INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOCIÊNCIAS

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE EFLUENTE TÊXTIL PARA PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO

MILENE MIRANDA ALMEIDA LIRA

Foz do Iguaçu
2020

INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DA VIDA E NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE EFLUENTE TÊXTIL PARA PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO

MILENE MIRANDA ALMEIDA LIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini.

Foz do Iguaçu
2020

MILENE MIRANDA ALMEIDA LIRA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE EFLUENTE TÊXTIL PARA PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini
UNILA

Profª. Drª. Rafaella Costa Bonugli Santos
UNILA

Profª. Drª. Marcela Boroski
UNILA

Foz do Iguaçu, 20 de agosto de 2020.

Catalogação elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação
Catalogação de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA

L768p
Lira, Milene Miranda Almeida.
Potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados de efluente têxtil para processos de biorremediação / Milene Miranda Almeida Lira. - Foz do Iguaçu, 2020.
87 fls.: il.

Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Centro Interdisciplinar de Ciências da vida, Programa de Pós-Graduação em Biociências.
Orientador: Michel Rodrigo Zambrano Passarini.

1. Biotecnologia - Indústria. 2. Indústria têxtil. 3. Biorremediação. 4. Metais pesados. I. Passarini, Michel Rodrigo Zambrano. II. Título.
CDU 620.952

AGRADECIMENTO

À Deus, pela oportunidade de realização do mestrado, e por me dar saúde mental e não me deixar desistir no meio do caminho.

Ao meu pai, Waldir de Almeida, que sempre lembrou-me o quanto é importante a atualização profissional.

Ao meu marido, Michael Jackson da Silva Lira pelo apoio, pela ajuda nos experimentos e pelas sugestões na pesquisa e na escrita deste trabalho.

Aos meus filhos, Matheus Almeida Lira, pela compreensão dos momentos em que estive ausente e pelas vezes que me aguardou comportado na minha mesa de trabalho o fim dos meus experimentos, e Melissa Almeida Lira, que ainda na minha barriga, aguentou firme e forte os inconvenientes momentos no laboratório.

Aos professores, Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini, pela orientação e dedicação no meu aprendizado, aperfeiçoamento e crescimento acadêmico; à Dr[a] Rafaella Costa Bonugli Santos e à Dr[a] Marcela Boroski pelo auxílio nas práticas laboratoriais.

Às minhas chefias, Solange Aikes e Meirile Íside Mattos Carvalho pelo apoio e por concederem-me afastamento do trabalho para finalização do meu projeto de mestrado.

Aos meus colegas de trabalho, Amanda Viana de Araújo, Fernando Cezar dos Santos e Juliana Kafka Bilha que por muitas vezes me tiraram dúvidas de química e estatística, e ajudaram com a parte técnica laboratorial.

LIRA, M. M. A.; **POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE EFLUENTE TÊXTIL PARA PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO**. 87 páginas. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

RESUMO

Os efluentes industriais têxteis são considerados fontes poluidoras, podendo causar um desequilíbrio ecológico nos mais variados ambientes. Diversos compostos considerados tóxicos podem estar presentes nestes efluentes, incluindo corantes sintéticos, metais pesados e uma grande variedade de hidrocarbonetos (HPAs). A exploração da maquinaria genética microbiana vem facilitando a descoberta de enzimas e/ou metabólitos potencialmente utilizados em processos de degradação de poluentes ambientais, podendo ser empregada em estudos de biorremediação. Microrganismos adaptados a ambientes poluídos podem ser mais eficientes na degradação dos mesmos poluentes aos quais essas células podem ser encontradas. Neste sentido, o presente projeto objetivou a avaliação do potencial biotecnológico de 26 fungos filamentosos isolados de um efluente industrial têxtil quanto a descoloração, tolerância, transformação e degradação de compostos incluindo corante, metais pesados e hidrocarbonetos como o HPA pireno para fins de utilização em estudos de biorremediação. Resultados dos testes de descoloração do corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR), demonstraram que os fungos *Sarocladium* sp. (ITF 33), *Aspergillus sydowii* (ITF 30) e *A. Amoenus* (ITF 47), apresentaram os melhores resultados de descoloração do corante, atingindo 60%, 60% e 80% de descoloração respectivamente. Ensaios de atividade da enzima lacase revelaram atividade enzimática de 0,0064 UL^{-1} pelo isolado *A. sydowii* (ITF 10). Análises de tolerância a metais pesados e tolerância e degradação de hidrocarbonetos, apontaram que o isolado *Penicillium* sp. (ITF 12), foi o melhor fungo tolerante aos metais pesados cobre (500 mg L^{-1}), chumbo (300 mg L^{-1}), alumínio (350 mg L^{-1}) e cromo (500 mg L^{-1}), bem como aos hidrocarbonetos hexano (25%), tolueno (25%) e benzeno (25%), além da capacidade de degradar 24,9% do composto pireno (2 mg L^{-1}) em 5 dias de crescimento. Os resultados do presente trabalho contribuirão com novos estudos de otimização da capacidade de tolerância aos compostos tóxicos utilizados bem como a verificação da produção de metabólitos mais tóxicos, a partir da degradação do composto pireno. Fungos filamentosos isolados de efluentes industriais têxteis apresentam a capacidade de tolerar e degradar compostos poluentes ambientais incluindo metais pesados e hidrocarbonetos policiclicos aromáticos (pireno), podendo ser utilizados em processos de biorremediação de efluentes industriais.

Palavras-chave: Bioprospecção, descoloração de corantes, RBBR, metais pesados, hidrocarbonetos, pireno.

LIRA, M. M. A.; **BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF FILAMENTOUS FUNGI ISOLATED FROM TEXTILE EFFLUENT FOR BIOREMEDIATION PROCESSES**. 87 pages. Master's thesis of the Post-Graduate Program in Biosciences – Federal University of Latin American Integration, Foz do Iguaçu, 2020.

ABSTRACT

Industrial textile effluents are considered polluting sources and can cause an ecological imbalance in the most varied environments. Several compounds considered toxic can be present in these effluents, including synthetic dyes, heavy metals and a wide variety of hydrocarbons (PAHs). The exploitation of microbial genetic machinery has been facilitating the discovery of enzymes and/or metabolites potentially used in processes of degradation of environmental pollutants and can be used in bioremediation studies. Microorganisms adapted to polluted environments may be more efficient in degrading the same pollutants that these cells are found. In this sense, the present project aimed to evaluate the biotechnological potential of 26 filamentous fungi isolated from an industrial textile effluent for discoloration, tolerance and degradation of compounds including dye, heavy metals and hydrocarbons such as HPA pyrene for use in bioremediation studies. Results from discoloration assay of the Remazol Brilliant Blue R (RBBR) dye, showed that the fungi *Sarocladium* sp. (ITF 33), *Aspergillus sydowii* (ITF 30) and *A. amoenus* (ITF 47), showed the best results of dye discoloration, reaching 60%, 60% and 80% discoloration, respectively. Laccase enzyme activity assays revealed enzymatic activity of 0,0064 UL^{-1} by isolate *A. sydowii* (ITF 10). Analysis of tolerance to heavy metals and tolerance and degradation of hydrocarbons showed that the isolated *Penicillium* sp. (ITF 12), was the best tolerant fungus for heavy metals copper (500 mg L-1), lead (300 mg L^{-1}), aluminum (350 mg L^{-1}) and chromium (500 mg L^{-1}), as well as hydrocarbons hexane (25%), toluene (25%) and benzene (25%), in addition to the ability to degrade 24.9% of the pyrene compound (2 mg L^{-1}) in 5 days of growth. The results of the present work emphasize the need for further studies to optimize the capacity of tolerance to toxic compounds used as well as the verification of the production of more toxic metabolites from the degradation of the pyrene. Filamentous fungi isolated from industrial textile effluents has the ability to tolerate and degrade environmental pollutant compounds including heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (pyrene) and may be used in industrial effluent bioremediation processes.

Keywords: Bioprospecting, dye discoloration, RBBR, heavy metals, hydrocarbons, pyrene.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cadeia de celulose.....14

Figura 2 - Fórmula química do corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR). 16

Figura 3 - Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Nesta figura estão os 16 HPAs prioritários em estudos ambientais de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA 1987). 18

Figura 4 - Estrutura química do Pireno.....20

Figura 5 - Via de degradação dos hidrocarbonetos aromáticos, por ação de monoxigenases. 23

Figura 6 - Via orto e meta clivagem do catecol.....24

Figura 7 - Estrutura química da lignina (A) e Alcoóis precursores da lignina (B). 25

Figura 8 - Vias ligninolíticas de degradação de HPAs por fungos. 27

Figura 9 - Mecanismos de interação da parede celular de fungos com íons metálicos.....31

Figura 10 - Tratamento físico, químico e biológicos de efluentes. 33

Figura 12 – Halo de descoloração ao redor das colônias de crescimento microbiano do isolado ITF 12 em meio PDA com corante RBBR a 500 mg L^{-1} após 7 dias de incubação a 28ºC. 52

Figura 13 – Porcentagem de descoloração do corante RBBR (500 mg L^{-1}) pelos isolados fúngicos em meio líquido. 53

Figura 14 – Porcentagem de descoloração do corante RBBR (1000 mg L-1) pelos isolados fúngicos em meio líquido. 54

Figura 15 – Comparação de descoloração do corante RBBR (500 mg L-1) antes e após trituração do micélio.....57

Figura 16 – Biomassa fúngica durante o período de incubação de 7 dias na presença de 500 mg L^{-1} do corante RBBR. 57

Figura 17 – Atividade enzimática da enzima lacase. 59

Figura 18 – Teste Colapso de gota. A) controle positivo (detalhe em verde); B) resultado negativo (detalhe em vermelho).....61

Figura 19 – Teste E24. A) controle positivo (tubo 1, mostrando uma camada de emulsificação); controle negativo (tubo 2); resultado negativo (tubos 3 e 4); B) resultados negativos. 62

Figura 20 – Cromatogramas e fragmentogramas obtidos por GC–MS. A e B: solução padrão de pireno; C e D: ITF12 Penicillium sp., após 5 dias de cultivo. 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolados fúngicos reativados.....41

Tabela 2 - Ensaio de descoloração do corante RBBR 500 mg L-1 em meio sólido.....51

Tabela 3 – Tolerância a metais pesados observada pelo crescimento microbiano em meio líquido.....63

Tabela 4 – Índice de tolerância a metais pesados após incubação de 13 dias, medidas avaliadas através do crescimento radial do micélio (cm).....65

Tabela 5 – Isolados fúngicos tolerantes a hidrocarbonetos. 67

Tabela 6 – Potencial biotecnológico dos melhores resultados obtidos nos ensaios experimentais com os fungos isolados do efluente têxtil.....74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira Nacional de Normas Técnicas
ABTS	Solução 2,2-azino-bis-etilbentiazolina
BaP	Benzo [a] pireno
BDA	Ágar Batata Dextrose
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno, Xileno
CBMAI	Coleção Brasileira de Microorganismos de Ambiente e Indústria
CG-MS	Cromatografia Gasosa com Espectrômetro de Massa
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CP450	Citocromo P450
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DBO	Demanda Biológica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
E_{24}	Índice de Emulsificação
EUA	Estados Unidos da América
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC-DAD-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Detector de Diodos e Espectrometria de Massa
ITF	Indústria Têxtil Fungo
LiP	Lignina Peroxidase
MA_2	Ágar Extrato de Malte
Mnp	Manganês Peroxidase
P.A.	Para Análise
PDB	Caldo Batata Dextrose
pH	Potencial Hidrogeniônico
RBBR	Remazol Brillant Blue R
RE	Retículo Endoplasmático
RPM	Rotações por minuto
SDB	Caldo Saboraud Dextrose
SIM	Monitoramento Seletivo de Íons
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV	Radiação Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 11
1.1 Referencial teórico 12
1.1.1 Efluentes industriais 12
1.1.2 Corantes sintéticos (RBBR) 15
1.1.3 Toxicidade dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) 17
1.1.4 Degradação microbiana dos HPAs 20
1.1.4.1 Degradação intracelular (enzimas do Citocromo P450) 22
1.1.4.2 Degradação extracelular (enzimas ligninolíticas) 24
1.1.5 Tolerância microbiana a metais pesados 27
1.1.6 Tratamento de efluentes industriais 32
1.1.7 Bioprospecção microbiana em ambientes diferenciados 34
1.2 Justificativa 38
1.3 Pergunta Norteadora e Hipótese 39

2. OBJETIVOS 40
2.1 Geral 40
2.2 Específicos 40

3. MATERIAL E MÉTODOS 41
3.1 Reativação dos isolados 41
3.2 Avaliação da descoloração do corante RBBR 42
3.2.1. Teste preliminar em meio sólido 42
3.2.2 Teste em meio líquido 43
3.2.3 Avaliação de adsorção do RBBR no micélio 43

3.3 Avaliação da atividade enzimática de lacase 44
3.4 Avaliação da produção de biossurfactantes 45
3.4.1 Teste do colapso da gota 45
3.4.2 Teste de emulsificação (Teste E_{24}) 46
3.5 Avaliação de tolerância a metais pesados 47
3.6 Avaliação da tolerância a hidrocarbonetos 47
3.7 Avaliação da degradação do hidrocarboneto pireno 48
3.7.1 Preparação e condição da cultura 48
3.7.2 Preparação da amostra (Extração do Hidrocarboneto) 49
3.7.3 Análise cromatográfica do pireno em GC-MS 49

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 51
4.1 Fungos filamentosos 51
4.2 Avaliação da descoloração do corante RBBR (ensaios em meio sólido e líquido) 51
4.2.1 Avaliação de adsorção do RBBR no micélio 56
4.3 Avaliação da produção da enzima lacase 58
4.4 Avaliação da produção de biossurfactantes 61
4.5 Avaliação de tolerância a metais pesados 63
4.6 Avaliação da tolerância a hidrocarbonetos 67
4.6.1 Avaliação da degradação do HPA pireno 69
4.7 Potencial biotecnológico de fungos filamentosos de efluentes têxtil 72

5. CONCLUSÃO 76

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 77

ANEXO - Absorbância do corante RBBR 500 mg L-1 e 1000 mg L-1 86

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento mundial e a crescente industrialização vêm acelerando a poluição ambiental devido, principalmente, ao lançamento de compostos tóxicos presentes em águas residuais, industriais e urbanas. A presença destes poluentes interfere significativamente na qualidade dos corpos d'água e na vida dos seres vivos, podendo favorecer o desenvolvimento de doenças ao homem e o aumento da poluição e degradação dos ecossistemas (DESHMUKH; KHARDENAVIS; PUROHIT, 2016).

Efluentes industriais podem apresentar uma elevada carga orgânica, além de compostos tóxicos como metais pesados, uma série de corantes sintéticos e diversos grupos de hidrocarbonetos, incluindo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), os quais são poluentes ambientais em potencial (OLUWASEUN; OLUTOYIN; JACKSON, 2016). Quando despejado na água, podem ser adsorvido pelos sedimentos, e bioacumular em organismos aquáticos. No ambiente terrestre, é adsorvido pelas partículas dos solos, podendo atingir águas subterrâneas (LEME, 2016). Em contato com o homem podem sofrer ativações enzimáticas e originar metabólitos com elevada natureza eletrofílica, denominadas carcinógenos efetivos. Esses carcinógenos podem interagir com DNA e RNA e possibilitar a formação de processos tumorais (BERNARDO; BARROS; SILVA, 2016; OLUWASEUN; OLUTOYIN; JACKSON, 2016).

Nas últimas décadas, microrganismos vêm sendo utilizados na recuperação de ambientes contaminados por compostos recalcitrantes, processos denominados de biorremediação. Esses organismos possuem a capacidade de sintetizar uma série de enzimas catalíticas, as quais podem apresentar uma baixa especificidade aos substratos, sendo assim, estrategicamente utilizadas na degradação de um número elevado de compostos poluidores ambientais. Desta forma, a utilização destas enzimas, torna-se uma opção ecologicamente correta, eficiente e com um bom custo/benefício (BALDANTONI et al., 2017).

Fungos filamentosos têm demonstrado ser eficientes em processos de recuperação da degradação ambiental, devido a alguns fatores incluindo, maior tolerância a compostos tóxicos no ambiente, sobrevivência em condições desfavoráveis como pH extremamente ácido ou básico, produção de enzimas e utilização de compostos orgânicos (poluentes) como substratos para seu metabolismo (BALDANTONI et al., 2017).

O isolamento de fungos filamentosos e a identificação de linhagens potencialmente degradadoras de compostos tóxicos, bem como a determinação das vias metabólicas de degradação destes compostos, podem facilitar o estudo dos mecanismos moleculares de degradação, podendo assim, prever com maior precisão, o destino desses compostos no ambiente e sua perda de toxicidade, além de selecionar comunidades microbianas potencialmente promissoras para processos de biorremediação de ambientes impactados por compostos tóxicos (BISOGNIN et al., 2017; VIEIRA et al., 2018). Desta forma, a busca por microrganismos degradadores de compostos poluentes ambientais, por tecnologias de bioprospecção, vêm sendo aplicadas em estudos para aumentar o conhecimento da diversidade microbiológica e seus processos funcionais em ecossistemas diversificados (ALMEIDA; COLLARES; BARBOSA, 2015).

Microrganismos isolados de efluentes industriais têxteis possuem o metabolismo adaptado aos compostos químicos tóxicos frequentemente encontrados nestes efluentes. Os locais contaminados são conhecidos como principais fontes de espécies resistentes aos metais (OLADIPO et al., 2017). Assim, células microbianas podem ser consideradas potencialmente promissoras na obtenção de enzimas degradadoras de poluentes ambientais, as quais podem ser utilizadas em processos de descontaminação de efluentes industriais incluindo os da indústria têxtil. Neste sentido, o presente trabalho buscou avaliar o potencial biodegradador de fungos filamentosos isolados de uma estação de tratamento de efluente industrial têxtil quanto à descoloração do corante RBBR, produção da enzima lacase e de biossurfactantes, tolerância a metais pesados e a hidrocarbonetos bem como avaliou a degradação do hidrocarboneto pireno e produção de seus metabólitos, características que tornam esses organismos, biotecnologicamente aplicáveis em processos de biorremediação.

1.1 Referencial teórico

1.1.1 Efluentes industriais

A industrialização gerada pelo aumento populacional e o desenvolvimento mundial, vêm acelerando a poluição ambiental, devido à presença de uma grande quantidade de compostos recalcitrantes, como os hidrocarbonetos policíclicos

aromáticos (HPAs), corante sintéticos, metais pesados, dentre outros compostos que são despejados diariamente no ambiente. Os problemas ambientais, cada vez mais críticos e frequentes, podem ser observados através de alterações na qualidade do solo, do ar e da água (DESHMUKH; KHARDENAVIS; PUROHIT, 2016).

A crescente urbanização influencia negativamente a qualidade do ar e da água nas cidades e, consequentemente, a poluição ambiental torna-se um importante fator de risco de doenças humanas (WANG et al., 2011). Estudos indicam uma associação entre a emissão de poluentes pela atividade industrial e o aumento da incidência de doenças infecciosas, parasitárias, respiratórias e cardiovasculares (MARINHO et al., 2016; TUFIK et al., 2017).

Águas residuais sem tratamento adequado impactam seriamente os corpos d água e prejudicam a qualidade de vida dos seres vivos. Podem causar a depleção do oxigênio, aumentar valores da demanda química de oxigênio (DQO), demanda biológica de oxigênio (DBO) e turbidez da água e, consequentemente, dificultar processos de fotossíntese (WANG et al., 2011). Os despejos líquidos provenientes de diversas etapas do processo produtivo de áreas industriais, os quais geram poluição por produtos utilizados ou produzidos na indústria, são denominados efluentes industriais (ABNT – NBR 9800/1987).

No Brasil, o despejo de efluentes industriais é regulamentado pela Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011, que complementa a resolução nº 357, de 17 de maio de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Esta resolução dispõe sobre condições, parâmetros, padrões e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes em corpos de água receptores (CONAMA, 2011).

Dentre outras exigências, a Resolução CONAMA nº 430/2011 veda o lançamento de poluentes orgânicos persistentes à mistura de efluentes com águas de melhor qualidade, tais como as águas de abastecimento, do mar e de sistemas abertos de refrigeração sem recirculação. A resolução também estabelece condições de lançamentos de efluentes, como o pH (entre 5 e 9), temperatura (inferior a 40ºC), remoção mínima de DBO à 60%, ausência de materiais flutuantes, além de valores máximos para poluentes inorgânicos (metais pesados) e orgânicos (hidrocarbonetos) (CONAMA, 2011).

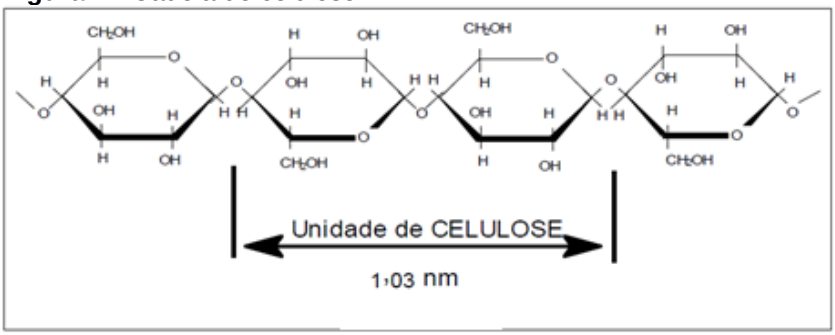
Os efluentes industriais podem apresentar contaminantes físico-químicos, como agrotóxicos e metais pesados, ou biológicos, como microrganismos. Esses

compostos e/ou células causam doenças que acometem o homem, poluem rios e mares e degradam os solos (KUNZ et al., 2002). Alguns efluentes, como os da indústria têxtil, possuem contaminantes quimicamente estáveis e de difícil degradação. São constituídos por uma elevada carga orgânica, sólidos suspensos e dissolvidos, vestígios de metais pesados como cromo (Cr), arsênio (As), cobre (Cu) e zinco (Zn) e por uma forte coloração, devido à presença de corantes que não se fixam à fibra dos tecidos durante os processos de tingimento (RAJASIMMAN; BABU; RAJAMOHAN, 2017; SANTHANAM et al., 2017; KULKARNI et al., 2018). Para o tingimento de 1 kg de algodão, a indústria têxtil utiliza entre 0,6 a 0,8 Kg de NaCl, 30 a 60 g de corante e 70 a 150 L de água, resultando em águas residuais indesejáveis, devido a possibilidade de causar sérios problemas ambientais, por estarem associadas à corantes e seus produtos de decomposição (KUMAR; RAUT; BANDYOPADHYAY, 2016).

Dentre os componentes químicos da fibra do algodão, a celulose é o que se encontra em maior proporção (cerca de 94%), cuja cadeia é constituída por moléculas de glicose e sua disposição na cadeia tem importante papel nas características intrínsecas da fibra (COSTA et al., 2005; MORAES, 2010).

As fibras têxteis podem ser divididas em dois grupos, denominadas como naturais e sintéticas (químicas). As fibras naturais ou vegetais são constituídas de celulose (composto orgânico), localizada principalmente na parede secundária das células vegetais, a qual se encontra sempre na natureza em combinação com outras substâncias. A celulose é uma molécula constituída por um grande número de unidades repetidas relativamente simples, conectadas por ligações químicas unidas por forças de associação secundárias (Figura 1) (MORAES, 2010).

Figura 1 - Cadeia de celulose.



Fonte: KUNZ et al., 2002.

As fibras naturais mais utilizadas na indústria são baseadas em celulose e proteína presentes na lã, seda, algodão e linho (GUARATINI; ZANONI, 2000). Esses materiais representam uma carga nutricional rica em fonte de carbono (celulose) nos efluentes industriais têxteis, que pode favorecer o crescimento de microrganismos adaptados à presença de compostos tóxicos e recalcitrantes presentes nesses efluentes. Desta forma, a utilização dessas células torna-se fundamental para a busca de moléculas utilizadas em processos de biorremediação, bem como outros processos biotecnológicos industriais.

1.1.2 Corantes sintéticos (RBBR)

Os corantes são compostos químicos utilizados em diversos materiais para conferir cor a uma variedade ampla de produtos. São utilizados nas indústrias têxteis, de artefatos de couro, papel, alimentos, cosméticos, tintas e plásticos. Eles são retidos no material por adsorção, dissolução, retenção mecânica ou por ligações químicas iônicas ou covalentes (MARI MENDA, 2020). Os corantes sintéticos utilizados nas indústrias representam um grupo grande e complexo de compostos orgânicos que se diferem em origem, propriedade química e/ou física e nos processos de aplicação nos setores industriais (PAZ et al., 2017).

