

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA – EST
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA

NATÁLIA VANESSA MIRANDA MÁXIMO

**PRODUÇÃO DE LACASE POR *Aspergillus brasiliensis* A PARTIR DO
RESÍDUO DA HIDRODESTILAÇÃO DE *Aniba canelilla* E USO DO
EXTRATO ENZIMÁTICO NA DESCOLORAÇÃO DE CORANTES**

MANAUS

2019

NATÁLIA VANESSA MIRANDA MÁXIMO

**PRODUÇÃO DE LACASE POR *Aspergillus brasiliensis* A PARTIR DO
RESÍDUO DA HIDRODESTILAÇÃO DE *Aniba canelilla* E USO DO
EXTRATO ENZIMÁTICO NA DESCOLORAÇÃO DE CORANTES**

**Monografia apresentada ao Curso de Graduação
em Engenharia Química da Escola Superior de
Tecnologia da Universidade do Estado do Amazonas,
para obtenção do título de Bacharel em Engenharia
Química.**

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque

MANAUS

2019

NATÁLIA VANESSA MIRANDA MÁXIMO

**PRODUÇÃO DE LACASE POR *Aspergillus brasiliensis* A PARTIR DO
RESÍDUO DA HIDRODESTILAÇÃO DE *Aniba canelilla* E USO DO
EXTRATO ENZIMÁTICO NA DESCOLORAÇÃO DE CORANTES**

**Monografia de Conclusão de Curso para obtenção do título de Engenheiro, Habilitação em
Engenharia Química – Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Estado do
Amazonas**

Banca Examinadora:

.....
Profa. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque – UEA

.....
Prof. Dr. José Renato Pereira Cavallazzi – UFAM

.....
Profa. Dra. Érica Simplicio de Souza – UEA

Conceito: APROVADA

Manaus, 10 de junho de 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que esteve a frente de tudo em meus projetos.

E a todos os amigos e professores.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as vitórias conquistadas em minha jornada.

À minha mãe Ziomar Carvalho Miranda por todos os conselhos e motivações que me ajudaram a crescer e foram de extrema importância pra eu chegar onde cheguei.

Ao meu esposo Leomar Miranda da Costa que esteve sempre ao meu lado nos momentos difíceis e nos momentos de alegria que me fizeram perseverar a cada dia durante toda a minha graduação.

À minha irmã Nayara Andressa Miranda Máximo que me deu ânimo e apoio sempre que eu precisava para que eu não desistisse.

A minha orientadora Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque por toda a sua dedicação preciosa em transformar uma aluna simples de graduação em uma pesquisadora que ama o que faz.

Aos meus amigos Roseane Alves, Nelly Carmen, Rayssa Feitosa, Edson Queiroz, Ulysses Nobre, Allan Everton, Marinélio Gomes, Larissa Ipuchima, Juliana Rebeca, Truskliangela Lopes, Anne Caroline, Rodrigo Duarte, Milena Romão, Luziele Ferreira, Luciana Castro, Catarine Viana, Vanderleia Mateus e Gisella Pazuello que contribuíram no decorrer da graduação para que eu atingisse meus objetivos de forma descontraída. Meu muito obrigada.

À Sara Loyola e ao Lucas Falcão pela ajuda nos procedimentos do laboratório.

À MSc. Rosiane Matias e ao Dr. Rafael Lopes e Oliveira pela ajuda na coleta do material vegetal na Reserva Florestal Adolpho Ducke do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA).

À Juliana Dias pela ajuda em disponibilizar o corante Azul Brilhante.

À Nelly Carmen pela ajuda com a tradução do resumo.

À Escola superior de Tecnologia pelo espaço concedido para a execução do trabalho.

Aos membros da banca, Profª. Dra. Érica Simplício de Souza e Prof. Dr. José Renato Pereira Cavallazzi por terem aceitado o convite para contribuir com o presente trabalho.

RESUMO

Os resíduos florestais que frequentemente são despejados no meio ambiente podem ser reaproveitados para a obtenção de enzimas oxidativas, reduzindo-se assim seu impacto ambiental. Esses biocatalisadores podem ser empregados na indústria para a obtenção de diversos resultados como na degradação de efluentes despejados pela indústria têxtil que sem um cuidado adequado, prejudicam a vida animal e vegetal. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo produzir lacase a partir do fungo *Aspergillus brasiliensis* por meio do aproveitamento do resíduo da hidrodestilação de folhas e galhos da espécie *Aniba canelilla* (Lauraceae), para a utilização na descoloração de corantes utilizados na indústria têxtil. Para a obtenção do resíduo, foi realizada a hidrodestilação de folhas e galhos de *A. canelilla* (preciosa), utilizando um aparelho tipo Clevenger. Na sequência, o resíduo foi utilizado como substrato para o cultivo do fungo *A. brasiliensis* para a obtenção da lacase. Por meio do extrato enzimático obtido, realizou-se a descoloração de dois corantes sintéticos, o corante Azul Brilhante e o Índigo Carmim. As variáveis analisadas para a determinação das melhores condições de descoloração foram o pH, variando de 4,0 a 6,0; a temperatura, avaliada entre 30 e 40°C e a variação da concentração de corante, de 0,5 a 1%. As maiores porcentagens de descoloração foram de 7,0% para o corante Azul Brilhante e de 17,2% para o Índigo Carmim, obtidas em pH 4,0, temperatura de 40°C e 0,5% de concentração do corante. Com este estudo foi possível aproveitar um resíduo lignocelulósico para a obtenção de lacase fúngica, sendo que o extrato fúngico produzido mostrou-se promissor na descoloração de corantes utilizados na indústria têxtil, a qual é responsável por elevados índices de poluição ambiental.

Palavras-chave: enzima oxidativa, fermentação sólida, corantes têxteis.

ABSTRACT

The forest residues that are frequently dumped into the environment can be reused to obtain oxidative enzymes, reducing their environmental impact. These biocatalysts can be used in the industry to obtain various results such as the degradation of effluents dumped by the textile industry, which, without adequate care, have damaged animal and plant life. In this sense, the aim of this study was to produce laccase from the fungus *Aspergillus brasiliensis* using the hydrodistillation residue of leaves and branches of the species *Aniba canililla* (Lauraceae), for the use in the discoloration of dyes used in the textile industry. To obtain the residue, the hydrodistillation of leaves and branches of *A. canelilla* was carried out using a Clevenger apparatus. Subsequently, the residue was used as substrate for the cultivation of the fungus *A. brasiliensis* to obtain the laccase. By means of the enzymatic extract obtained, the discoloration of two synthetic dyes was carried out, the Brilliant Blue and Indigo Carmine dye. The variables analyzed for the determination of the best discoloration conditions were the pH, ranging from 4,0 and 6,0; the temperature, evaluated between 30 and 40°C; and the variation of dye concentration from 0,5 to 1,0%. The highest percentage of discoloration were 7,0% for Brilliant Blue and 17.2%, for Indigo Carmine, obtained at pH 4.0, 40°C and 0.5% of dye concentration. With this study it was possible to use a lignocellulosic residue to obtain fungal laccase, and the fungal extract showed promise in discoloration of dyes used in the textile industry, which is responsible for high rates of environmental pollution.

Keywords: oxidative enzymes, solid fermentation, textile dyes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química de um azo corante.....	16
Figura 2 – Interação de corantes reativos do tipo vinil sulfonato com a fibra têxtil.....	18
Figura 3 – Estrutura química do Azul Brilhante KN-R.....	19
Figura 4 – Estrutura química do corante Vermelho Congo.....	19
Figura 5 – Estrutura química do corante Crizoidina.....	20
Figura 6 – Estrutura química do corante Vermelho Ácido 74.....	20
Figura 7 – Estrutura química do corante Índigo.....	21
Figura 8 – Estrutura química do corante Índigo Carmim.....	21
Figura 9 – Exemplo da reação de corantes contendo grupo tiosulfato com íon sulfeto e subsequente formação dos corantes com pontes de dissulfeto.....	22
Figura 10 – Solubilização temporária do corante Vermelho de Ionamina KA por hidrólise.....	22
Figura 11 – Exemplo de tingimento da lã com o corante pré-metalizado cromo/corante 1:1 através do grupo amino como ligante e o centro metálico do corante.....	23
Figura 12 – Exemplo de corante fluorescente contendo o grupo triazina usado no branqueamento de algodão, poliamida, lã e papel.....	24
Figura 13 – Estrutura tridimensional da lacase de <i>Trametes versicolor</i>	28
Figura 14 – Estrutura química do 2,5-xilidina.....	29
Figura 15 – Estrutura química do Tween 80 (Polisorbato 80)	29
Figura 16 – Fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i>	31
Figura 17 – Fermentação sólida composta por resíduos de <i>Aniba canelilla</i>	36
Figura 18 – Diagrama de Pareto apresentando a influência das variáveis do planejamento experimental 2 ³ para a descoloração do corante Azul Brilhante.....	40
Figura 19 – Superfície de resposta da descoloração do corante Azul Brilhante em função do pH e da concentração de corante.....	41
Figura 20 – Superfície de resposta da descoloração do corante Azul Brilhante em função da temperatura e concentração de corante.....	42

Figura 21 – Superfície de resposta da descoloração do corante Azul Brilhante em função da temperatura e do pH.....	42
Figura 22 – Diagrama de Pareto apresentando a influência das variáveis do planejamento experimental 2^3 para a descoloração do corante Índigo Carmim.....	43
Figura 23 – Superfície de resposta da descoloração do corante Índigo Carmim em função da temperatura e do pH.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de substâncias usadas no tingimento pela indústria têxtil.....	17
Tabela 2 – Matriz do planejamento experimental 2^3 para a descoloração dos corantes Azul Brilhante e Índigo Carmim, mediada pelo extrato enzimático com atividade de lacase.....	35
Tabela 3 – Descoloração do corante Azul Brilhante mediada por extrato enzimático, a partir do planejamento experimental 2^3	38
Tabela 4 – Descoloração do corante Índigo Carmim mediada por extrato enzimático, a partir do planejamento experimental 2^3	38

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BDA	Batata-Ágar-Dextrose
CuSO ₄	Sulfato de Cobre II
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EST	Escola Superior de Tecnologia
FES	Fermentação em Estado Sólido
FeSO ₄	Sulfato de Ferro (II)
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
K ₂ HPO ₄	Hidrogenofosfato Dipotássico
KH ₂ PO ₄	Fosfato Monobásico de Potássio
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
MnSO ₄	Sulfato de manganês (II)
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
Tween 80	Polisorbato 80
U	Unidade de Atividade Enzimática
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
UV/VIS	Ultravioleta-Visível
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
ZnSO ₄	Sulfato de Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 CORANTES.....	16
2.2 CLASSIFICAÇÃO DOS CORANTES TÊXTEIS.....	17
2.2.1 Corantes Reativos.....	18
2.2.2 Corantes Diretos.....	19
2.2.3 Corantes Azóicos.....	20
2.2.4 Corantes Ácidos.....	20
2.2.5 Corantes à Cuba.....	21
2.2.6 Corantes de Enxofre.....	22
2.2.7 Corantes Dispersivos.....	22
2.2.8 Corantes Pré-Metalizados.....	23
2.2.9 Corantes Branqueadores.....	23
2.3 EFLUENTES TÊXTEIS.....	24
2.3.1 Biodegradação de Efluentes Têxteis.....	25
2.4 ENZIMAS.....	26
2.5 LACASE.....	27
2.5.1 Produção de Lacases.....	28
2.6 FUNGOS.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 MICRO-ORGANISMO.....	32
3.2 INÓCULO.....	32
3.3 MATERIAL VEGETAL.....	32
3.4 HIDRODESTILAÇÃO E OBTENÇÃO DO RESÍDUO SÓLIDO.....	32
3.5 PRODUÇÃO DA ENZIMA.....	33
3.6 EXTRAÇÃO DA ENZIMA.....	33
3.7 DOSAGEM DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	33
3.8 DESCOLORAÇÃO DOS CORANTES.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 OBTENÇÃO DE ENZIMA FÚNGICA.....	36

4.2 DESCOLORAÇÃO DOS CORANTES UTILIZANDO O EXTRATO ENZIMÁTICO.....	37
5 CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

O uso de resíduos florestais como a biomassa lignocelulósica para a obtenção de enzimas é um método eficiente para se obter esses metabólitos a um custo mais baixo. (MENEZES e BARRETO, 2015) Além disso, o uso dessa biomassa como fonte de carbono em bioprocessos em fase sólida reduz o volume de resíduos dispostos no meio ambiente. (COUTO e SANROMA, 2006; FORSTER-CARNEIRO et al., 2013)

