

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Biorremediação do azo corante Amarelo tartrazina por três espécies de microalgas

Chlorophyta

Maryssa Fernanda Zecchin Simões

Orientadora: Profa. Dra. Inessa Lacativa Bagatini

São Carlos – SP

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Biorremediação do azo corante Amarelo tartrazina por três espécies de microalgas

Chlorophyta

Maryssa Fernanda Zecchin Simões

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Inessa Lacativa Bagatini

São Carlos – SP

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Maryssa Fernanda Zecchin Simões, realizada em 28/07/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Inessa Lacativa Bagatini (UFSCar)

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi (UFSCar)

Profa. Dra. Renata Fracácio Francisco (UNESP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, por todo esforço e dedicação que tiveram comigo ao longo da minha caminhada acadêmica, não apenas pelo apoio financeiro, mas por estarem sempre ao meu lado me apoiando.

Agradeço a Deus, por guiar os meus passos.

À Dra. Inessa Lacativa Bagatini, pela orientação exemplar, sempre presente e disposta a ajudar, com muita paciência e dedicação aos seus alunos.

Aos meus colegas de laboratório, Ana Beatriz, Ana Eliza, Ana Luiza, Elise, Juliana, Nathan, Wesley e Thais, por todo o companherismo durante essa caminhada.

Ao Luiz, técnico do laboratório, que além de sempre me ajudar com o que eu precisasse, se tornou um amigo e companheiro de trabalho.

Agradeço à Profa Dra Renata Fracácio pela indicação do Amarelo tartrazina e por sua participação na banca de defesa e sugestões.

Agradeço também à Profa Dra Ana Teresa Lombardi, pelas sugestões e participação na banca de defesa.

Ao meu namorado, Lucas, seu apoio e sua paciência foram fundamentais durante essa jornada.

À Universidade Federal de São Carlos por fornecer a infraestrutura necessária à realização deste trabalho e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, pela oportunidade da realização do Mestrado.

Aos funcionários do PPGERN: João e Roseli.

Ao laboratório de química da USP e ao técnico Aldimar, pela disponibilidade de me ajudar com minhas análises.

Ao financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida e ao auxílio concedido Programa de apoio à Pós-Graduação da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio do Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais - Código de Financiamento 001 (PROAP/CAPES PPGERN)

E por último, aos meus demais familiares e amigos por sempre estarem ao meu lado, me acompanhando e torcendo por mim.

Resumo

Corantes são um exemplo de produto tóxico liberado na natureza por indústrias de vestuário, cosméticos, alimentos e entre outros. O amarelo tartrazina, utilizado na indústria alimentícia, é um composto Azo, de cor amarelo alaranjado que pode afetar a saúde humana e desempenhar um papel negativo nas comunidades aquáticas. O capítulo I deste trabalho apresenta uma revisão bibliográfica dos efeitos toxicológicos de corantes azo em vários organismos e a remoção desses compostos por microrganismos. No capítulo II foi analisado o crescimento e a capacidade de remoção do amarelo tartrazina por três cepas axênicas de diferentes espécies de microalgas, *Desmodesmus spinosus* (Scenedesmaceae), *Muriella decolor* (Chlorellaceae) e uma cepa não identificada de Chlamydomonadales. O experimento foi realizado em triplicata em 3 condições: microalgas apenas em meio de cultivo; microalgas em meio de cultivo com tartrazina (70 mg L⁻¹); tartrazina em meio de cultivo sem algas. As curvas de crescimento e remoção do corante foram medidas por absorção em espectrofotômetro em 750 e 426 nm, respectivamente. Para a comparação das curvas de crescimento utilizamos análise de covariância. O contato com o corante não afetou significativamente ($p=0,6$) o crescimento da cepa de Chlamydomonadales, que foi capaz de remover 43% do corante no tratamento com a tartrazina ($p=0,004$). A cepa de *M. decolor* removeu significativamente 28% ($p=0,02$) do corante no meio com a tartrazina, sem que seu crescimento fosse afetado pelo corante ($p=0,4$). A remoção do corante realizada por *D. spinosus* também foi significativa, apresentando 25% ($p=0,003$) de remoção da tartrazina, e apresentando bom crescimento na presença apenas do corante ($p=0,6$). Este trabalho demonstra o potencial das microalgas em remover a tartrazina, corante pouco estudado, em um sistema estável por pelo menos 12 dias sem que seu crescimento seja afetado pelo corante.

Palavras-chave: águas residuais, corantes, fitoplâncton, água doce, biorremediação

Abstract

Dyes are an example of toxic compounds released into the environment by textile, cosmetics, and food industries, among others. Tartrazine, a yellow-orange dye widely used in the food industry, is an azo compound with deleterious effects on human health and aquatic communities. The chapter 1 of this work presents a literature review about the toxicological effects of azo dyes in various organisms and the removal of these compounds by microorganisms. In chapter 2, we analyzed the growth and tartrazine removal capacity of three axenic strains of microalgae, namely *Desmodesmus spinosus* (Scenedesmaceae), *Muriella decolor* (Chlorellaceae), and an unidentified species of Chlamydomonadales. The experiment was performed in triplicate under three conditions, as follows: microalgae grown in culture medium only, microalgae grown in culture medium containing 70 mg L⁻¹ tartrazine, and culture medium containing 70 mg L⁻¹ tartrazine without algae. Growth and dye removal curves were determined by measuring the absorbance at 750 and 426 nm, respectively. Covariance analysis was used to compare the curves. Dye exposure did not affect ($p = 0.6$) the growth of the Chlamydomonadales strain, which was able to remove 43% of tartrazine dye ($p = 0.004$). *M. decolor* cultured in medium containing tartrazine achieved 28% dye removal ($p = 0.02$); microalgal growth was not affected by the dye ($p = 0.4$). *D. spinosus* also significantly decreased dye concentration ($p = 0.003$), achieving 25% tartrazine removal and good growth in the presence of dye ($p = 0.6$). This study demonstrated the potential of microalgae to remove tartrazine, a dye that has received limited scientific attention, from a stable system, maintaining unaffected growth for a minimum of 12 consecutive days.

Keywords: wastewater, dyes, freshwater, phytoplankton, bioremediation

Sumário

Capítulo 1.....	8
Introdução geral.....	8
Azocorantes: efeitos tóxicos e biorremediação.....	8
Microrganismos como agentes de biorremediação.....	9
Referências bibliográficas.....	11
Capítulo 2.....	16
Introdução.....	16
Materiais e métodos.....	18
Resultados.....	20
Discussão.....	21
Conclusão.....	24
Referências bibliográficas.....	25
Fig.1	30
Fig.2	31
Material Suplementar.....	32
Fig.S1	33
Fig.S2	34
Fig.S3	34
Fig.S4	35

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

Azocorantes: efeitos tóxicos e biorremediação

Os corantes são contaminantes de grande preocupação ambiental, bastante utilizados por diversos setores industriais e apresentam alto risco para toda biota onde são despejados (Bhardwaj e Bharadvaja 2021; Premaratne et al. 2021; Selvaraj et al. 2021). Apesar de haver inúmeras classificações de corantes, os da classe azo são atualmente os mais utilizados para a coloração de produtos (Oon et al. 2020; Benkhaya et al., 2020).

Diversos estudos ecotoxicológicos já foram realizados com vários tipos de corantes azo, demonstrando o quão prejudicial eles podem ser. O estudo de El-Sakhawy Mohamed & Ahmed (2019), por exemplo, analisou a influência do amarelo tartrazina, um corante azo, no cerebelo e rins de ratos machos adultos albinos, demonstrando que o corante pode levar à hemorragia intersticial e dilatação dos capilares glomerulares dos rins.

Em outro trabalho, Hernández-Zamora e Martínez-Jerónimo (2019b), demonstraram os efeitos ecotoxicológicos do azo corante Direct blue 15 em uma espécie de produtor primário, a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* e em consumidores primários e secundários, a *Ceriodaphnia dubia* e *Danio rerio* (peixe zebra), respectivamente. A microalga *P. subcapitata* apresentou maior sensibilidade ao corante testado, atingindo um IC_{50} de $15,99 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto o LC_{50} da *C. dubia* foi de 450 mg L^{-1} . Em relação ao *Danio rerio*, de 96 a 144 horas após a fertilização, os embriões expostos ao corante apresentaram efeitos subletais sob concentrações de 100 a 500 mg L^{-1} , como deformações esqueléticas, edema no saco vitelino e cauda curvada. Após as 144 horas pós fertilização, à medida que a concentração do corante aumentava, começaram a surgir embriões sem batimentos cardíacos. Outro efeito deletério observado foi sob *C. dubia*, onde a 25 mg L^{-1} , ocorreu a diminuição no número de descendentes e atraso no início da reprodução (Hernández-zamora; Martínez-jerónimo, 2019b).

Um corante azo bastante utilizado na indústria alimentícia, é o Amarelo tartrazina, composto bastante prejudicial ao meio ambiente e à saúde humana (Amin e Al-shehri 2018; Kaya et al. 2021; Ranjbari et al. 2021) e que será abordado no capítulo II desse trabalho. Alguns estudos já foram realizados com esse composto, como no trabalho de El-Sakhawy Mohamed e Ahmed (2019), que apresenta uma série de resultados ecotoxicológicos relacionados à ação da tartrazina em diversos seres vivos, como no cerebelo e rins de ratos. O experimento consistiu na aplicação de doses contendo 7,5; 15

e 100 mg/kg/pc por dia em ratos machos adultos albinos, que ao final apontaram rins com hemorragia intersticial e dilatação dos capilares glomerulares.