A família dos azos corantes representam 70% de todo corante sintético que é produzido mundialmente. São compostos aromáticos complexos, com estrutura molecular grande, preparados pelo acoplamento entre um composto diazônio e uma anilina, fenol ou outro composto aromático. Possuem alto grau de estabilidade química, biológica e fotocatalítica, bem como resistência à ação do tempo, exposição à luz solar, microrganismos, água e sabão. A maioria é cancerígeno e/ou mutagênico para os seres humanos, fauna e flora (ALMEIDA, 2018).

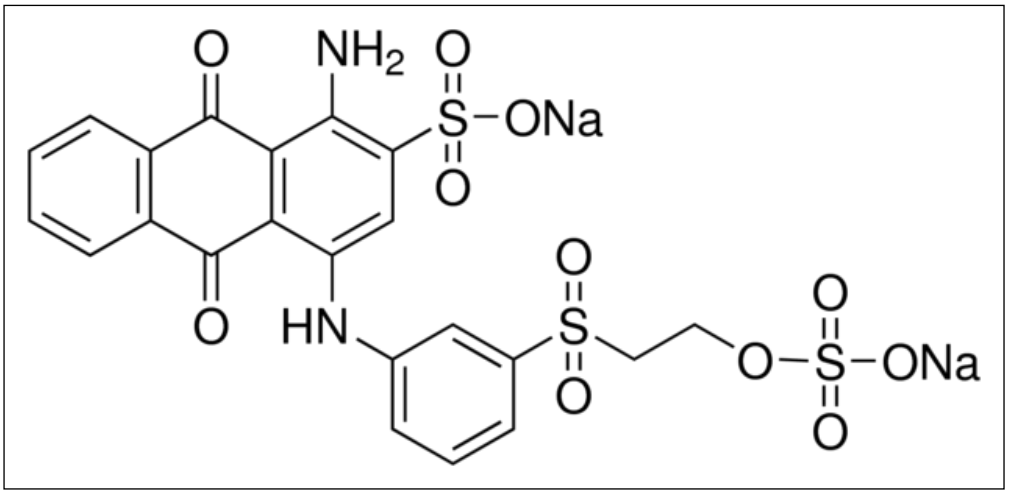
A indústria têxtil libera em suas águas residuais, de 20 a 30% da quantidade aplicada de corantes (concentração média de 2000 mg L^{-1}) e substâncias auxiliares ao tingimento. Em todo o mundo, 280 mil toneladas de corantes têxteis são lançados em efluentes industriais a cada ano, gerando assim, uma preocupação ainda maior, com o tratamento desses efluentes (KUMAR; RAUT; BANDYOPADHYAY, 2016). Além das indústrias de tecidos, as indústrias de alimentos, de cosméticos, papel e plástico, liberam juntas, anualmente no ambiente, através de efluentes, em torno de 0,1 milhões

de toneladas de corantes comerciais, podendo ser potencialmente tóxicos e carcinogênicos, se não forem tratados antes do seu destino final (RANI et al., 2014; PAZ et al. , 2017).

A recuperação e a reutilização de águas residuais merecem atenção considerável devido à escassez de água potável para as futuras gerações, e o interesse não está apenas em tecnologias para remoção das cores, mas também em métodos que possam produzir água reutilizável, remover toxicidade, mineralizar compostos aromáticos e recuperar os corantes utilizados (HOLKAR et al., 2016).

Um dos corantes mais importantes utilizados na indústria têxtil é o Remazol Brilliant Blue R (RBBR - $C_{22}H_{16}N_2Na_2O_{11}S_3$), um composto derivado do antraceno (HPA) com peso molecular de 626,54 g moL^{-1}. Representa uma classe importante dos organopoluentes tóxicos e recalcitrantes (Figura 2) (PALMIERI; CENNAMO; SANNIA, 2005; RAHMAT; ALI, 2016).

Figura 2 - Fórmula química do corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR).



Fonte: SIGMA-ALDRICH, 2018.

O RBBR é um corante solúvel em água, com um bom equilíbrio hidrofílico/hidrofóbico e com grupos β-sulfaetilsulfonil reativos. Foi um composto bastante utilizado no setor têxtil devido a sua característica em apresentar baixa degradabilidade e fácil aplicabilidade (TORGUT et al., 2017). Esse corante pode ser aplicado em tecidos como nylon, lã e seda, fornecendo uma ampla variedade de cores

e tons brilhantes aos tecidos. Além disso, pode ser utilizado no tingimento de papel e couro, na indústria de alimentos, cosméticos e plásticos (RAHMAT; ALI, 2016).

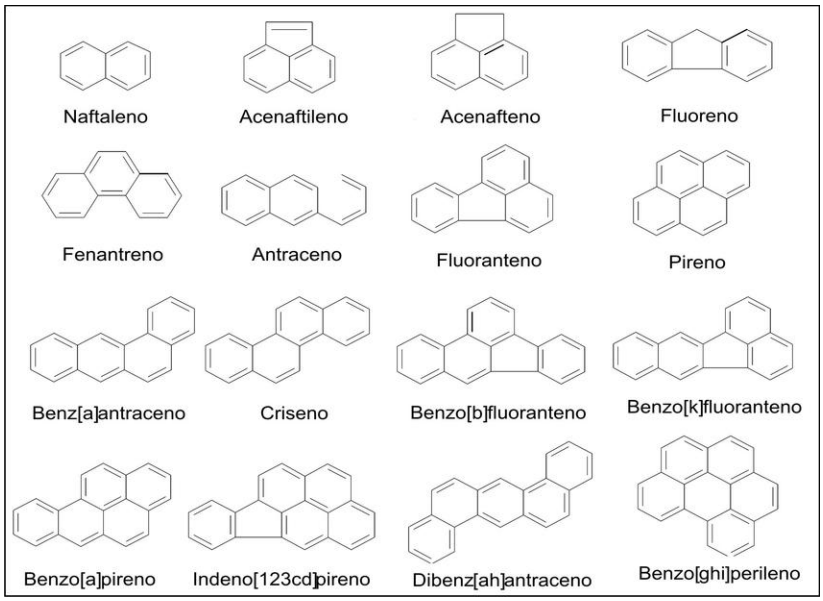
Devido à estabilidade da sua composição química, esse corante não é facilmente degradado por produtos químicos ou processos físicos convencionais, sendo caracterizado como um organopoluente potencialmente tóxico e carcinogênico (RAHMAT; ALI, 2016). Entretanto, processos de degradação biológica utilizando microrganismos como os fungos, podem contribuir para a transformação deste poluente em intermediários menos tóxicos para o ambiente (ORZECHOWSKI et al., 2018).

A molécula do RBBR é semelhante a estruturas da molécula da lignina (polímero orgânico complexo que une as fibras celulósicas). A lignina é facilmente degradada por enzimas microbianas, portanto o RBBR é utilizado como molécula modelo para o isolamento de espécies degradadoras de poluentes, uma vez que, permite selecionar microrganismos produtores de enzimas envolvidas na hidrólise da lignina (MACHADO; MATHEUS, 2006). Fungos do gênero *Pleurotus*, são bons produtores de enzimas do complexo degradador da lignina, as quais são capazes de degradar compostos orgânicos complexos contendo anéis aromáticos em sua estrutura, como os corantes sintéticos (ORZECHOWSKI et al., 2018).

1.1.3 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos ou HPAs constituem uma família de compostos químicos que apresentam apenas átomos de carbono e hidrogênio em suas moléculas. Possuem átomos arranjados sob a estrutura de anéis aromáticos (ou benzênicos) fundidos ou condensados, arranjados de forma hexagonal (Figura 3). São caracterizados por possuírem dois ou mais anéis aromáticos condensados, com duas duplas ligações conjugadas em sua estrutura (MAGRINI, 2012).

Figura 3 - Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Nesta figura estão os 16 HPAs prioritários em estudos ambientais de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA 1987).



Fonte: MEIRE et al., 2007.

Os HPAs são semi-voláteis e formados pela combustão incompleta ou pirólise de material orgânico. Apresentam massa molecular variando entre 128 e 178 g moL^{-1}. A solubilidade desta família, em água, varia entre os altamente insolúveis (benzo[g,h,i]perileno: 0,003 mg L^{-1}) a pouco solúveis (naftaleno: 31 mg L^{-1}) (ROCHA, 2015; OLUWASEUN; OLUTOYIN; JACKSON, 2016). São compostos quimicamente estáveis, mas suscetíveis à oxidação e fotodegradação pela luz. O tempo de meia vida no ar pode variar em uma faixa de poucas horas a dias, no entanto, estima-se que este tempo possa ser de vários meses a muitos anos no solo (CARUSO; ALABURDA, 2008).

As fontes de HPAs incluem os recursos naturais, como vulcões e fontes antropogênicas, como atividades industriais, exaustão de motores a diesel ou à gasolina, queima de carvão e churrasco (OLUWASEUN; OLUTOYIN; JACKSON, 2016). Os hidrocarbonetos aromáticos mais abundantes nas frações leves do petróleo, como a gasolina e o óleo diesel são o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX). Esses compostos podem ser transportados em locais distantes de seu ponto de origem tornando-se fonte de contaminação do solo e água (SOUSA et al., 2016).

São contaminantes presentes em todo ambiente marinho, podendo ser utilizados para avaliar a contaminação por óleo ou compostos pirogênicos em sedimentos marinhos. Eles podem entrar nestes ambientes, através de várias rotas, incluindo a deposição atmosférica, escoamento de rios, emissários domésticos e industriais, derramamento de petróleo ou derivados, além de fontes naturais, consideradas baixas (10% das emissões), como à queima espontânea de floresta, emissões vulcânicas, biossíntese de bactérias, algas e vegetais superiores, além de integrantes naturais do petróleo e do carvão, quando comparadas com as antropogênicas (FRENA et al., 2017).

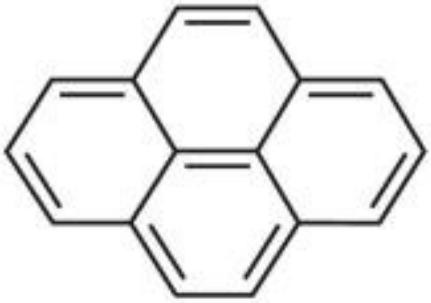
Os HPAs de baixo peso molecular (compostos por 2 ou 3 anéis aromáticos) são predominantemente encontrados em fontes petrogênicas e podem ser introduzidos em ambientes aquáticos por derramamento de óleo, descargas de operações de navios tanque e escoamento municipal e urbano. Por outro lado, os HPAs de alto peso molecular (4 a 6 anéis aromáticos) como pireno e benzo[a]pireno (BaP), são os mais importantes em fontes pirogênicas, sendo liberados no ambiente principalmente na forma de escape de resíduos sólidos (VIEIRA et al., 2018).

Devido aos seus efeitos nocivos aos ecossistemas e a saúde humana, e principalmente ao seu potencial carcinogênico, teratogênico e mutagênico, estes compostos são largamente estudados. No homem, estes compostos não interagem diretamente com material genético, eles podem entrar em contato com a pele, boca e outros pontos de entrada e sofrer ativações enzimáticas e originar metabólitos com elevada natureza eletrofílica, denominadas carcinógenos efetivos. Esses carcinógenos podem interagir com DNA e RNA e possibilitar a formação de processos tumorais (BERNARDO; BARROS; SILVA, 2016; OLUWASEUN; OLUTOYIN; JACKSON, 2016).

O pireno é um dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos mais comumente encontrados. Consta na lista da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) como um dos poluentes prioritários. Este composto pode ser introduzido no ambiente, geralmente através da queima incompleta de combustíveis como carvão, petróleo e madeira, por meios de gases exalados dos veículos e pela fumaça produzida por cigarros. Quando lançado na atmosfera, o pireno pode existir na forma de vapor e material particulado (LEME, 2016). Este composto é constituído por quatro anéis fundidos (Figura 4), apresenta fórmula molecular $C_{16}H_{10}$, massa molecular alta de 202,256 g moL^{-1}, ponto de fusão 151°C, ponto de ebulição 404°C, boa solubilidade em

etanol, benzeno, tolueno e solventes orgânicos em geral (NCBI, 2020). A solubilidade em água é limitada e a afinidade por material particulado é alta (PASSARINI et al., 2011). Os valores de concentração na água considerados típicos vão de 0,00023 – 11,8 μg L^{-1}, enquanto valores acima de 0,08 mg L^{-1} são considerados altos (LEME, 2016).

Figura 4 - Estrutura química do Pireno.



Fonte: NCBI, 2020.

O pireno é uma molécula recalcitrante, com meia-vida longa no solo, variando entre 270 dias a 5,2 anos (PASSARINI et al., 2011), está frequentemente associado a outros compostos aromáticos, tornando-se mais tóxico e mais perigoso nestas associações, se for comparado com uma molécula individual. Quando despejado na água, o pireno é adsorvido pelos sedimentos, sendo capaz de bioacumular de forma leve a moderada, em organismos aquáticos como crustáceos, peixes, algas e moluscos. Quando liberado em ambiente terrestre, este contaminante é adsorvido pelas partículas dos solos, podendo atingir águas subterrâneas. O grau de perigo apresentado pelo pireno reflete nos critérios rigorosos adotados para a água potável e alguns outros meios, sendo tolerada apenas uma baixa concentração deste contaminante (LEME, 2016).

1.1.4 Degradação microbiana dos HPAs

Nas últimas décadas, o uso de microrganismos em processos de degradação de contaminantes, como os HPAs, tem sido proposta como uma abordagem promissora para recuperar ambientes poluídos, uma vez que é ecologicamente correta, eficiente e de melhor custo beneficio. Organismos de diferentes *táxons*, como bactérias

e fungos, possuem atividades catalíticas específicas que podem ser utilizadas para recuperar ambientes contaminados por HPAs, devido à ação de um arsenal enzimático que pode ser sintetizado por esses organismos (BALDANTONI et al., 2017).

Os fungos filamentosos podem ser considerados potencialmente promissores, pois toleram a toxicidade do ambiente, podem sobreviver em condições ambientais desfavoráveis, se desenvolver em extensas redes formadas por micélios, sintetizam enzimas catalíticas e utilizar compostos orgânicos (poluentes) como fontes de carbono para seu desenvolvimento. Geralmente, os fungos não utilizam os HPAs como única fonte de carbono e energia, bem como não os mineralizam, ou seja, não metabolizam os HPAs de modo que promova a completa degradação e formação de CO_2 e H_2O. Entretanto, produzem compostos altamente solúveis em água, aumentando a sua reatividade química e facilitando a ação de bactérias capazes de finalizar esse processo (ROCHA, 2015).

A biodegração dos HPAs, geralmente é incompleta e resulta em compostos intermediários (VIEIRA et al., 2018), depende da estabilidade dos anéis aromáticos e da solubilidade e biodisponibilidade, da concentração e do tamanho da molécula do hidrocarboneto. A solubilidade na água é baixa e decresce quando o peso molecular do composto aumenta (WETLER-TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010). Desta forma, a resistência dos HPAs à degradação microbiana aumenta com o aumento do peso molecular (BALDANTONI et al., 2017).

Devido à baixa solubilidade dos HPAs em água, os microrganismos precisam sofrer adaptações moleculares que facilitam a absorção desses compostos, podendo assim, utilizar três caminhos para a entrada dos hidrocarbonetos na célula microbiana: *a)* contato direto através da ligação da célula a grandes gotas de óleo; *b)* adsorção de gotas de óleo sub-microscópicas à superfície celular; *c)* absorção dos hidrocarbonetos solubilizados na fase aquosa. O transporte através da parede celular pode ser facilitado pela formação de canais especiais que permitem a entrada de hidrocarbonetos, pela formação de vesículas de membrana ou pela excreção de biossurfactante, moléculas que aumentam a área interfacial entre o substrato e o microrganismo, facilitando a assimilação pela célula (ARAÚJO, 2010).

A degradação microbiana dos HPAs pode ocorrer extracelularmente, onde fungos atacam compostos orgânicos usando uma gama de oxirredutases extracelulares com atividades não especificas, e ou intracelularmente, por oxidases

P450 de função mista de vários fungos que catalisam epoxidações e hidroxilações de numerosos compostos poluentes ambientais (HARMS; SCHLOSSER; WICK, 2011).

1.1.4.1 Degradação intracelular (enzimas do Citocromo P450)

As enzimas intracelulares são encontradas em todos os seres vivos, nos eucariotos, normalmente estão ligadas ao reticulo endoplasmático (RE) ou à membrana interna da mitocôndria. As monooxigenases, também conhecidas por enzimas do Citocromo P450 (CP450), constituem-se de proteínas similares, onde cada membro possui especificidade por diferentes substratos. Os componentes do CP450 podem reagir com O_2 e ligar-se ao monóxido de carbono, formando um complexo que exibe intensa absorção a luz em comprimento de onda de 450 nm, gerando o nome do citocromo (ARAÚJO, 2010; SANTOS, 2012; ROCHA, 2015).

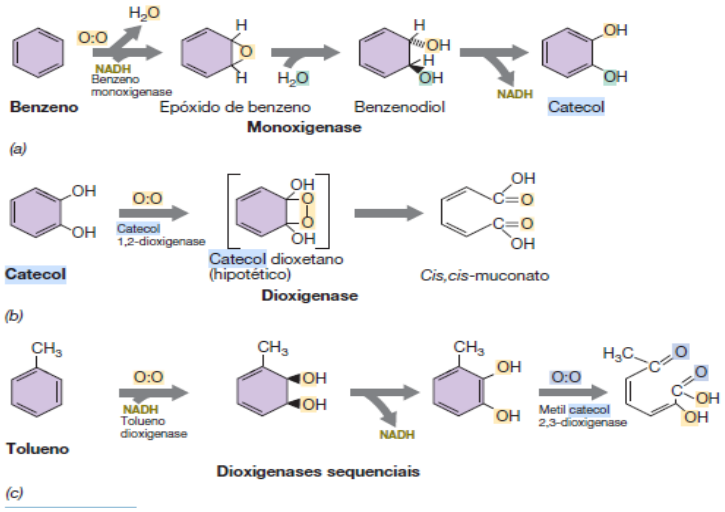
As monooxigenases catalisam uma ampla gama de reações como hidroxilação de carbono, oxigenação de heteroátomos, desalquilação, epoxidação, redução e desalogenação (SYED et al., 2010). Essas enzimas são as mais importantes envolvidas na oxidação de xenobióticos, devido a sua abundância, suas numerosas isoformas e pela indução de sua atividade por xenobióticos em processos de biodegradação. Elas catalisam a transformação de xenobióticos hidrofóbicos ou componentes endógenos em compostos mais hidrofílicos, através da introdução de um átomo de oxigênio, derivado do oxigênio molecular (ARAÚJO, 2010; SANTOS, 2012).

Algumas dessas enzimas são extremamente específicas, catalisando apenas as reações de determinado substrato, enquanto outras são capazes de catalisar oxidações de diversos substratos. Essas reações ocorrem devido às mudanças de conformação da cavidade proteica que orientam o sítio ativo em torno do substrato e isolam a reação conferindo boa atividade catalítica e seletividade (SILVA, 2017a).

A degradação microbiana dos hidrocarbonetos, em condições aeróbicas ou anaeróbicas (CARUSO; ALABURDA, 2008) ocorre através da ativação e rompimento do anel aromático. A ativação exige a ação de enzimas oxigenases (monoxigenases e peroxidades), que incorporam uma molécula de oxigênio molecular ao anel, formando epóxido, ou pelas dioxigenases, que tem a função de reconhecer o composto aromático e adicionar dois átomos de oxigênio, quebrando a estabilidade, devido à ressonância do anel aromático. Assim, após a hidratação, ocorre a formação de

dihidrodiol (1,2-dihidroxiciclohexa-3,5-dieno), cuja isomeria espacial (cis ou trans) depende de qual enzima catalisará a reação enzimática. A molécula com o anel fechado será transformada, por ação de uma desidrogenase, em um dos intermediários centrais da via de degradação dos hidrocarbonetos aromáticos, que podem ser o catecol, o protocatecol ou gentisato, que participarão do ciclo de Krebs (Figura 5) (WETLER-TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

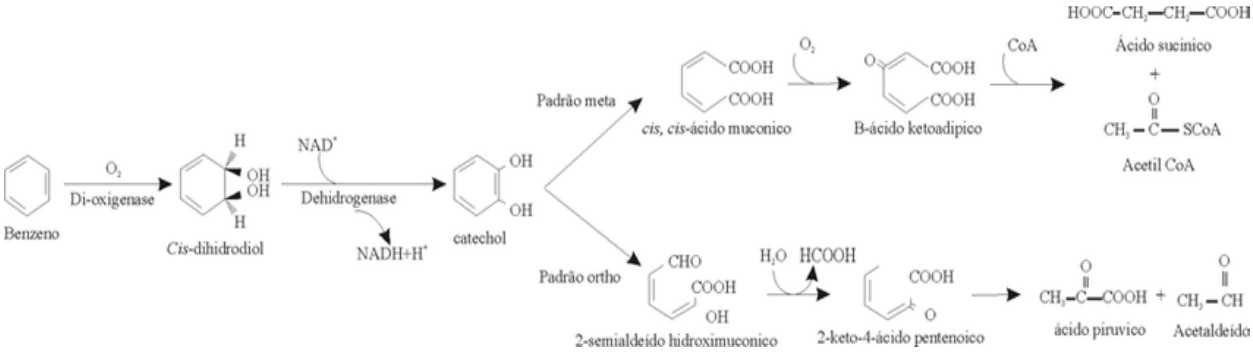
Figura 5 - Via de degradação dos hidrocarbonetos aromáticos, por ação de monoxigenases.



Fonte: MADIGAN et al., 2016.

A fissão do anel aromático se dá pela via orto ou meta clivagem do catecol (Figura 6). A via de orto clivagem do catecol envolve a quebra da ligação entre os átomos de carbono aos grupos hidroxila do catecol, pela ação da enzima catecol 1,2-dioxigenase, levando a formação de cismuconato, e sucessivamente acetil-CoA e succinato. Na via de meta clivagem, a fissão da molécula do catecol ocorre entre o átomo de carbono adjacente ao grupo hidroxila pela ação da enzima catecol 2,3-dioxigenase, formando semialdeído 2-hidroximucônico (2HMS) e, logo após, piruvato e acetaldeido Os outros compostos como o tolueno, etilbenzeno e xileno, são degradados primeiramente pela oxidação do anel, ou a oxidação dos grupos laterais pela ação das enzimas monoxigenases ou dioxigenases (ARAÚJO, 2010).

Figura 6 - Via orto e meta clivagem do catecol.



.

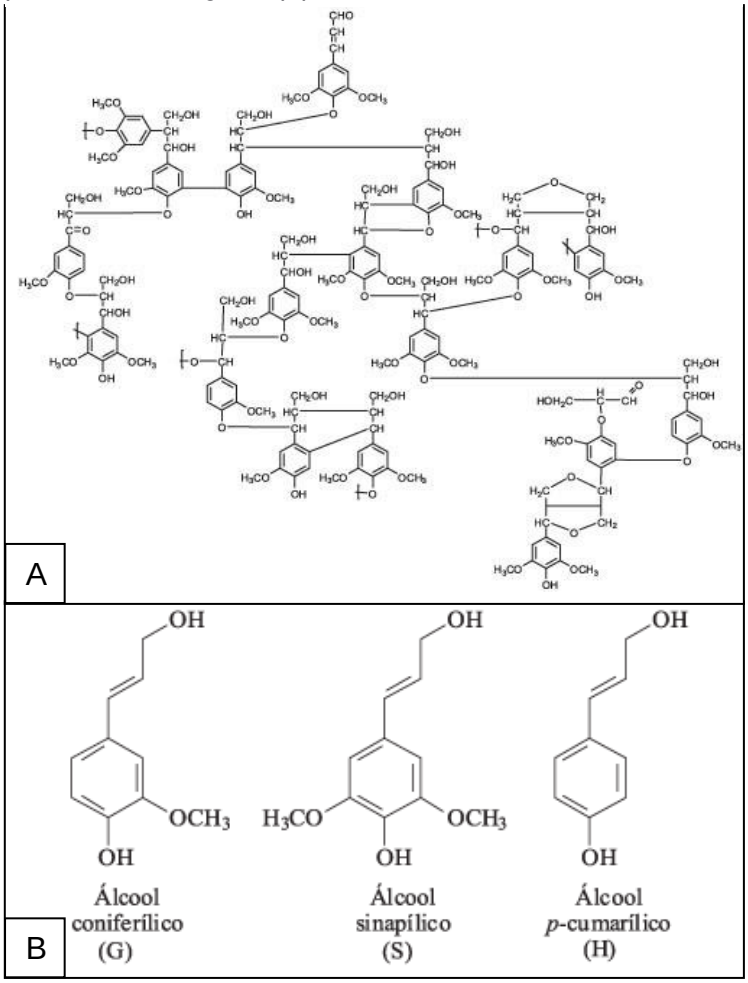
Fonte: MOREIRA; DOURADO, 2007.

