

CARLOS ROBERTO SOBRINHO DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO E DETOXIFICAÇÃO DE
CORANTES UTILIZADOS EM INDÚSTRIA TÊXTIL POR FUNGOS ISOLADOS DE
SEDIMENTO DO PARQUE NACIONAL DA SERRA DA CAPIVARA (PI)**

PPGVS/INCQS

FIOCRUZ

2008

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO E DETOXIFICAÇÃO DE
CORANTES UTILIZADOS EM INDÚSTRIA TÊXTIL POR FUNGOS ISOLADOS DE
SEDIMENTO DO PARQUE NACIONAL DA SERRA DA CAPIVARA (PI)**

Carlos Roberto Sobrinho do Nascimento

**Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz**

**Dr^a. Manuela da Silva
Orientadora**

**Rio de Janeiro
2008**

Folha de Aprovação

Avaliação do Potencial de Descoloração e Detoxificação de Corantes Utilizados em Indústria Têxtil por Fungos Isolados de Sedimento do Parque Nacional da Serra da Capivara (PI).

Carlos Roberto Sobrinho do Nascimento

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

_____ (FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Maria Helena Simões Villas Boas

_____ (UNICAMP)

Prof^a. Dr^a. Lara Durães Sette

_____ (INT)

Prof^a. Dr^a. Viridiana Santana Ferreira-Leitão

Orientadora: _____

Prof^a. Dr^a. Manuela da Silva

Rio de Janeiro

2008

Ficha Catalográfica

Nascimento, Carlos Roberto Sobrinho do

Avaliação do Potencial de Descoloração e Detoxificação de Corantes Utilizados em Indústria Têxtil por Fungos Isolados de Sedimento do Parque Nacional da Serra da Capivara (PI)/ Carlos Roberto Sobrinho do Nascimento. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2008.

xvii, 80p., il., tab.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2008. Orientadora: Manuela da Silva.

1. biorremediação 2. fungos 3. *Candida rugosa* 4. corantes têxteis 5. azo corantes. I. Título.

“Evaluation of the Potential of Decolorization and Detoxification of Dyes Used in Textile Industry by Fungi Isolated from Sediments from the Serra da Capivara National Park (PI)”

Dedico aos amores da minha vida:

Tia Aracy (in memorian),

Papai (in memorian), Mamãe e

a meus queridos irmãos,

sem os quais não seria possível.

Agradecimentos

Enfim chegou o momento de agradecer a todos que de forma muito especial contribuíram para além deste trabalho...

Ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, por acreditar na importância deste tema.

Ao Departamento de Microbiologia (DM) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, que me concedeu as condições necessárias para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À minha amiga, e nesta etapa orientadora, Prof^a. Dr^a Manuela da Silva que confiou no meu potencial em todos os momentos e me ofereceu apoio e segurança para seguir adiante.

Aos queridos amigos Claudia Souto, Ana Paula Alcides, Elias da Silva, Rafael Vasconcellos e Elisa Ladeira (Setor de Esterilidade - DM) que acreditaram em mim e, por vezes, tiveram que se doar um pouco mais nas atividades do setor devido minha ausência.

À querida Marília pela sua contribuição valorosa e seu apoio que juntamente com Miguel me receberam com muito afeto no Setor de Fungos.

À Ludmila pelo carinho e por estarmos juntos compartilhando o caminho para esta conquista.

Ao José Marcos, Will Robson, Cátia do Nascimento e Eliete da Silva (Setor de Meio de Cultura - DM); Francisco Malaquias, Sineide de Souza, Mônica Almeida e Jorge Santana (Central de Esterilização - DM), pois sem o apoio de vocês tudo seria mais difícil.

À Carla Rosas, Valéria Medeiros e Márcia Warnken (Setor de Alimentos - DM); Neide Miyazaki, Bruna Sabagh e Leilce Muniz (Setor de Saneantes - DM); Sinéa Andrade, Filipe da Silva, Claudia Conceição, Laura Calarrara e Ana Corrêa

(Setor Imunobiológicos – DQ); M^a Heloísa Moraes e Rosana dos Santos (Setor de Resíduos Micotoxinas – DQ) por me permitirem compartilhar seus espaços de trabalho, onde sempre fui gentilmente recebido.

À equipe do Laboratório de Ecologia Gustavo de Oliveira Castro – Departamento de Endemias Samuel Pessoa (ENSP – FIOCRUZ), em especial a Marcia Chame e Martha Brandão pelas coletas de sedimento.

À equipe do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (IOC – FIOCRUZ), em especial a Danielly Paiva, pela colaboração nas análises toxicológicas.

A DyStar pela doação dos corantes.

À Prof^a. Dr^a. Viridiana Ferreira-Leitão, pelos conhecimentos compartilhados e pela atenção dedicada.

À vó Deisy e Moyses pelo apoio espiritual.

À Marise, Luciene, Alessandra, Cristianne, Fernanda, Glauca e Renata, flores raras colhidas durante meu caminho profissional.

Ao Beto e Ricardo, por me permitir estar presente em suas vidas de forma tão intensa.

Às minhas cunhadas Suelen e Fernanda pelo carinho.

À minha vó Mercedes, uma inspiração de força.

À minha família, Mamãe (Kédima) e meus irmãos (Luiz e Mario), meu porto seguro onde sempre sou acolhido com muito amor.

Ao meu sobrinho Bernardo, luz na minha vida.

A todos meus queridos amigos, que me acompanham e torcem por mim, alguns de longa data: Kreisy, Leonardo, Felipe, Viviane, Mônica, Kleidy, Valesca, minha madrinha Guacira, minha prima Marília, outros mais recentes, mas não menos importantes: Mila, Marcos, Regina, Heloísa e todos aqueles, que por acaso não citei os nomes, mas que estão gravados em meu coração... Sempre!

Obrigado meu Deus por permitir em meu caminho pessoas tão especiais!

Resumo

O ambiente tem sido fortemente impactado por uma diversidade de poluentes, principalmente, devido ao crescimento populacional e ao aumento da atividade industrial. Neste contexto, a contaminação de corpos d'água por efluentes de indústrias têxteis tem tido destaque, pois os efluentes produzidos por este setor são constituídos por uma complexa mistura de poluentes. Os corantes mais extensivamente usados, os do tipo azo, quando lançados no meio aquático sofrem degradação podendo gerar aminas aromáticas e benzidinas, potentes agentes carcinogênicos e mutagênicos que além de afetar o ambiente podem causar danos à saúde humana. A persistência de resíduos perigosos no ambiente é um problema público que leva à necessidade da atuação de segmentos relacionados à Saúde Pública, inclusive a Vigilância Sanitária, na eliminação ou mitigação das conseqüências adversas decorrentes deste processo. A seleção de fungos capazes de descolorir e detoxificar esses corantes é uma alternativa promissora para substituir ou complementar os tratamentos convencionais. Sedimentos de vinte reservatórios de água do Parque Nacional da Serra da Capivara, área de preservação ambiental encravado na caatinga no Estado do Piauí, com clima semi-árido, foram avaliados com o objetivo de selecionar consórcios de fungos com capacidade de descolorir e detoxificar três azo corantes (Vermelho Reativo 198, Azul Reativo 214 e Vermelho Reativo 141), e destas amostras de sedimento selecionar fungos que apresentem esta mesma capacidade isoladamente. As culturas de fungos em consórcio oriundas do Caldeirão Escuridão foram as mais eficientes na descoloração e detoxificação dos três corantes. A partir deste consórcio foi possível isolar três fungos identificados como *Candida rugosa*, *Trichosporon ovoides* e *Mucor* sp. Destes isolados a levedura *C. rugosa* apresentou importantes resultados de descoloração e detoxificação quando comparada à cepa de referência *Lentinula edodes*. *C. rugosa* foi mais eficiente na descoloração de dois dos corantes testados e obteve melhor desempenho na detoxificação dos três corantes frente a *L. edodes*. Este é o primeiro trabalho descrevendo a capacidade de *C. rugosa* tanto na degradação quanto na detoxificação de corantes têxteis. Assim, este fungo se apresenta como um potencial agente na biorremediação de efluentes têxteis.

Abstract

The environment has been heavily impacted by a variety of pollutants, mainly due to population growth and increased industrial activity. In this context, the contamination of bodies of water by effluents from textile industries has been highlighted as the effluent produced by this sector consists of a complex mixture of pollutants. The dyes used more extensively, of the azo type, when released into the aquatic environment suffer degradation and can generate aromatic amines and benzidines, potent carcinogenic and mutagenic agents that besides affecting the environment can cause damage to human health. The persistence of hazardous waste on the environment is a public problem that leads to the need of the action of segments related to Public Health, including the Health Surveillance, in the elimination or mitigation of the adverse consequences resulting from this process. The selection of fungi capable of decolorization and detoxification of these dyes is a promising alternative to replace or supplement the conventional treatments. Sediments of twenty water wells of the Serra da Capivara National Park, area of environmental preservation in the caatinga in the State of Piauí, with semi-arid climate, were evaluated with the objective of selecting consortia of fungi capable of decolorization and detoxification three azo dyes (Reactive Red 198, Reactive Blue 214 and Reactive Red 141), and from these samples of sediment to select fungi that have this same ability individually. The cultures of fungi in the consortium from Caldeirão Escuridão were the most efficient in the decolorization and detoxification of the three dyes. From this consortium it was possible to isolate three fungi identified as *Candida rugosa*, *Trichosporon ovoides* and *Mucor* sp. Of these isolates the yeast *C. rugosa* presented important results of decolorization and detoxification when compared to the reference strain *Lentinula edodes*. *C. rugosa* was more efficient in decolorization of two of the tested dyes and obtained better performance in the detoxification of the three dyes vs. *L. edodes*. This is the first work describing the ability of *C. rugosa* both in the degradation and in the detoxification of textile dyes. Therefore, this fungus is a potential agent in the bioremediation of textile effluents.

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema genérico do ciclo catalítico de peroxidases.	13
Figura 2. Ciclo catalítico das lacases.	14
Figura 3. Mapa com a localização do Parque Nacional da Serra da Capivara no Estado do Piauí.....	22
Figura 4. Coleta nos reservatórios de água no Parque Nacional da Serra da Capivara.	23
Figura 5. Estruturas dos corantes: a. Vermelho Reativo 198; b. Azul Reativo 214; c. Vermelho Reativo 141.....	26
Figura 6. Esquema da pré-seleção de fungos capazes de descolorir os corantes.	27
Figura 7. Esquema de preparo das culturas para leitura em espectrofotômetro.....	28
Figura 8. Esquema do estudo de descoloração e detoxificação em meio líquido.....	30
Figura 9. Percentual de descoloração, do corante VR198, das culturas obtidas das amostras de sedimento ao final de 7 dias de incubação.....	38
Figura 10. Culturas das amostras descoloridas e controle do corante VR198: A1 – CG; A2 – CM; A3 – OAG; A4 – OAC; A5 – controle e B1- BFPB; B2 – CJ; B3 – CMZ; B4 – OASB; B5 – controle.....	39
Figura 11. Percentual de descoloração do corante VR198 das culturas das amostras pré-selecionadas liofilizadas, após 7 dias de incubação.....	40
Figura 12. Comparação dos percentuais de descoloração do corante VR198 das amostras pré-selecionadas congeladas a -70°C (submetidas e não submetidas ao corante), após 7 dias de incubação.	41
Figura 13. Comparação dos percentuais de descoloração, do corante AR214, das amostras pré-selecionadas congeladas a -70°C e liofilizadas, após 7 dias de incubação.....	43
Figura 14. Comparação dos percentuais de descoloração, do corante VR141, das amostras pré-selecionadas congeladas a -70°C e liofilizadas, após 7 dias de incubação.....	43
Figura 15. Culturas descoloridas da amostra CE, para os corantes A– VR198; B– AR214; C– VR141, após 7 dias de descoloração, onde 1 e 3 se referem aos meios descoloridos e 2 aos controles.....	44
Figura 16. Percentual de descoloração, do corante VR198, pelos isolados das culturas da amostra CE.	47
Figura 17. Desempenho de descoloração, do corante VR198, pelos isolados CE-3, CE-5 e CE-9, durante os 7 dias de incubação.....	47

Figura 18. Comparação dos percentuais de descoloração, dos três corantes, por <i>C. rugosa</i> e <i>L.edodes</i> , durante os 7 dias de incubação. A – corante VR198, B – corante AR214 e C – corante VR141.	51
Figura 19. Culturas descoloridas por <i>C. rugosa</i> , para os corantes A– VR198; B– AR214; C– VR141, após 7 dias de incubação, onde 1 e 3 se referem aos meios descoloridos e 2 aos controles.....	52
Figura 20. Culturas descoloridas por <i>L. edodes</i> , para os corantes A– VR198; B– AR214; C– VR141, após 7 dias de incubação, onde 1 e 3 se referem aos meios descoloridos e 2 aos controles.....	52
Figura 21. Comparação da adsorção pela biomassa e descoloração do corante AR214 por <i>L. edodes</i> no 3° (A) e 7° (B) dia de incubação.....	53
Figura 22. Comparação dos sobrenadantes e da biomassa precipitada dos três corantes: 1. AR214; 2. VR141 e 3. VR198 por <i>C. rugosa</i> (A) e <i>L.edodes</i> (B), após 7 dias de incubação.....	54
Figura 23. Pseudo-hifas de <i>C. rugosa</i> (CE-9).	61

Lista de Quadros

Quadro 1. Vantagens e desvantagens dos métodos físicos e químicos utilizados para remoção de corantes de efluentes industriais.	9
Quadro 2. Locais e dados abióticos das amostras de sedimento.	24
Quadro 3. Descrições dos corantes utilizados.	26
Quadro 4. Isolados das culturas de CE, e suas características macroscópicas e microscópicas.	45
Quadro 5. Resultados das caracterizações fisiológicas e bioquímicas dos isolados	62

Lista de Tabelas

Tabela 1. Espectros das culturas descoloridas por <i>C. rugosa</i> comparadas aos controles dos corantes utilizados.	54
Tabela 2. Parâmetros físico-químicos pré-analisados, $FT_{D(24h)}$ e percentual de redução de toxicidade dos meios com VR198 descoloridos pelas culturas das amostras pré-selecionadas.	55
Tabela 3. Parâmetros físico-químicos pré-analisados, $FT_{D(24h)}$ e percentual de redução de toxicidade dos meios com VR198 descoloridos pelas culturas das amostras CE e CDG selecionadas após avaliação do método de crio-preservação.	56
Tabela 4. Parâmetros físico-químicos pré-analisados, $FT_{D(24h)}$ e percentual de redução de toxicidade dos meios com AR214 descoloridos pela cultura da amostra CE.	57
Tabela 5. Parâmetros físico-químicos pré-analisados, $FT_{D(24h)}$ e percentual de redução de toxicidade dos meios com VR141 descoloridos pela cultura da amostra CE.	57
Tabela 6. Parâmetros físico-químicos pré-analisados, $FT_{D(24h)}$ e percentual de redução de toxicidade dos meios descoloridos de VR198, por <i>C. rugosa</i> e <i>L. edodes</i>	58
Tabela 7. Parâmetros físico-químicos pré-analisados, $FT_{D(24h)}$ e percentual de redução de toxicidade dos meios descoloridos de VR141, por <i>C. rugosa</i> e <i>L. edodes</i>	58
Tabela 8. Parâmetros físico-químicos pré-analisados, $FT_{D(24h)}$ e percentual de redução de toxicidade dos meios descoloridos de AR214, por <i>C. rugosa</i> e <i>L. edodes</i>	59

Siglas e Abreviaturas

AR214 – Azul Reativo 214

BFPB – Bebedouro do Fundo do Pinga do Boi

BPE – Bebedouro Pinga da Escada

BHI – Infusão de cérebro-coração

CA – Caldeirão Apertado

CBI – Caldeirão da Barriguda I

CBII – Caldeirão da Barriguda II

CE – Caldeirão da Escuridão

CG – Caldeirão da Geladeira

CM – Caldeirão da Muriçoca

CDG – Caldeirão Deolindo Gongo

CAM – Caldeirão do Abel da Minhosa do Zé Carlos

CD – Caldeirão do Desfiladeiro

CJ – Caldeirão do Jacinto

CP – Caldeirão do Perna

CVM – Caldeirão do Veado Morto

BPF – Caldeirão Esquerdo do Fundo do Boqueirão da Pedra Furada

CMZ – Caldeirão Manuel Zuza

CV – Centro de Visitantes

cm – Centímetros

cm² – Centímetro Quadrado

CYA – Ágar Czapek Extrato de Levedura

EC – Enzyme Commission (Comissão de Enzima)

ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FT – Fator de Toxicidade

Fumdam – Fundação Museu do Homem Americano

g – Grama

h – Horas

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

ha – Hectare

HCl – Ácido Clorhídrico

IMSEAR – Instituto Virtual do Milênio do Semi-Árido

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade um Saúde

INT – Instituto Nacional de Tecnologia

Km – Quilômetros

KNO₃ – Nitrato de Potássio

L⁻¹ – por Litro

LiP – Lignina Peroxidase

m - Metro

MEA – Ágar Extrato de Malte e Peptona

mg – Miligrama

min. – minutos

mL – Mililitro

mm – milímetros

MnP – Manganês Peroxidase

NaNO₂ – Nitrito de Sódio

NaOCl – Hipoclorito de sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NBR – Norma Brasileira

nm – Nanômetros

°C – Graus Celsius

OD – Oxigênio Dissolvido

OAC – Olho d'Água do Cumbre

OAG – Olho d'Água Gongo
OASB – Olho d'Água Serra Branca
PDA – Ágar Batata Dextrose
PDB – Caldo Batata Dextrose
pH – Potencial Hidrogeniônico
rpm – Rotações por Minuto
SDB – Caldo Sabouraud Dextrose
SUS – Sistema Único de Saúde
Temp. - Temperatura
UFC – Unidade Formadora de Colônia
UTM – Sistema Universal Transverso Mercator
UV – Ultra Violeta
VIS – Visível
VISA – Vigilância Sanitária
VR141 – Vermelho Reativo 141
VR198 – Vermelho Reativo 198
YBC – Carta Bioquímica de Leveduras
YCB – Base de Carbono para Leveduras
YMA – Ágar Extrato de Levedura e Extrato de Malte
YNB – Base de Nitrogênio para Leveduras
YVFB – Base Livre de Vitaminas para Leveduras
 μm – Micrômetro

Sumário

1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivos Gerais	19
2.2. Objetivos Específicos.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Coleta das Amostras de Sedimento	21
3.2. Meios de Cultura e Reagentes.....	25
3.3. Pré-seleção de Fungos Presentes nas Amostras de Sedimento Capazes de Descolorir os Corantes.....	26
3.4. Preservação das Culturas das Amostras de Sedimentos Seleccionadas.....	28
3.5. Isolamento dos Fungos Filamentosos e Leveduras.....	29
3.6. Estudo de Descoloração em Meio Líquido	30
3.7. Avaliação Toxicológica do Meio de Cultura Pós-tratamento Fúngico	31
3.8. Identificação dos Fungos	31
3.8.1. Fungos Filamentosos	32
3.8.2. Leveduras	32
3.8.2.1. Termotolerância.....	32
3.8.2.2. Teste da Urease	33
3.8.2.3. Fermentação de Carboidratos.....	33
3.8.2.4. Assimilação de Compostos de Carbono	33
3.8.2.5. Assimilação de Compostos Nitrogenados.....	34
3.8.2.6. Crescimento em Meio de Cultura na Ausência de Vitaminas	35
3.8.2.7. Sensibilidade à Cicloheximida.....	35
3.8.2.8. Formação de Compostos a Amilóides Extracelulares.....	35
3.8.2.9. Análise por Vitek.....	35
3.9. Preservação dos Fungos Filamentosos e Leveduras Isoladas.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. Pré-Seleção	38
4.2. Isolamento	44
4.3. Descoloração dos Isolados e <i>L. edodes</i> em Meio Líquido.....	46
4.4. Ensaio Toxicológico	55
4.4.1. Culturas das Amostras de Sedimento.....	55
4.4.2. <i>C. rugosa</i> e <i>Lentinula edodes</i>	58
4.5. Identificação.....	60
5. CONCLUSÃO	65
6. PERSPECTIVAS	68
7. REFERÊNCIAS	70

*“Quando chegar o momento
de vocês deixarem o mundo,
não tenham a preocupação
de terem sido bons.
Isto não é o bastante!
Deixem o mundo bom!”*
Brecht

1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os problemas ambientais têm se tornado cada vez mais críticos e freqüentes, principalmente devido ao desmedido crescimento populacional e ao aumento da atividade industrial. Com estes ingredientes os danos causados pela ação antrópica têm atingido dimensões catastróficas, podendo ser observados através de alterações na qualidade do solo, ar e água (KUNZ et al., 2002).

São evidentes os sinais de deterioração do ambiente na escala planetária. A destruição de ecossistemas, a contaminação crescente da atmosfera, solo e água, bem como o aquecimento global são exemplos dos impactos das atividades humanas sobre o ambiente (BARCELLOS & QUITÉRIO, 2006). Com a Revolução Industrial no final do século XVIII, a produção de resíduos intensificou-se devido à mecanização dos processos de produção. Além da geração de resíduos sólidos, houve a geração de efluentes líquidos e compostos voláteis resultantes de processos industriais (DIAS, 2000).

Esses problemas são exacerbados em situações locais em que se acumulam fontes de risco advindas de processos produtivos passados ou presentes, como a disposição inadequada de resíduos industriais, a contaminação de mananciais de água e as más condições de trabalho e moradia. Não raro esses problemas interagem sobre grupos populacionais vulneráveis (BARCELLOS & QUITÉRIO, 2006).

Poluentes ambientais são gerados devido à precariedade da disposição e tratamento destes resíduos, além da aceleração dos processos industriais e agrícolas contribuindo para contaminação de inúmeras áreas em todo mundo (DIAS, 2000). Esses poluentes são uma potencial ameaça à saúde pública e ao ambiente (da SILVA & ESPOSITO, 2004).

Nos Estados Unidos foram identificados mais de 25 mil lugares contaminados com resíduos perigosos provenientes de despejos inapropriados, derramamentos ou estocagem (SKINNER apud DIAS, 2000, p.80). No Brasil não há estimativas sobre o

número de áreas contaminadas por resíduos perigosos. Entretanto mesmo que um resíduo não seja caracterizado como perigoso, se não tratado de maneira adequada, fatalmente tornar-se-á fonte de contaminação ambiental e risco à saúde (DIAS, 2000).

Para prevenir os riscos à saúde é necessário conhecimento das possíveis causas das doenças e os mecanismos pelos quais os indivíduos se defrontam com os elementos causais. Este conhecimento pode levar a um processo de recomendação de ações sanitárias que prevê medidas e atividades fundamentadas cientificamente para a prevenção de doenças (TAMBELLINI & CÂMARA, 2002).

Entre os profissionais da área de saúde coletiva vem crescendo o conhecimento sobre a relação categoria ambiente e o padrão de saúde/doenças das populações. A área de saúde coletiva incorporou a saúde ambiental entre suas questões prioritárias, coincidindo com uma maior preocupação nos meios acadêmicos com problemas de saúde relacionados ao ambiente, além do crescimento e maior visibilidade dos movimentos ecológicos (TAMBELLINI & CÂMARA, 2002).