Existem diversos resíduos florestais que podem ser utilizados em bioprocessos, como no caso das plantas da família Lauraceae que são amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Dentre suas espécies, encontram-se as aromáticas e produtoras de óleos voláteis, como a *Aniba rosaeodora* (pau rosa) e a *Aniba canelilla* (casca preciosa), utilizadas na produção de perfumes. (MARQUES, 2001)

Para obtenção dos óleos essenciais, utiliza-se a hidrodestilação, processo que gera resíduos sólidos (folhas, caules, troncos), geralmente descartados diretamente no meio ambiente, ou reutilizados pela própria indústria, na queima do mesmo, gerando energia. Porém, este resíduo pode ser destinado para outras finalidades, como, adubo agrícola ou suplementação em ração animal, ou ainda como substrato em bioprocessos, para o cultivo de micro-organismos e obtenção de enzimas e outros metabólitos de interesse. (FISCHBORN, 2013)

Entre os diversos ramos da biotecnologia, a produção de enzimas merece destaque, uma vez que sua aplicação na indústria é diversificada. Existem diversas fontes para a sua obtenção, como tecidos animais e vegetais, mas a grande variedade e fácil obtenção de bactérias, leveduras e fungos, em conjunto com as técnicas de cultivo, fazem com que as enzimas obtidas de micro-organismos se tornem mais viáveis e conseqüentemente mais utilizadas em processos industriais. (MONTEIRO e SILVA, 2009)

As enzimas fúngicas apresentam grande aplicabilidade industrial. O fungo *Aspergillus brasiliensis* pertencente à classe nigri (VARGA et al., 2007) apresenta potencial na obtenção de diversas enzimas, uma vez que apresenta estreita semelhança com o *A. niger*, fungo que apresenta grande eficiência na produção de diferentes enzimas, inclusive lacase, amplamente utilizado em processos fermentativos em escala industrial. (ROCHA, 2010)

A lacase é uma polifenoloxidase que pode ser obtida a partir de fungos, plantas e bactérias. (MCGUIRL e DOOLEY, 1999) É produzida por grande parte dos fungos de decomposição branca,

tais como *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata*, *Pycnoporus cinnabarinus*, entre outros. (GIL et al., 2009) Esta enzima catalisa a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, possuindo ampla aplicação na produção de etanol, remediação de solos e águas com contaminantes, bem como no clareamento e na degradação de corantes. (MOREIRA NETO, 2006; SEN et al., 2016)

A indústria têxtil é um grande consumidor de água e produz grandes volumes de efluentes contaminados. (SEN et al., 2016) O despejo de grandes volumes de efluentes industriais tem causado preocupação com o meio ambiente, pois este efluente causa a deterioração da água, possui também elevada coloração, prejudicando a vida das plantas aquáticas, impedindo sua fotossíntese e reprodução, e como consequência disso, a diminuição de oxigênio na água, limitando seu acesso aos peixes. (ORZECOWSKI et al., 2018)

A busca por processos com elevada eficiência e baixo custo para o tratamento de efluentes vem crescendo devido à exigência, tanto da legislação quanto dos consumidores, que buscam produtos ecologicamente corretos. De forma similar, as empresas procuram melhorar suas políticas ambientais com o intuito de obterem certificações de qualidade. (ODY, FERIS e HAROS, 2014) Dentre as formas de tratamento para efluentes têxteis se encontram os tratamentos físicos, químicos e biológicos. Os processos oxidativos avançados (POAs) vêm sendo investigados e se mostram promissores. (LIU e LI, 2010) As técnicas de descoloração com o uso de micro-organismos também podem ser utilizadas e bactérias e fungos vêm demonstrando resultados positivos quanto à versatilidade em degradar substâncias recalcitrantes. (SEN et al., 2016)

Na busca por métodos alternativos para o tratamento de efluentes, vem crescendo a procura pelo uso de enzimas microbianas na remoção de poluentes orgânicos, por conta do seu apelo ecológico. (SILVA e CORREA, 2011) Portanto, o presente trabalho tem por objetivo a produção de lacase a partir do fungo *Aspergillus brasiliensis*, aproveitando o resíduo da hidrodestilação de folhas e galhos da espécie *Aniba canelilla* (Lauraceae), e utilizar o extrato enzimático na descoloração de corantes. Os objetivos específicos são:

- Utilizar o resíduo da hidrodestilação de folhas e galhos de *Aniba canelilla* como substrato para o cultivo fúngico e consequente obtenção de um extrato enzimático com atividade da lacase;
- Utilizar o extrato enzimático na descoloração de corantes sintéticos utilizados na indústria têxtil, Azul Brillhante e Índigo Carmim;

- Avaliar a influência do pH, temperatura e concentração de corante na degradação enzimática.

2 REVISÃO DA LITERATURA

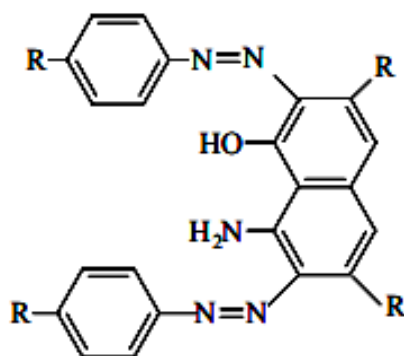
2.1 CORANTES

Até o século XIX, os corantes eram obtidos por meio de folhas, ramos, frutos ou flores de diversas plantas e de substâncias extraídas de animais. O corante sintético foi descoberto na Inglaterra em 1856 e, a partir de 1915, com o avanço da tecnologia, a Alemanha manteve o monopólio com respeito à produção de corantes sintéticos até a Segunda Guerra Mundial. (GUARATINI e ZANONI, 2000)

Os corantes sintéticos começaram a ser produzidos no Brasil após a Primeira Guerra Mundial. Contudo, a produção de corante está relacionada com o Brasil desde seu descobrimento, começando a partir do nome dado ao país, que está diretamente ligado à madeira “Pau-Brasil”, que possui um corante natural na cor vermelha. (GUARATINI e ZANONI, 2000)

Os componentes químicos principais que constituem o corante se dividem em dois, o grupo cromóforo, que é responsável pela cor que absorve a luz solar e o grupo funcional, que permite a fixação da cor nas fibras do tecido. (DURAN, MORAIS e FREIRE, 2000) Existem diversos grupos cromóforos, mas os mais representativos e largamente utilizados são os da família dos azo corantes, que constituem cerca de 60% do mercado mundial de corantes, sendo amplamente utilizados no tingimento da fibra têxtil. (VANDEVIVERE, BIANCHI e VERSTRATE, 1998; SEN et al., 2016) Observa-se na Figura 1 a estrutura química de um azo corante.

Figura 1 – Estrutura química de um azo corante.



Fonte: KUNZ et al. (2002).

Com respeito à saúde humana, dependendo do tempo de exposição, ingestão oral e sensibilidade das vias respiratórias ou da pele, os corantes sintéticos podem trazer riscos toxicológicos. (GUARATINI e ZANONI, 2000) Os azo corantes são compostos aromáticos e heterocíclicos, que contêm o grupo azo (N=N), são recalcitrantes e apresentam propriedades carcinogênicas, (SARATALE et al., 2011) contudo, são comumente utilizados nas indústrias de alimentos, farmacêutica, de papel, cosmética, de couro e têxtil. (SARATALE et al., 2013)

Além dos corantes, diversas substâncias são utilizadas no processo de tingimento. As substâncias mais utilizadas podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Exemplos de substâncias usadas no tingimento pela indústria têxtil.

Descrição	Composição	Função
Sais	Cloreto de sódio Sulfato de sódio	Retardante
Ácido	Acético e sulfúrico	Controle de pH
Base	Hidróxido de sódio Carbonato de sódio	Controle de pH
Sequestrantes	EDTA	Sequestrante
Dispersantes e surfactantes	Aniônico, catiônico e não aniônico	Amaciante, dispersante de corante
Agentes oxidantes	Peróxido de nitrogênio Nitrito de sódio	Insolubilizante de corante
Agentes redutores	Hidrossulfito de sódio	Remoção de corantes não reagidos
“Carriers”	Organoclorados	Aumenta a adsorção

Fonte: PERES e ABRAHÃO (1998).

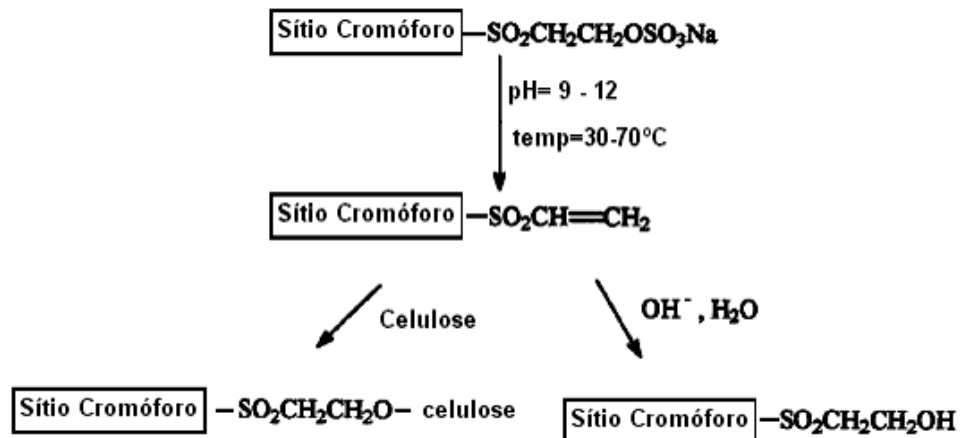
2.2 CLASSIFICAÇÃO DOS CORANTES TÊXTEIS

Os corantes utilizados na indústria têxtil podem ser classificados de acordo com sua estrutura química. Eles são divididos em reativos, ácidos, básicos, dispersos, azoicos, diretos, de cuba, de enxofre, pré-metalizados, branqueadores, entre outros. (VIEIRA, 2007)

2.2.1 Corantes Reativos

Esse tipo de corante possui como característica a elevada solubilidade em água e a capacidade de estabelecer ligações covalentes entre o corante e a fibra, onde a ligação confere uma estabilização na coloração do tecido tingido quando comparada aos demais corantes onde o processo de tingimento ocorre através de ligações de menor intensidade. Observa-se na Figura 2 a interação do corante com a fibra. (KUNZ et al., 2002)

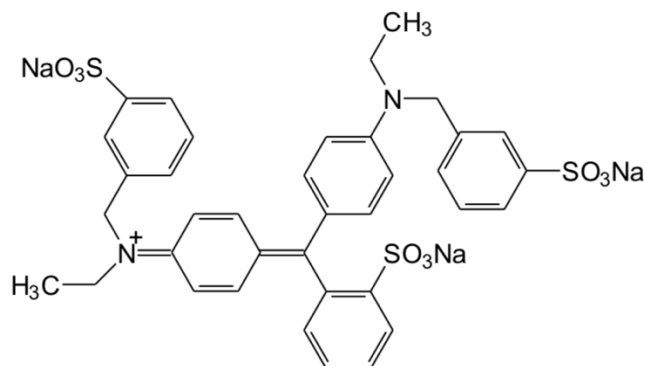
Figura 2 – Interação de corantes reativos do tipo vinil sulfonato com a fibra têxtil.



Fonte: KUNZ et al. (2002).

Um exemplo de corante reativo é o Azul Brilhante G (Figura 3), de massa molecular 854,04 g/mol, amplamente utilizado na indústria têxtil. (WERKA, 2009) Da mesma forma, o corante derivado Azul Brilhante KN-R vem sendo muito utilizado na indústria têxtil e poucas são as informações sobre sua degradação. (LIU e LI, 2010) Já o corante Azul Brilhante FCF pode ser encontrado nos mais variados produtos alimentícios consumidos no dia a dia, como por exemplo, sopas desidratadas, sorvetes, ervilhas enlatadas, bebidas engarrafadas, produtos que são aromatizados de framboesa azul, produtos laticínios, doces e bebidas. (OLIVEIRA et al., 2010)

Figura 3 – Estrutura química do corante Azul Brillante KN-R.

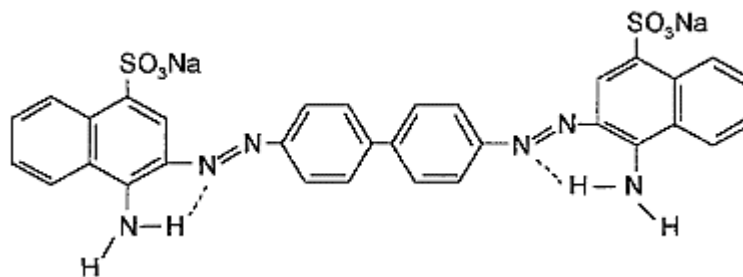


Fonte: WERKA, 2009.

