



REF – ISSN 1808-0804 Vol. X (1), 27 - 50, 2013.

## **DESCOLORAÇÃO DO CORANTE FOOD BLUE Nº 1, POR MEIO DE USO DE FIBRAS SILICÁTICAS DE AMIANTO (CRISOTILA 5S) COMO SUPORTE PARA FUNGO *Ganoderma applanatum***

*DISCOLORATION OF FD&C BLUE Nº 1 DYE BY ASBESTOS SILICATE FIBERS (CHRYSOTILE 5S) AS SUPPORT FOR *Ganoderma applanatum* Fungus*

*DECOLORACIÓN DEL COLORANTE FOOD BLUE Nº 1, MEDIANTE EL USO DE FIBRAS DE AMIANTO SILICATO (CRISOTILO 5S) COMO APOYO PARA EL HONGO *Ganoderma applanatum**

**<sup>1</sup>Josely Batista Rabelo, <sup>2</sup>Luiza Cintra Campos, <sup>\*3</sup>Paulo de Tarso Ferreira Sales, <sup>4</sup>Monike Fabiane Alves Ribeiro Lacerda, <sup>5</sup>Mariângela Fontes Santiago**

<sup>1</sup>Funcionária da *Ultrachem Scientifics Products*.

<sup>2</sup>*University College London*.

<sup>3</sup>Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.  
DF – Brasil.

<sup>4</sup>IFG - Instituto Federal de Goiás, Brasil.

<sup>5</sup>Docente na Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, Departamento de Tecnologia Farmacêutica.

\*autor para correspondência: paulogyn8@gmail.com

***Recebido em 20/07/2011, Aceito em 26/02/2013***

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar a interferência das fibras silicáticas de amianto (Crisotila 5S) como suporte de cultura dos fungos, tendo como parâmetros de determinações as atividades enzimáticas de lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase como produtos microbianos e a descoloração do corante Food Blue nº 1 por meio da espectrofotometria do visível. Foi utilizado o microrganismo *Ganoderma applanatum*, as soluções de corante azul brilhante nº 1 e a crisotila 5S. O tratamento biológico foi efetuado em uma mesa agitadora refrigerada à temperatura de 28° C e 180 rpm na ausência de luz, sendo que foram colocados 100 mL de efluente em um erlenmeyer de 250 mL e acrescentado os conteúdos das placas (meio de cultura + fungo) e a crisotila. Os tempos de tratamento foram de 24, 48, 72 e 96 h. Foi observado que para concentração de 0,125 g.L<sup>-1</sup>, houve significativa degradação do corante pelo *G. applanatum* e a adsorção da crisotila pelo fungo. Portanto, neste trabalho, o uso de crisotila como suporte para crescimento de fungos em meio líquido, aumentou significativamente a produção enzimática de lignina peroxidase, concomitante com a diminuição da absorbância da solução em 630 nm ( $\lambda_{\text{máx}}$ ), indicando boas perspectivas no processo degradativo desse corante.

**Palavras-chave:** Crisotila 5S; corante azul brilhante nº 1; *Ganoderma applanatum*; descoloração.

## ABSTRACT

This work aimed to evaluate the interference of asbestos silicate fibers (Chrysotile 5S) as support for fungus culture. The enzymatic activity of laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase were determined as microbial products and the discoloration of FD&C blue nº 1 dye was checked by spectrometry in UV-visible. The microorganism *Ganoderma applanatum*, five different concentrations of the dye solutions and the chrysotile 5S were used. The biological treatment was carried out on a refrigerated shaker table at 28 °C and 180 rpm in light absence, and 100 mL of dye solution were put in a 250 mL Erlenmeyer flask and the plate contents (culture medium + fungus) and chrysotile were added to it. The treatment times investigated were 24, 48, 36, and 48 h. For the 0.125 g L<sup>-1</sup> solution concentration, considerable dye degradation and chrysotile adsorption by the *G. applanatum* fungus, and fungal biocompound production were observed. Therefore, the chrysotile used as support for fungal growth in liquid medium increased the enzymatic production of lignin peroxidase with absorbance decrease at 630 nm

( $\lambda_{\max}$ ). This indicates a prominent use of bioremediation and chrysotile as fungal support for the degradation of FD&C blue n° 1 dye.

**Keywords:** Chrysotile 5S, food blue dye n°1, *Ganoderma applanatum*, discoloration

## RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo estudiar la interferencia de amianto de fibra de silicato (crisotilo 5S) en apoyo de la cultura de los hongos, con los parámetros de las determinaciones de las actividades de la enzima lacasa, peroxidasa de lignina y manganeso peroxidasa como productos microbianos y la decoloración del colorante Food Blue n° 1 por espectrofotometría visible. Se utilizó el microorganismo *Ganoderma applanatum*, las soluciones del colorante Azul Brillante n° 1 y crisotilo 5S. El tratamiento biológico se realizó sobre una mesa vibradora se enfrió a 28 °C y 180 rpm en la oscuridad, y se colocaron 100 ml de efluente en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añadió a los contenidos de las placas (medio de cultivo + levadura) y el crisotilo. Los tiempos de tratamiento fueron 24, 48, 72 y 96 h. Se observó que la concentración de 0,125 g.L<sup>-1</sup>, se produjo una degradación significativa del colorante por *G. applanatum* y la adsorción de crisotilo por el hongo. Por lo tanto, en este trabajo, el uso de crisotilo como soporte para el crecimiento de hongos en medio líquido, aumentó significativamente la producción de la enzima peroxidasa de lignina, concomitante con la disminución de la absorbancia de la solución a 630 nm ( $\lambda_{\max}$ ), lo que indica buenas perspectivas en este proceso degradativo teñir.

**Palabras claves:** El crisotilo 5S, azul brillante tinte n° 1; *Ganoderma applanatum*; decoloración.

## INTRODUÇÃO

Grandes quantidades de diferentes corantes químicos são usadas em várias aplicações industriais, sendo que uma significativa proporção destes aparece na forma de resíduos. Neste contexto, os diversos corantes utilizados em vários segmentos industriais aparecem como um grande problema

ambiental. Muitas dessas substâncias possuem propriedades mutagênicas e/ou carcinogênicas. Adicionalmente, o descarte de corantes em rios e lagos prejudica a absorção de energia luminosa, alterando os ecossistemas aquáticos <sup>(1)</sup>, afetam também o efluente quanto à estética e a solubilidade do gás na água <sup>(2)</sup>.

Existe uma pesquisa global mundial para métodos alternativos na

produção de energia por fontes renováveis. Para melhorar a produtividade e o rendimento do etanol e para evitar a utilização das centrífugas, que são processos caros, contínuos com células imobilizadas nos diferentes suportes como vidro, polímeros sintéticos como poliacrilamida, gels de polipropileno têm sido sugerido, embora alguns portadores apresentassem dificuldades em escala industrial <sup>(3)</sup>. Nas pesquisas, têm sido mostrados que *Saccharomyces Cerevisiae* suportada em crisotila tem um aumento de 130% na velocidade de fermentação e que o rendimento de etanol pode ser tanto quanto 26% mais elevado do que para células livres. Então este sistema poderia ser usado em um processo de fermentação contínuo <sup>(4)</sup>.