No estudo de Albasher et al (2020), avaliaram as alterações comportamentais e desequilíbrio redox em ratos fêmeas grávidas, com exposições a tartrazina dentro dos valores de ingestão diárias aceitáveis (IDA) sem causar prejuízos à saúde, de 7,5 mg/kg peso corpóreo (Ferreira et al. 2021; Silva e Fracacio, 2021). Durante a gestação, as fêmeas receberam a tartrazina e os recém-nascidos eram sacrificados para que análises histológicas fossem realizadas entre 21 a 35 dias após o nascimento. Os autores encontraram diminuição de antioxidantes em algumas regiões do cérebro, parte locomotora alterada, ansiedade, aumento de plaquetas, leucócitos e eritrócitos, além de apresentarem estresse oxidativo.

Respostas ecotoxicológicas como as apresentadas nessa breve revisão, expõe a urgência de uma regulamentação mais séria, uma vez que corantes, principalmente da classe azo, por serem muito utilizados e descartados sem um tratamento prévio, são de extrema preocupação ambiental e social, trazendo muitos prejuízos ao meio ambiente e ser humano.

Microrganismos como agentes de biorremediação

Para buscar soluções sustentáveis à contaminação dos recursos hídricos por corantes e outros contaminantes como metais pesados, microplásticos, agrotóxicos e entre outros, muitos estudos de biorremediação vêm sendo desenvolvidos. A biorremediação já era um processo conhecido desde meados da década de 40, no entanto passou a ser mais utilizada a partir da década de 80 devido a um acidente de derramamento de óleo no Alasca. Esse processo é conhecido por utilizar microrganismos para a redução da poluição ambiental de diversos contaminantes, como fármacos, corantes, pesticidas, microplásticos e entre outros (Francisco; Queiroz, 2018).

Em relação à biorremediação, os microrganismos mais aplicados são as bactérias e fungos (El-Rahim et al. 2021; Prabhakar et al. 2021). A utilização desses organismos vem sendo estudada há mais tempo e são conhecidos por serem de baixo custo e ecologicamente funcionais, não havendo formação de novos poluentes (Aragaw; Asmare, 2018). A biorremediação pelos microrganismos citados anteriormente ocorre por meio da adsorção e biodegradação por enzimas (Sen et al., 2016). Nos processos de biorremediação bacteriana, são utilizadas abordagens aeróbicas, anaeróbicas e até mesmo

anaeróbicas facultativas, sendo capazes de remover corantes azo por meio de enzimas específicas, como a azo redutase (Ajaz et al. 2019).

Os principais fungos utilizados para a testes de biorremediação, são conhecidos como fungos da podridão branca, sendo o *Phanerochaete chrysosporium* o de maior interesse para aplicação nesses testes. As leveduras vêm também ganhando espaço em testes de biorremediação, mas apesar de apresentarem ser potenciais degradadoras enzimáticas de alguns compostos e metais pesados, são encontrados mais estudos em relação a sua capacidade de bioabsorção (Ajaz et al. 2019).

Segundo Ajaz et al (2019), alguns estudos mais antigos testaram espécies como, *Debaryomyces polymorphus*, *Issatchenkia occidentalis* e *Candida tropicalis*, para a degradação enzimática, sendo capazes de remover diversos corantes azo. Outro estudo recente, feito por Song et al. 2018, comprovaram a eficiência de *Cyberlindnera samutprakarnensis*, sob condições ótimas na remoção do azo corante vermelho ácido B de 97% em 18h. Mais recentemente vêm sendo realizados também muitos trabalhos sobre a ação de microalgas como agentes de biorremediação de corantes (Sinha et al. 2016; Ellatif et al. 2020).

Alguns trabalhos utilizam o consórcio de mais de uma espécie ou com organismos diferentes, como no estudo de Das & Mishra (2017), no qual os autores fizeram consórcio de cepas de *Bacillus pumilus* HKG212 e *Zobellella taiwanensis* AT1–3, apresentando um bom percentual de remoção sobre o azo corante verde reativo 19.

As microalgas, são outro tipo de microrganismos que vem sendo bastante visadas para esses testes. Elas são encontradas em uma variedade de habitats, como água doce, salgadas, águas residuais, superfícies de rochas úmidas e entre outros. Podem ser uni ou multicelulares, pertencentes ao domínio Eukarya, e formam um grupo artificial de eucariotos fotossintetizantes que surgiram de diferentes processos de endossimbiose (Gould et al., 2008). São os principais organismos, junto às cianobactérias, responsáveis pela atmosfera oxigenada conhecida hoje, além de serem a base da rede trófica aquática, responsáveis por manter o equilíbrio ecológico desses ecossistemas, desempenhando um papel fundamental para o bom funcionamento do planeta (Almeida et al., 2020; Graham et al., 2016).

O surgimento das cianobactérias está registrado em torno de 3,5 milhões de anos (Almeida et al., 2020). Posteriormente, deram origem aos cloroplastos das microalgas por diferentes processos de endossimbiose. Em um primeiro momento, um organismo eucarioto englobou um endossimbionte procarioto (cianobactéria) originando o

cloroplasto do hospedeiro (organismo eucarionte), um processo denominado de endossimbiose primária, que deu origem as Archaeplastida, representadas por Chlorophyta, Rhodophyta e Glaucophyta. Posteriormente, outros grupos surgiram por processo de endossimbiose secundária, em que clorófitas e rodófitas originaram os cloroplastos de diferentes linhagens evolutivas (Gould et al., 2008).

Por possuírem processos evolutivos distintos, há um número significativo de espécies, que resulta em uma grande diversidade metabólica e de pigmentação, sendo organismos capazes de absorver diferentes quantidades e qualidades de luz (Graham et al. 2016). Espécies do gênero *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Desmodesmus* são bastante conhecidas em testes de biorremediação de corantes e apresentam excelentes resultados (Keskin et al. 2015; Sinha et al. 2016; Abou-el-souod et al. 2020; Wang et al. 2020). Wang et al (2020), por exemplo, mostraram que a *Chlorella vulgaris* foi capaz de remover o azo corante G-Red. A espécie *Desmodesmus obliquus* apresentou uma porcentagem de 41,15 e 48,60% de remoção de vermelho congo e vermelho de metila, respectivamente (Abou-el-souod et al. 2020).

Microalgas como *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *S. obliquus*, se apresentam como potenciais remediadoras de compostos azo, removendo corantes como direct red 31, Laranja G, Remazol Black 5, Vermelho metil e entre outros sendo capazes de atingir entre 18 a 90% de remoção desses compostos (Keskin et al. 2015; Sinha et al. 2016; Ellatif et al. 2020; El-Naggar et al. 2022). No capítulo 2, trataremos o Amarelo tartrazina, no qual apresentaremos nossos resultados na utilização de três diferentes gêneros de microalgas para testes de biorremediação, uma vez que há escassez de trabalhos com esse corante altamente tóxico e de grande utilização industrial.

Referências bibliográficas

Abou-el-Souod, G; Hamouda, G. A; El-sheekh, M. Influence of heavy metal as co-contamination on biodegradation of dyes by free and immobilized *Scenedesmus obliquus*. *Desalination and Water Treatment*, 2020.

Ajaz M, Shakeel S, Rehman A (2019) Microbial use for azo dye degradation a strategy for dye bioremediation. *International Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00103-2>.

Albasher G, Maashi N, Alfarraj S, Almeer R, Albrahim T, Alotibi F, Bin-Jumah M, Mahmoud AM (2020) Perinatal Exposure to Tartrazine Triggers Oxidative Stress and Neurobehavioral Alterations in Mice Offspring. *Antioxidants*, v. 9, n. 1, p. 53. <https://doi.org/10.3390/antiox9010053>.

Almeida W. et al. Algas. In: FERREIRA, M. J. F. V. Rios de Portugal. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2020. p 75 – 96
Ayangbenro AS, Babalola, OO (2017) A new strategy for heavy metal polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph14010094>.

Alshehrei F (2020) Role of microorganisms in biodegradation of food additive Azo dyes: A review. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 19(11), pp.799-805. <https://doi.org/10.5897/AJB2020.17250>.

Amin K, Al-shehri FS (2018) Toxicological and safety assessment of tartrazine as a synthetic food additive on health biomarkers: A review. *African Journal of Biotechnology*. Vol.17(6), pp, 139-149. <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16300>.

Aragaw TA; Asmare AM (2018) Phycoremediation of textile wastewater using indigenous microalgae. *Water Practice & Technology*. <https://doi.org/10.2166/wpt.2018.037>.

Benkhaya S, M'rabet S, Harf AE (2020) Classifications, properties, recent synthesis, and applications of azo dyes. *Heliyon*. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03271>.

Bhardwaj D, Bharadvaja N (2021) Phycoremediation of effluents containing dyes and its prospects for value-added products: A review of opportunities. *Journal of water process engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102080>.

Das A. Mishra S (2017) Removal of textile dye reactive green-19 using bacterial consortium: Process optimization using response surface methodology and kinetics study. *Journal of Environmental Chemical Engineering*.