2.2.2 Corantes Diretos

São corantes que possuem elevada solubilização em água com capacidade de tingir as fibras de celulose (algodão, viscose, etc.), por meio das interações de Van der Waals. Possuem mais de um grupo azo (díazo, triazo, etc.), ou são pré-transformados em complexos metálicos. Esses corantes têm por vantagem o alto grau de exaustão no decorrer da aplicação, tendo como consequência a diminuição do corante nas águas de rejeito. (VIEIRA, 2007) Um exemplo é o corante Vermelho Congo (Figura 4).

Figura 4 – Estrutura química do corante Vermelho Congo.

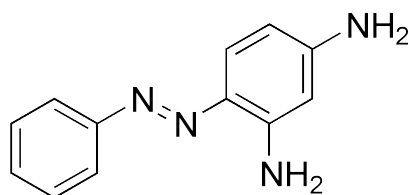


Fonte: SILVA et al. (2008).

2.2.3 Corantes Azóicos

É uma classe de compostos com elevada solubilização em água e que no decorrer do tingimento, são sintetizados sobre a fibra. Para esse processo a fibra é impregnada com um composto solúvel em água, chamado de agente de acoplamento, que apresenta elevada afinidade pela celulose. Quando adicionado um sal de diazônio, ocorre uma reação com o agente de acoplamento já fixado na fibra, produzindo um corante insolúvel em água. Um exemplo é o corante Crizoidina (Figura 5), o primeiro corante azóico comercializado. (VIEIRA, 2007)

Figura 5 – Estrutura química do corante Crizoidina.

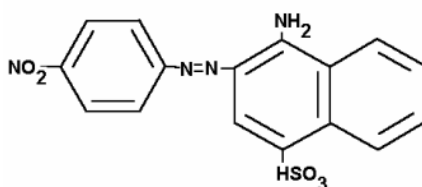


Fonte: VIEIRA (2007).

2.2.4 Corantes Ácidos

O termo ácido envolve um grupo de corantes aniônicos que possuem uma faixa de 1 a 3 grupos sulfônicos. Possuem elevada solubilização em água por conta dos grupos substituintes ionizáveis. Caracterizam-se pela presença de substâncias contendo estrutura química baseando-se em compostos azo, antraquinona, triarilmetano, azina, xanteno, ketonimina, nitro e nitroso, que demonstram altas faixas de coloração e grau de fixação. (VIEIRA, 2007) Como exemplo tem-se o corante Vermelho Ácido 74 (Figura 6).

Figura 6 – Estrutura química do corante Vermelho Ácido 74.

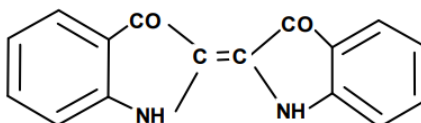


Fonte: GOMES (2000).

2.2.5 Corantes à Cuba

São conhecidos também como corantes tina e de redução e são praticamente insolúveis em água. Para torna-los solúveis, realiza-se a redução com ditionito, em solução alcalina. Com a oxidação do ar, o corante é regenerado à sua forma inicial na fibra. Sua aplicação está no tingimento do algodão. Como a produção de hidrossulfito de sódio tem causado problemas ao meio ambiente, o custo operacional para esta classe de corantes tem sido elevada. (VIEIRA, 2007) Como exemplo tem-se o corante Índigo (Figura 7).

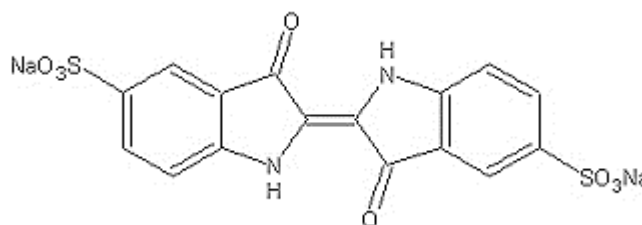
Figura 7 – Estrutura química do corante Índigo.



Fonte: GOMES (2000).

Um outro exemplo de corante à cuba são os chamados corantes indigóides, comumente usados na indústria têxtil, podendo ser utilizados também no setor industrial de papel, celulose e alimentícia. Este corante apresenta uma complexa estrutura molecular, o que os torna quimicamente mais estáveis e sua degradação se torna mais difícil. Normalmente usados em tratamentos de efluentes. (CHAVES, 2008) Dentre os corantes indigóides, se encontra o corante Índigo Carmim (Figura 8), muito usado na indústria alimentícia, na obtenção de cápsulas como um pigmento solúvel, utilizado também como corante de contraste para a mucosa colorretal para uma análise das lesões detectadas pela colonoscopia, no entanto, sua principal utilização ocorre nas indústrias têxteis. (LOPES, 2008)

Figura 8 – Estrutura química do corante Índigo Carmim.

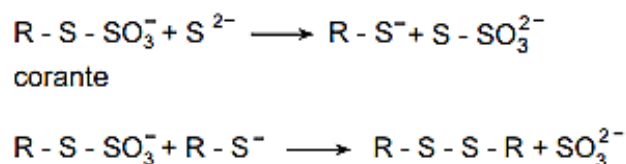


Fonte: PAVANELLI (2010).

2.2.6 Corantes de Enxofre

Esses corantes caracterizam-se pela formação de compostos macromoleculares com pontes de polissulfetos. Em princípio sua aplicação ocorre após a realização da pré-redução em banho de ditionito de sódio, que lhe confere a forma solúvel, e posteriormente são reoxidados subsequentemente sobre a fibra em contato com o ar. Entretanto, estes corantes usualmente apresentam resíduos tóxicos. (VIEIRA, 2007) Na Figura 9 pode-se observar um exemplo para esse tipo de corante.

Figura 9 – Exemplo da reação de corantes contendo grupo tiosulfato com íon sulfeto e subsequente formação dos corantes com pontes de dissulfeto.

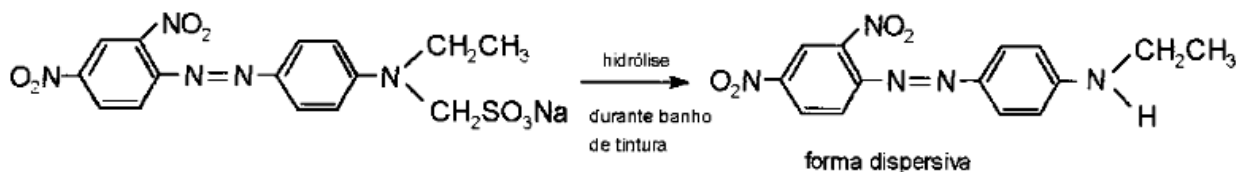


Fonte: GUARATINI e ZANONI (2000).

2.2.7 Corantes Dispersivos

Esta é uma classe de corantes insolúveis em água, aplicados em fibra de celulose e em outras fibras hidrofóbicas através de suspensão. No decorrer do processo de tingimento, o corante sofre hidrólise e a forma originalmente insolúvel é lentamente precipitada na forma dispersa sobre o substrato têxtil. Para sua aplicação são necessários agentes dispersantes. Esses corantes são utilizados para o tingimento de fibras sintéticas, como de celulose, poliacrilonitrila, nylon e polyester. (VIEIRA, 2007) Na Figura 10 observa-se a reação de hidrólise do corante de lonamina.

Figura 10 – Solubilização temporária do corante Vermelho de lonamina KA por hidrólise.

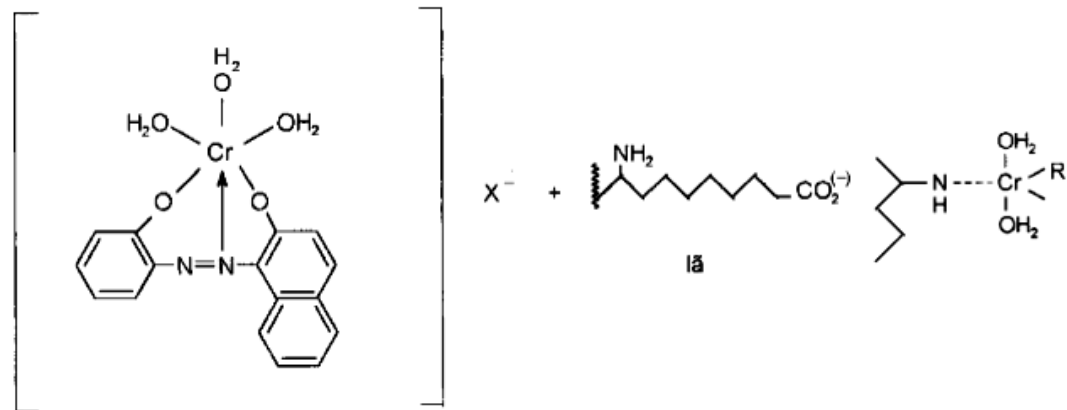


Fonte: GUARATINI e ZANONI (2000).

2.2.8 Corantes Pré-Metalizados

Estes corantes são utilizados no tingimento de fibras proteicas e poliamida. Caracterizam-se pela presença de um grupo hidroxila na posição orto em relação ao cromóforo azo, permitindo que se formem complexos com íons metálicos. Neste tipo de tingimento explora-se a capacidade de interação entre o metal e os grupamentos funcionais portadores de pares de elétrons livres, como aqueles presentes nas fibras proteicas. A desvantagem ecológica deste tipo de corante está associada ao elevado conteúdo de metal nas águas de rejeito. (GUARATINI e ZANONI, 2000) Exemplos mais comuns deste grupo são os complexos estáveis de cromo:corante (1:1), como pode ser visto na Figura 11.

Figura 11 – Exemplo de tingimento da lã com o corante pré-metálico cromo/corante 1:1 através do grupo amino como ligante e o centro metálico do corante.



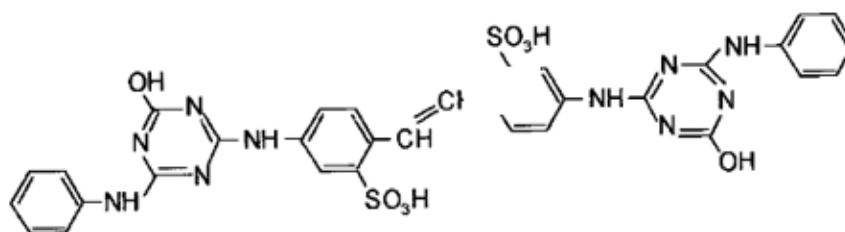
Fonte: GUARATINI e ZANONI (2000).

2.2.9 Corantes Branqueadores

As fibras têxteis no estado bruto, por serem compostas primariamente por materiais orgânicos, possuem aparência amarelada por absorver a luz principalmente na faixa de baixo comprimento de onda. A diminuição dessa tonalidade tem sido efetuada na indústria ou lavanderia pela oxidação da fibra com alvejantes químicos, ou utilizando-se os corantes brancos também chamados branqueadores ópticos ou branqueadores fluorescentes. (VIEIRA, 2007) Estes corantes apresentam grupos carboxílicos, azometino (-N=CH-) ou etilênicos (-CH=CH-) aliados a sistemas benzênicos, naftalênicos, pirênicos e anéis aromáticos que proporcionam reflexão por

fluorescência na região de 430 a 440 nm quando excitados por luz ultra-violeta. (GUARATINI e ZANONI, 2000) Na Figura 12 observa-se um exemplo de corante branqueador.

Figura 12 – Exemplo de corante fluorescente contendo o grupo triazina usado no branqueamento de algodão, poliamida, lã e papel.



Fonte: GUARATINI e ZANONI (2000).