A Lei Orgânica da Saúde (Lei nº. 8080/90) inclui como campo de atuação do Sistema Único de Saúde (SUS) a colaboração na proteção do ambiente, nele compreendido o do trabalho, além de integralizar em nível executivo as ações de saúde, ambiente e saneamento básico.

Esta Lei, também, define Vigilância Sanitária (VISA) como “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde” e compreendendo que a integração saúde-ambiente é a mais perfeita tradução dos ideais da promoção da saúde, cabe à Vigilância Sanitária reconhecer a complexidade da tarefa com a qual se defronta que é a de garantir simultaneamente a permanência das condições ambientais favoráveis à saúde, já conquistadas nas sucessivas etapas do desenvolvimento, e atuar na eliminação ou mitigação das conseqüências adversas decorrentes desse mesmo desenvolvimento (QUITÉRIO, 2005). Embora não se consiga comprovar de forma inequívoca a amplitude e a extensão de riscos à saúde causados por alguns problemas ambientais, sua existência não pode ser descartada (TAYRA & RIBEIRO, 2005).

Existem riscos à saúde em incontáveis áreas de produção. A persistência de resíduos perigosos no ambiente é um problema público, científico e de interesse regulatório devido ao potencial tóxico, mutagênico, carcinogênico e à capacidade de bioacumulação destes compostos (SEMPLE et al., 2001).

A água é um recurso valioso, cada vez mais escasso devido ao acentuado crescimento populacional, ao uso indiscriminado, à elevação dos padrões de vida e à contaminação de toda ordem. Devido à sua abundância, sob as mais diversas formas, às vezes, torna-se difícil avaliar a sua importância e embora sendo renovável, há um limite na disponibilidade mundial de recursos hídricos (da SILVA & ESPOSITO, 2004).

Sem dúvida, a contaminação de águas naturais tem sido um dos grandes problemas da sociedade moderna. A economia de água em processos produtivos vem ganhando especial atenção devido ao valor agregado que tem sido atribuído a este bem, através de princípios como consumidor pagador e poluidor pagador incorporados em nossa legislação, através da Lei nº. 9433/97. Dentro deste contexto, o setor têxtil apresenta um especial destaque, devido ao seu grande parque industrial instalado gerar grandes volumes de efluentes, os quais, quando não corretamente tratados, podem causar sérios problemas de contaminação ambiental (KUNZ et al., 2002).

A cor na água pode ser tanto resultado de um fenômeno natural, como a presença de substâncias húmicas, íons metálicos naturais, por exemplo, ferro e manganês, e / ou plâncton; ou também pode resultar de um fenômeno artificial como a presença de corantes e pigmentos de processos industriais têxteis, químicos e/ou farmacêuticos que podem descartar grandes quantidades de águas residuais coloridas nos corpos d'água (dos SANTOS et al., 2007).

Dejetos hídricos provenientes de indústrias têxteis são uma complexa mistura de várias substâncias poluentes como metais pesados, pigmentos e corantes (COULIBALY et al., 2003). O interesse no potencial de poluição de corantes têxteis tem sido primariamente apontado devido a possíveis problemas à saúde e ao ambiente (BANAT et al., 1996). Efluentes descartados por indústrias de corantes, se não forem tratados adequadamente, podem conter grandes quantidades de compostos químicos perigosos (CHEN & HWANG, 1997).

Colorantes (corantes e pigmentos) são importantes compostos químicos industriais e de acordo com a nomenclatura tecnológica abrangem os pigmentos que são colorantes insolúveis no meio de aplicação e corantes que são usados na forma solúvel (GOLKA et al., 2004). Mais de 7×10^7 toneladas de corantes são produzidas por ano mundialmente, destes 10% são lançados na forma de efluentes industriais (VAIDYA & DATYE, 1982).

A molécula do corante, utilizada para tingimento da fibra têxtil, pode ser dividida em duas partes principais, o grupo cromóforo que confere cor e a estrutura responsável pela fixação à fibra (KUNZ et al., 2002).

Colorantes podem ser classificados usualmente em duas classes, uma de acordo com sua estrutura química e outra de acordo com o método de aplicação (CHRISTIE, 2001).

Para a indústria têxtil, que faz uso dos corantes para fibras distintas, a classificação pelo método de aplicação é de maior interesse do que a classificação química. São oito os principais grupos de corantes classificados pelo modo de fixação: corantes ácidos, corantes mordentes e pré-metalizados para fibras protéicas, corantes diretos, corantes reativos, e corantes à cuba para fibras celulósicas, corantes dispersivos para poliéster e corantes básicos para fibras acrílicas (CHRISTIE, 2001).

Destes destacam-se os corantes reativos baseados em cromóforos azo que se caracterizam por apresentarem um ou mais grupamentos $-N=N-$ ligados a sistemas aromáticos e que diferem de todas as outras classes de corantes, uma vez que se ligam a fibras têxteis, tais como algodão, através de ligações covalentes. Os corantes azo têm características favoráveis de cor brilhante, lavagem rápida, técnicas simples de aplicação com baixo consumo de energia e, portanto são usados extensivamente em indústrias têxteis. Entretanto os métodos utilizados para remoção destes corantes de efluentes não apresentam resultados satisfatórios devido à sua origem sintética e principalmente pelos complexos aromáticos em sua estrutura molecular (BROWN & DEVITO, 1993; KUNZ et al., 2002; AKSU & DÖNMEZ, 2003; LEE & PAVLOSTATHIS, 2004).

Adicionalmente, alguns problemas envolvendo a classe de corantes reativos são preocupantes, principalmente se considerarmos que este grupo de corantes constitui-se em um dos mais utilizados no Brasil para a tintura de algodão.

Até metade do século XIX, todos os corantes eram derivados de folhas, ramos, raízes, frutos ou flores de várias plantas e substâncias extraídas de animais. Com o aumento das inovações tecnológicas, por volta de 1915 a Alemanha manteve o monopólio sobre a produção de corantes sintéticos até a Segunda Guerra Mundial. Hoje a indústria de corantes dos Estados Unidos é a maior fonte exportadora destes produtos, colocando no mercado aproximadamente 2000 tipos diferentes de corantes sintéticos (GUARATINI & ZANONI, 2000).

Desde o descobrimento do Brasil, sua história tem estado relacionada à produção de corantes. A começar pelo nome do país, uma vez que este é proveniente da madeira “Pau-Brasil”, fonte natural de corante avermelhado. Durante grande parte do século XIX, o Brasil também foi grande produtor do índigo natural (extraído da *Indigofera tinctoria*). A produção industrial de corantes sintéticos no país foi introduzida logo após a Primeira Guerra Mundial e atualmente supre 60% da sua demanda doméstica.

Atualmente, seguindo uma tendência mundial, a indústria de corantes no Brasil tem dedicado grande esforço para atender às regras de proteção ambiental. Além do fato da aplicação destes corantes no processo de tintura constituir um problema efetivo a atividade de fiscalização torna-se difícil, uma vez que grande porcentagem destas indústrias são pequenas empresas (GUARATINI & ZANONI, 2000).

Segundo dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior – MDIC, em estudo publicado em 2005, o Brasil ocupa o terceiro lugar em produção de tecidos de malha e detém a sétima colocação como produtor de fios e tecidos planos, constituindo um setor de importância na economia nacional (BRUNO & MALDONADO, 2005). Aproximadamente 75% das indústrias têxteis estão localizadas na região sul (Santa Catarina), sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e nordeste (Pernambuco, Bahia e Ceará) (GUARATINI & ZANONI, 2000).

Os efluentes destas indústrias são altamente coloridos e a disposição dos resíduos nas águas de recebimento podem ser tóxicos para a vida aquática devido à presença de metais, compostos clorados, etc. (AKSU & DÖNMEZ, 2003). Em adição, o lançamento não controlado dos resíduos, em maior ou menor nível de concentração, fatalmente interferirá na absorção da luz pelos habitantes vegetais e animais do ambiente aquático, na potencial acumulação e/ou ainda no transporte

para a estação de tratamento de águas municipais (principalmente os corantes com alta solubilidade em água), contribuindo para a contaminação dos mananciais e da água distribuída à população (GUARATINI & ZANONI, 2000).

Condições e padrões para o lançamento de efluentes são estabelecidos, no Brasil, pela Resolução nº. 357, de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e atendendo ao disposto nesta resolução o efluente não deverá possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente e esses critérios devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados.

O interesse no potencial poluente dos corantes e compostos intermediários, foi primeiramente levantado pela preocupação com a sua putativa toxicidade e carcinogenicidade, principalmente devido ao fato de muitos corantes serem fabricados a partir de substâncias cancerígenas conhecidas, como a benzidina, naftaleno e outros compostos aromáticos (ANJANEYULU et al., 2005). A clivagem redutiva de ligações azo é responsável pela formação de aminas tóxicas nos efluentes (FU & VIRARAGHAVAN, 2001).

É importante salientar que, a adequação de qualquer método de tratamento para degradação do corante será mais efetiva, fácil e barata se realizada na estação de tratamento da indústria, isto é, antes de atingir os mananciais (GUARATINI & ZANONI, 2000). O aumento da diluição destes compostos na presença de outras descargas de origem industrial e doméstica em sistemas de esgoto comum exigiria procedimentos muito mais drásticos, sensíveis e caros para identificação e remoção específica dos corantes.

Assim, o desenvolvimento de tratamentos e tecnologias mais adequados para remoção da cor e redução da toxicidade de efluentes industriais é uma necessidade urgente. O desenvolvimento das tecnologias de descoloração logicamente depende de um bom conhecimento científico. Atendendo às necessidades técnicas e econômicas, várias novas tecnologias envolvendo processos físicos, químicos e biológicos estão sendo propostas e testadas em diferentes estágios de comercialização. Entretanto, uma ampla validação e integração dos diferentes métodos aos esquemas de tratamento atuais serão necessárias para tornar essas

tecnologias simultaneamente eficientes e economicamente viáveis (ANJANEYLU et al., 2005).

Os métodos correntes são diversos e incluem processos químicos oxidativos (ozonização, fotoquímico, NaOCl, reagentes Fentons, cucurbituril e destruição eletroquímica); processos físicos de adsorção (carbono ativado, turfa, pedaços de madeira e outros materiais) e ainda filtração por membrana, troca iônica, irradiação e coagulação eletrocinética. O Quadro 1 apresenta vantagens e desvantagens de alguns destes métodos (ROBINSON et al., 2001; ANJANEYLU et al., 2005).

O tratamento de águas residuais de algumas indústrias, geralmente, utiliza a combinação de tratamentos primários, secundários e terciários. O tratamento primário também chamado purificação mecânica, remove os constituintes mais grosseiros. O tratamento secundário degrada a matéria orgânica em colóides. O tratamento terciário tenta limitar a presença de microrganismos e outros patógenos no tratamento de água através de filtração por membranas ou filtros e alguma forma de desinfecção usando cloro, ozônio ou ultravioleta (DE CLERCQ, 2006).

Durante o tratamento secundário utiliza-se o processo de lodo ativado, que recebeu este nome devido à produção de uma massa ativa de microrganismos capazes de estabilizar águas residuais aerobicamente (DE CLERCQ, 2006). Entretanto, lodo ativado e outros tipos de bioreatores não são eficientes para a remoção da cor e de outros micropoluentes presentes em efluentes industriais (ANJANEYLU et al., 2005). Além disso, existem outras limitações, dentre elas: quantidade excessiva de produtos químicos usados; acúmulo de lodo que se torna crítico, uma vez que a concentração de corantes adsorvida é bastante elevada, impedindo qualquer possibilidade de reaproveitamento; custo operacional e plantas caras; pouca eficiência quando há uma maior diversidade de resíduos, além dos corantes (KUNZ et al., 2002; AKSU, 2005).

Quadro 1. Vantagens e desvantagens dos métodos físicos e químicos utilizados para remoção de corantes de efluentes industriais.

Métodos Físicos/Químicos	Vantagens	Desvantagens
Reagentes Fentons	Efetivo na descolorização de corantes solúveis e insolúveis	Geração de lodo
Ozonização	Aplicado em estado gasoso: não há alteração de volume	Tempo meia vida curto (20 min.)
Fotoquímico	Não há produção de lodo	Formação de subproduto
NaOCl	Início e aceleração da quebra ligação azo	Libera aminas aromáticas
Cucurbituril	Boa capacidade sorção para vários corantes	Alto custo
Destruição eletroquímica	Os compostos analisados não são perigosos	Alto custo de eletricidade
Carbano ativado	Boa remoção de uma ampla variedade de corantes	Alto custo
Turfa	Bom adsorvente devido a estrutura celular	Área da superfície específica de adsorção menor que a do carvão ativado
Pedaços de Madeira	Boa capacidade de sorção para corantes ácidos	Requer longo tempo de retenção
Sílica gel	Efetivo para remoção de corantes básicos	Reações laterais impedem aplicação comercial
Filtração por membrana	Remove todos os tipos de corantes	Concentra o lodo produzido
Troca iônica	Regeneração: não há perda de adsorvente	Não é efetivo para todos os corantes
Irradiação	Oxidação efetiva para escala laboratorial	Requer muito O.D.
Coagulação Eletrocinética	Viável economicamente	Alta produção de lodo

Fonte: Robinson et al. 2001.

Nos últimos anos, vários estudos têm focado o uso de microrganismos que sejam capazes de biodegradar ou também bioacumular azo corantes de águas residuais (AKSU, 2005).

A biorremediação, um dos aspectos da biodegradação, é um processo tecnológico pelos quais sistemas biológicos, principalmente microrganismos, são aplicados à recuperação ou remediação de áreas contaminadas. O tratamento de

compostos orgânicos voláteis tóxicos ou de efluentes industriais que contenham resíduos tóxicos que devam ser eliminados antes da descarga no ambiente, ou ainda a transformação destes compostos tóxicos em compostos inofensivos, pode também ser considerado biorremediação já que depende da atividade microbiana para degradar resíduos indesejáveis (ATLAS & PRAMER, 1990; DIAS, 2000; BENNET et al., 2002).

A biorremediação pode envolver populações microbianas indígenas, com ou sem suplementação nutricional, ou pode ainda utilizar organismos exógenos ao local. Quando organismos exógenos são inseridos, o processo é chamado de "bioaugmentação" (BENNET et al., 2002).

Devido a esta complexidade, o sucesso da biorremediação depende de um enfoque interdisciplinar envolvendo diferentes áreas tais como microbiologia, engenharia, ecologia, geologia, química e toxicologia (BOOPATHY, 2000).

Muitos estudos dividem as estratégias de biorremediação em três categorias gerais: (i) o composto alvo é metabolizado como fonte de carbono (mineralização), (ii) o composto alvo é metabolizado, mas não é usado como fonte de carbono (cometabolismo), e (iii) o composto alvo não é metabolizado, mas concentrado pelo organismo, tanto por células vivas quanto por mortas (bioacumulação) (BENNET et al., 2002).

A biorremediação oferece várias vantagens, pois pode ser realizada no local; geralmente possui custo menor e transtorno mínimo do processo; elimina os resíduos permanentemente; pode ser utilizado em conjunto com métodos de tratamento físicos e químicos; tem impacto ambiental mínimo e, portanto, tem boa aceitação pública, com o encorajamento regulatório (BOOPATHY, 2000; DIAS, 2000).

Por outro lado, este processo apresenta algumas limitações, pois certos compostos químicos não são suscetíveis à biorremediação, por exemplo, metais pesados, radionucleotídeos e alguns compostos clorados; o tempo necessário para desenvolver sistemas efetivos para os compostos alvo pode ser longo; além de problemas relacionados ao aumento de escala, do laboratório para o campo. Em alguns casos o metabolismo microbiano pode produzir metabólitos mais tóxicos que os compostos originais (BOOPATHY, 2000). Portanto, ensaios toxicológicos devem ser utilizados para monitorar o nível de toxicidade resultante desta transformação e

neste contexto, estudos ecotoxicológicos utilizando espécies do microcrustáceo do gênero *Daphnia* têm sido realizados (COOMAN et al., 2003; SHINY et al., 2005; HAN et al., 2006).

Uma variedade de organismos pode servir como agente de biorremediação, incluindo plantas e algas, além de microrganismos tais como fungos e bactérias, e também enzimas:

Plantas - Quando as plantas são utilizadas o processo de tratamento é conhecido como fitorremediação. As plantas atuam de forma direta ou indireta na recuperação de áreas contaminadas. A atuação direta ocorre quando os vegetais absorvem os contaminantes e a ação indireta ocorre quando propiciam um meio favorável para a atividade microbiana de degradação dos contaminantes (DIAS, 2000).

Algas - Espécies de *Chlorella* e *Oscillatoria* foram capazes de utilizar alguns corantes azóicos como única fonte de carbono e nitrogênio e também conseguiram utilizar apenas a amina aromática, no entanto são necessários estudos adicionais para averiguar os produtos finais (JINQI & HOUTIAN, 1992).

Bactérias - Actinomicetos, especialmente do gênero *Streptomyces*, são conhecidos por produzir peroxidases extracelulares que têm um papel na biodegradação de lignina. Com a exceção dos actinomicetos, o isolamento de bactérias aeróbias capazes de descolorir e mineralizar corantes, especialmente sulfonados e corantes azóicos, tem-se revelado difícil (MCMULLAN et al., 2001).

No entanto, em condições anaeróbias muitas bactérias reduzem as altas ligações eletrofílicas azóicas na molécula do corante, por meio de azoredutases citoplasmáticas com baixa especificidade para produzir aminas aromáticas incolores, em geral mais tóxicas que o composto original. No entanto, uma vez que o componente azóico da molécula do corante é removido, os compostos aminos resultantes são bons substratos para biodegradação aeróbia (PEARCE et al., 2003).

Enzimas - Outra forma de remediação é isolar enzimas de microrganismos e plantas, utilizando-as em suspensão ou sob forma imobilizada (DIAS, 2000). Enzimas solúveis possuem certas desvantagens, como a instabilidade térmica, susceptibilidade ao ataque de proteases, inibição da atividade, etc. (HUSAIN & JAN, 2000). Por outro lado, a utilização de formas imobilizadas apresenta características adequadas, incluindo alta resistência à desnaturação térmica, melhoria significativa da atividade enzimática, e a sua conservação durante longos períodos de tempo (PERALTA-ZAMORA et al., 2003), no entanto uma desvantagem é que elas podem atacar um tipo de molécula de corante e bloquear o ataque a outras estruturas (SINGH, 2006).

A principal razão pela qual, os tratamentos enzimáticos ainda não foram aplicados em escala industrial é o grande volume de águas residuais poluídas demandando remediação (AKHTAR et al, 2005), além do custo dos biocatalisadores.

Fungos – São organismos decompositores e recicladores com um papel fundamental na manutenção do equilíbrio ambiental e apresentam diversas vantagens frente aos outros organismos quando aplicados na biorremediação (da SILVA & ESPOSITO, 2004; SINGH, 2006):

- ✓ capacidade para adaptar rapidamente o seu metabolismo a diferentes fontes de carbono e energia, fator essencial para a sua sobrevivência;
- ✓ produção de uma grande quantidade de enzimas intra e extracelulares, não específicas, capazes de degradar polímeros de origem vegetal como celulose, hemicelulose e lignina;
- ✓ produção de hifas que penetram o substrato, alcançando mais facilmente os poluentes;
- ✓ capacidade para mineralizar, liberar e estocar vários elementos e íons;
- ✓ capacidade de acumulação de materiais tóxicos.

O processo de biorremediação de poluentes por fungos é denominado micorremediação e estes são utilizados para uma grande variedade de compostos tais como: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), dioxinas, pesticidas, metais pesados, explosivos, plásticos e corantes têxteis (da SILVA & ESPOSITO, 2004).

A capacidade de fungos para metabolizar os corantes azóicos está principalmente relacionada à atividade de exoenzimas tais como peroxidases e fenoloxidasas.

Peroxidasas são hemoproteínas que catalisam reações na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (DURAN & ESPOSITO, 2000). As enzimas lignina peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14) e manganês peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13) são representantes deste grupo e possuem um mecanismo de reação semelhante, sendo oxidadas durante seus ciclos catalíticos por H_2O_2 que é reduzido pelos substratos (por exemplo, os corantes azóicos) e em duas transferências subseqüentes de um elétron para a forma inicial da enzima (Figura 1) (STOLZ, 2001).

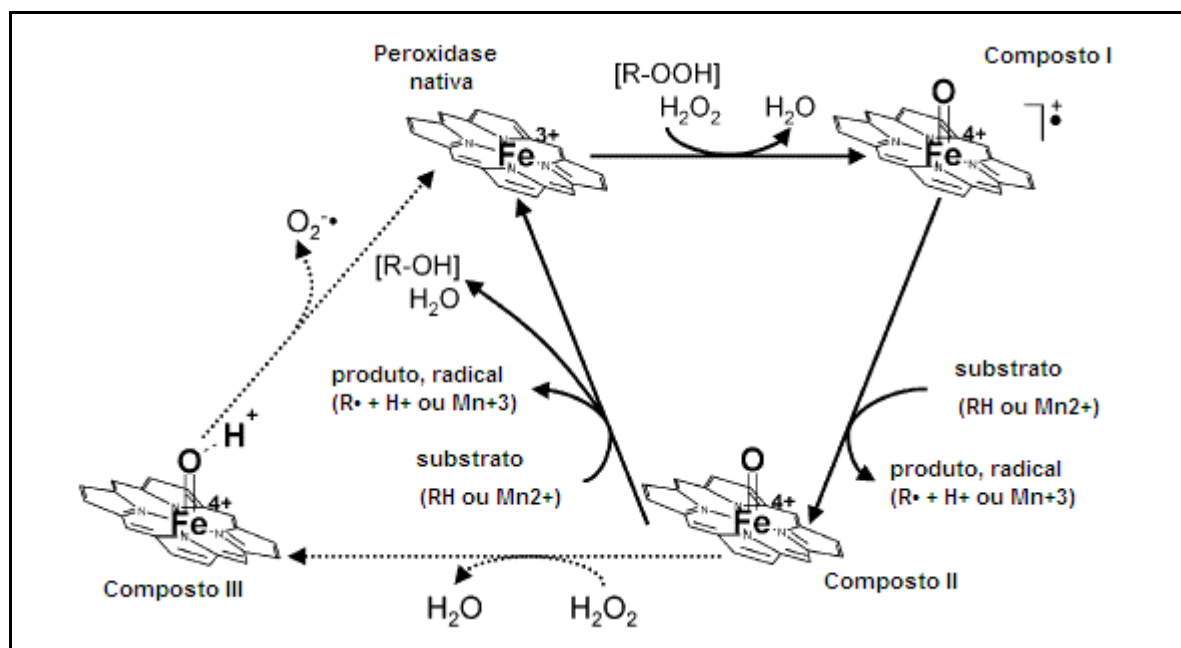


Figura 1. Esquema genérico do ciclo catalítico de peroxidases.

Fonte: Adaptado de Wesenberg, et al., 2003.