A crisotila é um silicato fibroso de magnésio abundante no Brasil. Os minérios neste país não são contaminados por formas perigosas do asbesto como crocidolita, tremolita e amosita<sup>1</sup>. A interação entre a crisotila e materiais biológicos podem ser utilizados desde que tenham conhecimento que estas fibras podem causar doenças de pulmão. Entre todos os materiais naturais do asbesto que incluem os anfibólios crocidolita, o tremolita, o amosita, o antofilita e o actinolita, e as serpentinas antigorita,

picrolita e crisotila, o câncer de pulmão é associado com crocidolita (asbesto azul), tremolita e amosita (asbesto marrom), visto que as outras fibras variam no grau de perigo na saúde. Crisotila é menos biopersistente que os anfibólios <sup>(4)</sup>.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a interferência das fibras silicáticas de amianto (Crisotila 5S) como suporte de cultura dos fungos, tendo como parâmetros de determinações as atividades enzimáticas de lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase como produtos microbianos e a descoloração do corante Food Blue nº 1 por meio da espectrofotometria do visível e redução de DQO.

### **Crisotila**

Crisotila pode ser usada como suporte mineral para células de levedura em fermentação alcoólica com células imobilizadas. Ela tem uma capacidade para imobilizar células de leveduras por adsorção, com algumas vantagens quando comparados com alguns suportes (TiCl<sub>4</sub> ou aminopropiltriétoxilase), como tem uma excelente estabilidade que permite seu uso por um longo período e também o reuso, resistência por tratamentos térmicos, suporta as condições operacionais da fermentação alcoólica e é mais barato. Mas a vantagem principal

---

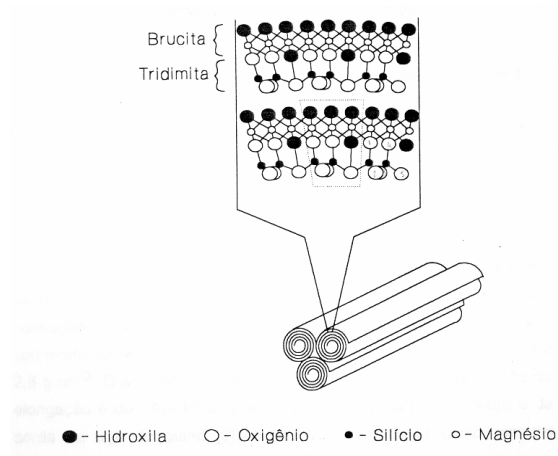
<sup>1</sup> Crocidolita, tremolita e amosita – Minerais fibrosos do grupo dos anfibólios (MENDES, 2001).

deste mineral é a estimulação da produção de etanol através de leveduras, aumentando a produtividade específica dos processos<sup>(3)</sup>.

Estudos recentes mostram que a imobilização de biocatalisadores em suporte apropriado proporciona um melhor desempenho do biocatalisador bem como possibilita a sua reutilização<sup>(5)</sup>. A imobilização das células de levedura em suportes sólidos é conhecida para incrementar estabilidade da célula e do metabolismo. As células de levedura de padeiro imobilizada em crisotila foram usadas com sucesso na produção de álcool, desde 1996.

Levedura suportada em crisotila tem 140% de aumento na velocidade de fermentação e o rendimento de etanol passa a ser 26% maior do que para as células livres. Além da eficiência incrementada na fermentação, uma das perguntas mais importantes a ser respondida é quais são os modos pelo os quais as fibras de crisotila modificam o metabolismo da célula<sup>(6)</sup>.

Estruturalmente, apresenta a célula unitária  $[Mg_3 Si_2 O_5 (OH)_4]$  com uma estrutura única e altamente organizada, constituída de bicamadas de brucita  $Mg(OH)_2$  e silicato ( $SiO_2$ ), enroladas coaxialmente, as quais formam uma fibrila (Figura 1).



**Figura 1** - Estrutura da crisotila<sup>(7)</sup>.

### **Corantes**

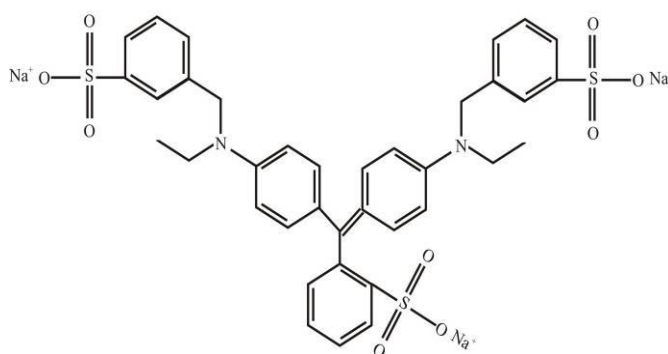
Corantes sintéticos são designados por serem resistentes à luz, água e agentes oxidantes, no entanto, é difícil removê-los, uma vez que são lançados no meio ambiente. Os efluentes contendo corantes

somente são ligeiramente descoloridos através dos tratamentos de esgotos biológicos convencionais<sup>(8)</sup>. Aproximadamente 10.000 diferentes corantes e pigmentos são usados industrialmente, o que representa um consumo anual de cerca de  $7 \times 10^5$  tons no mundo<sup>(9)</sup>.

Aditivo para alimentos é definido pela *Food and Agriculture Organization / World Health Organization* (FAO / WHO) como "toda substância, que não apresenta valor nutritivo, adicionada ao alimento com a finalidade de impedir alterações, manter, conferir ou intensificar seu aroma, cor e sabor; modificar ou manter seu estado físico geral, ou exercer qualquer ação exigida para uma boa tecnologia de fabricação do alimento" <sup>(10)</sup>.

O corante alimentício Azul Brilhante nº 1 é caracterizado como

solução traçadora, no qual este deve: ser sensível à detecção; possibilitar o uso em análise quantitativa com rapidez; ser solúvel quando misturado à calda, com efeitos físicos mínimos na pulverização e menor evaporação das gotas; ter propriedades distintas para se diferenciar de outras substâncias; e ser estáveis, atóxicas e de baixo custo. A Figura 2 mostra a fórmula estrutural do corante em estudo: Food Blue nº. 1.



**Figura 2** - Fórmula estrutural do corante Food Blue nº 1.

A utilização deste corante oferece uma série de vantagens em relação ao substrato convencional porque são estáveis, solúveis e substratos baratos com elevadas taxas de extinção molares e baixa toxicidade. Esses corantes podem ser aplicados em ensaios quantitativos espectrométricos simples e rápidos <sup>(11)</sup>.

### **Fungos Basidiomicetos Ligninolíticos e Enzimas**

Os fungos são organismos complexos morfologicamente nos quais diferem na estrutura nos diferentes tempos em seu ciclo de vida, diferem na forma entre a superfície e o meio submerso, e diferem também na natureza do meio de cultivo, ambientes físicos e condições de culturas físicas

(temperaturas, pH, forças mecânicas, etc.)<sup>(12)</sup>. Os basidiomicetos ligninolíticos secretam enzimas que convertem os polímeros externos em moléculas menores, que são assimiladas e utilizadas como nutrientes. Ao lado de outros microrganismos, os basidiomicetos ligninolíticos atuam na decomposição da matéria orgânica, dinamizando a ciclagem de nutrientes e regulando o equilíbrio energético dos ecossistemas terrestres<sup>(13)</sup>. O sistema ligninolítico responsável pela biodegradação da lignina é o mesmo envolvido na degradação de poluentes orgânicos por basidiomicetos ligninolíticos e apresenta algumas vantagens de aplicação na biorremediação de solos. Este sistema é extracelular e pode atuar em substâncias insolúveis ou complexadas ao solo. A inespecificidade do sistema enzimático permite a sua utilização para uma ampla variedade de poluentes orgânicos. Além disso, o sistema não precisa ser induzido e a degradação pode ocorrer até níveis não detectáveis, com mineralização<sup>(14)</sup>. Devido à baixa especificidade e elevado potencial de oxidação do sistema enzimático, os basidiomicetos ligninolíticos são também capazes de degradar uma variedade de compostos recalcitrantes<sup>(15)</sup>.