2.3 EFLUENTES TÊXTEIS

A água residual das indústrias têxteis é uma das mais difíceis de serem tratadas e seu efluente com corantes possui principalmente moléculas orgânicas complexas solúveis em água, que podem ser tóxicas, mutagênicas ou carcinogênicas para diversos microrganismos e animais aquáticos. (JORENEK e ZAJONCOVA, 2015) Tem-se que em média, 15% da produção de corantes pelo mundo é perdida para o meio ambiente durante a sua síntese, processamento ou aplicação na indústria têxtil. Isso se dá pela fixação incompleta dos corantes no decorrer do tingimento das fibras. Além disso, a remoção da cor do banho de lavagem é difícil, tornando-se um problema para a indústria. (KUMARASAMY et al., 2007; SALLES, PELEGRINI e PELEGRINI, 2006)

A poluição do meio ambiente por conta da contaminação causada por efluentes têxtil é bastante conhecida. Devido à natureza dos corantes, pode-se detectá-los a olho nu. Essa característica pode ser extremamente prejudicial ao meio ambiente pois mesmo que fosse realizado o despejo de uma pequena quantidade de corante em efluentes aquáticos, poderia ser o suficiente para alterar a coloração dos rios o que resultaria em problemas estéticos, além da redução ou inibição da fotossíntese por plantas aquáticas. (GUARATINI e ZANONI, 2000; ALMEIDA, ASSALIN e ROSA, 2004)

A composição química do efluente pode ser variada, podendo possuir alta demanda química de oxigênio (DQO) e apresentar também em sua composição a presença de compostos recalcitrantes que podem ter relação com a toxicidade crônica e aguda. (GUARATINI e ZANONI, 2000; ALMEIDA, ASSALIN e ROSA, 2004) A DQO é utilizada para determinar o grau de poluição em um corpo de água residual e determinar o impacto causado por esses efluentes no meio ambiente. (ZUCCARI, GRANER e LEOPOLDO, 2005)

2.3.1 Biodegradação de Efluentes Têxteis

Os tratamentos de resíduos de corantes se dividem em físicos, químicos, físico-químicos e biológicos. Os tratamentos físicos envolvem os processos de sedimentação, filtração ou gradeamento, tratamento térmico, destilação, adsorção e resfriamento. Os tratamentos químicos envolvem a neutralização, a troca iônica, a oxidação, a redução e a catálise. Os tratamentos físico-químicos envolvem a coagulação ou floculação, a extração por solventes, a incineração, a osmose e a eletrólise. Já os tratamentos biológicos envolvem o tratamento aeróbico, o lodo ativado, o filtro biológico, a digestão anaeróbica e o tratamento com fungos. (VIEIRA, 2007)

Existem diversas preocupações com o meio ambiente, mas umas das preocupações mais emergentes está o não tratamento de efluentes que são resultantes da indústria de corantes e de processos que envolvam tingimento têxtil tornando o seu descarte em águas naturais bastante preocupante. (GUARATINI e ZANONI, 2000)

O cuidado e preocupação com a coloração da água têm se mostrado cada vez mais importante, e por conta disso, tem-se adotado diferentes técnicas para a remoção da coloração das águas causada por rejeitos. O avanço na elaboração de métodos para o tratamento de efluentes tem mostrado que a conscientização e rigidez das regras ambientais estão sendo aplicadas. Dentre as técnicas de descoloração de efluentes relatadas na literatura, se destacam os processos de adsorção, precipitação, degradação química, eletroquímica e fotoquímica, biodegradação com o uso de micro-organismos ou enzimas e muitos outros. (GUARATINI e ZANONI, 2000; ALMEIDA, ASSALIN, e ROSA, 2004; SALLES, PELEGRINI e PELEGRINI, 2006; KUNZ et al., 2002)

2.4 ENZIMAS

As enzimas são proteínas produzidas por todos os organismos vivos, consideradas catalisadores biológicos, cuja função é acelerar as reações químicas sem alterá-las. Dependendo das condições onde estejam inseridas, pode ocorrer sua desnaturação, como elevadas temperaturas, altas variações de pH, perdendo sua função. São importantes nos processos bioquímicos, agindo como séries organizadas, catalisando centenas de reações contínuas pelas quais as moléculas nutrientes são degradadas. (ELIAS et al., 2018) Esse catalisador natural, atua em diversos setores da indústria, como alimentícia, farmacêutica, têxtil e de papel e celulose. Podem ser obtidas de fontes vegetais ou animais, mas a busca por obtê-las a partir de fermentações de fontes microbianas vem crescendo a cada dia por ser possível a sua obtenção em maior escala e elevada pureza. (ARRUDA, 2017)

Além disso, para uma boa produção de enzima é necessário levar em consideração as condições de cultivo. Woiciechowski (2005) relata que ao produzir enzimas a partir de micro-organismos, pode-se obter uma atividade melhor, quando utilizamos esses micro-organismo em suas melhores condições de crescimento. As enzimas microbianas podem ser extracelulares (enzimas eliminadas ao meio) ou intracelulares (enzimas retidas no interior das células microbianas), sendo que a maioria das enzimas empregadas nas indústrias são enzimas extracelulares de origem microbiana.

Em diversos processos industriais é comum o uso de enzimas oxidativas para transformações que envolva lignina ou outros compostos aromáticos. Fungos da decomposição branca são bastante conhecidos pelas habilidades de produzir enzimas extracelulares oxidativas, como a manganês peroxidase, lignina peroxidase e lacase, que realizam o processo de despolimerização ligninolítica. Esta capacidade permite a sua aplicação em uma série de processos biotecnológicos, baseados na degradação das estruturas de diversos compostos aromáticos, (MIELGO et al., 2001) sendo que a presença de alguns metais pode influenciar a atividade das enzimas lignolíticas. (JOHANNES e MAJCHERCZYK, 2000)

2.5 LACASE

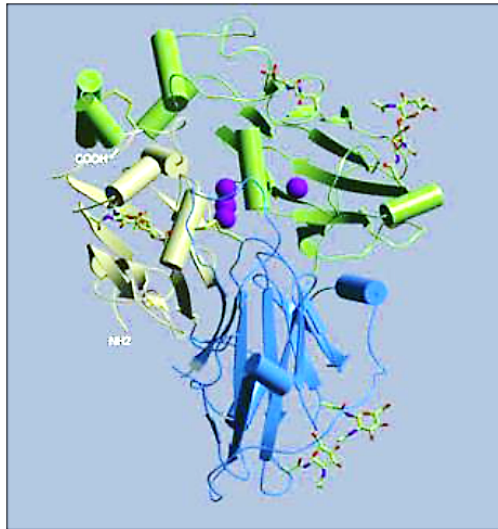
A descrição da enzima lacase foi realizada em 1883 por Yoshida, mas apenas em 1985 que Bertrand caracterizou essa enzima como uma oxidase contendo metal. (MAYER e STAPLES, 2002) Pode-se representar a lacase por dois grupos, as que são extraídas de plantas superiores e as que são obtidas por meio de fungos, sendo possível encontrá-la em insetos e procariontes. (RIVA, 2006)

A enzima lacase tem atuado sobre diversos doadores de hidrogênio aromático (LEONOWICZ et al., 2001) e atuado também em espécies inorgânicas como íons Mn^{+2} . (BOLLAG e LEOWICZ, 1984) Além disso essa enzima consegue desencadear a remoção de um elétron e um próton de grupos hidróxi-fenólicos ou amino-aromáticos formando seus respectivos radicais livres. Esta enzima não realiza somente a oxidação de ácidos fenólicos e metoxifenólicos, mas também os descarboxila e ataca seus grupos metoxila por meio de desmetilação ou desmetoxilação. (LEONOWICZ et al., 2001) No geral, a atuação dessa enzima está na oxidação do substrato por meio da abstração de um elétron de um composto fenólico onde resulta na geração de um radical fenoxila. (MAYER e STAPLES, 2002)

Pode-se determinar a família a qual uma enzima pertence baseando-se em sua espectroscopia característica, sequência homóloga e pela reatividade. A enzima lacase faz parte da família de cobre azul. Com respeito a estrutura, essa enzima é uma glicoproteína que possui uma heterogeneidade adicional por conta do conteúdo variável de hidratos de carbono e de cobre. Possui na faixa de 520-550 aminoácidos, seu peso varia de 60-80 kDa e é constituída de hidratos de carbono na faixa de 15-10%. (YAROPOLOV et al., 1994)

Dentre os fungos que possuem a capacidade de produzir a enzima lacase, se encontra o fungo de podridão branca *Trametes versicolor*. A estrutura tridimensional da lacase obtida desse fungo pode ser observada na Figura 13. Encontram-se quatro átomos de cobre presentes na estrutura das lacases obtidas por meio de fungos, e esses átomos são distribuídos em três sítios de ligação distintos, onde podem ser identificados pela densidade eletrônica. A coordenação do cobre é realizada por duas histidinas e uma cisteína, no qual é encontrada em um arranjo triangular plano. Os íons de cobre possuem elevada importância no mecanismo catalítico. (THURSTON, 1994)

Figura 13 - Estrutura tridimensional da lacase de *Trametes versicolor*.



Fonte: THURSTON (1994).

2.5.1 Produção de Lacases

Dentre os fatores que podem influenciar a produção de lacase, destacam-se o pH, a composição do meio, razão entre carbono/nitrogênio, aeração e temperatura de cultivo. Existem pesquisas que visam aprimorar as técnicas de produção dessa enzima, combinando diversos fatores que possam ter influência em sua obtenção. (IKEHATA, BUCHANAN e SMITH, 2004)

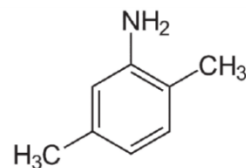
Existem diversos fatores que sem um controle adequado, podem comprometer a produção da lacase, como o tempo de cultivo, considerado crítico, pois vários fungos sintetizam essa enzima depois de 2 ou 3 dias de crescimento. (IKEHATA, BUCHANAN e SMITH, 2004) Outro fator crítico na produção desta enzima é a agitação do meio, que pode reprimir a produção de lacase, como observado para o fungo *Phlebia radiata*, onde a agitação diminuiu a produção da enzima. (PAAVOLA e ITAVAARA, 1990) Por outro lado, para o *Pycnopurus sanguineus*, se obtiveram os melhores resultados de produção de lacase com agitação do meio. (POINTING e VRIJMOED, 2000)

A quantidade de nitrogênio e carbono no meio de cultivo do fungo também é muito importante para a obtenção de lacase, sendo necessário conhecer o tipo de micro-organismo que se está trabalhando a fim de se determinar os valores ótimos. (POINTING e VRIJMOED, 2000)

Dong e colaboradores (2005) fizeram comparações de vários meios de cultura e condições de crescimento de micro-organismos e notaram que a agitação e a composição do meio de cultura influenciou na expressão gênica, apresentando diferentes padrões de isoenzimas de lacase. Logo, diferentes isoformas de lacase em diferentes condições de cultivo têm sido descritas para diversos fungos de podridão branca da madeira, como *T. villosa* que apresentou pelo menos três isoformas e *P. ostreatus* quatro isoformas. (LEONOWICZ et al., 2001) Pointing e Vrijmoed (2000) foram capazes de obter várias isoformas com respeito ao indutor inserido ao meio de cultivo de *P. sanguineus*. De modo semelhante, o padrão de produção de isoformas por *P. pulmonarius* foi diretamente influenciado pela composição do meio, em específico o carbono e a glicose, assim como a presença ou não de indutor. (SOUZA, TYCHANOWICZ e SOUZA, 2004)

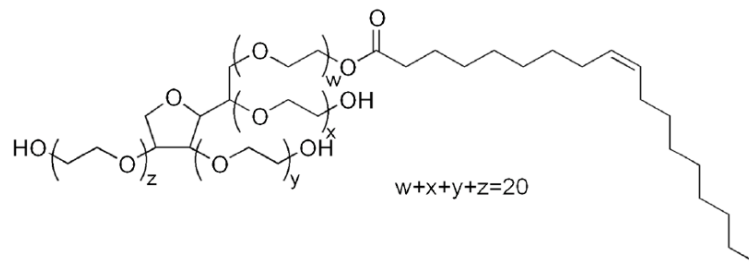
Pointing e Vrijmoed (2000) e Lomascolo e colaboradores (2002) realizaram a avaliação do efeito do Tween 80 (Polisorbato 80), um tensoativo, e de 2,5-xilidina na produção de lacase por diferentes linhagens do fungo *P. sanguineus*, informando que a 2,5-xilidina (Figura 14) é um bom indutor. O efeito estimulante da 2,5-xilidina foi descrito primeiramente por Fahraeus em 1958. (LEONOWICZ et al., 2001) Observa-se na Figura 14 a estrutura química da 2,5-xilidina e na Figura 15 a estrutura química do Tween 80.

Figura 14 - Estrutura química do 2,5 - xilidina.



Fonte: LEONOWICZ et al. (2001).

Figura 15 - Estrutura química do Tween 80 (Polisorbato 80).



Fonte: LOMASCOLO et al. (2002).