Já as fenoloxidasas são oxidoredutases que catalisam a oxidação de compostos fenólicos. Lacases (EC 1.10.3.2) são fenoloxidasas que catalisam a redução de quatro elétrons de oxigênio em água e simultaneamente realiza a oxidação de um elétron de uma variedade de substratos, incluindo mono-, di- e polifenóis, aminofenóis, metóxfenóis e aminas aromáticas. Este ciclo é apresentado na Figura 2 (MOLDES, et al., 2004).

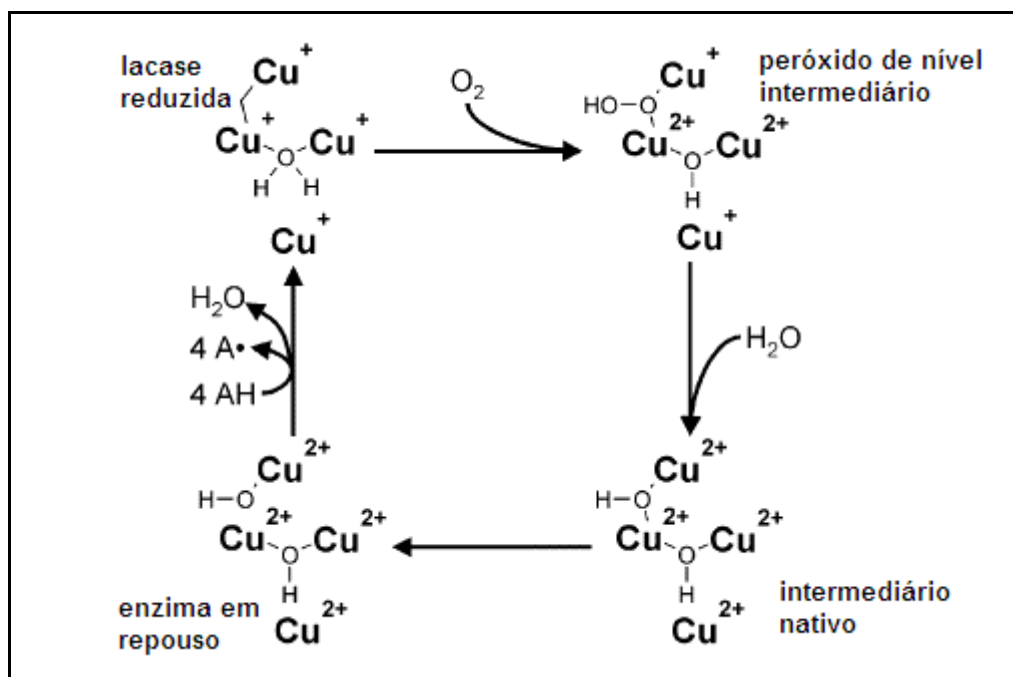


Figura 2. Ciclo catalítico das lacases.

Fonte: Adaptado de Wesenberg, et al., 2003.

Cerca de 50% dos estudos de descoloração e degradação de corantes estão relacionados a fungos ligninolíticos (SINGH, 2006). *Phanerochaete chrysosporium* tem sido um modelo para estudo de degradação de compostos poluentes (BENNET et al., 2002) e foi inicialmente estabelecida sua atividade na degradação de corantes no estudo realizado por Glenn & Gold (1983). Além deste, isolados de *Trametes versicolor* têm apresentado potencial para o uso no tratamento de efluentes contaminados por corantes e outros gêneros também têm sido avaliados, incluindo *Bjerkandera*, *Pleurotus*, *Coriolus*, *Polyporus* e *Phelebia* (SWAMY & RAMSAY, 1999; BOER et al., 2004; CHANDER et al., 2004; LIU et al., 2004). Outro fungo que também tem sido estudado por sua eficiência na descoloração de corantes é *Lentinula edodes*.

L. edodes (Berk.) Pegler é um fungo basidiomiceto, ligninolítico, também conhecido como o cogumelo comestível *shiitake*. Este cogumelo é um dos mais cultivados devido seu sabor exótico e qualidades medicinais (SILVA et al. 2007a).

L. edodes degrada componentes individuais de lignocelulose, como, lignina, celulose e hemicelulose, pela secreção de enzimas oxidativas e hidrolíticas (LEATHAM, 1986). *L. edodes* produz quantidades elevadas de manganês peroxidase e lacase. A lignina peroxidase, aparentemente, não desempenha um

papel significativo no sistema enzimático deste fungo, e apesar dos resultados da ausência de LiP nos extratos de *L. edodes* existe dúvida se este fungo realmente produz LiP, ou se esta enzima não pode ser detectada por métodos analíticos convencionais (LEATHAN, 1985; BUSWELL et al., 1995; SILVA et al., 2007a). Além da capacidade de descolorir corantes industriais *L. edodes* também é utilizado para o tratamento de outros tipos de efluentes como indústrias de processamento de azeite de oliva e polpa de papel (SILVA et al., 2007b). No entanto, existem menos estudos relacionados a este fungo quanto à degradação de corantes, em comparação a outros gêneros como *Phanerochaete* e *Trametes*, que são mais estudados. Outra questão importante é o pouco conhecimento sobre a efetividade da redução de toxicidade dos produtos de degradação gerados pelo fungo *L. edodes*, assim como o de outros fungos ligninolíticos.

Já a eficiência de fungos não ligninolíticos, cujo sistema enzimático envolvido na degradação de compostos tóxicos é intracelular, tem sido menos avaliada. Entretanto alguns estudos vêm obtendo resultados promissores com estes fungos. Isolados dos gêneros *Aspergillus*, *Cunninghamella* e *Rizopus* têm a capacidade de descolorir e/ou adsorver corantes (AMBROSIO et al., 2004; JIN et al., 2007; KUMARI & ABRAHAN, 2007), e até mesmo de biodegradar estes compostos como demonstrado por Parshetti et al. (2007) em seu estudo com *Aspergillus ochraceus*.

Comparado com as bactérias e os fungos filamentosos, as leveduras exibem características atraentes, pois embora seu crescimento não seja tão rápido como o das bactérias, as leveduras podem crescer mais rápido que a maioria dos fungos filamentosos e, como eles, têm a capacidade para resistir a ambientes desfavoráveis (PAJOT et al, 2007).

Pouco se sabe sobre a degradação de corantes e remoção da cor por leveduras (SINGH, 2006), no entanto, a maioria dos trabalhos apresentam resultados positivos, principalmente nos aspectos de biossorção.

O gênero *Candida* tem apresentado importantes resultados de biossorção como demonstrado por Aksu & Dönmez (2003) ao estudarem seis espécies diferentes, incluindo *Candida* sp., *C. tropicalis*, *C. lipolytica*, *C. utilis*, *C. guilliermondii* e *C. membranaefaciens*. Em outro estudo, *C. zeylanoides* foi utilizada para degradação de azo corantes e apresentou uma capacidade considerável na remoção da cor em meio nutriente sintético e em pH ácido (MARTINS et al., 1999).

Outros gêneros também têm sido avaliados como *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Issatchenkia* (AKSU & DÖNMEZ, 2003; RAMALHO et al., 2004; KUMARI & ABRAHAN, 2007).

Linhagens de *C. zeylanoides*, *Issatchenkia occidentalis* e *Saccharomyces cerevisiae* foram comparadas quanto à sua capacidade de descoloração de vários corantes. As taxas específicas de degradação obtidas mostraram que a *S. cerevisiae* foi mais eficiente na descoloração dos corantes testados. Experiências de assimilação pelas leveduras dos produtos de redução, demonstraram que todas as linhagens utilizam as aminas formadas como fonte de carbono e azoto. Isto representa a possibilidade de mineralização completa desses corantes (RAMALHO, 2005a).

Os efeitos do pH, temperatura, concentração do corante e do mediador redox, bem como o grau de descoloração na fase de crescimento sugerem a participação (direta ou indireta) de uma atividade enzimática na redução de corantes azóicos por leveduras (RAMALHO, 2004).

Graças à eficiência dos fungos no processo de descoloração, principalmente devido ao seu aparato enzimático que permite a degradação de diversos compostos tóxicos inclusive daqueles que contêm aminas aromáticas em sua estrutura, e também por não produzirem material a ser descartado, além de aceitação pela opinião pública, o tratamento utilizando fungos é uma alternativa promissora para substituir ou complementar os processos de tratamento convencionais (FU & VIRARAGHAVAN, 2001). Entretanto, são necessários mais estudos sobre a capacidade de fungos na descoloração e detoxificação de corantes utilizados pela indústria têxtil.

O Brasil possui em seu território uma diversidade de ecossistemas cujas riquezas não são ainda totalmente conhecidas, como a caatinga na região semi-árida que possui uma área de preservação ambiental instaurada, o Parque Nacional da Serra da Capivara.

Um dos poucos trabalhos relacionados ao estudo da diversidade de fungos no semi-árido brasileiro foi publicado em 2006 pelo Instituto Virtual do Milênio do Semi-Árido (IMSEAR). Um dos programas relacionados a este projeto, o Programa de Biodiversidade, visava a coleta em áreas específicas para catalogação de fanerógamas e de fungos da região (GIULIETTI & QUEIROZ, 2006).

O *site* intitulado Fungos do Semi-Árido (<http://fungosdosemiarido.uefs.br/default.asp>), proveniente deste projeto, apresenta um banco de dados com as espécies cadastradas que foram coletadas e identificadas na região.

Estima-se que a diversidade de fungos no mundo seja de cerca de 1,5 milhão de espécies (HAWKSWORTH, 1991) e que grande parte desta diversidade está presente em países tropicais. Nas regiões do semi-árido, presente em países tropicais, geralmente os organismos apresentarem ampla capacidade de resistência osmótica e adaptabilidade a condições específicas de pH e salinidade, sendo assim fungos destas regiões tornam-se alvos promissores de bioprospecção (GIULIETTI & QUEIROZ, 2006) para possível aplicação em biorremediação de áreas contaminadas por efluentes têxteis e outras substâncias recalcitrantes.

*“A satisfação está no esforço
feito para alcançar o objetivo,
e não em tê-lo alcançado.”*

Ghandi

2

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Isolar fungos de sedimentos de reservatórios de água no Parque Nacional da Serra da Capivara, para investigar a sua capacidade de descolorir, isoladamente e/ou em consórcio, corantes extensivamente utilizados nos processos de tingimento pela indústria têxtil brasileira e depositá-los na Coleção de Microrganismos de Referência do INCQS.

2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar as amostras de sedimento quanto à capacidade de descoloração do corante apresentada pelos consórcios de fungos presentes nestas amostras;
2. Isolar os fungos das amostras de sedimento que se mostraram eficientes na descoloração do corante;
3. Avaliar a capacidade dos fungos isoladamente, em comparação com o fungo de referência, *Lentinula edodes* (INCQS 40220), da Coleção de Microrganismos do INCQS, de descolorir o corante em meio líquido;
4. Realizar avaliação toxicológica do meio líquido após tratamento com os fungos mais eficientes na descoloração, utilizando o teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Daphnia pulex*;
5. Caracterizar morfológica e bioquimicamente os fungos selecionados.



*“Seja qual for o seu sonho, comece
Ousadia tem genialidade, poder e magia”*

Goethe

3

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de sedimento foram coletadas pela equipe do Laboratório de Ecologia Gustavo de Oliveira Castro – Departamento de Endemias Samuel Pessoa, Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ, e foram processadas no Setor de Fungos, Laboratório de Microrganismos de Referência, também ligado à Coleção de Microrganismos de Referência, Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ. Os experimentos de toxicologia foram realizados com a colaboração do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

3.1. Coleta das Amostras de Sedimento

O Parque Nacional da Serra da Capivara está localizado no sudeste do Estado do Piauí, ocupando áreas dos municípios de São Raimundo Nonato, João Costa, Brejo do Piauí e Coronel José Dias. A superfície do Parque é 129.140 ha e seu perímetro é de 214 Km. A distância que o separa da capital do Estado, Teresina, é de 530 Km. A Figura 3 apresenta um mapa com a localização do Parque.

O clima na região do Parque Nacional se caracteriza por uma temperatura média anual elevada (28° C). A característica principal desta região semi-árida é a irregularidade interanual das chuvas e suas repercussões no ambiente, como a exclusão de espécies animais e vegetais incapazes de resistir às secas. Não há rios perenes no Parque e os bebedouros e “caldeirões” naturais (Figura 4) se enchem durante as chuvas garantindo suprimento.

As amostras de sedimento foram coletadas de reservatórios naturais na área de contato entre a planície e a frente da *cuesta* da Serra da Capivara, na região do entorno do Parque Nacional Serra da Capivara. Esta área foi escolhida por ser uma área protegida pela Fundação Museu do Homem Americano - FUMDHAM, entidade

de pesquisa sem fins lucrativos, proprietária das terras do entorno do Parque Nacional, na região da Baixa Grande, e portanto, livre de impactos antrópicos.

As coletas de sedimento foram feitas nos anos de 2004 a 2006, durante o projeto “Sustentabilidade dos reservatórios de água no Semi-árido do Piauí” – financiado pela Fiocruz, que buscou analisar a qualidade da água dos reservatórios do entorno do Parque Nacional Serra da Capivara.

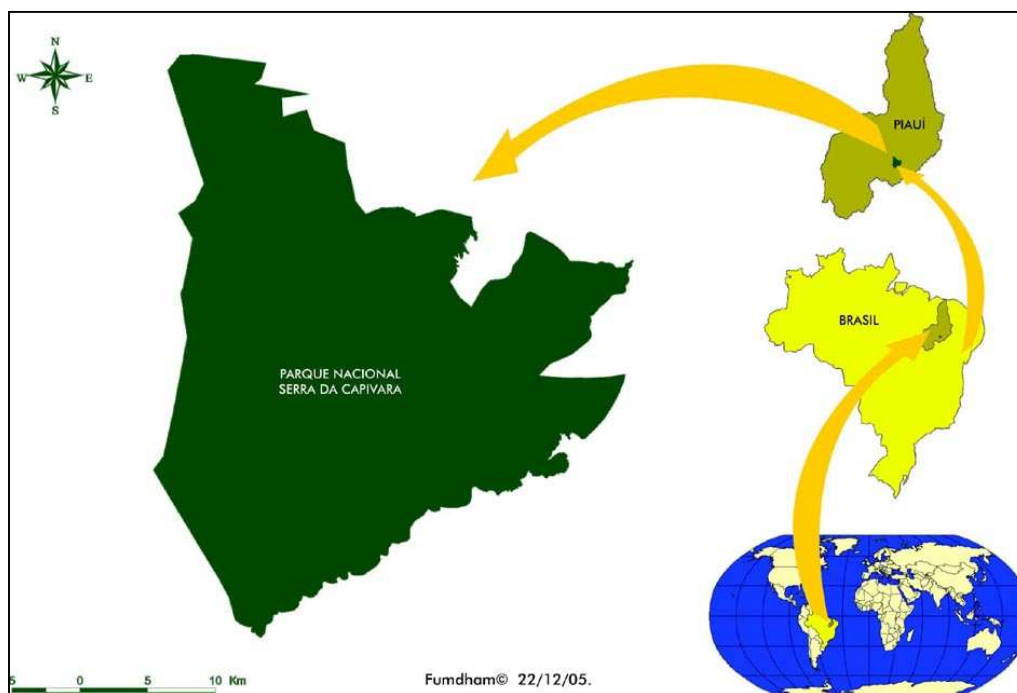


Figura 3. Mapa com a localização do Parque Nacional da Serra da Capivara no Estado do Piauí.

Fonte: Fumdham (Disponível em: www.fumdham.org.br/Mapas/01_Localização.jpg. Acesso em 30 jan. 2008).

As amostras de sedimento foram coletadas, em duplicatas, de vinte reservatórios de água, apresentados no Quadro 2, em tubos plásticos com 50 mL de capacidade (tipo Falcon) estéreis. Para alcançar profundidades maiores em alguns reservatórios, o tubo foi fixado em pedaços de madeira (Figura 4). Em seguida, foram acondicionadas em caixa de isopor com gelo até serem processadas.



Figura 4. Coleta nos **reservatórios de água** no Parque Nacional da Serra da Capivara.
Créditos; Prof. Dr^a. Marcia Chame (ENSP-FIOCRUZ)

Quadro 2. Locais e dados abióticos das amostras de sedimento.

LOCAL DE COLETA	SIGLAS	xUTM (23L)	yUTM	Altitude (m)	pH	Temp. (°C)	O.D. (mg L ⁻¹)	Condutividade (μS/cm)
Caldeirão Apertado	CA	768678	9024006	418	5,6	25,6	5,7	21,3
Caldeirão Esquerdo do Fundo do Boqueirão da Pedra Furada	BPF	-	-	-	-	-	-	-
Centro de Visitantes	CV	768834	9022335	425	-	-	-	-
Caldeirão da Geladeira	CG	768743	9024095	478	-	-	-	-
Caldeirão da Escuridão	CE	769341	9022784	423	-	-	-	-
Caldeirão Deolindo Gongo	CDG	766084	9044735	474	6,18	25,7	5,56	1,0
Caldeirão do Abel da Minhosa do Zé Carlos	CAM	755417	9020501	484	6,32	25,9	5,77	98,2
Olho d'Água do Cumbre	OAC	-	-	-	-	-	-	-
Caldeirão da Muriçoca	CM	753184	9019005	473	-	-	-	-
Olho d'Água Gongo	OAG	769732	9044092	444	5,44	27,8	2,06	1,6
Caldeirão do Veado Morto	CVM	-	-	-	-	-	-	-
Caldeirão da Barriguda I	CBI	763496	9024263	515	6,6	25,3	5,5	1,4
Caldeirão da Barriguda II	CBII	763517	902504	476	-	-	-	-
Caldeirão do Desfiladeiro	CD	-	-	-	-	-	-	-
Caldeirão do Perna	CP	762062	9021585	508	-	-	-	-
Caldeirão Manuel Zuza	CMZ	749436	9039992	475	5,39	25,7	18,0	20,2
Bebedouro Pinga da Escada	BPE	-	-	-	-	-	-	-
Bebedouro do Fundo do Pinga do Boi	BFPB	755331	9053604	396	6,86	24,0	3,38	240
Olho d'Água Serra Branca	OASB	-	-	-	5,85	29,4	12,75	55,4
Caldeirão do Jacinto	CJ	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: UTM - Sistema Universal Transverso Mercator; O.D. – Oxigênio Dissolvido.

Alguns pontos não apresentam os dados abióticos e localizações, devido a limitação de equipamentos e a necessidade logística do grupo se dividir, para abranger uma maior área pesquisada.

3.2. Meios de Cultura e Reagentes

O meio Caldo Sabouraud Dextrose (SDB) (1% de peptona e 4% de dextrose) com cloranfenicol (400 mg L⁻¹), foi usado como meio de enriquecimento para os fungos presentes nas amostras de sedimento e a adição de cloranfenicol tem como objetivo inibir o crescimento bacteriano. O meio Caldo Batata Dextrose (PDB) (20% de batata e 2% de dextrose) e o meio Ágar Batata Dextrose (PDA) (meio PDB adicionado de 2% de ágar) foram utilizados para a pré-seleção e isolamento dos fungos que descolorem corantes.

O PDB também foi usado para o estudo de descoloração em meio líquido dos fungos selecionados e do fungo de referência, *L. edodes*, estabelecido como linhagem padrão por sua eficiência na descoloração de corantes e também por ter sido menos avaliado quando comparado a outras linhagens como *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* e *Trametes versicolor*, por exemplo. (KIM et al., 1995; ZHENG et al., 1999).

Os meios Ágar Extrato de Malte e Peptona (MEA) (2% de extrato de malte, 0,1% de peptona e 2% de glicose e 2% de ágar) e Ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA) (0,1% de K₂HPO₄, 1% de concentrado de Czapek extrato de malte, 0,5% de extrato de levedura, 3% de sacarose e 1,5% de ágar) foram usados para manutenção dos fungos filamentosos e os meios Ágar Extrato de Levedura e Extrato de Malte (YMA) (0,3% de extrato de levedura, 0,3 de extrato de malte, 0,5 de peptona, 1% de glicose e 2% de ágar) para manutenção das leveduras.

Foram preparadas soluções estoques a 5% para os corantes Vermelho Reativo 198 e Vermelho Reativo 141 e solução a 4% para o corante Azul Reativo 214, que foram esterilizadas por filtração através de membrana de 0,22 µm e utilizadas na concentração final de 100 mg L⁻¹ para meio líquido e 200 mg L⁻¹ para ágar. Os corantes estão listados no Quadro 3 e as estruturas químicas estão apresentadas na Figura 5. Estes corantes foram escolhidos como representantes de corantes comercialmente usados pela indústria têxtil. O corante Vermelho Reativo 198 foi escolhido para selecionar os fungos por apresentar estrutura menos complexa do que os demais azo corantes utilizados.

Quadro 3. Descrições dos corantes utilizados.

NOME NO C.I.	NOME COMERCIAL	ABREVIÇÃO	λ_{MAX}	FORNECEDOR
Vermelho Reativo 198	Remazol Vermelho RB	VR198	520nm	DyStar, Suzano, SP, Brasil
Azul Reativo 214	Drimaren Azul Marinho X-GN	AR214	608nm	Doação do INT
Vermelho Reativo 141	Procion Vermelho H-E7B	VR141	543,5nm	DyStar, Suzano, SP, Brasil

Legenda: C.I. – Colour Index; λ_{max} – comprimento de onda máximo; nm – nanômetro; SP – São Paulo; INT – Instituto Nacional de Tecnologia.

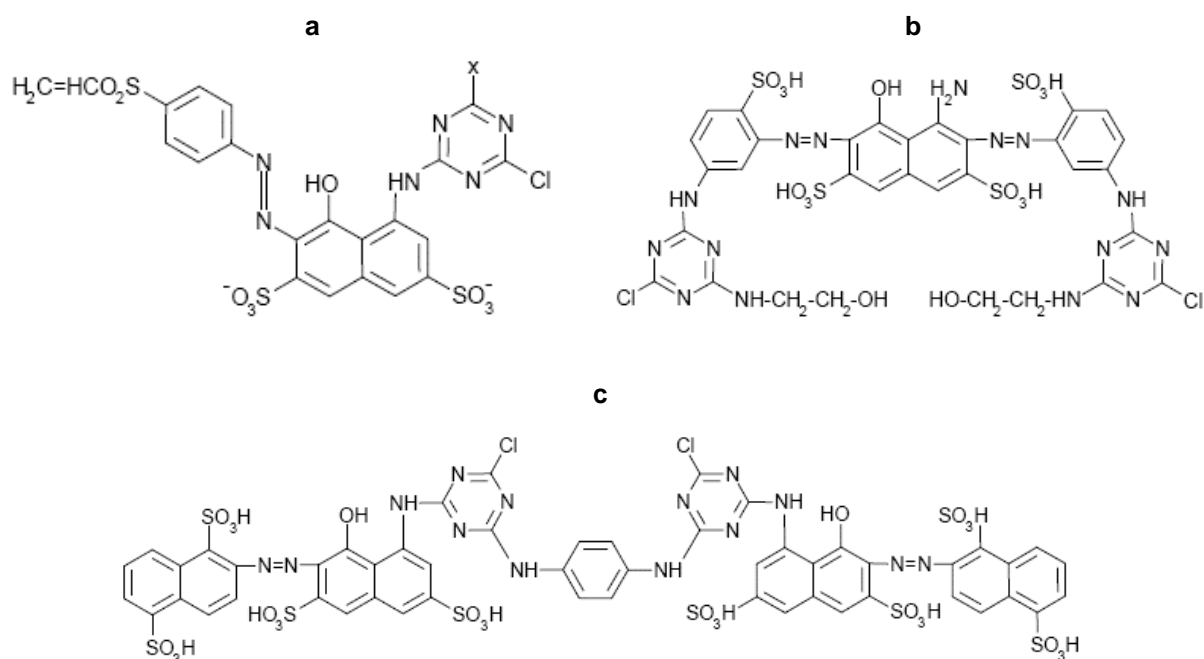


Figura 5. Estruturas dos corantes: a. Vermelho Reativo 198; b. Azul Reativo 214; c. Vermelho Reativo 141.