1.1.4.2 Degradação extracelular (enzimas ligninolíticas)

Alguns fungos possuem vias alternativas para a degradação de compostos aromáticos, produzindo enzimas extracelulares durante o metabolismo secundário e perante limitações nutricionais do meio (SANTOS, 2012). Essas enzimas, denominadas enzimas ligninolíticas, devido a sua atuação na decomposição de materiais lenhosos (lignina e celulose), podem atuar em processos de tratamento de compostos tóxicos por biorremediação (ARAÚJO, 2010; MADIGAN et al., 2016).

A lignina (Figura 7) é uma macromolécula tridimensional amorfa, encontrada em materiais vegetais, formada pela polimerização de fenilpropanóides (álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico) (Figura 7B) juntamente com água ou grupos hidroxilas. A proporção dos álcoois na estrutura química forma diferentes tipos de lignina (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003).

Figura 7 - Estrutura química da lignina (A) e Alcoóis precursores da lignina (B).



Fonte: BARBOSA et al., 2008; SANTOS et al., 2012.

A variedade de ligninas existentes e a falta de especificidade das enzimas ligninolíticas na degradação de estruturas químicas diferentes, evidenciam a flexibilidade do complexo ligninolítico, que não se limita a degradação de substratos lignocelulósicos naturais (BONUGLI-SANTOS; DURRANT; SETTE, 2012). As enzimas desse complexo podem contribuir para a transformação e degradação de compostos tóxicos recalcitrantes, os quais apresentam estruturas químicas similares aos encontrados em efluentes industriais, como corantes têxteis, HPAs, e pesticidas (PASSARINI et al., 2015).

O complexo enzimático que atua nessa transformação, e age no meio extracelular, é composto por peroxidases, oxidases e lacases. Essas enzimas pertencem à família das oxiredutases. A lignina peroxidase (LiP) é uma hemeproteína extracelular, que catalisa reações de desaminação de produtos de ácidos

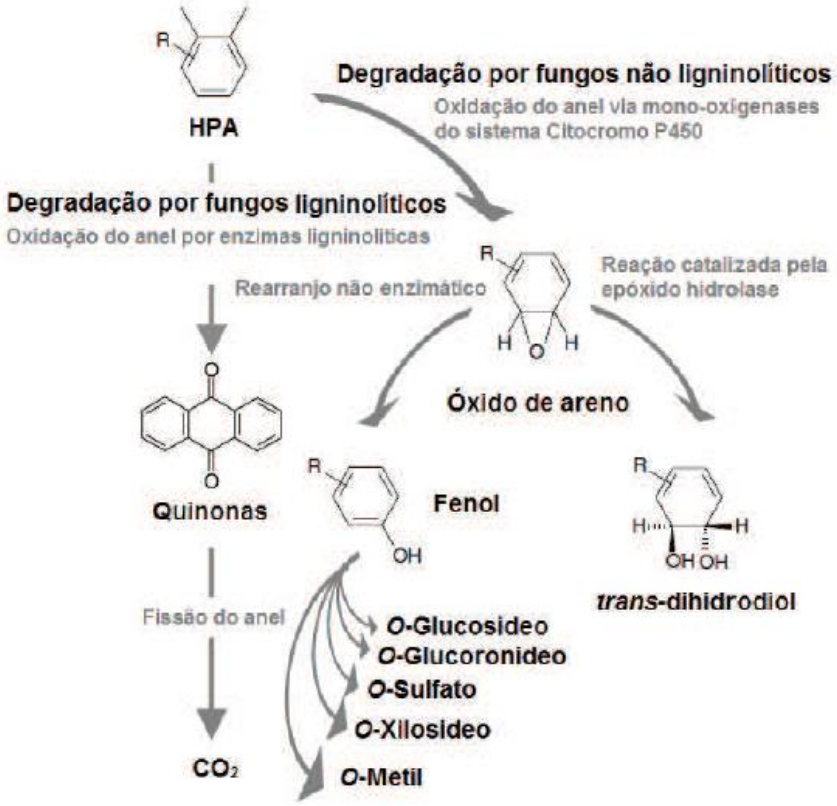
aminoaromáticos, possui um potencial redox alto e baixo pH ótimo, além de pouca especificidade ao substrato e necessidade de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para iniciar a catalase. A LiP é capaz de oxidar uma variedade de substratos redutores, incluindo substratos poliméricos, anéis aromáticos metoxilados, além de degradar compostos fenólicos e não fenólicos, alcoóis benzílicos e de metila, como também, pode provocar rearranjos intramoleculares (ARAÚJO, 2010; MACIEL; CASTRO E SILVA; RIBEIRO, 2010).

A manganês peroxidases (MnP) é uma glicoproteína que atua com isoenzimas, oxidando diretamente Mn (II) à Mn (III), atuando ativamente nos processos de oxidação catalítica, sendo os compostos, quelados por ácido orgânico como o oxalato, formando um complexo estável de alto potencial de oxidorredução. A enzima não depende de H_2O_2, possui um potencial redox menor que a LiP, capacidade de oxidar substratos fenólicos, corantes e compostos aromáticos (ARAÚJO, 2010; MACIEL; CASTRO E SILVA; RIBEIRO, 2010).

As lacases são enzimas multinucleares com quatro átomos de cobre em seu sítio catalítico. Podem catalisar a oxidação de várias estruturas aromáticas, como as fenólicas (mono, di e polifenóis), também degradam compostos não fenólicos na presença de mediadores específicos. Na indústria de alimentos, a lacase elimina compostos fenólicos indesejáveis no processamento de sucos de frutas, vinhos e cerveja, além de remediar águas residuais. Na indústria de papel, branqueia o papel e degrada poluentes ambientais recalcitrantes e corantes sintéticos (CARDOSO et al., 2018).

Os HPAs oxidados pelas enzimas ligninolíticas, geram radicais livres hidroxila pela doação de um elétron que oxida o anel aromático. Essa reação gera quinonas e ácidos em vez de dihidrodiois (Figura 8). Geralmente as quinonas são acumuladas como produtos de degradação de HPAs, devido ao anel aromático ser apenas clivado por ação das enzimas e não mineralizado (MAGRINI, 2012).

Figura 8 - Vias ligninolíticas de degradação de HPAs por fungos.



Fonte: MAGRINI, 2012.

A capacidade das enzimas ligninolíticas em oxidar compostos fenólicos e não fenólicos, remover substâncias xenobióticas e degradar produtos poliméricos e moléculas recalcitrantes despertou a atenção de pesquisadores nas últimas décadas. Assim, sua aplicação biotecnológica em processos de desintoxicação de efluentes industriais, principalmente da indústria de celulose, têxtil e petroquímica, vem sendo estudada amplamente (RODRÍGUEZ COUTO; TOCA HERRERA, 2006; LEVASSEUR et al., 2010; CARDOSO et al., 2018).

1.1.5 Tolerância microbiana a metais pesados

Os metais são elementos químicos que apresentam propriedades físicas características. São sólidos (exceto mercúrio – Hg), possuem brilho, condução elétrica

e térmica, resistência, maleabilidade e ductibilidade, apresentam altos pontos de fusão e ebulição, sua estrutura é cristalina cúbica ou hexagonal (OLIVEIRA, 2018). São elementos que possuem elétrons livres nas camadas de valência, tornando possíveis ligações iônicas com outros materiais, possuem facilidade em oxidar e podem formar óxidos básicos ao se unirem ao átomo de oxigênio (PEIXOTO, 2019).

Em relação à ciência ambiental, os metais são classificados em: *i)* elementos essenciais ou minerais (sódio, potássio, cálcio, ferro, zinco, cobre, níquel e magnésio), encontrados na natureza e possuem função estrutural, funcional e reguladora no organismo humano; *ii)* micro-contaminantes ambientais ou metais pesados (arsênico, chumbo, cádmio, mercúrio, alumínio, titânio, estanho e tungstênio) elementos que podem se bioacumular e biomagnificar nos organismos vivos e causar intoxicação ou até mesmo morte; *iii)* elementos essenciais e simultaneamente micro-contaminantes (cromo, zinco, ferro, cobalto, manganês e níquel), que embora sejam essenciais no organismo, em grandes quantidades podem causar intoxicações que afetam o sistema nervoso, gastrointestinal e diversos outros sistemas do corpo humano (ALVAREZ; ROCHA-GOMES, 2015; OLIVEIRA, 2018).

Os elementos essenciais, classificados em dois grupos principais, de acordo com suas concentrações nos organismos, em macroelementos (Ca, Mg, K, Na) e microelementos (Fe, Zn, Mn, Cu, Co, Sn, Cr), desempenham importante papel metabólico em baixas concentrações, entretanto podem ser tóxicos quando presentes em concentrações elevadas nos organismos. Os elementos não essenciais não apresentam funções biológicas definidas, e quando assimilados pelos organismos em concentrações nocivas, estes elementos podem desencadear efeitos adversos, que variam conforme a atuação específica de um determinando elemento, sua toxicidade e exposição (MOURA, 2013).

Os elementos considerados metais pesados são quimicamente muito reativos e bioacumuláveis, definidos com base em três critérios: densidade (superior a 5 g cm^{-3}), número atômico (superior a 20) e propriedades químicas (ionização e reatividade) (SIDDIQUEE; ROVINA; AZAD, 2015; PEIXOTO, 2019). Podem ser encontrados no ambiente aquático natural por deposição atmosférica e fontes geológicas (interperismo de rochas) ou por atividades antropogênicas, como o descarte indevido de resíduos industriais, deposição de esgotos e mineradoras (VALE et al., 2011; OLIVEIRA, 2018). Estipula-se que 99% dos metais contaminantes são

depositados e acumulados nos sedimentos e menos de 1% são dissolvidos na água. Entretanto, através de variações físicas e/ou químicas (pH, salinidade, potencial redox) ou fenômenos de ressuspensão natural, os metais pesados podem diluir-se e tornar-se disponíveis aos organismos aquáticos, sendo uma fonte de poluição (AKCIL et al., 2015).

Atividades de manufatura, grandes indústrias (galvanização, metalúrgica, curtumes, fabricação de produtos químicos, drenagem de minas e fabricação de baterias) e atividades agrícolas, são responsáveis pelo acúmulo de altas concentrações de metais pesados nos solos, estuários, portos e zonas costeiras. Essa contaminação por metais representa um sério problema ambiental de preocupação global, que autoridades nacionais e internacionais enfrentam desde as últimas duas décadas (IRAM et al., 2013).

A concentração e a disponibilidade de metais pesados presentes em efluentes industriais, despejados sem tratamento nos solos e águas, bem como a ação de diferentes fatores (tipo de metal e a natureza do meio), alteram a microbiota natural dos ecossistemas e podem selecionar microrganismos resistentes a compostos metálicos tóxicos, representando um risco à saúde pública (IRAM et al., 2013; TORRES-CRUZ et al., 2018). Dependendo dos fatores ambientais e da espécie metálica, a morfologia e a fisiologia dos microrganismos podem ser alteradas, afetando suas taxas de crescimento, reprodução e produção enzimática (IRAM et al., 2013). Esses compostos são infinitamente persistentes no ambiente, e ao contrário dos poluentes orgânicos, não podem ser degradados, podem ser apenas transformados em soluções menos tóxicas através de estratégias de alteração da sua solubilidade (mobilização) ou sua estabilidade, reduzindo assim sua biodisponibilidade (imobilização) (AKCIL et al., 2015; SIDDIQUEE; ROVINA; AZAD, 2015).

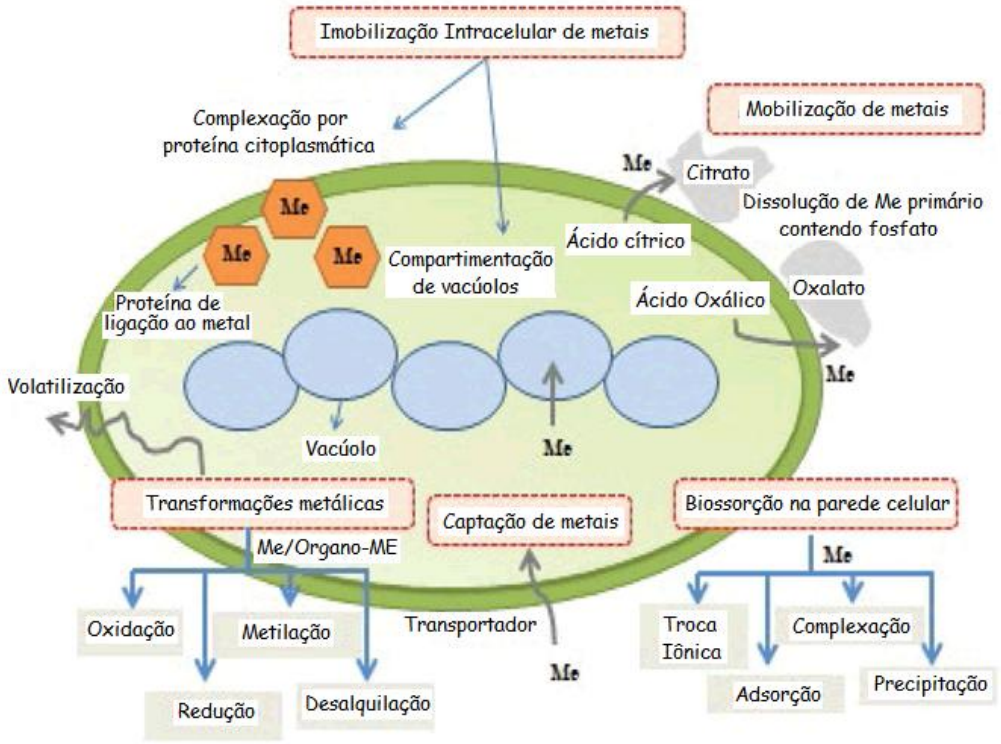
A biomassa de fungos e leveduras toleram metais pesados, os quais se adaptam e crescem em altas concentrações de metais (IRAM et al., 2013). A tolerância/resistência ao metal é definida como a capacidade de um organismo sobreviver à toxicidade do metal por meio de um ou mais mecanismos em resposta direta aos metais. A tolerância ao metal por fungos filamentosos foi associada a seus locais de isolamento, toxicidade do metal testado, sua concentração no meio e na competência do microrganismo. Os locais contaminados são conhecidos como

principais fontes de espécies resistentes aos metais (OLADIPO et al., 2017). A resistência aos metais pesados pode ocorrer pela eliminação de íons metálicos com auxílio de substâncias quelantes de metais ou pela decomposição em sistemas de transporte específicos de metais (SIDDIQUEE; ROVINA; AZAD, 2015).

Mecanismos biológicos como precipitação intra e extracelular (formação de precipitados cristalinos ou amorfos), transformação de valência (redução e oxidação de átomos), absorção ativa (interação físico-química) (TORRES-CRUZ et al., 2018), complexação e cristalização, transformação, biossorção de pigmentos em parede celular, transporte diminuído ou impermeabilidade, efluxo, compartimentação intracelular e sequestro (IRAM et al., 2013), estão envolvidos na sobrevivência de fungos filamentosos, que os utilizam para acumular ou remover metais de ambientes contaminados com estes compostos.

A parede celular dos fungos possui alta capacidade de interação com íons de metais pesados (Figura 9), podendo assim, desintoxicar ambientes poluídos por esses compostos através de transformação molecular. A produção e secreção de ácido cítrico e ácido oxálico, substâncias quelantes, interagem com os metais e aumentam sua solubilidade através da acidificação do meio (*Mobilização de metais*). Esses microrganismos podem regular suas concentrações citosólicas de íons metálicos através da compartimentação e complexação de vacúolos por proteínas citoplasmáticas, as metalotioneínas e fitocelatinas, que formam ligações entre a proteína e o metal, modulando as concentrações intracelulares de metais (*Imobilização intracelular de metal*). Reações químicas como oxidação, redução, metilação e desalquilação podem ocorrer, levando a volatilização do metal, reduzindo assim, sua toxicidade e biotransformação (*Transformações metálicas*) (SIDDIQUEE; ROVINA; AZAD, 2015). Os fungos também apresentam transportadores específicos de metais, que reagem com os metais através de acoplamentos metabólicos que são acionados por gradiente de concentração (*Captação de metais*). A parede celular fúngica, que funciona como uma camada protetora pode controlar a captação de metais tóxicos para a célula, através de uma interação físico-química entre íons metálicos e o microrganismo por processos de troca iônica, complexação, cristalização, adsorção e precipitação (*Biossorção*) (AKCIL et al., 2015).

Figura 9 - Mecanismos de interação da parede celular de fungos com íons metálicos.



Fonte: SIDDIQUEE et al., 2015 modificada.

Estudos demonstram que linhagens fúngicas podem ser tolerantes a metais como cobre, níquel, cromo e chumbo, sendo bastante utilizados na remoção e tratamento de águas residuais e de solos contaminados com metais pesados (PARAMESWARI; LAKSHMANAN; THILAGAVATHI, 2010; IRAM et al., 2013). As espécies *Aspergillus flavus* e *A. niger* já foram reportadas como tolerantes ao cromo e ao chumbo, sendo capazes de reduzir o metal pesado cromo hexavalente (Cr^{6+}) para cromo trivalente (Cr^{3+}). O gênero em questão é muito versátil, pois além de ser utilizado com sucesso na biorremediação de ambientes contaminados por metais pesados também degradam compostos aromáticos e pesticidas (AKHTAR et al., 2013; IRAM et al., 2013; DESHMUKH; KHARDENAVIS; PUROHIT, 2016).

Durante experimentos de biossorção e determinação da concentração mínima inibitória de níquel e cromo para culturas fúngicas isoladas de solo contaminado, *Phanerochaete chrysosporium,* destacou-se pelo acúmulo de mais de 60% de cromo e 57% de níquel do que os outros fungos filamentosos investigados. Nesse estudo, os

autores concluíram que os fungos isolados de solo contaminados com metais poderiam ser explorados na remoção de metais pesados em águas residuais (PARAMESWARI; LAKSHMANAN; THILAGAVATHI, 2010).

Considerando os mecanismos de interação dos fungos filamentosos com íons metálicos e sua capacidade de resistência e tolerância aos metais, esses microrganismos podem ser utilizados em processos de biorremediação de ambientes impactados por metais pesados (IRAM; NASIR, 2012). Os processos microbianos de biotransformação e bioacumulação são os que estão envolvidos na remediação de metais pesados, sendo que a bioacumulação representa o cenário mais estratégico para investimento em tecnologia de biorremediação microbiana, visto seu potencial para ser implementado em programas/ações de recuperação de áreas impactadas por metais pesados (CRISTINA; CASTRO; QUINTELLA, 2018).

1.1.6 Tratamento de efluentes industriais

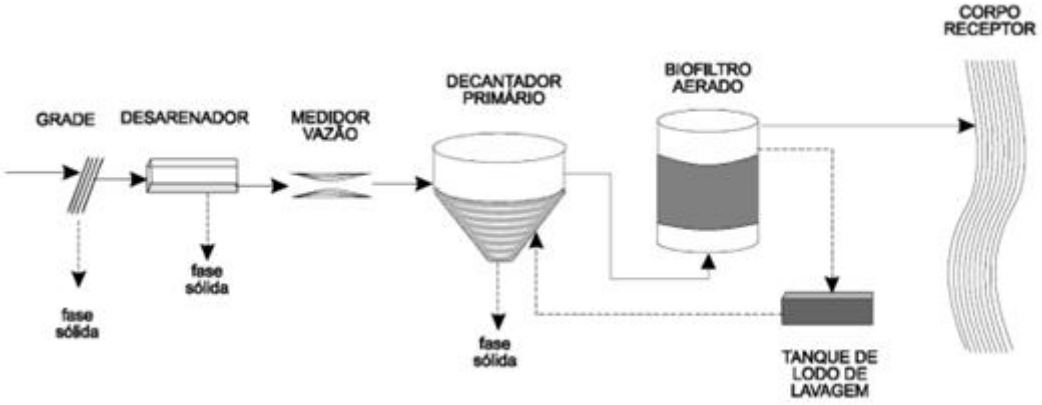
O desenvolvimento da indústria em todo o mundo causou danos significativos, devido á interferência de poluentes orgânicos na natureza. Quando essas substâncias são despejadas na água, afetam o equilíbrio ecológico e os organismos vivos. Diversas metodologias disponíveis podem ser utilizadas para reduzir o impacto ambiental, incluindo tratamentos biológicos, filtração, oxidação, fotodegradação e adsorção (TORGUT et al., 2017).

Os compostos tóxicos e recalcitrantes, como os corantes sintéticos, metais pesados e hidrocarbonetos encontrados nas águas residuais industriais, são uma ameaça à qualidade de vida dos ecossistemas, pois eles interferem na passagem de luz, retardam a fotossíntese, afetam a solubilidade dos gases e podem bioacumular em diversos organismos como plantas e animais. A fim de evitar um desequilíbrio ecológico em vários ecossistemas, esses efluentes devem ser tratados antes da destinação final (ALMEIDA, 2018). Os processos de tratamento dos efluentes industriais podem ser químicos, físicos ou biológicos, ou ainda podem ser associados, se necessário, para alcançar melhores resultados (ARAÚJO et al., 2013).

Os processos físicos de tratamento estão relacionados à remoção do corpo sólido do efluente através de métodos de gradeamento, sedimentação, filtração, flotação ou equalização. Os químicos são aqueles que dependem de reações

químicas, como coagulação, troca iônica, oxidação, neutralização e ultrafiltração. Os métodos biológicos são os que utilizam organismos vivos e/ou suas enzimas, que reagem bioquimicamente para eliminar os contaminantes, esse processo pode ser anaeróbico e/ou aeróbico e se dão pela utilização de sistemas de biodiscos, filtro percolador, valas de oxidação, lodos ativados e lagoas aeradas (Figura 10) (HIDROGERON, 2016).

Figura 10 - Tratamento físico, químico e biológicos de efluentes.



Fonte: OLIVEIRA, 2014.

Métodos físico-químicos que utilizam agentes oxidantes fortes (H_2O_2, O_3 e reagente de Fenton), processos avançados de oxidação como fotoquímicos e fotocatalítica (H_2O_2/UV ou oxidação eletroquímica), coagulação, floculação, filtração e procedimentos de adsorção embora eficazes, produzem grande quantidade de lodo, possuem alto custo e não são viáveis para aplicação em larga escala, contudo possuem aplicação limitada e ineficiência para alguns corantes (DESHMUKH; KHARDENAVIS; PUROHIT, 2016; PAZ et al., 2017). Estes métodos podem criar uma carga química adicional em corpos d água, que reduz a penetração de luz nos sistemas aquáticos, prejudicando a fotossíntese e comprometendo a flora e a fauna (RANI et al., 2014). Os métodos biológicos geralmente são eficientes para uma grande variedade de substâncias tóxicas, apresentam menores custos na aplicação, baixa produção de lodo inorgânico, mineralização/estabilização completa de corantes, e geram produtos que

não agridem o meio ambiente (DESHMUKH; KHARDENAVIS; PUROHIT, 2016; HOLKAR et al., 2016; PAZ et al., 2017).

Não existe um tratamento padrão para efluentes, uma vez que a composição de cada efluente residual é diferente e, portanto, requer medidas específicas para seu tratamento, que podem conter métodos físicos, químicos e biológicos. O objetivo das estações de tratamento de efluentes têxtil é implementar tecnologias que ofereçam poluição mínima ou nula na água. Uma vez identificada à carga poluente e os tipos de contaminantes, é possível definir qual o tipo de tratamento mais adequado àquele efluente (HIDROGERON, 2016; HOLKAR et al., 2016).