O Tween 80 é um surfactante solúvel ou dispersível em água, é constituído por moléculas anfífilas (uma parte polar e outra parte apolar). Este tensoativo é comumente utilizado na área de cosméticos, nas indústrias farmacêuticas e alimentícias. (GRIPPA et al., 2010) Para as membranas biológicas, o Tween 80 é considerado pouco tóxico e um bom estimulante para a secreção de enzimas lignolíticas. (SOUZA, TYCHANOWICZ e SOUZA, 2004)

2.6 FUNGOS

Os fungos são importantes na degradação de matéria orgânica, mas para que a degradação seja executada, é necessário que haja a fase vegetativa ou miceliana. Nas fases vegetativa e reprodutiva, a formação de biomassa depende da produção de enzimas extracelulares, que são fundamentais na degradação dos componentes dos substratos, principalmente da lignocelulose. (VELÁZQUEZ-CEDEÑO, MATA e SAVOIE, 2002)

Os fungos filamentosos são um grupo de micro-organismos secretores de enzimas que atuam na degradação de biomassa. São organismos eucarióticos e quimioheterotróficos, essenciais à biodiversidade, visto sua capacidade de proliferação em diversos ambientes. Suas condições de cultivo são relativamente fáceis de serem controladas, pois crescem onde há umidade e fonte de calor e carbono. (TREVISAN, SAID e PIETRO, 2004; SOUSA, 2017; BENASSI e ALMEIDA, 2018)

O uso de fungos filamentosos e seus metabólitos nos processos de biorremediação e tratamento de efluentes vêm crescendo, por conta do seu elevado potencial degradativo e biossorbitivo (metais pesados e corantes). (CONCEIÇÃO, 2005) Conseguem sobreviver em uma ampla faixa de pH, variando entre 1,5 e 11, (MINAMI, 2003) sendo os micro-organismos mais usados para a produção de enzimas por meio de bioprocessos em fase sólida. (AKHTER et al., 2011)

Dentre os fungos filamentosos existentes, se encontra o *Aspergillus brasiliensis* (Figura 16) pertencente à seção nigri. Segundo Varga e colaboradores (2007), esta espécie pode ser diferenciada de outros *Aspergillus* com base em regiões intergênicas transcritas, e nas sequências dos genes de β -tubulina e calmodulina. Apresenta pigmento melanínico (preto) e seus esporos se dispersam com facilidade no meio ambiente. Estudos com essa espécie referentes à produção

enzimática são bem mais escassos, quando comparados aos estudos com *Aspergillus niger*, espécie amplamente utilizada em fermentações industriais. (VARGA et al., 2007)

Dependendo das condições de cultivo, esta espécie é capaz de produzir diferentes enzimas oxidativas, tais como peroxidases e lacases. (FASANELLA, 2008)

Diferentes espécies de *Aspergillus* são capazes de utilizar corantes como substrato, transformando-os em compostos não tóxicos ou de baixa toxicidade, devido à produção de enzimas extracelulares. (EL-RAHIM, EL-ARDY e MOHAMMAD, 2009) O uso de fungos do gênero *Aspergillus* em reatores biológicos para mineralizar compostos de difícil degradação no tratamento de águas residuárias é uma alternativa viável e promissora, por conta dos bons resultados apresentados na degradação de corantes da indústria têxtil. (SILVA et al., 2010)

Figura 16 – Fungo *Aspergillus brasiliensis*.



Fonte: IKEHATA, BUCHANAN e SMITH (2004).

O uso desses fungos para a produção de lacase, por meio de fermentação no estado sólido, visando sua aplicação na degradação de corantes têxteis pode ser uma alternativa para diminuir a poluição causada pela indústria.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRO-ORGANISMO

Neste trabalho, foi utilizado o fungo *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, obtido comercialmente. O micro-organismo foi reativado em meio batata-ágar-dextrose (BDA) e mantido em incubadora BOD por 7 dias a 28°C. Posteriormente, foi utilizado na fermentação em estado sólido (FES) para a produção de lacase.

3.2 INÓCULO

Para a produção do inóculo, preparou-se uma suspensão de esporos a partir da placa cultivada com o fungo esporulado, preparando-se uma solução salina a 1%. Logo após a homogeneização da suspensão em agitador do tipo vortex, foi realizada a contagem de esporos, sendo adicionada uma gota da suspensão em Câmara de Neubauer. O número de células foi padronizado de modo a atingir a concentração de 1×10^8 esporos/mL. (MAXIMO et al., 2015)

3.3 MATERIAL VEGETAL

Foram coletados folhas e galhos da espécie *Aniba canelilla* na Reserva Florestal Adolpho Ducke do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA no mês de julho de 2018. Este material passou por uma secagem em estufa a 24°C por 10 dias, em seguida foi triturado em moinho de facas com tela de 3 mm, para posteriormente ser retirado o óleo essencial por hidrodestilação.

3.4 HIDRODESTILAÇÃO E OBTENÇÃO DO RESÍDUO SÓLIDO

A hidrodestilação foi realizada por meio do aparelho do tipo Clevenger, onde 100 g de resíduo sólido foram destilados com 1000 g de água destilada na temperatura de 100 °C por três horas e 30 minutos para folhas e seis horas para galhos, logo após os óleos foram separados do hidrolato por decantação. (CHAAR, 2000) O resíduo sólido obtido foi utilizado nos experimentos de FES.

3.5 PRODUÇÃO DA ENZIMA

A produção de lacase foi realizada por meio de FES, conforme condições utilizadas em trabalho realizado anteriormente. O substrato sólido utilizado foi o resíduo da hidrodestilação de folhas e galhos da espécie *Aniba canellila*, que passou por uma secagem em estufa a 70°C por 24 horas. Em um frasco Erlenmeyer foram adicionados 28 g do resíduo sólido seco, logo após, foram adicionados 100 mL de uma solução contendo 1 g de L-asparagina, 8 g de KH_2PO_4 , 0,01 g de CuSO_4 , 20 g de MgSO_4 e 0,05 g de Tween 80. Após autoclavagem a 1 atm e 121°C durante 20 minutos foi realizada a inoculação de 200 μL da suspensão de esporos. O cultivo foi mantido a 28°C por 14 dias em incubadora tipo BOD para a produção da lacase. O experimento foi realizado em triplicata. (MAXIMO et al., 2015)

3.6 EXTRAÇÃO DA ENZIMA

Conforme o trabalho de Barros (2012), após decorrido o tempo necessário para o crescimento do fungo, foram adicionados ao meio 80 mL de água deionizada autoclavada para facilitar a extração da enzima. Durante 2 minutos, o meio contendo água foi colocado no ultra-som e por 10 minutos sob agitação em incubadora tipo shaker. Em seguida, foi realizada uma filtração a vácuo, em funil de Büchner para separar o micélio do meio. Posteriormente, o extrato enzimático obtido foi utilizado para dosagem da atividade enzimática e na descoloração dos corantes.

3.7 DOSAGEM DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A dosagem foi realizada pelo método colorimétrico em espectrofotômetro UV/VIS. O aumento da absorbância em 530 nm em função da oxidação da seringaldazina foi relacionado ao aumento da atividade de lacase no extrato enzimático segundo a metodologia descrita por Ride (1980).

A mistura reativa utilizada na leitura em espectrofotômetro foi composta por 2200 μL de tampão fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), 100 mM, pH 6,5 (ajustado com NaOH 1,0 M); 500 μL do extrato enzimático e 300 μL de solução de seringaldazina (0,216 mM em metanol). Para

o branco da reação de oxidação foi realizado a substituição do extrato enzimático por água destilada.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de seringaldazina por minuto por mililitro de extrato enzimático. O cálculo da atividade enzimática foi realizado utilizando a Equação 1, no qual 0,001 representa a variação de absorvância por minuto por unidade de lacase e 0,5 representa o volume em mL, de extrato enzimático utilizado.

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{(Abs_{530}extrato - Abs_{530}branco) \times (df)}{(0,001) \times (0,5)} \quad (1)$$

3.8 DESCOLORAÇÃO DOS CORANTES

Os corantes utilizados foram o Azul Brilhante, cedido pela empresa Wild Amazon Flavors e o corante Índigo Carmim (VETEC). Para a degradação dos corantes foi realizado um estudo das variáveis pH, temperatura e concentração do corante, a partir de um planejamento experimental fatorial completo 2^3 , conforme a matriz apresentada na Tabela 2.

Realizou-se os experimentos adicionando 5 mL do extrato enzimático, 100 μL de água destilada e 50 μL de corante. A mistura reativa foi colocada em incubadora do tipo shaker durante 180 minutos a 30°C e agitação de 150 rpm. Após a reação, realizou-se a leitura da absorvância da mistura reacional em espectrofotômetro a 592 nm para o Azul Brilhante e 410 nm para o Índigo Carmim. (YAKUP et al., 2017; ALMEIDA et al., 2012)

A concentração residual do corante foi calculada a partir da absorvância medida de acordo com a Equação 2, onde % é a porcentagem de descoloração obtida, A_0 é a absorvância inicial e A é a absorvância final. (KUNAMNENI et al., 2008; SINIRLIOGLU, SINIRLIOGLU e AKBAS, 2013)

$$(\%) = \left[\frac{A_0 - A}{A_0} \right] \times 100 \quad (2)$$

A análise estatística dos dados experimentais foi realizada com o auxílio do software Statistica 10.0 com $p > 0,1$.

Tabela 2 - Matriz do planejamento experimental 2^3 para a descoloração dos corantes Azul Brillante e Índigo Carmim, mediada pelo extrato enzimático com atividade de lacase.

Experimento	Concentração de Corante (%)	pH	Temperatura (°C)
1	0,5 (-1)	4,0 (-1)	30 (-1)
2	1,0 (+1)	4,0 (-1)	30 (-1)
3	0,5 (-1)	6,0 (+1)	30 (-1)
4	1,0 (+1)	6,0 (+1)	30 (-1)
5	0,5 (-1)	4,0 (-1)	40 (+1)
6	1,0 (+1)	4,0 (-1)	40 (+1)
7	0,5 (-1)	6,0 (+1)	40 (+1)
8	1,0 (+1)	6,0 (+1)	40 (+1)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DE ENZIMA FÚNGICA

A Fermentação em estado sólido (FES) pode definir-se como o meio onde ocorre o crescimento microbiano sobre uma matriz sólida, com a presença de água livre em baixas quantidades. (PINTO et al., 2006) De acordo com Alves e colaboradores (2002) as condições de cultivo em meio sólido são mais parecidas com o habitat natural para os fungos filamentosos tornando mais rápido o seu crescimento e a excreção de enzimas, sendo por isso a FES escolhida para a produção de lacase no presente estudo.

Para a produção de lacase foram utilizadas quantidades fixas de nutrientes: KH_2PO_4 (80 g/L), L-asparagina (10 g/L), CuSO_4 (0,1 g/L), MgSO_4 (200 g/L) e Tween 80 (0,5 g/L); o material vegetal: resíduo da hidrodestilação de *Aniba canellila* (preciosa); e o fungo: *Aspergillus brasiliensis*. Este experimento foi realizado em triplicata, como mostra a Figura 17.

Figura 17 – Fermentação sólida composta por resíduos de *Aniba canellila*.



A partir da extração da enzima, determinou-se a atividade enzimática do experimento realizado em triplicata, onde o mesmo apresentou uma atividade média de 440,88 U/mL. Em estudo realizado anteriormente (MAXIMO et al., 2015), foram definidas as condições de cultivo utilizadas

no presente estudo, sendo observada uma atividade de lacase máxima de 553 U/mL. No presente estudo, contudo, não foi possível alcançar a mesma produção de lacase que a obtida anteriormente, e isso provavelmente se deve ao fato de que os resíduos de *A. canelilla* produzem substâncias conhecidas como 2-nitrofeniletano, linalol e cotoína, as quais possuem um efeito antifúngico para alguns fungos e estão presentes no óleo essencial da mesma. (GOTTLIEB e MORS, 1958; ARAUJO et al., 1971) Se considerarmos que a hidrodestilação por arraste de vapor não extraia 100% do óleo essencial, é possível que as substâncias consideradas antifúngicas estivessem presentes no resíduo utilizado no experimento de fermentação sólida, o que pode ter ocasionado a dificuldade de adaptação do fungo *A. brasiliensis* na produção da enzima.

Melo e colaboradores (2015), realizaram um estudo para verificar a capacidade do fungo *Aspergillus* sp para a produção da enzima lacase, utilizaram três diferentes meios de cultura, variando as fontes de nitrogênio e carbono, durante 120 horas, 150 rpm e 28°C. Ao final do experimento, obtiveram 300 U/mL de atividade enzimática nas melhores condições de cultivo em meio contendo glicose, KH_2PO_4 , ZnSO_4 , K_2HPO_4 , FeSO_4 , MnSO_4 e MgSO_4 , o que demonstra que os fungos desse gênero são bons produtores de enzimas oxidativas.