3.3. Pré-seleção de Fungos Presentes nas Amostras de Sedimento Capazes de Descolorir os Corantes

A partir de cada amostra de sedimento coletada foram tomados 30 g de sedimento e dissolvidos em 270 mL de água estéril. Depois de homogeneizado em liquidificador com copo de aço inoxidável esterilizado por aproximadamente 2 min 2 mL da mistura foram inoculados em 400 mL de meio de enriquecimento SDB com

cloranfenicol (400 mg L^{-1}) e incubado por 5 dias a 28°C sob agitação de 140 rpm. Após a incubação, foram transferidos 3 mL da cultura para 100 mL de meio PDB complementado com 100 mg L^{-1} do corante VR198 (KIRBY et al., 2000; ROBINSON et al., 2001), em duplicata e em seguida foram incubados por 7 dias a 28°C em agitação de 140 rpm e ao abrigo da luz. Experimentos controle foram realizados incubando o meio PDB, sem culturas microbianas, com as mesmas concentrações testadas do corante (Figura 6).

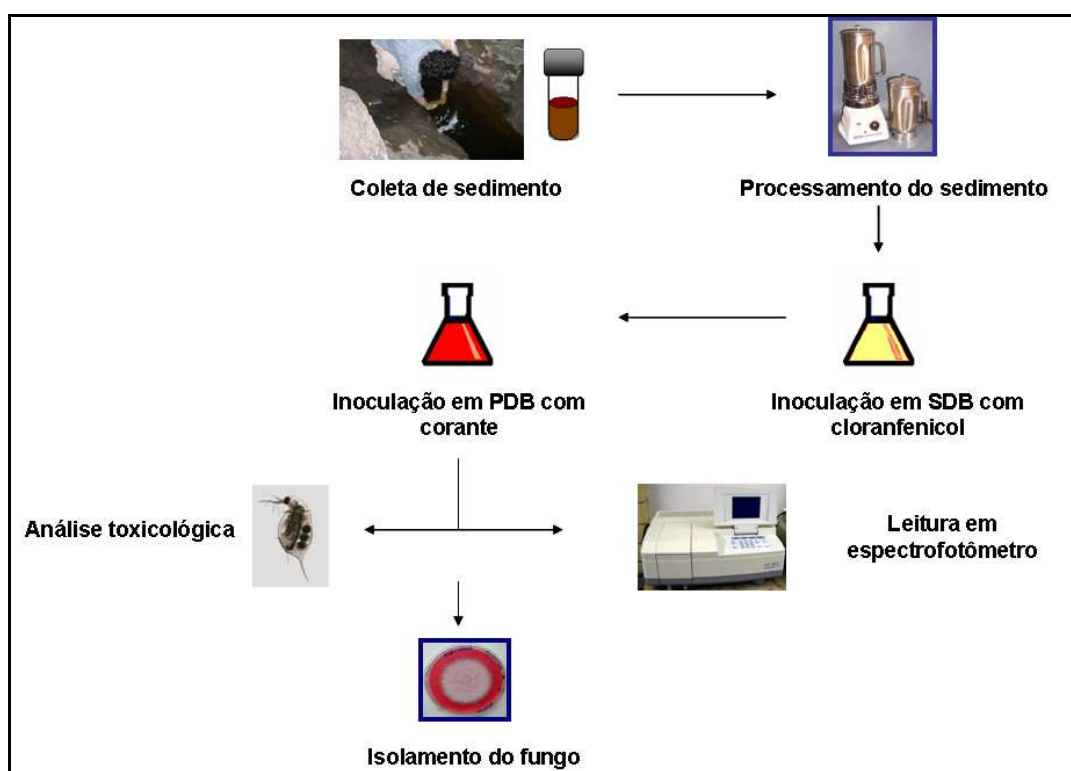


Figura 6. Esquema da pré-seleção de fungos capazes de descolorir os corantes.

A avaliação do nível de descoloração do corante foi realizada ao final dos 7 dias de incubação. Após a centrifugação de 2 mL da cultura das amostras a 10.000 rpm por 10 min, 0,5 mL do sobrenadante foi diluído 10 vezes em água purificada para a análise em espectrofotômetro UV/VIS (Shimadzu – UV-1601, Japão). O meio de cultura com corante e sem inóculo foi usado como controle negativo e o meio sem corante e sem inóculo foi usado como branco. Os espectros foram lidos entre 200 a 700 nm de absorvância (BUMPUS & BROCK, 1988; KIM et al., 1995; MÁXIMO et al., 2003) (Figuras 6 e 7).

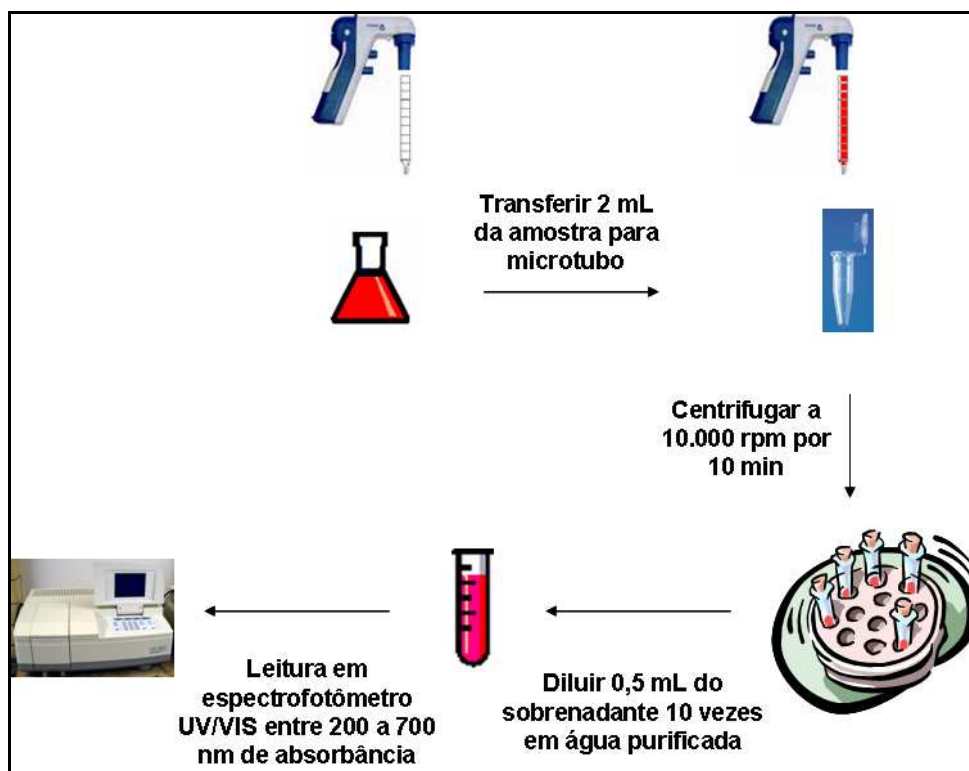


Figura 7. Esquema de preparo das culturas para leitura em espectrofotômetro.

As culturas selecionadas, ou seja, aquelas capazes de descolorir o corante VR198 acima de 90%, sem características de adsorção, foram testadas com os outros dois corantes, VR141 e AR214, seguindo o mesmo procedimento.

3.4. Preservação das Culturas das Amostras de Sedimentos Selecionadas

Alíquotas de 1,5 mL das culturas, crescidas no meio de enriquecimento SDB com cloranfenicol, foram transferidas para criotubos e em seguida glicerol foi adicionado em uma concentração final de 15% e congeladas a -70°C , com a finalidade de preservar os microrganismos antes de terem contato com o corante, possibilitando utilização em estudos posteriores com outros poluentes.

As culturas selecionadas após descoloração do corante foram centrifugadas e a biomassa precipitada dividida em duas partes, em uma foi adicionada solução de skim milk a 20% para posterior liofilização e a outra parte foi adicionada solução aquosa de glicerol a 15% para congelamento a -70°C .

3.5. Isolamento dos Fungos Filamentosos e Leveduras

As culturas que apresentaram descoloração visível a olho desarmado e/ou média de descoloração acima de 90% na análise espectrofotométrica (análise descrita no item 3.3) para todos os corantes testados, em comparação com os controles, e sem características de adsorção foram inoculadas em meio sólido PDA por meio da técnica de esgotamento com alça de platina, e incubadas a 28°C por até 7 dias, em duplicatas. Para isolamento de possíveis bactérias resistentes ao cloranfenicol placas contendo ágar BHI foram inoculadas, pela mesma técnica descrita para o PDA e incubadas a 30° C por até 48 h.

Colônias de leveduras e de fungos filamentosos foram selecionadas de acordo com sua morfologia macroscópica observada em estereoscópio (Leica MZ6, Wetzlar, Alemanha). Este foi o primeiro critério utilizado para diferenciação dos microrganismos isolados, onde características como forma, cor e textura foram avaliadas.

As colônias filamentosas que apresentaram características macroscópicas distintas foram novamente repicadas em PDA, até a obtenção de colônias puras. Após a purificação, as colônias foram repicadas em CYA e MEA inclinados para preservação. A identificação destes fungos está descrita no item 3.8.1.

Para a observação das características celulares das leveduras, em microscópio ótico (Leica DM LS, Wetzlar, Alemanha), após o crescimento das colônias em PDA e BHI, lâminas para microscopia foram preparadas utilizando-se a técnica de coloração de Gram para confirmar ausência de bactérias e com lactofenol azul de algodão para identificação das leveduras. As características microscópicas em conjunto com as macroscópicas possibilitaram a formação de grupos com características semelhantes.

Assim, aproximadamente 10 colônias de leveduras foram coletadas e repicadas para um mesmo tubo de YMA inclinado. Após crescimento as culturas foram novamente repicadas em PDA para avaliação da pureza dos grupos formados e para posterior identificação bioquímica e fisiológica (item 3.8.3).

3.6. Estudo de Descoloração em Meio Líquido

Após a etapa de isolamento as leveduras foram cultivadas em PDA acrescido de 200 mg L⁻¹ do corante e incubadas por 48 h. Destas culturas foram preparadas suspensões em água purificada estéril com turvação ajustada ao padrão 2 da escala de McFarland (6 X 10⁸ UFC mL⁻¹), das quais 2 mL foram usados para inocular 100 mL de meio PDB em 2 frascos Erlenmeyer de 250 mL.

Os fungos filamentosos isolados e a cepa de *Lentinula edodes* foram cultivados em PDA acrescido de 200 mg L⁻¹ do corante, no entanto o período de incubação foi de 5 dias. Após o crescimento foram retirados 6 discos de 5 mm de diâmetro da periferia da colônia e usados para inocular os 2 frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio PDB.

Os frascos foram incubados sob agitação por 2 dias e ao abrigo da luz (HEINFLING-WEIDTMANN et al., 2001; MÁXIMO et al., 2003). Após este período em todos os frascos foram adicionados 100 mg L⁻¹ do corante ao meio líquido. As culturas continuaram sendo incubadas nas mesmas condições por 7 dias. Experimentos controle foram realizados incubando o meio PDB, sem fungo, com as mesmas concentrações testadas do corante, nesta etapa foram realizadas leituras espectrofotométricas durante os 7 dias (Figura 8).

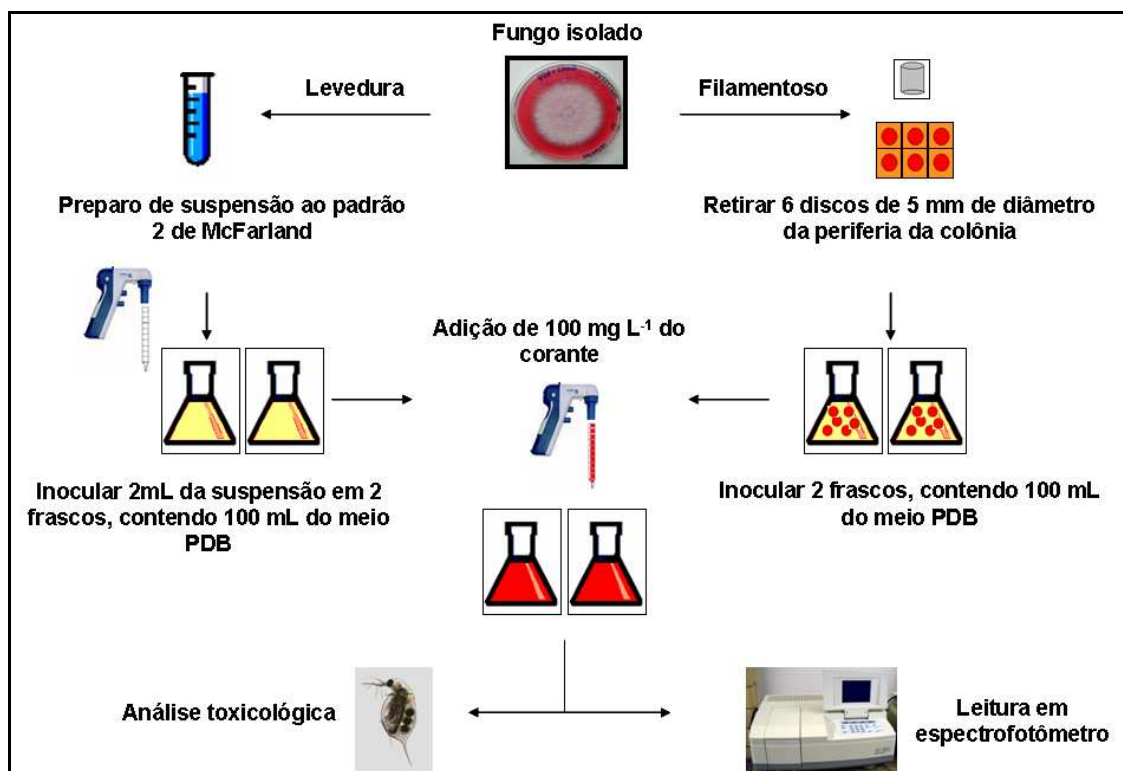


Figura 8. Esquema do estudo de descoloração e detoxificação em meio líquido.

3.7. Avaliação Toxicológica do Meio de Cultura Pós-tratamento Fúngico

Os testes toxicológicos foram realizados para avaliar o nível de toxicidade após a descoloração do corante, tanto pelos fungos presentes nas amostras de sedimentos quanto pelos isolados mais eficientes, utilizando o teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Daphnia pulex* (BAPTISTA et al., 2002). Os ensaios seguiram a Norma NBR 12713 (Figura 8).

Assim que as amostras chegaram ao laboratório foram medidos os seguintes parâmetros: pH, condutividade e oxigênio dissolvido (OD – mg L⁻¹).

No momento da análise, as amostras redutoras de oxigênio, tiveram a água de diluição oxigenada a 100% de saturação com oxigênio puro com objetivo de minimizar esse efeito. O valor mínimo de OD para o experimento ser validado é de 2 mg L⁻¹.

Em relação ao pH, as *Daphnias* vivem em meio com pH entre 7,0 e 8,0. Assim algumas amostras foram ajustadas para o pH neutro. O ajuste foi realizado pela adição gota a gota de solução de HCl (para amostras muito básicas) ou NaOH (para amostras muito ácidas), ambas na concentração de 1N, até alcançar pH neutro.

Para realização do teste foram utilizados 20 neonatos com 24 h de nascido, divididos em duas réplicas de 10 indivíduos por concentração-teste. O tempo de exposição foi de 24 h sob temperatura constante de 24°C e ao abrigo de luz. O método utilizado foi o estático, ou seja, não houve troca do meio de exposição durante as 24 h.

Após cada 24 h de exposição os parâmetros oxigênio dissolvido e pH foram medidos.

O Fator de toxicidade para 24 h (FT_{D24hs}) foi estimado, esse fator corresponde a menor diluição da amostra em que não ocorreu imobilidade ou mortalidade em mais de 10% dos organismos.

3.8. Identificação dos Fungos

A identificação dos fungos filamentosos foi baseada na observação das características morfológicas macroscópicas observadas em estereoscópio (Leica

MZ6, Wetzlar, Alemanha), e microscópicas em microscópio ótico (Leica DM LS, Wetzlar, Alemanha). No caso das leveduras a identificação foi baseada nas características fisiológicas e bioquímicas, além da caracterização morfológica (item 3.5). As leveduras e os fungos filamentosos foram identificados seguindo os métodos e critérios morfológicos, fisiológicos e bioquímicos determinados pela literatura (DOMSCH et al., 1993; KURTZMAN & FELL, 1998; BARNETT et al., 2000; SAMSON et al., 2002)

3.8.1. Fungos Filamentosos

Para identificação dos fungos filamentosos foi utilizada a técnica de cultivo em lâmina, onde um pedaço de meio de cultura (PDA) de aproximadamente 0,5 cm² foi transferido para uma lâmina disposta sobre um bastão em forma de U sobre papel de filtro no interior de uma placa de Petri. Fragmentos do fungo foram inoculados nos quatro cantos do meio de cultura. Sobre a superfície do meio inoculado foi colocada uma lamínula e o papel de filtro foi umedecido com 2,5 mL de água destilada estéril. A placa foi então fechada e incubada a 25°C por até 5 dias. Após o período de incubação 0,2 mL de formoldeído a 40% foi colocado no papel de filtro e após 20 min a lâmina foi desmontada e duas novas lâminas foram preparadas a partir da lâmina e da lamínula do cultivo. As lâminas foram coradas com lactofenol azul de algodão para a observação das estruturas fúngicas ao microscópio ótico.

3.8.2. Leveduras

3.8.2.1. Termotolerância

Para o teste de termotolerância os isolados foram incubados a 25 e 37°C, por um período de sete dias, em meio de YM caldo, com inóculo obtido de um subcultivo em YMA. Foram realizadas observações microscópicas para certificação da morfologia celular.

3.8.2.2. Teste da Urease

Os isolados foram inoculados em tubo de cultivo contendo o meio ágar uréia de Christensen (Difco Laboratories), e incubados a 25°C durante cinco dias. A produção de amônia a partir da uréia, pela ação da urease, alcaliniza o meio, conseqüentemente, alterando a cor do indicador de pH presente no meio de cultura.

3.8.2.3. Fermentação de Carboidratos

Para a verificação da capacidade de fermentar carboidratos, foram utilizados os seguintes açúcares: glicose, galactose, sacarose, maltose, lactose, celobiose, trealose, na concentração de 2% e a rafinose a 4%, em um meio basal constituído de peptona e extrato de levedura em pH 7,0 e utilizando-se tubos de Durham. Para efeito de identificação são considerados positivos os açúcares em cujo tubo de Durham houver a presença de gás em seu interior e negativo para a ausência de gás.

3.8.2.4. Assimilação de Compostos de Carbono

O teste de assimilação de compostos de carbono foi realizado em caldo YNB (Yeast Nitrogen Base, Difco Laboratories) com diferentes fontes de carbono: glicose, galactose, L-sorbose, sacarose, lactose, celobiose, glicosamina, trealose, melibiose, rafinose, D-xilose, L-arabinose, D-ribose, L-ramnose, glicerol, eritritol, adonitol, dulcitol, D-manitol, D-sorbitol, inositol, salicina, ácido láctico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido glucurônico, α -d-metil-glicosídeo, todos da marca Sigma. Os meios de cultura contendo os açúcares foram preparados a 0,5%, exceto a rafinose que foi preparada na concentração de 1%.

Foi utilizado como inóculo no teste de assimilação uma suspensão em YNB a partir de um subcultivo do microrganismo em YMA, com turvação ajustada ao padrão dois da escala de McFarland (6×10^8 UFC mL⁻¹) e incubado a 25°C durante 24-48 h. Cada tubo contendo YNB mais a fonte de carbono recebeu 0,1 mL de inóculo e foi incubado a 25°C com agitação uma vez por dia. A glicose foi usada como controle do crescimento do inóculo.

A leitura do teste de assimilação foi realizada, após agitação vigorosa do cultivo, observando-se a turvação do meio pelo crescimento do microrganismo utilizando-se um cartão branco de 7,5 cm de altura por 12,5 cm de comprimento com linhas feitas com tinta nanquim de 0,5 mm de espessura e 0,5 cm de distância uma da outra. Este procedimento visa estabelecer o critério de turvação em 1(+), 2(+), 3(+) para o crescimento do microrganismo ou (-) quando da ausência de crescimento. Se o crescimento no tubo obliterou totalmente as linhas foi considerado 3(+); se as linhas aparecem como bandas difusas, o crescimento foi considerado 2(+); mas se as linhas forem distinguíveis como tal e suas bordas não foram diferenciadas, o crescimento foi considerado 1(+) e a ausência de crescimento foi indicado como negativo (-). Os tubos testes foram colocados contra o cartão após agitação vigorosa e os resultados foram registrados em formulário apropriado. As leituras foram realizadas durante o período de quatro semanas, com um intervalo de cinco dias cada uma. Foram considerados resultados positivos 3(+) e 2(+), sendo 1(+) considerado resultado negativo, assim como a ausência de crescimento.

3.8.2.5. Assimilação de Compostos Nitrogenados

O teste de assimilação de compostos nitrogenados foi realizado em caldo YCB (Yeast Carbon Base, Difco Laboratories), com lisina como fonte de nitrogênio orgânico e nitrito de sódio (NaNO_2) e nitrato de potássio (KNO_3) como fonte de nitrogênio inorgânico.

O inóculo foi o mesmo utilizado no teste de assimilação de compostos de carbono (item 3.8.2.4) e incubado a 25°C. Após uma semana de incubação, um segundo tubo com meio de cultura YCB mais a fonte de nitrogênio estudada foi inoculado com 0,05 mL de inóculo retirado do primeiro tubo teste e incubado a 25°C durante sete dias.

A leitura foi realizada com o segundo tubo teste e a presença de turvação correspondente a 2(+) ou 3(+) conforme descrito anteriormente, foi considerada positiva, isto é, o microrganismo foi capaz de utilizar a fonte de nitrogênio. Se a leitura for 1(+) ou (-) foi considerada negativa.

3.8.2.6. Crescimento em Meio de Cultura na Ausência de Vitaminas

O crescimento em meio de cultura sem vitaminas foi realizado em caldo YVFB (Yeast Vitamin Free Base, Difco Laboratories). O inóculo foi o mesmo utilizado para a verificação da assimilação de compostos de carbono, incubado a 25°C durante sete dias. Foi transferido 0,05 mL para um segundo tubo com o mesmo meio, como realizado na assimilação de compostos nitrogenados. A leitura foi realizada utilizando-se o segundo tubo teste e a turvação correspondente a 3(+) indicou se o microrganismo foi capaz de crescer na ausência de vitaminas.