Os fungos de decomposição branca parecem ser os únicos microrganismos nos quais mostram

capacidade de degradação e mineralização de lignina e uma série de compostos poluentes orgânicos, altamente tóxicos e recalcitrantes. Esta capacidade é, no mínimo em alguma extensão, causada pelo sistema enzimático não-específico produzido por estes fungos durante a degradação de lignina e inclui diversas isoenzimas de lignina-peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14), Manganês-Peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13), Lacase (EC 1.10.3.2) bem como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzindo oxidases. O sistema multienzimático envolvido na degradação e mineralização da lignina é constituído de diferentes combinações de enzimas lignolíticas, sendo a ocorrência de MnP e Lacase maior que LiP. Entretanto, há uma diversidade grande de basidiomicetos com diferentes modelos de enzimas lignolíticas, nos quais tem também diferenças grandes em suas habilidades na degradação xenobiótica<sup>(11)</sup>.

*Ganoderma applanatum* têm sido usados na medicina tradicional chinesa e japonesa para o tratamento de vários tipos de doenças, embora pesquisas sistemáticas dos efeitos farmacológicos começaram somente há vinte e cinco anos atrás<sup>(16)</sup>. O fungo *Ganoderma applanatum* já foi utilizado para tratar efluente da indústria papeleira (ligninacelulose)<sup>(17)</sup> e no tratamento de corante reativo, conforme estudos de Vaithiyanathan et al.<sup>(18)</sup>. A Figura 3

mostra o fungo *Ganoderma applanatum* encontrado na natureza.



**Figura 3** - Fungo *Ganoderma Applanatum*

Fonte: [http://www.mrcashop.org/mushroom\\_shop/ganoderma-applanatum-artist-conk-kofukitake-pi-461.html](http://www.mrcashop.org/mushroom_shop/ganoderma-applanatum-artist-conk-kofukitake-pi-461.html)

Grande variedade de parâmetros de cultivo afeta a produção e a atividade das enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos como: a disponibilidade de oxigênio, fonte e concentração de carbono e nitrogênio, microelementos, pH e temperatura<sup>(19)</sup>. Tal característica mostra que os meios de culturas têm grande influência no processo de biorremediação e o uso de inibidores também pode vir a ser um ponto importante no processo de tratamento de poluentes<sup>(20)</sup>.

Lacases são proteínas globulares contendo entre 10-25% de carboidrato *N*-ligado e elas podem ter estruturas monoméricas, diméricas ou multiméricas, produzidas principalmente por basidiomicetos de degradação branca, mas são também detectadas em fungos de degradação parda e em fungos de degradação mole<sup>(21)</sup>. Lacases são membros da família de proteínas multi-cobres, que

incluem ascorbato oxidase, ceruloplasmina e bilirrubina oxidases. A expressão de genes que codificam a síntese dessa enzima indica que ela pode ser constitutiva ou indutiva.

A síntese de manganês peroxidase (ou peroxidase dependente do manganês) é possivelmente limitada a certos fungos basidiomicetos, e até então não se evidenciou em qualquer bactéria, levedura e nenhum basidiomiceto micorrízico. A capacidade de produção de MnP está distribuída entre grupos de basidiomicetos distintos taxonomicamente. Algumas espécies colonizadoras de madeira, pertencente às famílias Meruliaceae, Coriolaceae e Polyporaceae, assim como basidiomicetos decompositores de serapilheira, das famílias Strophariaceae (família de *Psilocybe castanella*) e Tricholomataceae expressam atividade de MnP. O peso

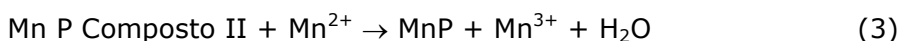
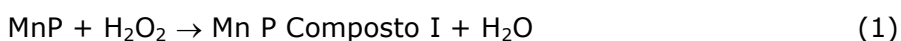


molecular de MnP varia de 38 a 62,5 kDa, mas a maioria das enzimas purificadas tem peso molecular próximo à 45 kDa <sup>(22)</sup>.

A MnP é uma glicoproteína com Fe protoporfirínico IX como grupo prostético, dependente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para sua atividade. A oxidação de lignina e outros compostos xenobióticos por

MnP é dependente da disponibilidade de íons de manganês. Seu ciclo catalítico é semelhante ao de LiP; no entanto, o Mn<sup>2+</sup> atua como doador de elétrons para gerar o composto II <sup>(22)</sup>.

A enzima manganês peroxidase é a única heme peroxidase capaz de catalisar a reação de um elétron do Mn<sup>2+</sup> a Mn<sup>3+</sup>, como mostra a reação:

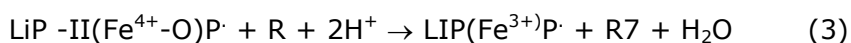
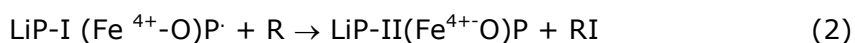
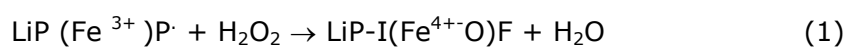


A enzima gerada pelo Mn<sup>3+</sup> é complexada como o ácido etanóico com o oxalato, que também é secretado por fungos. O complexo orgânico com o Mn<sup>3+</sup> complexado com o ácido oxida o substrato fenólico, incluindo os composto lignínicos e os mediadores <sup>(23)</sup>. A manganês peroxidase já foi usada para tratar efluente da indústria petroquímica <sup>(24)</sup>, corante <sup>(25)</sup> e benzopireno <sup>(26)</sup>.

Durante o processo de degradação Lignolítica, a LiP é inicialmente oxidada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e oxida núcleos aromáticos da molécula de lignina (fenólicos e não fenólicos), gerando radicais aniônicos. Eles reagem com nucleófilos (primariamente H<sub>2</sub>O) e com oxigênio

molecular, gerando uma "combustão enzimática" onde ligações C-C e C-O são quebradas, despolimerizando a lignina e abrindo os anéis aromáticos. Esta enzima é uma glicoproteína que contém Fe protoporfirínico IX como grupo prostético e é dependente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para sua atividade <sup>(27)</sup>.

A LiP é uma enzima extracelular importante no processo degradativo da lignina, que se apresenta como o mais abundante composto polimérico aromático na terra. LiP é uma glicoproteína com massa molecular de 41 kDa, que contém 1 mol de ferro protoporfirina IX por mol de enzima. A LiP catalisa o peróxido de hidrogênio no processo oxidativo multipasso, como se segue:



Na reação acima, R é o substrato e P o porfirina. O composto LiP-I carrega os oxidante duplo do peróxido, um como o centro oxiferril ( $\text{Fe}^{4+}\text{O}$ ) e o outro como porfirina  $\pi$  cátion radical ( $\text{P}^\cdot$ ), com a consequente reação não-enzimática <sup>(28)</sup>.