4.2 DESCOLORAÇÃO DOS CORANTES UTILIZANDO O EXTRATO ENZIMÁTICO

Para verificar o efeito das variáveis pH, temperatura e porcentagem de concentração de corante na degradação do Azul Brillante e do Índigo Carmim, foram realizados 8 experimentos em duplicata para cada corante, conforme a matriz do planejamento experimental (Tabela 2).

Os resultados obtidos para a descoloração dos corantes Azul Brillante e Índigo Carmim estão apresentados na Tabela 3 e na Tabela 4, respectivamente.

De acordo com a Tabela 3, o ensaio de número 5 foi o que apresentou a maior porcentagem de descoloração, de 7,0%, com temperatura de 40°C, pH 4,0 e 0,5% de concentração de corante, enquanto no ensaio de número 8 não houve descoloração.

Tabela 3 – Descoloração do corante Azul Brillhante mediada por extrato enzimático, a partir do planejamento experimental 2³.

Ensaio	Corante (%)	pH	T (°C)	Absorbância inicial*	Absorbância final*	Descoloração (%)
1	-1	-1	-1	0,429 ± 0,01	0,418 ± 0,003	2,6
2	1	-1	-1	0,705 ± 0,01	0,675 ± 0,02	4,3
3	-1	1	-1	0,269 ± 0,001	0,262 ± 0,003	2,6
4	1	1	-1	0,393 ± 0,01	0,391 ± 0,01	0,5
5	-1	-1	1	0,445 ± 0,03	0,414 ± 0,03	7,0
6	1	-1	1	0,707 ± 0,01	0,69 ± 0,003	2,4
7	-1	1	1	0,267 ± 0,01	0,261 ± 0,01	2,3
8	1	1	1	0,396 ± 0,01	0,396 ± 0,01	0

*Valores médios da duplicata ± desvio padrão

Tabela 4 – Descoloração do corante Índigo Carmim mediado por extrato enzimático, a partir do planejamento experimental 2³.

Ensaio	Corante (%)	pH	T (°C)	Absorbância inicial *	Absorbância final *	Descoloração (%)
1	-1	-1	-1	0,759 ± 0,03	0,744 ± 0,04	2,0
2	1	-1	-1	0,975 ± 0,07	0,963 ± 0,07	1,2
3	-1	1	-1	1,041 ± 0,01	1,035 ± 0,004	0,6
4	1	1	-1	1,062 ± 0,05	1,014 ± 0,04	4,5
5	-1	-1	1	0,906 ± 0,01	0,75 ± 0,01	17,2
6	1	-1	1	0,984 ± 0,02	0,909 ± 0,07	7,6
7	-1	1	1	1,023 ± 0,004	1,02 ± 0,01	0,3
8	1	1	1	1,221 ± 0,15	1,338 ± 0,44	-9,6

*Valores médios da duplicata ± desvio padrão

Pode-se observar na Tabela 4, que o ensaio de número 5 foi o que apresentou a maior porcentagem de descoloração, de 17,2%, com temperatura de 40°C, pH 4,0 e 0,5% de concentração de corante, enquanto no ensaio 8 não ocorreu degradação do corante. Verifica-se que as mesmas condições experimentais favoreceram a descoloração dos dois corantes avaliados.

Para os dois corantes, a remoção de cor não mostrou-se efetiva em pH 6,0. O melhor valor de pH para a descoloração de ambos os corantes foi o 4,0 pois nessa condição obteve-se a maior eficiência de remoção de cor no tempo de reação fixado. Zeng e colaboradores (2011), realizaram a degradação do Azul Brillhante de Remazol, do Ácido Azul 129 e do Preto Reativo 5 utilizando a enzima lacase para os testes de descoloração. Os maiores valores obtidos pelos autores foram

observados em pH que variaram de 4,0 a 5,0, o que coincide com os resultados obtidos no presente trabalho.

Zhao e colaboradores (2011) avaliaram a descoloração dos corantes Alizarina Vermelha e Índigo Azul, utilizando a enzima lacase, em pH 3,5 e temperatura de 40°C. Os autores observaram que ao utilizarem a enzima lacase na descoloração dos corantes, foi obtido 12% de descoloração do corante Índigo Azul e de 8% do corante Alizarina Vermelha, valores estes que se aproximam dos obtidos na descoloração do Azul Brillante e Índigo Carmim no presente estudo.

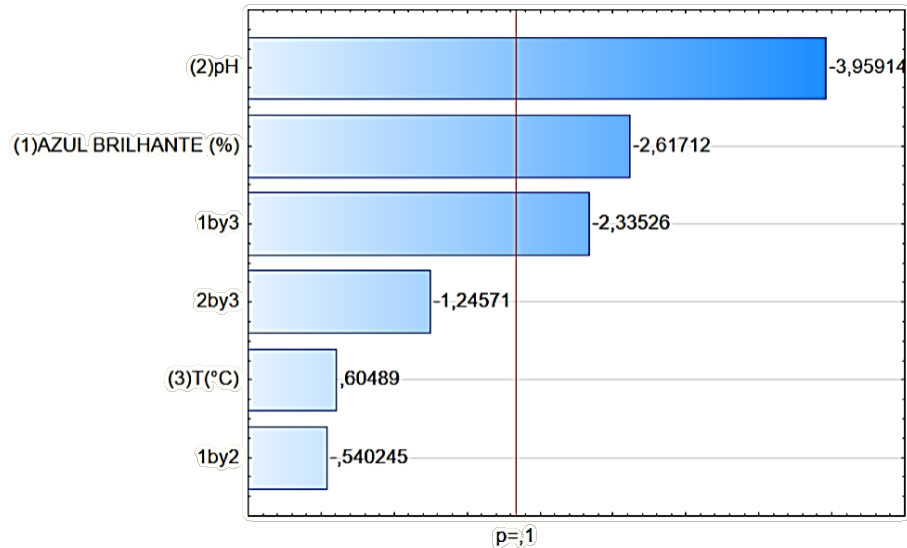
Pode-se observar na Tabela 4 (ensaio 8) que a absorvância apresentou um aumento no seu valor após decorrido o tempo definido para a descoloração, o que não era esperado. De acordo com Pearce, Lloyd e Guthrie (2003), esse aumento pode ter sido decorrente do fenômeno da bioadsorção, onde a princípio uma parte do corante é adsorvido pela biomassa. A bioadsorção é com frequência a primeira etapa da biodegradação do corante.

Comparando os resultados obtidos para ambos os corantes, o que apresentou um maior percentual de remoção considerando o mesmo tempo de tratamento, foi o corante Índigo Carmim. Isso demonstra que provavelmente a enzima lacase possui uma maior afinidade pelo Índigo Carmim, que pelo Azul Brillante.

Para ambos os corantes a temperatura mais elevada (40°C), favoreceu uma maior porcentagem de remoção dos corantes. Um estudo realizado por Carneiro e colaboradores (2011), demonstrou que a temperatura considerada ótima para a atuação da enzima lacase é de 50°C. Esse dado reforça o motivo do experimento apresentar um resultado melhor em 40°C que em 30°C.

A partir da análise estatística, foram obtidos os valores dos efeitos de cada parâmetro estudado (temperatura, pH e concentração de corante) sobre a descoloração dos corantes. O Diagrama de Pareto apresenta de forma rápida e clara os efeitos que são estatisticamente significativos. O resultado do planejamento experimental 2^3 para a porcentagem de descoloração do corante Azul Brillante pode ser observado no Diagrama de Pareto ($p < 0,1$) apresentado na Figura 18.

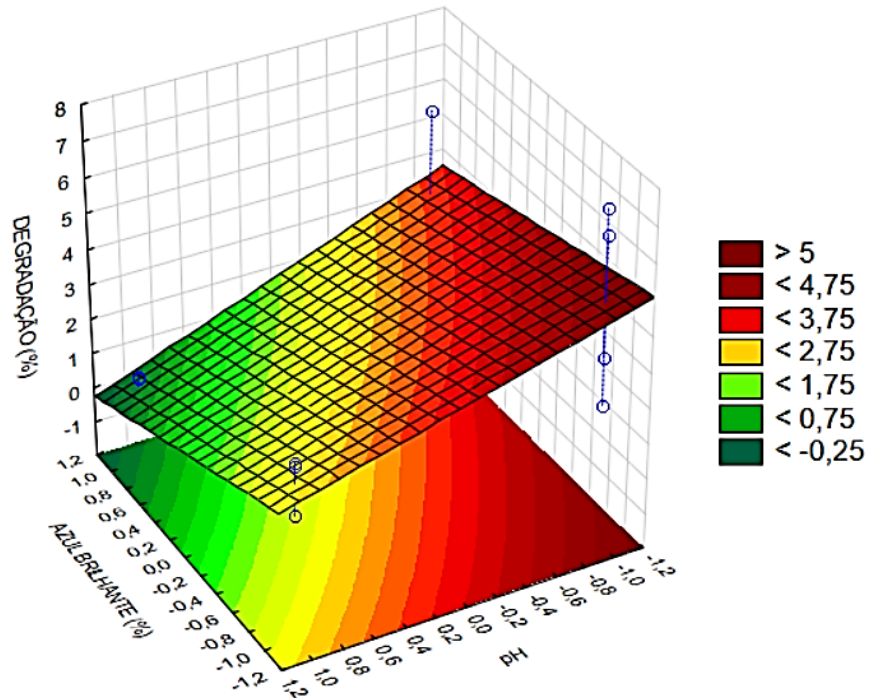
Figura 18 – Diagrama de Pareto apresentando a influência das variáveis do planejamento experimental 2^3 para a descoloração do corante Azul Brilhante.



De acordo com a Figura 18, para a descoloração do Azul Brilhante, os efeitos pH, concentração de corante e a interação entre o pH e temperatura influenciaram significativamente na descoloração do corante. O efeito do pH foi negativo, ou seja, baixos valores de pH aumentaram a descoloração. O mesmo tipo de efeito pode ser observado para a diminuição da concentração de corante. O efeito da interação entre o pH e a temperatura foi negativo, isso significa que quando valores desses dois fatores são aumentados simultaneamente no meio de tratamento, a porcentagem de descoloração diminui.

Na execução do planejamento experimental 2^3 , que propôs realizar uma triagem das variáveis estatisticamente significativas para a descoloração do corante Azul Brilhante, foi possível avaliar graficamente o efeito das variáveis sobre a descoloração por meio da análise das superfícies de resposta. Para uma melhor análise dos fatores que influenciaram na descoloração do corante Azul Brilhante, foram obtidos os gráficos das superfícies de resposta em função do pH e da concentração de corante (Figura 19), temperatura e concentração de corante (Figura 20), temperatura e pH (Figura 21).

Figura 19 - Superfície de resposta da descoloração do corante Azul Brillante em função do pH e da concentração de corante.



Observando-se o gráfico de superfície de resposta na Figura 19 para o corante azul brilhante, é possível verificar que para que haja uma maior degradação da cor do corante, é necessário utilizar os valores de pH e concentração de corante em valores mais baixos.

Analisando o gráfico da superfície de resposta (Figura 20) para o Azul Brillante é possível observar que para que ocorra uma maior degradação do corante, é necessário que haja uma temperatura mais elevada, e concentração de corante não interfere na degradação.

Observando-se a superfície de resposta em função da temperatura e pH (Figura 21), pode-se verificar que para que ocorra uma elevada degradação, é necessário aumentar a temperatura e diminuir o pH. Ao compararmos a correlação de temperatura e pH no gráfico presente na Figura 20, verifica-se que a variação na temperatura não promove alteração significativa na descoloração.

Figura 20 - Superfície de resposta da descoloração do corante Azul Brilhante em função da temperatura e concentração de corante.