3.8.2.7. Sensibilidade à Cicloheximida

Para a realização do teste de sensibilidade à cicloheximida (Sigma) foi utilizado o caldo YNB com glicose 0,5% e cicloheximida nas concentrações de 100 mg L⁻¹ e 1000 mg L⁻¹. O inóculo foi o mesmo utilizado no teste de assimilação de compostos de carbono, e os tubos foram incubados a 25°C, com agitação diária, durante quatro semanas. Foram considerados resultados positivos 3(+) e 2(+), sendo 1(+) considerado resultado negativo, assim como a ausência de crescimento.

3.8.2.8. Formação de Compostos a Amilóides Extracelulares

Após 4 semanas de incubação foram adicionadas duas gotas de lugol ao tubo contendo glicose utilizado na assimilação de compostos de carbono (item 3.8.2.4). Na presença de compostos amilóides extracelulares o iodo reage, levando à formação de uma coloração azul (resultado positivo). Se a coloração amarelada se mantiver o resultado é considerado negativo.

3.8.2.9. Análise por Vitek

A análise automatizada foi realizada com o equipamento Vitek 32 (Marcy L'Etoile - França), utilizando-se o cartão YBC (Carta Bioquímica de Leveduras). Toda metodologia foi seguida de acordo com o descrito no Manual de Referência de Microbiologia VITEK (FOLHETO YBC, 2003 ; BOLETIM TÉCNICO YBC, 2003).

3.9. Preservação dos Fungos Filamentosos e Leveduras Isoladas

Os fungos filamentosos selecionados foram mantidos em tubos contendo MEA e CYA e as leveduras selecionadas em YMA a 4°C e temperatura ambiente. Estes fungos também foram submetidos à liofilização e congelados a -70° C em solução aquosa de glicerol a 15%, procedimentos utilizados pelo Setor de Fungos da Coleção de Microrganismos do INCQS.

*“ Antes o risco,
antes a inquietação e suas agulhas
do que amarrar-se a permanência
e murchar-se...”*

Carmem Vasconcelos

4

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Pré-Seleção

A pré-seleção foi realizada com as vinte amostras de sedimento coletadas no Parque Nacional da Serra da Capivara e os resultados das médias de descoloração são apresentados na Figura 9.

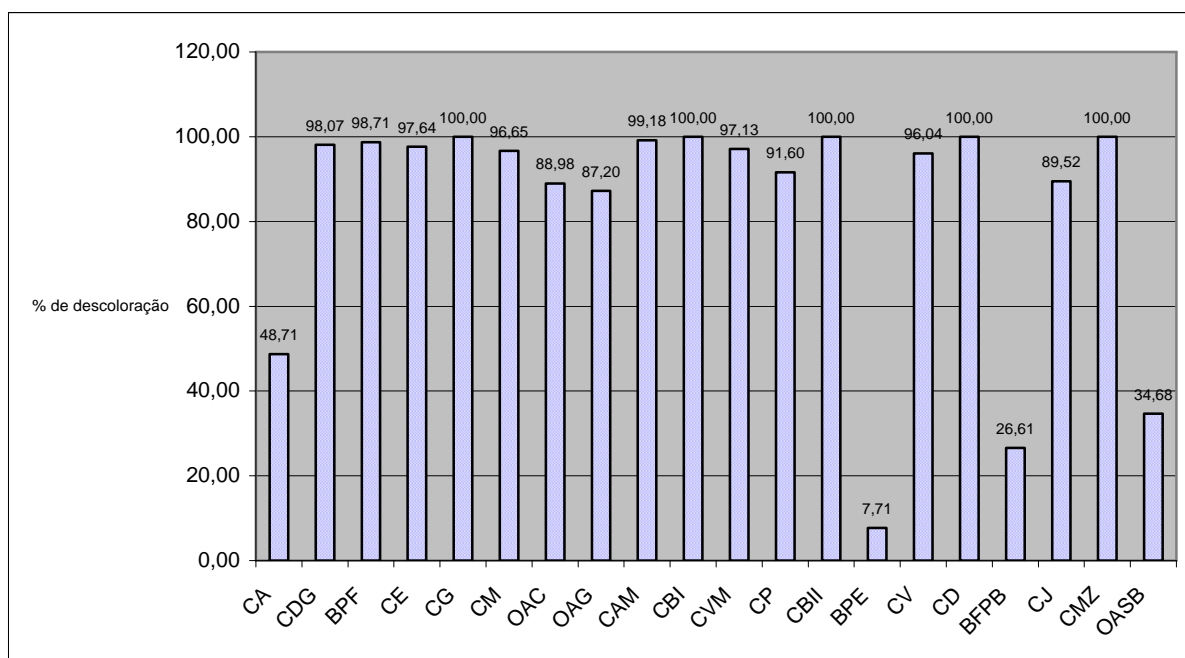


Figura 9. Percentual de descoloração, do corante VR198, das culturas obtidas das amostras de sedimento ao final de 7 dias de incubação.

Cinco das culturas das amostras analisadas (CG, CBI, CBII, CD e CMZ) apresentaram 100% de descoloração após 7 dias de incubação (Figura 9), no entanto visualmente apenas as amostras CG e CMZ não apresentaram traços de adsorção do corante pela biomassa após centrifugação. As demais amostras apresentavam a biomassa vermelha caracterizando adsorção do corante VR198.

Apesar da descoloração de 100%, as amostras que adsorveram o corante não foram consideradas satisfatórias, pois este mecanismo é semelhante a muitos

outros mecanismos físicos de adsorção para a remoção de cor, não sendo adequado para o tratamento em longo prazo, pois há acúmulo de biomassa com corante adsorvido que deverá ser eventualmente descartada (PEARCE et al., 2003).

As amostras BPF (98,71%), CDG (98,07%), CE (97,64%), CM (96,65%), CAM (99,18%), CVM (97,13%), CP (91,60%) e CV (96,04%) apresentaram percentual de descoloração acima de 90% (Figura 9). Destas amostras CDG, CE e CP não apresentaram traços de adsorção.

As amostras CA (48,71%), OAC (88,98%), OAG (87,20%), BPE (7,71%), BFPB (26,61%), OASB (34,68%) e CJ (89,52%) apresentaram percentual de descoloração abaixo de 90%, o pior resultado foi observado no BPE e todas estas amostras apresentaram biomassa vermelha, caracterizando adsorção do corante (Figura 9). A Figura 10 apresenta algumas culturas após 7 dias de incubação.

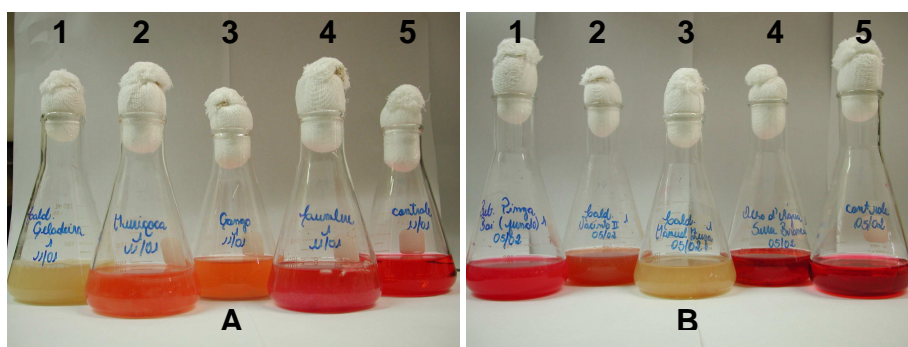


Figura 10. Culturas das amostras descoloridas e controle do corante VR198: A1 – CG; A2 – CM; A3 – OAG; A4 – OAC; A5 – controle e B1- BFPB; B2 – CJ; B3 – CMZ; B4 – OASB; B5 – controle.

Baseado nestes resultados as cinco amostras (CG, CMZ, CDG, CE e CP) sem características de adsorção e com descoloração acima de 90% foram selecionadas.

As amostras das culturas selecionadas submetidas ao corante foram preservadas e após cinco meses, a eficiência dos procedimentos de preservação (liofilização e congelamento a -70°C) foi avaliada utilizando-se novos testes de descoloração com o corante VR198.

Inicialmente foram testadas as amostras submetidas ao processo de liofilização, cujos resultados de descoloração após 7 dias são apresentados na Figura 11.

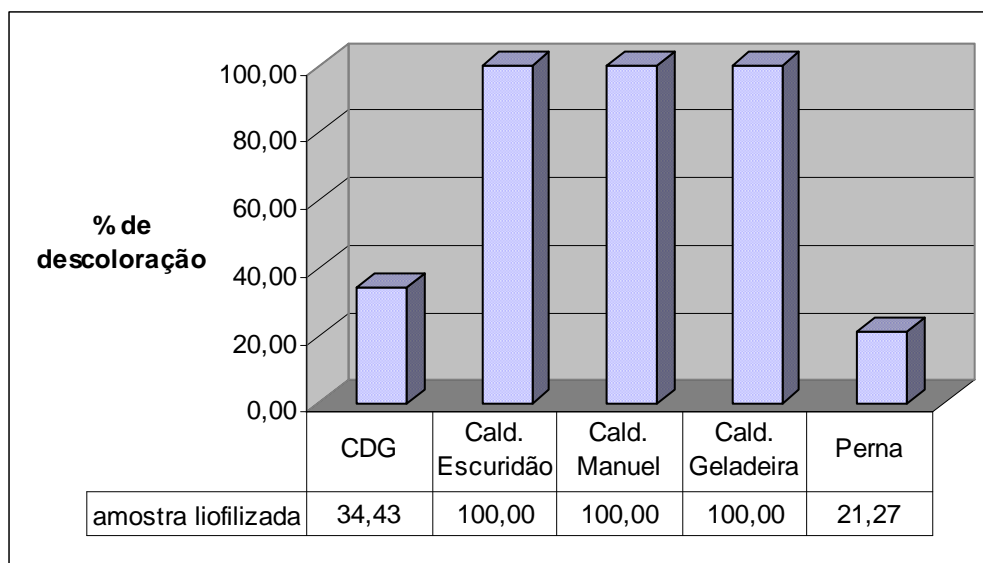


Figura 11. Percentual de descoloração do corante VR198 das culturas das amostras pré-selecionadas liofilizadas, após 7 dias de incubação.

Foi observado decréscimo no desempenho de descoloração nas amostras CDG e CP, quando comparado aos resultados anteriores apresentados na Figura 9. Para a amostra CDG a redução da descoloração foi de 2,85 vezes enquanto que para a amostra CP foi de 4,30 vezes. Nesta etapa, estas amostras, além da redução da descoloração também apresentaram adsorção do corante pela biomassa. Possivelmente, os organismos eficientes na descoloração são sensíveis ao processo de liofilização tendo sido inativados.

CE e CMZ mantiveram seus desempenhos, 100% de descoloração sem adsorção durante todo o período do experimento, e CG até o terceiro dia da análise apresentou biomassa levemente rosada, a partir daí alcançou 100% de descoloração sem traços de adsorção (Figura 11).

Como o material testado nesta etapa, previamente liofilizado e congelado a -70° C, foi produzido com a biomassa obtida das culturas após o processo de descoloração, é possível inferir que apesar da descoloração completa os produtos resultantes deste processo poderiam estar prejudicando a preservação.

Devido a esta problemática, as culturas que haviam sido congeladas a -70°C antes do contato com o corante foram testadas e comparadas com as culturas congeladas após o contato com o corante, a fim de avaliar possível interferência do corante no procedimento de conservação por congelamento. A Figura 12 apresenta os resultados para as duas situações.

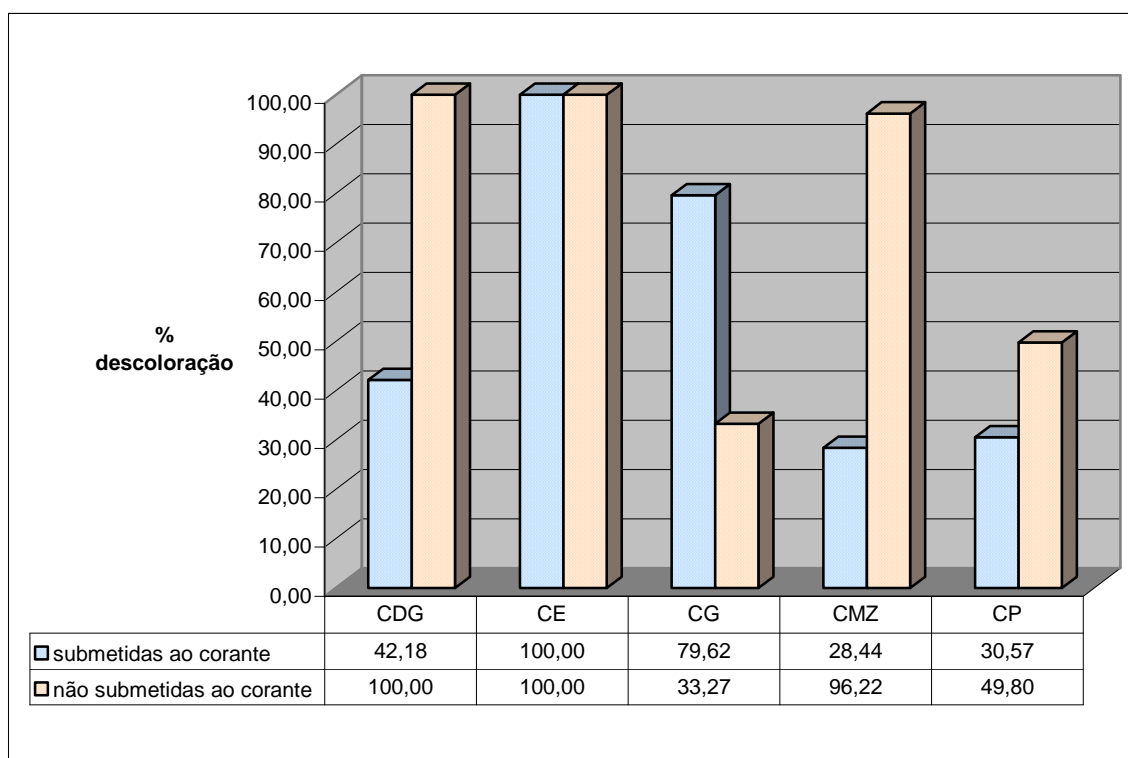


Figura 12. Comparação dos percentuais de descoloração do corante VR198 das amostras pré-selecionadas congeladas a -70°C (submetidas e não submetidas ao corante), após 7 dias de incubação.

O desempenho de descoloração apresentado pelas culturas não submetidas ao corante foi superior ao evidenciado naquelas submetidas ao corante, exceto CG que apresentou média de descoloração 2,39 vezes melhor quando submetida ao corante (Figura 12), mas ainda assim não alcançou desempenho de 100% demonstrado no processo de pré-seleção apresentado na Figura 9.

Das amostras congeladas, a cultura de CDG que não tinha tido contato com corante, antes de ser preservada, apresentou descoloração de 100% e apenas CE descoloriu totalmente o meio nas duas situações, ou seja, tendo sido preservado antes e depois do contato do corante (Figura 12).

Em relação à adsorção do corante pela biomassa, em ambas as situações, todas as culturas com desempenho abaixo de 100% apresentaram esta característica. Possivelmente, os organismos eficientes na descoloração são sensíveis ao processo de congelamento e foram inativados.

A liofilização se mostrou mais eficiente, quando comparada ao processo de congelamento a -70°C , pois apesar do contato com o corante, três amostras submetidas a este processo mantiveram desempenho de descoloração de 100% e sem adsorção (Figura 11 e 12).

Com base nestes resultados novas ampolas foram liofilizadas e criotubos congelados utilizando-se as culturas que mantiveram os melhores resultados de descoloração para garantir a preservação estável deste material.

Após esta avaliação as cinco culturas selecionadas foram testadas com os corantes: AR214 e VR141 e devido à variação nos resultados anteriores, ambas as culturas foram testadas, as liofilizadas submetidas ao corante e as congeladas sem contato com corante. As médias dos resultados, após 7 dias de incubação, são apresentados nas Figuras 13 e 14, para os corantes AR214 e VR141, respectivamente.

Nesta etapa apenas a cultura CE apresentou descoloração total, de ambos os corantes, em todas as situações avaliadas. A cultura de CMZ apresentou descoloração superior a 98% para os dois corantes com as culturas provenientes da biomassa congelada sem contato com corante. CG alcançou 95,42% de descoloração para a cultura oriunda da liofilização submetidas ao corante AR214. Todas essas culturas apresentaram descoloração visível dos produtos tratados, no entanto CMZ e CG apresentaram adsorção dos corantes em ambos os casos (Figuras 13 e 14).

A comparação entre o potencial de descoloração dos corantes AR214 e VR141 relacionados ao processo de preservação apresentados nas Figuras 13 e 14 foram bastante variáveis quando comparados aos resultados com o corante VR198 (Figuras 11 e 12). Esta variação de resultados pode ser explicada pelo fato destes corantes possuírem estruturas mais complexas.

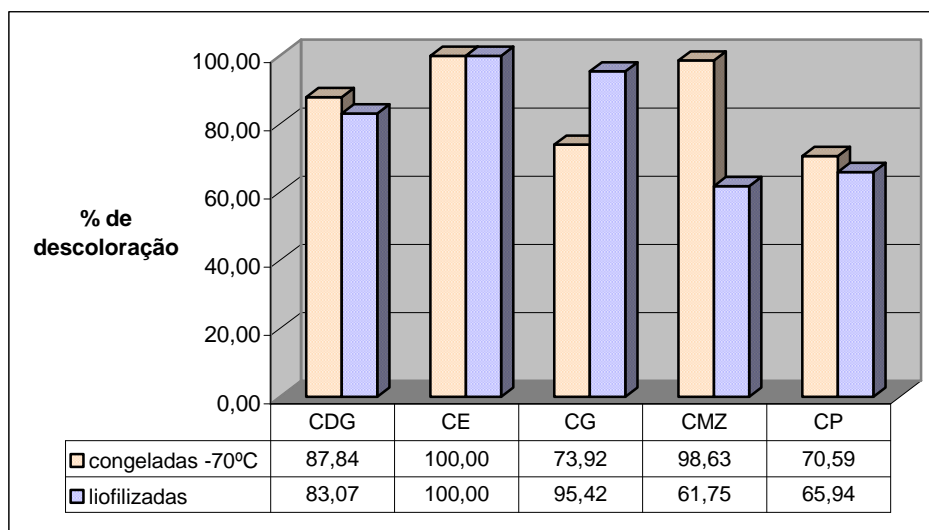


Figura 13. Comparação dos percentuais de descoloração, do corante AR214, das amostras pré-selecionadas congeladas a -70°C e liofilizadas, após 7 dias de incubação.

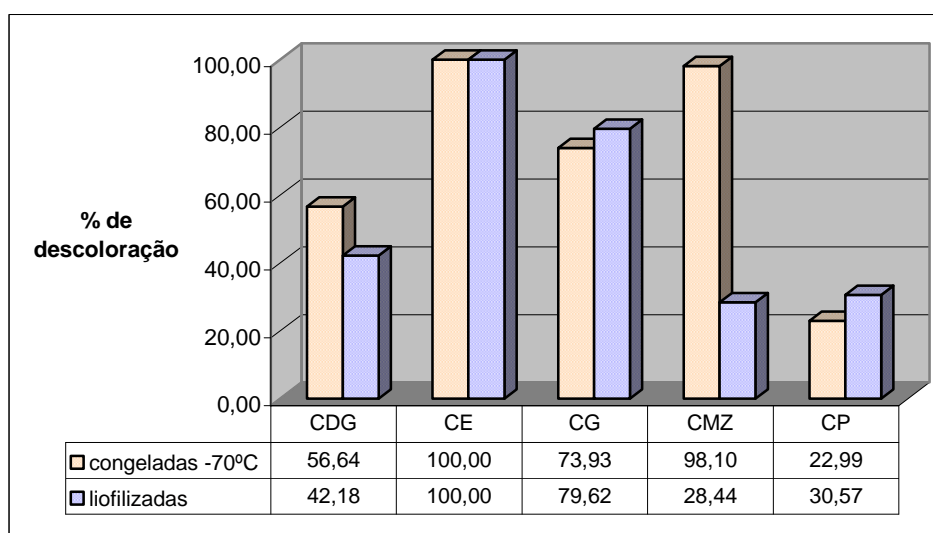


Figura 14. Comparação dos percentuais de descoloração, do corante VR141, das amostras pré-selecionadas congeladas a -70°C e liofilizadas, após 7 dias de incubação.

As culturas provenientes da amostra CE que apresentaram 100% de descoloração para todos os corantes, incluindo o VR198, e não apresentaram adsorção pela biomassa (Figura 15), foram selecionadas para isolamento dos fungos presentes no consórcio natural, e assim avaliar se estes isoladamente são capazes de descolorir os corantes.

Os processos de descoloração de corantes poliméricos têm sido propostos como um bom indicador para a oxidação inicial de produtos tóxicos e compostos ligninolíticos (PASTI & CRAWFORD, 1991).

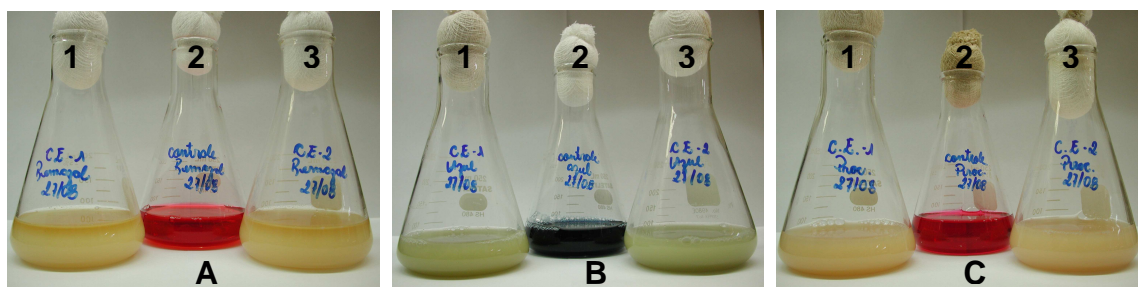


Figura 15. Culturas descoloridas da amostra CE, para os corantes A– VR198; B– AR214; C– VR141, após 7 dias de descoloração, onde 1 e 3 se referem aos meios descoloridos e 2 aos controles.

Muitos trabalhos relacionados ao potencial de descoloração de fungos utilizam linhagens oriundas de áreas já impactadas (DÖNMEZ, 2002; ARORA et al., 2005; YANG et al., 2005; LUCAS et al., 2006). No entanto, resultados obtidos com fungos isolados de áreas não impactadas têm se mostrados promissores (JUNGHANNS et al., 2007; PAJOT et al., 2007). As metodologias utilizadas para estas seleções apresentam resultados positivos, entretanto geram uma grande quantidade de isolados a serem avaliados.

4.2. Isolamento

A partir dos frascos com os três corantes descoloridos pelas culturas das amostras de sedimento CE, obtidos no item 4.1, foram feitos repiques em PDA e BHI.