## **METODOLOGIA**

### **Preparações das soluções das amostras de corante**

Foram preparadas cinco soluções do corante tipo azo: Food Blue nº 1 fornecido pela Indústria Eskisa (São Paulo, SP, Brasil) nas concentrações de 0,032; 0,062; 0,125; 0,250 e 0,500 g.L<sup>-1</sup>, que foram guardadas em refrigeração a 4°C.

### **Microrganismo**

O fungo *Ganoderma applanatum* foi cedido pelo IBAMA (Brasília, DF, Brasil). Foi mantido em meio de extrato de malte 2% (P/V) a 4°C e repicados semanalmente.

### **Preparações da fibra silicática – Crisotila 5S**

À fibra silicática cedida pela Empresa SAMA (Minaçu, GO, Brasil) com nome comercial de crisotila 5S com massa de 1,000 g foi adicionada a um volume de 50,00 mL de água destilada. O sistema foi levado a um banho ultrassônico por 30 min, para retirar impurezas. Após o banho, as

fibras foram secas naturalmente e autoclavadas, sendo posteriormente adicionadas às soluções <sup>(6)</sup>.

### **Meio de cultura**

#### **Meio ágar batata (BGA)**

Para preparação do meio ágar batata foram colocados 50 mL de caldo de batata; 5 g de glicose; 3,75 g de ágar e água destilada para completar 250 mL. O meio foi autoclavado durante 15 min a 120 °C. Condições de crescimento da cultura

Meio sólido:

O meio sólido foi colocado em placas de petri (10 cm de diâmetro) contendo 15,00 ( $\pm 1$ ) mL de meio BGA. Cada placa foi inoculada com disco (5 mm de diâmetro) de fungo de idade de crescimento de 5 dias em meio BGA temperatura ambiente (em torno de 28° C).

### **Equipamentos e métodos analíticos usados**

Para avaliação das soluções controles e das soluções em estudo foram empregados os seguintes parâmetros: pH, Absorbância e Demanda Química de Oxigênio (DQO). Todas as análises foram efetuadas de acordo com o Standard Methods (29). Os outros métodos de análises são

relativos ao processo de tratamento envolvendo fungos e são necessários para a avaliação da eficiência do tratamento.

Os equipamentos utilizados foram: espectrofotômetro marca Micronal modelo B-582, potenciômetro marca Tecnal (Brasil) modelo Tec-3-MP com eletrodo de Ag/AgCl e mesa agitadora refrigerada New Brunswick Scientific, modelo

C24KC. O digestor para realização de DQO foi o da marca Hach (COD Reactor). Estufa para cultura de microrganismos Marca Alfa. O Quadro 1 relaciona as características físico-químicas analisadas, descrevendo o tipo de análise efetuada, bem como especificando os agentes complexantes, tipo de eletrodo, indicadores, equipamentos e métodos.

**Quadro 1** - Característica e tipos de análises realizadas.

<b>Característica</b>	<b>Tipo de análise</b>
pH	Análise potenciométrica direta (eletrodo de Ag/AgCl)
Absorbância	Análise espectrofotométrica (630 nm)
DQO	Análise colorimétrica (método de digestão com dicromato)

**Métodos para determinação das atividades enzimáticas antes e após o tratamento das soluções com fungo.**

Antes e após o tratamento (meio líquido) das soluções pelo fungo foram determinadas as atividades enzimáticas relacionadas com a degradação dos compostos orgânicos existentes nas soluções. As culturas não inoculadas (controles) foram utilizadas como controles enzimáticos para descartar possíveis interferências com os métodos de determinação das atividades. As atividades enzimáticas foram determinadas espectrofotometricamente e os resultados expressos em  $\mu$ moles de substrato oxidado durante um minuto,

por mL de caldo filtrado ( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). As enzimas pesquisadas foram:

a) Lacase <sup>(30 - modificado)</sup>:

A reação iniciou-se com a adição da seringaldazina e a velocidade de oxidação desta foi acompanhada durante 10 min a 525 nm.

b) Lignina-Peroxidase <sup>(31, modificado)</sup>:

A reação foi iniciada pela adição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o aparecimento do aldeído veratrílico determinado medindo-se a absorbância a 310 nm. A atividade de LiP foi expressa em  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

c) Manganês-peroxidase <sup>(32)</sup>:

A mistura foi incubada a 30°C durante 5 min e a reação interrompida pela adição de 40  $\mu\text{L}$  de

NaOH 2,0 mmol.L<sup>-1</sup>. A absorvância foi lida a 610 nm e a atividade de MnP expressa como  $\Delta\text{Abs mL}^{-1}\text{min}^{-1}$ .

### **Realização dos tratamentos**

Nos tratamentos das soluções de corante foram colocados 100,00 mL de solução de corante em um erlenmeyer de 250 mL e em capela de fluxo laminar foram colocados os conteúdos totais das placas (meio de cultura + fungo) nos erlenmeyers, totalizando 20 amostras. Desses erlenmeyers, 10 continham crisotila e 10 sem crisotila. O experimento foi feito em duplicata e foram usados para controle somente a solução contendo crisotila para realizar comparações com os tempos de tratamentos (24 h, 48 h, 72 h e 96 h). Em seguida, foram colocados na mesa agitadora refrigerada a 28° C e 180 rpm. Para controle foram adicionados culturas dos fungos, sob as mesmas condições acima, seguida de autoclavagem a uma temperatura de 121°C por 15 min sendo agitado em uma mesa agitadora refrigerada sob temperatura de 28°C e 180 rpm (rotações por minuto), que é o teste de adsorção. Para o teste de adsorção, foram colocadas as amostras e os conteúdos das placas de petri (fungo+meio), sendo posteriormente autoclavados e feitas as devidas caracterizações.

### **Preparação e manutenção das Amostras**

Após os respectivos períodos de tratamento das soluções de corante, estas foram filtradas em papel de filtro Whatmann 1,3 mm sendo o caldo filtrado guardado sob refrigeração a 4°C. Todas as amostras foram filtradas posteriormente em membrana Milipore® 0,45 µm e imediatamente refrigeradas a 4° C<sup>(33)</sup>. Antes das medições enzimáticas através de absorvância no UV-vis, as amostras foram centrifugadas durante 20 min a 8000 rpm.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Tratamento das Soluções em estudo**

Espectros de 300 a 750 nm foram medidos para acompanhar a evolução do tratamento das soluções de corante tipo azo Food Blue nº 1, em intervalos de 15 nm. Os resultados foram apresentados segundo a concentração das soluções de corante. Como solução de referência, utilizou-se a solução do corante (sem fungo) e a solução do corante com a fibra silicática. Para efeito de avaliação de degradação do corante, utilizou-se o comprimento de onda de 630 nm como comprimento específico e para avaliação de produção de compostos fúngicos, o

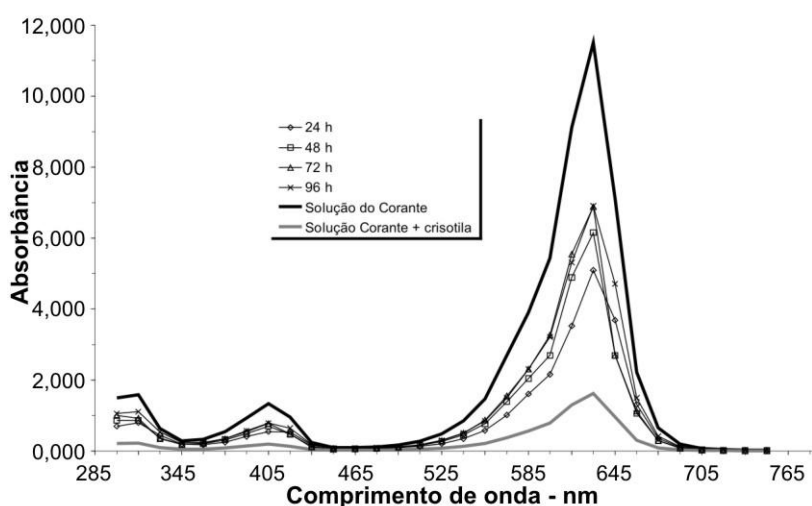
comprimento de onda usado foi o de 300 nm.