1.1.7 Bioprospecção microbiana em ambientes diferenciados

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (MADIGAN et al., 2016). Estipula-se que existem 10^{30} células microbianas existentes no planeta terra, e destes, menos de 1% já foram cultivados e tiveram seu metabolismo explorado em laboratório (ALMEIDA; COLLARES; BARBOSA, 2015).

Desta forma, tecnologias tradicionais e avançadas de bioprospecção de microrganismos cultiváveis ou não, têm sido desenvolvidas e empregadas para aumentar o conhecimento da diversidade microbiana e processos funcionais em diversos ecossistemas. Assim, a caracterização de genes, enzimas e/ou vias metabólicas para posteriores aplicações biotecnológicas, tornaram-se ferramentas indispensáveis em processos de tratamentos de ambientes impactados com compostos poluentes tóxicos (ALMEIDA; COLLARES; BARBOSA, 2015).

A triagem por fungos filamentosos e seus metabólitos vêm crescendo em virtude do seu alto potencial degradativo, biossortivo (metais e corantes) e dos mecanismos de resistência em condições ambientais adversas. Estes organismos apresentam características que os tornam interessantes em aplicações industriais e processos de biorremediação, como o alongamento e ramificação das hifas induzidas quimiostaticamente em direção à fonte de carbono orgânico (colonização de grandes áreas) bem como biodegradação por enzimas intra e/ou extracelulares. Dessa forma, o contato superficial

com o contaminante é otimizado, aumentando sua biodisponibilidade e, consequentemente, sua biodegradação (PEREIRA; FREITAS, 2012).

Células microbianas, de um modo geral, vêm apresentando bons resultados na transformação de substâncias químicas complexas como os HPAs, derivados do petróleo e metais pesados, em formas menos complexas e/ou menos tóxicas, demonstrando o potencial biotecnológico destes organismos (CASTRO-SILVA et al., 2003; SANTAELLA et al., 2009; PASSARINI et al., 2011; CHANAGÁ et al., 2012; RANI et al., 2014; LEE et al., 2018).

SILVA (2017b) selecionou fungos isolados do bioma da Caatinga com potencialidade para biorremediação de ambientes contaminados com corantes da indústria têxtil. O estudo apresentou potencial de três espécies de fungos filamentosos (*Mucor subtilissimus, Cunninghamella phaeospora e Aspergillus* sp.) para descoloração do corante Direct Black 22, sendo o isolado *Aspergillus* sp., o responsável pela maior capacidade de tratamento da água, uma vez que apresentou forte habilidade para descolorir o corante em diferentes concentrações (50, 125 e 250 mg L^{-1}). Desta forma, o estudo concluiu que o isolado pode ser considerado um potencial agente na biorremediação de efluentes têxteis.

LISBOA (2017) avaliou 50 isolados do gênero *Trichoderma* spp., quanto à descoloração do corante têxtil Índigo Carmine e do efluente têxtil (coletado em uma lavanderia de jeans em Toritama - PE) e sua produção enzimática. Nesse estudo as linhagens *Trichoderma atroviride* (URM 6625, 3735 e 3270) apresentaram percentual de descoloração do Índigo Carmine de 93,57%, 94,61% e 96,86%, respectivamente. As melhores atividades enzimáticas encontradas foram do isolado *Trichoderma virens* URM 4996 para lacase (15,7 U L^{-1}), *Trichoderma atroviride* URM 3735 para lignina peroxidase (1307 U L^{-1}) e *Trichoderma erinaceum* URM 3881 para manganês peroxidase (875,3 U L^{-1}). Entre os fungos testados, *T. atroviride* (URM 4950), apresentou o melhor resultado na descoloração do efluente têxtil puro, (75,30% de descoloração).

No trabalho realizado por Rosa (2018), foi avaliado a descoloração de efluente proveniente de lavanderia industrial têxtil na cidade de Caruaru-PE/Brasil por fungos imobilizados em suportes. *Aspergillus niger* e *Scytinostroma duriusculum* apresentaram percentuais de descoloração do efluente de 89,49 e 86,50% respectivamente, os quais podem estar associados a produção de manganês peroxidase (35,72 e 106,79 U L^{-1}).

O autor da pesquisa concluiu que o fungo *Scytinostroma duriusculum* imobilizado pode ser utilizado nos processos de biorremediação de efluentes têxteis.

ROCHA, (2015) desenvolveu estudos sobre degradação de hidrocarbonetos, entre eles (naftaleno (N), acenaftileno (Aceft), acenafteno (Ace), fluoreno (F), fenantreno (Fen), antraceno (Ant), fluorantreno (Fl), pireno (Pi), benzo(a)antraceno (BaA), criseno (Cri), benzo(b)fluorantreno (BbF), benzo(k)fluorantreno (BkF), benzo(a)pireno (BaPi), indeno[1,2,3-cd]pireno (Ipi), Dibenzo[a,h]antraceno (DbahA), benzo[g,h,i]perileno (BghiPe), utilizando um consórcio fúngico (*Fusarium moniliforme*, *Phoma herbarum* e *Penicillium citrinum*) e petróleo bruto em ensaios de bioaumentação e bioestímulação. O estudo das linhagens de fungos demonstrou o potencial para o emprego deste consórcio em biorremediação, pois apresentaram uma alta taxa de biodegradação (64%) dos HPA total presentes no óleo bruto ao final de 7 dias de experimento. Foi verificado ainda, que alguns compostos foram totalmente mineralizados em 7 dias (Indeno[1,2,3-cd]pireno e o Benzo[g,h,i]perileno). Em destaque a mineralização do Benzo(a)pireno.

Parameswari; Lakshmanan; Thilagavathi (2010) isolaram os fungos *Aspergillus niger, Phanerochaete chrysosporium* e *Trichoderma viride*, resistentes a metais de um solo contaminado com esgoto municipal. Os isolados foram testados quanto ao potencial de biossorção de metais. Este estudo determinou concentrações inibitórias mínimas de níquel (50 a 100 mg L^{-1}) e cromo (75 a 100 mg L^{-1}) e concluiu que os fungos em questão apresentaram potencial de biossorção de metal e podem ser explorados para remoção de metais em soluções aquosas. Da mesma forma no trabalho realizado por TORRES-CRUZ et al., (2018a), os autores isolaram e identificaram fungos tolerantes a metais pesados de uma floresta temperada de pinheiros na Carolina do Norte – EUA. Os gêneros mais comuns encontrados foram *Penicillium* e *Tricoderma*, mostrando amplos níveis de adaptação a diferentes metais e níveis de toxicidade.

Os sistemas enzimáticos presentes no metabolismo dos fungos é uma ferramenta útil para fins de biorremediação devido a sua ação na degradação de vários compostos xenobióticos e corantes (MACIEL; CASTRO E SILVA; RIBEIRO, 2010). Além disso, os fungos ainda podem sintetizar biossurfactantes, que apresentam diversas aplicações, tais como, recuperação de petróleo, degradação de hidrocarbonetos, remoção de metais pesados a partir de solos contaminados (REIS, 2017).

A produção de biossurfactantes pelos microrganismos vem sendo estudada em processos de biorremediação devido a suas características de seletividade, baixa toxicidade e por serem biodegradáveis e compatíveis com tecnologias de menor impacto ao meio ambiente, além de sua funcionalidade sob várias condições extremas de pH e temperatura. Em comparação aos surfactantes sintéticos, são mais versáteis e mais adequados para o controle de poluição por meio da biodegradação (YAKUBU, 2007; REIS, 2017).

Os biossurfactantes são moléculas de características anfipáticas, ou seja, possuem uma região hidrofílica e uma região lipofílica. Devido a esta estrutura, tendem a acumular-se nas interfaces, entre as fases de fluidos com polaridades diferentes (óleo-água ou óleo-ar) reduzindo assim a tensão superficial e interfacial dos líquidos pelo remanejamento molecular. Esse processo dinâmico influencia as ligações hidrofílicas-hidrofóbicas e aumenta a área superficial, a solubilidade, mobilidade e biodisponibilidade da substância, com consequente aumento da biodegradabilidade (REIS, 2017).

Essas moléculas podem ser produzidas no metabolismo secundário de uma grande variedade de microrganismos incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos, as quais possuem diversas aplicações industriais, tais como detergência, emulsificação, dispersão e solubilização. Assim podem ser utilizados na indústria de alimentos, produtos de limpeza, petróleo, cosméticos e produtos de higiene (PEREIRA; DUVOISIN JR; ALBUQUERQUE, 2017).

Os biossurfactantes são produzidos por microrganismos que utilizam como substratos de crescimento, moléculas simples de carboidratos, óleos e hidrocarbonetos. O uso de diferentes tipos de substratos altera a estrutura e as propriedades do biossurfactante produzido. Assim, os microrganismos podem utilizar compostos dos ambientes contaminados, tais como os componentes do petróleo bruto como substrato para a produção de biossurfactantes. O uso desses microrganismos apresenta-se como alternativa ecologicamente correta para o tratamento de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo (LEE et al., 2018; WANG et al., 2018).

Grande parte dos estudos sobre biossurfactantes é feita com bactérias e leveduras, entretanto, espécies de fungos representantes dos gêneros *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp., mostram-se eficientes na degradação de petróleo bruto (ZHANG et

al., 2016; REIS, 2017). Estudos demonstram a produção de biossurfactantes por microrganismos e sua utilização biotecnológica como alternativa prática e economicamente viável para destinação de resíduos industriais. Catiglioni, Bertolin e Costa (2009) descreveram a produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agrícolas, como substrato de crescimento, em biorreatores. Santaella et al. (2009) compararam o desempenho de reatores biológicos inoculados com o fungo *Aspergillus niger* para remover matéria orgânica, fenóis totais e compostos nitrogenados de águas residuais de refinarias de petróleo.

Microrganismos isolados de efluentes industriais possuem o metabolismo adaptado ao ambiente extremamente contaminado por compostos químicos e tóxicos, podendo ser considerados potencialmente promissores na obtenção de enzimas degradadoras de poluentes ambientais. Neste sentido, o estudo da maquinaria biotecnológica destes microrganismos pode auxiliar o desenvolvimento de processos biorremediadores nestes ambientes.

1.2 Justificativa

Os poluentes ambientais encontrados nos efluentes industriais são de difícil degradação natural, persistem e bioacumulam em diversos ecossistemas. Métodos de tratamento biológicos, geralmente são eficientes para uma variedade de substâncias tóxicas, apresentam menores custos na aplicação e geram produtos que não agridem o meio ambiente (DESHMUKH; KHARDENAVIS; PUROHIT, 2016; HIDROGERON, 2016; PAZ et al., 2017).

As tecnologias utilizadas na busca por células microbianas provenientes de ambientes considerados complexos ou contaminados com poluentes ambientais vêm demonstrando que estudos em bioprospecção, são fundamentais para se evidenciar o potencial biotecnológico proveniente destes organismos, incluindo a degradação e ou tolerância a compostos tóxicos (ALMEIDA; COLLARES; BARBOSA, 2015). Estas características funcionais são adquiridas pela comunidade microbiana, através de eventos evolutivos na presença destes compostos tóxicos, fazendo com que o uso destas células microbianas seja considerado promissor em aplicações industriais e principalmente em processos de biorremediação (PEREIRA; FREITAS, 2012).

Neste sentido, o presente projeto buscou explorar o metabolismo de fungos filamentosos isolados de uma estação de tratamente de efluente indústrial têxtil, na busca por compostos biotecnologicamente aplicáveis em processos de biorremediação.

1.3 Pergunta Norteadora e Hipótese

Fungos filamentosos isolados de efluente têxtil possuem características e mecanismos que podem ser utilizados em processos de biorremediação de ambientes contaminados com compostos tóxicos e recalcitrantes?

Os fungos filamentosos isolados de efluente têxtil possuem características metabólicas que os tornam adaptados à presença de compostos tóxicos recalcitrantes e os tornam aptos a transformar esses compostos em moléculas menos tóxicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados de uma amostra coletada em uma estação de tratamento de efluente industrial têxtil, quanto à capacidade de descoloração, tolerância e degradação de compostos poluentes ambientais como corante sintético, metais pesados e hidrocarbonetos, por enzimas e/ou metabólitos, no intuito de utilizá-los em processos de biorremediação.

2.2 Específicos

- Seleção de fungos filamentosos potencialmente descolorantes/degradadores do corante sintético Remazol Brilliant Blue R (RBBR);
- Avaliação da produção da enzima lacase com os isolados potencialmente descolorantes/degradadores;
- Seleção de fungos filamentosos produtores de biossurfactantes e avaliação de emulsificação;
- Avaliação da tolerância frente a diferentes concentrações de metais pesados;
- Avaliação da tolerância a hidrocarbonetos;
- Avaliação da degradação do HPA pireno.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reativação dos isolados

Os 60 fungos filamentosos utilizados no presente trabalho foram coletados a partir de uma amostra de estação de tratamento de efluente têxtil de uma indústria localizada na rodovia BR – 277, no município de São Miguel do Iguaçu – Paraná/Brasil (latitude 25° 20` 50`` Sul e longitude 54° 14` 6`` Oeste) (BERNAL et al., 2020 In press), no âmbito do projeto: "Bioprospecção de resíduos da Indústria Têxtil: avaliação do potencial biotecnológico para área ambiental e da saúde", coordenado pelo Prof. Dr. Michel R. Z. Passarini, em desenvolvimento na Unila.

Os isolados estão preservados, na forma de discos de micélio, em tubos de 2 mL em glicerol 20% à - 20ºC no laboratório de Biotecnologia Ambiental da Universidade Federal da Integração Latino-Americana – UNILA. Os discos foram inoculados em placas de Petri com meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA: Infusão de batata 4 g L^{-1}, dextrose 20 g L^{-1}, ágar 15 g L^{-1}) e incubados durante 21 dias a 28°C.

Os 26 isolados (Tabela 1) que obtiveram crescimento satisfatório foram identificados por técnicas moleculares na Divisão de Recursos Microbianos (DRM), do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP) bem como por características morfológicas macro e microscópicas (BERNAL et al., 2020 In press).

Tabela 1 - Isolados fúngicos reativados.

Isolados	Identificação
ITF 2	*Penicillium* sp.
ITF 3	*Penicillium* sp.
ITF 4	*Penicillium rubens*
ITF 8	*Penicillium* sp.
ITF 9	*Aspergillus* sp.
ITF 10	*Aspergillus sydowii*
ITF 11	*Penicillium* sp.
ITF 12	*Penicillium* sp.
ITF 13	NI
ITF 14	*Penicillium* sp.

ITF 20	NI
ITF 21	*Penicillium* sp.
ITF 22	*Penicillium citrinum*
ITF 27	*Aspergillus sydowii*
ITF 28	*Penicillium* sp.
ITF 29	*Trichoderma harzianum*
ITF 30	*Aspergillus sydowii*
ITF31	NI
ITF 33	*Sarocladium* sp.
ITF 34	*Penicillium* sp.
ITF 39	*Penicillium* sp.
ITF 40	*Penicillium* sp.
ITF 43	*Penicillium* sp.
ITF 44	NI
ITF 47	*Aspergillus amoenus*
ITF 60	NI

NI = não identificado

Fonte: o autor, 2020.

3.2 Avaliação da descoloração do corante RBBR

3.2.1. Teste preliminar em meio sólido

A avaliação da descoloração foi realizada com os 26 isolados (Tabela 1) de acordo com DA SILVA et al., (2008), modificado. A partir dos isolados fúngicos reativados, um (01) disco de micélio fúngico (0,5 cm de diâmetro) foi retirado da borda da colônia e transferido para placas de Petri contendo os meios: a) BDA adicionado do corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR) na concentração de 500 mg L^{-1}; b) BDA adicionado do corante RBBR na concentração de 1000 mg L^{-1}. As placas foram incubadas durante 13 dias a 28°C, a fim de se testar a capacidade de descoloração do corante. Os organismos que apresentaram um halo de descoloração ao redor do crescimento microbiano foram considerados como resultados positivos. Como controle foram utilizados placas de Petri com meio BDA com adição de RBBR, isento de células, e meio BDA com inóculo sem RBBR. Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata.

3.2.2 Teste em meio líquido

A descoloração do corante RBBR em meio de cultura líquido foi realizada com os 26 isolados (Tabela 1) de acordo com DA SILVA et al., (2008), modificado. A partir dos isolados em meio sólido, três discos de micélio fúngico (0,5 cm de diâmetro) foram retirados da borda da colônia e transferidos para frascos erlenmeyer contendo meio de cultura Caldo Batata Dextrose (PDB: Infusão de batata 4 g L^{-1}, dextrose 20 g L^{-1}) com adição de RBBR em concentrações de 500 mg L^{-1} e 1000 mg L^{-1}. Os erlenmeyers foram incubados em estufa rotatória durante 12 dias, sob agitação de 150 rpm à 28°C.

Amostras de 1 mL das culturas foram coletadas nos tempos 4, 8 e 12 dias de incubação, centrifugadas a 12.000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante diluído 10 vezes com água destilada. A partir dessas diluições foi verificada a redução da absorbância em relação ao tempo zero, em espectrofotômetro (BEL-1105) no comprimento de onda de 580 nm (DA SILVA et al., 2008). A eficiência da descoloração foi expressa através da fórmula:

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

$A_{\lambda\ \text{inicial}}$ = absorbância inicial e $A_{\lambda\ \text{final}}$ = absorbância final

Experimentos de controle foram conduzidos utilizando meio PDB, com inóculo, isento de RBBR, e meio PDB isento de células com adição de RBBR. Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata. Os isolados que apresentaram 60% ou mais de descoloração foram avaliados quanto à capacidade de produção da enzima lacase.

3.2.3 Avaliação de adsorção do RBBR no micélio

Os isolados ITF 12 e ITF 47 foram avaliados quanto à adsorção do RBBR no micélio, por apresentarem os melhores resultados nos ensaios de descoloração do corante em meio sólido e líquido, respectivamente. A partir dos isolados em meio sólido, três discos de micélio fúngico (0,5 cm de diâmetro) foram retirados da borda da

colônia e transferidos para frascos Erlenmeyer contendo meio de cultura Caldo Batata Dextrose (PDB: Infusão de batata 4 g L^{-1}, dextrose 20 g L^{-1}) com adição de RBBR em concentrações de 500 mg L^{-1}. Os frascos foram incubados em estufa rotatória durante 7 dias, sob agitação de 150 rpm à 28°C.

Amostras de 1 mL das culturas sacrifício foram coletadas nos tempos 3, 5 e 7 dias de incubação, centrifugadas a 12.000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante diluído 10 vezes com água destilada. A partir dessas diluições foi verificada a redução da absorbância em relação ao tempo zero, em espectrofotômetro (BEL-1105) no comprimento de onda de 580 nm (DA SILVA et al., 2008).

As culturas foram trituradas utilizando o sistema Ultra – Turrax® segundo Passarini et al. (2011). As amostras permaneceram em repouso até separação das fases sólidas - líquidas. Amostra da fase líquida foram coletas com auxílio de uma micropipeta, centrifugada a 12.000 rpm por 2 minuto e o sobrenadante diluído 10 vezes com água destilada. A partir dessas diluições foi verificada a redução da absorbância em espectrofotômetro (BEL-1105) no comprimento de onda de 580 nm (DA SILVA et al., 2008). A absorbância antes da trituração e após trituração foram comparadas para verificar a possibilidade de adsorção do corante RBBR no micélio. A fase sólida foi filtrada em sistema de bomba à vácuo, com auxílio de papel filtro previamente seco em estufa de secagem por 24h e pesado. O material retido no papel filtro foi seco em estufa de secagem por 24 horas e pesado novamente. Foram comparados os pesos antes e depois do papel filtro.

3.3 Avaliação da atividade enzimática de lacase

Os isolados que apresentaram 60% ou mais de descoloração foram cultivados em placas de Petri com ágar extrato de malte 2% (MA2: extrato de malte 2 g 100 mL^{-1} e ágar 15 g L^{-1}) por 7 dias a 28 °C. Após a incubação, um disco de micélio fúngico (0,5 cm de diâmetro) foi retirado da borda da colônia e transferido para frascos de erlenmeyer de 50 mL contendo 30 mL do caldo extrato de malte a 2% (m/v) em duplicata. Os frascos foram incubados durante 7 dias a 150 rpm e 28°C. As culturas foram colhidas por filtração em gaze estéril e centrifugadas a 10.000 rpm durante 30 min. O sobrenadante (1.800 µL) foi usado como extrato enzimático, adicionado a

ele uma mistura de 900 µL de tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), 300 µL de solução 2,2-azino-bis-etilbentiazolina (ABTS) 0,03%. A partir dessa mistura foi verificada a absorbância em espectrofotômetro (BEL-1105) no comprimento de onda de 420 nm, em seguida, incubada por 10 minutos a 28 °C, e novamente verificada a absorbância no mesmo comprimento de onda.

A atividade da lacase foi determinada pela oxidação do 2,2-azino-bis-etilbentiazolina (ABTS) de acordo com BUSWELL; CAI; CHANG (1995), medida por monitorização do aumento da absorbância. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1µmol ABTS por minuto utilizando o coeficiente de extinção molar de 36000 $M^{=1}$ cm^{-1} (E_{420}= 3.6 x 10^4 $_M$ $^{-1}$.cm $^{-1.}$) (BOURBONNAIS; PAICE, 1988)

$$U\ L^{-1} = \frac{(\Delta A)\ (V_t)\ (10^6)}{(t)\ (E)\ (V_s)}$$

Quando:

U = Atividade da enzima (µmol min^{-1} L^{-1})

ΔA = Absorbância final – Absorbância inicial)

V_t = Volume total da reação (mL)

10^6 = fator de correção (µmol moL^{-1})

t = tempo da reação (min)

E = coeficiente de extinção molar (L moL^{-1} cm^{-1})

V_s = Volume da amostra

3.4 Avaliação da produção de biossurfactantes

3.4.1 Teste do colapso da gota

Os ensaios de capacidade de produção de biossurfactantes foram avaliados pelo teste de Colapso da Gota (BODOUR et al., 2003). Para isso os 26 isolados (Tabela 1) foram cultivados em meio de cultura líquidos PDB a 28°C por 7 dias. As amostras foram filtradas em gaze estéril, obtendo assim os extratos enzimáticos. Com

o objetivo de otimizar os experimentos, os mesmos foram miniaturizados utilizando tampas das placas de 96 poços (12.8 - 8.5-cm) (TPP®) pois, as mesmas apresentam poços circulares de 8 mm de diâmetro. Assim, para cada poço da tampa, foi aplicada uma camada fina de óleo de motor automotivo (20W – 50 Lubrax BR Petrobras). As tampas foram mantidas estáticas durante 24h à 25º C. Após este período, alíquotas de 7 µL (~1 gota) de cada extrato microbiano foram adicionados no centro de cada poço que continha o óleo de motor 20/50. O teste foi considerado negativo quando a gota (sobrenadante), adicionada em cima do óleo, permanecesse intacta, ou positivo, quando a gota se espalhasse ou colapsasse. Os testes foram realizados em triplicatas. O meio MA2 e PDB sem inóculo foi utilizado como controle negativo e uma solução de Tween 2 % foi utilizada como controle positivo.

3.4.2 Teste de emulsificação (Teste E_{24})

O ensaio de produção de emulsificação (Teste E_{24}) consistiu na formação de uma camada de emulsão entre o extrato enzimático e o óleo comercial. As atividades emulsificantes (E_{24}) foram realizadas de acordo com os métodos descritos por Cooper & Goldenberg (1987) e Fleck et al. (2000). Os isolados foram cultivados em MA2 (extrato de malte 13 g L^{-1}; extrato de levedura 0.5 g L^{-1}; peptona 5.5 g L^{-1}; ágar 20g L^{-1}), durante 7 dias a 28ºC. Após o período de crescimento, um disco de micélio fúngico (0,5 cm de diâmetro) foi retirado da borda da colônia e transferido para tubos de ensaio contendo 15 mL do meio mineral de cultivo (extrato de levedura 5 g mL^{-1}; $(NH_4)_2SO_4$ 1 g L^{-1}; Na_2HPO_4 6 g L^{-1}; KH_2PO_4 3 g L^{-1}; NaCl 2.7 g L^{-1}; $MgSO_4$.7H2O 0.6 g L^{-1}; óleo de soja 1 % v/v). Os tubos foram incubados por 7 dias a 28ºC sob agitação de 150 rpm. Após sete dias de incubação, as culturas foram transferidas para microtubos de 2 mL e centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min, 4°C. Em seguida, 2 mL de cada extrato foi transferido para tubos de rosca contendo 2 mL de óleo diesel. Os tubos foram agitados em vórtex na máxima velocidade por 2 minutos. As medidas ocorreram após 24 h. O índice de emulsificação (E_{24}) foi calculado pela medida da altura da camada de emulsificação, dividido pela altura total da cultura, multiplicado por 10. O ensaio foi realizado em triplicata, solução de Triton 2% foi utilizada como controle positivo e o meio mineral sem o inóculo foi utilizado como controle negativo.