Após incubação as colônias crescidas foram divididas, tendo como base suas características coloniais macroscópicas e microscópicas e assim nove grupos foram formados. Estas características estão descritas no Quadro 4.

Quadro 4. Isolados das culturas de CE, e suas características macroscópicas e microscópicas.

Identificação dos Isolados	Meio de origem	Característica macroscópica	Característica microscópica
CE-1	PDA	Colônia branca brilhosa	Células arredondadas e/ou ovaladas com brotamento
CE-2	PDA	Colônia branca ceribriforme com filamentos	Presença de hifas septadas, células arredondadas com brotamento e artroconídeos
CE-3	PDA	Colônia branca ceribriforme	Presença de hifas septadas, células arredondadas com brotamento e artroconídeos
CE-4	BHI	Colônia branca opaca	Células arredondadas e/ou ovaladas com brotamento
CE-5	BHI	Colônia filamentosa branca com exudato	Presença de hifas
CE-6	BHI	Colônia branca opaca pequena	Células arredondadas e/ou ovaladas com brotamento
CE-7	PDA	Colônia branca brilhosa pequena	Células arredondadas e/ou ovaladas com brotamento
CE-8	PDA	Colônia branca opaca ovalada	Células arredondadas e/ou ovaladas com brotamento
CE-9	BHI	Colônia branca brilhosa	Células arredondadas e/ou ovaladas com brotamento

Legenda: CE – Caldeirão Escuridão; PDA - Agar Batata Dextrose; BHI – Infusão de cérebro-coração.

As observações microscópicas realizadas confirmaram que dos 9 isolados obtidos, 8 eram leveduras e um era fungo filamentoso, não havendo bactérias.

Todos os isolados foram novamente repicados em PDA e nova avaliação, tanto macroscópica quanto microscópica, foi realizada para avaliar a pureza dos mesmos isolados. Nesta etapa todos os isolados apresentaram-se sem contaminação. O grupo formado pelos isolados CE-1, CE-4, CE-6, CE-7, CE-8 e CE-

9 apresentou características semelhantes, possivelmente representando uma mesma levedura, enquanto o grupo dos isolados CE-2 e CE-3 representaria outra espécie de levedura, e o isolado CE-5 foi o único fungo filamentoso (Quadro 3).

Na metodologia utilizada no presente trabalho, somente depois de submeter as culturas das amostras de sedimento aos corantes e com a subsequente seleção das melhores culturas, foi iniciado o procedimento de isolamento, ou seja, o isolamento foi apenas realizado a partir de culturas que apresentaram capacidade de descolorir o corante. Portanto, esta metodologia reduziu o número de isolados e o gasto de material, além de otimizar o tempo de seleção, mostrando-se assim muito eficiente no isolamento de fungos com potencial de descoloração.

4.3. Descoloração dos Isolados e *L. edodes* em Meio Líquido

A partir das culturas preservadas à temperatura ambiente foram realizados repiques de todos os isolados conforme descrito na metodologia de estudo de descoloração em meio líquido (item 3.6), com objetivo de avaliar o potencial de descoloração dos isolados individualmente. Os resultados de todos os isolados obtidos ao final deste período são apresentados na Figura 16. Apesar de terem sido realizadas leituras diárias durante os 7 dias de incubação, estes dados não estão apresentados na Figura 16, mas sim na Figura 17, onde estão os resultados dos isolados CE-3, CE-5 e CE-9.

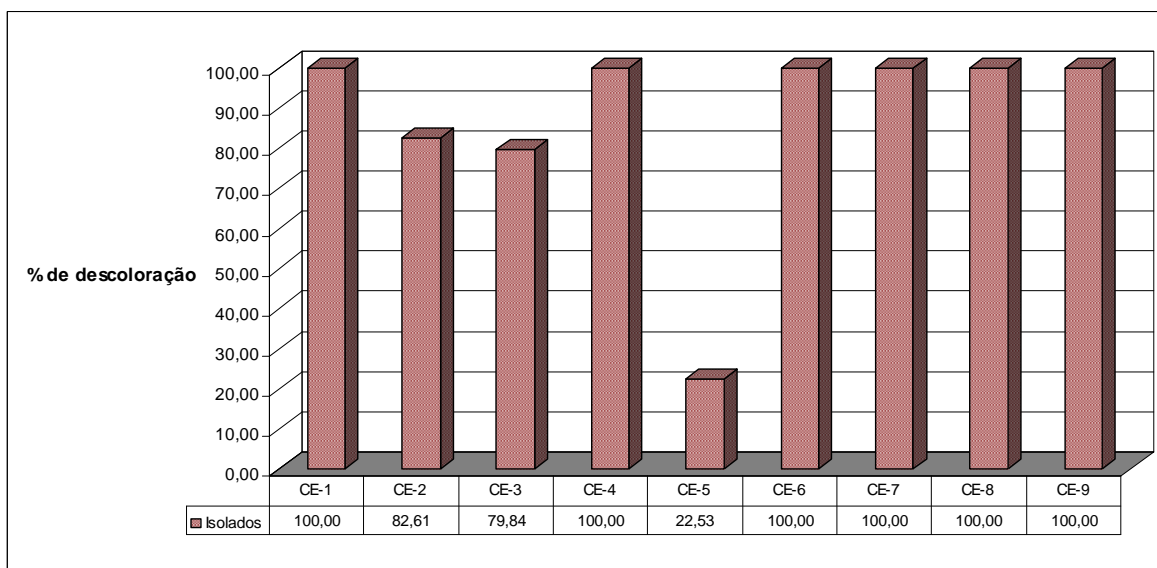


Figura 16. Percentual de descoloração, do corante VR198, pelos isolados das culturas da amostra CE.

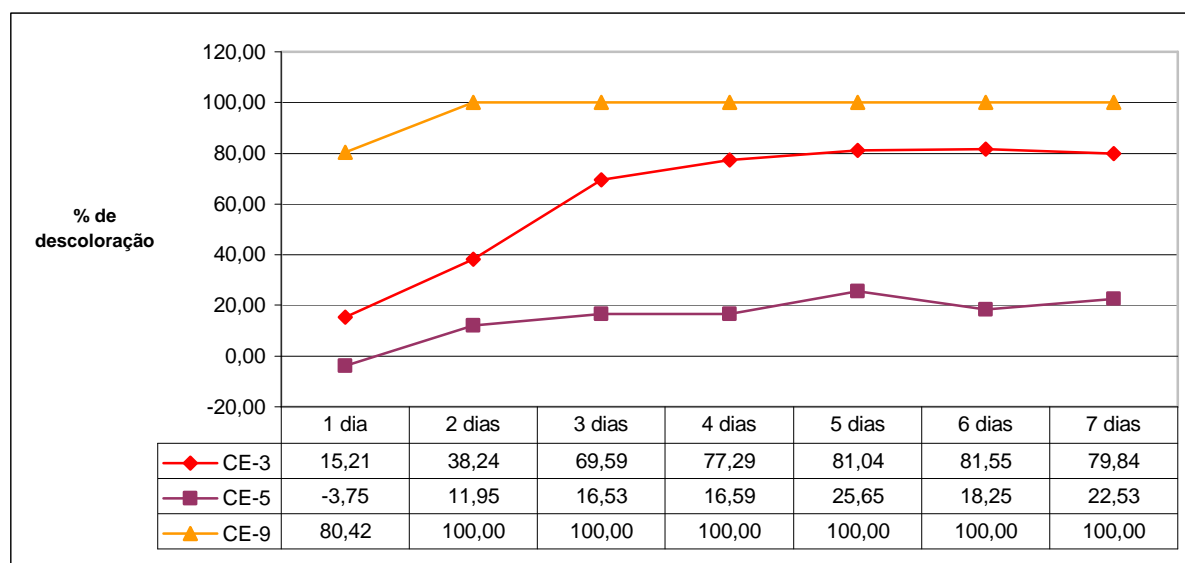


Figura 17. Desempenho de descoloração, do corante VR198, pelos isolados CE-3, CE-5 e CE-9, durante os 7 dias de incubação.

Os grupos de isolados com características semelhantes descritos anteriormente, apresentaram comportamento semelhante de descoloração.

Assim, os isolados CE-1, CE-4, CE-6, CE-7, CE-8 e CE-9 apresentaram a mesma eficiência, ou seja, 100% de descoloração em 7 dias de incubação (Figura 16), todos sem adsorção do corante. O resultado da identificação confirmou que

todos os isolados deste grupo eram representantes de uma mesma espécie identificada como *Candida rugosa* (item 4.5). O representante deste grupo, CE-9, apresentou, após 24 h, 80% de descoloração e em 48 h, 100% que se manteve até o final dos 7 dias de incubação (Figura 17) para uma concentração de 100 mg L⁻¹ do corante, concentração significativa se comparada a outros trabalhos que utilizaram o mesmo gênero de levedura.

Um dos primeiros estudos com leveduras foi realizado com *Candida zeylanoides*, isolada de solo contaminado por corante, próximo à área de tratamento de efluente de uma indústria têxtil em Portugal. Esta levedura após 7 dias de incubação sob agitação, na presença de cinco corantes azo, em diferentes concentrações de 10 a 50 mg L⁻¹, alcançou eficiência de descoloração entre 44 a 90%. No melhor resultado apresentado pela levedura houve alguma adsorção pela biomassa e 90% de descoloração foi alcançado em menos de 20 h que se manteve até o período final de incubação (MARTINS et al., 1999).

A mesma linhagem de *C. zeylanoides* foi avaliada em outro estudo e sua eficiência foi aumentada, alcançando 100% de descoloração em 40 h para dois dos azo corantes utilizados e em 60 h para os demais azo corantes. Aparentemente o principal fator determinante para esta melhora na eficiência foi a alteração da composição do meio de cultura (RAMALHO et al., 2002).

No estudo de Yu & Wen (2005) foi avaliado o potencial de descoloração de 44 linhagens de leveduras de diferentes origens onde: 28 adsorveram o corante, as outras 16 descoloriram o corante e destas apenas 6 alcançaram descoloração >70%. Assim, foram selecionadas as 2 linhagens mais eficientes que apresentaram descoloração >90% para o corante Vermelho Brilhante Reativo K-2BP (50 mg L⁻¹), após 18 h sem adsorção. Estas leveduras foram identificadas como *Pseudozyma rugulosa* e *Candida krusei*.

Outro resultado interessante foi apresentado por Lucas et al. (2006) que também utilizaram o gênero *Candida* para descoloração do corante azo Preto Reativo 5, nas concentrações de 50, 100 e 200 mg L⁻¹. *C. oleophila* apresentou extensiva descoloração (95-100%), também sem traços de adsorção entre 20-24 h.

Segundo Ramalho et al. (2002) esses resultados sugerem um processo de biodegradação muito rápido, entre 18 e 48 h. Aparentemente este processo é mais rápido durante a fase de crescimento exponencial das leveduras, isto seria

esperado, já que o processo deve ser dependente da biomassa celular e do crescimento ativo.

Com exceção do trabalho de Lucas et al. (2006) que utiliza concentrações máximas de corantes entre 100 e 200 mg L⁻¹, os demais apresentam resultados de descoloração para concentrações que variaram de 10 a 50 mg L⁻¹, ou seja, concentrações menores do que aquelas utilizadas nos experimentos com *Candida rugosa*, apesar de se tratar de corantes diferentes.

Em relação à atividade enzimática, envolvida nos processos de descoloração por leveduras, estudos realizados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* têm indicado o envolvimento de azoredutases como proeminentes enzimas para a degradação em condições específicas (RAMALHO et al., 2005b; JADHAV et al., 2007). Já Yang et al. (2008) avaliaram os efeitos do cometabolismo da glicose na descoloração de um azo corante pelas linhagens de *Debaryomyces polymorphus* e *Candida tropicalis* e sua correlação com a atividade da enzima MnP.

O grupo dos isolados CE-2 e CE-3 apresentou médias de descoloração de 82,61% e 79,84% ao final do sétimo dia de análise, no entanto estes isolados apresentaram características de adsorção (Figura 16) e foram identificados como pertencentes a espécie *Trichosporon ovoides* (item 4.5).

Em seus estudos, Pajot et al. (2007) identificaram dois gêneros de *Trichosporon* que apresentaram descoloração para os dois corantes usados variando entre 63,5 e 90,2% para *T. multisporum* e 91,4 e 98,7% para *T. laibachii*, após 72 h, sendo que não apresentaram adsorção.

Apenas o isolado CE-5 apresentou oscilações de adsorção e dessorção, alcançando até o quinto dia de análise a média de descoloração de 25,65%, em seguida houve um decréscimo para 18,25% no sexto dia e na sétima e última leitura alcançou 22,53% de descoloração (Figura 17). Este isolado foi identificado como *Mucor* sp. (item 4.5).

Apesar dos isolados CE-2 e CE-3 apresentarem um significativo potencial de descoloração, o processo de adsorção observado os desqualifica para possíveis processos de biorremediação, já que o problema da disposição final do corante permanece.

Portanto, com base nestes resultados CE-2, CE-3 e CE-5 não foram testados nos experimentos de descoloração em meio líquido

Na etapa seguinte *C. rugosa* foi avaliada paralelamente a *L. edodes* quanto à capacidade descoloração dos 3 corantes, VR198, AR214 e VR141, com avaliações diárias durante os 7 dias de incubação. Estes resultados de descoloração são apresentados na figura 18. Nas figuras 19 e 20 são apresentados os meios após o tratamento com *C. rugosa* e *L. edodes*, respectivamente, na presença dos 3 corantes testados.

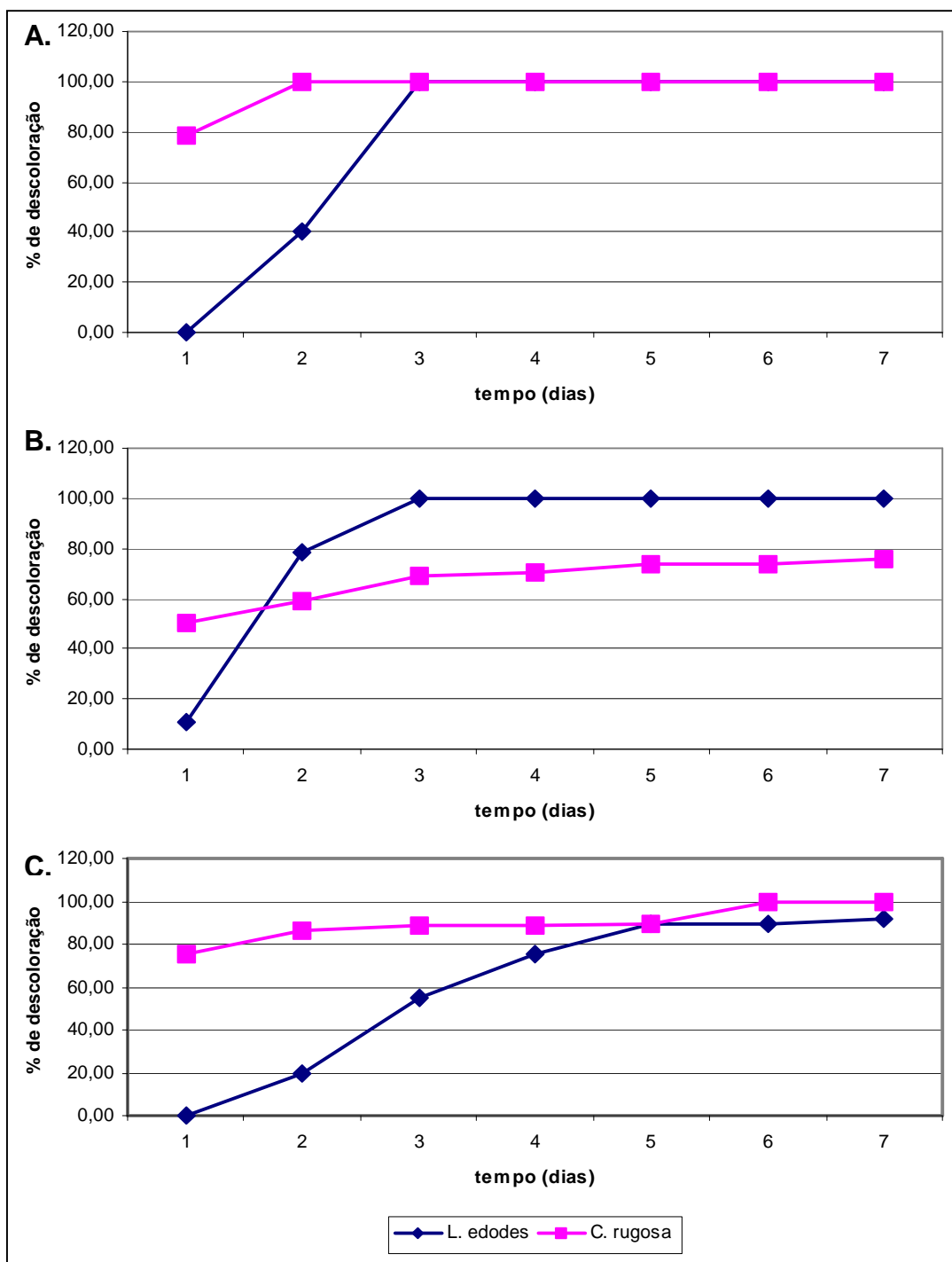


Figura 18. Comparação dos percentuais de descoloração, dos três corantes, por *C. rugosa* e *L. edodes*, durante os 7 dias de incubação. A – corante VR198, B – corante AR214 e C – corante VR141.

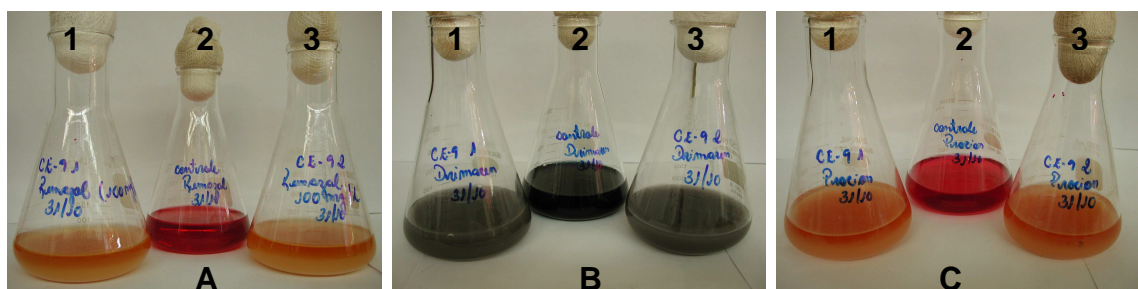


Figura 19. Culturas descoloridas por *C. rugosa*, para os corantes A– VR198; B– AR214; C– VR141, após 7 dias de incubação, onde 1 e 3 se referem aos meios descoloridos e 2 aos controles.

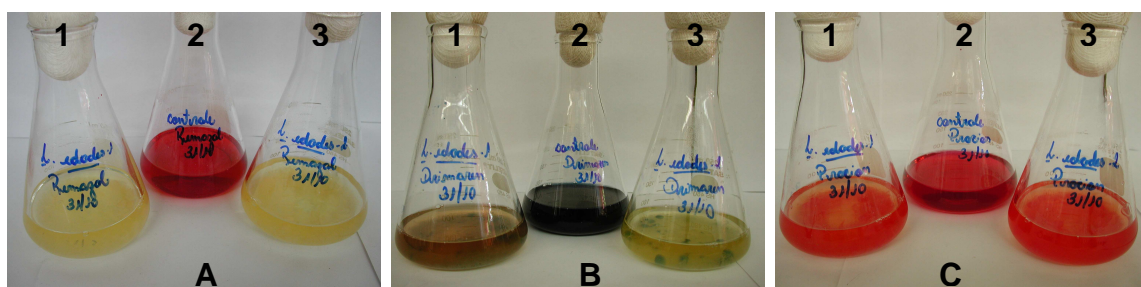


Figura 20. Culturas descoloridas por *L. edodes*, para os corantes A– VR198; B– AR214; C– VR141, após 7 dias de incubação, onde 1 e 3 se referem aos meios descoloridos e 2 aos controles.

Visualmente *L. edodes* apresentou melhor descoloração do que *C. rugosa*, no entanto as análises espectrofotométricas demonstraram o contrário. Esta diferença é possível, por *C. rugosa* ser uma levedura e de forma geral, se dispersa melhor no meio de cultivo do que os fungos filamentosos, o que dificulta a análise visual.

Para os corantes VR198 e VR141 *C. rugosa* apresentou-se mais eficiente do que *L. edodes*. Em 24 e 48 h apresentou desempenho de descoloração muito mais eficiente do que o fungo de referência, pois enquanto *C. rugosa*, em 24 h, apresentou 78,46% de descoloração para o corante VR198 e 75,60% para o corante VR141, *L. edodes* ainda não havia iniciado a descoloração, com 0% de descoloração para ambos os corantes (Figura 18).

Em 48 h o desempenho de *C. rugosa* ainda era superior para os corantes VR198 e VR141, 100% e 86,46%, respectivamente, contra 40,15% e 19,57% de *L. edodes* (Figura 18).

A partir do terceiro dia *C. rugosa*, em relação ao corante VR141, manteve descoloração próxima de 90% alcançando 100% no sexto dia de incubação e sem adsorção (Figuras 19 e 21). Enquanto *L. edodes* apresentou uma crescente

descoloração, alcançando 55% no 3º dia e com descoloração final de 91,44% (Figura 18), no entanto com adsorção do corante pela biomassa (Figuras 20 e 21).

Em relação ao corante VR198, *C. rugosa* e *L. edodes* realizaram descoloração total do meio e sem adsorção. O desempenho de *C. rugosa* é superior, visto que este isolado apresentou 100% de descoloração em 48 h, enquanto *L. edodes* obteve este mesmo resultado no terceiro dia (Figuras 18, 19, 20 e 21).

No caso de AR214, *C. rugosa* não foi tão eficiente quanto *L. edodes*, pois apresentou descoloração de 76,05% ao final do período de incubação, sendo que nas primeiras 24 h descoloriu 50% do corante, havendo adsorção do corante pela biomassa. Enquanto *L. edodes* descoloriu 100% do corante no 3º dia, mas também com adsorção (Figuras 18, 19 e 20). No entanto ao final da análise, apesar de ainda haver corante adsorvido pela biomassa, essa característica apresentava-se reduzida em relação ao início da análise conforme observado na Figura 21, que apresenta os meios descoloridos no 3º e 7º dia de incubação.

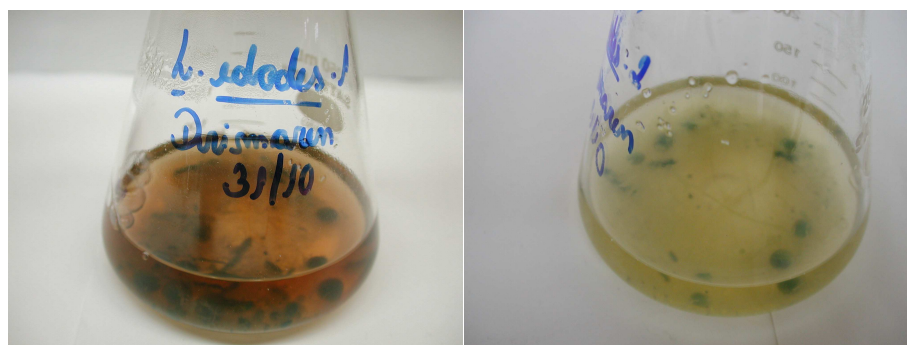


Figura 21. Comparação da adsorção pela biomassa e descoloração do corante AR214 por *L. edodes* no 3º (A) e 7º (B) dia de incubação.

