

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

**DESCOLORAÇÃO DE CORANTES INDUSTRIAIS POR  
LEVEDURAS ISOLADAS DE MOLUSCOS DO RIO SUBAÉ – BAHIA**

**LILIANE ANDRADE SANDE DA SILVA**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
SETEMBRO - 2015**

# **DESCOLORAÇÃO DE CORANTES INDUSTRIAIS POR LEVEDURAS ISOLADAS DE MOLUSCOS DO RIO SUBAÉ – BAHIA**

**LILIANE ANDRADE SANDE DA SILVA**

Biomédica

Universidade Estadual de Santa Cruz – 2009

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientação: Prof. Dr<sup>a</sup> Márcia Luciana Cazetta

Co-orientação: Prof. Dr<sup>a</sup> Norma Suely Evangelista Barreto

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

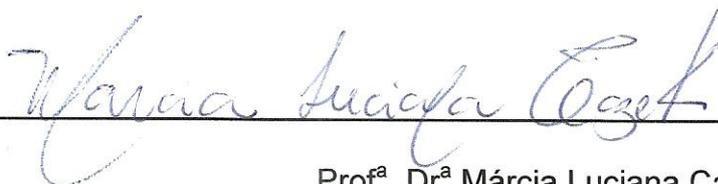
**SETEMBRO – 2015**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S586d	<p>Silva, Liliâne Andrade Sande da. Descoloração de corantes industriais por leveduras isoladas de moluscos do Rio Subaé-Bahia / Liliâne Andrade Sande da Silva. – Cruz das Almas, BA, 2015. 86f.; il.</p> <p>Orientadora: Márcia Luciana Cazetta.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1. Águas residuais – Efluentes – Biodegradação. 2. Corantes – Biodegradação. 3. Bahia – Rio Subaé. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD: 628.50154</p>
-------	--

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

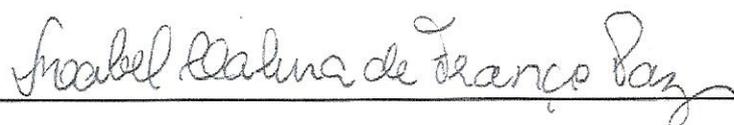
**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
LILIANE ANDRADE SANDE DA SILVA**



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Márcia Luciana Cazetta

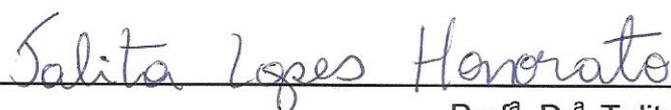
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

(Orientadora)



Profa. Dra. Mabel Calina França Paz

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Talita Lopes Honorato

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_ conferindo o grau de  
Mestre em Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_.

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS pela vida, pelas pessoas e oportunidades que ELE tem colocado no meu caminho dia a dia.

A minha orientadora Profa. Márcia Luciana Cazetta pela paciência, incentivo, confiança e pela oportunidade de desenvolver este trabalho em seu laboratório.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Norma Suely Evangelista Barreto pela colaboração em todas as etapas deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Carine, Thiara, Juliana e Camila, pela ajuda, colaboração, pelo convívio harmonioso, pelas conversas, brincadeiras e risadas.

Às técnicas do Bloco L, Carol e Lene, pela paciência, amizade e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais que, mesmo estando longe, sempre estiveram oferecendo palavras de incentivo e por todos os seus ensinamentos. Serei eternamente grata a vocês!

A minha tia Claudiane pela amizade, carinho e apoio incondicional.

Ao meu irmão Leandro pela amizade, compreensão e paciência.

A professora Dra. Mariana Culoto de Araújo, e equipe do NEPA pela ajuda nos testes de toxicidade com *Artemia salina*.

Ao professor Dr. André Dias de Azevedo Neto pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola e a todos os funcionários da seção de pós-graduação pela paciência e colaboração.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

## LISTA DE TABELAS

### Revisão de Literatura

<b>Tabela 1.</b> Faixa de fixação de várias classes de corantes.....	5
<b>Tabela 2.</b> Vantagens e desvantagens de processos químicos e físicos na descoloração de efluentes industriais.....	12

### Capítulo 1

<b>Tabela 1.</b> Valores da CL <sub>50</sub> para as amostras do RBBR não tratado e tratado durante 24 e 120 horas de incubação.....	52
--	----

### Capítulo 2

<b>Tabela 1.</b> Valores da CL <sub>50</sub> para as amostras tratadas pelas leveduras <i>Candida</i> sp. e <i>Pichia kudriavzevii</i> e amostras não tratadas do Alaranjado G durante 24 e 120 horas de incubação.....	76
<b>Tabela 2.</b> Crescimento da radícula (cm) em diferentes concentrações do corante tratado e não tratado durante 24 e 120 horas de incubação.....	78
<b>Tabela 3.</b> Taxa de germinação (%) de sementes em diferentes concentrações do corante tratado e não tratado durante 24 e 120 horas de incubação.....	78

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1.** Estrutura química do corante Azul Brilhante de Remazol R .....39
- Figura 2.** Descoloração do corante RBBR na concentração de 25 ppm, por leveduras, em meio MDN a 2% de glicose, pH 5,0 a 25 °C, durante 40 horas de incubação.....42
- Figura 3:** Comparação da biomassa (D.O.) no comprimento de onda de 600 nm para os isolados OJU2 (a), SJL6 (b), SF5 (c), SJ10 (d) e SJU5 (e) em MND com corante e sem corante durante 40 horas de incubação.....42
- Figura 4.** Efeito do pH na descoloração do RBBR (a) e no crescimento celular (b) na concentração de 25 ppm para os isolados OJU2, SJL6, SF5, SJ10 e SJU5 em meio MND, contendo 2% de glicose a 25 °C durante 24n horas de incubação .....43
- Figura 5.** Efeito da concentração de glicose na descoloração do RBBR (a) e no crescimento celular (b) a 25 ppm para os isolados OJU2, SF5 a pH 4,0; SJL6 e SJU5 a pH 3,0 e SJ10 pH 5,0 em meio MND a 25°C durante 24 horas de incubação.....44
- Figura 6.** Efeito da temperatura nas taxas de descoloração do corante RBBR (a) e no crescimento celular (b) a 25 ppm para os isolados OJU2 e SF5 a pH 4,0; SJL6 e SJU5 a pH 3,0 e SJ10 a pH 5,0 em meio MND a 2% de glicose durante 24 horas de incubação.....46
- Figura 7.** Efeito da concentração inicial do corante nas taxas de descoloração do RBBR (a) e no crescimento celular (b) para os isolados OJU2 e SF5 em pH 4,0; SJL6 e SJU5 a pH 3,0 e SJ10 a pH 5,0 em meio MND a 2% de glicose durante 24 horas de incubação.....46

<b>Figura 8.</b> Taxas de descoloração do corante RBBR na concentração de 25 ppm nas melhores condições de cultivo (a) e nas condições iniciais de descoloração (b) durante 48 e 40 horas de incubação, respectivamente.....	48
<b>Figura 9.</b> Espectro UV-VIS do RBBR antes e depois da biodegradação por 96 horas pelos isolados OJU2 (a); SJL6 (b); SF5 (c); SJ10 (d); SJU5 (e) em condições otimizadas de cultivo.....	49
<b>Figura 10.</b> Possível mecanismo da transformação biocatalítica do RBBR por <i>Aspergillus flavus</i> (Perlatti et al. 2012).....	50
<b>Figura 11.</b> Possível via da degradação do RBBR pela lacase de <i>Polyporus</i> sp. S133 (Hadibarata et al., 2012b).....	51

## Capítulo 2

<b>Figura 1.</b> Estrutura química do Alaranjado G (Niu et al., 2012).....	63
<b>Figura 2.</b> Efeito da concentração inicial do corante nas taxas de descoloração do Alaranjado G (a) e no crescimento celular (b) para <i>Candida</i> sp. (■) e <i>Pichia kudriavzevii</i> (●) em meio MND contendo 2% de glicose, pH 5,0 a 25 °C durante 24 horas de incubação.....	66
<b>Figura 3.</b> Efeito da concentração de glicose na descoloração biológica do Alaranjado G a 100 ppm (a) e crescimento celular (b) para os isolados <i>Candida</i> sp. (■) e <i>Pichia kudriavzevii</i> (●) em meio MDN, com pH 5,0 a 25 °C durante 24 horas de incubação.....	69
<b>Figura 4.</b> Efeito do pH na descoloração biológica do Alaranjado G na concentração de 100 ppm (a) e no crescimento celular (b) em meio MND contendo 2% de glicose pelos isolados <i>Candida</i> sp. (■) e <i>Pichia kudriavzevii</i> (●) a 25 °C durante 24 horas de incubação.....	70
<b>Figura 5.</b> Efeito da temperatura na descoloração biológica (a) e crescimento celular (b) do Alaranjado G a 100 ppm em meio MND contendo 2% de glicose	

para os isolados *Candida* sp. (■) com pH 3,0 e *Pichia kudriavzevii* (●) com pH 4,0 durante 24 horas de incubação.....72

**Figura 6.** Taxa de descoloração em melhores condições para os isolados *Candida* sp. (■) e *Pichia kudriavzevii* (●) durante 30 horas de incubação em intervalos de 6 horas.....74

**Figura 7.** Espectro UV-VIS do Alaranjado G antes e depois da biodegradação pelos isolados de *Candida* sp. (a) e *Pichia kudriavzevii* (b).....76

## ÍNDICE

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
Introdução.....	3
Referencial teórico.....	4
Indústria têxtil.....	4
Corantes têxteis.....	6
Métodos de tratamentos de efluentes.....	9
- Métodos químicos.....	9
-Métodos físicos.....	10
-Métodos biológicos.....	12
Utilização de micro-organismos na descoloração de corantes e tratamento de efluentes têxteis.....	16
Fatores abióticos que influenciam na descoloração de corantes por micro-organismos.....	19
Toxicidade de efluentes têxteis.....	22
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>26</b>

### CAPÍTULO 1

Descoloração do corante Azul Brilhante de Remazol R por leveduras isoladas de moluscos do Rio Subaé-BA.....	36
RESUMO.....	37
ABSTRACT.....	37
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	39
Corante.....	39
Triagem das leveduras.....	39
Determinação da biomassa dos isolados.....	40

Descoloração sob diferentes condições de cultivo.....	40
Screening do comprimento de onda do produto de degradação.....	40
Testes de toxicidade aguda utilizando <i>Artemia salina</i> .....	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
Triagem das leveduras.....	41
Descoloração sob diferentes condições de cultivo.....	43
- Efeitos do pH.....	43
- Efeito da concentração de glicose.....	44
- Efeito da temperatura.....	45
- Concentração inicial do corante.....	46
Ensaio de validação nas condições ótimas de cultivo.....	47
Análise do produto de degradação por espectrofotometria.....	48
Testes de toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i> .....	51
CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

## **CAPÍTULO 2**

Efeito das condições de cultivo na descoloração do corante Alaranjado G por leveduras isoladas de moluscos de água doce.....	59
RESUMO.....	60
ABSTRACT.....	60
INTRODUÇÃO.....	61
MATERIAL E MÉTODOS.....	62
Corante.....	62
Micro-organismos utilizados nos ensaios de descoloração.....	63
Ensaio de descoloração utilizando diferentes parâmetros de cultivo.....	63
Determinação da biomassa dos isolados.....	64
Screening do comprimento de onda do produto de degradação.....	64
Testes de toxicidade.....	65
-Ensaio com semente de alface ( <i>Lactuca sativa</i> ).....	65
-Ensaio com <i>Artemia salina</i> .....	65
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66

Efeito de diferentes parâmetros na descoloração do corante no crescimento das leveduras.....	66
-Efeito da concentração inicial do corante.....	66
-Efeito da concentração de glicose.....	68
-Efeito do pH.....	69
-Efeito da temperatura.....	72
Testes de validação.....	73
Análise do produto da degradação.....	75
Ensaio de toxicidade.....	76
-Ensaio com <i>Artemia salina</i> .....	76
-Ensaio de fitotoxicidade com sementes de alface ( <i>Lactuca sativa</i> ).....	77
CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>87</b>

## RESUMO

### SILVA, L. A. S. Descoloração de corantes industriais por leveduras isoladas de moluscos do Rio Subaé – Bahia

A poluição do meio ambiente por efluentes industriais tem aumentado gradativamente nas últimas décadas. Os resíduos produzidos frequentemente contêm poluentes tóxicos e resistentes aos sistemas convencionais de tratamento. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar o potencial de descoloração de dois corantes sintéticos, o Alaranjado G e o Azul Brilhante de Remazol R (RBBR) por leveduras isoladas do Rio Subaé-Bahia. Nos ensaios de descoloração, entre os 60 isolados estudados, cinco (OJU2, SFL6, SJ10, SF5 e SJU5) foram capazes de descolorir o RBBR e três (OJU1, SF4 e SD5) descoloriram o Alaranjado G. Parâmetros como temperatura, concentração inicial do corante, pH e glicose foram analisados a fim de otimizar o processo de biodescoloração. Para o RBBR, as melhores taxas de descoloração, variando de 80% a 93%, ocorreram a 25 ppm na temperatura de 25 °C, em condições ácidas utilizando 2% de glicose para todos os isolados. Para o Alaranjado G, a melhor taxa de descoloração, de 97% em condições otimizadas, ocorreu em pH ácido, a 100 ppm, utilizando a 2% de glicose. No entanto, para o isolado OJU1 e SF4 a melhor temperatura de descoloração ocorreu a 35 °C, enquanto que para o isolado SD5 a melhor temperatura foi de 45 °C. A análise do produto da descoloração por espectrofotometria indicou que ocorreu a biodegradação da molécula do corante, principalmente a hidrólise do grupo cromóforo. Os ensaios de toxicidade foram realizados com *Artemia salina* e sementes de alface (*Lactuca sativa*) com amostras antes e depois da descoloração. Para os ensaios com *Artemia salina*, o RBBR não tratado apresentou uma CL<sub>50</sub> de 8,16% ao passo que para os isolados SJ10 e SJU5 os valores foram de 19,5% e 20,8%, respectivamente, após 120 horas de incubação. No entanto, para os isolados OJU2, SFL6 e SF5 não foi possível obter um valor de CL<sub>50</sub> demonstrando toxicidade mais elevada até mesmo para o corante não tratado. Para o Alaranjado G, apenas o isolado SD5 apresentou uma CL<sub>50</sub> de 11,21% após 120 horas de incubação. Em relação à fitotoxicidade do Alaranjado G, o maior tempo de incubação, de 120 horas, diminuiu a toxicidade dos metabólitos tanto para o crescimento das radículas como para as taxas de germinação. Assim, os resultados demonstraram que alguns dos isolados possuem bom potencial de descoloração para serem utilizados em processos de biorremediação de corantes industriais.

Palavras-chave: corantes, fungos, biorremediação.

## ABSTRACT

### **SILVA, L. A. S. Textile dyes decolorization by yeasts isolated by yeasts isolated from molluscs the Subaé River – BA.**

The pollution of the environmental by industrial effluents has gradually increased in recent decades. The wastes produced often contain toxic pollutants and resistant to conventional treatment systems. The aim of this study was to analyze the potential for decolorization of two synthetic dyes, Orange G and Remazol Brilliant Blue R (RBBR) by yeasts isolated from Subaé River-Bahia, Brazil. In decolorization assays among the 60 isolates, five (OJU2, SFL6, SJ10, SF5 and SJU5) were able to decolorize the RBBR and three (OJU1, SF4 and SD5) decolorized the Orange G. Parameters such as temperature, initial dye concentration, initial pH, and glucose were analyzed to optimize the decolorization process. For RBBR, the best decolorization rates vary from 80 to 93%, occurred at 25 ppm at 25 °C, under acidic conditions using 2% glucose for all isolates. For Orange G, the best decolorization, of 97% in optimized conditions, occurred under acidic pH, at 100 ppm, using 2% glucose for all isolates. However, for the isolated OJU1 and SF4 the best temperature was 35 °C while for the isolated SD5 to the best temperature was 45 °C. Analysis of the decolorization products by spectrophotometry indicated that the biodegradation of the dye molecule occurred by hydrolysis of the chromophore group. For tests with *Artemia salina*, the RBBR untreated showed a LC<sub>50</sub> of 8.16% whereas for the SJ10 and SJU5 isolated values were 19.5% and 20.8%, respectively, after 120 h of incubation. The toxicity tests were conducted on *Artemia salina* and *Lactuca sativa* seeds in the samples before and after decolorization. However, for isolated OJU2, SFL6 and SF5 were not possible to get a LC<sub>50</sub> value showing higher toxicity even to dye untreated. For Orange G, only isolate SD5 showed LC<sub>50</sub> of 11.21% after 120 h of incubation. For Orange G phytotoxicity, longer incubation period, of 120 h, decreased the toxicity of the metabolites on both growth of rootles and germination rates. The results demonstrated that the some isolated has good potential for use in bioremediation processes.

Keywords: dyes, fungi, bioremediation.

# INTRODUÇÃO

Ao longo da história, os corantes sempre estiveram presentes como objeto de atividades comerciais. Esses compostos químicos são usados pelas indústrias alimentícia, farmacêutica, têxtil, automotiva, de artefatos de couro, papel, tintas e cosméticos, embora a maior parte dos corantes fabricados tenha como finalidade atender à indústria têxtil (MOHANA et al., 2008). A preferência por corantes artificiais, em detrimento dos naturais, deve-se ao fato de que os primeiros possuem maior fixação, propiciando cores mais fortes e aumento na tonalidade com maior estabilidade e menor custo (CHANG et al., 2001).

A indústria têxtil é responsável por lançar grande volume de resíduos em águas correntes contendo elevado teor de compostos orgânicos e de coloração, representando o maior problema ambiental gerado nesse setor (CHEN et al., 2009). Ao diminuir a transparência da água e impedir a penetração da radiação solar, os rejeitos coloridos diminuem a atividade fotossintética, provocam distúrbios na solubilidade dos gases, causam diferentes graus de toxicidade, além de apresentar potencial mutagênico e carcinogênico em organismos que entrarem em contato com o corante, ou seus resíduos (ROBINSON et al., 2001; FU & VIRARAGHAVAN, 2001).