Para concentrações de 0,125 g.L<sup>-1</sup> (Figura 4a e 4b) notou-se a degradação do corante pelo fungo e a adsorção da crisotila nas paredes do fungo, havendo a produção de compostos pelo fungo. Nessa concentração, observou-se o aumento da degradação do corante pelo fungo, comparando-se com a solução do corante. A adição da crisotila também tem papel importante, pois ela apresentou menor absorbância no comprimento específico de 630 nm, mostrando que a adsorção do corante às fibras silicáticas teve maior significância que a degradação.

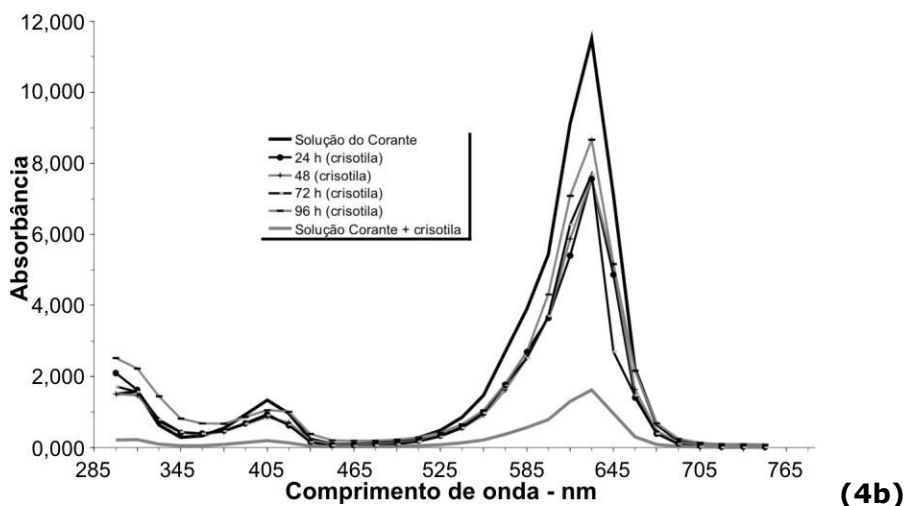
Comparando-se as duas formas de tratamento, o uso das fibras não teve grande importância na síntese

enzimática, pois as curvas espectrais quando se usou o as fibras foram semelhantes às curvas de quando não se usou a crisotila. Nota-se também que o aumento do tempo de tratamento aumenta a coloração da solução em ambos os casos de tratamento, o que já foi citado anteriormente por Aquino <sup>(34)</sup>.

O uso das fibras aumentou a produção de compostos fúngicos, como pôde ser observado na Figura 4b em comprimento de onda de 300 nm, salientado em 96 h de tratamento, o que corrobora com Aquino <sup>(34)</sup> em que o tempo de tratamento aumenta a quantidade de PMS (Produtos Microbianos Solúveis), sendo que a biotransformação tem um papel tão importante quanto a degradação.



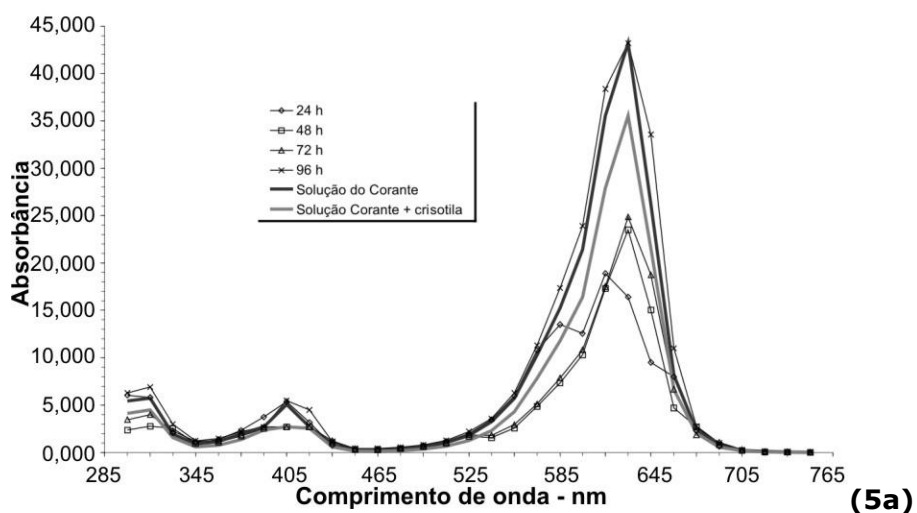
(4a)

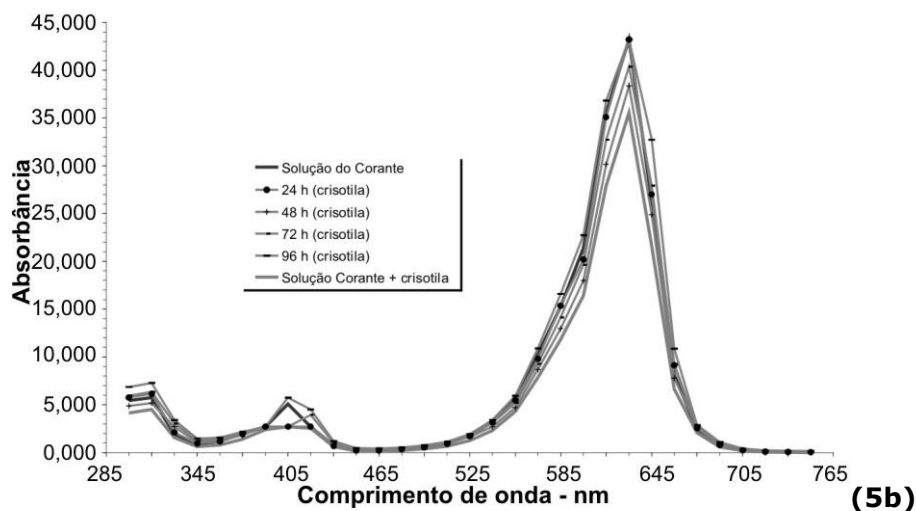


**Figura 4** - Espectro de 300 a 750 nm da amostra. (4a) concentração de  $0,125 \text{ g.L}^{-1}$  sem crisotila, (4b) concentração de  $0,125 \text{ g.L}^{-1}$  com crisotila. A curva intitulada solução corante+ crisotila indica que não houve adição do fungo ao sistema.

Já na concentração de  $0,500 \text{ g.L}^{-1}$  (Figura 5a e 5b) houve a adsorção da crisotila nas paredes do fungo (controle de adsorção, dado não mostrado), no qual notou-se o aumento da absorbância. Segundo Cassiola et al. <sup>(4)</sup> o grau de interação entre as células e as fibras da crisotila

parece estar relacionado ao tempo de exposição e a presença ou ausência de nutrientes durante o período de adesão. As células quando estão na ausência de nutrientes aderem mais intensamente aos nutrientes das fibras de crisotila.