Ellatif SA, El-sheekh MM Senousy, HH (2020) Role of microalgal ligninolytic enzymes in industrial dye decolorization, *International Journal of Phytoremediation*. <https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1789842>.

El-Naggar NE, Hamouda RA, Abou-El-Souod GW (2022) Statistical optimization for simultaneous removal of methyl red and production of fatty acid methyl esters using fresh alga *Scenedesmus obliquus*. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11069-z>.

El-Sakhawy MA.; Mohamed DW, Ahmed YH (2019) Histological and immunohistochemical evaluation of the effect of tartrazine on the cerebellum, submandibular glands, and kidneys of adult male albino rats. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, n. 10, p. 9574-9584. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04399-5>.

Ferreira PG. et al. There is Chemistry Here: Supermarket, Part II: Natural and Synthetic Dyes. *Rev. Virtual Quim.*, 2022, 14(2), 267-283.

Francisco WC, Queiroz TM (2018). Biorremediação. *Nucleus*, v.15, n.1, abr. 2018.

Prabhakar Y, Gupta A, Kaushik A (2021) Using indigenous bacterial isolate *Nesterenkonia lacusekhoensis* for removal of azo dyes: A low-cost ecofriendly approach for bioremediation of textile wastewaters. *Environment, Development and Sustainability*. <https://doi.org/10.1007/s10668-021-01661-0>.

Gould SB, R. F. Waller, et al. (2008). "Plastid evolution." *Plant Biology* 59(1): 491.

Graham LE, Graham JM, Wilcox LW, Cook ME (Eds) (2016) *Algae*, 3rd edition. LJLM Press, Madison.

Hernández-Zamora M, Martínez-jerónimo F. (2019a) Exposure to the azo dye Direct blue 15 produces toxic effects on microalgae, cladocerans, and zebrafish embryos. *National Library of Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02087-1>.

Hernández-Zamora M, Martínez-jerónimo F (2019b) Congo red dye diversely affects organisms of different trophic levels: a comparative study with microalgae, cladocerans, and zebrafish embryos. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04589-1>.

Hernández-zamora; Martínez-jerónimo (2015) Bioremoval of the azo dye Congo Red by the microalga *Chlorella vulgaris*. *National Library of Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4277-1>.

Kaya SI, Cetinkaya A, Ozkan SA (2021) Latest advances on the nanomaterials-based electrochemical analysis of azo toxic dyes Sunset Yellow and Tartrazine in food samples. *Food and Chemical Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112524>.

Keskin NOS, Celebioglu A, Uyar T, Tekinay T (2015) Microalgae immobilized nanofibrous web for removal of reactive dyes from wastewater. *Washington, DC: Industrial & Engineering Chemistry Research*. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b01033>.

- Oon Y, Ong S, Ho L, Wong Y, Dahalan FA, Oon Y, Teoh T, Lehl HK, Thung W (2020) Constructed wetland–microbial fuel cell for azo dyes degradation and energy recovery: Influence of molecular structure, kinetics, mechanisms, and degradation pathways. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137370>.
- Premaratne M, Nishshanka GKSH, Liyanaarachchi VC, Nimarshana PHV, Ariyadasa TU (2021) Bioremediation of textile dye wastewater using microalgae: current trends and future perspectives. *Wiley Online Library*. <https://doi.org/10.1002/jctb.6845>.
- Ranjbari S, Ayati A, Tanhaei B, Al-Othman A, Kamiri F (2022) The surfactant-ionic liquid bi-functionalization of chitosan beads for their adsorption performance improvement toward Tartrazine. *Environmental Research*. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111961>.
- Selvaraj V, Karthika TS, Mansiya C, Alagar M (2021) An over review on recently developed techniques, mechanisms and intermediate involved in the advanced azo dye degradation for industrial applications. *Journal of Molecular Structure*. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129195>.
- Sen SK, Raut S, Bandyopadhyay P, Raut S (2016) Fungal decolouration and degradation of azo dyes: A review. *Fungal biology reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.06.003>.
- Song Z, Song L, Shao Y, Tan L (2018) Degradation and detoxification of azo dyes by a salt-tolerant yeast *Cyberlindnera samutprakarnensis* S4 under high-salt conditions. *World J Microbiol Biotechnol* 34:131. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2515-7>.
- Silva J, Fracacio R, (2021) Toxicological and ecotoxicological aspects of tartrazine yellow food dye: a literature review. *Brazilian Journal of Environmental Sciences*. <https://doi.org/10.5327/Z21769478746>.
- Sinha S, Singh R, Chaurasia AK, Nigam S (2016) Self-sustainable *Chlorella pyrenoidosa* strain NCIM 2738 based photobioreactor for removal of Direct Red-31 dye along with other industrial pollutants to improve the water-quality. *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.12.011>.

CAPÍTULO II

**Biorremediação do azo corante Amarelo tartrazina por três espécies de microalgas
Chlorophyta****Introdução**

Nas últimas décadas, muito tem se falado dos problemas ambientais causados pelo aumento populacional e uso desenfreado de recursos naturais não renováveis (Severo et al, 2021). Um exemplo, é a contaminação de corpos d'água pelo descarte de corantes sintéticos utilizados por setores industriais distintos, como o alimentício, cosmético, farmacêutico, têxtil, fotográfico, plástico etc. (Benkhaya et al. 2020; Ranjbari et al. 2021; Vishani e Shrivastav 2022).

Devido à sua ampla utilização, os corantes muitas vezes são descartados de forma irresponsável, ocasionando sérios problemas ambientais e contaminando diversos ecossistemas, mas principalmente os aquáticos. Além de sua possível toxicidade, esses corantes podem afetar a biodiversidade local por prejudicarem a penetração de luz em corpos d'água, aumentarem a demanda química (DQO) e bioquímica (DBO) de oxigênio, causando a diminuição do oxigênio dissolvido e aumento de nitrogênio e fósforo (Ardila-leal et al. 2021; Bhardwaj e Bharadvaja 2021). Essas alterações influenciam a produção primária no ambiente e a eutrofização, afetando diretamente a estética e o odor do local (Premaratne et al. 2021; Selvaraj et al. 2021).

Os corantes podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química e aplicação, divididos nas seguintes classes: antraquinona, polimetino, nitroso, nitro, xanteno, azo e outros (Benkhaya et al. 2020; Ranjbari et al. 2021). Corantes do tipo Azo são os de maior aplicação industrial atualmente, representando 60% a 80% do uso de corantes comparado às outras classes e são de baixo custo (Oon et al. 2020; Benkhaya et al. 2020; Ranjbari et al. 2021; Vishani e Shrivastav 2022).

A grande utilização de corantes de classificação azo ocorre devido ao alto grau de estabilidade para coloração, por serem hidrossolúveis e resistentes, características dadas pela presença de uma ou mais duplas ligações de nitrogênio (N=N), denominado de grupo azo, o qual está ligado a uma estrutura aromática (Benkhaya et al. 2020; Oon et al. 2020; Vishani e Shrivastav 2022). São difíceis de degradar, até mesmo por métodos tradicionais (Ardila-Leal et al. 2021).

Um exemplo de corante de classificação azo amplamente utilizado é o amarelo tartrazina, altamente solúvel em água devido a sua composição e estrutura: seu grupamento Azo está ligado a dois grupos sulfônicos e conta com a presença de um grupo funcional de ácido carboxílico (Al-Shabib et al., 2017; Silva e Fracácio, 2021). Esse corante, embora seja empregado na indústria de cosméticos, farmacêutica e têxtil, sua principal aplicação é na indústria alimentícia (Tekin et al. 2018; Ardila-leal et al. 2021; Wu et al. 2021).

Ele pode estar presente em uma variedade de alimentos, como refrigerantes, algodão doce, salgadinhos, gomas de mascar, geléias, sorvetes, mostarda, cereais, sucos artificiais e produtos enlatados, sendo prejudiciais à saúde humana, podendo desencadear urticária, asma e bronquite, câncer na tireóide, hiperatividade e déficit de atenção, principalmente em crianças, pelo alto consumo de alimentos com a tartrazina (Amin e Alshehri 2018; Ardila-leal et al. 2021; Kaya et al. 2021; Wu et al. 2021; Ranjbari et al. 2021), além de apresentar toxicidade para outros organismos.

De acordo com Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2017), o limite máximo de ingestão diária aceitável (IDA) da Tartrazina é 7,5 mg/kg peso corpóreo sem causar prejuízos à saúde. No entanto, mesmo o seu uso aprovado pela FAO/WHO, é o composto com mais reações negativas ao ser humano, comparado a outros autorizados para aplicação (Ferreira et al. 2021; Silva e Fracácio, 2021).

A remediação de corantes é um passo muito importante para diminuir sua presença em corpos d'água, porém técnicas físico-químicas, como floculação, coagulação, filtração por membrana e adsorção, são inviáveis por serem ecologicamente prejudiciais, ocasionando a formação de novos poluentes, como grandes quantidades de lama (Sarmah et al, 2019; Ihsanullah et al. 2020; Severo et al, 2021). Uma alternativa, é a biorremediação, que utiliza microrganismos como fungos, bactérias e microalgas para descontaminação de locais com altos índices de poluição (Saba et al. 2016; Sen et al. 2016; Ihsanullah et al. 2020; Bhardwaj e Bharadvaja 2021; Premaratne et al. 2021).