Em geral, métodos convencionais como adsorção, precipitação, degradação química, eletroquímica e fotoquímica são pouco eficientes no tratamento desses poluentes por desencadear poluição secundária e apresentar alto custo (KAPDAN et al., 2000). Dentre as alternativas de tratamento para efluentes industriais, o tratamento biológico por degradação tem se destacado por ser ambientalmente mais adequado (STOLZ, 2001). Bactérias, fungos filamentosos, algas e leveduras são alguns dos micro-organismos capazes de degradar os corantes por meio de hidrólise enzimática ou por adsorção (CHANG et al., 2001; ROBINSON et al., 2001; MOOSVI et al., 2007). A utilização de leveduras no processo de biorremediação oferece vantagens como a elevada capacidade de bioacumulação, o rápido crescimento, capacidade de sobreviver em ambientes desfavoráveis e rápida descoloração quando comparado a fungos filamentosos (YANG et al., 2008). Assim, devido ao grande problema ambiental

causado por efluentes têxteis, se faz necessária a utilização de novas metodologias que garantam a total mineralização dos corantes, principalmente a baixos custos, podendo as leveduras apresentar elevado potencial biotecnológico na remoção de poluentes. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar o potencial de degradação de corantes têxteis por leveduras isoladas de água e moluscos do Rio Subaé.

A presente dissertação possui dois capítulos e uma revisão de literatura que consiste de uma introdução geral contendo os principais tipos de corantes industriais, assim como as metodologias utilizadas no tratamento de efluentes e os riscos inerentes do descarte destes, contendo corantes no meio ambiente. Possui como objetivo apresentar informações gerais dos tópicos mais relevantes sobre o tratamento e toxicidade de efluentes contendo corantes industriais.

O capítulo 1, intitulado “Descoloração do corante Azul Brilhante de Remazol R por leveduras isoladas de moluscos do Rio Subaé-BA” apresenta a descoloração de um corante antraquinônico por cinco diferentes isolados de leveduras, assim como a influência de fatores abióticos durante o processo de degradação da molécula do corante, as possíveis vias metabólicas envolvidas no processo e os efeitos tóxicos que o corante tratado e não tratado possuem sobre o bioindicador *Artemia salina*.

O capítulo 2, intitulado como “Efeito das condições de cultivo na descoloração do corante Alaranjado G por leveduras isoladas de moluscos de água doce” apresenta informações sobre o potencial de degradação deste corante azo, a influência de diferentes parâmetros no processo de descoloração, assim como os efeitos tóxicos do corante tratado e não tratado sobre diferentes organismos da cadeia trófica.

# REVISÃO DE LITERATURA

## Introdução

A contaminação de águas naturais tem sido um dos grandes problemas da sociedade moderna e o setor têxtil possui especial destaque, devido à utilização de uma variedade de produtos químicos e corantes nos processos de tingimento e de acabamento. Aliado a isso, o seu grande parque industrial gera grandes volumes de efluentes, os quais, quando não corretamente tratados, podem causar sérios problemas de contaminação ambiental (KUNZ et al., 2002; AL-KDASI et al., 2004). O efluente industrial pigmentado é um evidente indicador da poluição da água que, além de comprometer a estética, provoca consideráveis efeitos prejudiciais à fauna, flora e a saúde pública (VITOR & CORSO, 2008).

O desenvolvimento de tecnologias econômicas e efetivas para o tratamento de efluentes têm sido objeto de grande interesse devido ao aumento da conscientização e rigidez nas normas ambientais. As principais técnicas disponíveis na literatura para descoloração de águas de rejeito envolvem, principalmente, processos de adsorção, precipitação, degradação química, eletroquímica e fotoquímica, além da biodegradação. Todos esses métodos possuem diferentes capacidades de descoloração, custo e velocidade de operação (ROBINSON et al., 2001; PARK et al., 2007).

Processos biológicos têm despertado maior interesse no tratamento de efluentes por demandar menor custo e, muitas vezes, conseguir modificar a molécula inicial em um composto menos prejudicial ao meio ambiente. A eficácia da descoloração microbiológica depende da adaptabilidade e da atividade dos micro-organismos selecionados, que incluem bactérias, fungos filamentosos e leveduras (CHEN et al., 2003; RAUF & ASHRAF, 2012). A descoloração de corantes por micro-organismos pode ocorrer através de dois principais mecanismos: a biossorção ou degradação enzimática. A biossorção é definida como o acúmulo e concentração de poluentes provenientes de soluções aquosas utilizando materiais biológicos, que pode ocorrer através de adsorção, complexação, quelação ou troca iônica (AKSU & DONMEZ, 2003; VIJAYARAGHAVAN & YUN, 2007). Quando se trata de micro-organismos, a

capacidade de adsorção é atribuída aos heteropolissacarídeos e componentes lipídicos da parede celular, que contêm diferentes grupos funcionais que causam intensa força de atração entre os corantes e a parede celular do micro-organismo (VITOR & CORSO, 2008). Embora a utilização de micro-organismos como bio-sorventes possua bom desempenho e baixo custo (VIJAYARAGHAVAN & YUN, 2007), a eficácia desse método depende de algumas condições como pH, temperatura, força iônica, tempo de contato, concentração e estrutura do corante, e o tipo de micro-organismo (RENGANATHAN et al., 2006).

Os micro-organismos, tais como bactérias, fungos e algas, podem ser utilizadas com sucesso para remover a cor de uma vasta gama de corantes. Os fungos são exemplos de micro-organismos que apresentam grande importância em biorremediações, pois possuem a capacidade de degradar moléculas mais complexas devido à produção de enzimas específicas (RAUF & ASHRAF, 2012). Entre as enzimas que podem atuar na degradação oxidativa de corantes podem-se destacar as fenoloxidasas tais como, manganês peroxidase, lacase e lignina peroxidase (YANG et al. 2005). As leveduras representam uma fonte de baixo custo, disponível e possuem algumas espécies como *Candida zeylanoides*, *Candida oleophila* e *Debaryomyces polymorphus* que apresentam uma importante atividade enzimática de biodegradação concomitante com a descoloração de corantes (DONMEZ, 2002; RAMALHO et al., 2002; LUCAS et al., 2006; YANG et al., 2003).

## **Referencial Teórico**

### **Indústria têxtil**

A indústria têxtil e de vestuário é uma das maiores e mais antigas presentes em todo o mundo e possui importante papel por ser responsável pela maior parte da economia dos países desenvolvidos e emergentes (GEREFFI, 2002; KEANE & TE VELDE, 2008). No Brasil, o processo de industrialização têxtil teve início no final do século XIX e constitui um fator de significativa importância para a economia, tendo desempenhado um papel de grande relevância no processo de desenvolvimento do país. Segundo a Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção (ABIT), o setor têxtil e de confecção nacional compreendem mais de 30 mil empresas e gera 1,7 milhão de empregos em toda

a sua extensa cadeia, que inclui fios, fibras, tecelagens e confecções. Efluentes têxteis possuem características variadas e diferentes composições dependendo do tipo de tecido fabricado e dos produtos químicos utilizados e são constituídos por grandes quantidades de gases, líquidos e resíduos sólidos. Muitas dessas substâncias não possuem um método adequado de tratamento estabelecido e, conseqüentemente, esses efluentes não tratados têm sido descartados no ambiente (SAVIN & BUTNARU, 2008). O impacto ambiental causado pela indústria têxtil têm sido reconhecido tanto em relação à descarga de poluentes como ao consumo de água. Durante todas as etapas de fabricação cerca de 200 litros de água são utilizados para produzir 1 kg de matéria têxtil. Estima-se que cerca de 1.000-3.000 m<sup>3</sup> de águas residuais são formadas depois de processar cerca de 12-20 toneladas de têxteis por dia (MALIK, 2002).

Embora as estruturas dos corantes sintéticos tenham significativo papel na aplicação industrial, o uso desses compostos resulta no comprometimento de recursos essenciais à vida, como a água. Durante o processo de tingimento uma parte do corante é perdida, sendo que a quantidade varia dependendo do tipo de corante utilizado, entre 5 % para corantes básicos a 40 % para corantes reativos sulfonados quando usados em celulose, devido ao baixo nível de fixação do corante à fibra (Tabela 1) (MCMULLAN et al., 2001; PEARCE et al., 2003).

Tabela 1 - Faixa de fixação de várias classes de corantes:

<i>Classe de corante</i>	<i>Fibra</i>	<i>Grau de Fixação (%)</i>	<i>Perda para o efluente (%)</i>
<i>Ácido</i>	Poliamida	80-95	5-20
<i>Básico</i>	Acrílico	95-100	0-5
<i>Direto</i>	Celulose	70-95	0-10
<i>Disperso</i>	Poliéster	90-100	2-10
<i>Pré-metalizados</i>	Lã	90-98	10-50
<i>Reativos</i>	Celulose	50-90	10-40
<i>Com grupo sulfônico</i>	Celulose	60-90	5-20

Fonte: Adaptado de CERVANTES & SANTOS 2011.

A presença de pequenas quantidades de corante, cerca de 1 ppm, é suficiente para afetar a transparência e a solubilidade dos gases de mananciais, rios e outros corpos d'água. A coloração do efluente afeta a penetração da luz

solar e a dissolubilidade do oxigênio, prejudicando a fotossíntese de plantas aquáticas e a absorção da luz pelas algas. A presença de corantes, bem como seus produtos de degradação, na água também pode causar problemas na saúde humana como náuseas, hemorragias, úlceras na pele e mucosas. Em adição, os resíduos presentes nos efluentes têxteis causam impactos significativos no carbono orgânico total (COT), demanda bioquímica por oxigênio (DBO), demanda química por oxigênio (DQO), sólidos suspensos, salinidade, coloração e pH (DEY & ISLAM, 2015). Essas substâncias após entrarem no ambiente podem sofrer degradação biótica ou abiótica e, dependendo de suas características químicas, persistirem por longos períodos de tempo. Esses metabólitos podem ser tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (SATHIYA et al., 2007; ASAD et al., 2007; RAUF & ASHARF, 2012).

A natureza recalcitrante e a estrutura aromática complexa dos corantes influenciam no tipo de tratamento de efluentes. Assim, o desenvolvimento de processos alternativos e de alta eficiência para a remoção da cor em efluentes industriais é de extrema importância, uma vez que as normas estão cada vez mais rigorosas em relação ao descarte de resíduos no meio ambiente (STOLZ, 2001; SILVA et al., 2012).

### **Corantes têxteis**

Segundo Rai et al. (2005), em 1856 Henry Perkin descobriu o primeiro corante sintético comercializável que, quando aplicado à fibra, garantia maior estabilidade da cor e resistência à luz, a compostos químicos, a agentes oxidantes e à degradação microbiana. Ao contrário de compostos naturais, os corantes sintéticos possuem coloração por causa de características tais como absorver ou emitir a luz no espectro visível de 400 a 700 nm, possuir pelo menos um grupo cromóforo, possuir um sistema conjugado, ou seja, uma estrutura com ligação duplas e simples alternadas, e exibir ressonância de elétrons que é a força estabilizante de compostos orgânicos (ABRAHART, 1977).

Os corantes sintéticos são macromoléculas orgânicas capazes de conferir cor a diferentes tipos de substratos, possibilitando a utilização dos mesmos em variados setores industriais como indústrias têxteis, de couro, tingimento e de

alimentos. Por possuir variedade de cores, facilidade de síntese, estabilidade à luz solar, resistência a processos de lavagem e a ação de produtos químicos, os corantes sintéticos são mais utilizados quando comparados aos corantes naturais (SATHIYA et al., 2007; RAUF & ASHRAF, 2012).

A molécula de corante é caracterizada por dois grupamentos principais, sendo o primeiro o grupo cromóforo e a segundo a estrutura responsável por sua fixação ao substrato (KUNZ et al., 2002). A estabilidade da molécula do corante é diretamente associada à força de ligação química dos átomos componentes dos grupos cromóforos e auxocromos (KIMURA et al., 1999). Os corantes possuem uma ampla variedade de estruturas químicas diferentes, principalmente grupos aromáticos e heterocíclicos substituídos, como amina aromática ( $C_6H_5-NH_2$ ), fenil ( $C_6H_5-CH_2$ ) e naftil ( $NO_2-OH$ ) (RAJAMOHAN & RAJASIMMAN, 2012). Nesse contexto, os corantes representam um grupo grande e complexo de compostos orgânicos que diferem entre si de acordo com o modo de produção, nas suas propriedades químicas e/ou físicas, e características relacionadas com o processo de aplicação (MUHD JULKAPLI et al., 2014). Por possuir essa grande variedade estrutural, os corantes podem ser sistematicamente classificados de acordo com os grupos cromóforos ou conforme o processo de aplicação. Entre os primeiros, estão incluídos os corantes acridina, azo, arilmetano, antraquinônicos, xantenos, nitro, sulfurosos, índigos e trifenilmetil (FORGACS et al., 2004; RAUF & ASHRAF, 2012), no entanto, os grupos de corantes reativos mais utilizados pelas indústrias têxteis são os corantes azo e antraquinônicos (FORGACS et al., 2004; SANTOS et al., 2007; SUDHA et al., 2014).

Em relação às propriedades de aplicação, os corantes dividem-se nos seguintes tipos: corantes à cuba, corantes de enxofre, azóicos, dispersos, diretos, ácidos, pré-metalizados e reativos, os quais são discriminados e descritos a seguir (GUARATINI & ZANONI, 2000):

Corantes reativos: possuem um grupo eletrofílico (reativo) capaz de formar ligação covalente com grupos hidroxila das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas e com grupos amino de poliamidas. Os principais corantes reativos possuem as funções azo e antroquinona.

Corantes diretos: são constituídos principalmente por corantes contendo mais de um grupo de azo, como diazo, triazo, entre outros, ou pré transformados

em complexos metálicos. Também possuem a característica de alta solubilidade em água, sendo capazes de interagir com as fibras celulósicas por meio de interações de Van der Waals.

Corantes ácidos: são corantes solúveis em água, com grande importância em fibras proteicas e poliamida sintética. O corante previamente neutralizado se liga à fibra por meio de trocas iônicas. Possuem uma ampla coloração e grau de fixação.

Corantes à cuba: são corantes intensamente utilizados em fibras de algodão. São praticamente insolúveis em água, porém, no processo de coloração são reduzidos em solução alcalina, transformando-se em compostos solúveis.

Corantes de enxofre: conferem coloração preta, verde-oliva, azul-marinho e marrom a fibras celulósicas. Caracterizam-se por apresentarem compostos macromoleculares com pontes de polissulfetos, altamente insolúveis em água. Em geral apresentam resíduos altamente tóxicos.

Corantes dispersivos: são utilizados em tintura de fibras sintéticas. São formados por corantes insolúveis em água e aplicados por meio de suspensão. Durante a coloração, estes corantes sofrem hidrólise, ocorrendo lentamente uma precipitação da molécula original.

Corantes azóicos: utilizam um sistema de produção diretamente na fibra, através de um agente de acoplamento, sendo este um composto de alta afinidade com a celulose e solúvel em água. A reação de acoplamento ocorre por meio da adição de um sal de diazônio, produzindo um corante insolúvel em água e proporcionando a característica de alta resistência contra luz e umidade.

Corantes pré-metalizados: possuem um grupo hidroxila ou carboxila na posição orto em relação ao cromóforo azo, permitindo a formação de íons metálicos. Esta característica causa desvantagem ecológica, uma vez que estes corantes estão associados ao alto conteúdo de metal no seu efluente. Fibras protéicas e poliamida são tingidas por este tipo de corante. Apresentam como característica alta solubilidade em água e a formação de uma ligação covalente entre o corante e a fibra, proporcionando maior estabilidade na cor do tecido tingido quando comparado a outros tipos de corantes (AXELSSON et al., 2006).

## **Métodos de tratamento de efluentes**

As indústrias têxteis possuem grande dificuldade em tratar eficientemente as águas residuárias geradas em seus processos de produção, principalmente em relação à remoção de corantes desses efluentes que, mesmo em pequenas quantidades, conferem cor intensa, constituindo um dos efluentes mais complexos e problemáticos a serem tratados (AKSU, 2005). Segundo a Resolução nº 430 de maio/2011, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente no corpo receptor se obedecerem às condições e padrões previstos na resolução, como por exemplo, pH entre 5 e 9, temperatura acima de 3 °C e abaixo de 40 °C, ausência de material flutuante e remover no mínimo 60% da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). Diante do impacto ambiental causado por águas residuais contendo corantes, diferentes tipos de tratamentos têm sido testados isoladamente ou em conjunto para tentar diminuir a toxicidade desses compostos, entre eles, métodos físicos, químicos e biológicos (MANU & CHAUDHARI, 2002).

### **Métodos químicos:**

Nos processos oxidativos avançados (POA) a remoção do corante ocorre por meio da clivagem dos anéis aromáticos da molécula do corante utilizando como principal agente oxidante o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Devido ao poder oxidante dos radicais hidroxila, os POA têm sido utilizados de forma crescente. A característica comum de todos os POA é o uso dos radicais livres reativos, principalmente os radicais hidroxila, que podem ser gerados por vários métodos, incluindo processos com  $H_2O_2$  ou ozônio, ou reações induzidas pela luz. A utilização de óxidos de ferro como catalisadores no processo Fenton é denominado de Fenton heterogêneo, e diversas pesquisas têm sido relatadas nessa área, inclusive para remoção de corantes (TARR, 2003; BAFANA et al., 2011). O método de reação de Fenton utiliza o reagente de Fenton ( $H_2O_2$ -Fe(II)) e é relativamente barato e eficiente na descoloração de corantes solúveis e insolúveis. No entanto, a geração de lodo associado com esta metodologia limita a sua utilização (ROBINSON et al., 2001). Embora os processos oxidativos

apresentem significativas vantagens sobre os métodos convencionais de tratamento, um dos obstáculos para a aplicação dos POA em larga escala tem sido atribuído ao elevado custo dos reagentes, e ao custo operacional envolvendo as fontes de energia como a luz ultravioleta (TARR, 2003).

A descoloração por oxidação utilizando o hipoclorito de sódio (NaClO), ocorre por meio da atuação do Cl<sup>+</sup> no grupo amino da molécula do corante, acelerando a quebra da ligação azo. No entanto, o aumento da descoloração aumenta a concentração de Cl<sup>+</sup>, e ocorre a liberação de aminas aromáticas nos corpos d'água (BAFANA et al., 2011).

### **Métodos físicos:**

Tratamentos físicos são baseados em processos de separação de fases (sedimentação, flotação, centrifugação), transição (destilação, evaporação e cristalização), transferência (adsorção) e de separação molecular utilizando membranas seletivas (microfiltração, ultrafiltração, osmose reversa e diálise). Vários métodos têm sido empregados para a degradação de efluentes contendo corantes e, em geral, estes métodos fazem parte da primeira etapa do tratamento dos efluentes (ROBINSON et al, 2001; SRINIVASAN & VIRARAGHAVAN, 2010).

Adsorção: A adsorção é um dos métodos mais populares para tratamentos de efluentes, uma vez que possui baixo custo, flexibilidade, simplicidade e fácil operação (BAFANA et al., 2011). Possui eficiência na remoção de poluentes e de variados tipos de corantes e é baseado em dois mecanismos: adsorção e mudança iônica. No entanto, esse método é influenciado por fatores físico-químicos como pH, temperatura, tamanho da partícula e tempo de contato (GUPTA & SUHAS, 2009).