De acordo com Glenn & Gold (1983) a degradação de corantes pode ser monitorada durante o cultivo do fungo em meio líquido, através da razão entre dois comprimentos de onda característicos do corante. Quando as razões apresentarem-se constantes ao longo do tempo, caracteriza-se a adsorção do corante pelo fungo e quando a razão for decrescente, pode-se inferir que houve degradação. Através do espectro de absorção do corante estes resultados também podem ser confirmados: quando ocorre degradação do corante, o pico característico desaparece; nos casos de adsorção pela biomassa, o pico característico apenas diminui.

Baseado nestas análises a Tabela 1 apresenta os espectros dos meios com os corantes antes e após o tratamento, onde se observa a redução (AR214) ou desaparecimento (VR198 e VR141) dos picos característicos dos corantes.

Outros estudos (CHEN et al., 2003; YU & WEN, 2005), além de confirmarem as inferências de Glenn & Gold (1983), apontam outra importante característica para diferenciar adsorção de degradação, a observação visual da biomassa precipitada. Assim, o resultado da adsorção é a biomassa colorida, sendo que o meio pode estar colorido ou não, e quando ocorre a degradação a biomassa permanece com sua coloração original e o meio torna-se descolorido. A figura 22 apresenta o sobrenadante das culturas de *C. rugosa* e *L. edodes* descoloridos dos três corantes ao final de 7 dias, com a biomassa precipitada após centrifugação.

Tabela 1. Espectros das culturas descoloridas por *C. rugosa* comparadas aos controles dos corantes utilizados.

Linagem	Pico (Abscis.)				% de descoloração
Controle VR198	519,0	370,0	288,0	223,0	
<i>C. rugosa</i> 1	-	496,0	263,0	229,0	100,00
<i>C. rugosa</i> 2	-	493,0	264,0	234,0	100,00
Controle VR141	548,0	523,0	289,0	223,0	
<i>C. rugosa</i> 1	-	-	308,0	244,0	100,00
<i>C. rugosa</i> 2	-	-	307,0	245,0	100,00
Controle AR214	609,0	400,0	279,0	228,0	
<i>C. rugosa</i> 1	562,0	443,0	277,0	231,0	76,05
<i>C. rugosa</i> 2	561,0	442,0	284,0	231,0	76,05

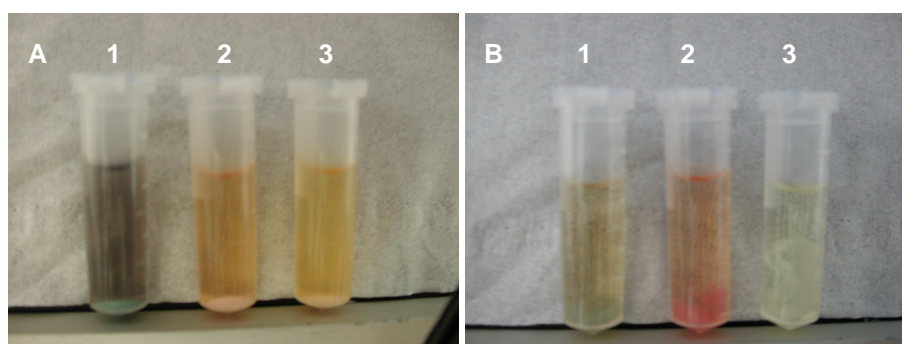


Figura 22. Comparação dos sobrenadantes e da biomassa precipitada dos três corantes: 1. AR214; 2. VR141 e 3. VR198 por *C. rugosa* (A) e *L. edodes* (B), após 7 dias de incubação.

A melhor eficiência no tempo de descoloração de *C. rugosa*, frente a *L. edodes*, em relação aos corantes VR198 e VR141, pode ser explicada, em parte,

pelo fato de *L. edodes* ser um fungo filamentosos, pertencente à classe Basidiomycetes, e que por isso apresenta um crescimento mais lento, em torno de 7 dias, comparado às leveduras, que apresentam crescimento em torno de 48 h. De forma geral, o crescimento de fungos filamentosos é mais lento quando comparado à maioria dos microrganismos unicelulares (YU & WEN, 2005). Esta maior velocidade na descoloração apresentada por *C. rugosa*, é uma importante vantagem, pois também agiliza o processo de biorremediação.

Metodologias de avaliação toxicológica dos meios tratados devem ser realizadas concomitantemente, para certificar que os produtos provenientes da descoloração são menos tóxicos do que os poluentes originais.

4.4. Ensaio Toxicológico

4.4.1. Culturas das Amostras de Sedimento

De acordo com os parâmetros físico-químicos avaliados, os meios tratados das cinco culturas das amostras dos sedimentos, após a descoloração do corante VR198, incluindo o controle, foram redutoras de oxigênio (Tabela 2). Portanto foi necessário oxigená-las, em relação ao pH apenas a amostra CMZ apresentou-se ácida (pH 2,63), impedindo a sobrevivência das *Daphnias*. Neste caso, foi realizado ajuste para pH 7,0, eliminando assim, esse fator adverso.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos pré-analisados, $FT_{D(24h)}$ e percentual de redução de toxicidade dos meios com VR198 descoloridos pelas culturas das amostras pré-selecionadas.

AMOSTRAS	pH	O.D. (mg L ⁻¹)	$FT_{D(24h)}$	% DE REDUÇÃO DE TOXICIDADE
Controle VR198	5,01	5,75	14,0	-
CG	5,08	6,38	3,3	76,43
CE	4,73	6,57	não tóxico	100
CDG	6,64	5,23	2,5	82,14
CP	5,48	6,16	3,3	76,43
CMZ	2,63	5,66	5,0	64,29

Legenda: CG – Caldeirão Geladeira; CE – Caldeirão Escuridão; CDG – Caldeirão Deolindo Gongo; CP – Caldeirão Perna; CMZ – Caldeirão Manuel Zuza; O.D. – Oxigênio Dissolvido; FT – Fator de Toxicidade.

O meio tratado pela cultura da amostra CE não foi tóxico para *D. pulex* após 24 h de exposição à concentração de 100% do meio, ou seja, houve detoxificação total do corante (Tabela 2).

As culturas do CG e CP apresentaram 76,43% de redução da toxicidade em relação ao controle do corante VR198 para 24 h de exposição. Já a amostra CDG apresentou redução de 82,14% e CMZ apresentou redução de 64,29% comparadas ao composto original (Tabela 2).

Como foi discutido no item 4.1 (Figura 12), apenas as culturas de CDG e CE apresentaram 100% de descoloração em relação ao corante VR198, após a preservação por -70°C , assim os meios descoloridos destas amostras foram submetidos ao ensaio toxicológico (Tabela 3). O controle e CE apresentaram pH 4,47 e 4,60, respectivamente, e portanto foram ajustados para 7,0 e todas as amostras e controle se apresentaram redutoras de oxigênio.

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos pré-analisados, $\text{FT}_{\text{D}(24\text{h})}$ e percentual de redução de toxicidade dos meios com VR198 descoloridos pelas culturas das amostras CE e CDG selecionadas após avaliação do método de crio-preservação.

AMOSTRAS	pH	O.D. (mg L^{-1})	$\text{FT}_{\text{D}(24\text{h})}$	% DE REDUÇÃO DE TOXICIDADE
Controle VR198	4,47	5,23	6,7	-
CE	4,60	6,0	2,0	70,15
CDG	6,52	6,76	1,3	80,60

Legenda: CE – Caldeirão Escuridão; CDG – Caldeirão Deolindo Gongo; O.D. – Oxigênio Dissolvido; FT – Fator de Toxicidade.

Nesta etapa, CDG (FT 1,3) apresentou redução de toxicidade 80,60% frente ao controle e CE (FT 2) apresentou redução de 70,15% (Tabela 3). Em comparação com os resultados das amostras iniciais (Tabela 2) ambas apresentaram decréscimo no desempenho para reduzir a toxicidade, principalmente CE que anteriormente não apresentou toxicidade.

Esta significativa alteração na redução da toxicidade, pode ter ocorrido devido à sensibilidade de alguns fungos, presentes no consórcio e ativos na descoloração, ao processo de preservação utilizado.

Em relação ao corante AR214 o ensaio toxicológico foi realizado apenas para a cultura descolorida da amostra CE (Tabela 4), pois somente esta alcançou percentual de descoloração acima de 90% e sem adsorção, para este corante. Quanto à análise de O.D., a amostra CE e o controle foram redutores de oxigênio e portanto foi necessário oxigená-las. O pH do controle apresentou-se ácido (pH 4,48) e foi ajustado para pH 7,0.

Tabela 4. Parâmetros físico-químicos pré-analisados, $FT_{D(24h)}$ e percentual de redução de toxicidade dos meios com AR214 descoloridos pela cultura da amostra CE.

AMOSTRAS	pH	O.D. (mg L ⁻¹)	$FT_{D(24h)}$	% DE REDUÇÃO DE TOXICIDADE
Controle AR214	4,48	5,73	2,0	-
CE	7,0	6,44	1,8	10

Legenda: CE – Caldeirão Escuridão; O.D. – Oxigênio Dissolvido; FT – Fator de Toxicidade.

O controle apresentou FT_{D24h} 2 e CE apresentou FT_{D24h} 1,8, ou seja, houve redução de 10% frente ao controle.

Para o corante VR141 apenas CE foi submetido à análise toxicológica (Tabela 5), pois foi a única cultura que apresentou 100% de descoloração, sem adsorção, da mesma forma que ocorreu para o corante AR214. O meio não tratado, ou seja, o controle apresentou FT 2,6 e o meio tratado com a cultura CE obteve o mesmo resultado, ou seja, não alterou a toxicidade do corante original.

Tabela 5. Parâmetros físico-químicos pré-analisados, $FT_{D(24h)}$ e percentual de redução de toxicidade dos meios com VR141 descoloridos pela cultura da amostra CE.

AMOSTRAS	pH	O.D. (mg L ⁻¹)	$FT_{D(24h)}$	% DE REDUÇÃO DE TOXICIDADE
Controle VR141	4,81	6,07	2,6	-
CE	4,75	6,90	2,6	0

Legenda: CE – Caldeirão Escuridão; O.D. – Oxigênio Dissolvido; FT – Fator de Toxicidade.

Com base nestes resultados, a cultura da amostra CE foi a mais eficiente para os corantes utilizados na detoxificação e na descoloração, como já constado anteriormente (item 4.1). Portanto, foi selecionado para a etapa de isolamento dos fungos ativos na descoloração, testados no item 4.3, e os resultados do potencial de detoxificação de *C. rugosa*, comparado a cepa de referência é avaliado no item 4.4.2.

4.4.2. *C. rugosa* e *Lentinula edodes*

Foram realizados os ensaios toxicológicos dos tratamentos com *C. rugosa* e *L. edodes* na presença dos 3 corantes testados. *C. rugosa* foi mais eficiente na redução da toxicidade dos corantes VR198 e VR141 (Tabela 6 e Tabela 7).

Tabela 6. Parâmetros físico-químicos pré-analisados, $FT_{D(24h)}$ e percentual de redução de toxicidade dos meios descoloridos de VR198, por *C. rugosa* e *L. edodes*.

AMOSTRAS	pH	O.D. (mg L ⁻¹)	$FT_{D(24h)}$	% DE REDUÇÃO DE TOXICIDADE
Controle VR198	4,47	5,23	6,7	-
<i>C. rugosa</i>	4,48	6,0	4,0	40,30
<i>L.edodes</i>	5,50	6,0	200,0	-2885,07

Legenda: O.D. – Oxigênio Dissolvido; FT – Fator de Toxicidade.

Tabela 7. Parâmetros físico-químicos pré-analisados, $FT_{D(24h)}$ e percentual de redução de toxicidade dos meios descoloridos de VR141, por *C. rugosa* e *L. edodes*.

AMOSTRAS	pH	O.D. (mg L ⁻¹)	$FT_{D(24h)}$	% DE REDUÇÃO DE TOXICIDADE
Controle VR141	4,81	6,07	2,6	-
<i>C. rugosa</i>	4,48	6,4	2,0	23,08
<i>L.edodes</i>	4,77	6,3	200,0	-19742,6

Legenda: O.D. – Oxigênio Dissolvido; FT – Fator de Toxicidade.

O meio com o corante VR198 tratado por *C. rugosa* (pH 4,48) e *L. edodes* (pH 5,50), assim como o controle (pH 4,47), apresentaram-se ácidos e foram ajustados para pH 7,0, além de reduzirem O.D. (Tabela 6)

O controle deste corante apresentou FT 6,7 e apenas o tratamento com *C. rugosa* foi capaz de reduzir a toxicidade, reduzindo 40,30%. Enquanto *L. edodes* aumentou a toxicidade em 2885,07% (Tabela 6). O tratamento de VR141 pelos fungos também resultou em meio ácido, assim como o controle, além de serem redutores de O.D. Portanto, todos os meios tiveram seus pHs neutralizados e foram oxigenados (Tabela 7).

C. rugosa reduziu a toxicidade em 23,07% (FT 2,0), já *L. edodes*, em relação a este corante aumentou a toxicidade, da mesma forma que ocorreu com o VR198 (Tabela 6), pois enquanto o controle apresentou FT 2,6, *L. edodes* apresentou FT 200%, ou seja, houve um aumento de 19742,6% na toxicidade (Tabela 7).

Os meios tratados de AR214 apresentaram toxicidade maior que o controle do corante, para ambos os fungos (Tabela 8). *C. rugosa* aumentou a toxicidade em 250% (FT 7,0) e *L. edodes* 4900% (FT 100), quando comparados ao controle (FT 2,0). Apesar do fato da descoloração deste corante por *C. rugosa* ter sido menos eficiente do que *L. edodes* (Figura 18), na redução de toxicidade foi observado o contrário, *C. rugosa* aumentou menos a toxicidade do que *L. edodes*. No entanto, nenhum dos dois fungos serviriam para biorremediar áreas contaminadas por este corante, nas condições estabelecidas neste estudo.

Tabela 8. Parâmetros físico-químicos pré-analisados, FT_{D(24h)} e percentual de redução de toxicidade dos meios descoloridos de AR214, por *C. rugosa* e *L. edodes*.

AMOSTRAS	pH	O.D. (mg L ⁻¹)	FT _{D(24h)}	% DE REDUÇÃO DE TOXICIDADE
Controle AR214	4,87	6,2	2,0	-
<i>C. rugosa</i>	4,47	6,1	7,0	-250
<i>L.edodes</i>	5,23	5,6	100,0	-4900

Legenda: O.D. – Oxigênio Dissolvido; FT – Fator de Toxicidade.

C. rugosa apresentou redução de toxicidade para os corantes VR141 e VR198 (Tabelas 6 e 7) e nestes casos houve descoloração total dos corantes (Figura 18). Já para o corante AR214, *C. rugosa* obteve descoloração de 76,05% e *L. edodes* descoloriu 100% (Figura 18). *L. edodes*, apesar do resultado superior de

descoloração, apresentou toxicidade significativamente maior do que *C. rugosa* (Tabela 8).

L. edodes apresentou ainda, relevantes resultados de descoloração, alcançando 100% em relação aos corantes VR198 e 91,44% para VR141 (Figura 18) após 7 dias de incubação. No entanto, em relação a todos os corantes, este fungo promoveu aumento da toxicidade (Tabelas 6, 7 e 8). Sendo assim, a utilização de *L. edodes* em biorremediação deve ser minuciosamente avaliada. No entanto como abordado inicialmente a biorremediação também pode ser utilizada conjuntamente com outros processos, agregando os pontos positivos das diversas tecnologias de tratamentos.

Portanto *C. rugosa* mostrou-se mais eficiente que *L. edodes*, tanto na descoloração quanto na detoxificação dos corantes utilizados nas condições estabelecidas neste estudo.

É necessário avaliar a formação de produtos tóxicos durante o processo de tratamento, pois a formação de amins aromáticas a partir de corantes azo, como benzidinas, tornam o meio tratado por bactérias anaeróbias mais tóxico que o efluente inicial. Portanto, técnicas utilizando bioindicadores como *D. pulex* apresentam-se como ferramenta valiosa para avaliar a eficiência do processo de degradação (SPONZA et al., 2004; SOUZA et al. 2007).

Poucos trabalhos relacionados à descoloração de corantes têxteis realizam paralelamente a análise toxicológica dos produtos descoloridos. Souza et al. (2007) utilizaram a enzima *horseradish peroxidase* (HRP) que teve a capacidade de reduzir em 75% a toxicidade do efluente bruto, utilizando o teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*.

Os resultados toxicológicos, aqui apresentados, demonstram com clareza a importância da avaliação toxicológica concomitante aos estudos de descoloração, já que a descoloração nem sempre está correlacionada com a redução de toxicidade.

4.5. Identificação

A identificação foi realizada pela observação das características morfológicas das leveduras e do fungo filamentosos, e pela caracterização fisiológica e bioquímica para os isolados de leveduras.

O grupo formado por CE-1, CE-4, CE-6, CE-7, CE-8 e CE-9 foi negativo para a hidrólise da uréia e para formação de compostos amilóides extracelulares, não fermentou carboidratos, não cresceu na ausência de vitaminas, foi sensível à cicloheximida, não assimilou o KNO_3 e NaNO_2 como fonte de nitrogênio, e assimilou os seguintes compostos de carbono: D-galactose, D-xilose, glicerol, D-manitol, D-sorbitol, ácido láctico e ácido succínico. Os outros compostos de carbono utilizados não foram assimilados (Quadro 5). Assim, os isolados pertencentes a este grupo foram identificados bioquimicamente e fisiologicamente como *Candida rugosa*.

O método automatizado de identificação, Vitek 32, foi usado e utilizou-se a carta bioquímica de leveduras (folheto YBC) para confirmar o método convencional e o resultado para esta identificação apresentou 99% de confiabilidade para *C. rugosa*.

A pesquisa de pseudo-hifas, característica desta espécie, foi realizada submetendo-se a linhagem ao cultivo em lâmina e estas estruturas foram observadas (Figura 23).

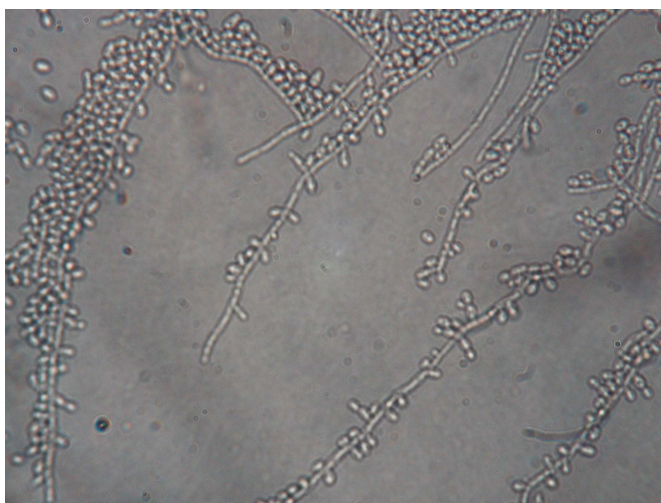


Figura 23. Pseudo-hifas de *C. rugosa* (CE-9).

Quadro 5. Resultados das caracterizações fisiológicas e bioquímicas dos isolados

Assimilação de Carbono	CE-1, CE-4, CE-6, CE-7, CE-8, CE-9	CE-2, CE-3
glicose	+	+
D. galactose	+	+
L. sorbose	-	+
D. glicosamina	-	+
D. ribose	-	+
D. xilose	+	+
L. arabinose	-	+
L. ramnose	-	+
sacarose	-	+
maltose	-	+
L. trealose	-	+
α -D-metil glicosídeo	-	+
celobiose	-	+
salicina	-	+
melibiose	-	+
lactose	-	+
rafinose	-	+
melzitose	-	-
glicerol	+	+
eritritol	-	-
adonitol/ribitol	-	+
dulcitol/galactitol	-	-
manitol	+	+
sorbitol/glucitol	+	+
inositol	-	+
ac. Glucorônico	-	+
ac. láctico	+	+
ac. succinico	+	+
ac. Cítrico	-	-
Fermentação		
D- glicose	-	-
Maltose	-	-
D- trealose	-	-
Demais		
Ciclohexamida 0,1 %	-	+
Ciclohexamida 1 %	-	+
Crescimento a 37°C	+	+
Crescimento a 25°C	+	+
Uréia	-	+
Produção de compostos amilóides	-	-
KNO ₃	-	-
NaNO ₂	-	-
L. lisina	-	-
Meio livre de vitaminas	-	-

No entanto, com o avanço das técnicas moleculares e sua utilização em taxonomia de fungos, estudos moleculares serão realizados para confirmar as identificações realizadas até o momento, resultando em uma taxonomia polifásica.

Esta abordagem vai evitar que ocorra o que foi previamente relatado por Vallini et al. (1997), que descreveram a identificação de uma linhagem de levedura por Corti et al. em 1995, a qual apresentava capacidade de biodegradar surfactantes como sendo *Candida maltosa*. No entanto, com o uso de técnicas moleculares Vallini et al. verificaram que está linhagem era representante de uma nova espécie, identificada como *Candida aquaetextoris*.

Como descrito anteriormente, alguns estudos foram apresentados utilizando-se o gênero *Candida* na descoloração de corantes têxteis, no entanto este é o primeiro trabalho que apresenta dados sugerindo a degradação de corantes azo pela espécie *C. rugosa*.

Apesar dos isolados CE-2, CE-3 e CE-5 não terem apresentado resultados importantes isoladamente, apresentaram bom resultado quando em consórcio nas culturas iniciais, principalmente no experimento com o corante AR214, pois devido a interação destes fungos não ocorreu adsorção (Figuras 15B), não ocorrendo o mesmo com *C. rugosa* (CE-9) quando submetida a este mesmo corante isoladamente (Figura 19B).

O grupo formado por CE-2 e CE-3 foi positivo para a hidrólise da uréia e para formação de compostos amilóides extracelulares negativo, não fermentou carboidratos, não cresceu na ausência de vitaminas, foi resistente à cicloheximida, não assimilou o KNO_3 e NaNO_2 como fonte de nitrogênio, e assimilou os seguintes compostos de carbono: D-galactose, L-sorbose, D-glicosamida, D-ribose, L-arabinose, L-raminose, sacarose, maltose, L-trealose, α -D-metil glicosídeo, celobiose, melibiose, lactose, rafinose, glicerol, salicina, adonitol, manitol, inositol, ácido glucorônico, ácido láctico e ácido succínico. Já os resultados para os demais compostos de carbono não foram assimilados (Tabela 5). Com base nestes resultados, assim como na caracterização morfológica, esta levedura foi identificada como *Trichosporon ovoides*.