A utilização de fungos e bactérias para a biorremediação é uma técnica que vem sendo estudada há mais tempo e são conhecidos por serem de baixo custo e ecologicamente funcionais, não havendo formação de novos poluentes (Aragaw e Asmare 2018). Estudos mais recentes, mostram a ação de microalgas na ficorremediação de produtos tóxicos (Keskin et al. 2015; Sinha et al. 2016; Behl et al. 2020; Ellatif et al. 2020), onde diferentes mecanismos de remoção, são usados por esses organismos, como a biodegradação, por meio de liberação de enzimas específicas (Chen et al. 2016; Sinha

et al. 2016; Ellatif et al. 2020) e a adsorção, onde os contaminantes se aderem à parede celular (Keskin et al. 2015; Behl et al. 2020).

Microalgas são de um modo geral, organismos fotoautotróficos, podendo ser encontradas espécies mixotróficas, capazes de sobreviver em diversos habitats, inclusive sob condições extremas de estresse e pouca luminosidade (Graham et al. 2016). Das espécies testadas até o momento na remoção de corantes azo em geral, algumas apresentam melhores potenciais, como é o caso de espécies dos gêneros da cianobactéria *Oscillatoria* e das microalgas verdes *Chlorella*, *Chlamydomonas* e *Scenedesmus* (Keskin et al. 2015, El-Sheekh1 et al, 2018; Ajaz et al., 2019; Abou-el-Souod et al. 2020; Behl et al. 2020)

A ação desses organismos é eficaz pois as enzimas liberadas agem diretamente na quebra da ligação N=N da molécula de corantes azo, sendo conhecidas como azo redutases, laccase e peroxidase (Keskin et al. 2015; Ellatif et al. 2020). Essa quebra de ligação azo é um passo importante para a remediação, porém ocasiona a formação de pequenas aminas, que apesar de incolores, continuam sendo uma grande preocupação ecológica, se mantendo tóxicas para o meio ao qual estão inseridas. Contudo, já foram reportados trabalhos de algumas espécies de *Chlorella* e *Oscillatoria* para uma metabolização aeróbica, transformando essas aminas em compostos orgânicos e até mesmo em CO₂ (El-Sheekh1 et al. 2018; Ajaz et al. 2019).

Apesar da grande diversidade biológica e fisiológica das microalgas e cianobactérias, é restrito o número de trabalhos e as espécies testadas na biorremediação de corantes azo, mais restrito ainda para o amarelo tartrazina. A *Chlorella*, seguido da *Chlamydomonas* e *Scenedesmus*, são espécies que apresentam resultados satisfatórios a remoção e degradação de compostos azo, composto que apresenta alto risco ambiental e à saúde humana, sendo encontrado na literatura, inúmeros trabalhos que as utilizam em seus testes (Keskin et al. 2015; Sinha et al. 2016; Ellatif et al. 2020; El-Naggar et al. 2022).

Considerando a escassez de trabalhos sobre a biorremediação do amarelo tartrazina e os potenciais efeitos tóxicos para o ser humano e a biota aquática, nós testamos a capacidade de remediação desse corante por 3 espécies de microalgas ainda não utilizadas em trabalhos de biorremediação.

Materiais e métodos

Microalgas utilizadas

As três cepas utilizadas para a realização do experimento, foram obtidas da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da Universidade Federal de São Carlos, CCMA-UFSCar (World Data Centre for Microorganisms WDCM 835) todas mantidas em condições axênicas (Tabela 1).

Tabela 1. Cepas de microalgas testadas durante o experimento, para a remoção do corante amarelo tartrazina, local e ano de isolamento e GPS do local de isolamento.

Cepa	Espécie	Local (ano) de isolamento	GPS
CCMA-UFSCar 62	<i>Desmodesmus spinosus</i> Chodat (Chlorophyceae, Sphaeropleales)	Luiz Antônio – SP (1987)	21°36'28.5"S 47°46'13.1"W
CCMA-UFSCar 138	Chlamydomonadales não identificada (Chlorophyceae, Chlamydomonadales)	Luiz Antônio – SP (1982)	21°36'28.5"S 47°46'13.1"W
CCMA-UFSCar 320	<i>Muriella decolor</i> (Trebouxiophyceae, Chlorellales)	Porto Velho – RO (2011)	8°24'18,6"S 63°27'13,6"W

As cepas utilizadas neste estudo foram selecionadas pela proximidade filogenética com espécies utilizadas em outros trabalhos. Diferentes trabalhos na literatura mostraram o potencial de espécies da Ordem Chlamydomonadales (cepa CCMA-UFSCar 138) e da Família Scenedesmaceae (cepa CCMA-UFSCar 62) na biorremediação de corantes azo (Keskin et al. 2015; Abou-el-souod et al. 2020; Behl et al. 2020; El-Naggar et al. 2022). *M. decolor* foi escolhida também por pertencer à mesma família da *Chlorella*, que é bastante utilizada e apresenta excelentes resultados de remoção de corantes (Sinha et al., 2015; Wang et al. 2016; El-Sheekh et al. 2018; Ellatif et al. 2020). Além disso, na etapa pré-experimental, as três espécies apresentaram bom crescimento e remoção da tartrazina, o que influenciou diretamente na escolha das cepas para a etapa experimental.

Corante utilizado

O Amarelo Tartrazina (C₁₆H₉N₄Na₃O₉S₂), é um monoazo com massa molar de 534,3 g/mol e de absorção máxima em solução aquosa a 426 nm (Diretiva 95/45/CE, 1995; Donoso et al. 2021; Silva e Fracacio, 2021; Kaya et al. 2021).

Condições de cultivo

Os cultivos experimentais foram realizados em meio WC pH 7,0 (Ghillard e Lorenzen 1972) a 23 ± 1°C, 142 μmol fótons m⁻² s⁻¹ com luz LED 2700 k (branca quente)

com fotoperíodos de 12/12 horas claro/escuro. Todos os cultivos se iniciaram com 3×10^4 células mL^{-1} retiradas de culturas em crescimento exponencial (8 dias de cultivo). A contagem celular foi realizada em câmara de Fucks-Rosental.

Todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas e as manipulações realizadas em uma cabine de Fluxo Laminar Horizontal VLFS-12 (VECO, Brasil), para evitar a contaminação por outros microrganismos.

Realizamos uma etapa preliminar, em tubos de ensaio (dados não mostrados) para determinar a melhor concentração de trabalho para o experimento principal. A partir da revisão bibliográfica realizada, foram selecionadas três concentrações iniciais, de 20, 70 e 200 para a etapa, que estão dentre as concentrações mais utilizadas pelos trabalhos com microalgas e que apresentaram resultados satisfatórios (e.g. Sinha et al. 2016; Ellatif et al. 2020; Keskin et al. 2020; El-Naggar et al. 2022).

Visto que o intuito do trabalho era testar a remoção do corante pelas microalgas, nós selecionamos a concentração de 70 mg L^{-1} , pois não afetou o crescimento da maioria das cepas, estava em limite máximo detectável pelo espectrofotômetro UV-VIS e era ainda uma concentração maior do que o utilizado na maioria dos trabalhos encontrados na literatura (Keskin et al. 2015; Behl et al. 2020; El-naggar et al. 2022).

Etapa pré-experimental

Foi realizado um pré experimento para verificar a influência da qualidade da luz nos cultivos com o corante amarelo tartrazina no crescimento dos organismos. Essa etapa foi realizada nas mesmas condições da etapa experimental, mas em frascos de cultivos de células de 250 mL. Os frascos contendo apenas a tartrazina em meio de cultivo, foram colocados entre o foco de luz e frascos controles – microalgas em meio de cultivo – para determinar seu crescimento em comparação aos controles que estavam diretamente sob o foco de luz (Fig.S1). Além disso, um tratamento de tartrazina com as culturas de microalgas também foi realizado, para testar a capacidade de degradação das espécies

Etapa experimental

Para analisar a remoção do corante amarelo tartrazina na concentração de 70 mg L^{-1} , cada microalga foi cultivada em triplicata em tubos de ensaio de 10 mL nas condições de cultivo descritas anteriormente. O Experimento foi conduzido sob 3 condições (Fig.S1). As condições utilizadas foram: a) controle da microalga (CM) - microalga em meio de cultivo; b) tratamento tartrazina (TT) – cultivo da microalga com tartrazina (70 mg L^{-1}); c) controle da tartrazina (CT) - tartrazina em meio de cultivo sem algas. Os tubos

foram colocados em uma superfície plana com iluminação por baixo por luz branca quente (2700k) e foram agitados e sua posição aleatorizada duas vezes por dia.

As curvas de crescimento das algas foram acompanhadas por absorvância em 750 nm e a degradação da tartrazina a 426 nm nos dias de cultivo 0, 8 e 12, que foram selecionados de acordo com os dados obtidos na etapa preliminar e pré experimental e a partir dos trabalhos estudados na revisão bibliográfica. A remoção da tartrazina nos cultivos com microalgas (TT) foi analisada após filtração em filtro de 0,45 µm (PET Chromafil) para retirada das células. O controle CT também foi filtrado para excluir possível interferência de adsorção do corante no filtro.