Carvão ativado: é um adsorvente muito utilizado para vários tipos de corantes, no entanto, é dependente do tipo de carvão utilizado e do tipo de efluente. As taxas de remoção do corante podem diminuir na reutilização do adsorvente, além de possuir elevado custo. A fim de tornar o processo economicamente viável, podem ser utilizados materiais de baixo custo como adsorventes, tais como a turfa, argila bentonita, cinzas volantes, resinas poliméricas e muitos materiais biológicos tais como espigas de milho, talos de

milho e palha de trigo para a remoção de cor dos efluentes (RAMAKRISHNA & VIRARAGHAVAN, 1997).

Filtração por membrana: Diferentes métodos de filtração como ultrafiltração, nanofiltração e de osmose reversa têm sido utilizados para reutilização da água e recuperação química (SARATALE et al., 2011). Essas metodologias possuem como vantagem a habilidade de descolorir, concentrar e separar continuamente o corante do efluente, possuir resistência a temperatura, e a micro-organismos. No entanto, há a concentração do resíduo formado após a separação e elevado custo operacional. A filtração por membrana é um método adequado para efluentes com baixa concentração de corante, e não reduz o teor de sólidos dissolvidos o que torna difícil a reutilização da água tratada (ROBINSON et al., 2001).

Permuta iônica: É um método utilizado na descoloração de corantes catiônicos e aniônicos por meio da passagem das águas residuais por uma resina de troca iônica até que os sítios de troca sejam saturados. Não há perda do adsorvente e pode ser utilizado na remoção de corantes solúveis, no entanto possui elevado custo (ROBINSON et al., 2001).

Irradiação: Nesse método, é necessário que esteja disponível quantidade suficiente de oxigênio dissolvido para quebrar as substâncias orgânicas eficientemente por radiação. O oxigênio dissolvido é utilizado rapidamente sendo necessário um constante fornecimento, o que demanda elevado custo (BAFANA et al., 2011).

Coagulação eletrocinética: envolve a adição de sulfato ferroso e de cloreto férrico, permitindo a remoção de corantes diretos de águas residuárias. Não é um método muito utilizado devido ao custo elevado, além de que a concentração ótima de coagulante é dependente da carga estática do corante na solução com a produção de lodo coagulado (ROBINSON et al., 2001).

Assim, observa-se que as principais desvantagens destes métodos têm sido, em grande parte, devido ao custo elevado, baixa eficiência, limitada versatilidade, interferência com outros constituintes das águas residuais e o manejo dos resíduos gerados, como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2: Vantagens e desvantagens de processos químicos e físicos na descoloração de efluentes industriais.

<i>Métodos físicos/químicos</i>	<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>
<i>Reagente de Fenton</i>	Efetiva descoloração de corantes solúveis e insolúveis	Geração de lodo
<i>Ozonação</i>	Aplicação no estado gasoso: não há alteração de volume	Meia-vida curta, 20 minutos
<i>Fotoquímico</i>	Não há produção de lodo	Formação de sub produtos
<i>NaOCl</i>	Inicia e acelera a quebra de ligações azo	Liberação de aminas aromáticas
<i>Destruição eletroquímica</i>	Componentes não prejudiciais	Elevado custo
<i>Carbônio ativado</i>	Remoção de grande variedade de corantes	Elevado custo
<i>Filtração em membrana</i>	Remoção de todo tipo de corante	Produção de lodo concentrado
<i>Mudança iônica</i>	Não há perda de adsorvente	Não é efetivo para todo tipo de corante
<i>Irradiação</i>	Efetiva oxidação em escala laboratorial	Necessário muito O <sub>2</sub> dissolvido
<i>Coagulação eletrocinética</i>	Economicamente viável	Elevada produção de lodo

Fonte: Adaptado de ROBINSON et al., 2001.

### **Métodos biológicos:**

Os métodos biológicos de tratamento de efluentes coloridos possuem como vantagem sobre outros métodos a conversão de compostos tóxicos recalcitrantes em compostos químicos simples, como CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, ou outros compostos que não agredem o meio ambiente, e por apresentar menores custos na aplicação (BAFANA et al., 2011). Diversos micro-organismos são capazes de descolorir corantes tais como bactérias, fungos, algas, e actinobactérias, no entanto, a eficácia da descoloração microbiana depende da capacidade de adaptação e da atividade dos microrganismos selecionados. Os métodos biológicos de descoloração são vistos como específicos, eficazes e ambientalmente seguros, uma vez que resultam em uma bioconversão parcial ou total de poluentes orgânicos em produtos finais estáveis e não tóxicos (PANDEY et al., 2007; RAUF& ASHRAF 2012).

A descoloração de um efluente por método biológico pode ocorrer por meio de biossorção, bioacumulação ou por degradação do corante por enzimas

microbianas (AKSU, 2005; GADD, 2009; WU et al., 2012; DAS & CHARUMATHI, 2012).

A biossorção é um processo físico-químico independente do metabolismo e inclui mecanismos como adsorção, mudança iônica, precipitação, interação eletrostática, e pode ser definida como uma ligação do soluto à biomassa por meio de um processo que não envolve transporte de energia metabólica, embora cada processo possa ocorrer simultaneamente quando biomassa viva é utilizada (AKSU, 2005; KAUSHIK & MALIK, 2009). A biossorção pode ocorrer tanto durante o crescimento das células dos micro-organismos como em células mortas. A utilização de biomassa possui vantagens especialmente se o efluente contendo corante for muito tóxico e, nessas circunstâncias, as células mortas possuem vantagem como absorventes em relação a células vivas, uma vez que não necessitam de nutrientes, podem ser estocadas por longos períodos de tempo e podem ser regeneradas utilizando solventes orgânicos ou surfactantes (FU & VIRARAGHAVAN, 2001; AKSU, 2005).

Entre os micro-organismos que são mais utilizados como biossorbentes estão bactérias, microalgas e fungos. A capacidade de biossorção de um micro-organismo é atribuída aos heteropolissacarídeos e aos componentes lipídicos da parede celular que contém diferentes grupos funcionais tais como os grupos carboxila e hidroxila, tiol e fosfato causando forte força de atração entre os corantes e a parede celular (AKSU & DONMEZ, 2003; GADD, 2009). Todavia, além de não ocorrer a modificação na estrutura original do corante, a eficiência da biossorção depende de fatores como pH, temperatura, força iônica, tempo de contato, concentração e estrutura do corante e tipo de micro-organismo (BAYRAMOGLU et al., 2006; VIJAYARAGHAVAN & YUN, 2007).

Nesse contexto, o efluente proveniente de indústrias têxteis, que contém uma mistura de corantes e outros produtos químicos, pode interferir no processo de descoloração por biossorção. Além disso, a biossorção não erradica o problema ambiental causado pelos corantes, uma vez que o poluente não é metabolizado, em vez disso, permanece retido no interior da matriz do adsorvente (KAUSHIK & MALIK, 2009). Tendo em vista que durante o tratamento de águas residuárias utilizando biossorbentes há a eliminação de grande quantidade de biomassa contendo corantes industriais, além da consequente formação de

corante solúvel durante a regeneração da biomassa utilizada, a utilização de biosorventes para o tratamento de águas residuais contendo grandes volumes de corantes não se torna uma abordagem interessante (KUHAD et al, 2004).

A bioacumulação é definida como o acúmulo inicial de poluentes pelo crescimento ativo das células, independentemente da temperatura e do metabolismo, na superfície da biomassa. Essa etapa é seguida por um processo dependente do metabolismo e pode acumular maiores quantidades de poluentes. As maiores taxas de bioacumulação de corantes podem ser atingidas utilizando quantidades disponíveis de fonte de carbono e nitrogênio facilmente utilizáveis no meio de crescimento das células. No entanto, existem limitações significativas no emprego de células vivas na descoloração, uma vez que o crescimento celular é inibido quando a concentração de corante é muito elevada (AKSU & DONMEZ, 2005; RENGANATHAN et al., 2006; DAS & CHARUMATHI, 2012).

A biodegradação é definida como a hidrólise de substâncias recalcitrantes por sistemas microbianos ou por outros agentes biológicos. A descoloração de corantes industriais por biodegradação ocorre pela ação de diferentes enzimas e envolve a clivagem do grupo cromóforo e possibilita a fragmentação da molécula inicial do corante em moléculas menores e mais simples, ou em sua total mineralização (MOHAN et al., 2005; RAUF & ASHRAF, 2012). A mineralização é o processo que envolve a completa degradação do composto, ou seja, a hidrólise total de moléculas orgânicas em água e gás carbônico e/ou outro composto inorgânico final (BENNETT et al., 2002).

A eficácia de degradação dos processos biológicos depende da biodegradabilidade dos contaminantes, isto é, sua suscetibilidade, que é fortemente influenciada pela estrutura química e concentração. Normalmente, quanto mais complexa a estrutura química de um composto mais difícil de ser biodegradado (GIANFREDA & RAO, 2004). A biodegradação de corantes industriais é um processo dependente de energia e envolve a hidrólise da molécula do corante que pode ocorrer por vias aeróbicas e anaeróbicas (KEHARIA & MADAMVAR, 2003; AKSU & DONMEZ, 2005).

No sistema aeróbico, bactérias e fungos utilizam oxigênio no processo de degradação, ao passo que no processo anaeróbico não há a presença de oxigênio e, geralmente, ocorre sob condições estáticas (KAUSHIK & MALIK,

2009). No tratamento aeróbio, os micro-organismos que atuam na degradação dos compostos existentes nos efluentes utilizam a molécula de oxigênio livre como acceptor final de elétrons.

O tratamento anaeróbio não utiliza a molécula de oxigênio ligado aos compostos químicos como acceptor final de elétrons (GALLIZIA et al., 2004). O tratamento anaeróbico de efluentes contendo corantes pode ocorrer pela utilização de diferentes tipos de bactérias produtoras de enzimas azoredutases. Nesses casos, a descoloração ocorre por redução através do co-metabolismo do micro-organismo ou o corante atua como acceptor final de elétrons durante a respiração anaeróbica por meio de enzimas não específicas formando aminas aromáticas (O'NEILL et al., 2000; FRIJTERS et al., 2006).

### **Enzimas Microbianas**

Cada vez mais é reconhecido o uso das enzimas em processos de remediação para tratamento de poluentes específicos. Estas podem atuar em compostos recalcitrantes, removendo-os por precipitação, transformação em outros produtos inócuos ou alterando as características de um determinado rejeito para aumentar sua biodegradabilidade (GIANFREDA & RAO, 2004; KARAM & NICELL, 1997).

Enzimas extracelulares incluem uma ampla gama de oxidoredutases e hidrolases, as quais podem transformar substâncias poliméricas em produtos parcialmente oxidados ou hidrolisados que podem ser facilmente captados pelas células. As oxidoredutases microbianas são enzimas periplasmáticas associadas à parede celular de células viáveis, e são encontradas principalmente em fungos, tais como os basidiomicetos degradadores de madeira, e actinobactérias (GIANFREDA & RAO, 2004). No entanto, as enzimas isoladas oferecem grandes vantagens por possuir maior especificidade, melhor padronização, facilidade de armazenamento, sem a dependência das taxas de crescimento microbiano (HUSAIN et al., 2009).

As principais oxidoredutases, lacases e peroxidases, apresentam grande potencial no tratamento de uma variedade de compostos orgânicos (KAUSHIK & MALIK, 2009) e seu uso pode ser uma prática interessante para a descoloração

de corantes sintéticos. Estas enzimas podem catalisar a transformação/degradação de corantes aromáticos, tanto por precipitação como pela ruptura do anel aromático (AKTAR & HUSSAIN, 2006). As azoredutases têm demonstrado alta especificidade na clivagem de ligações azo, enquanto que peroxidases e lacases atuam inespecificamente em anéis aromáticos e possuem o potencial de degradar uma vasta gama de estruturas aromáticas. Alternativamente, o tratamento enzimático pode ser utilizado como uma etapa no tratamento de componentes tóxicos que podem ser seletivamente removidos, funcionando como um pré-tratamento durante o processo de remediação (GIANFREDA & RAO, 2004).

### **Utilização de micro-organismos na descoloração de corantes e tratamento de efluentes têxteis**

Vários micro-organismos, incluindo bactérias, fungos e algas possuem capacidade de descolorir e mineralizar corantes industriais, no entanto, a efetividade da descoloração microbiana depende de fatores como a adaptabilidade e da atividade dos micro-organismos utilizados (PANDEY et al., 2007).

As microalgas são organismos fotossintetizantes, que estão presentes em praticamente todo o tipo de habitats do planeta. Alguns corantes exibem elevada toxicidade para a vida aquática, mas não reduzem significativamente o crescimento e proliferação das microalgas que podem ser encontradas crescendo em efluentes industriais (ACUNER & DILEK, 2004; DUBEY et al., 2011). Os mecanismos utilizados pelas algas na descoloração podem ser degradação enzimática, adsorção ou ambos. As algas podem ser utilizadas na descoloração de corantes, uma vez que são capazes de degradar corantes azo por meio de azoredutases e enzimas oxidativas (EI-SHEEKH et al., 2009; OMAR, 2008; PRIYA et al., 2011). Portanto, as microalgas são uma opção para a biorremediação de efluentes têxteis, uma vez que, em contraste com as bactérias e os fungos, que dependem de fontes de carbono adicional, algas produzem energia a partir da luz solar e obtém o carbono do ar atmosférico, tornando o cultivo mais barato (SAHA et al., 2010).

Segundo Solis et al. (2012), um dos organismos mais aplicados a biorremediação de efluentes têxteis são as bactérias, em função da facilidade de cultivo, rápido crescimento e capacidade de sobreviver em condições extremas de salinidade e temperatura. A descoloração de corantes azo por bactérias geralmente é iniciada pelas azoredutases que são responsáveis pela redução da ligação azo em ambiente anaeróbio. Corantes azo são geralmente resistentes à degradação por bactérias em condições aeróbias porque a presença de oxigênio normalmente inibe a atividade de redução da ligação azo (CHANG et al., 2004), sendo interessante a descoloração em condições anaeróbicas ou estáticas (SARATALE et al., 2009). Contudo, algumas estirpes de bactérias aeróbias selecionadas possuem a capacidade de reduzir a ligação azo por azoredutases aeróbicas (KODAM et al., 2005; OOI et al., 2007; LIN & LEU, 2008).

Muitos fungos tem capacidade de descolorir efluentes industriais contendo corantes via adsorção de biomassa, sem degradação, ou através de degradação aeróbica completa. Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos, cuja nutrição ocorre por absorção e sua principal substância de reserva é o glicogênio. São constituídos basicamente por hifas que, agrupadas, formam o micélio. As hifas podem ser asseptadas ou cenocíticas, ou podem possuir septos que são produzidos em intervalos relativamente regulares ao longo de todo o comprimento da hifa, dividindo-a em compartimentos que possuem um ou mais núcleos. No entanto, nem todos os fungos possuem micélios compostos por hifas, muitas formas são referidas como leveduras, existindo como células únicas que são capazes de se reproduzir rapidamente por gemação ou fissão binária (ALEXOPOULOS et al., 1996).

A utilização de fungos filamentosos nos processos de descoloração é uma alternativa atraente devido ao baixo custo e a possibilidade de total mineralização do corante (MARTORELL et al., 2012). Os fungos secretam enzimas extracelulares que auxiliam na clivagem de complexos poliméricos, bem como na absorção de nutrientes simples, sendo importantes não apenas para a sua sobrevivência em ambientes extremos, mas para a subsistência das demais comunidades do nicho trófico (GOPINATH et al., 2005). Assim, uma vez que as enzimas dos fungos são extracelulares, não há a limitação de difusão do substrato como ocorre com bactérias. Além disso, a secreção de enzimas por

fungos da podridão branca é dependente da fonte de carbono e nitrogênio e não pela presença de poluentes (GE et al., 2004).

A utilização desses fungos em processos de biorremediação ocorre devido ao sistema enzimático não específico desenvolvido para despolimerização e mineralização do complexo polímero de lignina e compostos aromáticos (PARK et al., 2004; GOPINATH et al., 2005; NOZAKI et al., 2008). Assim, devido à semelhança entre os grupos químicos presentes na lignina e nos corantes têxteis, estas enzimas também são capazes de degradá-los, constituindo uma possível alternativa para o uso na remediação de efluentes da indústria têxtil (KUHAD et al., 2004; COUTO, 2009).

Fungos causadores da podridão branca, por exemplo, são capazes de mineralizar diferentes tipos de corantes sintéticos devido ao seu sistema de enzimas oxidativas e lignolíticas incluindo a Lacase (Lac), a Manganês-Peroxidase (MnP) e a Lignina-Peroxidase (LiP), todas envolvidas na oxidação de complexos de estruturas aromáticas, como alguns compostos xenobióticos (ASGHER et al., 2008; ENAYATZAMIR et al., 2009; MARTORELL et al., 2012).

O sistema enzimático fenoloxidase inclui as lacases e tirosinases, que necessitam de oxigênio molecular para a atividade, e as enzimas lignina peroxidase e manganês peroxidase que utilizam o peróxido de hidrogênio em suas reações. Nesse contexto, a degradação de corantes ocorre em condições aeróbicas evitando a formação de aminas aromáticas que são sintetizadas durante a redução de corantes azo por bactérias em condições anaeróbicas (O'NEILL et al., 2000; NOZAKI et al., 2008). No entanto, o envelhecimento do micélio desses tipos de fungos e a possibilidade da contaminação bacteriana em condições não estéreis prejudica a utilização de fungos da podridão branca no tratamento de efluentes (BORCHET & JUDY, 2001; PAGOT et al., 2007; BAFANA et al., 2011). De acordo com Solís et al. (2012), a imobilização da biomassa fúngica é vantajosa quando o efluente têxtil possui substâncias tóxicas que dificultam o crescimento celular, uma vez que a biomassa pode ser regenerada e reutilizada ao longo de muitos ciclos.

Os mecanismos que envolvem a descoloração por leveduras são bioissorção, bioacumulação ou degradação enzimática. A coloração da biomassa após a remoção do corante atua como indicador do mecanismo envolvido na

descoloração do corante. A ausência de cor na biomassa é um forte indício de que ocorreu a biodegradação do corante (DAS & CHARUMATHI, 2012).

As leveduras possuem algumas vantagens quando comparadas com bactérias e fungos filamentosos, pois crescem rapidamente como bactérias e resistem a ambientes desfavoráveis, como por exemplo, em ambientes de baixo pH, como fungos filamentosos (YU & WEN, 2005).