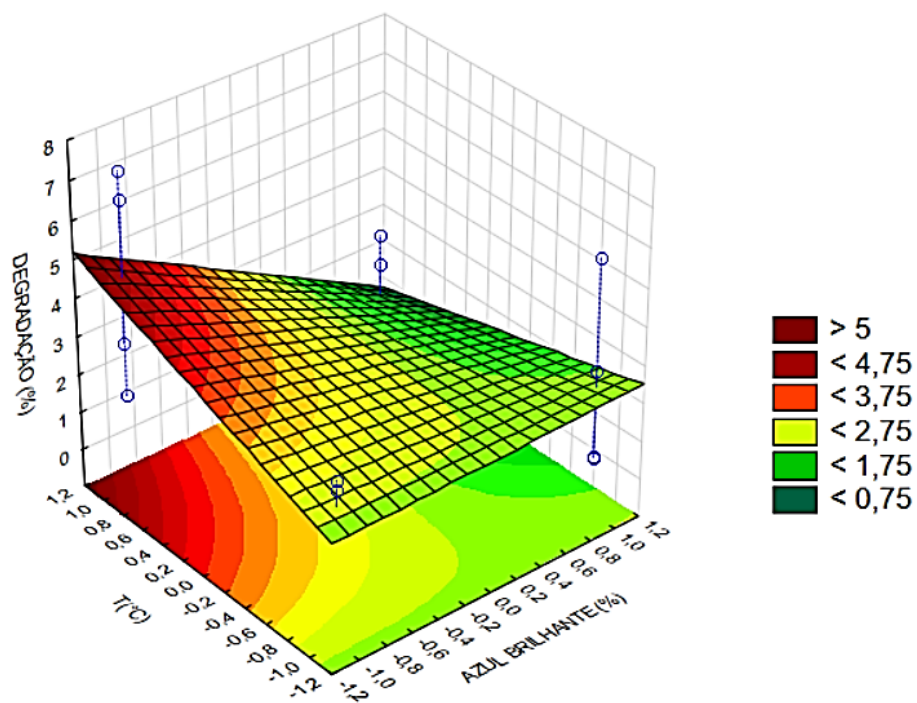
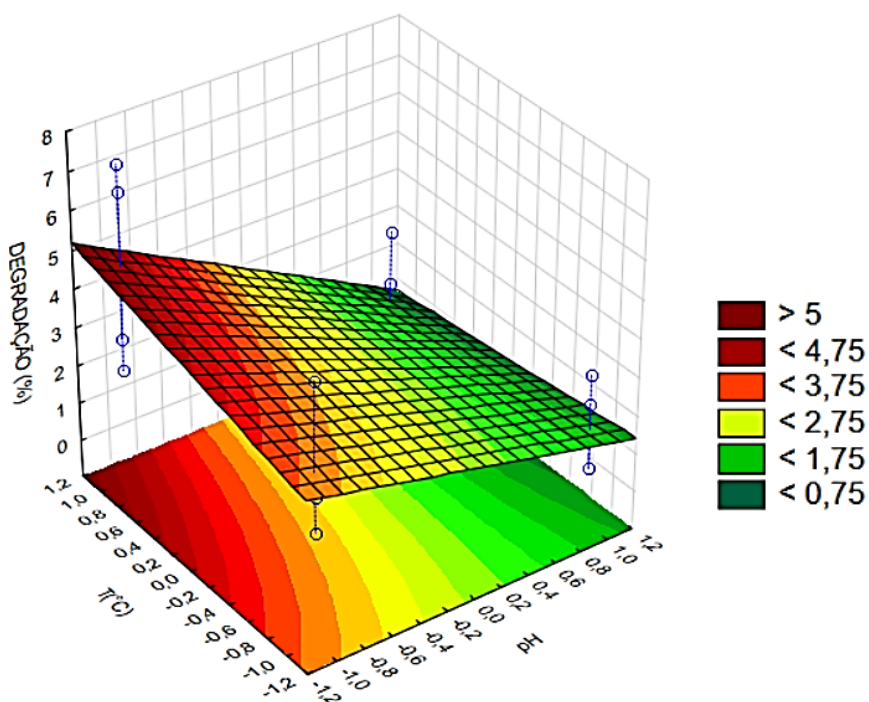


Figura 21 - Superfície de resposta da descoloração do corante Azul Brilhante em função da temperatura e do pH.



Para o corante Índigo Carmim, seguiu-se os mesmos procedimentos de análise estatística realizada para o corante Azul Brillante. A partir da análise, foram obtidos os valores dos efeitos de cada parâmetro estudado (temperatura, pH e concentração de corante) sobre a descoloração do Índigo Carmim. Obteve-se o Diagrama de Pareto ($p < 0,1$) para a análise dos fatores estatisticamente importantes na obtenção de uma boa degradação do corante. O resultado do planejamento experimental 2^3 para a porcentagem de descoloração do corante Índigo Carmim com 90% de confiança para a descoloração, como mostra a Figura 22.

Analisando o Diagrama de Pareto (Figura 22) para a descoloração do corante Índigo Carmim, pode-se afirmar que somente o pH e a interação entre pH e temperatura influenciaram de forma estatisticamente significativa a descoloração do corante, onde valores mínimos de pH favorecem a descoloração, bem como a diminuição simultânea de pH e temperatura tende a aumentar a descoloração. Os efeitos da temperatura e concentração de corante aparecem na sequência do Diagrama, e não apresentaram nenhuma significância estatística para o nível de confiança de 90%. Logo, para o corante Índigo Carmim, obteve-se somente a superfície de resposta em função da temperatura e do pH como se observa na Figura 23.

Figura 22 – Diagrama de Pareto apresentando a influência das variáveis do planejamento experimental 2^3 para a descoloração do corante Índigo Carmim.

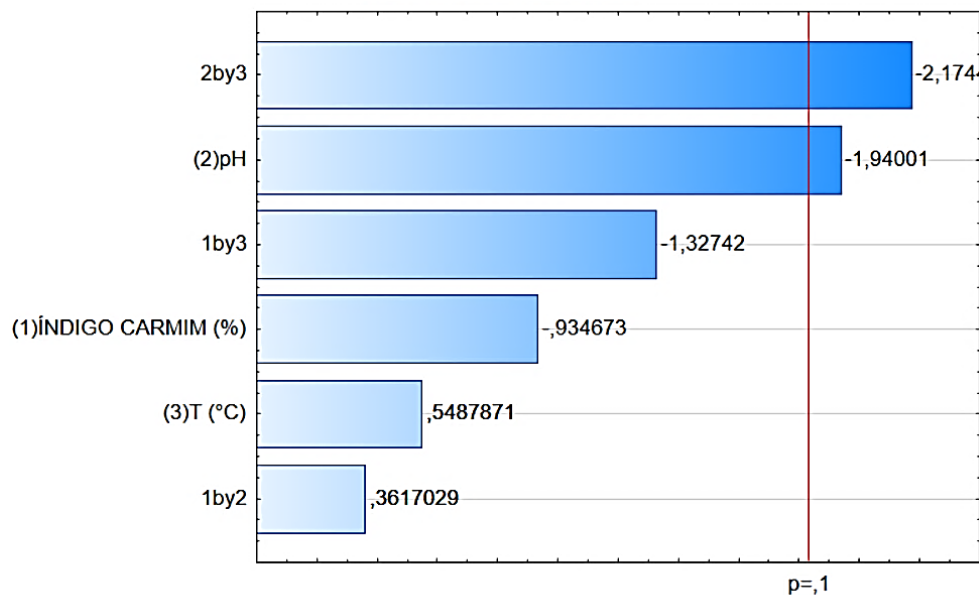
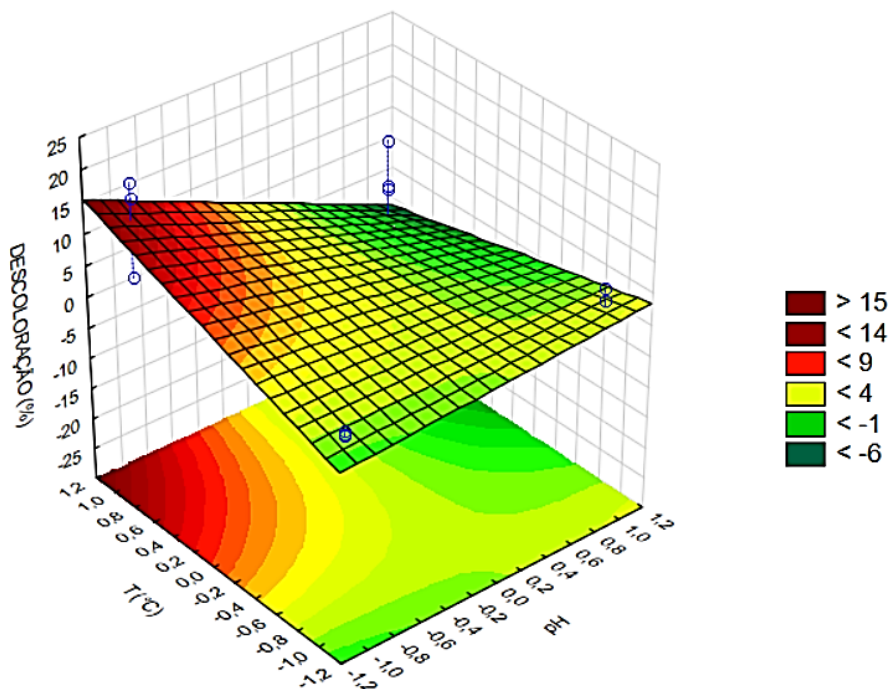


Figura 23 - Superfície de resposta da descoloração do corante Índigo Carmim em função da temperatura e do pH.



Como mostra a superfície de resposta da Figura 23, para uma maior descoloração do corante Índigo Carmim, é necessário que haja uma maior temperatura e menor pH na realização do experimento, só assim se garantirá uma boa descoloração.

5 CONCLUSÕES

O resíduo de preciosa, obtido a partir da hidrodestilação de galhos e folhas, mostrou-se como um substrato interessante para o cultivo do fungo *Aspergillus brasiliensis* em fermentação sólida, para produção da enzima lacase. O aproveitamento deste resíduo para a obtenção de um produto de alto valor agregado, como as enzimas, pode contribuir para a redução do impacto ambiental causado pelo despejo deste material.

Foi possível utilizar o extrato enzimático contendo lacase, na degradação de dois tipos de corantes utilizados na indústria têxtil (Azul Brilhante e Índigo Carmim). As variáveis que se mostraram estatisticamente significativas para a degradação do corante Azul Brilhante foram pH, concentração de corante e interação entre a concentração de corante e a temperatura; para o corante Índigo Carmim, as variáveis significativas foram pH e interação entre o pH e a temperatura. As melhores condições para a degradação de ambos os corantes é pH 4,0, temperatura 40°C e concentração de corante de 0,5%.

A partir dos resultados obtidos para a degradação dos corantes Azul Brilhante e Índigo Carmim, verifica-se que a lacase presente no extrato enzimático produzido pelo fungo *Aspergillus brasiliensis* apresenta potencial para ser utilizada na degradação de corantes utilizados na indústria têxtil. Contudo, mais experimentos devem ser realizados, a fim de se aumentar a percentagem de descoloração.

REFERÊNCIAS

- AKHTER, N.; MORSHED, M. A.; UDDIN, A.; BEGUM, F.; SULTAN, T.; AZAD, A. K. Production of pectinase by *Aspergillus niger* cultured in solid state media. **International Journal of Biosciences**, v. 1, n. 1, p. 33-42, 2011.
- ALMEIDA, D. G.; SILVA, M. G. C.; MIRANDA, R. C. M.; MACIEL, C. C. S.; GUSMÃO, N. B. Descoloração do corante Índigo Carmim e produção de lacase por fungos filamentosos. **Scientia Plena**, v. 8, n. 5, p. 3, 2012.
- ALMEIDA, E.; ASSALIN, M. R.; ROSA, M. A. Tratamentos de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v. 27, p. 818-824, 2004.
- ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor* ssp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 325-330, 2002.
- ARAÚJO, V. C.; CORRÊA, G. C.; MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L.; GOTTLIEB, O. R.; MARX, M. C.; MAGALHÃES, M. T. Óleos essenciais da Amazônia contendo linalol. **Acta Amazonica**, v. 1, p. 44-47, 1971.
- ARRUDA, H. J. **Produção industrial de enzimas e aplicações no processo cervejeiro: uma revisão da literatura**. 7º Congresso Brasileiro de Engenharia de Produção, Ponta Grossa, 2017.
- BARROS, A. C. **Estudo da produção de lacase fúngica por fermentação em estado sólido e fermentação submersa**. Monografia (Graduação) – Graduação em Engenharia Química, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM. 2012.
- BENASSI, V. M.; ALMEIDA, A. Prospecção de fungos filamentosos termotolerantes e termofílicos de distintos materiais coletados no estado de Minas Gerais e análise de potenciais produtores de amilases. **Revista Unimontes Científica**, v. 20, n. 1, p.150-169, 2018.
- BOLLAG, J. M.; LEONOWICZ, A. Comparative studies of extracellular fungal laccases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 849-854, 1984.
- CARNEIRO, J. L. G.; NETO, A. G.; VASCONCELLOS-NETO, J. R. T.; MITOSHIKAMIDA, H. **Otimização de enzimas ligninolíticas produzidas pelo fungo *Fomitella supina***. Universidade Estadual de Feira de Santana. 2011
- CHAAR, J. S. **Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba dukei* Kostermans**. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos, 2000. 125p.
- CHAVES, K. O. Adsorção de Índigo Carmim em biomassas mortas de *Aspergillus niger*. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 13, n. 4, p. 351-355, 2008.