3.5 Avaliação de tolerância a metais pesados

Os isolados foram avaliados quanto a tolerância aos metais pesados Chumbo (Pb), Cromo (Cr), Alumínio (Al), e Cobre (Cu) conforme OLADIPO et al. (2017), modificado. As concentrações de sais metálicos: 100 mg L^{-1} de $Pb(C_2H_3O_2)_2.3H_2O$; 125 mg L^{-1} de $Cr(NO_3)_3$; 500 mg L^{-1} de $Al(NO_3)3$; 125 mg L^{-1} de $Cu(CH3COO)_2$ foram adicionadas ao meio PDB em tubos de ensaio separados, nos quais foram inoculados os isolados. Os tubos foram incubados em estufa rotatória por 7 dias a 28ºC sob agitação de 150 rpm.

Os isolados que obtiveram crescimento microbiano foram avaliados nas concentrações de 200 e 300 mg L^{-1} de $Pb(C_2H_3O_2)_2.3H_2O$; 250 e 500 mg L^{-1} de $Cr(NO_3)_3$; 200 e 350 mg L^{-1} de $Al(NO_3)3$; 250 e 500 mg L^{-1} de $Cu(CH3COO)_2$ adicionados ao meio PDA em placas de Petri. Os isolados foram inoculados no centro do meio de cultivo, e as placas foram incubadas em estufa a 28ºC por 13 dias. O crescimento radial do micélio foi monitorado e registrado a cada três dias. O potencial de tolerância dos fungos aos metais pesados foi calculado em relação aos crescimentos radiais controles (inóculo microbiano sem adição de sal metálico). A tolerância foi avaliada através do cálculo do índice de tolerância pela fórmula:

$$\text{Índice de tolerância} = \frac{\text{Crescimento radial (cm) meio + metal}}{\text{Crescimento radial (cm) sem metal}}$$

Os isolados foram classificados em muito pouco tolerante (0,00 – 0,039 cm), pouco tolerante (0,040 – 0,059 cm), tolerância média (0,060 – 0,079 cm), tolerância alta (0,080 – 0,099 cm) e tolerância muito alta (0,100 - 0,100 cm).

3.6 Avaliação da tolerância a hidrocarbonetos

Os isolados fúngicos (Tabela 1) foram avaliados quanto à tolerância aos hidrocarbonetos benzeno, tolueno, hexano e xileno, de acordo com RIBEIRO et al., (2016), modificado. Os hidrocarbonetos foram incorporados ao meio de cultura Meio Mínimo (MM) (0,2 g L^{-1} de sulfato de magnésio ($MgSO_4$), 0,02 g L^{-1} de cloreto de cálcio

($CaCl_2$), 0,7 g L^{-1} de fosfato potássico monobásico (KH_2PO_4), 0,7 g L^{-1} de fosfato potássico dibásico (KH_2PO_4), 0,5 g L^{-1} de sulfato de amônio $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 g L^{-1} de nitrato de sódio ($NaNO_3$) em tubos de ensaio nas proporções de 1,5 mL de MM e 500 microlitros de cada hidrocarboneto, separadamente. Nesses tubos foram inoculados os isolados fúngicos e incubados em estufa rotatória a 28°C sob agitação de 150 rpm, por 7 dias. O experimento foi conduzido em triplicata. Para o controle os isolados foram inoculados em tubos de ensaio contendo 500 microlitros de meio de cultura Potato Dextrose Broth (PDB) (Dextrose 20 g L^{-1}, Infusão a partir de batatas (200 g) 4 g L^{-1}) estéril e 1,5 mL de MM. Foram considerados tolerantes os isolados que apresentaram crescimento microbiano.

3.7 Avaliação da degradação do hidrocarboneto pireno

3.7.1 Preparação e condição da cultura

Os isolado ITF 12 e ITF 47 foram cultivado em Ágar Saboraud Dextrose (SDA) (hidrolisado pancreático de caseína 5,0 g L^{-1}, hidrolisado péptico de tecido animal 5,0 g L^{-1}, dextrose 40,0 g L^{-1} e ágar 16,0 g L^{-1}) por 7 dias a 28°C. Após a incubação, 3 discos de micélio fúngico (0,5 cm de diâmetro) foram retirados da borda da colônia e transferidos para erlermeyer contendo 30 mL de Caldo Saboraud Dextrose (SDB) (digestão enzimática de caseína 5 g L^{-1}, digestão enzimática de tecido animal 5 g L^{-1}, dextrose 20 g L^{-1}). O erlermeyer foi incubado em estufa rotatória a 28°C sob agitação de 150 rpm por 48h. Em seguida foram adicionados 2 mg de pireno (dissolvido em 0,5 mL de dimetilsulfóxido, analiticamente) e incubados novamente a 28°C sob agitação de 150 rpm, durante 5 e 10 dias no escuro. O experimento foi realizado em triplicata. O controle (inóculo sem pireno) foi incubado seguindo as mesmas condições das culturas com pireno. Outro frasco (tempo zero) contendo o meio SDB, os discos de micélio e pireno não foram incubados, e seguiram para o procedimento de extração (PASSARINI et al., 2011).

3.7.2 Preparação da amostra (Extração do Hidrocarboneto)

A extração do hidrocarboneto e seus produtos de degradação em meio de cultivo foram realizados usando um sistema de trituração Ultra–Turrax® , segundo PASSARINI et al., (2011). Foram adicionados aos frascos, 50 mL de acetato de etila (P.A.), com objetivo de romper as paredes celulares dos fungos e remover os compostos adsorvidos. Em seguida, os frascos foram submetidos à desintegração celular no triturador a 12.000 rpm por 1 minuto. O material permaneceu em repouso por 5 minutos para separação da fase orgânica. A fase não orgânica (constituinte de micélio) foi extraída com mais 50 mL de acetato de etila por mais duas vezes. A fase orgânica foi adicionado 2 g de Na_2SO_4 anidro para desidratação da amostra, que passou por agitação e filtragem em papel filtro e algodão. Esse material permaneceu em capela de exaustão de gases num período de 24 à 48h até completa secagem. Em seguida, o resíduo formado foi ressuspenso em 2 mL de acetato de etila (grau HPLC). A partir dessa solução, 50 µL foram dispensados em balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com acetato de etila (grau HPLC). Essa solução foi submetida a análises em GC-MS.

3.7.3 Análise cromatográfica do pireno em GC-MS

A análise cromatográfica foi realizada usando um equipado com um sistema automático de amostragem TriPlus RSH e analisador de massa ISQ Single Quadrupole MS, todos da ThermoScientific. Os compostos foram separados em uma coluna capilar TR-5MS (5% de difenil-95% de dimetilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm I.D. x 0,25 µm), ThermoScientific. A temperatura do injetor foi fixada em 290ºC e as amostras foram injetadas (2 µL) no modo split. A temperatura do forno da coluna aumentou de 180°C (1 min) para 310°C a 5°C min^{-1}, mantida por 10 min. O hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo constante de 1 mL min^{-1}.

A fonte de íons foi mantida a 300°C e a temperatura da linha de transferência MS foi ajustada em 280°C, e um modo de monitoramento de varredura completo (m/z 30-320) foi definido. O processamento dos dados foi realizado no software ThermoXcalibur, versão 2.2 (Thermo Scientific). A identificação foi baseada na comparação do tempo de retenção com o padrão de pireno (SIGMA-ALDRICH) e na

Biblioteca Nist.

As amostras também foram analisadas no modo de monitoramento seletivo de íons (SIM). A identificação dos metabólitos foi realizada através da identificação dos íons pela confirmação dos compostos formados, comparando com os espectros de massas descritos na literatura: hidroxipireno (identificação = 218 confirmação = 189, 94), dihidroxipireno (identificação = 234, confirmação = 205, 176), pireno quinona (identificação = 232, confirmação = 204, 176, 88), pireno dihidrodiol (identificação = 236, confirmação = 218, 189, 176, 94) e pirenilsulfato (identificação = 297, confirmação = 217) (MAGRINI, 2012).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fungos filamentosos

Dos 60 fungos filamentosos que estavam preservados a -20ºC, apenas 26 isolados apresentaram crescimento microbiano satisfatório no meio de cultivo. Acredita-se que a temperatura (-20 ºC) e o tempo de permanência nesta temperatura (cerca de 3 anos) de conservação em que os isolados foram submetidos, possivelmente possa ter reduzido a viabilidade dos mesmos, os quais podem ter sofrido injúrias metabólicas ao longo do processo (Batista et al. 2018) . Os 26 isolados que obtiveram sucesso na reativação foram avaliados quanto ao potencial biotecnológico.

4.2 Avaliação da descoloração do corante RBBR (ensaios em meio sólido e líquido)

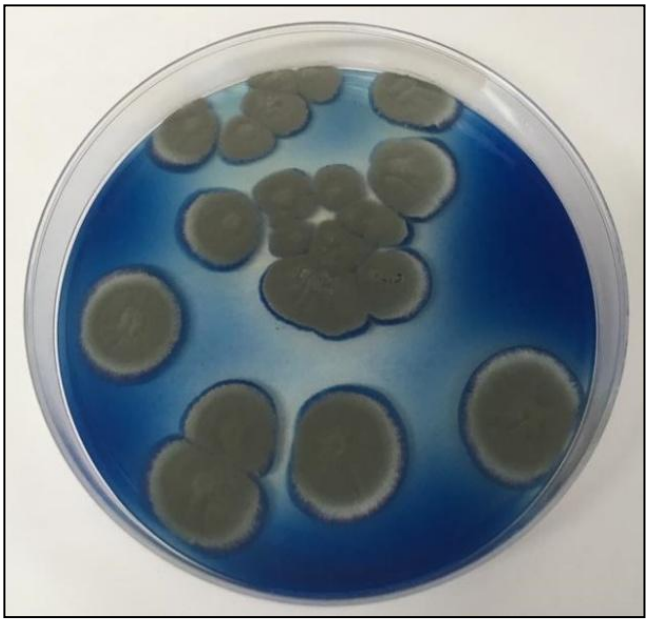
Os ensaios de descoloração do corante RBBR em meio sólido mostraram o crescimento microbiano de todos os isolados fúngicos (26), os quais foram semeados nos meios com o corante nas concentrações de 500 mg L^{-1} e 1000 mg L^{-1}. Destes, somente três isolados foram capazes de descolorir o meio de cultivo na concentração de 500 mg L^{-1} em meio sólido (Tabela 1), resultado positivo observado através da formação de um halo de descoloração ao redor das colônias de crescimento microbiano (Figura 12). O isolado ITF 12 (*Penicillum* sp.) apresentou o maior halo de descoloração do corante no meio de cultivo (0,8 cm) após 7 dias de incubação (Tabela 1).

Tabela 2 - Ensaio de descoloração do corante RBBR 500 mg L-1 em meio sólido.

Halo de descoloração do RBBR (cm) – 500 mg L^{-1}			
Isolados	Tempo de incubação (dias)		
	3	5	7
Penicillum sp. ITF 12	0,3	0,5	0,8
Aspergillus citrinum ITF 22	-----	0,1	0,1
Aspergillus sydowii ITF 30	-----	0,1	0,1

Fonte: o autor, 2020.

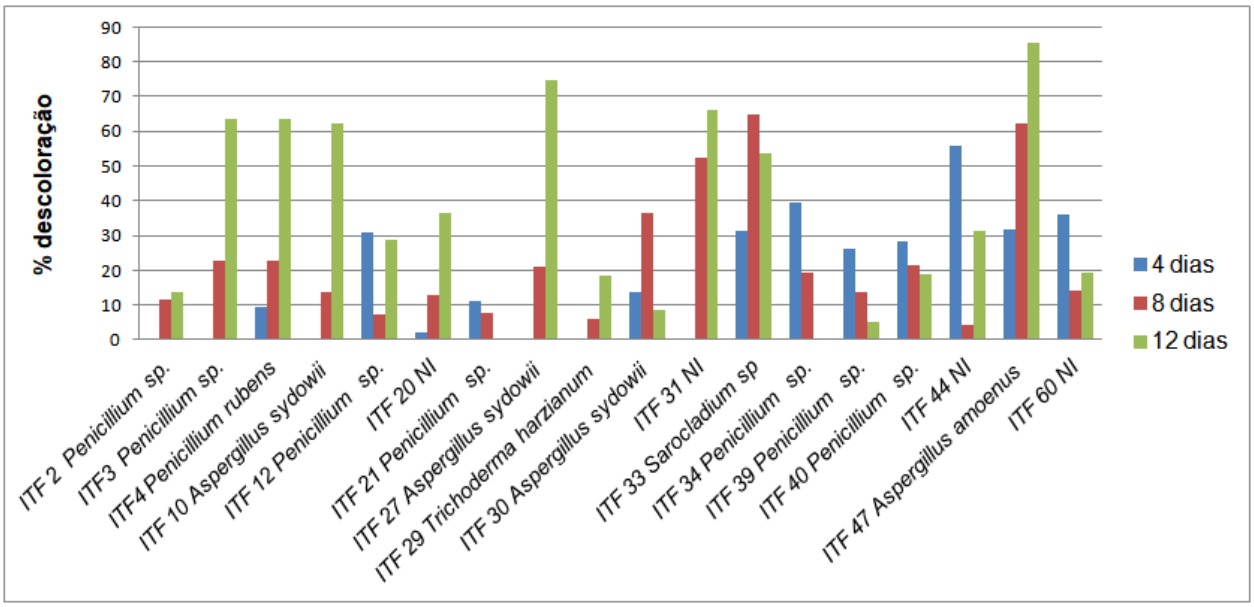
Figura 11 – Halo de descoloração ao redor das colônias de crescimento microbiano do isolado ITF 12 em meio PDA com corante RBBR a 500 mg L^{-1} após 7 dias de incubação a 28ºC.



Fonte: o autor, 2020.

Os resultados dos ensaios de descoloração do corante em meio líquido mostraram que 18 isolados foram capazes de descolorir o corante RBBR na concentração de 500 mg L^{-1} (Anexo 1). O melhor resultado foi observado a partir do crescimento no isolado *Aspergillus amoenus* ITF 47, com mais de 80% de descoloração do meio de cultivo (Figura 13), seguidos dos isolados *Aspergillus sydowii* ITF 27 com mais de 70% de descoloração e dos isolados ITF 3, ITF 4, ITF 10, ITF 31 e ITF 33 que descoloriram mais de 60% do corante após 12 dias de incubação.

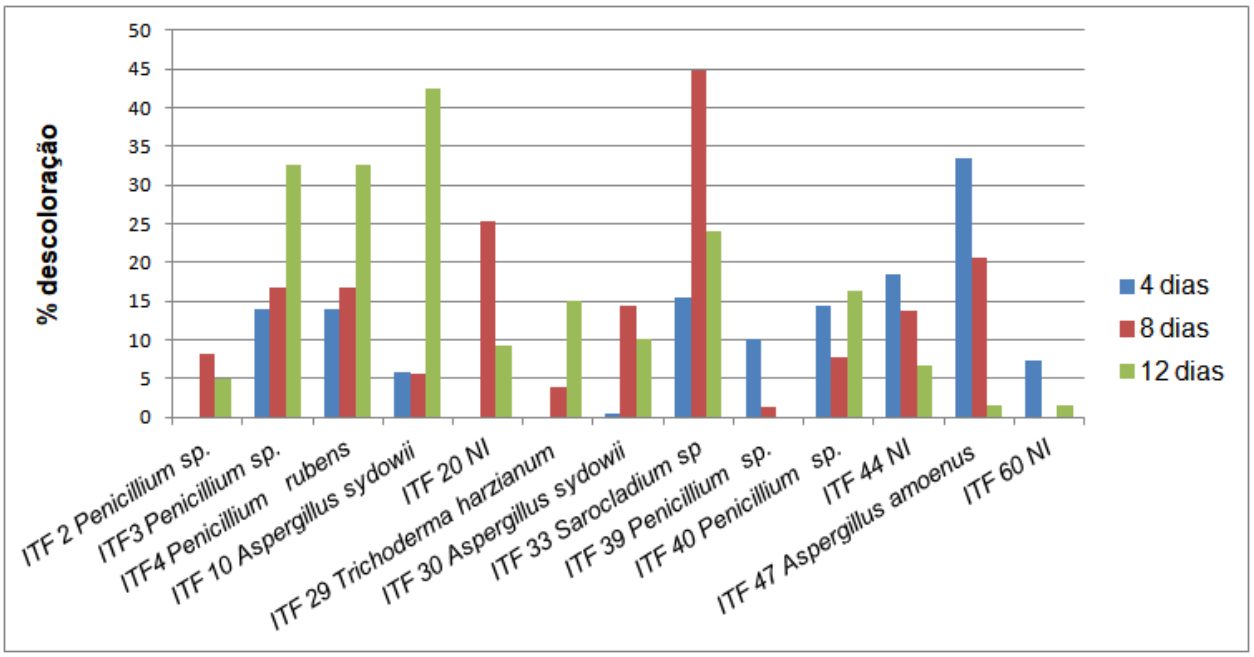
Figura 12 – Porcentagem de descoloração do corante RBBR (500 mg L^{-1}) pelos isolados fúngicos em meio líquido.



Fonte: o autor, 2020.

Os ensaios de descoloração do corante na concentração de 1000 mg L^{-1}, mostraram que 13 isolados foram capazes de descolorir o corante (Anexo 1), sendo o melhor resultado de descoloração mostrado pelo isolado *Sarocladium* sp. ITF 33, com 45% de redução do corante (Figura 14), seguido do isolado *Aspergillus sydowii* ITF 10 que descoloriu mais de 40% do corante e dos isolados ITF 3, ITF 4 e ITF 47 que descoloriram mais de 30% do corante.

Figura 13 – Porcentagem de descoloração do corante RBBR (1000 mg L-1) pelos isolados fúngicos em meio líquido.



Fonte: o autor, 2020.

Comparando as duas concentrações de corante testadas (500 mg L^{-1} e 1000 mg L^{-1}) nas figuras 13 e 14 observamos que os isolados foram mais eficientes nos processos de descoloração na concentração mais baixa, de 500 mg L^{-1} atingindo 80% de descoloração pelo isolado *Aspergillus amoenus* ITF 47, comparando com a concentração de 1000 mg L^{-1} onde a melhor porcentagem foi de 45%, pelo isolado *Sarocladium* sp.ITF 33.

Os dados obtidos nos ensaios de descoloração em meio líquido mostraram que a disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo líquido e a agitação podem ter favorecido a atuação dos isolados na descoloração do corante. O mesmo foi observado por Pereira et al. (2010) que testaram a descoloração dos corantes têxteis Remazol Brilliant Blue R (RBBR), Reactive Yellow 145 e Reactive Red 195, pela espécie *Geothricum candidum* isolada de um tanque de aeração de indústria têxtil, comparando com espécies de fungos com capacidade degradativa conhecida, *Lentinula edodes* e *Paraconiothyrium estuarinum*. No estudo, em condições de incubação com agitação do meio de cultivo líquido, os fungos apresentaram melhor capacidade de descoloração dos corantes presentes nas amostras, comparando com os ensaios realizados em meio sólido de cultivo.

Salar et al. (2012), realizaram um estudo com três linhagens de *Aspergillus* spp. incluindo *A. terreus, A. flavus* e *A. niger*, isolados de um efluente têxtil em Panipat, na Índia. Os isolados foram submetidos a ensaios de descoloração dos corantes Reactive Blue MR, Orange M2R e Yellow M4G. Os autores demonstraram a capacidade adaptativa de fungos isolados de ambientes têxteis na descoloração de corantes sintéticos.

Rani *et al*., (2014) também verificaram uma melhor descoloração dos corantes Verde malaquita, Nigrosina e Fucsina básica em meio de cultura sob agitação do que em meio sólido, em experimentos com as espécies de *Phanerochaete chrysosporium* e *Aspergillus niger*, isolados de solo contaminado com corantes. Os autores concluiram que a agitação melhorou a oxigenação do fungo e manteve as células microbianas em contato regular com as enzimas secretadas em resposta ao corante, melhoram a absorção e a adsorção.

Como pode ser observado na tabela 1 e nas figuras 13 e 14, os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* apresentaram os melhores desempenhos na descoloração do corante RBBR. Resultados similares foram encontrados por Da Silva et al. (2008), que avaliaram a capacidade de descoloração do corante RBBR por fungos isolados de cnidários marinhos. Neste estudo, os autores mostraram que as espécies *P. citrinum* e *A. sulphureus* foram capazes de descolorir 100% e 98% do corante, respectivamente.

Muitas são as pesquisas por microrganismos que sejam capazes de degradar/descolorir corantes têxteis. Entretando, a maioria dos trabalhos, enfatizam o isolamento de células microbianas em amostras de solos contaminados (Da Silva et al., 2008). Por outro lado, outras fontes vêem sendo investigadas na intenção de encontrar microrganismos adaptados a ambientes contaminados (Passarini et al., 2011) e, trabalhos utilizando microrganismos isolados de efluentes (SALAR et al. 2012). Os fungos apresentam a capacidade de adaptar seu metabolismo frente a mudanças nas condições ambientais incluindo temperatura, pH e fontes de nutrientes, entre elas, compostos tóxicos. Essa capacidade é vital para a sobrevivência microbiana sendo que, enzimas intra e extracelulares, favorecem a adaptação do metabolismo microbiano nestes ambientes. Essas enzimas podem degradar uma grande diversidade de corantes presentes nas águas residuais têxteis. Desta forma, fungos filamentosos recuperados de amostras de estações de tratamento de indústria têxtil, podem ser

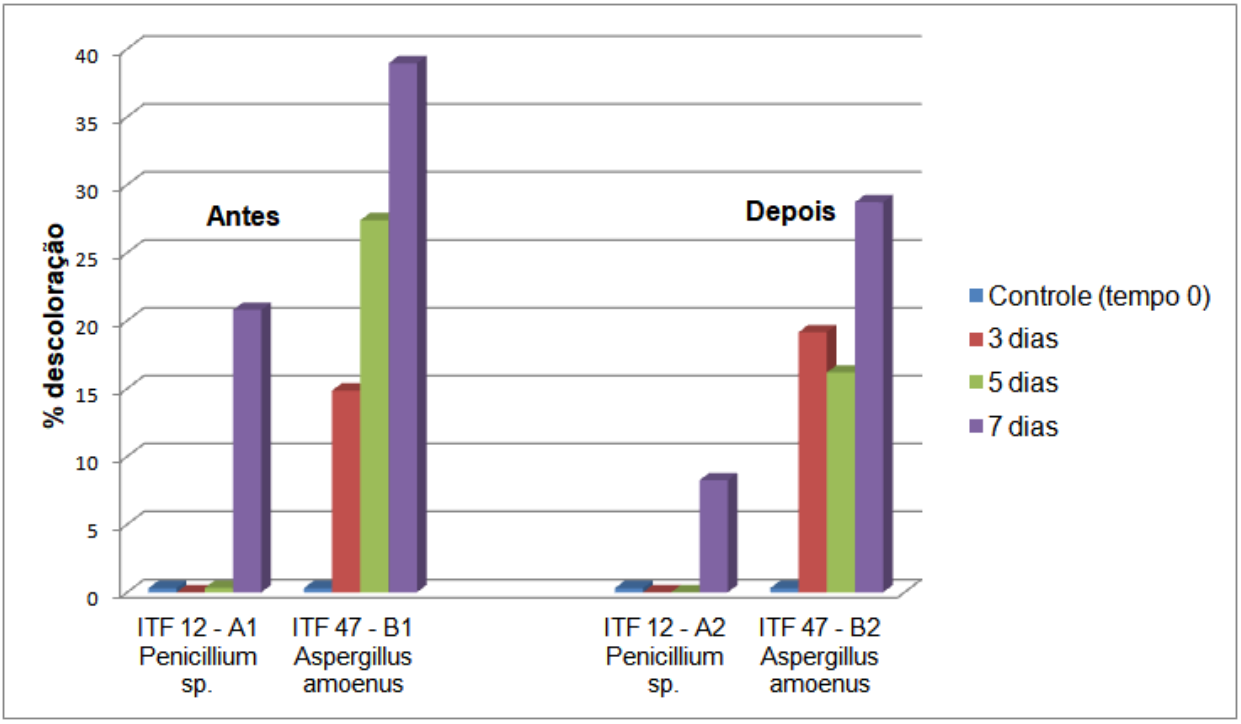
considerados fontes promissoras na obtenção de enzimas com potencial aplicação em processos de descoloração de corantes têxteis (HOLKAR et al., 2016).