Análises estatísticas

As curvas de remoção da tartrazina e crescimento das microalgas foram comparadas por meio da análise de covariância (ANCOVA). Para verificar homogeneidade dos dados foi realizado o teste de Levene e a normalidade teste de Shapiro-Wilk. As análises foram realizadas no ambiente R e a significância dos resultados foi avaliada por $\alpha = 0,05$. Para nenhum dos tratamentos houve violação conjunta da normalidade e homoscedasticidade, permitindo o uso da ANCOVA (Olejnik e Algina, 1984).

Para calcular a porcentagem de descoloração de espécie testada nesse trabalho, foi utilizada a fórmula, de acordo com trabalhos da literatura (e.g. Keskin et al, 2015; Sinha et al, 2016; Behl et al, 2019)

$$\text{Descoloração (\%)} = \frac{(\text{absorvância inicial} - \text{absorvância final})}{(\text{absorvância inicial})} \times 100$$

Resultados

Na etapa pré-experimental, os resultados obtidos mostraram que as cepas *D. spinosus* e *M. decolor*, não foram afetadas pela qualidade luminosa ($p=0,94$ e $p=0,08$) (Fig.S2). No entanto, a análise do crescimento da cepa de Chlamydomonadales não identificada (CCMA-UFSCar 138) não foi possível, porque as células se aderiram às paredes do frasco, formando um biofilme e impossibilitando sua amostragem (Fig.S2). Foi possível atestar seu crescimento visualmente, mas também pela remoção significativa da tartrazina ($p=0,003$) (Fig.S3) (Fig.S4).

Na etapa experimental, dentre as espécies utilizadas nesse trabalho, a *Muriella decolor*, nunca utilizada em testes de biorremediação, apresentou bons resultados na remoção da tartrazina, atingindo resultado significativo de 28% de remoção ($p=0,02$) em comparação ao controle de tartrazina (CT). A *Desmodesmus spinosus* (Chodat) E.

Hegewald, apresentou resultados parecidos, atingindo 25% de remoção da tartrazina, sendo estatisticamente diferente do CT ($p=0,003$) (Fig.1).

Em relação ao crescimento da *M. decolor* no tratamento de tartrazina, não houve toxicidade para a espécie, pois não apresentou diferença significativa em relação ao controle CM ($p=0,4$). Da mesma forma, *D. spinosus*, apresentou crescimento igual ao controle (CM) ($p=0,6$) em tratamento com o corante (TT) (Fig.2). A cepa de Chlamydomonadales CCMA-UFSCar 138, foi a que obteve maior porcentagem de remoção da tartrazina, atingindo 43% ($p=0,004$) durante os 12 dias de experimento (Fig.1). Em relação ao seu crescimento, a alga não foi afetada pela toxicidade do corante ($p=0,06$) (Fig.2).

Discussão

São encontrados na literatura diversos trabalhos sobre biorremediação de produtos tóxicos, dentre eles, estudos com azocorantes realizados com vários microrganismos, como bactérias, fungos (Zahran et al. 2019; El-Rahim et al. 2021; Prabhakar et al. 2021) e microalgas (El-Naggar et al. 2022; Omar, 2008; Sinha et al. 2015). No entanto, na literatura há apenas um trabalho (Omar 2008) que testou a biorremediação da tartrazina por microalgas.

Microrganismos podem realizar a biorremediação por diferentes processos, o de biodegradação e a adsorção. No primeiro caso, os microrganismos liberam enzimas específicas que realizam a quebra dos poluentes, e podem utilizar os compostos degradados como fonte de nutrientes para seu crescimento, uma vez que esse processo é realizado pela célula viva (Chen et al. 2016; Sinha et al. 2016; Ellatif et al. 2020). Na adsorção é processo realizado passivamente, por um metabolismo não ativo, no qual os grupos funcionais da parede celular dos organismos se ligam às moléculas dos poluentes, os deixando retidos em suas paredes (Keskin et al. 2015; Behl et al. 2020).

Os estudos com diferentes microrganismos são importantes porque a porcentagem de remoção dos azocorantes pode ser influenciada por diversos fatores, como o tempo de incubação, a concentração do composto, a temperatura, o pH (Majumdar et al. 2022), a estrutura e composição do corante, a interação das espécies testadas com os diferentes tipos existentes desses compostos e a quantidade de ligações azo presente em sua estrutura (Keskin et al. 2015; Oon et al. 2020; Vishani e Shrivastav 2022). Além disso, o comportamento dos microrganismos pode mudar na presença de diferentes compostos e condições do local onde estão inseridos (Prabhakar et al. 2021).

Uma vez que os trabalhos com microalgas são escassos, para efeito de comparação, trazemos dados de biorremediação do amarelo tartrazina por outros microrganismos e de outros azocorantes por microalgas dos mesmos gêneros ou famílias utilizadas por nós.

Em relação à biorremediação por bactérias e fungos, as porcentagens de descoloração da tartrazina variam bastante entre os trabalhos na literatura, dependendo dos fatores citados acima (Zahran et al. 2019; El-Rahim et al. 2021; Prabhakar et al. 2021). Fungos do gênero *Aspergillus* degradaram mais de 66% da tartrazina a 20 mg L⁻¹ em pH 5 (El-Rahim et al. 2021). A bactéria *Nesterenkonia lacusekhoensis* EMLA3, testada para a remoção de 11 corantes azo, removeu 98% da tartrazina a 100 mg L⁻¹ em 5 dias e pH 11, bastante básico, mas favorável à espécie, uma vez que foi isolada de um efluente extremamente alcalino (pH 13) (Prabhakar et al. 2021).

Em condições de pH semelhantes às que usamos, ou seja, próximo ao pH 7,0, as bactérias *Brevibacillus brevis* e *Bacillus subtilis* foram as que apresentaram maiores porcentagens de remoção do corante amarelo tartrazina, respectivamente 62,02 e 54,4% em 3 dias (El-Rahim et al. 2021). A descoloração mais rápida do que a encontrada por nós pode ser devida às maiores taxas de crescimento nas bactérias (Zubkov 2014) e à menor concentração do corante no trabalho citado, que foi de 20 mg L⁻¹, ou seja, menos de 30% da concentração utilizada em nosso estudo.

O comparativo mais próximo aos nossos testes é com o trabalho de Omar (2008), no qual as microalgas testadas sob condições axênicas apresentaram bons resultados para a remoção da tartrazina. Dentre as espécies testadas, estão *Scenedesmus bijugatus*, *Scenedesmus obliquus* (ambas Scenedesmaceae) e *Chlorella vulgaris* (Chlorellaceae). *S. bijugatus*, atualmente sinônimo de *Tretradesmus obliquus* (Guiry e Guiry 2020) foi a que apresentou melhor resultado de remoção em diferentes concentrações.

Quando testada a 20 mg L⁻¹ de tartrazina, essa cepa apresentou aproximadamente 60% de remoção em 6 dias, enquanto *C. vulgaris* e *S. obliquus*, removeram aproximadamente 45% e 55% da tartrazina, respectivamente. Em nosso estudo, a concentração utilizada da tartrazina foi maior, o que pode ter influenciado na menor remoção em relação às cepas citadas do estudo de Omar 2008. No entanto, ambos os trabalhos provaram a eficiência de diferentes cepas de microalgas na remoção desse corante, demonstrando a viabilidade da utilização desses organismos para a biorremediação do amarelo tartrazina.

Os trabalhos de biorremediação de outros tipos de azo corantes por microalgas também demonstram como esses microrganismos exercem um trabalho fundamental para a biorremediação desses compostos. Um exemplo é a utilização da espécie *S. obliquus* (Scenedesmaceae) que em diferentes repetições de um experimento de 14 dias removeu entre 29,6 e 70,6% do monoazo Vermelho metil a concentrações de até 30 mg L⁻¹ (El-Naggar et al. 2022). A *D. spinosus*, utilizada em nosso estudo, mesmo a uma maior concentração de tartrazina, atingiu uma porcentagem similar, de 25% em 12 dias de experimento. Apesar de algumas diferenças no tempo experimental, das espécies e concentrações dos diferentes corantes utilizados, ambos os trabalhos demonstram o potencial desse gênero para a remoção de compostos azo.

Em outro trabalho, Keskin et al (2015) imobilizaram a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlamydomonadales) utilizando uma rede nanofibrosa de polisulfona para testar sua capacidade de degradação do azocorante Remazol Black 5 (RB5). Após 14 dias de incubação houve a remoção de 73% do RB5 a 10 mg L⁻¹, 47,7% a 25 mg L⁻¹ e 18,07% a 50 mg L⁻¹. Além da imobilização celular, os autores realizaram experimentos com as células livres, concluindo que células imobilizadas, apresentam melhores resultados de remoção.

Nossa cepa de Chlamydomonadales foi testada com suas células livres para a remoção da tartrazina a uma concentração maior do que a de RB5 do trabalho de Keskin et al (2015) e apresentou resultados significativos. A imobilização celular é uma opção para estudos futuros com essa cepa, podendo ser utilizada em matrizes para tratamento de efluentes, uma vez que ela se adere facilmente às superfícies, característica comprovada no pré-experimento que realizamos em frascos de células. Na etapa experimental em tubos de ensaio, a cepa também apresentou aderência as paredes dos tubos, mas a agitação vigorosa em vórtex para leitura em espectrofotômetro removia a maioria das células aderidas.