CONCEIÇÃO, D. M.; ANGELIS, D. A. BIDOIA, E. D; ANGELIS, D. F. Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 1, p. 99-106, 2005.

COUTO, S. R.; SANROMA, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2006.

DONG, P.; LOH, M.; MONDRY, A. The impact factor revisited. **Biomedical Digital Libraries**, v. 2, p. 7-15, 2005.

DURAN, N.; MORAIS, S. G.; FREIRE, R. S. Degradation and toxicity reduction of textile effluent by combined photocatalytic and ozonation processes. **Chemosphere**, v. 40, p. 369-373, 2000.

EL-RAHIM, W. M. A.; EL-ARDY, O. A. M.; MOHAMMAD, F. H. A.; The effect of pH on bioremediation potential for the removal of direct violet textile dye by *Aspergillus niger*. **Desalination**, v. 249, p. 1206-1211, 2009.

ELIAS, A. M.; MOREIRA NETO, S. L.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A. M. F. Produção de enzimas oxidativas em substratos lignocelulósicos e aplicação na deslignificação de polpas celulósicas. **Biotecnologia Aplicada à Agroindústria**, v. 4, p. 569-600, 2018.

FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas lignolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente.** (Dissertação) Mestrado em Agronomia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008

FISCHBORN, A. C. **Aproveitamento do resíduo sólido da hidrodestilação de *Aniba parviflora* (Meissn) Mez e *Aniba rosaeodora* Ducke (Lauraceae): obtenção de enzimas fúngicas.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2013.

FORSTER-CARNEIRO, T.; BERNI, M. D.; DORILEO I. L.; ROSTAGNO, M. A. Biorefinery study of availability of agriculture residues and wastes for integrated biorefineries in Brazil. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 77, p. 78-88, 2013.

GIL, E. S.; MULLER, L.; SANTIAGO, M. F.; GARCIA, T. A. Biosensor based on brut extract from laccase (*Pycnoporus sanguineus*) for environmental analysis of phenolic compounds. **Portugaliae Electrochimica Acta**, v. 27, n. 3, p. 215-225, 2009.

GOMES, J. I. N. R. **Química da cor e dos corantes.** Monografia (Graduação) – Graduação em Química, São Paulo, SP. 2000.

GOTTLIEB, O. R.; MORS, W. B. **A química do pau-rosa.** Boletim do Instituto de Química Agrícola, Rio de Janeiro, v.53, p. 7-20, 1958.

GRIPPA, G. A.; MOROZESK, M.; NATI, N; MATSUMOTO, S. T. Estudo genotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 23, n. 1-2, p. 11-16, 2010.

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

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I. D.; SMITH, D. W. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v. 3, n. 1, p. 1-19, 2004.

JOHANNES, C.; MAJCHERCZYK, A. Laccase activity tests and laccase inhibitors. **Journal of Biotechnology**, v. 78, p. 193-199, 2000

JORENEK, M.; ZAJONCOVA, L. Immobilization of laccase on magnetic carriers and its use in decolorization of dyes. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 29, p. 457-466, 2015.

KUMARASAMY, M.; HYUN N.; YOUNG, M. K.; YOON, S. C. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1662-1672, 2007.

KUNAMNENI, A.; GHAZI, I.; CAMARERO, S.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F.J.; ALCALDE, M. Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 169-178, 2008.

KUNZ, A.; PERALTA Z. P.; MORAES, S.; DURAN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, p. 78-82, 2002.

LEONOWICZ, A.; CHO, N.; LUTEREK, J.; WILKOLAZKA, A.; WOJTAS – WASILEWSKA, M.; MATUSZEWSKA, A.; HOFRICHTER, M.; WESENBERG, D.; ROGALSKI, J. Fungal laccase: properties and activity on lignina. **Journal of Basic Microbiology**, v. 41, n. 3-4, p.185-227, 2001.

LIU, J. L.; LI, X. Y. Biodegradation and biotransformation of wastewater organics as precursors of disinfection by products in water **Chemosphere**, v. 81, n. 9, p. 1075-1083, 2010.

LOMASCOLO, A.; CAYOL, J. L.; ROCHE, M.; GUO, L.; ROBERT, J. L.; RECORD, E.; LESAGE-MEESSEN, L.; OLLIVIER, B.; SIGOILLOT, J. C.; ASTHERR, M. Molecular clustering of *Pycnoporus* strains from various geographic origins and isolation of monocaryotic strains for laccase hyperproduction. **Mycology Research**, v. 106, n. 10, p. 1193-1203, 2002.

LOPES, R. P. **Estudo de processos alternativos para a degradação de compostos de relevância ambiental com monitoramento dos produtos formados por Espectrometria de Massas com Fonte de Ionização Electrospray (ESI-MS)**. Dissertação (Mestrado em Química – Química Analítica) – Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química, Belo Horizonte, 2008.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.

MAXIMO, N. V. M.; FISCHBORN, A. C.; DUVOISIN JR, S.; ALBUQUERQUE, P. M. Produção de lacase fúngica em meio sólido utilizando resíduos florestais como substrato. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 701-708, 2015.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Review – laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, p. 551-565, 2002.

MCGUIRL, M. A.; DOOLEY, D. M. Copper-containing oxidases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 3, p. 138-144, 1999.

MELO, T. L., LUNA, M. A. C., SILVA, L. A. D. O., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Avaliação do potencial de amostras de *Aspergillus ssp* isoladas da caatinga para produção de lacase. **E-Xacta**, v. 8, n. 1, p. 67-75, 2015.

MENEZES, C. R.; BARRETO, A. R. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. **Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas**, v. 19, n. 2, p. 1365-1391, 2015.

MIELGO, I.; MOREIRA, M. T.; FEIJOO, G.; LEMA, J. M. A packed-bed fungal bioreactor for the continuous decolourisation of azo-dyes (Orange II). **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 99-106, 2001.

MINAMI, P. S. **Micologia: métodos laboratoriais de diagnóstico de micoses**. Barueri: Manole, 199p., 2003.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MOREIRA NETO, S. L. **Enzimas lignofílicas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.

ODY, D. A.; FERIS, L. A.; HARO, N. K. **Remoção de corantes têxteis de efluentes por adsorção com carvão ativado**. Monografia (Graduação) – Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2014.

OLIVEIRA, A. P. S.; JACQUES, G. F.; NERY, V. V. C.; ABRANTES, S. Consumo de corantes artificiais em balas e chicletes por crianças de seis a nove anos. **Revista Analytica**, v. 2, n. 44, p. 79, 2010

ORZECOWSKI, J.; RAMPINELLI, J. R.; SILVEIRA, M. L. L.; CHAVES, M. B.; FURLAN, S. A. 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.

PAAVOLA, N. M. L.; ITAVAARA, M. L. R.; Detection of white-rot fungi by a nontoxic stain. **Mycological Research**, v. 94, n.1, p. 27-31, 1990.

PAVANELLI, S. P. **Degradação de corantes da indústria alimentícia por processos oxidativos e redutivos: monitoramento por espectrometria de massas com ionização electrospray (ESI-MS)**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química, Minas Gerais. 2010

PEARCE, C.; LLOYD, J.; GUTHRIE, J. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. **Dyes and Pigments**, v. 58, n. 3, p. 179-196, 2003.

PERES, C. S.; ABRAHÃO, A. J. Característica e sistemas de tratamento de águas residuais das indústrias têxteis. **Química Têxtil**, v. 21, n. 52, p. 22-39, 1998.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R. **Revista Química Industrial**, v. 74, p. 18, 2006.

POINTING, S. B.; VRIJMOED, L. L. P. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 317-318, 2000.

RIDE, J. P. The effects of induced lignification on the resistance of wheat cell walls to fungal degradation. **Physiological Plant Pathology**, v. 16, p. 187-196, 1980

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 219-226, 2006.

ROCHA, C. P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido**. 2010. 161 f. Dissertação (Mestrado em Engenharias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

SALLES, P. T. F.; PELEGRINI, N. N. B.; PELEGRINI R. T. Tratamento eletroquímico de efluentes industrial contendo corantes reativos. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 3, n. 2, p. 25-40, 2006.

SARATALE, R. G.; GANDHI, S. S.; PURANKAR, M. V.; KURADE, M. B.; GOVINDWAR, S. P.; OH, S. E.; SARATALE, G. D. Decolorization and detoxification of sulfonated azo dye C.I. Remazol Red and textile effluent by isolated *Lysinibacillus* sp. RGS. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, p. 658-667, 2013.

SARATALE, R. G.; SARATALE, G. D.; CHANG, J. S.; GOVINDWAR, S. P. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, p. 138-157, 2011.

SEN, S. K.; RAUT, S.; BANDYOPADHYAY, P.; RAUT, S. Fungal decolouration and degradation of azo dyes: a review. **Fungal Biology Reviews**, v. 30, p. 112-133, 2016.

SILVA, C. P.; MARMITT S.; HAETINGER, C.; STULP, S. Avaliação da degradação do corante vermelho bordeaux através de processo fotoquímico. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 13, n. 1, p. 1, 2008.

SILVA, K. M. L.; MARINHO, G.; WANDERLEY, C. R. P.; RODRIGUES, K. Degradação de corante azo em efluente sintético de indústria têxtil por *Aspergillus niger* an 400 em reatores em batelada. **Conexões, Ciência e Tecnologia**, v. 4, n. 1, p. 24-33, 2010.

SILVA, M. C; CORREA, A. D. **Degradação de corantes e remediação de efluentes têxteis por extrato bruto de peroxidase de nabo**. Monografia (Graduação) – Graduação em Engenharia Química, Universidade do Federal de Lavras, Lavras, MG. 2011.

SINIRLIOGLU, Z. A.; SINIRLIOGLU, D.; AKBAS, F. Preparation and characterization of stable cross linked enzyme aggregates of novel laccase enzyme from *Shewanella putrefaciens* and using malachite green decolorization. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 807-811, 2013.

SOUSA, G. P. **Caracterização molecular e enzimática de fungos endofíticos de cana-de-açúcar e seu potencial para desconstrução de biomassa lignocelulósica**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Tocantins, Gurupi, 2017.

SOUZA, C. G. M.; TYCHANOWICZ, G. K.; SOUZA, D. F. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 129-136, 2004.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, n. 1, p. 19-26, 1994.

TREVISAN, H. C; SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. (Eds) **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 115-136, 2004.

VANDEVIVERE, P. C.; BIANCHI, R.; VERSTRATE, W. Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 72, p. 289-302, 1998.

VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; TÓTH, B.; FRISVAD, J. C.; PERRONE, G.; SUSCA, A.; MEIJER, M.; SAMSON, R. A. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriolate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1925-1932, 2007.

VELÁZQUEZ-CEDENO, M. A.; MATA, G.; SAVOIE, J. M. Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 201-207, 2002.

VIEIRA, F. D. P. **Descoloração e Degradação de Corantes Têxteis por Cianobactérias**. 2007. Artigo. Disponível em: < https://alsafi.ead.unesp.br/bitstream/handle/11449/121722/vieira_fdp_tcc_rcla.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 28 de março de 2018.

WERKA, H. A. **Estudo da adsorção dos corantes Azul Ácido 80 e Azul Brillhante G sobre crisotila ativada**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Regional de Blumenau. Blumenau, 2009.

WOICIECHOWSKI, A. L. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná.

YAKUP, A.; BEKIR, S.; OMUR, C.; GULAY, B. Immobilization of laccase on the fibrous polymer-grafted film and study of textile dye degradation by MALDI-ToF-MS. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 128, n. 4, p. 107-119, 2017.

YAROLOV, A. I.; SKOROBOGATKO, O. V.; VARTANOV, S. S.; VARFOLOMEYEV, S. D. Laccase properties, catalytic mechanism and applicability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 257-280, 1994.

ZHAO, M.; WANG, Y.; LIU, Z.; CUI, D.; BIAN, X. Properties of immobilized laccase on mesostructured cellular foam silica and its use in dye decolorization. **Journal of Macromolecular Science**, v.48, n. 2, p. 447-453, 2011.

ZENG, X.; CAI, Y.; LIAO, X.; ZENG, X. Decolorization of synthetic dyes by crude laccase from a newly isolated *Trametes trogii* strains cultivated on solid agro-industrial residue. **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, p. 517-525, 2011.

ZUCCARI, M. L.; GRANER, C. A. F.; LEOPOLDO, P. R. Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO) em águas e efluentes por métodos colorimétricos alternativo. **Revista Energia na Agricultura**, v. 20, n. 4, p. 69-82, 2005.