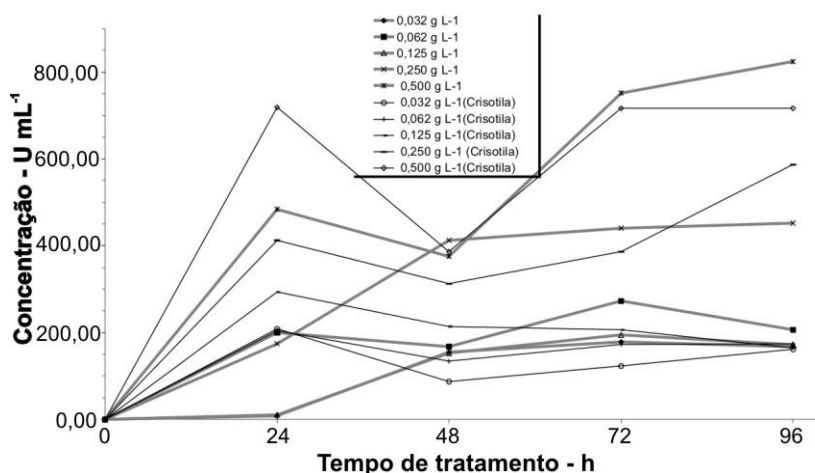
**Figura 5** - Espectro de 300 a 750 nm da amostra. (5a) concentração de 0,500 g.L<sup>-1</sup> sem crisotila, (5b) concentração de 0,500 g.L<sup>-1</sup> com crisotila.

Sem o uso da fibra silicática, obteve-se maior descoloração do corante, observando-se em 630 nm, em 24 h de tratamento. A adsorção do corante às fibras foi de grande importância, pois ela representou maior descoloração em 630 nm, diferentemente do observado com a concentração de 0,125 g L<sup>-1</sup> (Figura 5b). Tal comportamento sugere que o fungo se adapta melhor à

determinadas concentrações do corante, o que pode vir a inibir seu metabolismo primário e secundário.

Para as concentrações de 0,032; 0,064; 0,250 g L<sup>-1</sup>, a influência das fibras silicáticas não foi significativa (abaixo de 10%), praticamente não havendo alteração nos tratamentos só com o fungo.

A produção de LiP é mostrada na Figura 6.

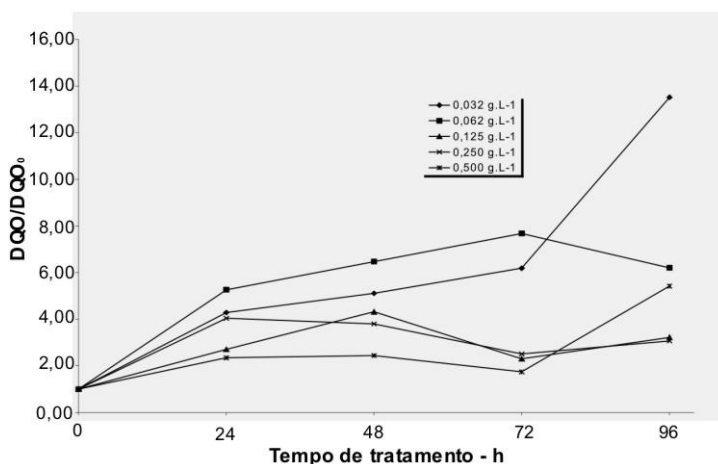


**Figura 6** - Determinação da atividade de lignina-peroxidase dos caldos filtrados da amostra, em pH 3,0 e álcool veratrílico como substrato, em 310 nm.

De acordo com a Figura 6, a maior produção de LiP se deu em 96 h de tratamento, com as concentrações de 0,500 g L<sup>-1</sup>, com as soluções com e sem o uso da crisotila, o que indica que o fator predominante para a síntese enzimática de LiP é a concentração do substrato, que tem como fonte de nitrogênio o próprio corante. De acordo com Belinky et al.<sup>(35)</sup> a produção de LiP está relacionada à presença de oxidantes, como o oxigênio, peróxido, sendo que o próprio corante pode funcionar como agente oxidante, o que indica neste caso que maiores concentrações de corante, maiores produções de tal enzima.

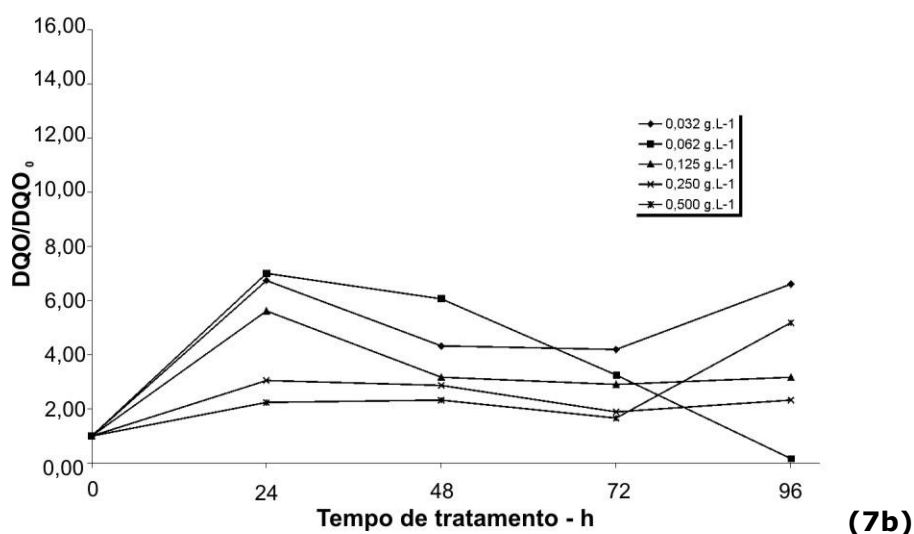
Para se avaliar o decaimento da matéria orgânica presente no efluente, foi avaliado a DQO (solúvel, pois os caldos eram filtrados em membrana 0,45 µm), conforme a Figura 7. Por se tratar de um sistema heterogêneo, em que se diferencia a fase sólida (micélio, ágar e particulados) da fase líquida (solúvel),

a bioatividade fúngica (variação de pH, síntese enzimática, etc.) pôde ser modificada a proporção entre as duas fases, levando a resultados em que a relação de DQO seja maior que o valor inicial. Entretanto, valores abaixo do valor inicial (1,00) possivelmente indicam degradação e podem ser interpretados como redução da matéria orgânica presente na solução, pois tal metodologia avalia toda matéria orgânica contida na amostra, sendo que os Produtos Microbianos Solúveis (PMS) que estão presentes no meio, impossibilitam a interpretação dos resultados<sup>(34)</sup>. Embora a varredura indique diminuição de absorbância no comprimento de onda de 630 nm, isto não pode ser usado como indicador de mineralização do corante, possivelmente uma degradação do mesmo, gerando moléculas intermediárias.