Por não serem encontrados trabalhos na literatura da capacidade de biorremediação da cepa de *Muriella decolor*, utilizada por nós, apresentaremos alguns estudos que mostram o potencial do gênero *Chlorella* (também Chlorellaceae), que apresenta resultados promissores para a remoção de corantes azo (Sinha et al. 2016; Ellatif et al. 2020).

Sinha et al (2016) demonstrou o grande potencial da *Chlorella pyrenoidosa* NCIM 2738 para a remediação do diazo Direct red 31 (DR-31) nas primeiras 3 horas de experimento, em condições axênicas, atingindo 78,66% de remoção do corante a 40 mg

L⁻¹. No entanto, os autores mostram uma queda no crescimento da *Chlorella pyrenoidosa* a concentrações acima de 50 mg L⁻¹, afetando diretamente a remoção do composto. Os autores também demonstram que a remoção ocorre de forma mais eficiente em pH mais baixo, como pH 3. Para a tartrazina neste trabalho foi testado apenas o pH 7.

Em outro trabalho, Ellatif et al 2020, mostraram que entre diversas espécies de microalgas testadas, a *Chlorella vulgaris* foi a que apresentou melhores resultados, atingindo 99,5% de remoção dos azos corantes Laranja G e Brazilwood em 7 dias a uma concentração de 200 mg L⁻¹. A alta porcentagem de remoção do corante ocorreu possivelmente pela alta concentração inicial de células, 100x do que a utilizada por nós. Dessa forma, é importante levar em consideração em estudos futuros, a quantidade de células iniciais utilizadas, pois podem aumentar as porcentagens de remoção e otimizar o trabalho desses organismos.

De acordo com os resultados apresentados em nosso estudo e dos trabalhos encontrados na literatura, a biorremediação por microalgas se apresenta como uma abordagem sustentável para a problemática ambiental. Além de ajudar na redução da contaminação, auxilia também na redução de pegada de carbono, pois durante seu crescimento e remoção de compostos tóxicos, ela consome CO₂, podendo a sua biomassa ser usada como crédito de carbono pelas empresas (Severo et al. 2021).

De acordo com os trabalhos revisados na literatura para a realização do presente estudo e com os resultados do nosso experimento, vimos que as microalgas são organismos promissores para a aplicação da biorremediação do corante amarelo tartrazina e outros compostos azo. No entanto, é importante haver novos estudos, em média e larga escala para otimização de resultados. Além disso, como apresentado no capítulo 1 desse trabalho, há inúmeras consequências do descarte desses compostos em corpos d'água, sendo necessário que haja uma regulamentação mais firme em relação ao descarte de corantes em ecossistemas aquáticos.

Conclusão

O presente trabalho é importante por apresentar espécies com potencial de degradação de tartrazina, corante de uso progressivo na indústria alimentícia, que tem causado insegurança alimentar e ainda pouco estudado para biorremediação.

A cepa de Chlamydomonadales foi a que apresentou melhores porcentagens de remoção da tartrazina, sendo uma alternativa para futuros estudos de imobilização celular devido a sua aderência nas paredes dos frascos de cultura e dos tubos de ensaio.

São necessários mais estudos com microalgas para a biorremediação, assim como testar novas espécies que podem apresentar resultados satisfatórios. Neste trabalho apresentamos novas espécies que podem ser testadas para biorremediação de outros azocorantes, mostrando que espécies ainda não testadas podem oferecer potenciais soluções sustentáveis para o tratamento de resíduos desses compostos.

Referências bibliográficas

Albasher, G. et al. Perinatal Exposure to Tartrazine Triggers Oxidative Stress and Neurobehavioral Alterations in Mice Offspring. *Antioxidants*, v. 9, n. 1, p. 53, 2020

Almeida W. et al. Algas. In: Ferreira, M. J. F. V. Rios de Portugal. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2020. p 75 – 96
Ayangbenro AS, Babalola, OO (2017) A new strategy for heavy metal polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph14010094>.

Amin K, Al-shehri FS (2018) Toxicological and safety assessment of tartrazine as a synthetic food additive on health biomarkers: A review. *African Journal of Biotechnology*. Vol.17(6), pp, 139-149. <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16300>.

Ajaz M, Shakeel S, Rehman A (2019) Microbial use for azo dye degradation a strategy for dye bioremediation. *International Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00103-2>.

Al-shabib NA, JM, Khan MS, Ali MS, Al-Senaïdy AM, Alsenaidy, Fohad MA, Husain M, Al-Lohedan HA (2017) Synthetic food additive dye “Tartrazine” triggers amorphous aggregation in cationic myoglobin. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.097>.

Ardila-leal LD, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM, Quevedo-Hidalgo BE (2021) A Brief History of Colour, the Environmental Impact of Synthetic Dyes and Removal by Using Laccases. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules26133813>.

Aragaw TA; Asmare AM (2018) Phycoremediation of textile wastewater using indigenous microalgae. *Water Practice & Technology*. <https://doi.org/10.2166/wpt.2018.037>.

Behl K, Sinha S, Sharma M, Singh R, Joshi M, Bhatnagar A, Nigam S (2019) One-time cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in aqueous dye solution supplemented with biochar for microalgal growth, dye decolorization and lipid production. *Chemical Engineering Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.01.180>.

Behl K, SessaCharan P, Joshi M, Sharma M, Mathur A, Kareya MS, Jutur PP, Bhatnagar A, Nigam S (2020) Multifaceted applications of isolated microalgae *Chlamydomonas* sp. TRC-1 in wastewater remediation, lipid production and bioelectricity generation, *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122993>.

Benkhaya S, M'rabet S, Harf AE (2020) Classifications, properties, recent synthesis, and applications of azo dyes. *Heliyon*. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03271>.

Bhardwaj D, Bharadvaja N (2021) Phycoremediation of effluents containing dyes and its prospects for value-added products: A review of opportunities. *Journal of water process engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102080>.

Chen B, Ma C, Han K, Yueh, P, Qin L, Hsueh C (2016) Influence of textile dye and decolorized metabolites on microbial fuel cell-assisted bioremediation. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.011>. 15

DIRETIVA 95/45/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 26 de julho de 1995. *Diário Oficial das Comunidades Europeias*, p.1, L 226 de 22 de setembro de 1995.

Donoso G, Dominguez JR, Gonzalez T, Correia S, Cuerda-Correa EM (2021) Electrochemical and sonochemical advanced oxidation processes applied to tartrazine removal. Influence of operational conditions and aqueous matrix. *Environmental Research*. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111517>.

Ellatif SA, El-sheekh MM Senousy, HH (2020) Role of microalgal ligninolytic enzymes in industrial dye decolorization, *International Journal of Phytoremediation*. <https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1789842>.

El-Rahim WMA, Moawad H, Azeiz AZA, Sadowsky MJ (2021) Biodegradation of azo dyes by bacterial or fungal consortium and identification of the biodegradation products. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2021.06.002>.

El-sakhawy, M. A.; Mohamed, D. W.; Ahmed, Y. H. Histological and immunohistochemical evaluation of the effect of tartrazine on the cerebellum,

submandibular glands, and kidneys of adult male albino rats. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, n. 10, p. 9574-9584, 2019.

Emparan Q, Harun R, Danquah MK (2019) Role of phycoremediation for nutrient removal from wastewaters: a review. *Applied Ecology and Environmental Research*. https://doi.org/10.15666/aeer/1701_889915.

El-Naggar NE, Hamouda RA, Abou-El-Souod GW (2022) Statistical optimization for simultaneous removal of methyl red and production of fatty acid methyl esters using fresh alga *Scenedesmus obliquus*. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11069-z>.

Graham LE, Graham JM, Wilcox LW, Cook ME (Eds) (2016) *Algae*, 3rd edition. LJLM Press, Madison.

Guillard RR and Lorenzen CJ (1972) Yellow-green algae with chlorophyllide C. *J Phycol.* <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1972.tb03995.x>.

Guiry, MD & Guiry, GM (2020) *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=58652; accessed 21 February 2023.

Ihsanullah I, Jamal A, Ilyas M, Zubair M, Khan G, Atieh MA (2020) Bioremediation of dyes: Current status and prospects. *Journal of Water Process Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101680>.

Kaya SI, Cetinkaya A, Ozkan SA (2021) Latest advances on the nanomaterials-based electrochemical analysis of azo toxic dyes Sunset Yellow and Tartrazine in food samples. *Food and Chemical Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112524>.

Keskin NOS, Celebioglu A, Uyar T, Tekinay T (2015) Microalgae immobilized nanofibrous web for removal of reactive dyes from wastewater. Washington, DC: *Industrial & Engineering Chemistry Research*. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b01033>.

Olejnik SF, Algina J (1984) Parametric ancova and the rank transform ancova when the data are conditionally non-normal and heteroscedastic. *Journal of Educational Statistics*. <https://doi.org/10.3102/10769986009002129>.