Os resultados demonstraram o potencial de fungos filamentosos isolados de amostras de efluentes têxteis e seu potencial em descolorir o corante RBBR, os quais podem ser utilizados em estudos de biorremediação de ambientes contaminados com corantes sintéticos.

4.2.1 Avaliação de adsorção do RBBR no micélio

Os isolados ITF 12 (*Penicillum* sp.) e ITF 47 (*Aspergillus amoenus*) foram avaliados quanto a capacidade adsortiva do corante pelo micélio pois, Após sete dias de crescimento, ITF 12 foi capaz de descolorir cerca de 20% do corante, entretanto após trituração do micélio, a porcentagem de descoloração reduziu para menos que 10%. O isolado ITF 47, com sete dias de crescimento, obteve uma descoloração do corante de quase 40% no entanto, após trituração do micélio, a porcentagem reduziu para 30% (Figura 15). Com os valores de porcentagem de descoloração menores após a trituração do micélio no meio fermentativo (após sete dias de cultivo), foi possível observar que os isolados foram capazes de descolorir uma quantidade do corante relativamente considerável (cerca de 10% e 30%, para o isolado ITF 12 e 47, respectivamente), entretanto, os respectivos isolados adsorveram cerca de 10% do corante em seus micélios vegetativos.

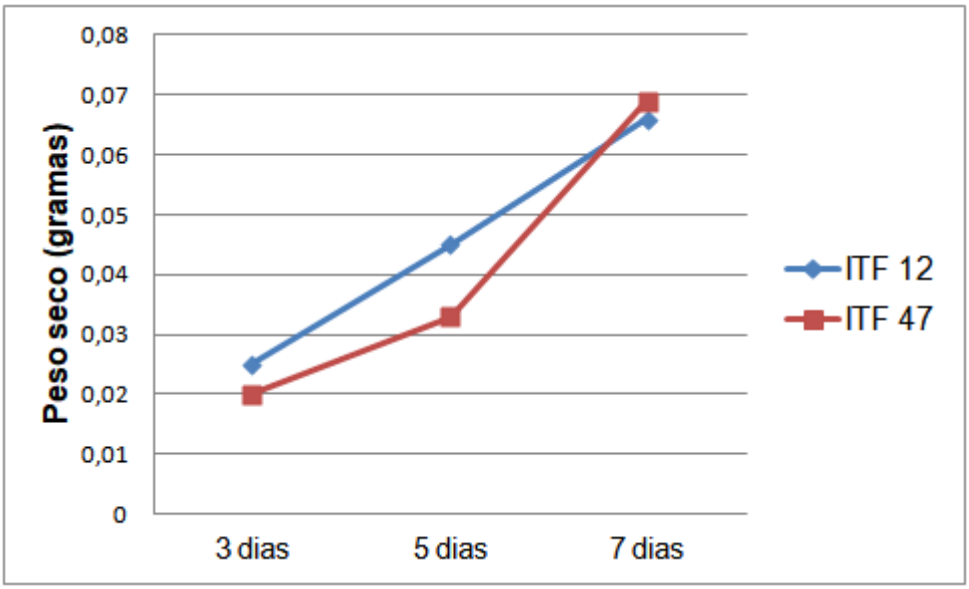
Figura 14 – Comparação de descoloração do corante RBBR (500 mg L-1) antes e após trituração do micélio.



Fonte: o autor, 2020.

Através do peso seco foi possível observar que o corante (500 mg L^{-1}) não influenciou o crescimento celular dos microrganismos, pois durante o período de crescimento houve aumento da biomassa microbiana (Figura 16).

Figura 15 – Biomassa fúngica durante o período de incubação de 7 dias na presença de 500 mg L^{-1} do corante RBBR.



Fonte: o autor, 2020.

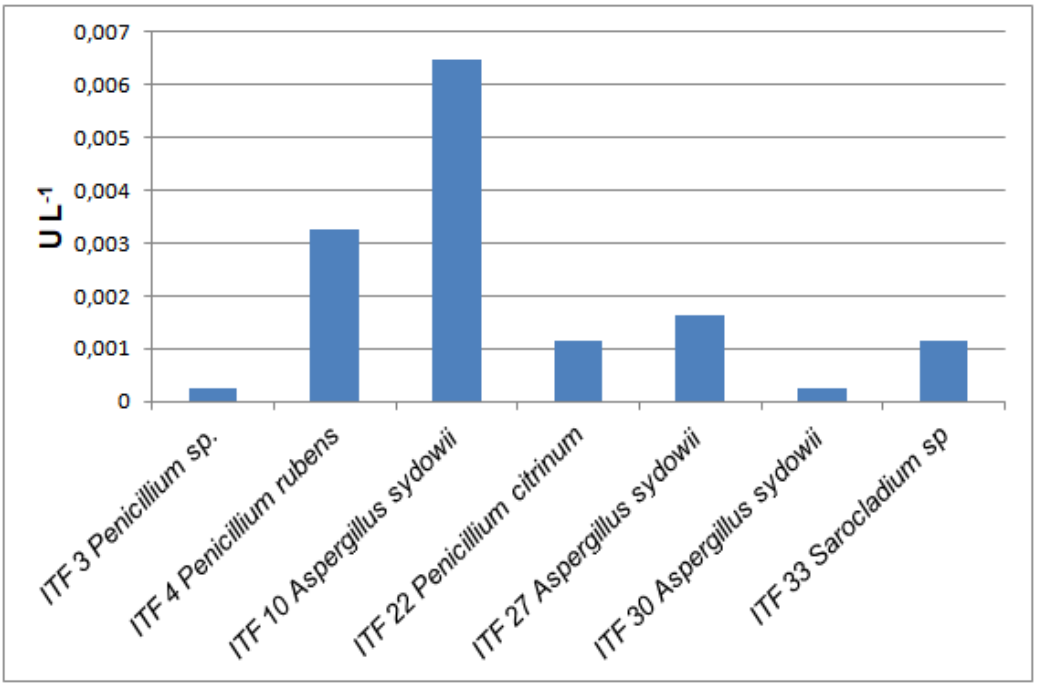
Cruz et al. (2019) avaliaram a biomassa fúngica em relação à descoloração do corante têxtil 78GR Turquesa, do fungo *Aspergillus* sp. Os autores obsevaram que o aumento da biomassa favoreceu o processo de descoloração, pois obtiveram resultados de descoloração de 69, 92 e 98% quando a biomassa microbiana atingiu quantidades de 1, 4 e 8 g L^{-1}, respectivamente. Os autores concluíram que o gênero *Aspergillus* é um potencial microrganismo a ser empregado no tratamento de áreas contaminadas por corantes têxteis, de forma barata, rápida e eficiente.

Ning et al. (2018) avaliaram a eficiência de descoloração de uma linhagem de *Aspergillus flavus* contra diversos corantes têxteis, incluindo o RBBR, bem como a capacidade biossortiva desse microrganismo. O isolado foi capaz de adsorver altas concentrações de corante (cerca de 1000 mg L^{-1}), e de biodegradar concentrações acima de 500 mg L^{-1}. Os autores observaram que a biossorção e a biodegradação trabalham juntas para remover os pigmentos e concluíram que o *Aspergillus flavus* possui forte adaptabilidade a diferentes tipos de corante e condições ambientais e pode, portanto, ser potencialmente usado em processos biológicos de tratamento de águas residuais contendo corantes.

4.3 Avaliação da produção da enzima lacase

Os ensaios de atividade da enzima lacase foram realizados com os isolados que apresentaram as melhores porcentagens de descoloração do corante RBBR. A Figura 17 demonstra os sete isolados que apresentaram atividade para essa enzima. A melhor atividade foi apresentada pelo isolado ITF 10 *Aspergillus sydowii* com 0,0064 UL^{-1}. Este isolado foi capaz de descolorir mais de 60% e 40% do corante nas concentrações de 500 e 1000 mg L^{-1}, respectivamente. O sistema enzimático fúngico é conhecido por abrigar uma ampla gama de enzimas óxido-redutases, tais como a lacase, peroxidases, NADP-redutase e tirosinase, que são capazes de oxidar uma grande variedade de corantes estruturalmente diferentes devido ao seu caractér não-específico e diversificado (SILVA, 2017b).

Figura 16 – Atividade enzimática da enzima lacase.



Fonte: o autor, 2020.

Segundo Orzechowski et al. (2018), o sucesso em processos de descoloração por fungos se deve à presença da enzima lacase no meio fermentativo, estando sua capacidade de descoloração relacionada à similaridade das estruturas químicas do corante e do substrato natural da enzima, permitindo assim, a destruição dos grupamentos cromóforos do corante. Entretanto a baixa atividade desta enzima para os isolados testados indica que, além da lacase, outras enzimas intracelulares e/ou extracelulares, não testadas, podem estar agindo na descoloração do corante, ou ainda processos de biossorção podem estar ocorrendo para a remoção do RBBR do meio de cultivo. Essas possibilidades podem estar acontecendo com *Aspergillus amoenus* ITF 47, o qual descoloriu o corante RBBR em meio líquido nas duas concentrações avaliadas (500 e 1000 mg L^{-1}) bem como apresentou 10% de adsorção do corante ao micélio fúngico.

A capacidade de biossorção de um microrganismo é atribuída aos componentes heteropolissacarídeos e lipídicos da parede celular, que contêm diferentes grupos funcionais, incluindo grupos amino, carboxil, hidroxil, fosfato e outros grupos carregados, causando fortes forças de atração entre o corante azo e a parede celular (ORZECHOWSKI et al., 2018).

Machado et al. (2005) avaliaram a atividade ligninolítica e descolorante de RBBR de 125 fungos basidiomicetos isolados de ecossistemas tropicais. Os autores detectaram diferentes padrões de enzimas ligninolíticas. Todos os fungos mostraram atividade de peroxidases, entretanto, cinco isolados foram incapazes de descolorir o RBBR. Diferentes padrões das enzimas lignolíticas, peroxidase dependente de manganês (MnP) e lacase foram detectados em 12 desses extratos fúngicos, porém todos mostraram atividade de lacase. Altos níveis de atividades de peroxidases e lacases não mostraram relação com significativa descoloração do RBBR.

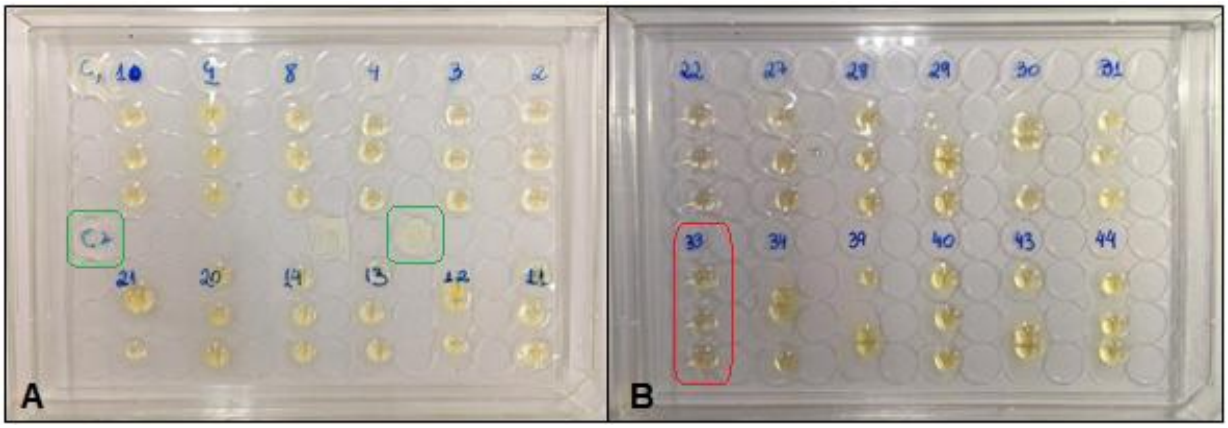
Jin; Ning (2013) testaram o fungo *Aspergillus fumigatus* na degradação de vários corantes sintéticos entre eles Blue X-GRL, Cationic Yellow 28, Reactive Yellow 17, Reactive Brilliant Red K-2BP, Reactive Red 120, Reactive Green 19A, Direct Red 28, Direct Yelow 12, Acid Yellow 17 e Disperse Yellow 211. Os autores avaliaram a capacidade de descoloração e degradação dos corantes à enzima lacase, em tratamentos de 12 horas. Os resultados mostraram que a atividade da lacase atingiu 142,198 ± 3586 U L^{-1} e que o extrato de *A. fumigatus* exibiu capacidade significativa de descoloração em todos os corantes estudados, além da transformação dos corantes em metabólitos não tóxicos, conclusão adquirida por testes de fitotoxicidade realizados com *Phaseolus Mungo*. No entanto, valores mais baixos referentes à produção de lacase como os encontrados em nosso estudo (atingindo valores próximos a 0,007 UL^{-1}) foram reportados na literatura como no trabalho realizado por Singha A. et al. (2010), onde foi demonstrado a produção da enzima lacase (0,0029 U L^{-1}) pelo fungo *Aspergillus heteromorphus*, isolado de lavagem de destilaria, quando a linhagem foi cultivada em bagaço de cana.

Estudos utilizando fungos filamentosos isolados de amostras industriais, principalmente de efluentes têxteis, ainda são raros, o que demonstra a importância na busca por células microbianas recuperadas destes ambientes. Entretanto, fungos filamentosos recuperados de águas residuais têxteis, capazes de produzir enzimas hidrolíticas, incluindo a lacase, vêm se tornando ferramentas aplicáveis em estudos de biorremediação (Bernal et al. 2020). Os resultados mostraram o potencial dos isolados avaliados no presente estudo em produzir a enzima lacase, os quais podem ser aplicados em ensaios de biorremediação de ambientes contaminados com compostos tóxicos similares a lignina.

4.4 Avaliação da produção de biossurfactantes

Os 26 isolados fúngicos foram submetidos aos ensaios de produção de biossurfactantes através do teste de colapso de gota. Entretanto, nenhum isolado avalido foi capaz de produzir algum composto com atividade biossurfactante, ou seja, não apresentaram a característica de colapsar a gota de óleo, quando o extrato microbiano foi adicionado em cima do óleo (Figura 18).

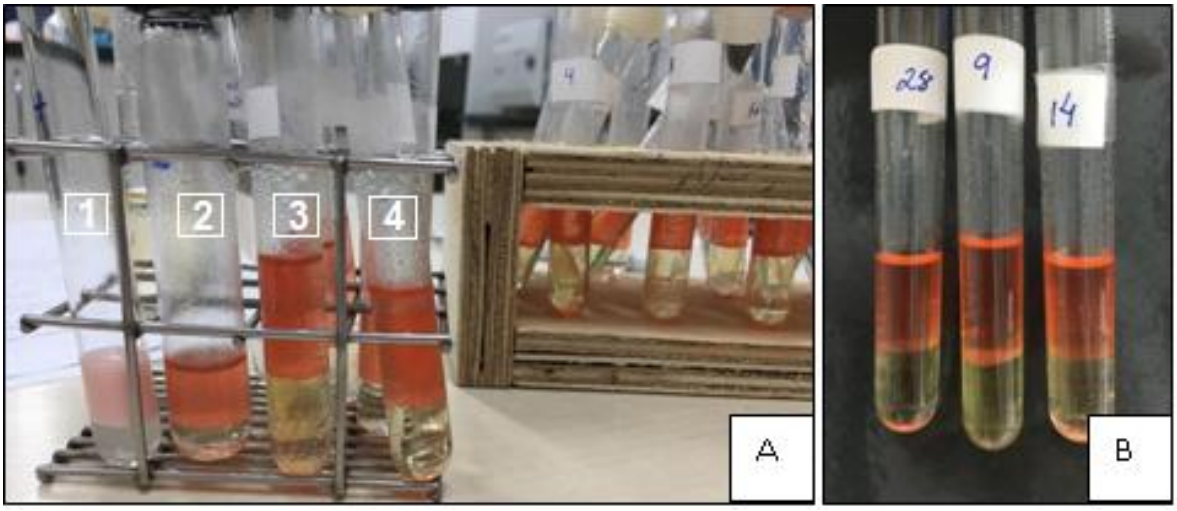
Figura 17 – Teste Colapso de gota. A) controle positivo (detalhe em verde); B) resultado negativo (detalhe em vermelho).



Fonte: o autor, 2020.

Entretanto, mesmo não sendo putativos produtores de moléculas biossurfactantes, todos os isolados foram submetidos à avaliação da produção de emulsificação (Teste E_{24}). Da mesma forma, nenhum isolado apresentou a formação de uma camada de emulsificante entre o extrato microbiano e os reagentes utilizados no ensaio (Figura 19).

Figura 18 – Teste E24. A) controle positivo (tubo 1, mostrando uma camada de emulsificação); controle negativo (tubo 2); resultado negativo (tubos 3 e 4); B) resultados negativos.



Fonte: o autor, 2020.

Segundo Pereira; Duvoisin Jr; Albuquerque (2017) a obtenção de biossurfactantes por fungos é pouco descrita, sendo a grande maioria dos estudos voltados para tensoativos produzidos por bactérias. Carla et al. (2018) também afirmaram que espécies bacterianas são bem mais exploradas em comparação com espécies fúngicas como agentes biossurfactantes. Entretanto, Silva et al. (2014) isolaram o fungo *Cunninghamella echinulata* de amostras de solo da Caatinga, o qual foi capaz de produzir biossurfactante. Testes de tensão superficial e índice de atividade emulsificante demonstraram que o isolado foi capaz de reduzir a tensão superficial de 72 para 36 mN/N e obteve um índice de emulsificação de 80%.

Mendez-Castilho, Prieto-Correa, Jimenez-Junca (2017) identificaram 33 linhagens de fungos filamentosos isolados de rachis de banana com potencial para a produção de biossurfactantes. Nesse estudo, três linhagens pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma* apresentaram atividade na redução da tensão superficial. Morganna et al., 2017 avaliou a produção de biossurfactantes produzidos por fungos filamentosos isolados da Caatinga brasileira, através de testes de emulsificação. 60% apresentaram índices de emulsificação, destacando-se o gênero *Aspergillus* sp. avaliados em condições extremas de temperatura, pH e concentração de sal. Os autores concluíram que esses fungos demonstraram potencial para produzir biossurfactante.

Desta forma, podemos dizer que nossos isolados não são considerados produtores de moléculas biossurfactantes. Entretanto, mais isolados poderiam ser triados quanto à produção destes compostos, tendo em vista a reativação de apenas 26 amostras submetidas aos ensaios.

4.5 Avaliação de tolerância a metais pesados

Todos os 26 fungos foram avaliados quanto à tolerância (crescimento microbiano no meio de cultivo líquido) aos metais pesados Alumínio, Cobre, Cromo e Chumbo. Dentre eles, vinte e três isolados foram capazes de crescer nos meios contendo Cromo e Chumbo. Apenas um isolado (ITF 47) não cresceu na presença do cobre. Seis isolados (ITF 2, ITF 20, ITF 21, ITF 29, ITF31 e ITF 43) apresentaram tolerância a todos os metais testados (Tabela 2). O metal alumínio foi o mais tóxico para a grande maioria dos isolados.

Tabela 3 – Tolerância a metais pesados observada pelo crescimento microbiano em meio líquido.

	Tolerância a metais				
Isolados	**Alumínio 500 mg L^{-1}**	**Cobre 125 mg L^{-1}**	**Cromo 125 mg L^{-1}**	**Chumbo 100 mg L^{-1}**	**Identificação**
ITF 2	+	+	+	+	*Penicillium* sp.
ITF 3	-	+	+	+	*Penicillium* sp.
ITF 4	-	+	+	+	*Penicillium rubens*
ITF 8	-	+	+	+	*Penicillium* sp.
ITF 9	-	+	+	+	*Aspergillus* sp.
ITF 10	-	+	+	+	*Aspergillus sydowii*
ITF 11	-	+	+	+	*Penicillium* sp.
ITF 12	-	+	+	+	*Penicillium* sp.
ITF 14	-	+	+	+	*Penicillium* sp.
ITF 20	+	+	+	+	NI
ITF 21	+	+	+	+	*Penicillium* sp.
ITF 22	-	+	+	+	*Penicillium citrinum*
ITF 27	-	+	+	+	*Aspergillus sydowii*
ITF 29	+	+	+	+	*Trichoderma harzianum*
ITF 30	-	+	+	+	*Aspergillus sydowii*
ITF31	+	+	+	+	NI
ITF 34	-	+	+	+	*Penicillium* sp.
ITF 39	-	+	+	+	*Penicillium* sp.

ITF 40	-	+	+	+	*Penicillium* sp.
ITF 43	+	+	+	+	*Penicillium* sp.
ITF 44	-	+	+	+	*NI*
ITF 47	-	-	+	+	*Aspergillus amoenus*
ITF 60	-	+	+	+	NI

Fonte: o autor, 2020.

Alguns metais são essenciais para o metabolismo dos fungos, no entanto, são tóxicos quando presentes em excesso. Os níveis de toxicidade de cada metal variam de acordo com a espécie de microrganismo, especiação do metal e pH. Esses níveis podem inibir o crescimento de fungos, além de causar mudanças morfológicas e fisiológicas e afetar a reprodução, portanto, podem reduzir o número, a diversidade e selecionar populações microbianas resistentes ou tolerantes. Como o crescimento do microrganismo reflete o metabolismo celular, este tem sido usado como um indicador chave da toxicidade de metais pesados para os microrganismos (VALE et al., 2011).

Após análise da tolerância dos isolados aos metais, os considerados tolerantes (que cresceram na presença dos metais), foram avaliados em ensaios de crescimento radial do micélio em meio de cultivo sólido, contendo os mesmos metais pesados em concentrações maiores (com exceção do metal alumínio, que apresentou uma maior toxicidade aos isolados testados assim, as concentrações foram reduzidas). Através deste ensaio, foi possível avaliar o Índice de tolerância aos metais (Tabela 3).

Os resultados encontrados indicaram uma alta tolerância (com índice de tolerância entre 0,080 a 0,099 cm) aos metais pela maioria dos fungos testados, sendo os isolados ITF 2, ITF 4, ITF 12, e ITF 20 os que apresentaram o índice de tolerância em todas as concentrações de metais avaliadas no meio de cultivo sólido. Destaca-seo isolado ITF 20 (não identificado), com tolerância a todos os metais em todas as concentrações testadas em meio líquido e sólido (Tabela 2 e 3), seguido do isolado ITF 12 *Penicillium* sp*.,* que apresentou altos índices de tolerância, (entre 0,88 a 1,82 cm) nas concentrações de metais pesados avaliadas (Tabela 3).

Tabela 4 – Índice de tolerância a metais pesados após incubação de 13 dias, medidas avaliadas através do crescimento radial do micélio (cm).