(7a)

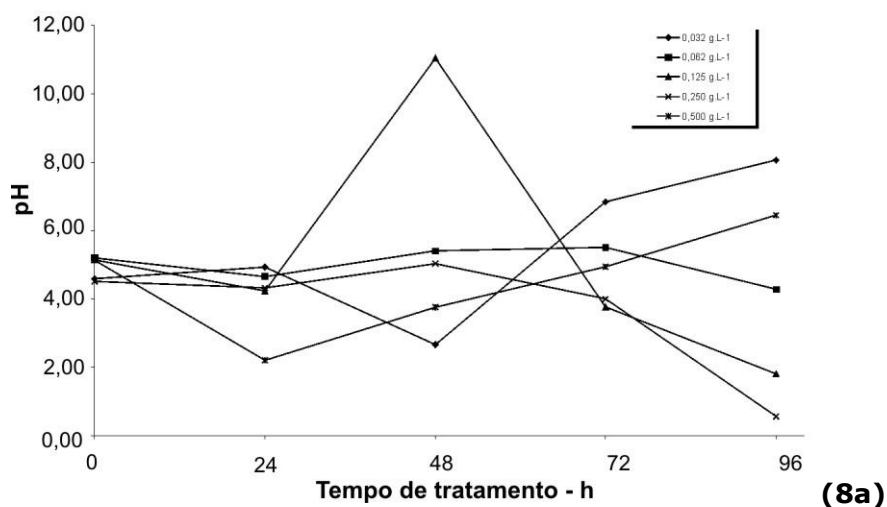


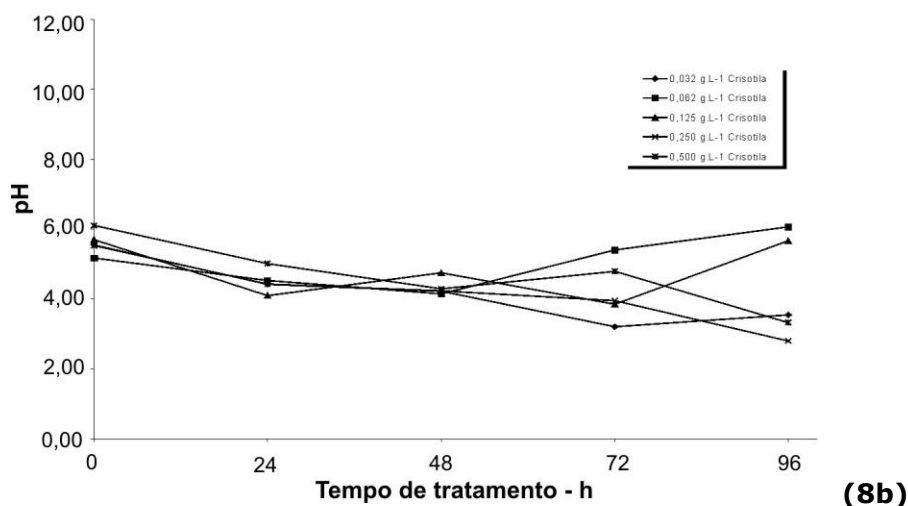


**Figura 7** - Relação entre a DQO final e a DQO inicial. 7a- corresponde variação de DQO da amostra sem o uso da crisotila e 7b a amostra com crisotila.

A Figura 8 mostra os resultados do monitoramento de pH. O pH das soluções com corante azul brilhante apresentou valores entre 4,59 a 5,20 (8a) nas soluções sem o uso de crisotila e 5,17 a 6,1 (8b) nas soluções com crisotila. Em geral, o pH das soluções apresentou-se numa faixa ácida (abaixo de 7,00), com

menor variação de valores de pH quando se usou a crisotila como suporte para os fungos, indicando possivelmente que a presença da fibra silicática ajuda a manter o pH das soluções em faixas de intervalos menores, como pode ser observado em 48 h de tratamento na Figura 8b.





**Figura 8** - Variação do pH durante o tratamento das soluções com corante azul brilhante sem o uso da crisotila (8a) e com o uso da crisotila (8b).

Nos procedimentos com e sem crisotila foi observado, após 72 h de tratamento (Figura 8), que houve maior variação de intervalos de pH, o que pode ser relacionado com a produção de PMS, como já citado por Aquino <sup>(34)</sup>, onde a biotransformação do contaminante pode alterar a estrutura da matéria orgânica resultante, bem como alterar o pH das amostras.

Essa faixa de pH que os caldos filtrados apresentaram está dentro do intervalo de pH ótimo para a atividade da lacase, MnP e LiP <sup>(36)</sup>. Já foi relatado que os fungos preferem valores de pH (4,0-6,0) mais ácido, pois nesta faixa de pH, as fenoloxidasas apresentam maior estabilidade <sup>(37)</sup>.

A variação e estabilização do pH foram feitas com a produção de compostos de origem fúngica, verificada com o aumento do pH no tratamento do efluente com os

fungos, sendo que a adição do meio de cultura não foi responsável direta pela variação de pH, indicando que a bioatividade fúngica está relacionada à manutenção de um pH ideal para crescimento e síntese de biocompostos.

Nos ensaios para lacase, em que se usou a seringaldazina como substrato, não foi detectado a atividade dessa enzima, o que não pode afirmar que o *G. applanatum* não sintetize essa enzima, pois somente uma análise de DNA pode mostrar se o fungo é capaz de sintetizar lacase.

Nos ensaios da atividade enzimática de manganês peroxidase, devido ao comprimento de onda do produto da oxidação do vermelho de fenol (610 nm) ser muito próximo ao comprimento de onda máximo do corante (630 nm), bem como à alta absorbância das soluções do corante azul brilhante, não foi possível medir

a atividade enzimática, mesmo diluindo-se a amostra, pois em concentrações mais baixas dessa enzima, mostrou-se indetectável. O fungo em estudo apresentou atividade de MnP, conforme Songulashvili et al.<sup>(38)</sup> e Tsujiyama e Minami<sup>(39)</sup>.

## CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de crisotila como suporte para crescimento de fungos em meio líquido, com o objetivo de aumentar a produção enzimática teve resultado importante, mostrando que a interação entre fungo e crisotila e entre crisotila e corante azul brilhante apresentam perspectivas importantes. Verificou-se maior produção de LiP quando aumentou a concentração do corante, o que indica que concentrações na faixa de 0,500 g L<sup>-1</sup> de corante, o fungo *G. applanatum* é capaz de sintetizar LiP, viabilizando a mineralização do contaminante orgânico em concentrações mais altas. A concentração de corante que apresentou melhor resultado de descoloração foi de 0,125 g L<sup>-1</sup>, usando-se a crisotila como suporte, o que sugere uma interação importante entre o suporte silicático e o fungo. Outra observação importante é a

interação entre a crisotila e o corante, que em concentrações de 0,032 e 0,064 g L<sup>-1</sup> houve uma adsorção expressiva, o que pode vir a ser interessante pesquisa futura, para a separação de contaminantes solúveis em efluentes. A metodologia de DQO não se mostrou confiável na quantificação da matéria orgânica degradada, durante a realização dos ensaios, o que pode apontar que a adição de esporos dos fungos, possa ser outra maneira de realizar o processo degradativo.

Estudos futuros utilizando-se a crisotila como suporte podem ser feitos, buscando-se uma maior variação de massa do suporte, bem como a adição de fonte primária de glicose, pois o metabolismo do fungo pode ser alterado com níveis mais altos de glicose, além de variações de pH ou o uso de soluções tamponadas, que podem ser outras maneiras de aumentar a produção enzimática.