Omar HH (2008) Algal decolorization and degradation of monoazo and diazo dyes. *Pakistan Journal of biological sciences*. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.1310.1316>. 17

- Oon Y, Ong S, Ho L, Wong Y, Dahalan FA, Oon Y, Teoh T, Lehl HK, Thung W (2020) Constructed wetland–microbial fuel cell for azo dyes degradation and energy recovery: Influence of molecular structure, kinetics, mechanisms and degradation pathways. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137370>.
- Prabhakar Y, Gupta A, Kaushik A (2021) Using indigenous bacterial isolate *Nesterenkonia lacusekhoensis* for removal of azo dyes: A low-cost ecofriendly approach for bioremediation of textile wastewaters. *Environment, Development and Sustainability*. <https://doi.org/10.1007/s10668-021-01661-0>.
- Premaratne M, Nishshanka GKSH, Liyanaarachchi VC, Nimarshana PHV, Ariyadasa TU (2021) Bioremediation of textile dye wastewater using microalgae: current trends and future perspectives. *Wiley Online Library*. <https://doi.org/10.1002/jctb.6845>.
- Ranjbari S, Ayati A, Tanhaei B, Al-Othman A, Kamiri F (2022) The surfactant-ionic liquid bi-functionalization of chitosan beads for their adsorption performance improvement toward Tartrazine. *Environmental Research*. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111961>.
- Saba B, Christy AD, Jabeen MA (2016) Kinetic and Enzymatic Decolorization of Industrial Dyes Utilizing Plant-Based Biosorbents: A Review. *Environmental engineering science*. <https://doi.org/10.1089/ees.2016.0038>.
- Sarmah P et al. Microalgal biomass generation by phycoremediation of sewage water: an integrated approach for production of antioxidant and value-added products. *Vegetos*, v. 32, n. 4, p. 556–563, 1 dez. 2019. <https://doi.org/10.1007/s42535-019-00056-x>.
- Sen SK, Raut S, Bandyopadhyay P, Raut S (2016) Fungal decolouration and degradation of azo dyes: A review. *Fungal biology reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.06.003>.
- Selvaraj V, Karthika TS, Mansiya C, Alagar M (2021) An over review on recently developed techniques, mechanisms and intermediate involved in the advanced azo dye degradation for industrial applications. *Journal of Molecular Structure*. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129195>.
- Severo IA, Nascimento TC, Fagundes (2021) Microalgas: potenciais aplicações e desafios. Canoas - RS - Brasil
- Seo YH, Park D, Oh Y, Yoon S, Han J (2015) Harvesting of microalgae cell using oxidized dye wastewater. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.074>.

Silva J, Fracacio R, (2021) Toxicological and ecotoxicological aspects of tartrazine yellow food dye: a literature review. *Brazilian Journal of Environmental Sciences*. <https://doi.org/10.5327/Z21769478746>.

Sinha S, Singh R, Chaurasia AK, Nigam S (2016) Self-sustainable *Chlorella pyrenoidosa* strain NCIM 2738 based photobioreactor for removal of Direct Red-31 dye along with other industrial pollutants to improve the water-quality. *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.12.011>.

Tekin G, Ersöz G, Atalay S (2018) Visible light assisted Fenton oxidation of tartrazine using metal doped bismuth oxyhalides as novel photocatalysts. *Journal of Environmental Management*. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.099>.

Vishani DB; Shrivastav A (2022) Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes. *Development in Wastewater Treatment Research and processes*. In: *Innovative Microbe-Based Applications for Removal of Chemicals and Metals in Wastewater Treatment Plants, India*, pp 419-432. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85657-7.00020-1>.

Zahrán SA, Ali-Tammam M, Hashem AM, Aziz RK, Ali, AE (2019). Azoreductase activity of dyedecolorizing bacteria isolated from the human gut microbiota. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41894-8>.

Zubkov MV (2014) Faster growth of the major prokaryotic versus eukaryotic CO₂ fixers in the oligotrophic ocean. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms4776>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2017) Safety evaluation of certain food additives: prepared by the Eighty-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva: World Health Organization, (WHO Food Additives Series, No. 73).

Wu L, Xu Y, Lv X, Chang X, Ma X, Tian X, Shi X, Li X, Kong X (2021) Impacts of an azo food dye tartrazine uptake on intestinal barrier, oxidative stress, inflammatory response, and intestinal microbiome in crucian carp (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112551>.

Fig.1

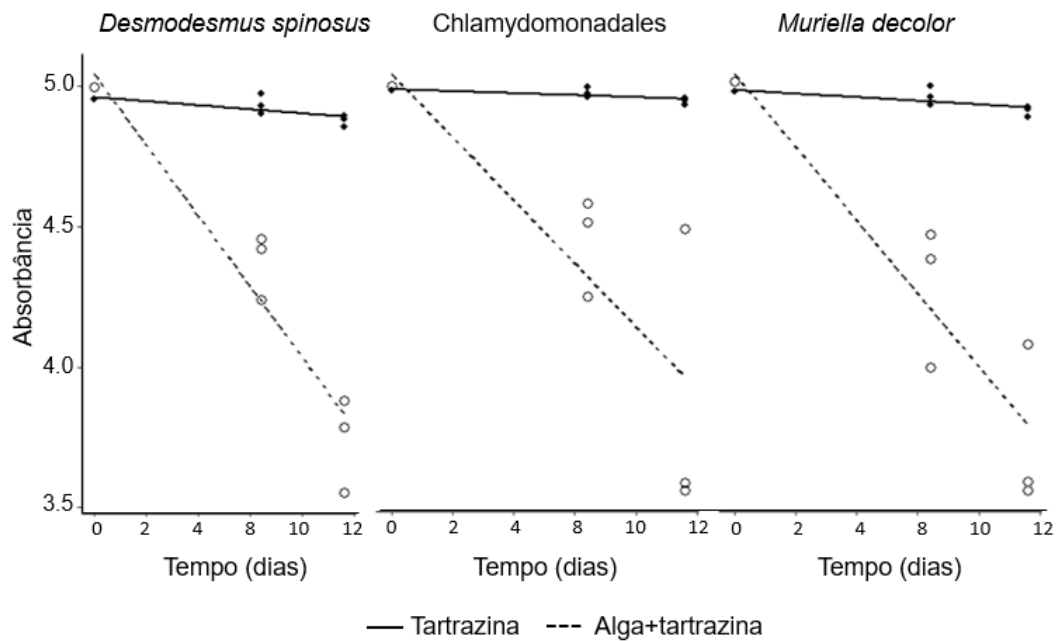


Fig.1 Remoção do azo-corante amarelo tartrazina pelas diferentes cepas de microalgas quantificado por meio da absorbância em 426 nm. Os círculos abertos representam a absorbância do corante após degradação pelas algas (ou seja, tartrazina com a microalga) e os círculos fechados representam a absorbância da tartrazina que foi mantida estéril nas mesmas condições de luz e temperatura do tratamento (controle) (n=3 para cada tratamento)

Fig.2

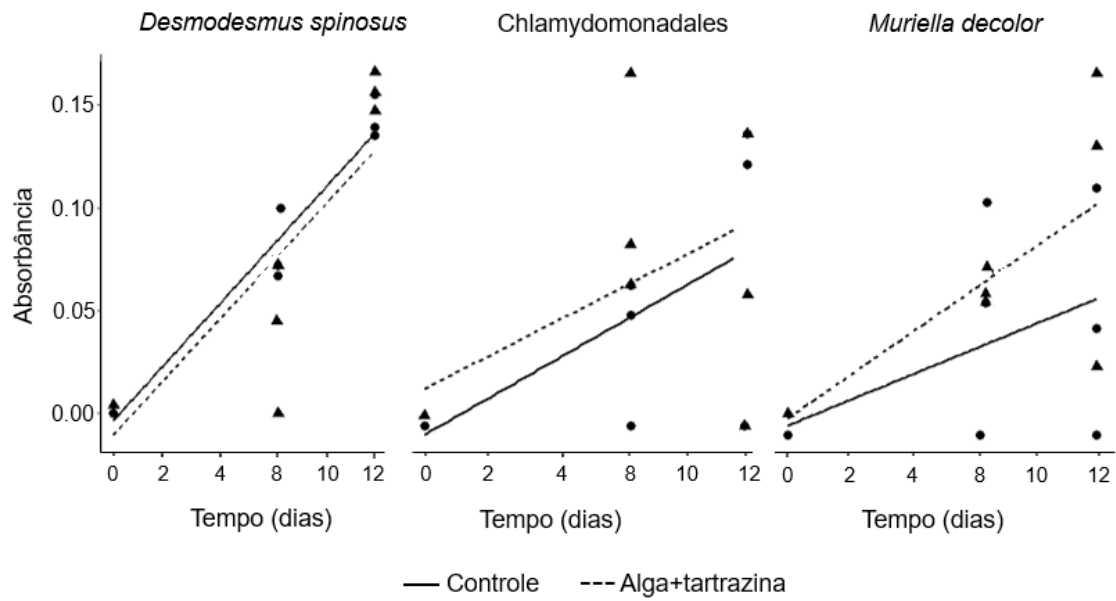


Fig.2 Crescimento das cepas de microalgas nos diferentes tratamentos quantificado por meio da absorbância em 750 nm. Os pontos pretos indicam o crescimento da alga em meio de cultivo apenas (controle), os triângulos pretos indicam o crescimento da alga com tartrazina adicionada ao meio (n=3 para cada tratamento)

Material Suplementar

Fig.S1 Fluxograma das etapas pré experimental e experimental.