Já o fungo filamentoso CE-5, foi submetido à técnica de cultura em lâmina e as observações morfológicas permitiram identificá-lo como um representante do gênero *Mucor* sp.

*“Depois de escalar uma montanha muito alta,
Descobrimos que há muitas outras montanhas por escalar.”*

Nelson Mandela

5

Conclusão

5. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi realizada a seleção de fungos com capacidade de descoloração e detoxificação de corantes, utilizados nas indústrias têxteis, a partir de sedimentos de reservatórios de água de uma área de preservação ambiental no Estado do Piauí, o Parque Nacional da Serra da Capivara.

As culturas das amostras de sedimento apresentaram significativo potencial de descoloração, pois 25% do total das amostras alcançaram >95% de descoloração durante o procedimento de pré-seleção, sem características de adsorção.

Alguns consórcios de fungos presentes nestas culturas foram muito eficientes, não só na descoloração, como também na detoxificação dos corantes testados, sugerindo que esta área possui um importante potencial para pesquisa de microrganismos biorremediadores.

A dificuldade encontrada foi manter a atividade de descoloração dos fungos presentes neste consórcio, com os métodos de preservação utilizados. No entanto, a liofilização foi o mais eficiente para a maioria das culturas. Foi observado também que as culturas preservadas antes do contato com material tóxico mantiveram melhor a atividade de descoloração. Portanto, a preservação deve ser realizada com as culturas livres do corante.

As culturas da amostra do Caldeirão Escuridão, foram as mais eficientes no conjunto das características, tanto de descoloração quanto na redução da toxicidade, de todos os corantes utilizados. O desempenho deste consórcio foi, inclusive, mais promissor do que a descoloração e detoxificação dos isolados e da cepa de referência *L. edodes*.

A metodologia de isolamento, após pré-seleção das culturas eficientes na descoloração, apresentou maior agilidade e eficiência do que as metodologias de isolamento geralmente utilizadas.

Três isolados foram obtidos a partir das culturas de CE: *Candida rugosa*, *Trichosporon ovoides* e *Mucor sp.* *C. rugosa* apresentou o melhor desempenho no processo de seleção dos isolados e suas atividades de descoloração e detoxificação foram comparadas ao fungo de referência *L. edodes*.

C. rugosa foi eficiente tanto na descoloração quanto na detoxificação dos três corantes avaliados, descoloriu totalmente os corantes VR198 e VR141, sem adsorção e apenas AR214 não foi eficientemente descolorido.

L. edodes, apesar de descolorir 100% os corantes VR198 e AR214, apresentou adsorção do corante AR214. Já para o corante VR141, *L. edodes* não apresentou descoloração total e sua biomassa promoveu adsorção.

Em relação à detoxificação *C. rugosa* apresentou-se muito mais eficaz do que *L. edodes*, pois enquanto *L. edodes* aumentou a toxicidade dos três corantes em altas proporções, *C. rugosa* reduziu a toxicidade de todos os corantes 100% descoloridos e apenas o corante AR214, que não foi totalmente descolorido, sofreu aumento da toxicidade, no entanto o percentual deste aumento foi menor se comparado a *L. edodes*.

Portanto os resultados deste estudo são pioneiros para *C. rugosa*, já que sua capacidade de degradação de corantes têxteis ainda não foi descrita e suas atividades de descoloração e detoxificação podem ser otimizados com a realização de estudos que estabeleçam condições mais específicas para esta levedura.

C. rugosa foi depositada na Coleção de Fungos de Referência do INCQS, sob o código INCQS 71011.

*"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".*

Fernando Pessoa

6

Perspectivas

6. PERSPECTIVAS

1. Complementação dos estudos taxonômicos de *C. rugosa* com técnicas de biologia molecular;
2. Pedido de patente para a descoloração e detoxificação de azo-corantes utilizados na indústria têxtil por *Candida rugosa*;
3. Otimização do potencial de *C. rugosa* na degradação e detoxificação de corantes têxteis;
4. Avaliação do potencial de *C. rugosa* na degradação e detoxificação de efluentes têxteis;
5. Caracterização das enzimas produzidas por *C. rugosa* envolvidas no processo de degradação;
6. Caracterização dos compostos gerados na degradação dos corantes por *C. rugosa*;
7. Avaliação do potencial de *C. rugosa* na degradação e detoxificação de outros compostos.

Estas perspectivas, se realizadas, permitirão a possibilidade de utilização de *C. rugosa* no tratamento de efluentes industriais antes de liberados em corpos d'água, e no processo de biorremediação de áreas impactadas por estes efluentes garantindo melhor qualidade para saúde pública e ambiental.

*“O que vale na vida não é o
ponto de partida, mas a caminhada.*

Caminhando e semeando, no fim

terás o que colher.”

Cora Coralina

7

Referências

7. REFERÊNCIAS

- AKHTAR, S.; KHAN, A.A.; HUSAIN, Q. Potential of immobilized bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidases in the decolorization and removal of textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent. **Chemosphere**. v. 60, p. 291–301, 2005.
- AKSU, Z.; DÖNMEZ, G. A comparative study on the biosorption characteristics of some yeasts for Remazol Blue reactive dye. **Chemosphere**. v. 50, n. 8, p. 1075-1083, 2003.
- _____. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 997-1026, 2005.
- AMBROSIO, S.T.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. **Bioresource Technology**. v. 91, p. 69-75, 2004.
- ANJANEYULU, Y.; CHARY, N.S.; RAJ, D.S.S. Decolourization of industrial effluents – available methods and emerging technologies – a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**. v. 4, p. 245-273, 2005.
- ARORA, S.; SAINI, H.S.; SINGH, K. Decolorisation of a monoazo dispersive dye with *Candida tropicalis*. **Coloration Technology**. v. 121, p. 298-303, 2005.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustacea)**. Rio de Janeiro: 2004. (NBR 12713).
- ATLAS, M.R.; PRAMER, D. Focus on bioremediation. **ASM News**. v. 56, n. 7, 1990.

- BANAT, I.M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. **Bioresource Technology**. v. 58, n. 217- 227, 1996.
- BAPTISTA, I.E.; SOARES, C.H.L.; MATIAS, W.G.; LOPES, E.B. “Avaliação da toxicidade aguda de efluentes de uma indústria têxtil utilizando *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* e *Vibrio fischeri* como bioindicadores”. In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; PASCHOAL, C.M.R.B.; ROCHA, O.; BOHRER M.B.C.; de OLIVEIRA NETO, A.L., eds. **Ecotoxicologia. Perspectivas para o Século XXI**. São Carlos: Editora Rima, 2002. p. 365-377.
- BARCELLOS, C.; QUITERIO, L.A.D. Vigilância ambiental em saúde e sua implantação no Sistema Único de Saúde. **Revista de Saúde Pública**. v. 40, n. 1, p. 170-177, 2006.
- BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 1139p.
- BENNETT, J.W.; WUNCK, K.G.; FAISON, B.D. “Use of Fungi Biodegradation”. In: HURST, C.J.; CRAWFORD, R.L.; KNUDSEN, G.R.; MCINERNEY, M.J.; STETZENBACH L.D., eds. **Manual of Environmental Microbiology**. Washington: ASM Press, 2002. p. 960-971.
- BOER, C.G.; OBICI, L.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. **Bioresource Technology**. v. 94, p. 107-112, 2004.
- BOLETIM TÉCNICO YBC – Capítulo 26. Marcy L’Etoile: bioMérieux, rev. 08/2003. p. 1-20. (Manual de Referência de Microbiologia VITEK).
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**. v. 74, p. 63-67, 2000.
- BRASIL. CONAMA. RESOLUÇÃO nº 357 de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, dá outras providências e revoga a Resolução nº 20/86. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 58-63. 18 mar. 2005. Seção 1.

- BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=16619&word=>>>. Acesso em: 28 dez. 2007.
- BROWN, M.A.; DE VITO, S.C. Predicting azo dye toxicity. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**. v. 23. n. 3, p. 249-324, 1993.
- BRUNO, F.S.; MALDONADO, L.M.O., coord. **O futuro da indústria têxtil e de confecções: vestuário de malha**. Brasília: MDIC/IEL, 2005. 95 p. il. (Série Política Industrial, 7).
- BUMPUS, J.A.; BROCK, B.J. Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus oxidation of persistent environmental pollutants by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Environmental Microbiology**. v. 54, p. 1143-1150, 1988.
- BUSWELL, J.A.; CAI, Y.J.; CHANG, S.T. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 128, p. 81-87, 1995.
- CHANDER, M.; ARORA, D.S.; BATH, H.K. Biodecolourisation of some industrial dyes by white-rot fungi. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v.31, p. 94-97, 2004.
- CHEN K.-C.; WU J.-Y.; LIOU D.-J.; HWANG S.-C. J. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. **Journal of Biotechnology**. v. 101, p. 57-68, 2003.
- CHEN, M.; HUANG, C-L. Industrial workers' health and environmental pollution under the new international division of labor: the Taiwan experience. **American Journal of Public Health**. v. 87, n. 7, p. 1223-1231. 1997.
- CHRISTIE, R.M. **Colour Chemistry**. United Kingdom: RSC Paperbacks, 2001. 228 p.
- COOMAN, K.; GAJARDO, M.; NIETO, J.; BORNHARDT, C.; VIDAL, G. Tannery wastewater characterization and toxicity effects on *Daphnia* spp. **Environmental Toxicology**. v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

- CORTI, A.; FRASSINETTI, S.; VALLINI, G.; D'ANTONE, S.; FICHI, C.; SOLARO, R. Biodegradation of nonionic surfactants. I. Biotransformation of 4-(1-nonyl) phenol by a *Candida maltosa* isolate. **Environmental Pollution**. v. 90, p. 83-87, 1995.
- COULIBALY, L.; GOURENE, G.; AGATHOS, S.N. Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. **African Journal of Biotechnology**. v. 2, n. 12, p. 620- 630, 2003.
- da SILVA, M. & ESPOSITO, E. “Utilização de fungos na recuperação ambiental”. In: ESPOSITO, E.; de AZEVEDO, J.L., eds. **Fungos: uma Introdução a Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2004. p. 337-378.
- DE CLERQ, J. **Batch and continuous settling of activated sludge: In- Depth Monitoring and ID Compression Modelling**. UGent, 2006. 217 p. il. – Tese (Doutorado) - Universiteit Gent, Faculteit Ingenieurswetenschappen & Faculteit Bio- Ingenieurswetenschappen, Zwijinaarde – Belgium.
- DIAS, A.E.X.O. “Biorremediação de áreas afetadas por resíduos sólidos tóxicos”. In: SISINNO, C.L.S.; OLIVEIRA, R.M., orgs. **Resíduos sólidos, ambiente e saúde: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000. p. 79-98.
- DOMSCH, K.H.; GAMS, W., ANDERSON, T.-H. Compendium of soil fungi. London: Academic Press, 1993. 859p.
- DÖNMEZ, G. Bioaccumulation of the reactive textile dyes by *Candida tropicalis* growing in molasses medium. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 30, p. 363-366, 2002.
- dos SANTOS, A.B.; CERVANTES, F.J.; van LIER, J.B. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 2369–2385, 2007.
- DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N.; JOHRI, A.K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 59, p. 143-152, 2002.

- DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**. v. 28, p. 83-99, 2000.
- FOLHETO YBC – Capítulo 25. Marcy L'Etoile: bioMérieux, rev. 08/2003. p. 1-20. (Manual de Referência de Microbiologia VITEK).
- FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. **Bioresource Technology**. v. 79, p. 251-262, 2001.
- GLENN, J.K.; GOLD, M.H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Environmental Microbiology**. v. 45, p. 1741-1747, 1983.
- GOLKA, K.; KOPPS, S.; MYSLAK, Z.W. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. **Toxicology Letters**. v. 151, p. 203-210, 2004.
- GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Corantes têxteis. **Química Nova**. v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000.
- GIULIETTI, A.M.; QUEIROZ, L.P., eds. Diversidade e caracterização dos fungos do semi-árido brasileiro. Recife: Associação de Plantas do Nordeste, 2006. 219 p. il. v. 2.
- HAN, G.H.; HUR, H.G.; KIM, S.D. Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 25, n. 1, p. 265-271, 2006.
- HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**. v.95, p. 641-655, 1991.
- HEINFLING-WEIDTMANN, A.; REEMTSMA, T.; STORM, T.; SZEWZK, U. Sulfophthalimide as major metabolite formed from sulfonated phthalocyanine dyes by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 203, p. 179- 183, 2001.

- HUSAIN, Q.; JAN, U. Detoxification of phenols and aromatic amines from polluted wastewater by using phenol oxidases. **Journal of Scientific and Industrial Research**. v. 59, p. 286-293, 2000.
- JADHAV, J.P.; PARSHETTI, G.K.; KALME, S.D.; GOVINDWAR, S.P. Decolourization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. **Chemosphere**. v. 68, p. 394-400, 2007.
- JIN, X-C.; LIU, G-Q.; XU, Z-H.; TAO, W-Y. Decolorization of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 74, p. 239-243, 2007.
- JINQI, L.; HOUTIAN, L. Degradation of azo dyes by algae. **Environmental Pollution**. v. 75, n. 3, p. 273-278, 1992.
- JUNGHANNS, C.; KRAUSS, G.; SCHLOSSER, D. Potential of aquatic fungi derived from diverse freshwater environments to decolourise synthetic azo and anthraquinone dyes. **Bioresource Technology**. doi:10.1016/j.biotech.2007.02015. 2007.
- KIM, S.J.; ISHIKAWA, K.; HIRAI, M.; SHODA, M. Characteristics of a newly isolated fungus, *Geotrichum candidum* Dec 1, which decolorizes various dyes. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 79, p. 601-607, 1995.
- KIRBY, N.; MARCHANT, R.; MCMULLAN, G. Decolourisation of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 188, p. 93-96, 2000.
- KUMARI, K.; ABRAHAM T.E. Biosorption of anionic textile dyes by nonviable biomass of fungi and yeast. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 1704-1710, 2007.
- KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S.G.; DÚRAN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The yeasts: a taxonomy study**. Amsterdam: Elsevier Science, 1998.1055p.

- LEATHAM, G.F. Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during degradation of a lignocellulosic medium. **Applied Environmental Microbiology**. v. 50, p. 859-867, 1985.
- LEATHAM, G.F. The ligninolytic activities of *Lentinus edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 14, p. 51-58, 1986.
- LEE, Y.H.; PAVLOSTATHIS, S.G. Decolorization and toxicity of reactive anthraquinone textile dyes under methanogenic conditions. **Water Resources**. v. 38, p. 1838-1852, 2004.
- LIU, W.; CHAO, Y.; YANG, X.; BAO, H.; QIAN, S. Biodecolorization of azo, anthraquinonic and triphenylmethane dyes by white-rot fungi and a laccase-secreting engineered strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 31, p.127-132, 2004.
- LUCAS, M.S.; AMARAL, C.; SAMPAIO, A.; PERES, J.A.; DIAS, A.A. Biodegradation of the diazo dye Reactive Black 5 by a wild isolate of *Candida oleophila*. **Enzyme and Microbial Technology**. v.39, p. 51-55, 2006.
- MARTINS, M.A.M.; CARDOSO, M.H.; QUEIROZ, M.J.; RAMALHO, M.T.; CAMPOS, A.M.O. Biodegradation of azo dyes by the yeast *Candida zeylanoides* in batch aerated cultures. **Chemosphere**. v. 38, n. 11, p. 2455-2460, 1999.
- MÁXIMO, C.; AMORIM, M.T.P.; COSTA-FERREIRA, M. Biotransformation of industrial reactive azo dyes by *Geotrichum* sp. CCMI 1019. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 32, p. 145-151, 2003.
- MCMULLAN, G.; MEEHAN, C.; CONNEELY, A.; KIRBY, N.; ROBINSON, T.; NIGAM, P.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; SMYTH, W.F. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 56, p. 81-87, 2001.
- MOLDES, D.; LORENZO, M.; SANROMÁN, M.Á. Degradation or polymerisation of Phenol Red dye depending to the catalyst system used. **Process Biochemistry**. v.39, p. 1811-1815, 2004.

- NIGAM, P.; ARMOUR, G.; BANAT, I.M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Physical removal of textile dyes and solid state fermentation of dye adsorbed agricultural residues. **Bioresource Technology**. v. 72, p. 219-226, 2000.
- PAJOT, H.F.; de FIGUEROA, L.I.C.; FARINA, J.I. Dye-decolorizing activity in isolated yeasts from the ecoregion of Las Yungas (Tucumán, Argentina). **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p. 1503-1511, 2007.
- PARSHETTI, G.K.; KALME, S.D.; GOMARE, S.S.; GOVINDWAR, S.P. Biodegradation of Reactive blue-25 by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. **Bioresource Technology**. v. 98, p.3638-3642, 2007.
- PASTI, M.B.; CRAWFORD, D.L. Relationships between the abilities of streptomycetes to decolorize three anthron-type dyes and to degrade lignocellulose. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 37, p. 902-907, 1991.
- PEARCE, C.I.; LOYD J.R.; GUTHRIE, J.T. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. **Dyes and Pigments**. v. 58, p. 179-196, 2003.
- PERALTA-ZAMORA, P.; KUNZ, A.; MORAES, S.G.; PELEGRINI, R.; MOLEIRO, P.C.; REYES, J.; DURAN, N. Degradation of reactive dyes I. A comparative study of ozonation, enzymatic and photochemical processes. **Chemosphere**. v. 38, n. 4, p. 835-852, 1999.
- _____; PEREIRA, C.M.; TIBURTIUS, E.R.L.; MORAES, S.G.; ROSA, M.A.; MINUSSI, R.C.; DURAN, N. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. **Applied Catalysis B: Environmental**. v.42, p. 131-144, 2003.
- QUITÉRIO, L.A.D. Vigilância Sanitária, processos de produção e riscos à saúde: a promoção da saúde na prática concreta de um caso de contaminação ambiental. **Revista Brasileira de Vigilância Sanitária**. v. 1, n. 1, p. 79- 83, 2005.
- RAI, H.S.; MULTANI, J.S.; BANSAL, T.K.; SHARMA, R.; BANERJEE, U.C. Removal of dyes from effluents of textile and dyestuff manufacturing industry: A review of emerging techniques with special reference to biological treatment. **Critical Reviews on Environmental Science and Technology**. v. 35, p. 219-238, 2005.

- RAMALHO, P.A.; SCHOLZE, H.; CARDOSO, M.H.; RAMALHO, M.T.; OLIVEIRA-CAMPOS, A.M. Improved conditions for the aerobic reductive decolourisation of azo dyes by *Candida zeylanoides*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, p. 848-854, 2002.
- _____; CARDOSO, M.H.; CAVACO-PAULO, A.; RAMALHO, M.T. Characterization of azo reduction activity in a novel Ascomycete yeast strain. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, p. 2279-2288, 2004.
- _____. **Degradation of dyes with microorganisms studies with ascomycete yeasts**. Braga: UMinho, 2005a. 100 p. il. – Tese (Doutorado) – Universidade do Minho, Escola de Ciências & Escola de Engenharia, Minho - Portugal.
- _____; PAIVA, S.; CAVACO-PAULO, A.; CASAL, M.; CARDOSO, M.H.; RAMALHO, M.T. Azo reductase activity of intact *Saccharomyces cerevisiae* cells is dependent on the Fre1p component of plasma membrane ferric reductase. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, n. 7, p. 3882-3888, 2005b.
- ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**. v. 77, p. 247-255, 2001.
- SAMSOM, R.A.; ROEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O., eds. **Introduction to food and airborne fungi**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 387p.
- SEMPLE, K.T.; REID, B.J.; FERMOR, T.R. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. **Environmental Pollution**. v. 112, p. 269-283, 2001.
- SHINY, K.J.; REMANI, K.N.; NIRMALA, E.; JALAJA, T.K.; SASIDHARAN, V.K. Biotreatment of wastewater using aquatic invertebrates, *Daphnia magna* and *Paramecium caudatum*. **Bioresource Technology**. v. 96, n. 1, p. 55-58, 2005.

- SILVA, E.M.; MARTINS, S.F., MILAGRES, A.M.F. Extraction of manganese peroxidase produced by *Lentinula edodes*. **Bioresource Technology**. (2007), doi:10.1016/j.biortech.2007.04.064.
- SILVA, E.S.; CAVALLAZZI, J.R.P.; MULLER, G.; SOUZA, J.V.B. Biotechnological applications of *Lentinus edodes*. **Journal of Food, Agriculture & Environment**. v. 5, n. 3&4, p. 403 - 407, 2007.
- SINGH, H. **Mycoremediation: fungal remediation**. New Jersey: Wiley-Interscience, 2006. 592p.
- SLOKAR, Y.M.; LE MARECHAL, A.M. Methods of decoloration of textile wastewaters. **Dyes and Pigments**. v. 37, n. 4, p. 335-356, 1998.
- SOUZA, S.M.A.G.U.; FORGIARINI, E.; SOUZA, A.A.U. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). **Journal of Hazardous Materials**. v. 147, p. 1073-1078, 2007.
- SPONZA, D.T.; ISIK, M. Toxicity and intermediates of C.I. Direct Red 28 dye through sequential anaerobic/aerobic treatment. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 2735-2744, 2005.
- STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 56, p. 69-80, 2001.
- SWAMY, J.; RAMSAY, J.A. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 24, p.130-137, 1999.
- TAMBELLINI, A.T.; CÂMARA, V.M. Vigilância Ambiental em Saúde: conceitos, caminhos e interfaces com outros tipos de vigilância. **Caderno Saúde Coletiva**. v. 10, n. 1, p. 77-93, 2002.
- TAYRA, F.; RIBEIRO, H. Vigilância e saúde ambiental: o papel dos indicadores de sustentabilidade – Danos, riscos e incerteza biológica. **Revista Brasileira de Vigilância Sanitária**. v.1, n. 2, p.108-116, 2005.
- VAIDYA, A.A.; DATYE, K.V. Environmental pollution during chemical processing of synthetic fibers. **Colourate**. v. 14, p. 3-10, 1982.
- VALLINI, G.; FRASSINETTI, S.; SCORZETTI, G. *Candida aquaetextoris* sp. nov., a new species of yeast occurring in sludge from a textile industry

wastewater treatment plant in Tuscany, Italy. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 47, n. 2, p. 336-340, 1997.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S.N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**. v. 22, p. 161-187, 2003.

YANG, Q.; YEDILER, A.; YANG, M.; KETTRUP, A. Decolorization of an azo dye, Reactive Black 5 and MnP production by yeast isolate: *Debaryomyces polymorphus*. **Biochemical Engineering Journal**. v. 24, p. 249-253, 2005.

_____.; TAO, L.; YANG, M.; ZHANG, H. Effects of glucose on the decolorization of Reactive Black 5 by yeast isolates. **Journal of Environmental Sciences**. v. 20, p. 105-108, 2008.

YU, Z.; WEN, X. Screening and identification of yeasts for decolorizing synthetic dyes in industrial wastewater. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 56, p. 109-114, 2005.

ZHENG, Z.; LEVIN, R.E.; PINKHAM, J.L.; SHETTY, K. Decolorization of polymeric dyes by a novel *Penicillium* isolate. **Process Biochemistry**. v. 34, p. 31-37, 1999.