Yang et al. (2003) demonstrou a capacidade de duas espécies de leveduras, *Debaryomyces polymorvus* e *Candida tropicalis*, em degradar seis diferentes tipos de corantes reativos através da enzima manganês peroxidase. Pajot et al. (2011) propuseram que leveduras oligotróficas, com alto potencial de descoloração, podem crescer em meio contendo apenas o corante como fonte de carbono e energia. Além disto, Martorell et al. (2012) descreveram um modelo de “screening” onde somente leveduras capazes de usar o corante como fonte de carbono e energia ou nitrogênio foram isoladas e, seguindo esta metodologia, recuperaram leveduras pertencentes aos grupos dos Ascomycetos e Basidiomicetos. Em adição, Lucas et al. (2006) utilizaram um isolado de *Candida oleophila* na descoloração do corante preto reativo e observaram que a descoloração do corante azo está associada ao metabolismo primário da levedura sem a presença de enzimas oxidativas.

### **Fatores abióticos que influenciam na descoloração de corantes por micro-organismos**

Os ecossistemas são ambientes dinâmicos com variadas condições abióticas como pH, temperatura, presença de oxigênio, metais e sais. Os micro-organismos, que possuem importante papel nos ciclos do carbono, nitrogênio e enxofre, são afetados pelas mudanças nesses parâmetros que, conseqüentemente, afetam suas atividades de decomposição (ALI, 2010). Os micro-organismos são sensíveis à presença de substâncias químicas tais como corantes, alta salinidade, variações de pH e elevado teor de compostos orgânicos. Assim, os efeitos desses parâmetros também são levados em consideração na avaliação do potencial de diferentes micro-organismos na degradação de compostos xenobióticos (DUA et al., 2002; MEGHARAJ et al., 2011; ANG et al.,

2005; RAUF& ASHRAF, 2012). Para possibilitar o maior desempenho na descoloração de corantes, é necessário criar um ambiente favorável para o crescimento dos micro-organismos.

Os corantes possuem deficiência em carbono, tornando a biodegradação, sem uma fonte extra de carbono, um processo difícil de ser realizado (TONY et al., 2009). Neste processo, a fonte de carbono possui diferentes finalidades: servir como fonte de carbono e energia para o crescimento e sobrevivência do micro-organismo e como doadores de elétrons necessários para clivagem da ligação azo. As taxas de descoloração geralmente aumentam na presença de fontes de carbono, no entanto, é importante considerar a quantidade da fonte, pois deve ser suficiente baixa para atender aos requisitos do crescimento da biomassa, permitir a atividade metabólica dos micro-organismos e manter a descoloração (WAGHMODE et al., 2011; KHOUNI et al., 2012). É importante considerar, também, que elevadas concentrações da fonte de carbono levam a baixas taxas de descoloração, pois os micro-organismos utilizam preferencialmente a fonte de carbono ao corante (KUMAR et al., 2009; MOHANA et al., 2008; WAGHMODE et al., 2011). Um estudo realizado por Yang et al. (2005), demonstrou que leveduras não conseguem utilizar o corante como fonte de carbono e de energia para crescimento, bem como para a produção das enzimas necessárias para degradação de corantes sintéticos. Assim, o processo de descoloração requer uma fonte extra de carbono.

Diferentes fontes de nitrogênio têm sido estudadas para melhorar as taxas de descoloração, no entanto, como observado no consórcio de *Paenibacillus polymyxa*, *Micrococcus luteus*, e *Micrococcus* sp. durante a descoloração do corante Reativo Violeta 5R, a utilização de extrato de levedura obteve os melhores resultados durante a descoloração de azo corantes (MOOSVI et al., 2007). As fontes de nitrogênio também são importantes na biodescoloração, uma vez que o metabolismo das mesmas é considerado essencial para a regeneração do NADH que atua como doador de elétrons na redução da ligação azo (HU, 1994). De acordo com KAUSHIK & MALIK (2009), a quantidade de nitrogênio presente no meio afeta a descoloração de corantes por meio da alteração da produção enzimática pelos fungos pois, para muitas espécies fúngicas, a

atividade das enzimas ligninolíticas é suprimida por elevadas concentrações de nitrogênio.

O efeito do pH no processo de descoloração é importante, pois alguns componentes responsáveis pela coloração do efluente são solúveis sob valores de pH elevados e insolúveis em pH ácido (FU & VIRARAGHAVAN, 2001). O pH inicial da solução contendo o corante possui influência significativa sob as propriedades químicas tanto do corante como da biomassa do micro-organismo, afetando o transporte da molécula do corante através da membrana celular (FU & VIRARAGHAVAN, 2001; SRINIVASAN & VIRARAGHAVAN, 2010). Geralmente, fungos filamentosos e leveduras mostram melhor atividade de descoloração e biodegradação em pH ácido ou neutro, enquanto bactérias em pH neutro ou básico (ALI, 2010). No processo de biodegradação, o pH é um importante fator devido à possibilidade de alterar o metabolismo microbiano, afetando sua fisiologia e, conseqüentemente, a expressão e atividade das enzimas envolvidas no processo. Assim, as taxas de descoloração são maiores no pH ótimo e tendem a diminuir em valores extremos de pH (KAPDAN et al., 2000). Em relação à expressão de enzimas lignolíticas, baixos valores de pH são requisitos para atividade ótima da enzima e, conseqüente, aumento da eficiência do processo de degradação (KAUSHIK & MALIK, 2009).

A temperatura é um fator de extrema importância para todos os processos associados à vida microbiana, incluindo a atividade de biodegradação dos micro-organismos na remediação de solos e água (ALI, 2010). Além disso, também tem sido relatado que mudanças na temperatura levam à alteração repentina na ativação energética dos micro-organismos (YU et al., 2001). As maiores taxas de remoção de cor estão geralmente relacionadas com a temperatura ótima de crescimento da cultura celular de cada espécie de micro-organismo (PEARCE et al., 2003). A atividade de degradação diminui devido ao crescimento mais lento e desativação de enzimas responsáveis pela descoloração e, assim, as taxas de biodegradação dos micro-organismos serão melhores na temperatura ótima necessária para crescimento, reprodução e atividades enzimáticas (ALI, 2010). De acordo com Saratale et al. (2009), as taxas de descoloração de corantes azo aumentam na temperatura ótima, no entanto com o aumento da temperatura há uma redução na atividade de descoloração. Este declínio em temperaturas mais

elevadas pode ser atribuído à perda da viabilidade celular ou à desnaturação das enzimas azo redutases.

A diminuição da descoloração do corante à medida que aumenta a concentração do corante pode ser atribuído à sua toxicidade no crescimento celular ou na concentração inadequada da biomassa em relação ao corante, bem como ao bloqueio de sítios ativos de enzimas responsáveis pela degradação pela molécula do corante com diferentes estruturas (GOPINATH et al., 2009; ALI, 2010). De acordo com CHEN et al. (2003), corantes azo reativos contendo o grupamento ácido sulfônico ( $\text{SO}_3\text{H}$ ) em seus anéis aromáticos inibem o crescimento de micro-organismos em elevadas concentrações.

As condições ambientais também podem afetar diretamente os processos de descoloração e degradação pelo estado redutivo ou oxidativo do ambiente e, indiretamente, influenciar no metabolismo microbiano (BARDI & MARZONA 2010). Apesar da degradação de corantes sintéticos ocorrer sob condições aeróbicas e anaeróbicas por diversos micro-organismos (VAN DER ZEE & VILLAVERDE, 2005), a maior remoção de cor é observada em culturas aeradas. Este fato ocorre por causa da melhor transferência de oxigênio e distribuição de nutrientes quando comparado com culturas estáticas (KAUSHIK & MALIK, 2009). No entanto, sob condições anaeróbicas redutivas também ocorre atividade enzimática, com elevadas taxas de descoloração. Todavia, é necessária uma pequena quantidade de oxigênio para ação de enzimas oxidativas, que também estão envolvidas na degradação de corantes sintéticos, para que ocorra a mineralização do composto (PEARCE et al., 2003).

### **Toxicidade de efluentes industriais**

Muitos tratamentos podem ser eficientes para a descoloração de corantes, porém, é essencial saber se há a formação de produtos tóxicos durante o processo. Assim é importante a avaliação da toxicidade dos produtos formados durante os processos de biorremediação, a fim de testar a viabilidade técnica da degradação (JADHAV et al., 2010). A análise química é normalmente utilizada para avaliar a eficiência da remoção de compostos químicos, no entanto, o tratamento utilizado pode gerar a formação de compostos potencialmente mais

tóxicos (MIGID et al., 2007), dessa forma, uma das técnicas para avaliar a toxicidade do produto final é o uso de bioindicadores. Desde a formação do corante até a sua deposição em um corpo hídrico, os contaminantes podem se associar a certas partículas, tornando-se biodisponíveis para o ecossistema, sofrer biotransformação, originando substâncias mais ou menos tóxicas ou migrar do sedimento para outros compartimentos ambientais via cadeia trófica. Portanto, níveis elevados de contaminantes podem acarretar efeitos para a biota aquática, dependendo de uma série de fatores que alteram a sua biodisponibilidade e a sua toxicidade (SALOMONS et al., 1987; CHUNG et al., 2007; FARRÉ & BARCELÓ, 2003).

O efeito tóxico e carcinogênico dos corantes se deve, principalmente, ao fato de que, em sua maioria, eles são fabricados a partir de agentes cancerígenos como benzidina, naftaleno e outros compostos aromáticos (GUARATINI & ZANONI, 2000). Os efluentes industriais também são corriqueiramente associados à presença de elementos-traço. Nesse caso, os metais podem ser provenientes das moléculas do corante ou de outros materiais utilizados no processo de tingimento, como o mercúrio, presente em vários reagentes químicos ou o cromo, proveniente do dicromato de potássio, utilizado na oxidação de corantes ao enxofre (GUARATINI & ZANONI, 2000; KAUSHIK & MALIK, 2009). Os riscos toxicológicos dos corantes sintéticos à saúde humana estão intrinsecamente relacionados ao modo e ao tempo de exposição, à ingestão oral e à sensibilização da pele e das vias respiratórias (GUARATINI & ZANONI, 2000).

A toxicologia envolve o estudo qualitativo e quantitativo dos efeitos adversos de substâncias químicas ou outros materiais antropogênicos sobre os organismos expostos.

A ecotoxicologia é uma área especializada da toxicologia ambiental que centra seus estudos nos efeitos ocasionados por agentes químicos e físicos sobre a dinâmica de populações e comunidades integrantes de ecossistemas definidos. Os testes de toxicidade consistem em expor organismos representativos, durante um período determinado, a várias concentrações de uma ou mais substâncias e avaliar os efeitos causados. Os efeitos tóxicos vão desde a mortalidade até efeitos sub-letais, como mudanças no crescimento, no desenvolvimento e na reprodução (PAIVA MAGALHÃES & FERRÃO-FILHO, 2008).

Os efeitos deletérios podem ser de dois tipos, agudo ou crônico. O efeito agudo é definido como uma resposta severa e rápida a um estímulo, a qual se manifesta num intervalo curto variando de 0 a 96 horas. Para se avaliar efeitos agudos utiliza-se em geral o parâmetro da CL<sub>50</sub>, que é a concentração do agente tóxico que causa letalidade, ou outro efeito, em 50% dos organismos-teste. Via de regra, são recomendados testes com variados tipos de organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos do ambiente, sendo eles produtores primários, representados por algas ou plantas superiores, consumidores primários, tais como microcrustáceos, e consumidores secundários, representados por peixes (COSTA et al., 2008; GARCÍA-LORENZO et al., 2009).

Testes de toxicidade utilizando plantas como modelo são consideravelmente mais sensíveis e simples, tendo como vantagens a grande variedade de parâmetros, como a germinação de sementes, o ganho de biomassa, o alongamento de raiz e o crescimento vegetal, além de apresentar baixo custo e disponibilidade de realização dos testes durante o ano todo (CZERNIAWSKA-KUSZA & KUSZA, 2011). No entanto, a germinação de sementes e o crescimento de plantas são os parâmetros mais utilizados para avaliar fitotoxicidade de um composto (KAPANEN & ITAVAARA, 2001). A alface (*Lactuca sativa* L.) e a cebola e (*Allium cepa* L.) são modelos comumente utilizados para avaliar toxicidade de efluentes, medindo o percentual de germinação e o alongamento radicular (EOM et al., 2007; FARRÉ & BARCELÓ, 2003). Contudo, é importante compreender que, embora as plantas forneçam evidências dos efeitos tóxicos de efluentes e sedimentos contaminados, sua resposta também poder ser afetada por condições como a disponibilidade de nutrientes (NAKAMURA et al., 2002).

A *Artemia salina* é uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca, utilizada como bioindicador de toxicidade. A grande dispersão do gênero pelo mundo em enormes populações pode ser atribuída à reprodução partenogênica com produção de cistos, que ocorre na ausência do macho (VEIGA & VITAL, 2002); além disso, os organismos desse gênero atuam como elo trófico entre as comunidades planctônicas e as cadeias superiores. Os cistos podem ser armazenados em ambiente seco ou sob condições anaeróbicas por, no mínimo, seis meses, sem perder a viabilidade e sem a necessidade de manter culturas

contínuas (CALOW, 1993). Uma vez hidratado, o embrião que está dentro do cisto se ativa e, após algumas horas, as membranas rompem e nasce uma larva náuplio livre-natante. É neste estágio do seu ciclo de vida que a *Artemia* é utilizada nos testes de toxicidade aguda. O efeito tóxico observado nesse bioensaio consiste na perda da capacidade de movimentação das larvas, após o período de exposição com as amostras a serem testadas. Mesmo quando não são lançados diretamente ao mar, a utilização de *Artemia* sp. é justificada pelo fato de que a maioria dos compostos nocivos despejados têm o ambiente salino como destino final (PIMENTEL et al., 2011). Assim, os testes de toxicidade são importantes para avaliar o potencial de risco ambiental de contaminantes, uma vez que somente as análises químicas não possibilitam esse tipo de avaliação.

## Referências Bibliográficas

ABIT. **Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção**. Disponível em: <http://www.abit.org.br/Abit.aspx#4>. Acesso em: 20/08/2015.

ABRAHART, E. N. Dyes and their intermediates. 1977.

ACUNER, A.; DILEK, F.B. Treatment of tectilon yellow 2G by *Chlorella vulgaris*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 623 – 31, 2004.

AKHTAR, S.; HUSAIN, Q. Potential applications of immobilized bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase in the removal of phenols from polluted water. **Chemosphere**, v. 65, n. 7, p. 1228-1235, 2006.

AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 997-1026, 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.

AKSU, Z.; DÖNMEZ, G. Combined effects of molasses sucrose and reactive dye on the growth and dye bioaccumulation properties of *Candida tropicalis*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 7, p. 2443-2454, 2005.

ALEXOPOULOS, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. *Introductory Mycology*. New York, John Wiley, 1996

AL-KDASI, A.; IDRIS, A.; SAED, K.; GUAN, C.T. Treatment of textile wastewater by advanced oxidation processes—a review. **Global nest: the International Journal**, v. 6, n. 3, p. 222-230, 2004.

ALI, H. Biodegradation of synthetic dyes—a review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 213, n. 1-4, p. 251-273, 2010.

ANG, E.L.; ZHAO, H.; OBBARD, J.P. Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 5, p. 487-496, 2005.

ASAD, S., AMOOZEGAR, M. A., POURBABAE, A., SARBOLOUKI, M. N., DASTGHEIB, S. M. M. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 11, p. 2082-2088, 2007.

ASGHER, M., BHATTI, H.N., ASHRAF, M., LEGGE, R.L. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, v. 19, n. 6, p. 771-783, 2008.

AXELSSON, J., NILSSON, U., TERRAZAS, E., ALIAGA, T.A.; WELANDER, U. Decolorization of the textile dyes Reactive Red 2 and Reactive Blue 4 using

*Bjerkandera* sp. Strain BOL 13 in a continuous rotating biological contactor reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 32-37, 2006.

BAFANA, A.; DEVI, S.S.; CHAKRABARTI, T. Azo dyes: past, present and the future. **Environmental Reviews**, v. 19, p. 350-371, 2011.

BARDI, L.; MARZONA, M. Factors affecting the complete mineralization of azo dyes. In: Biodegradation of Azo Dyes. **Springer Berlin Heidelberg**, p. 195-210, 2010.

BAYRAMOĞLU, G.; ÇELİK, G.; ARICA, M.Y. Biosorption of Reactive Blue 4 dye by native and treated fungus *Phanerocheate chrysosporium*: Batch and continuous flow system studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, n. 3, p. 1689-1697, 2006.

Bennet, J.W., Wunch, K.G. and Faison, B.D. Use of Fungi in Biodegradation. In: Hurst, C.J., Ed., **Manual of Environmental Microbiology**, ASM Press, Washington, DC, 960-971, 2002.

BORCHERT, M.; LIBRA, J.A. Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing batch reactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 75, n. 3, p. 313-321, 2001.

CALOW, P. **Handbook of ecotoxicology**, vol. 1, Blackwell, Oxford, UK, 1993.

CERVANTES, F.J.; SANTOS, A.B. Reduction of azo dyes by anaerobic bacteria: microbiological and biochemical aspects. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 10, n. 2, p. 125-137, 2011.

CHANG, J.S.; CHOU, C.; LIN, Y.C.; LIN, P.J.; HO, J.Y.; HU, T.L. Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. **Water Research**, v. 35, n. 12, p. 2841-2850, 2001.

CHANG, J.S.; CHEN, B.Y.; LIN, Y.S. Stimulation of bacterial decolorization of an azo dye by extracellular metabolites from *Escherichia coli* strain NO3. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 3, p. 243-248, 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, n. 1, p. 57-68, 2003.

CHEN, T.Y.; KAO, C.M.; HONG, A.; LIN, C.E.; LIANG, S.H. Application of ozone on the decolorization of reactive dyes—Orange-13 and Blue-19. **Desalination**, v. 249, n. 3, p. 1238-1242, 2009.

CHUNG, M.K.; HU, R.; WONG, M.H.; CHEUNG, K.C. Comparative toxicity of hydrophobic contaminants to microalgae and higher plants. **Ecotoxicology**, v. 16, n. 5, p. 393-402, 2007.

Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2011. Resolução Nº 430. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 05 Julho 2015.

COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.; ESPINDOLA, E.L. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

COUTO, S.R. Dye removal by immobilised fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 227-235, 2009.

CZERNIAWSKA-KUSZA, I.; KUSZA, G. The potential of the Phytotoxkit microbiotest for hazard evaluation of sediments in eutrophic freshwater ecosystems. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 179, n. 1-4, p. 113-121, 2011.

DAS, N.; CHARUMATHI, D. Remediation of synthetic dyes from wastewater using yeast--An overview. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 369-380, 2012.