Fig.S2 Crescimento das cepas de *D. spinosus* e *M. decolor* nos diferentes tratamentos quantificado por meio da absorbância em 750 nm. Os pontos pretos indicam o crescimento da alga em meio de cultivo apenas (controle), os quadrados pretos indicam o crescimento da alga com uma barreira de solução de tartrazina para verificar a influência da qualidade de luz no crescimento (controle de qualidade de luz) e os triângulos indicam o crescimento da alga com tartrazina adicionada ao meio (n=3 para cada tratamento).

Fig.S3 Remoção do azo-corante amarelo tartrazina pela cepa de Chlamydomonadales não identificada quantificado por meio da absorbância em 426 nm.

Os pontos pretos (tartrazina com microalga) representam a absorbância do corante após degradação pelas algas e os pontos abertos (controle tartrazina) a absorbância da tartrazina que foi mantida estéril nas mesmas condições de luz e temperatura do tratamento (n=3 para cada tratamento)

Fig.S4 Aderência das células da cepa de Chlamydomonadales não identificada, nas paredes do frasco de cultura de células.

Fig.S1

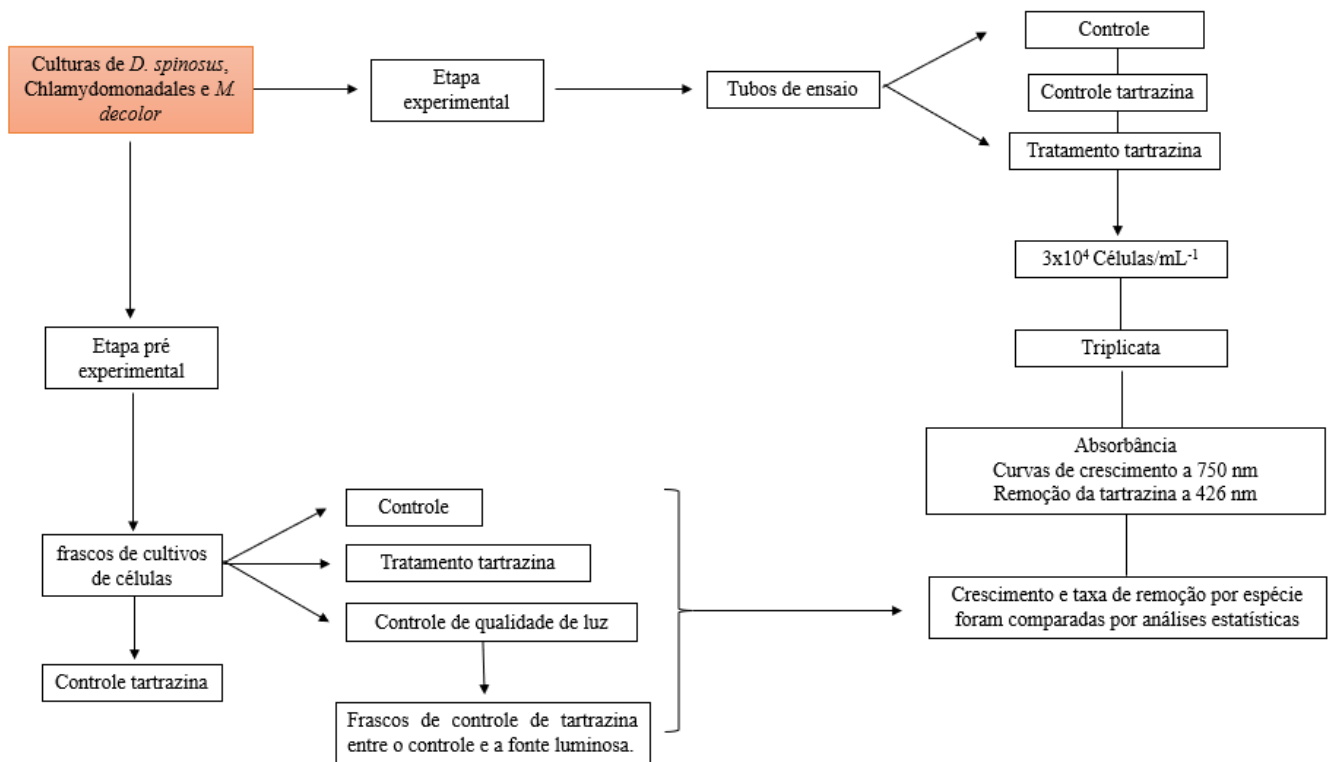


Fig.S2

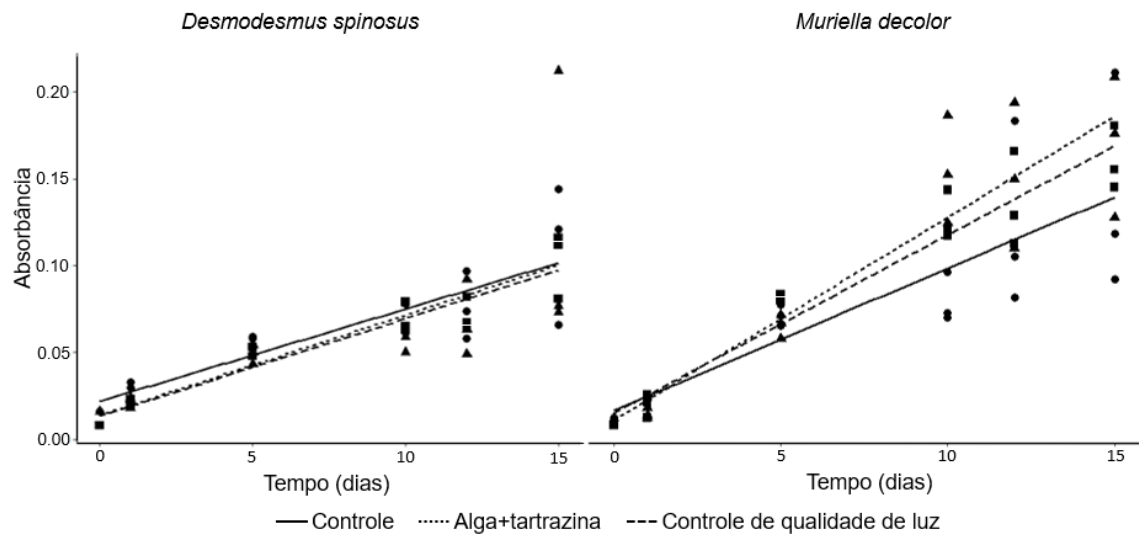


Fig.S3

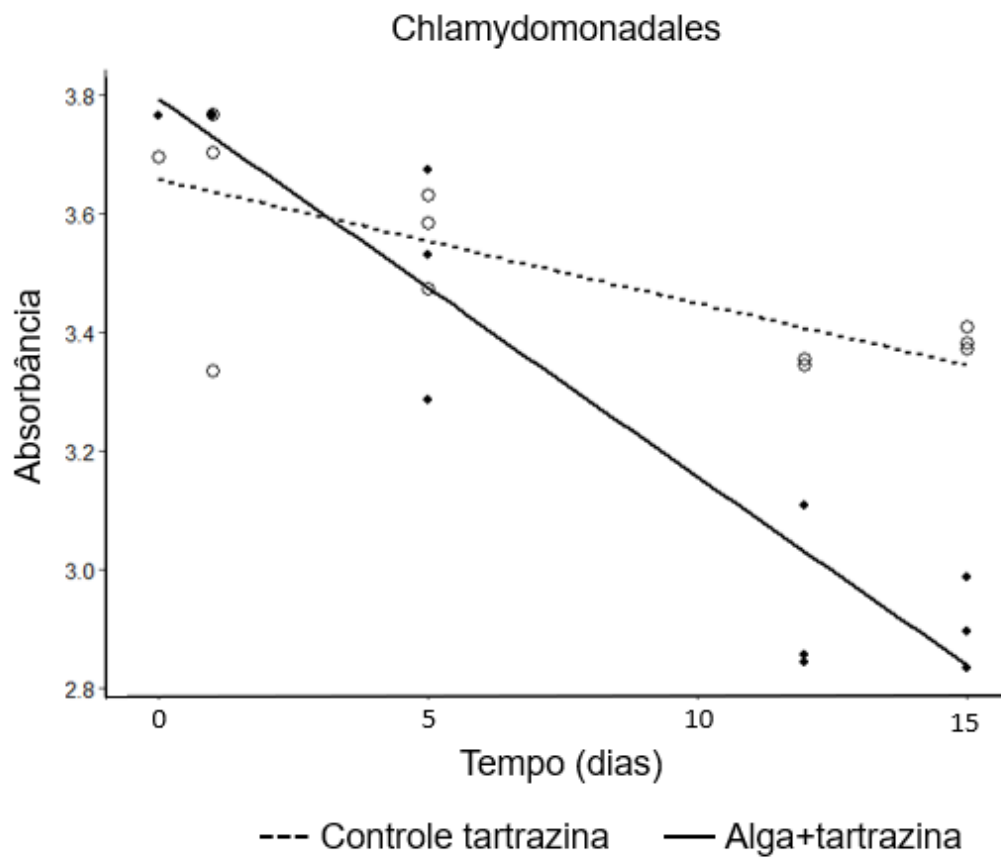


Fig.S4