## AGRADECIMENTOS:

Editais MCT/CNPq/CT-Hidro nº 14/2005 e International Foundation of Science/W3433-1(IFS).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferreira, V. S. ; Silva Jr., J. G.; Bom, E. P. S. Degradação e síntese de corantes usando lignina peroxidase fúngica. *Anais do 4º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC*, Rio de Janeiro, Brasil, 1999; p. VIII.1.
2. Fu, Y.; Viraraghavan, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource technology*;, 2001; 79(2): 251-262.
3. Monte Alegre, R.; Rigo, M.; Joekes, I. Ethanol fermentation of a diluted molasses medium by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chrysotile. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2003; 46 (4): 751-757.
4. Cassiola, F.; Silveira, M.; Jericó, S.; Joekes, I. Interaction between *Saccharomyces Cerevisiae* and Chrysotile. *European Cells and Materials*. 2001; 2: 30-35.
5. Vieira, M.R; Lehmkuhl, A.L; Risch, D.H; Wendhausen, R. Estudo de leveduras imobilizadas na redução de derivados da Acetofenona. *26º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química-SBQ*, 26 a 29 de maio de 2003.
6. Cassiola, F.; Rogers, R.; Kiyohara, P. K.; Joekes, I. Yeast cells long-term interaction with asbestos fibers. *Colloids and Surfaces B.*, 2004; 41: 277-283.
7. Wendhausen, Jr. R. *Estudo sobre utilização de crisotila como suporte de células Saccharomyces cerevisiae para uso em processo contínuo de fermentação alcoólica e biorreduções*. Tese (Doutorado), Campinas, SP, 1998.
8. Zhao, X.; Lu, Y.; Phillips, D.; Hwang, H; Hardin, I. Study of biodegradation products from azo dyes in fungal degradation by capillary electrophoresis/ electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1-8, 2006.
9. Spadaro, J. T.; Gold, M. H.; Renganathan, V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology*; 1992; 58 (8): 2397-2401.
10. Food And Agriculture Organization. Evaluation of certain food additives. Geneva, 1974; 557: 1-37.

11. 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*. 2005, 36, 246-252.
12. Prasad, K. K.; Mohan, S.; Venkata, B. Y.; Vijaya; Ramanaiah, S. V.; Babu, V. Lalit, et al. Laccase Production Using *Pleurotus ostreatus* 1804 Immobilized on PUF Cubes in Batch and Packed Bed Reactors: Influence of Culture Conditions. *The Journal of Microbiology*. 2005; 43 (3): 301-307.
13. Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A.; Itavaara, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*. 2000; 72: 169-183,
14. Barr, D.P.; Aust, S.D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science and Technology*. 1994; 28 (2): 78-87.
15. Fragoeiro, S.; Magan, N. Enzymatic activity, osmotic stress and degradation of pesticide mixtures in soil extract liquid broth inoculated with *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *Environmental Microbiology*. 2005; 7 (3): 348-352.
16. Ming, D.; Chilton, J.; Fogarty; Fidel; Towers, G.H N. Chemical constituents of *Ganoderma Applanatum* of British Columbia forests. *Fitoterapia*. 2002; 73: 147-152.
17. Lang, E.; Eller, G.; Zadrazil, F.; Lignocellulose Decomposition and Production of Ligninolytic Enzymes During Interaction of White Rot Fungi with Soil Microorganisms. *Microbial Ecology*. 1997, 34 (1) 1-10.
18. Vaithiyanathan, S.; Mishra, A. S.; Prasad, R.; Tripathi, M. K.; Misra, A. K.; Chaturvedi, O. H. Remazol brilliant blue reactive dye decolouration and mustard straw utilization by white rot fungi. *Indian Journal of Biotechnology*., 2005; 4 (1) 144-148.

19. Van Der Merwe, J. J. *Production of laccase by the white-rot fungus Pycnoporus sanguineus*. Dissertação de mestrado, University of the Free State, Bloemfontein, South Africa, 2002; 125.
20. Garcia, T. A. *Produção e caracterização de duas lacases do Fungo Pycnoporus sanguineus*, Tese de doutorado, Universidade de Brasília, 2006.
21. Durán, N.; Esposito, E. In Microbiologia Ambiental (I.S. De Melo and J.L. De Azevedo, Eds.) *EMBRAPA Publ.* 1997; 268.
22. Hofrichter, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. 2002; 30: 454-466.
23. Sundaramoorthy, M.; Kishi, K., Gold, M. H.; Poulos, T. L. Crystal Structures of Substrate Binding Site Mutants of Manganese Peroxidase. *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. 1997; 28: 17574.
24. Edwards, W.; Leukes, W.D.; Bezuidenhout, J.J. Ultrafiltration of petrochemical industrial wastewater using immobilised manganese peroxidase and laccase: application in the defouling of polysulphone membranes. *Desalination*. 2002; 149: 275-278.
25. López, C., Moreira, M. T., Feijoo G., Lema, J. M. Dye Decolorization by Manganese Peroxidase in an Enzymatic Membrane Bioreactor, *Biotechnology. Prog.* 2004; 20: 74-81.
26. Steffen, K. T.; Hatakka, A.; Hofrichter, M. Degradation of Benzo[a]pyrene by the Litter-Decomposing Basidiomycete *Stropharia coronilla*: Role of Manganese Peroxidase. *Applied And Environmental Microbiology*. 2003; 69 (7): 3957-3964
27. Kirk, T.K., Schultz, E., Connors, W.J., Lorenz, L.F.; Zeikus, J.G. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology*. 1978; 117: 277-285.
28. Edwards, S. L.; Raag, R.A.; Warshii, H.; Goldt, M. H.; Poulos, T. L. Crystal structure of lignin peroxidase. *Proclamation National Academy Science USA - Biochemistry*. 1993; 90: 750-755.

29. APHA, AWWA and WPCF *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Eaton, A.D; Clesceri, L. S., Greenberg, A. E. (Eds.). 19<sup>th</sup> Edition American Public Health Association, 1995.
30. Szklarz, G. D.; Antibus, R. K.; Sinsabaugh, R. L; Linkins, A. E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycology*. 1989; 81: 234.
31. Tien, M.; Kirk, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Science*. 1984; 81: 2280-2284.
32. Kumahara, M.; Glenn. J.K.; Morgan, M.A.; Gold, M.H. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*. 1984; 169: 242-250.
33. Santiago, M. F. Estudo De Substâncias De Baixa Massa Molar Que Mimetizam As Fenoloxidas Com Aplicações Em Tratamentos De Efluentes Industriais, Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas, 1999.
34. Aquino, S. F. Caracterização da DQO Efluente de Sistemas de Tratamento Biológico. *Engenharia Sanitária e Ambiental*. 2003; 8 (3): 135-144.
35. Belinky, P. A.; Flikshtein, N.; Lechenko, S.; Gepstein, S.; Dosoretz, C. G. Reactive Oxygen Species and Induction of Lignin Peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology*. 2003; 69 (11): 6500-6506.
36. Wesenberg, D., Kyriakides, I.; Agathos. S.N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*. 2003; 22: 161-187.
37. Palmieri, G.; Giarina, P; Marzullo, L; Desiderio, B.; Nitti, G.; Cannio, R.; Sannia, G. Stability and activity of phenol oxidase from Lignolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 1993; 39: 632-636.

Rabelo, J.B., Campos, L.C. Sales, P.T.F. Lacerda, M.F.A.R. Santiago, M.F. Revista Eletrônica de Farmácia Vol. X (1), 27 - 50, 2013.

38. Songulashvili, G.; Elisashvili, V.; Wasser, S. P.; Nevo, E.; Hadar Y. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007; 41: 1-2, 57-61.

39. Tsujiyama, S-I.; Minami, M. Production of phenol-oxidizing enzymes in the interaction between white-rot fungi *Mycoscience*. 2005; 46 (4) 268-271.