DEY, S.; ISLAM, A. A Review on Textile Wastewater Characterization in Bangladesh. **Resources and Environment**, v. 5, n. 1, p. 15-44, 2015.

DÖNMEZ, G. Bioaccumulation of the reactive textile dyes by *Candida tropicalis* growing in molasses medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 3, p. 363-366, 2002.

DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N.; JOHRI, A. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 2-3, p. 143-152, 2002.

DUBEY, S.K.; DUBEY, J.; VISWAS, A.J.; TIWARI, P. Studies on cyanobacterial biodiversity in paper mill and pharmaceutical industrial effluents. **British Biotechnol Journal**, v. 1, n. 3, p. 61-67, 2011.

EL-SHEEKH, M.M.; GHARIEB, M. M.; ABOU-EL-SOUOD, G. W. Biodegradation of dyes by some green algae and cyanobacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 6, p. 699-704, 2009.

ENAYATZAMIR, K.; TABANDEH, F.; YAKHCHALI, B.; ALIKHANI, H.A.; COUTO, S.R. Assessment of the joint effect of laccase and cellobiose dehydrogenase on the decolouration of different synthetic dyes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1, p. 176-181, 2009.

EOM, I.C.; RAST, C.; VEBER, A.M.; VASSEUR, P. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)- contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 67, n. 2, p. 190-205, 2007.

FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 22, n. 5, p. 299-310, 2003.

FORGACS, E.; CSERHATI, T.; OROS, G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. **Environment International**, v. 30, n. 7, p. 953-971, 2004.

FRIJTERS, C.T.M.J.; VOS, R.H.; SCHEFFER, G.; MULDER, R. Decolorizing and detoxifying textile wastewater, containing both soluble and insoluble dyes, in a full scale combined anaerobic/aerobic system. **Water Research**, v. 40, n. 6, p. 1249-1257, 2006.

FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. **Bioresource Technology**, v. 79, n. 3, p. 251-262, 2001.

GADD, G. M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 13-28, 2009.

GALLIZIA, I.; VEZZULLI, L.; FABIANO, M.. Oxygen supply for biostimulation of enzymatic activity in organic-rich marine ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 1645-1652, 2004.

GARCÍA-LORENZO, M.L.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, M.J.; PEREZ-SIRVENT, C.; MOLINA, J. Ecotoxicological evaluation for the screening of areas polluted by mining activities. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 8, p. 1077-1086, 2009.

GE, Y.; YAN, L.; QINGE, K. Effect of environment factors on dye decolorization by *P. sordida* ATCC90872 in a aerated reactor. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1401-1405, 2004.

GEREFFI, G. Outsourcing and changing patterns of international competition in the apparel commodity chain. In: **Responding to Globalization: Societies, Groups and Individuals Conference, Boulder, Colorado**. 2002.

GIANFREDA, L.; RAO, M.A. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 4, p. 339-354, 2004.

GOPINATH, K.P.; SAHIB, H.A.M.; MUTHUKUMAR, K.; VELAN, M. Improved biodegradation of congo red by *Bacillus* sp. **Bioresource Technology**, v.100, p. 670–675, 2009.

GOPINATH, S.C.B; ANBU, P.; HILDA, A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**, v. 46, n. 2, p. 119-126, 2005.

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

GUPTA, V. K. Application of low-cost adsorbents for dye removal—a review. **Journal of Environmental management**, v. 90, n. 8, p. 2313-2342, 2009.

HU, T. L. Decolourization of reactive azo dyes by transformation with *Pseudomonas luteola*. **Bioresource Technology**, v. 49, n. 1, p. 47-51, 1994.

HUSAIN, Q.; HUSAIN, M.; KULSHRESTHA, Y. Remediation and treatment of organopollutants mediated by peroxidases: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 94-119, 2009.

JADHAV, J.P.; KALYANI, D.C.; TELKE, A.A.; PHUGARE, S.S.; GOVINDWAR, S.P. Evaluation of the efficacy of a bacterial consortium for the removal of color, reduction of heavy metals, and toxicity from textile dye effluent. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 165-173, 2010.

KAPANEN, A.; ITÄVAARA, M. Ecotoxicity tests for compost applications. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 49, n. 1, p. 1-16, 2001.

KAPDAN, I.K.; KARGIA, F.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R. Effect of environmental conditions on biological decolorization of textile dyestuff by *Candida versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 5, p. 381-387, 2000.

KARAM, J.; NICELL, J. A. Potential applications of enzymes in waste treatment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 69, n. 2, p. 141-153, 1997.

KAUSHIK, P.; MALIK, A. Fungal dye decolourization: recent advances and future potential. **Environment International**, v. 35, n. 1, p. 127-141, 2009.

KEANE, J.; TE VELDE, D.W. The role of textile and clothing industries in growth and development strategies. **Overseas Development Institute. Disponível em: [www.odi.org.uk/resources/docs/3361.pdf](http://www.odi.org.uk/resources/docs/3361.pdf) [28.6. 2013.]**, 2008.

KEHARIA, H.; MADAMWAR, D. Bioremediation concepts for treatment of dye containing wastewater: a review. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 41, n. 9, p. 1068-1075, 2003.

KHOUNI, I.; MARROT, B.; AMAR, R. B. Treatment of reconstituted textile wastewater containing a reactive dye in an aerobic sequencing batch reactor using a novel bacterial consortium. **Separation and Purification Technology**, v. 87, p. 110-119, 2012.

KIMURA, I.Y.; GONÇALVES JR, A.C.; STOLBERG, J.; LARANJEIRA, M.C.; FÁVERE, V.D. Efeito do pH e do tempo de contato na adsorção de corantes reativos por microesferas de quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 9, n. 3, p. 51-57, 1999.

KODAM, K.M.; SOOJHAWON, I.; LOKHANDE, P.D.; GAWAI, K.R. Microbial decolorization of reactive azo dyes under aerobic conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 367-370, 2005.

KUHAD, R.C.; SOOD, N.; TRIPATHI, K.K.; SINGH, A.; WARD, O.P. Developments in microbial methods for the treatment of dye effluents. **Advances in Applied Microbiology**, v. 56, p. 185-213, 2004.

KUMAR, K.; DASTIDAR, M.G.; SREEKRISHNAN, T.R. Effect of process parameters on aerobic decolourization of reactive azo dye using mixed culture.

World Academy of Science, **Engineering and Technology**, v. 58, p. 962-965, 2009.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; DE MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

LIN, Y.H.; LEU, J.Y. Kinetics of reactive azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola* in a biological activated carbon process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 3, p. 457-467, 2008.

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, n. 1, p. 51-55, 2006.

MALIK, A.S. Impact of Environmental Regulations on the Textile Sector of Pakistan. In: **Country Paper Prepared for Expert Meeting on Environmental Requirements and International Trade**. 2002.

MANU, B.; CHAUDHARI, S. Anaerobic decolorisation of simulated textile wastewater containing azo dyes. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 3, p. 225-231, 2002.

MARTORELL, M.M.; PAJOT, H.F.; DE FIGUEROA, L. I. Dye-decolourizing yeasts isolated from Las Yungas rainforest. Dye assimilation and removal used as selection criteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 66, n. 1, p. 25-32, 2012.

MCMULLAN, G.; MEEHAN, C.; CONNEELY, A.; KIRBY, N.; ROBINSON, T.; NIGAM, P.; SMYTH, W.F. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 1-2, p. 81-87, 2001.

MEGHARAJ, M.; RAMAKRISHNAN, B.; VENKATESWARLU, K.; SETHUNATHAN, N.; NAIDU, R. Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. **Environment International**, v. 37, n. 8, p. 1362-1375, 2011.

MIGID, H.M.A.; AZAB, Y. A.; IBRAHIM, W.M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, n. 1, p. 57-64, 2007.

MOHAN, S.V.; PRASAD, K.K.; RAO, N.C.; SARMA, P.N. Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. **Chemosphere**, v. 58, n. 8, p. 1097-1105, 2005.

MOHANA, S.; SHRIVASTAVA, S.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D. Response surface methodology for optimization of medium for decolorization of textile dye Direct Black 22 by a novel bacterial consortium. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 3, p. 562-569, 2008.

MOOSVI, S.; KHER, X.; MADAMWAR, D. Isolation, characterization and decolorization of textile dyes by a mixed bacterial consortium JW-2. **Dyes and Pigments**, v. 74, n. 3, p. 723-729, 2007.

MUHD JULKAPLI, N.; BAGHERI, S.; BEE ABD HAMID, S. Recent advances in heterogeneous photocatalytic decolorization of synthetic dyes. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

NAKAMURA, T.; ADU-GYAMFI, J.J.; YAMAMOTO, A.; ISHIKAWA, S.; NAKANO, H.; ITO, O. Varietal differences in root growth as related to nitrogen uptake by sorghum plants in low-nitrogen environment. In: **Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities**. Springer Netherlands, p. 103-110, 2002.

NOZAKI, K.; BEH, C.H.; MIZUNO, M.; ISOBE, T.; SHIROISHI, M.; KANDA, T.; AMANO, Y. Screening and investigation of dye decolorization activities of basidiomycetes. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 105, n. 1, p. 69-72, 2008.

O'NEILL, C.; HAWKES, F.R.; HAWKES, D.L.; ESTEVES, S.; WILCOX, S.J. Anaerobic-aerobic biotreatment of simulated textile effluent containing varied ratios of starch and azo dye. **Water Research**, v. 34, n. 8, p. 2355-2361, 2000.

OMAR, H.H. Algal decolorization and degradation of monoazo and diazo dyes. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 10, p. 1310-1316, 2008.

OOI, T.; SHIBATA, T.; SATO, R.; OHNO, H.; KINOSHITA, S.; THUOC, T.L.; TAGUCHI, S. An azoreductase, aerobic NADH-dependent flavoprotein discovered from *Bacillus* sp.: functional expression and enzymatic characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 2, p. 377-386, 2007.

PAIVA MAGALHAES, D.; FERRAO-FILHO, A. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 3, 2008.

PAJOT, H.F.; DELGADO, O.D.; FIGUEROA, L.I.; FARIÑA, J.I. Unraveling the decolorizing ability of yeast isolates from dye-polluted and virgin environments: an ecological and taxonomical overview. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 3, p. 443-456, 2011.

PAJOT, H.F.; DE FIGUEROA, L.I.C; FARIÑA, J.I. Dye-decolorizing activity in isolated yeasts from the ecoregion of Las Yungas (Tucumán, Argentina). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1503-1511, 2007.

PANDEY, A.; SINGH, P.; IYENGAR, L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, n. 2, p. 73-84, 2007.

PARK, C.; LEE, M.; LEE, B.; KIM, S.W.; CHASE, H.A.; LEE, J.; KIM, S. Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia trogii*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, n. 1, p. 59-65, 2007.

PARK, C.; LEE, Y.; KIM, T.H.; LEE, B.; LEE, J.; KIM, S. Decolorization of three acid dyes by enzymes from fungal strains. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 6, p. 1190-1195, 2004.

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

PIMENTEL M.F. et al. O Uso de *Artemia* sp. como organismo-teste para avaliação da toxicidade das águas residuárias do beneficiamento da castanha de caju antes e após tratamento em reator biológico experimental. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 6, n. 1, 2011.

PRIYA, B.; UMA, L.; AHAMED, A.K.; SUBRAMANIAN, G.; PRABAHARAN, D. Ability to use the diazo dye, CI Acid Black 1 as a nitrogen source by the marine cyanobacterium *Oscillatoria curviceps* BDU92191. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 14, p. 7218-7223, 2011.

RAI, H.S.; BHATTACHARYYA, M.S.; SINGH, J.; BANSAL, T. K.; VATS, P.; BANERJEE, U. C. Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry: a review of emerging techniques with reference to biological treatment. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 35, n. 3, p. 219-238, 2005.

RAJAMOCHAN, N.; RAJASIMMAN, M. Kinetic modeling of dye effluent biodegradation by *Pseudomonas stutzeri*. Engineering, **Technology & Applied Science Research**, v. 3, n. 2, p. pp. 387-390, 2012.

RAMAKRISHNA, K.R.; VIRARAGHAVAN, T. Dye removal using low cost adsorbents. **Water Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 189-196, 1997.

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, n. 6, p. 848-854, 2002.

RAUF, M.A.; ASHRAF, S. S. Survey of recent trends in biochemically assisted degradation of dyes. **Chemical Engineering Journal**, v. 209, p. 520-530, 2012.

RENGANATHAN, S.; THILAGARAJ, W.R.; MIRANDA, L.R.; GAUTAM, P.; VELAN, M. Accumulation of acid orange 7, acid red 18 and reactive black 5 by growing *Schizophyllum commune*. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 16, p. 2189-2193, 2006.

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, n. 3, p. 247-255, 2001.

SAHA, S.K.; SWAMINATHAN, P.; RAGHAVAN, C.; UMA, L.; SUBRAMANIAN, G. Ligninolytic and antioxidative enzymes of a marine Cyanobacterium *oscillatoria*

*willei* BDU 130511 during Poly R-478 decolourization. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 9, p. 3076-3084, 2010.

SALOMONS, W.; DE ROOIJ, N.M.; KERDIJK, H.; BRIL, J. Sediments as a source for contaminants?. **Hydrobiologia**, v. 149, n. 1, p. 13-30, 1987.

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, n. 12, p. 2369-2385, 2007.

SARATALE, R.G.; SARATALE, G.D.; CHANG, J.S.; GOVINDWAR, S.P. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 1, p. 138-157, 2011.

SARATALE, R.G.; SARATALE, G.D.; CHANG, J.S.; GOVINDWAR, S.P. Ecofriendly decolorization and degradation of Reactive Green 19 using *Micrococcus glutamicus* NCIM-2168. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 3897-3905, 2009.

SATHIYA, M.; PERIYAR, S.; SASIKALAVENI, A.; MURUGESAN, K.; KALAICHELVAN, P.T. Decolorization of textile dyes and their effluents using white rot fungi. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 4, 2007.

SAVIN, I.I.; BUTNARU, R. Wastewater characteristics in textile finishing mills. **Environmental Engineering and Management Journal**, v. 7, n. 6, p. 859-864, 2008.

SILVA, M.C.; CORRÊA, A.D.; TORRES, J.A.; AMORIM, M.T.S.P. Descoloração de corantes industriais e efluentes têxteis simulados por peroxidase de nabo (*Brassica campestris*). **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 889-894, 2012.

SOLÍS, M.; SOLÍS, A.; PÉREZ, H.I.; MANJARREZ, N.; FLORES, M. Microbial decolouration of azo dyes: a review. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1723-1748, 2012.

SRINIVASAN, A.; VIRARAGHAVAN, T. Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 91, n. 10, p. 1915-1929, 2010.

STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 1-2, p. 69-80, 2001.

SUDHA, M.; SARANYA, A.; SELVAKUMAR, G.; SIVAKUMAR, N. Microbial degradation of Azo Dyes: A review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 2, p. 670-690, 2014.

TARR, M.A. (Ed.). **Chemical degradation methods for wastes and pollutants: environmental and industrial applications**. CRC Press, 2003.

TONY, B.D.; GOYAL, D.; KHANNA, S. Decolorization of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 4, p. 462-469, 2009.

VAN DER ZEE, F.P.; VILLAVERDE, S. Combined anaerobic–aerobic treatment of azo dyes—a short review of bioreactor studies. **Water Research**, v. 39, n. 8, p. 1425-1440, 2005.

VEIGA, L. F.; VITAL, N. Testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. **Nascimento IA, Souza ECPM, Nipper M. Métodos de ecotoxicologia marinha. São Paulo: Edit. Artes Gráficas**, p. 111-22, 2002.

VIJAYARAGHAVAN, K.; YUN, Y.S. Utilization of fermentation waste (*Corynebacterium glutamicum*) for biosorption of Reactive Black 5 from aqueous solution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 141, n. 1, p. 45-52, 2007.

VITOR, V.; CORSO, C.R. Decolorization of textile dye by *Candida albicans* isolated from industrial effluents. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 11, p. 1353-1357, 2008.

WAGHMODE, T.R.; KURADE, M.B.; GOVINDWAR, S.P. Time dependent degradation of mixture of structurally different azo and non azo dyes by using *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 3, p. 479-486, 2011.

WU, Y.; LI, T.; YANG, L. Mechanisms of removing pollutants from aqueous solutions by microorganisms and their aggregates: a review. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 10-18, 2012.

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, n. 3, p. 249-253, 2005.

YANG, Q.; YANG, M.; PRITSCH, K.; YEDILER, A.; HAGN, A.; SCHLOTTER, M.; KETTRUP, A. Decolorization of synthetic dyes and production of manganese-dependent peroxidase by new fungal isolates. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 9, p. 709-713, 2003.

YANG, Q.; 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, n. 1, p. 105-108, 2008.

YU, J.; WANG, X.; YUE, P.L. Optimal decolorization and kinetic modeling of synthetic dyes by *Pseudomonas* strains. **Water Research**, v. 35, n. 15, p. 3579-3586, 2001.

YU, Z.; WEN, X. Screening and identification of yeasts for decolorizing synthetic dyes in industrial wastewater. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 56, n. 2, p. 109-114, 2005.

## **CAPITULO 1**

# **DESCOLORAÇÃO DO CORANTE AZUL BRILHANTE DE REMAZOL R POR LEVEDURAS ISOLADAS DE MOLUSCOS DO RIO SUBAÉ-BA**

# Descoloração do corante Azul Brilhante de Remazol R por leveduras isoladas de moluscos do Rio Subaé-BA

## Decolorization of Remazol Brilliant Blue R dye by yeasts isolated from molluscs the Subaé River – BA.

### Resumo

O lançamento de efluentes provenientes da indústria de corantes em corpos d'água acarreta grave impacto ambiental. Assim, esse trabalho teve como objetivo analisar o potencial de decoloração do corante Azul Brilhante de Remazol R (RBBR) por leveduras isoladas de moluscos do rio Subaé-Bahia. Entre as leveduras estudadas, cinco (OJU2, SJL6, SF5, SJ10 e SJU5) apresentaram capacidade de decolorir o RBBR por meio da biodegradação com taxas variando entre 80% e 93%, após 24 horas de incubação. As condições ótimas de decoloração foram pH ácido, 2 % de glicose, 25 ppm do corante e 25 °C. Após os ensaios de toxicidade com *Artemia salina*, foi observada diminuição da toxicidade após o tratamento com os isolados SJ10 e SJU5, pois os valores de  $CL_{50}$  aumentaram de 8,16% para 19,5% e 20,8 %, respectivamente, após 120 horas de incubação.