Índice de tolerância a metais (cm)								
Isolados	**Cobre (mg L^{-1})**		**Chumbo (mg L^{-1})**		**Alumínio (mg L^{-1})**		**Cromo (mg L^{-1})**	
	250	**500**	**200**	**300**	**200**	**350**	**250**	**500**
ITF 2 ***Penicillium* sp.**	0,93	0,90	0,76	0,83	0,86	0,83	0,95	0,86
ITF 3 ***Penicillium* sp.**	0,85	0,61	0,70	0,79	---	---	0,70	0,76
ITF 4 ***Penicillium rubens***	0,90	0,45	0,81	0,81	0,97	0,87	0,74	0,81
ITF 8 ***Penicillium* sp.**	---	---	0,75	0,84	---	---	0,66	0,78
ITF 9 ***Aspergillus* sp.**	1,09	0,52	1,00	0,96	---	---	0,74	0,96
ITF 10 ***Aspergillus sydowii***	0,95	0,62	0,90	0,95	---	---	0,67	1,24
ITF 11 ***Penicillium* sp.**	1,07	0,67	0,93	0,96	---	---	0,74	0,96
ITF 12 ***Penicillium* sp.**	1,06	1,06	0,88	1,29	1,82	1,59	0,88	0,94
ITF 14 ***Penicillium* sp.**	0,87	0,63	---	---	---	---	0,60	0,87
ITF 20 **NI**	0,84	0,76	0,74	0,72	0,76	0,72	0,76	0,68
ITF 21 ***Penicillium* sp.**	0,96	0,71	---	---	0,84	0,76	0,87	0,78
ITF 22 ***Penicillium citrinum***	0,95	1,19	---	---	---	---	0,95	1,33
ITF 27 ***Aspergillus sydowii***	0,92	1,04	0,92	1,00	---	---	0,81	1,12
ITF 29 ***Trichoderma harzianum***	1,05	---	1,10	---	0,95	---	1,00	0,20
ITF 30 ***Aspergillus sydowii***	1,25	1,56	---	---	---	---	---	---
ITF31 **NI**	---	---	1,10	0,71	---	---	0,82	0,67
ITF 34 ***Penicillium* sp.**	---	---	0,97	1,00	1,07	0,53	1,00	0,87
ITF 39 ***Penicillium* sp.**	0,87	0,71	0,81	0,90	---	---	0,65	0,84
ITF 40 ***Penicillium* sp.**	1,00	0,75	0,93	1,00	---	---	0,79	0,86
ITF 43 ***Penicillium* sp.**	1,00	0,83	---	---	0,88	0,76	0,83	0,80
ITF 44 **NI**	0,90	0,58	0,81	0,84	---	---	0,74	0,84
ITF 47 ***Aspergillus amoenus***	---	---	---	---	1,33	1,60	0,67	1,47
ITF 60 **NI**	0,82	0,56	0,76	0,91	---	---	---	---

NI = não identificado.
Fonte: o autor, 2020.

Podemos observar que o gênero *Penicillium*, foi o grupo de organismo (n=13) que foi capaz de tolerar quase todos os metais pesados analisados, demonstrando assim seu potencial uso como agente biorremediador de metais pesados. Estudos vêm enfatizando o uso do mesmo gênero bem como outros, potencialmente utilizados como agentes tolerantes à presença de metais pesados (ISKANDAR et al. 2011; MOHAMMADIAN et al. 2017). No trabalho realizado por Faryal, Ahmed e Hameed (2006), os autores isolaram fungos filamentosos tolerantes a metais pesados, entre eles, espécies de *Penicillium* spp, de amostras coletadas em fábricas têxteis, no Paquistão.

Muñox-Silva et al. (2019) estudaram o grau de tolerância a metais pesados de fungos isolados do solo com mineração, a fim de conhecer seu potencial para aplicações em trabalhos de biorremediação. Dos 23 fungos isolados, os gêneros *Penicillium* e *Fusarium* obtiveram os melhores índices de tolerância aos metais chumbo (Pb), zinco (Zn), níquel (Ni), e cromo (Cr). Os autores concluíram que os isolados podem ser úteis para o desenvolvimento de processos de biorremediação. IRAM et al. (2013) triaram amostras de solo de áreas agrícolas periurbanas em Hudiara - Paquistão e identificaram fungos tolerantes a metais pesados. Os resultados revelaram que a maioria dos isolados foram resistentes ao Pb e Cr. Entre as linhagens analisadas, o gênero *Aspergillus* destacou-se com concentrações mínimas inibitórias de 600 mg L^{-1} de Pb e 400 mg L^{-1} de Cr.

Acosta-Rodriguez et al. (2018) estudaram a capacidade de resistência e remoção de metais pesados pelo fungo *Aspergillus niger*, o qual cresceu em meios de cultura com a presença de zinco, chumbo e mercúrio na concentração de 2000 mg L^{-1}, arsênico à 1200 L^{-1}, flúor e cobalto a 800 L^{-1} e cádmio a 400 L^{-1}. Iram e Nasir (2012) testaram linhagens de fungos isolados de solo contaminado por esgotos e efluentes industriais, os quais continham metais pesados e produtos químicos tóxicos, com objetivo de avaliar o potencial de tolerância aos metais chumbo e cromo. Entre as linhagens testadas, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Fusarium* sp., apresentaram tolerância aos metais. Os autores concluíram que as linhagens tolerantes aos metais são potencialmente úteis em processos de biorremediação de solo contaminado com estes metais.

Os resultados de tolerância mostram a importância e o potencial adaptativo de fungos filamentosos recuperados de efluentes têxteis os quais podem ser utilizados em

estudos de tolerância e/ou degradação de ambientes contaminados com metais pesados.

4.6 Avaliação da tolerância a hidrocarbonetos

Os 26 fungos filamentosos foram submetidos a ensaios de tolerância (crescimento microbiano em meio líquido) aos hidrocarbonetos hexano, tolueno, benzeno e xileno em meio de cultura contendo 25% de cada hidrocarboneto, separadamente. Os resultados mostraram que sete isolados apresentaram tolerância aos respectivos compostos (Tabela 4) destacando-se os isolados ITF 12 (*Penicillium* sp.) e o ITF 20 que toleraram a maioria do hidrocarbonetos testados. Nenhum dos isolados foram tolerantes ao hidrocarboneto xileno.

Tabela 5 – Isolados fúngicos tolerantes a hidrocarbonetos.

Tolerantes a hidrocarbonetos (25%)					
Isolados	**Hexano**	**Tolueno**	**Benzeno**	**Xileno**	**Identificação**
ITF 8	-----	-----	x	-----	*Penicillium* sp.
ITF 12	x	x	x	-----	*Penicillium* sp.
ITF 20	x	x	x	-----	NI
ITF 21	-----	x	-----	-----	*Penicillium* sp.
ITF 34	x	x	-----	-----	*Penicillium* sp.
ITF 43	x	-----	-----	-----	*Penicillium* sp.
ITF 60	x	-----	-----	-----	NI

NI = não identificado.
Fonte: o autor, 2020.

Podemos verificar que todos os isolados tolerantes aos hidrocarbonetos são representantes do gênero *Penicillium*. O gênero *Penicillium* pode estar presente em diferentes habitats com condições desfavoráveis ao desenvolvimento microbiano como altas concentrações de pH, salinidade, temperatura e baixa disponibilidade de nutrientes (NARAIAN, GAUTAM, 2018). O fato de ser um organismo que produz muitos esporos pode ser o motivo para a alta tolerância desse gênero demonstrada no presente estudo. Espécies de *Penicillium* isoladas de ambientes extremos podem ser utilizadas para entender processos adaptativos que permitem a vida nesses tipos de ambientes. A evidência de sua existência nestes habitats vêm colaborando na

exploração de aplicações biotecnológicas incluindo processos de biorremediação (YADAV *et al*, 2018).

Os resultados demonstram que a concentração de 25% dos hidrocarbonetos testados no meio de cultura foram tóxicos para a maioria dos isolados testados, não permitindo que os mesmos se desenvolvessem no meio de cultivo. O hidrocarboneto xileno (MM 106,16 g moL^{-1}) possui peso molecular maior que os outros hidrocarbonetos, o que pode ter restringido o crescimento dos microrganismo no meio de cultivo. Segundo Baldantoni et al., (2017) a resistência dos HPAs à degradação microbiana aumenta com o aumento do peso molecular. Wetler-Tonini; Rezende; Grativol, (2010) afirmam que a biodegradação dos HPAs depende da estabilidade dos anéis aromáticos e da solubilidade e biodisponibilidade dos HPAs, bem como a concentração e o tamanho da molécula do hidrocarboneto. Contudo, isolados do gênero *Penicillium* toleraram a concentração de 25% para os hidrocarbonetos hexano, tolueno, e benzeno.

Segundo Lima; Oliveira; Cruz (2011) espécies dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* são as principais degradoras de hidrocarbonetos reportados na literatura. Dos Santos et. al (2008) isolaram quatro espécies de *Aspergillus* spp. de amostras de solo contaminado do Rio Grande do Sul, Brasil em meio de cultura contendo os hidrocarbonetos fenol, hexano, clorobenzeno, benzeno, tolueno e xileno. Os autores observaram que apenas um isolado apresentou tolerância aos compostos benzeno, tolueno e xileno. No estudo realizado por Rodrigues et al. (2017), os autores utilizaram um reator de fluxo contínuo para verificar a capacidade do fungo *Aspergillus niger* em remover BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno). O isolado foi capaz de degradar benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno nas porcentagens de 88%, 90%, 90% e 91%, respectivamente.

No estudo realizado por Vitali et al. (2006), os autores isolaram 55 fungos de amostras de solo contaminados com resíduos industriais contendo organoclorados, principalmente hexaclorobenzeno. Três linhagens identificadas como *Eupenicillium baarnense* (SSP1951 e SSP1952) e *Eupenicillium crustaceum* (Ludwig, SSP1953) foram selecionadas para testes de biodegradação. *E. crustaceum* foi capaz de reduzir 24,6% dos compostos solúveis de hexano. O mesmo foi observado pelos *Eupenicillium baarnense* (SSP1951 e SSP1952) com percentagens inferiores. Os autores concluíram que

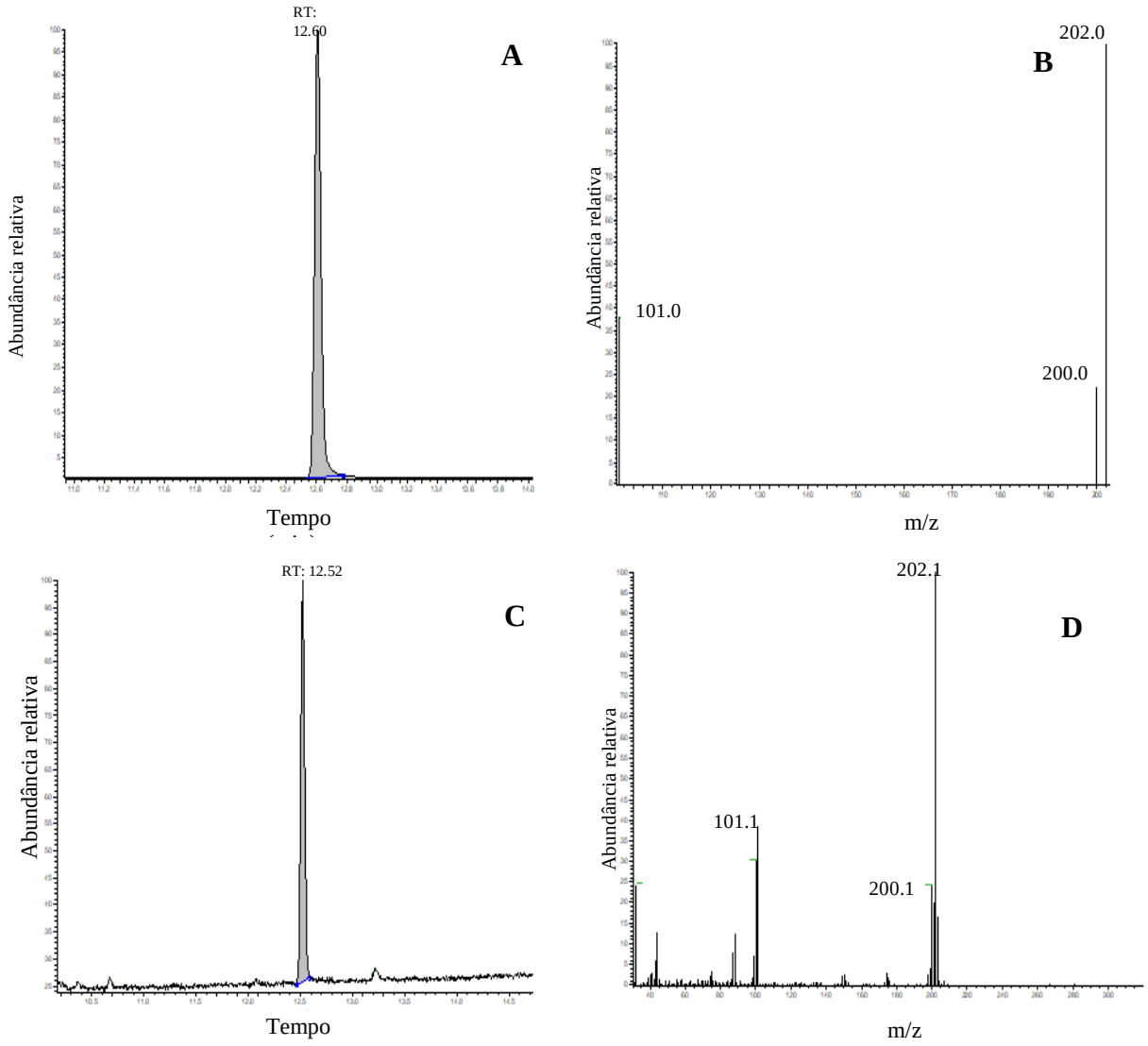
E. crustaceum é uma espécie interessante para estudos de biorremediação do solo contaminado com hidrocarbonetos.

Estudos utilizando fungos filamentosos isolados de efluentes industriais têxteis, não foram encontrados, demonstrando assim, a importância na busca por células microbianas recuperadas destes ambientes aptas a metabolizar hidrocarbonetos. Os resultados de tolerância aos hidrocarbonetos nos mostraram o potencial de fungos filamentosos recuperados de ambientes industriais, os quais podem ser aplicados em processos de biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos incluindo hexano, tolueno e benzeno. Entretanto, novas análises precisam ser realizadas na tentativa de verificar se os isolados tolerantes aos hidrocarbonetos testados são capazes de metabolizar os hidrocarbonetos em compostos menos tóxicos.

4.6.1 Avaliação da degradação do HPA pireno

Os ensaios de degradação de pireno foram realizados com os isolados *Aspergillus amoenus* ITF 47 e *Penicillium* sp. ITF 12 , devido à capacidade de descoloração do corante RBBR e tolerância aos hidrocarbonetos hexano, tolueno e benzeno bem como a descoloração do RBBR em meio líquido, respectivamente. Os resultados das análises cromatográficas em CG-MS revelaram as áreas de pico 142558739 do tempo zero, e 107064072 do isolado ITF 12, demonstrando degradação de 24,9% de pireno (2 mg L^{-1}) nos extratos metabólicos do isolado *Penicillium* sp. ITF 12 após 5 dias de cultivo microbiano. Observa-se na Figura 20, o tempo de retenção (RT) do padrão em 12.60 minutos e o RT do isolado ITF 12 em 12.52 minutos, confirmando a presença do composto. Por outro lado, foi verificado uma degradação muito baixa após 10 dias de cultivo, aproximadamente 10%. As análises referentes aos extratos metabólicos da linhagem *Aspergillus amoenus* ITF 47 após cinco dias de cultivo, mostraram que não houve degradação do pireno devido ao aparecimento de áreas de picos praticamente iguais (dados não mostrados).

Figura 19 – Cromatogramas e fragmentogramas obtidos por GC–MS. A e B: solução padrão de pireno; C e D: ITF12 Penicillium sp., após 5 dias de cultivo.



Fonte: o autor, 2020.

Após análises dos possíveis metabólitos formados por monitoramento de varredura completo (m/z) bem como pelos espectros de massas descritos na literatura em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), os resultados dos cromatogramas da amostra ITF 12, mostraram que não houve o aparecimento de nenhum pico em tempo de retenção distinto do padrão e do composto pireno, bem como dos íons relacionados aos metabólitos entre eles hidroxipireno, dihidroxipireno, pireno quinona, pireno dihidrodiol e pirenilsulfato, potencialmente produzidos pela degradação do pireno. Os resultados encontrados após análises cromatográficas nos mostraram que o isolado ITF 12 degradou o HPA pireno. Entretanto, não foi possível detectar os

possíveis metabólitos menos tóxicos formados a partir da degradação do composto pela técnica utilizada (CG-SM). Assim, torna-se necessário a utilização de outra metodologia cromatográfica tal como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de diodos e espectrometria de massa (HPLC-DAD-MS) (Passarini et al. 2011). Por outro lado, podemos dizer que o isolado degradou o pireno, tendo em vista a utilização de uma etapa de trituração do micélio fúngico na extração das amostras, antes da injeção no cromatógrafo, demonstrando que não houve adsorção do pireno no micélio e sim degradação.

Relatos na literatura demonstram o potencial degradador de hidrocarbonetos aromáticos por fungos filamentosos. Leme (2016), avaliou diferentes fatores na destoxificação do hidrocarboneto policíclico aromático pireno em um consórcio microbiano de origem marinha. Os fungos filamentosos *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 e *Mucor racemosus* CBMAI 847 juntamente com as bactérias *Dietzia* sp. CBMAI 705 e *Bacillus* sp. CBMAI 707, isoladas de petróleo degradado, apresentaram resultados eficientes nos testes de toxicidade, que possibilitou uma taxa de sobrevivência de até 68,53% de microcrustáceos (*Artemia sp*.). Os autores também obtiveram baixos valores na avaliação da atividade enzimática das enzimas ligninolíticas e concluíram que estas enzimas não parecem estar diretamente envolvidas com o processo de destoxificação do pireno, sugerindo que outras enzimas ou rotas metabólicas estariam participando do processo de destoxificação.

No estudo realizado por Ravelet et al. (2000), os autores isolaram 41 fungos de sedimentos contaminados com HPAs, os quais foram avaliados quanto à degradação de pireno. Dez isolados incluindo *Mucor racemosus*, *M. racemosus var. sphaerosporus*, *Gliocladium virens*, *Penicillium simplicissimum*, *P. janthinellum*, *Phialophora alba*, *P. hoffmannii*, *Trichoderma harzianum*, *Scopulariopsis brumptii* e *Coniothyrium fuckelii* degradaram o pireno (10 mg L^{-1}) em meio líquido incubados por dois dias. Os autores demonstraram o potencial uso destas linhagens em processos de biorremediação. Vieira et al. (2018) avaliaram a degradação dos HPAs pireno e benzo(a)pireno e a capacidade da produção enzimática ligninolítica de três basidiomicetos entre eles *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061, *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 e *Peniophora* sp. CBMAI 1063) isolados de esponjas marinhas. Os três isolados foram capazes de degradar os HPAs, entretanto, o fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, foi o mais eficiente, chegando a degradar mais de 90% da quantidade inicial de ambos os HPAs (0,02 e 0,04 mg

mL^{-1} de benzo(a)pireno e pireno, respectivamente) nos primeiros 7 dias de cultivo. Souza et al., (2017) realizaram um estudo onde fungos filamentosos da região amazônica, isolados de sedimentos com diferentes níveis de contaminação por HPAs, foram capazes de tolerar fenantreno e pireno. Todos os fungos mostraram tolerância ao fenantreno e ao pireno, dentre os quais, espécies de *Penicillium* spp. toleraram o composto pireno nas concentrações 240, 540, 780, 1020 e 2040 µg mL^{-1} após 10 dias de crescimento.

Estudos utilizando fungos filamentosos isolados de efluentes industriais têxteis, na degradação do hidrocarboneto pireno não foram encontrados, demonstrando assim, a relevância em pesquisas utilizando fungos recuperados destas amostras capazes de degradar HPAs incluindo pireno. Desta forma, apesar da não visualização de metabólitos intermediários durante a degradação de pireno, podemos dizer que o isolado ITF 12 representa um agente potencialmente degradador de hidrocarbonetos aromáticos e pode ser utilizado em processos de biorremediação.

4.7 Potencial biotecnológico de fungos filamentosos de efluentes têxtil

Após avaliação de todos os resultados derivados do presente estudo, podemos dizer que cinco fungos filamentosos recuperados do efluente têxtil podem representar linhagens promissoras para utilização na descontaminação de ambientes impactados com compostos tóxicos incluindo metais pesados e hidrocarbonetos (Tabela 5).

A linhagem *Aspergillus sydowwi* ITF 10, foi capaz de produzir a enzima lacase, degradar o corante RBBR e tolerar concentrações de diferentes metais pesados, demonstrando assim, seu potencial em descolorir corantes em processos de biorremediação em ambientes impactados com metais pesados. O isolado *Sarocladium sp.* ITF 33 também descoloriu o corante RBBR e produziu a enzima lacase, entretanto não tolerou concentrações de metais no meio fermentativo. Novos estudos precisam ser realizados para avaliar a capacidade de detoxificação e/ou adsorção destes isolados na presença dos metais pesados estudados e por fim, verificar os possíveis eventos metabólicos envolvidos neste processo.

Podemos destacar a linhagem *Penicillium* sp. ITF 12, que apresentou resultados promissores de descoloração do corante RBBR (incluindo adsorção ao micélio), tolerância aos metais pesados e aos hidrocarbonetos estudados, bem como foi capaz de

degradar o HPA pireno. Como podemos ver na Tabela 5, a linhagem ITF 12, não produziu a enzima extracelular lacase, bem como não foi possível detectar os possíveis metabólitos intermediários formados durante o decorrer da degradação dos compostos no meio fermentativo.

Tabela 6 – Potencial biotecnológico dos melhores resultados obtidos nos ensaios experimentais com os fungos isolados do efluente têxtil.

Resultados dos melhores ensaios experimentais											
	Descoloração do corante RBBR										
	Halo de descoloração (500 mg L^{-1}) (cm)	**Descoloração (500 mg L^{-1}) (%)**	**Descoloração (1000 mg L^{-1}) (%)**	**Adsorção do RBBR (%)**	**Atividade Lacase (UL^{-1})**	**Índice de tolerância (cm) a metais (mg L^{-1})**				**Tolerância a Hexano, Tolueno, Benzeno (%)**	**Degradação do Pireno (%)**
						Cu (500)	**Pb (300)**	**Al (350)**	**Cr (500)**		
***Aspergillus sydowii* ITF 10**	-----	60	40	-----	0,006	0,62	0,95	-----	1,24	-----	NA
***Penicillium* sp. ITF 12**	0,8	-----	-----	10	-----	1,06	1,29	1,59	0,94	25	24,9
ITF 20 NI	-----	-----	-----	-----	-----	0,76	0,72	0,72	0,68	25	NA
***Sarocladium* sp. ITF 33**	-----	60	45	-----	0,001	-----				-----	NA
***Aspergillus amoenus* ITF 47**	-----	80	30	10	-----	-----	-----	1,60	1,47	-----	NA

NA = não analisado.
Fonte: o autor, 2020.

Os dados de degradação do composto pireno nos mostraram o potencial biodegradador da linhagem *Penicillium* sp. ITF 12, entretanto, ainda não ficou claro qual o verdadeiro envolvimento bem como o principal papel das enzimas intracelulares (P450) e extracelulares (ligninases) na degradação e na descoloração do corante RBBR pelo isolado do ambiente têxtil.

A linhagem *Aspergillus amoenus* ITF 47, foi capaz de descolorir o corante RBBR em meio líquido, entretanto, não foi capaz de degradar pireno e nem produzir a enzima lacase, como ocorreu com o ITF 12, sugerindo assim, a atuação de outras enzimas ligninolíticas envolvidas na descoloração do corante RBBR, incluindo a capacidade de adsorver o corante no micélio.

Desta forma, mais estudos necessitam ser realizados para garantir que sejam identificados os metabólitos intermediários menos tóxicos e mais solúveis que o composto pireno, bem como o envolvimento das enzimas intracelulares pertencentes ao sistema Citocromo P450, e a produção de outras enzimas extracelulares do complexo ligninolítico, incluindo a manganês peroxidase e/ou a lignina peroxidase.

Os fungos estudados no presente trabalho demonstraram estar adaptados às condições adversas encontradas nos efluentes industriais têxteis. Esta adaptação pode garantir a sobrevivência microbiana, a qual pode ser atribuída à presença de enzimas intra e extracelulares, que favorecem a adaptação do metabolismo microbiano nestes ambientes devido à capacidade de degradar, adsorver e tolerar uma diversidade de compostos presentes nas amostras estudadas.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que as linhagens de fungos filamentosos recuperados da amostra de efluente industrial têxtil representam fontes microbianas promissoras na obtenção de metabólitos com potencial aplicação em processos de biorremediação de efluentes têxteis.