Palavras-chave: fungos, corante têxtil, biorremediação

### Abstract

The discharge of effluents from the dye industry in aquatic environments causes severe environmental impact. Thus, this study aimed to analyze the potential for decolorization of the Brilliant Blue dye Remazol R (RBBR) by yeasts isolated from the river Subaé-Bahia molluscs. Among the yeasts studied, five (OJU2, SJL6, SF5, and SJU5 SJ10) showed ability to decolorize RBBR by biodegradation with rates ranging between 80% and 93% after 24 hours of incubation. The optimal conditions for decolorization were acid pH, glucose 2%, 25 ppm dye concentration and 25 °C. After the toxicity tests with *Artemia salina*, decreased toxicity was observed following treatment with isolated SJU5 and SJ10, since the  $LC_{50}$  values increased from 8.16% to 19.5% and 20.8%, respectively, after 120 hours incubation.

Keywords: fungi, textile dye, bioremediation

## 1.0 INTRODUÇÃO

Os corantes sintéticos são largamente utilizados em variadas aplicações industriais, incluindo a indústria têxtil. Mais de 10.000 corantes estão comercialmente disponíveis e, pelo menos, 10% são lançados no ambiente através de águas residuais (Fu & Viraraghavan, 2001). A presença de corantes em um corpo d'água é altamente visível, mesmo em concentrações muito baixas, e reduz a penetração da luz, afetando a

fotossíntese. Além disso, alguns corantes podem ser tóxicos ou mutagênicos e carcinogênicos (Nigam *et al.*, 2000; Dogan *et al.*, 2005).

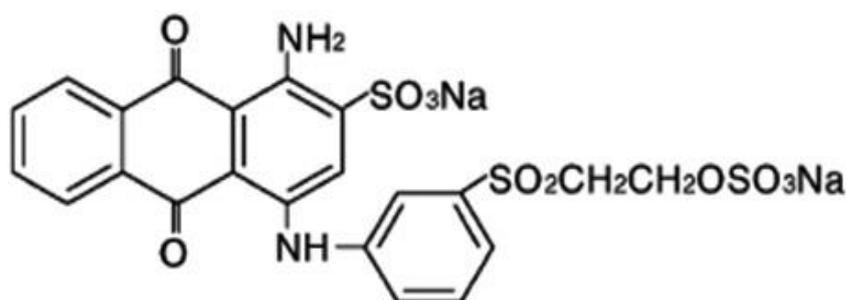
Os corantes podem ser classificados pelo seu grupo cromóforo e possuem diferenças nas estruturas e estabilidade química. O Azul Brillante de Remazol R (RBBR) pertence à classe dos corantes antraquinônicos e representa um importante organopoluente tóxico e recalcitrante. É um composto derivado do antraceno que apresenta elevada toxicidade, devido ao comportamento químico similar aos compostos que pertencem à família de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), que são muito difíceis de serem metabolizados (Mechichi *et al.*, 2006; Osma *et al.*, 2010; Hadibarata & Kristanti, 2012a). Além disso, o RBBR é utilizado como molécula modelo para isolamento de espécies degradadoras de poluentes, uma vez que permite selecionar micro-organismos produtores de enzimas envolvidas na hidrólise da lignina (Machado & Matheus, 2006).

Os corantes sintéticos são altamente resistentes à biodegradação e, frequentemente, não são removidos por processos de tratamento convencionais químicos e físicos, o que os torna um importante fator de poluição ambiental (Ahn *et al.*, 1999; Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2002). Métodos biológicos para tratamento de efluentes, especialmente os baseados na biodegradação, são mais atrativos por possibilitar a redução da toxicidade dos subprodutos da descoloração. Além disso, possuem baixo custo operacional quando comparado aos métodos físicos e químicos de tratamento de efluentes (Heinfling-Weidtmann *et al.*, 2001; Kuhad *et al.*, 2004). Neste contexto, uma estratégia promissora é a utilização de micro-organismos que possuam a capacidade de descoloração (Robinson *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004). Por possuir rápido crescimento e suportar condições de baixo pH e de elevada concentrações de sais, a utilização de leveduras na descoloração de corantes apresenta vantagens em relação a bactérias e fungos filamentosos (Qu *et al.*, 2012). Muitas espécies de fungos como *Pleurotus ostreatus*, *Pichia sp.*, *Penicillium sp.* e *Candida tropicalis* demonstraram capacidade em descolorir corantes por meio de adsorção ou/e degradação (Kalmış *et al.*, 2008; Gou *et al.*, 2009; Qu *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2013). Assim, a síntese de enzimas extracelulares também permite a utilização de micro-organismos como método alternativo na descoloração de efluentes. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi selecionar e identificar leveduras com potencial para descoloração do corante RBBR, analisando os efeitos de diferentes parâmetros como pH, temperatura, concentração de glicose e concentração inicial do corante sobre a descoloração, bem como avaliar a toxicidade final do processo de degradação.

## 2.0 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Corante

Foi utilizado o corante Azul Brilhante de Remazol R (RBBR) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), como uma solução estoque na concentração final de 10.000 ppm, pela dissolução do pó em água destilada.



**Figura 1:** Estrutura química do corante Azul Brilhante de Remazol R (Hadibarata & Kristanti, 2012a)

### 2.2 Triagem das leveduras

Foram utilizadas leveduras que fazem parte da micoteca do laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). As mesmas foram isoladas de moluscos coletados no município de São Francisco do Conde, na Baía de Todos os Santos, considerando o eixo longitudinal do rio Subaé (da nascente a foz). Foram realizadas três coletas em três unidades amostrais correspondendo às regiões: agrícola (longitude 12° 33' 52.4" e latitude 038° 41' 40.5"), urbana (12° 35' 35.8" e latitude de 038° 41' 47.7") e estuarina (longitude de 12° 37' 52.9" e latitude de 038° 40' 55.0") nos meses de outubro e dezembro de 2010 e janeiro de 2011. Os isolados foram conservados em glicerol a 20% em temperatura de - 20 °C.

Os isolados foram reativados em placas de Petri contendo meio Sabouraud-dextrose durante 24-48 h e incubadas a 25 °C. A triagem para a capacidade de descoloração em meio líquido foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 250 ml contendo 60 ml do Meio Normal de Descoloração (MND) modificado (Ramalho *et al.*, 2004), constituído por (%): extrato de levedura (0,25), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,013), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,05), glicose (2) e concentração final do corante de 25 ppm. Os frascos de Erlenmeyer foram inoculados com 6 ml de uma suspensão celular padronizada (D.O.<sub>600</sub> =

0.8) das culturas e incubadas a 25°C por 120 h em agitação de 150 rpm. Os ensaios foram realizados em triplicata e, como controle, foi utilizado o MND acrescido do corante sem o inóculo. A cada 24 horas, alíquotas de 1 ml foram retiradas e centrifugadas durante 20 minutos a 5.000 rpm. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm e a porcentagem de descoloração foi obtida a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Descoloração (\%)} = (A-B)/A \times 100,$$

Onde: (A) indica a absorbância do meio não inoculado e (B) indica a absorbância residual do meio.

### **2.3 Determinação da biomassa dos isolados**

Após os ensaios de descoloração as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 5.000 rpm, o sobrenadante foi retirado e a biomassa contida no fundo do tubo foi lavada com água destilada e centrifugada novamente. A biomassa foi determinada por turbidimetria (densidade ótica) a 600 nm (D.O.<sub>600</sub>). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### **2.4 Descoloração em diferentes condições de cultivo**

Para definir as melhores condições para a descoloração do RBBR as variáveis escolhidas foram: pH (2 a 8), concentração inicial do corante (25, 50, 75 e 100 ppm), concentração da fonte de carbono (0, 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0%) e temperatura de incubação (20 °C a 40 °C, com intervalo de 5 °C). Todos os ensaios foram realizados em triplicata com agitação de 150 rpm durante 24 horas, utilizando como controle o MND com corante sem inóculo.

### **2.5 Screening do comprimento de onda do produto de degradação**

O produto da degradação de cada isolado, nas condições ótimas de descoloração foi monitorado em espectrofotômetro em diferentes intervalos de tempo (24, 48, 72 e 96 horas). As amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 20 minutos e os sobrenadantes foram analisados nos comprimentos de onda de 400-800 nm.

### **2.6 Teste de toxicidade aguda utilizando *Artemia salina***

O ensaio de toxicidade aguda foi realizado com náuplios de *Artemia salina*, de acordo com método descrito por Matthews (1995), com algumas adaptações. Para eclosão,

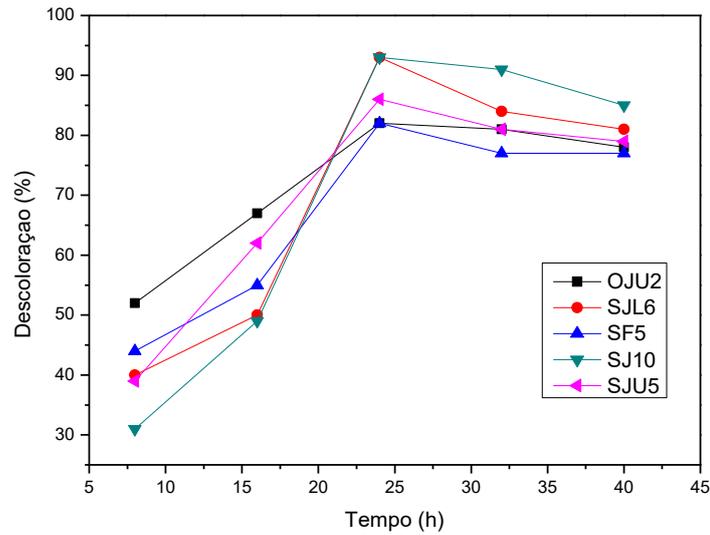
foi adicionado 1 g de cistos de *A. salina* em um recipiente contendo 2 litros de água artificial do mar. Os cistos foram mantidos em movimento constante por meio de uma bomba de ar imersa no recipiente por 24 h em temperatura de 30 °C com constante iluminação. Após este período, 10 náuplios do microcrustáceo foram transferidos para tubos de ensaio contendo diferentes concentrações (6, 12, 25, 50, 100%) do corante e do sobrenadante após a etapa de descoloração sob condições otimizadas. Os ensaios foram mantidos em temperatura ambiente por 24 horas. O controle negativo foi realizado somente com água artificial do mar. Todos os testes foram realizados em triplicata. O resultado da toxicidade aguda do corante e do produto de sua descoloração foi realizada através do cálculo da  $CL_{50}$ , ou seja, a média da concentração letal em que 50 % dos náuplios que morreram durante 24 horas de exposição. O cálculo da  $CL_{50}$  foi realizado usando o programa Trimmed Spearman-Kärber (An, 2006).

### **3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Triagem das leveduras**

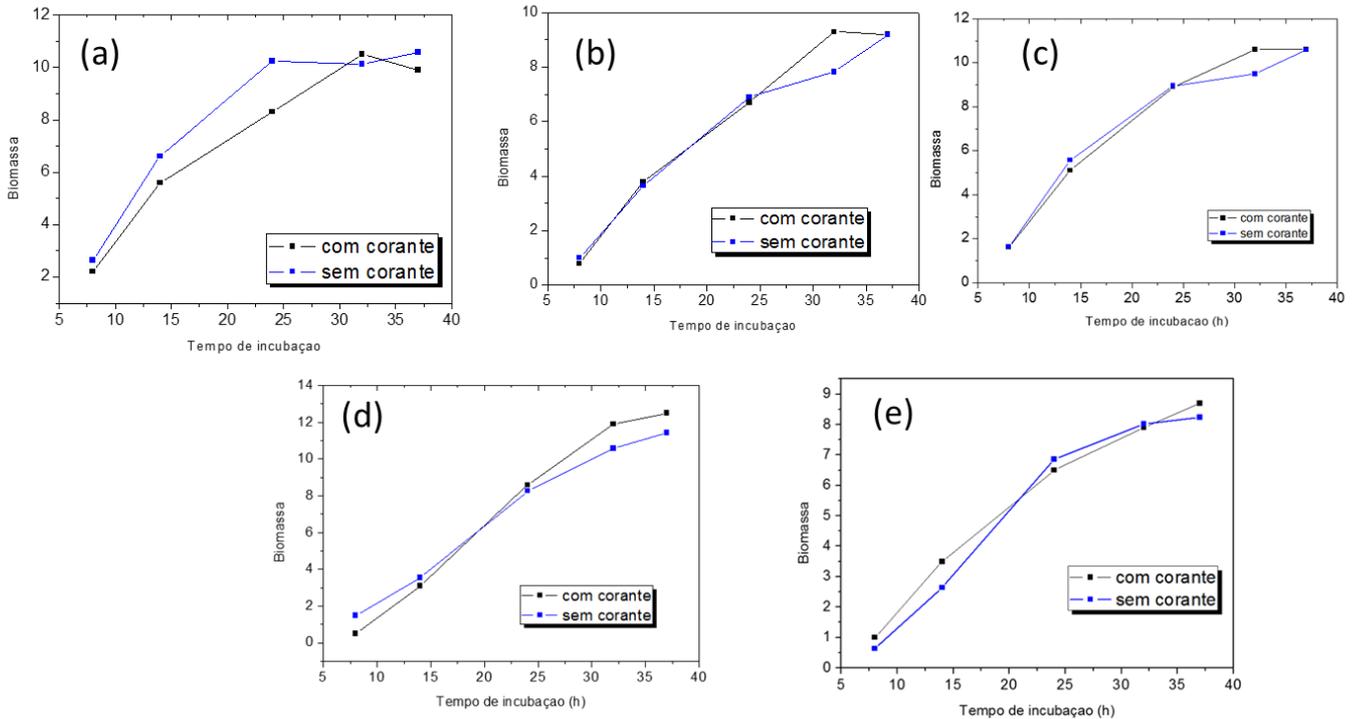
A diferença entre os processos de degradação e adsorção foi caracterizada por meio da observação da coloração da biomassa, após o período de 120 horas de incubação. A biomassa das leveduras que realizaram adsorção adquiriu coloração azul, uma vez que a coloração azul permaneceu no meio de cultura e na própria célula. No entanto, para as leveduras que realizaram a degradação do corante, a coloração da biomassa não se alterou com a descoloração do meio de cultura. Do total de 60 leveduras estudadas, 42 % apresentaram potencial de adsorção enquanto 58 % foram capazes de degradar o corante. Para os isolados com potencial de degradação, as porcentagens de descoloração variaram de 1 % a 93 %. Observou-se que cinco isolados apresentaram capacidade de descoloração do RBBR acima de 80 % em 24 horas (OJU2, SJL6, SF5, SJ10, SJU5). Dentre estes, destacaram-se os isolados SJL6 e SJ10 que apresentaram porcentagem de descoloração acima de 90 % após 24 horas. Com os isolados que apresentaram as melhores taxas de descoloração em menor tempo, acima de 80 % em 24 horas, foram realizados ensaios em duplicata durante 40 horas com leituras em intervalos de 8 horas. Os resultados confirmaram que as taxas de descoloração foram máximas no período de 24 horas para todos os isolados. Os isolados SJL6 e SJ10 apresentaram descoloração de 93 %, enquanto que os isolados OJU2, SJU5 e SF5 apresentaram descoloração de 82 %, 86 % e 82 %,

respectivamente. A taxa de descoloração manteve-se elevada até 40 horas, embora tenha sido registrada uma pequena queda a partir de 24 horas (Figura 2).



**Figura 2:** Descoloração do corante RBBR na concentração de 25 ppm por leveduras em meio MND com 2 % de glicose, pH 5,0 a 25 °C, durante 40 horas de incubação.

Foi observado, também, que o crescimento celular não foi afetado na presença do corante, ou de seus metabólitos, ao longo do tempo (Figura 3).



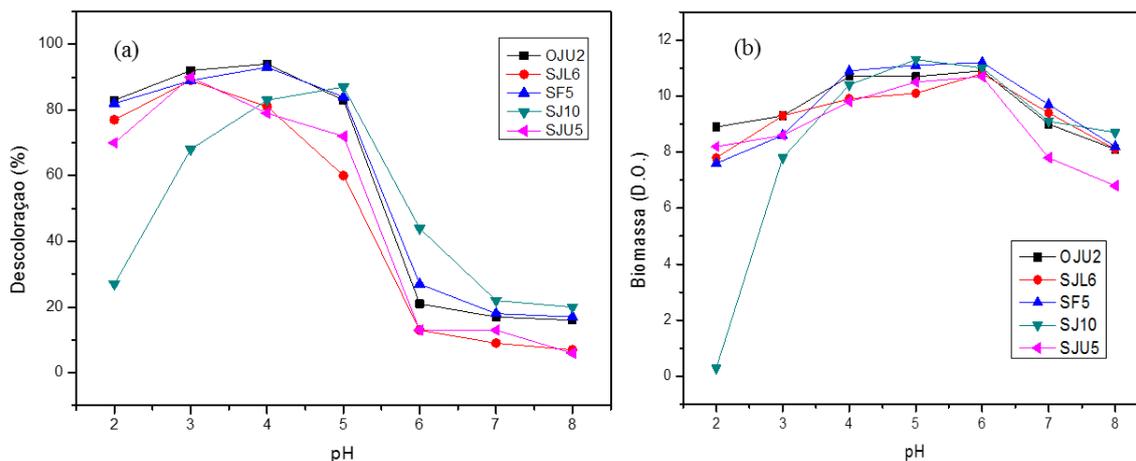
**Figura 3:** Comparação da biomassa em D.O. no comprimento de onda de 600 nm para os isolados OJU2 (a), SJL6 (b), SF5 (c), SJ10 (d) e SJU5 (e) em MND com corante e sem corante durante 40 horas de incubação.

Estudo semelhante foi realizado por Ramalho *et al.* (2002) e Ramalho *et al.* (2004) e foi demonstrando que a biomassa celular de *Candida zeylanoides* e de *Issatchenkia occidentalis*, respectivamente, também não foi afetada pela concentração do corante testado, indicando a ausência de efeitos inibitórios para o crescimento do micro-organismo.

### 3.2 Descoloração sob diferentes condições de cultivo

#### 3.2.1 Efeito do pH na descoloração

Para todos os isolados, foram estudados os efeitos do pH na descoloração do RBBR variando-se o pH de cultivo de 2,0 a 8,0 durante 24 horas de incubação. Os valores ótimos para os isolados SJL6 e SJU5 foram pH de 3,0; para os isolados OJU2 e SF5 foi pH 4,0 e para o isolado SJ10 foi pH 5,0. Para todos os isolados observou-se que, a partir do pH 5,0, as taxas de descoloração diminuíram consideravelmente e que os valores ótimos de descoloração foram alcançados em condições ácidas (Figura 4a). No entanto, conforme a Figura 4b, pode-se observar que o intervalo de pH ótimo para o crescimento celular ocorreu até o pH 6,0 e, nesse mesmo valor de pH, pode-se notar que houve uma redução considerável nas taxas de descoloração do RBBR para todos os isolados.



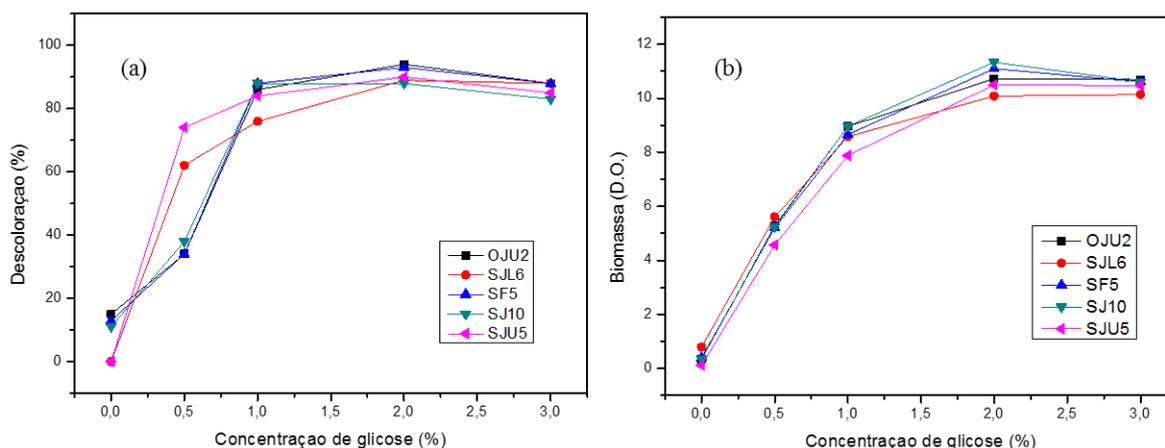
**Figura 4:** Efeito do pH na descoloração do RBBR (a) e no crescimento celular (b) na concentração de 25 ppm para os isolados OJU2, SJL6, SF5, SJ10 e SJU5 em meio MND, contendo 2 % de glicose a 25 °C durante 24 horas de incubação.

Resultados semelhantes foram encontrados por Jadhav *et al.* (2008) na descoloração do Corante Vermelho de Metila por *Galactomyces geotrichum*. Em outro estudo, Yu e Wen (2005) obtiveram elevadas taxas de descoloração do corante Vermelho Brilhante Reativo K-2BP utilizando *Pseudozyma rugulosa* na faixa de pH entre 5 e 6. Essa

faixa de pH, de 3 a 5, está relacionada à faixa ótima de atuação das enzimas ligninolíticas, às quais são atribuídas a descoloração inespecífica dos corantes para diferentes fungos (Guo *et al.*, 2008; Hadibarata & Kristanti, 2012a; Tan *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2014). O pH do meio de cultura possui importante efeito na descoloração de corantes e, de acordo com Kodam *et al.* (2005) e Garg *et al.* (2012), está relacionado com o transporte das moléculas do corante através da membrana celular e com o desempenho fisiológico ótimo das culturas microbianas. Além disso, enzimas ligninolíticas dos fungos, possuem atividade máxima em pH ácido e tendem a diminuir em valores extremos de pH (Saratale *et al.*, 2011; Senthilkumar *et al.*, 2014). Dessa forma, o pH do meio é um importante fator nos processos de descoloração de corantes. Assim, os resultados sugerem que a relação entre pH e descoloração está associada as condições de atuação e produção das enzimas envolvidas no processo de degradação.

### 3.2.2 Efeito da concentração de glicose

O efeito da fonte de carbono na remoção do corante foi estudado utilizando diferentes concentrações de glicose, que variaram de 0 a 3 %. De acordo com as Figuras 5a e 5b, todos os isolados tiveram valores elevados de descoloração e de crescimento a partir de 1% de glicose, com discreta diminuição em 3 %.



**Figura 5:** Efeito da concentração de glicose na descoloração do RBBR (a) e no crescimento celular (b) a 25 ppm para os isolados OJU2, SF5 a pH 4,0; SJL6 e SJU5 a pH 3,0 e SJ10 pH 5,0 em meio MND a 25 °C durante 24 horas de incubação.

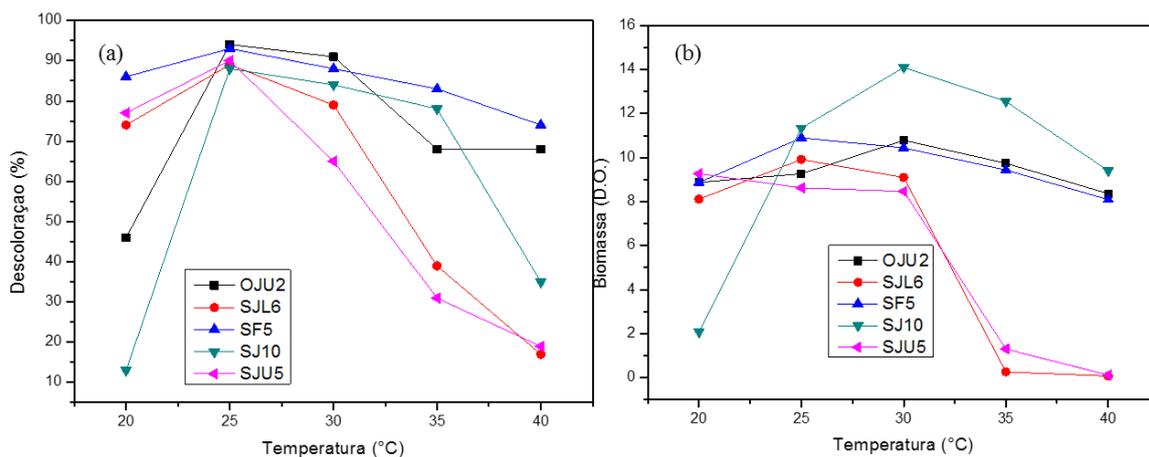
De um modo geral, células de leveduras não crescem sem glicose ou qualquer outra fonte de carbono facilmente metabolizável (Solís *et al.*, 2012), como descrito para outras espécies de leveduras como *Debaryomyces polymorphus* e *Candida tropicalis* (Yang *et al.*,

2008). Estudo realizado por Gurav *et al.* (2011) demonstraram que utilizando 1% de glicose *Galactomyces geotrichum* conseguiu descolorir 45% do corante Vat Red 10. No entanto, a maior taxa de descoloração do corante Azul Reativo 4 ocorreu utilizando 3% de glicose (Yemendzhiev *et al.*, 2009). O aumento concomitante do crescimento celular com a descoloração de corantes pela suplementação de fontes de carbono é atribuído ao fato de que corantes são deficientes em carbono, sendo necessária uma fonte externa para que ocorra a biodegradação (Padmavathy *et al.*, 2003; Sarioglu & Bisgin, 2007). Todavia, quando há o excesso da fonte de carbono, o micro-organismo pode preferir utilizar esse substrato ao invés do corante (Wang *et al.*, 2009; Saratale *et al.*, 2009). De acordo com alguns autores, a glicose funciona como um co-substrato e doador de elétrons que favorece o crescimento da levedura e a descoloração de corantes (Telke *et al.*, 2008). Assim, a glicose é uma fonte de carbono facilmente metabolizada, não atuando somente como agente redutor de corantes mas, também, promovendo o crescimento e o metabolismo microbiano (Nigam *et al.*, 1996).

### 3.2.3 Efeito da temperatura

A influência da temperatura na descoloração do RBBR e na produção de biomassa para os diferentes isolados está representada nas Figuras 6a e 6b, respectivamente. Pode-se observar que as melhores taxas de remoção da cor e de crescimento celular ocorreram na faixa de temperatura de 25 °C a 30 °C. Entretanto, a partir de 35 °C, a descoloração diminuiu consideravelmente, acompanhada pelo decréscimo acentuado da produção de biomassa.

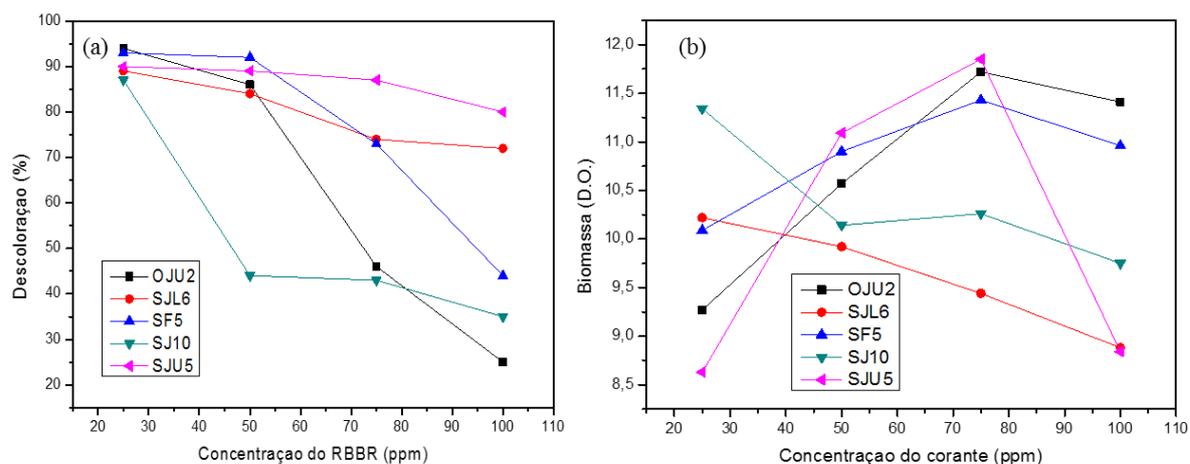
A relação inversamente proporcional da descoloração com o aumento da temperatura pode ser explicada pela perda da viabilidade celular ou da desnaturação das enzimas responsáveis pela descoloração (Aksu & Tezer, 2000; Saratale *et al.*, 2011). Resultados semelhantes foram encontrados com *Candida rugopelliculosa* degradando Azul reativo 13, onde a temperatura ótima foi de 30 °C e a descoloração cessou completamente a 37 °C (Liu *et al.*, 2011). Além disso, Jafari *et al.* (2014) observaram que 32 °C foi a temperatura ótima para a descoloração do Preto Reativo 5 por *Issatchenkia orientalis* JKS6. A temperatura ótima de descoloração do Vermelho Acido B por *Magnusiomyces ingens* LH-F1 também foi de 30 °C, cessando completamente na temperatura de 40 °C (Tan *et al.*, 2014).



**Figura 6:** Efeito da temperatura nas taxas de descoloração do corante RBBR (a) e no crescimento celular (b) a 25 ppm para os isolados OJU2 e SF5 a pH 4,0; SJL6 e SJU5 a pH 3,0 e SJ10 a pH 5,0 em meio MND a 2% de glicose durante 24 horas de incubação.

### 3.2.4 Efeito da concentração inicial do corante

O efeito da concentração inicial do corante tem importante papel no crescimento do micro-organismo e nas taxas de descoloração. Para o isolado SF5 as taxas de descoloração se mantiveram em cerca de 90% até 50 ppm e acima de 70% até 75 ppm. Para os isolados OJU2 e SJL6 a taxa de descoloração ficou acima de 85% até 50 ppm, mantendo-se acima de 70% para o isolado SJL6 até 100 ppm. O isolado SJ10 foi o que apresentou menor tolerância ao aumento da concentração do corante, com taxa máxima de descoloração em 25 ppm (Figura 7a). O comportamento do crescimento celular variou entre os isolados, sendo que, para SJU5, SF5 e OJU2 o aumento da concentração do corante elevou o crescimento celular, que foi ótimo a 75 ppm. Para os isolados SJL6 e SJ10, ao contrário, o crescimento diminuiu a partir de 25 ppm (Figura 7b).

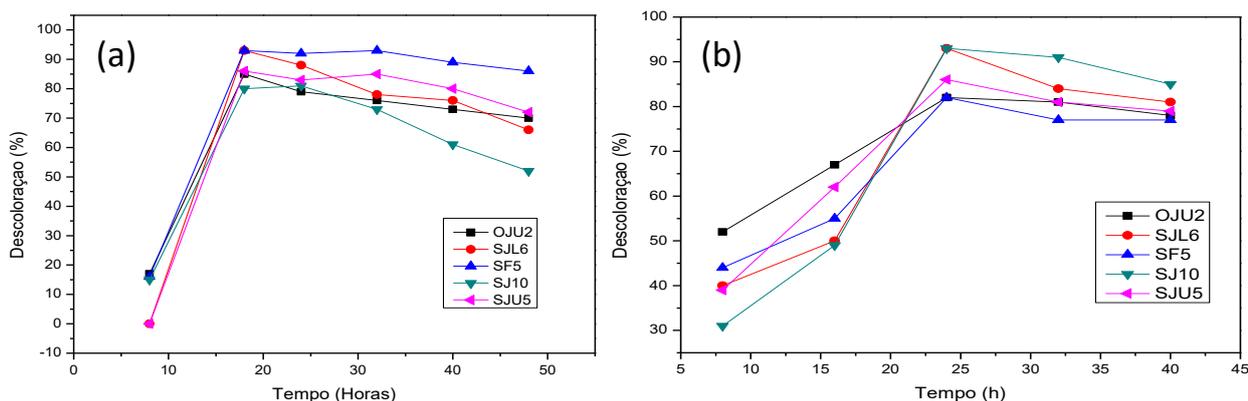


**Figura 7:** Efeito da concentração inicial do corante nas taxas de descoloração do RBBR (a) e no crescimento celular (b) para os isolados OJU2 e SF5 a pH 4,0; SJL6 e SJU5 a pH 3,0 e SJ10 a pH 5,0 em meio MND a 2% de glicose durante 24 horas de incubação.

No estudo realizado por Yemendzhiev *et al.* (2009) a maior descoloração do corante Azul Reativo 4 ocorreu na concentração de 50 ppm utilizando *Trametes versicolor* durante 144 horas de incubação. De acordo com Jadhav *et al.* (2009), o aumento da concentração do corante aumentou o tempo necessário para descoloração do corante Scarlet RR por *Galactomyces geotrichum*, sendo que a melhor taxa de descoloração ocorreu a 100 ppm. Outra levedura, a *Candida rugopelliculosa* HLX-2 removeu 90% da cor do corante Azul reativo 13 em 50 ppm, no entanto, a taxa de descoloração ficou em torno de 80% quando a concentração do corante foi aumentada para 2000 ppm (Liu *et al.*, 2011) A relação inversamente proporcional entre o aumento da concentração inicial do corante e as taxas de descoloração pode ser explicada devido ao aumento da carga orgânica do corante e da toxicidade de alguns subprodutos após a descoloração. Estudos demonstraram que o crescimento e a descoloração, por processos de bioacumulação ou biorredução, foram consideravelmente inibidos em elevadas concentrações iniciais do corante e que, nesses casos, usualmente é necessário um maior tempo de incubação para que ocorra efetiva descoloração (Dönmez, 2002; Aksu, 2003). No entanto, em mecanismos de descoloração que envolvem processos enzimáticos oxidativos, que em geral necessitam de curto intervalo de tempo (em torno de 24 horas) para descoloração, o aumento da concentração do corante não mostra inibição significativa no crescimento do micro-organismo (Yang *et al.*, 2005). Deste modo, nossos resultados sugerem que a descoloração do RBBR ocorreu por processos enzimáticos oxidativos.

### **3.3 Ensaios de validação nas condições ótimas de cultivo**

A utilização de uma metodologia otimizada na descoloração de corantes pode possibilitar a melhoria do processo, diminuir a variabilidade, o tempo e os custos totais no tratamento de efluentes industriais. A observação da Figura 6 mostra que o tempo necessário para atingir os valores máximos de descoloração foi de 18 horas de incubação na condição otimizada, e que as taxas de descoloração se mantiveram até cerca de 40 horas para os isolados OJU2, SJL6, SF5 e SJU5 e cerca de 30 horas para SJ10. Em comparação com as condições iniciais de descoloração, a otimização do processo permitiu alcançar elevadas taxas em menor tempo, caindo de 24 horas nas condições iniciais para 18 horas na condição otimizada (Figura 8a e 8b). Esses resultados demonstram a influência da composição do meio de cultura, e de parâmetros como o pH e temperatura, no tempo necessário para a descoloração de corantes.



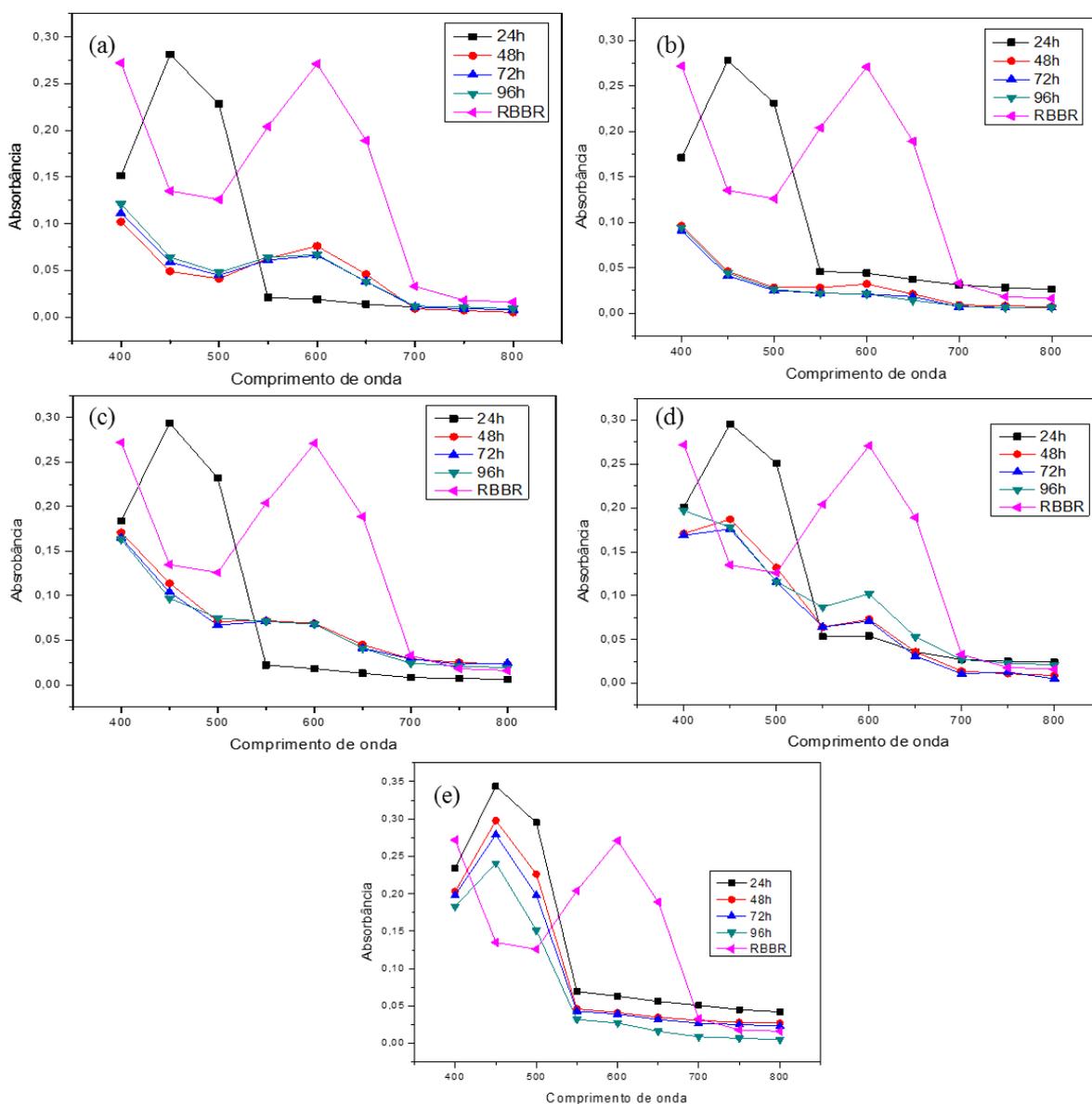
**Figura 8:** Taxas de descoloração do corante RBBR na concentração de 25 ppm nas melhores condições de cultivo (a) e nas condições iniciais de descoloração (b) durante 48 e 40 horas de incubação, respectivamente.