Os fungos filamentosos isolados da estação de tratamento de indústria têxtil apresentam a capacidade de produzir metabólitos responsáveis por processos bioquímicos envolvidos na transformação, degradação e tolerância de compostos tóxicos poluentes ambientais, incluindo hidrocarbonetos e metais pesados, pois descoloriram o corante RBBR, além de degradar o pireno e tolerar a presença de metais pesados e hidrocarbonetos no meio.

Não foi definida as enzimas envolvidas nos processos de transformação, degradação e tolerância aos compostos tóxicos estudados. Desta forma, novos estudos serão necessários para evidenciar o verdadeiro processo enzimático, bem como as possíveis rotas enzimáticas envolvidas no metabolismo dos hidrocarbonetos e metais pesados estudados no presente trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT NBR 9800: **Critérios para lançamento de efluentes líquidos industriais no sistema coletor público de esgoto sanitário** - Procedimento. Rio de Janeiro, 1987.

ACOSTA-RODROGUEZ, I. et al. Bioremoval of Different Heavy Metals by the Resistant Fungal Strain Aspergillus niger. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2018, p. 7, 2018.

AKCIL, A. et al. A review of approaches and techniques used in aquatic contaminated sediments: metal removal and stabilization by chemical and biotechnological processes. **Journal of Cleaner Production**, v. 86, p. 2, jan. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.08.009>.

AKHTAR, S. et al. Metal tolerance potential of filamentous fungi isolated from soils irrigated with untreated municipal effluent. **Soil and Environment**, v. 32, n. 1, p. 55–62, 2013.

ALMEIDA, E. Avaliação da remoção de cor e toxicidade de azo corantes pelo emprego de tratamentos microbiológicos , adsortivos e processos oxidativos avançados Erica Janaina Rodrigues de Almeida. **Paulista, Universidade Estadual Aplicada, Microbiologia**, 2018.

ALMEIDA, J. R. M.; COLLARES, D. G.; BARBOSA, P. F. D. Bioprospecção microbiana. **Embrapa Agroenergia**, 2015.

ALVAREZ, C. E. De; ROCHA-GOMES, L. V. da. Análise Crítica dos Aspectos Ambientais no Uso de Pigmentos nas Argamassas de Rejuntamento do Espírito Santo (Brasil): Diagnóstico e recomendações. **Universidade Federal do Espírito Santo**, n. February, 2015.

ARAÚJO, K. C. N. de. Degradação de Hidrocarbonetos por fungos Filamentosos. **Instituto de Ciências Biológicas -Universidade Federal de Minas Gerais**, 2010.

ARAÚJO, G. R. et al. Descoloração do Corante têtil Índigo Carmine por espécie de Aspergillus. **I CONICBIO/ II CONABIO/ VI SIMCBIO**, n. 1, p. 1–11, 2013.

BALDANTONI, A. D. et al. Anthracene and benzo(a)pyrene degradation in soil is favoured by compost amendment: perspectives for a bioremediation approach. **Journal of Hazardous Materials**, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.043>.

BARBOSA, L. C. A. et al. Determination of the syringyl/guaiacyl ratio in eucalyptus wood by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry (Py-GC/MS). **Quimica Nova**, v. 31, n. 8, p. 2035–2041, 2008.

BERNAL, S. et al. Biotechnological potential of microorganisms from textile effluent: isolation, enzymatic activity and dye discoloration Journal: **Annals of Brazilian Academy of Sciences**, 2020.

BERNARDO, D. L.; BARROS, K. A.; SILVA, R. C. Carcinogenicidade de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. **Química Nova**, v. 39, n. 7, p. 789–794, 2016.

BISOGNIN, R. P. et al. Análise do potencial microbiano de uma biopilha na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. **Eng Sanit Ambient**, p. 517–526, 2017.

BODOUR, A. A. et al. Distribution of Biosurfactant-Producing Bacteria in Undisturbed and Contaminated Arid Southwestern Soils. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 69, n. 6, 2003.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 519–546, 2003. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938>.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SETTE, L. D. The production of ligninolytic enzymes by marine-derived basidiomycetes and their biotechnological potential in the biodegradation of recalcitrant pollutants and the treatment of textile effluents. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 223, n. 5, p. 2333–2345, 2012.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete Pleurotus sajor-caju. **Biochem. J.**, v. 255, p. 445–450, 1988.

BUSWELL, J. a; CAI, Y.; CHANG, S. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by Lentinula (Lentinus) edodes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, n. 1, p. 81–87, 1995.

CARDOSO, B. K. et al. Panus strigellus laccase decolorizes anthraquinone, azo, and triphenylmethane dyes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, n. September, p. 558–563, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187881811830519X>.

CARLA, A. et al. Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. **Agricultural Microbiology**, p. 1–12, 2018.

CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo (a) pireno : uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 1, p. 1–27, 2008.

CASTRO-SILVA, M. A. et al. Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. SUPPL. 1, p. 45–47, 2003.

CHANAGÁ, X. et al. Hongos Nativos con Potencial Degradador de Tintes Industriales en el Valle de Aburrá , Colombia. **Revista Facultad Nacional Agronomía de Medellín**,

v. 65, n. 2, p. 6811–6821, 2012.

CONAMA, C. N. do M. A.-. Resolução n° 430. 2011.

COSTA, J. N. da et al. Técnicas de Colheita, Processamento e Armazenamento do Algodão. **Embrapa**, p. 1–14, 2005.

CRISTINA, D.; CASTRO, M. De; QUINTELLA, C. M. Mapeamento Tecnológico de Processos Microbianos Aplicados na Biorremediação de Metais Pesados. **Caderno de Prospecção**, v. 11, n. 5, p. 1740–1751, 2018.

CRUZ, N. V. dos S. et al. DESCOLORAÇÃO DE CORANTE TÊXTIL UTILIZANDO O FUNGO FILAMENTOSO Aspergillus sp. URM 5741. **I CONIMINAS**, 2019.

DA SILVA, M. et al. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: Isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. **Environmental Technology**, v. 29, n. 12, p. 1331–1339, 2008.

DESHMUKH, R.; KHARDENAVIS, A. A.; PUROHIT, H. J. Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation. **Indian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 247–264, 2016.

FRENA, M. et al. Distribution and Sources of Aliphatic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Sediments of Itajaí-Açu Estuarine System in Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 4, p. 603–614, 2017.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, V. B. Corantes têxteis. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71–78, 2000.

HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L. Y. Untapped potential : exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Nature Publishing Group**, v. 9, n. 3, p. 177–192, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2519>.

HIDROGERON, G. Tratamento de efluentes. **Portal tratamento de água**, p. 1–17, 2016.

HOLKAR, C. R. et al. A critical review on textile wastewater treatments: Possible approaches. **Journal of Environmental Management**, v. 182, p. 351–366, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.07.090>.

IRAM, S. et al. Heavy metal tolerance of fungus isolated from soil contaminated with sewage and industrial wastewater. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 22, n. 3, p. 691–697, 2013.

IRAM, S.; NASIR, K. Heavy metal tolerance of filamentous fungal strains isolated from soil irrigated with industrial wastewater. **BIOLOGIJA**, v. 58, n. 3, p. 107–116, 2012.

JIN, X.; NING, Y. Laccase production optimization by response surface methodology with Aspergillus fumigatus AF1 in unique inexpensive medium and decolorization of

different dyes with the crude enzyme or fungal pellets. **Journal of Hazardous Materials**, v. 262, p. 870–877, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.09.024>.

KULKARNI, A. N. et al. Decolorization and detoxification of dye mixture and textile effluent by lichen Dermatocarpon vellereceum in fixed bed upflow bioreactor with subsequent oxidative stress study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, n. October 2017, p. 17–25, 2018. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651317306711>.

KUMAR, S.; RAUT, S.; BANDYOPADHYAY, P. Fungal decolouration and degradation of azo dyes : A review. **Fungal Biology Reviews**, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2016.06.003>.

KUNZ, A. et al. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Quimica Nova**, v. 25, n. 1, p. 78–82, 2002.

LEE, D. W. et al. Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. **Environmental Pollution**, v. 241, p. 254–264, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.070>.

LEME, C. de R. Aplicação de consórcio microbiano marinho na destoxificação do contaminante Pireno. **Instituto de Geociências e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"**, 2016.

LEVASSEUR, A. et al. Exploring laccase-like multicopper oxidase genes from the ascomycete Trichoderma reesei: a functional, phylogenetic and evolutionary study. **BMC Biochemistry**, v. 11, n. 1, p. 32, 2010. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/11/32>.

LIMA, D. F.; OLIVEIRA, O. M. C.; CRUZ, M. J. M. UTILIZAÇÃO DOS FUNGOS NA BIORREMEDIAÇÃO DE SUBSTRATOS CONTAMINADOS POR PETRÓLEO : ESTADO DA ARTE. **Cadernos de Geociências**, v. 8, p. 113–121, 2011.

LISBOA, D. C. V. da S. BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES DE LAVANDERIAS TÊXTEIS POR ESPÉCIES DE TRICHODERMA DA MICOTECA URM PRODUTORAS DE ENZIMAS OXIDATIVAS. **Universidade Federal de Pernambuco - Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos**, 2017.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical Brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 246–252, 2005.

MACHADO, K. M.; MATHEUS, D. R. BIODEGRADATION OF REMAZOL BRILLIANT BLUE R BY LIGNINOLYTIC ENZYMATIC COMPLEX PRODUCED BY PLEUROTUS

OSTREATUS. p. 468–473, 2006.

MACIEL, M. J. M.; CASTRO E SILVA, A.; RIBEIRO, H. C. T. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 1–13, 2010.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. [s.l: s.n.]

MAGRINI, M. J. DEGRADAÇÃO DE HPAs E PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS POR FUNGOS BASIDIOMICETOS DERIVADOS DE ESPONJAS MARINHAS. **Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas**, 2012.

MARI MENDA. Corantes e pigmentos. **Conselho Regional de Química IV Região**, p. 1–4, 2020.

MARINHO, J. S. et al. Waterborne infectious and parasitic diseases and respiratory diseases in an industrial area , Northern Brazil. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 24, p. 443–451, 2016.

MEIRE, R. O. et al. ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICOS DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS. **Oecologia Brasil**, v. 11, n. 2, p. 188–201, 2007.

MENDEZ-CASTILHO, L.; PRIETO-CORREA, E.; JIMENEZ-JUNCA, C. Identification of fungi isolated from banana rachis and characterization of their surface activity. **Applied Microbiology**, 2017.

MORAES, C. M. de. ESTUDO DA DIFUSÃO DE CORANTES REATIVOS EM TECIDO DE ALGODÃO. **Universidade Estadual de Campinas**, 2010.

MOREIRA, C. A.; DOURADO, J. C. MONITORAMENTO DA ATENUAÇÃO NATURAL DE PLUMA DE CONTAMINAÇÃO PELO MÉTODO DE RADAR DE PENETRACÃO NO SOLO (GPR). **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 25, p. 389–398, 2007.

MORGANNA, R. et al. Screening , Production and Characterization of Biosurfactants from Caatinga ´ S Filamentous Fungi. **Journal of Pharmaceutical Science Invention**, v. 6, n. 5, p. 23–28, 2017.

MOURA, J. F. de. Saúde pública e saúde dos oceanos: interface conceitual dos paradigmas e análise de elementos essenciais e não essenciais em organismos marinhos de um ecossistema de ressurgência. **Fundação Oswaldo Cruz**, 2013.

MUÑOX-SILVA, L. et al. Microorganismos tolerantes a metales pesados del pasivo minero Santa Rosa , Jangas (Perú). **Revista peruana de biologia**, v. 26, n. 1, p. 109–118, 2019.

NING, C. et al. Decolorization of a variety of dyes by Aspergillus flavus A5p1. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 0, n. 0, p. 0, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-017-1885-9>.

OLADIPO, O. G. et al. Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 29–37, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.003>.

OLIVEIRA, C. M. R. Aplicabilidade de sistemas simplificados para estações de tratamento de esgoto de cidades de pequeno porte. **Universidade federal de juiz de fora**, 2014.

OLIVEIRA, E. M. da S. Avaliação de metais (Al, As, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr,Cu, Fe,K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Sb, Sc, Se, Sn ,Sr, V, Zn) em Liposarcus pardalis (BODÓ) E Prochilodus Cearensis (CURIMATÃ). **Universidade Federal do Ceará**, 2018.

OLUWASEUN, O.; OLUTOYIN, B.; JACKSON, V. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) compounds : (acenaphthene and fluorene) in water using indigenous bacterial species isolated from the Diep and Plankenburg rivers , Western Cape , South Africa. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 314–325, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.027>.

ORZECHOWSKI, J. et al. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO E DE DETOXIFICAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS POR LACASE DE PLEUROTUS SAJOR-CAJU. **Evidência**, v. 18, n. 1, p. 59–80, 2018.

PALMIERI, G.; CENNAMO, G.; SANNIA, G. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus Pleurotus ostreatus and its oxidative enzymatic system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 1, p. 17–24, 2005.

PARAMESWARI, E.; LAKSHMANAN, A.; THILAGAVATHI, T. Biosorption and metal tolerance potential of filamentous fungi isolated from metal polluted ecosystem. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 664–671, 2010.

PASSARINI, M. R. Z. et al. Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 2, p. 364–370, 2011.

PASSARINI, M. R. Z. et al. Induction, expression and characterisation of laccase genes from the marine-derived fungal strains Nigrospora sp. CBMAI 1328 and Arthopyrenia sp. CBMAI 1330. **AMB Express**, v. 5, n. 1, 2015.

PAZ, A. et al. Biological treatment of model dyes and textile wastewaters. **Chemosphere**, v. 181, p. 168–177, 2017.

PEIXOTO, A. da S. P. A química dos metais: uma abordagem CTS para discutir a problemática dos resíduos eletroeletrônicos. **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, 2019.

PEREIRA, A. R. B.; FREITAS, D. A. F. de. Uso De Microorganismos Para a

Biorremediação De Ambientes Impactados. **Rev. Elet. em Gestão Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 6, n. 6, p. 975–1006, 2012. Disponível em: <www.ufsm.br/reget%5Cnhttp://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/reget>.

PEREIRA, D. D. F.; DUVOISIN JR, S.; ALBUQUERQUE, P. M. O estudo da produção de biossurfactantes por fungos amazônicos. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 03, n. 4, p. 688–695, 2017.

RAHMAT, N. A.; ALI, A. A. Removal of Remazol Brilliant Blue R from Aqueous Solution by Adsorption Using Pineapple Leaf Powder and Lime Peel Powder. 2016.

RAJASIMMAN, M.; BABU, S. V.; RAJAMOHAN, N. Biodegradation of textile dyeing industry wastewater using modified anaerobic sequential batch reactor – Start-up, parameter optimization and performance analysis. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 72, p. 171–181, mar. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2017.01.027>.

RANI, B. et al. Bioremediation of dyes by fungi isolated from contaminated dye effluent sites for bio-usability. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 1055–1063, 2014.

RAVELET, C. et al. Biodegradation of pyrene by sediment fungi. **Chemosphere**, v. 40, p. 557–563, 2000.

REIS, C. B. L. dos. **PRODUÇÃO DE QUITINASES E BIOSSURFACTANTES FÚNGICOS POR PROCESSOS FERMENTATIVOS**. 2017. 2017.

RIBEIRO, I. D. A. et al. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS E FENOL POR ISOLADOS BACTERIANOS ENDOFÍTICOS DE BAMBU. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer**, v. 13, p. 1386–1397, 2016.

ROCHA, S. D. da. BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO PELA ATUAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DA Eichhornia crassipes (Mart.) Solms DE AMBIENTE AQUÁTICO DA AMAZÔNIA. **Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas**, 2015.

RODRIGUES, K. et al. Remoção de BTEX por fungos em reator aeróbio de escoamento contínuo BTEX removal by fungi in continuous flow aerobic reactor. **Eng Sanit Ambient**, v. 22, n. 4, p. 809–820, 2017.

RODRÍGUEZ COUTO, S.; TOCA HERRERA, J. L. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 500–513, 2006.

SANTAELLA, S. T. et al. Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com Aspergillus niger. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 14, n. 1, p. 139–148,

2009.

SANTHANAM, M. et al. Combined electrochemical, sunlight-induced oxidation and biological process for the treatment of chloride containing textile effluent. **Chemosphere**, v. 186, p. 1026–1032, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.066>.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quimica Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SANTOS, I. J. S. Estudo do potencial de biodegradação de 17 α -etinilestradiol , carbamazepina e ibuprofeno por fungos ligninolíticos e bactérias. **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**, 2012.

SIDDIQUEE, S.; ROVINA, K.; AZAD, S. Al. Heavy Metal Contaminants Removal from Wastewater Using the Potential Filamentous Fungi Biomass: A Review. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 07, n. 06, p. 384–393, 2015. Disponível em: <https://www.omicsonline.org/open-access/heavy-metal-contaminants-removal-from-wastewater-using-the-potentialfilamentous-fungi-biomass-a-review-1948-5948-1000243.php?aid=64703>.

SILVA, F. de A. ESTUDO DA OXIDAÇÃO DO ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIÁCETICO CATALISADA POR MODELOS BIOINSPIRADOS. **programa de Pós-Graduação em QuímicaUniversidade Federal de Sergipe**, 2017a.

SILVA, N. R. A. et al. Biosurfactant-and-bioemulsifier produced by a promising Cunninghamella echinulata isolated from caatinga soil in the Northeast of Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 15377–15395, 2014.

SILVA, R. L. A. BIORREMEDIAÇÃO DE ÁGUAS FLUVIAIS CONTAMINADAS COM CORANTES DA INDÚSTRIA TÊXTIL POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO BIOMA CAATINGA. **Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/ Universidade Federal de Pernambuco**, 2017b.

SOUSA, karina C. et al. BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADO POR HIDROCARBONETOS UTILIZANDO FUNGOS. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v. 14, p. 43–52, 2016.

SOUZA, H. M. de L. et al. Tolerance to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) by filamentous fungi isolated from contaminated sediment in the Amazon region. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 39, n. 4, p. 481–488, 2017.

SYED, K. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Genome-to-function characterization of novel fungal P450 monooxygenases oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 399, n. 4, p. 492–497, 2010. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.094>.

TORGUT, G. et al. Application of response surface methodology for optimization of Remazol Brilliant Blue R removal onto a novel polymeric adsorbent. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 0, p. 1–9, 2017.

TORRES-CRUZ, T. J. et al. Presence and distribution of heavy metal tolerant fungi in surface soils of a temperate pine forest. **Applied Soil Ecology**, v. 131, n. August, p. 66–74, 2018a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.08.001>.

TORRES-CRUZ, T. J. et al. Presence and distribution of heavy metal tolerant fungi in surface soils of a temperate pine forest. **Applied Soil Ecology**, v. 131, n. April, p. 66–74, 2018b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.08.001>.

TUFIK, S. et al. Epidemiology of cardiovascular and respiratory diseases and its associations with air pollution in Vitória, Brazil: a systematic review. **Clinical e Biomedical Research**, v. 37, 2017. Disponível em: <http://seer.ufrgs.br/hcpa>.

VALE, M. do S. et al. Efeito da toxicidade de Cr (VI) e Zn (II) no crescimento do fungo filamentoso Aspergillus niger isolado de efluente industrial. **Instituto de Ciências do Mar**, v. 16, p. 237–244, 2011.

VIEIRA, G. A. L. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by marine-derived basidiomycetes : optimization of the degradation process. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 749–756, 2018.

WANG, X. et al. Effect of biosurfactant on biodegradation of heteroatom compounds in heavy oil. **Fuel**, v. 230, n. May, p. 418–429, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.05.047>.

WANG, Z. et al. Textile Dyeing Wastewater Treatment. In: **Advances in Treating Effluent**. [s.l: s.n.]ip. 154.

WETLER-TONINI, R. M. C.; REZENDE, C. E. De; GRATIVOL, A. D. DEGRADAÇÃO E BIORREMEDIAÇÃO DE COMPOSTOS DO PETRÓLEO POR BACTÉRIAS : REVISÃO. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 4, p. 1010–1020, 2010.

YAKUBU, M. Biological approach to oil spills remediation in the soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 24, p. 2735–2739, 2007.

ZHANG, J. H. et al. Degradation of crude oil by fungal enzyme preparations from Aspergillus spp. for potential use in enhanced oil recovery. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 865–875, 2016.

ANEXO - Absorbância do corante RBBR 500 mg L-1 e 1000 mg L-1

Amostra	Absorbância					
	500 mg L^{-1}			1000 mg L^{-1}		
	4 dias	8 dias	12 dias	4 dias	8 dias	12 dias
ITF 2A	0,478	0,325	0,317	0,772	0,667	0,680
ITF 2B	0,475	0,325	0,317	0,774	0,667	0,700
ITF 3A	0,480	0,286	0,137	0,580	0,591	0,489
ITF 3B	0,502	0,284	0,132	0,671	0,617	0,489
ITF 4A	0,332	0,285	0,134	0,625	0,604	0,487
ITF 4B	0,335	0,285	0,134	0,625	0,604	0,491
ITF 8A	0,332	0,389	0,407	0,898	0,920	0,862
ITF 8B	0,373	0,382	0,407	0,897	0,956	0,862
ITF 9A	0,412	0,398	0,433	0,704	0,718	0,771
ITF 9B	0,473	0,393	0,437	0,780	0,775	0,771
ITF 10A	0,385	0,318	0,139	0,631	0,672	0,408
ITF 10B	0,448	0,316	0,139	0,738	0,698	0,428
ITF 11A	0,344	0,421	0,449	0,604	0,879	0,771
ITF 11B	0,381	0,441	0,447	0,926	0,879	0,771
ITF 12A	0,247	0,317	0,263	0,538	0,728	0,665
ITF 12B	0,261	0,366	0,261	0,589	0,755	0,667
ITF 13A	0,282	0,434	0,487	0,909	0,724	0,910
ITF 13B	0,520	0,451	0,487	0,933	0,789	0,910
ITF 14A	0,445	0,369	0,391	0,773	0,785	0,524
ITF 14B	0,459	0,380	0,391	0,788	0,823	0,527
ITF 20A	0,386	0,321	0,234	0,847	0,542	0,658
ITF 20B	0,392	0,321	0,234	0,847	0,542	0,658
ITF 21A	0,270	0,340	0,517	0,855	0,804	1,066
ITF 21B	0,384	0,340	0,518	0,866	0,804	1,078
ITF 22A	0,462	0,501	0,520	0,904	1,102	1,037
ITF 22B	0,486	0,506	0,520	0,91	1,102	1,037
ITF 27A	0,430	0,290	0,081	0,799	0,867	0,718
ITF 27B	0,428	0,290	0,105	0,836	0,870	0,718
ITF 28A	0,421	0,452	0,00	0,761	0,853	0,00
ITF 28B	0,428	0,450	0,00	0,821	0,853	0,00
ITF 29A	0,495	0,346	0,300	0,745	0,698	0,616
ITF 29B	0,525	0,346	0,300	0,745	0,698	0,616
ITF 30A	0,331	0,234	0,336	0,723	0,621	0,652
ITF 30 B	0,425	0,234	0,336	0,723	0,621	0,652
ITF 31A	0,411	0,175	0,124	0,846	0,747	0,719
ITF 31B	0,38	0,175	0,124	0,868	0,745	0,719
ITF 33A	0,254	0,130	0,170	0,613	0,400	0,551
ITF 33B	0,252	0,128	0,170	0,613	0,400	0,551
ITF 34A	0,223	0,297	0,388	0,658	0,730	0,855

ITF 34B	0,223	0,297	0,390	0,662	0,728	0,857
ITF 39A	0,273	0,319	0,348	0,653	0,714	0,746
ITF 39B	0,269	0,315	0,350	0,653	0,718	0,746
ITF 40A	0,265	0,288	0,298	0,622	0,659	0,607
ITF 40B	0,263	0,290	0,298	0,622	0,679	0,607
ITF 43A	0,400	0,405	0,313	0,822	0,800	0,742
ITF 43B	0,4	0,405	0,313	0,82	0,800	0,762
ITF 44A	0,165	0,354	0,252	0,591	0,626	0,676
ITF 44B	0,161	0,352	0,254	0,593	0,626	0,678
ITF 47A	0,251	0,139	0,052	0,483	0,577	0,714
ITF 47B	0,251	0,139	0,056	0,483	0,575	0,714
ITF 60A	0,237	0,315	0,297	0,670	0,740	0,704
ITF 60B	0,235	0,316	0,297	0,676	0,740	0,724