De um modo geral, as leveduras apresentam taxas elevadas de descoloração em períodos de tempo mais curtos, entre 18 e 48 horas (Liu *et al.*, 2011; Pajot *et al.*, 2011; Jafari *et al.*, 2014) especialmente quando comparadas com fungos filamentosos, como por exemplo, na descoloração do corante Preto de Amido 10B por *Phanerochaete chrysosporium* que atingiu 98% de descoloração após três dias de incubação (Senthilkumar *et al.*, 2014). Jadhav *et al.* (2009) encontraram 80% de descoloração do corante Scarlet RR em 18 horas de incubação utilizando *Galactomyces geotrichum*. Qu *et al.* (2012) demonstraram que o isolado de *Pichia* sp. TCL alcançou 94% e 93% de descoloração dos corantes Preto Reativo 5 e Azul Brillhante Reativo K-GR, respectivamente, durante 18 horas de incubação. Miranda *et al.* (2013) relataram que foi necessário 10 dias para se obter 96% de descoloração do efluente utilizando os fungos filamentosos *Curvularia lunata* e *Phanerochaete chrysosporium*. Assim, diferentes tempos de descoloração podem ser obtidos dependendo do corante, do micro-organismo e do processo envolvido na descoloração mas, de um modo geral, as leveduras apresentam vantagens em relação aos fungos filamentosos, uma vez que apresentam taxa de crescimento e, conseqüentemente, de descoloração, em períodos de tempos muito menores.

### 3.4 Análise do produto de degradação por espectrofotometria

A análise do sobrenadante obtido após a descoloração (corante tratado) indicou que, a 595 nm (comprimento de onda de máxima absorvância do RBBR), houve diminuição significativa no valor da absorvância quando comparado ao corante não tratado (Figura 9). A diminuição e alteração nos picos de absorvância em diferentes comprimentos, associado

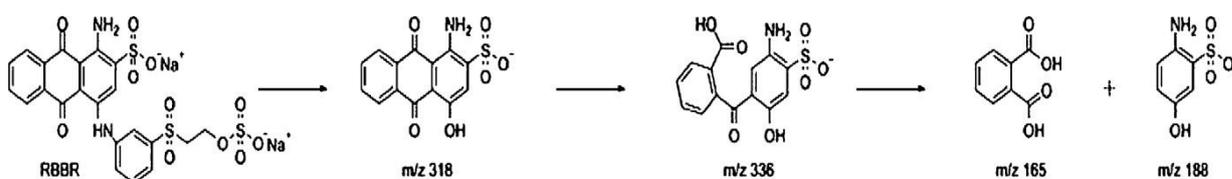
ao fato da biomassa não ter sofrido alteração na cor, indicam que houve a degradação do corante (Qu *et al.*, 2012; Jafari *et al.* 2014), que é um processo dependente de energia e envolve a hidrólise da molécula por processos enzimáticos (Saratale *et al.*, 2011). De acordo com a Figura 9 observa-se, também, que há um pico de absorbância em 24 horas de incubação, no comprimento de onda de 450 nm que vai diminuindo a partir de 48 horas para todos os isolados. De acordo com Buitron *et al.* (2004) e Davies *et al.* (2006) a redução progressiva dos valores da absorbância tem sido relacionada com a biodegradação, e as diferenças nos picos de absorbância do corante tratado e do corante não tratado expressam a decomposição da molécula em diferentes intermediários aromáticos incolores, produzidos e acumulados durante o processo de descoloração.



**Figura 9:** Espectro UV-VIS do RBBR antes e depois da biodegradação por 96 horas pelos isolados OJU2 (a); SJL6 (b); SF5 (c); SJ10 (d); SJU5 (e) em condições otimizadas de cultivo.

De acordo com Perlatti *et al.* (2012), na degradação do RBBR por *Aspergillus flavus* foi possível identificar quatro compostos com diferentes pesos moleculares (Figura 10). O composto com 336 Da, 2-amino-4-(2-carboxibenzil)-5-sulfonato hidroxibenzeno, foi identificado como produto da oxidação do grupo antraquinônico. Na oxidação da segunda porção do anel aromático foram gerados dois produtos de 165 e 188 Da, que foram identificados como o ácido o-ftálico e ácido 2-amino-1-fenil-4 sulfônico, respectivamente. Conforme Silva *et al.* (2013), esse caminho de degradação proposto por Perlatti *et al.* (2012) provavelmente envolve a citocromo P-450 monooxigenase, que faz parte de um sistema intracelular geralmente presente em muitos fungos e pode estar envolvido na degradação de diferentes organopoluentes (Cha *et al.*, 2001). A utilização de outras enzimas como a P-450 monooxigenase ou dioxigenase nos processos de descoloração de corantes pode ocorrer na ausência de enzimas ligninolíticas (Cha *et al.*, 2001). Por outro lado, em outro estudo, Hadibarata *et al.* (2012b) demonstraram que a lacase produzida por *Polyporus* sp.S133 poderia formar dois subprodutos na hidrólise do corante RBBR (Figura 11). Os produtos formados foram 1-amino-9,10-dióxido-9,10-dihidroantraceno-2-sulfonato de sódio e 2-(3-amino fenil)-sulfonil-metil-sulfato de sódio.

Diferentes enzimas podem estar envolvidas nos processos de descoloração de corantes por leveduras. De acordo com Deivasigamani & Das (2011), durante a degradação do corante Violeta Básico 3 por *Candida krusei* em 24 horas sob condições otimizadas, diferentes enzimas como lignina peroxidase, lacase, tirosinase, NADH-DCIP redutase e azoredutases atuaram. Em outro estudo, Yang *et al.* (2005) encontraram a atividade da enzima manganês peroxidase durante o processo de descoloração do corante Preto Reativo 5 por *Debaromyces polymorphus*. Em adição, Martorell *et al.* (2012) encontraram a produção das enzimas tirosinase e manganês peroxidase durante a descoloração do corante Black B-V por *Williopsis californica* e *W. saturnus* em 24 horas de incubação.



**Figura 10:** Possível mecanismo da transformação biocatalítica do RBBR por *Aspergillus flavus*. (Perlatti *et al.* 2012)



micro-organismos, ainda que os intermediários da degradação sejam tóxicos, é possível diminuir a toxicidade do RBBR com um maior tempo de incubação.

**Tabela 1:** Valores da CL<sub>50</sub> para as amostras do RBBR não tratado e tratado durante 24 e 120 horas de incubação.

Isolados	CL <sub>50</sub> em 24 horas	CL <sub>50</sub> em 120 horas
OJU2	-	-
SJL6	-	-
SF5	-	-
SJ10	-	19,5 %
SJU5	14,2 %	20,8 %
RBBR	8,16 %	8,16 %

Resultados semelhantes foram encontrados por Almeida & Corso (2014), em que, mesmo obtendo elevada taxa de descoloração do corante Vermelho de Procion pelo fungo *Aspergillus terreus*, o produto da degradação foi mais tóxico para *Artemia salina* que o corante não tratado. De acordo com alguns autores, a diminuição da toxicidade pode ocorrer com o aumento do tempo de incubação, como por exemplo, no estudo realizado por Babu *et al.* (2015) em que houve uma diminuição na taxa de mortalidade da *Artemia franciscana* no produto da descoloração do corante Vermelho Congo tratado com *Dietzia* sp. As taxas de mortalidade foram de 15%, 36% e 53% depois de 24, 48 e 72 horas, respectivamente. No entanto, alguns testes de toxicidade não demonstraram diferenças significativas entre os valores de CL<sub>50</sub> antes e depois da descoloração do corante que ficaram entre 6% para 8%, respectivamente (Prasad & Rao, 2013) e de 3,5% para 8,3% (Ayed *et al.*, 2011), isto é, a toxicidade não diminuiu mesmo após o tratamento por micro-organismos. Esses resultados demonstram a importância da realização de testes de toxicidade, visto que a ausência de cor não indica necessariamente a ausência de toxicidade. Em adição, a degradação incompleta de corantes pode levar a efeitos adversos maiores em comparação ao efluente bruto descartado devido à formação de metabólitos altamente tóxicos durante a degradação da molécula do corante (Almeida & Corso, 2014).

## CONCLUSÕES

Todos os isolados utilizados neste trabalho demonstraram elevada capacidade de descoloração do corante RBBR. No entanto, os isolados SJL6 e SF5 se destacaram por

apresentar porcentagens de descoloração acima de 90% em curto período de tempo nas condições otimizadas.

O produto da descoloração dos isolados SJU5 e SJ10 apresentou menor toxicidade quando comparado com o corante puro, ainda assim, esses resultados indicam que pode ser necessário um maior tempo de incubação para alcançar a total mineralização do corante RBBR.

O corante tratado dos isolados OJU1, SJL6 e SF5 mostraram elevada toxicidade, indicando que a biodegradação gerou moléculas mais tóxicas do que o corante inicial.

Por fim, embora os isolados utilizados tenham sido capazes de degradar o RBBR, e a descoloração seja um dos parâmetros para se atingir uma metodologia eficiente no tratamento de efluentes contendo corantes, é importante conhecer a natureza dos produtos formados. Assim, mais estudos devem ser realizados com o intuito de conhecer os intermediários formados e as enzimas envolvidas no processo de descoloração.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, D.H.; CHANG, W.S.; YOON, T.I. (1999). Dyestuff wastewater treatment using chemical oxidation, physical adsorption and fixed bed biofilm process. *Process Biochemistry*, v. 34, n. 5, p. 429-439.

AKSU, Z. (2003). Reactive dye bioaccumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry* v. 38, n. 10, p. 1437-1444.

AKSU, Z.; TEZER, S. (2000). Equilibrium and Kinetic Modeling of Biosorption of Remazol Black B by *Rhizopus arrhizus* in a batch system: Effects of Temperature. *Process Biochemistry*, v. 36, n. 5, p. 431 – 439.

ALMEIDA, E.J.R.; CORSO, C.R. (2014). Comparative study of toxicity of azo dye Procion Red MX-5B following biosorption and biodegradation treatments with the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. *Chemosphere*, v. 112, p. 317-322.

AL-SABTI, K. (2000). Chlorotriazine reactive azo Red 120 textile dyes induces micronuclei in fish. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 47, n. 2, p. 149-155.

AN, Y.J. (2006). Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. *Chemosphere*, v. 62, n. 8, p. 1359-1365.

AYED, L.; MAHDHI, A.; CHEREF, A.; BAKHROUF, A. (2011). Decolorization and degradation of azo dye Methyl Red by an isolated *Sphingomonas paucimobilis*: biotoxicity and metabolites characterization. *Desalination*, v. 274, n.1, p. 272-277.

BABU, S.S.; MOHANDASS, C.; VIJAYARAJ, A.S.; DHALEe, M.A. (2015). Detoxification and color removal of Congo red by a novel *Dietzia* sp.(DTS26)–A microcosm approach. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 114, p. 52-60.

BUITRON, G.; QUEZADA, M.; MORENO, G. (2004). Aerobic degradation of the azo dye Acid Red 151 in a sequencing batch biofilter. *Bioresource technology*, v. 92, n. 2, p. 143-149.

CHA, C.J.; DOERGE, D.R.; CERNIGLIA, C.E. (2001). Biotransformation of Malachite Green by the Fungus *Cunninghamella elegans*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 9, p. 4358-4360.

DAVIES, L.C.; PEDRO, I.S.; NOVAIS, J.M.; MARTINS-DIAS, S. (2006). Aerobic degradation of acid orange 7 in a vertical-flow constructed wetland. *Water research*, v. 40, n. 10, p. 2055-2063.

DEIVASIGAMANI, C.; DAS, N. (2011). Biodegradation of Basic Violet 3 by *Candida krusei* isolated from textile wastewater. *Biodegradation*, v. 22, n. 6, p. 1169-1180.

DOGAN, E.; YESILADA, E.; OZATA, L.; YOLOGIU, S. (2005). Genotoxic testing of four textile dyes in two crosses of *Drosophila* using wing somatic mutation and recombination test. *Drug and chemical toxicology*, v. 28, n. 3, p. 289-301.

DONMEZ, G. (2002). Bioaccumulation of the reactive textile dyes by *Candida tropicalis* growing in molasses medium. *Enzyme and Microbial Technology* v. 30, n. 3, p. 363-366.

FU Y.; VIRARAGHAVAN T. (2001). Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource technology*, v. 79, n. 3, p. 251-262.

GARG, S.K.; TRIPATHI, M.; SINGH, S.K.; TIWARI, J.K. (2012) Biodecolorization of textile dye effluent by *Pseudomonas putida* SKG-1 (MTCC 10510) under the conditions optimized for monoazo dye orange II color removal in simulated minimal salt medium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 74, p.24-35.

GOTTILIEB, A.; SHAW, C.; SMITH, A.; WHEATLEY, A.; FORSYTHE, S. (2003). The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourization. *Journal of Biotechnology*, v. 101, n. 1, p. 49-56.

GOU, M.; QU, Y.; ZHOU, J.; MA, F.; TAN, L. (2009). Azo dye decolorization by a new fungal isolate, *Penicillium* sp. QQ and fungal-bacterial cocultures. *Journal of hazardous materials*, v. 170, n. 1, p. 314-319.

GUO, M.; LU, F.; LIU, M.; LI, T.; PU, J.; WANG, N.; LIANG, P.; ZHANG, C. (2008). Purification of recombinant laccase from *Trametes versicolor* in *Pichia methanolica* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Biotechnology letters*, v. 30, n. 12, p. 2091-2096.

GURAV, A.A.; GHOSH, J.S.; KULKARNI, G.S. (2011) Decolorization of anthroquinone based dye Vat Red 10 by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112 and *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360. *Int J Biotechnol Mole Biol Res*, v. 2, n. 6, p. 93-97.

- HADIBARATA, T.; AYU KRISTANTI, R.I.S.K.Y. (2012a). Effect of environmental factors in the decolorization of Remazol Brilliant Blue R by *Polyporus* sp. S133. *Journal of the Chilean Chemical Society*, v. 57, n. 2, p. 1095-1098.
- HADIBARATA, T.; YUSOFF, A.R.M.; KRISTANTI, R.A. (2012b). Decolorization and metabolism of anthraquinone-type dye by laccase of white-rot fungi *Polyporus* sp. S133. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 223, n. 2, p. 933-941.
- HEINFLING-WEIDTMANN A.; REEMTSMA T.; STROM T.; SZEWZYK U. (2001). Sulfophthalimide as major metabolite formed from sulfonated phthalocyanine dyes by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*, *FEMS microbiology letters*, v. 203, n. 2, p. 179-183.
- JADHAV, S.U., GHODAKE, G.S., TELKE, A.A., TAMBOLI, D.P., Govindwar, S.P. (2009). Degradation and detoxification of disperse dye Scarlet RR by *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360. *J Microbiol Biotechnol*, v.19, p.409-415.
- JADHAV, S.U.; KALME, S.D.; GOVINDWAR, S.P. (2008). Biodegradation of methyl red by *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 62, n. 2, p. 135-142.
- JAFARI, N.; SOUDI, M.R.; KASRA-KERMANSHAHI, R. (2014). Biodecolorization of textile azo dyes by isolated yeast from activated sludge: *Issatchenkia orientalis* JKS6. *Annals of microbiology*, v. 64, n. 2, p. 475-482.
- JAROSZ-WILKOLAZKA A.; KOCHMANSKA-RDEST J.; MALARCZYK E., WARDAS W.; LEONOWICZ A. (2002). Fungi and their ability to decolorize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, n. 4, p. 566-572.
- KALMIS, E.; AZBAR, N.; KALYONCU, F. (2008). Evaluation of two wild types of *Pleurotus ostreatus* (MCC07 and MCC20) isolated from nature for their ability to decolorize Benazol Black ZN textile dye in comparison to some commercial types of white rot fungi: *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor*, and *Pleurotus citrinopileatus*. *Canadian journal of microbiology*, v. 54, n. 5, p. 366-370.
- KODAM, K.M.; SOOJHAWAN, I.; LOKHANDE, P.D., GAWAI, K.R. (2005). Microbial decolorization of reactive azo dyes under aerobic conditions. *World journal of microbiology and biotechnology*, v. 21, n. 3, p. 367-370.
- KUHAD R.C.; SOOD N.; TRIPATHI K.K.; SINGH A., WARD O.P. (2004) Developments in microbial methods for the treatment of dye effluents, *Advances in applied microbiology*, v. 56, p. 185-213.
- LIU, W.; CHAO, Y.; YANG, X.; BAO, H.; QUIAN, S. (2004). 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, n. 3, p. 127-132.
- LIU, X.; ZHANG, J.; JIANG, J.; LI, R.; XIE, Z.; LI, S. (2011). Biochemical degradation pathway of reactive blue 13 by *Candida rugopelliculosa* HXL-2. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 65, n. 1, p. 135 – 141.

MACHADO, K.M.G.; MATHEUS, D.R. Biodegradation of Remazol Brilliant Blue R by ligninolytic Enzymatic Complex produced by *Pleurotus Ostratus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p.468-473, 2006.

MARTORELL, M.M.; PAJOT, H.F.; DE FIGUEROA, L.I. (2012). Dye-decolourizing yeasts isolated from Las Yungas rainforest. Dye assimilation and removal used as selection criteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 66, n. 1, 25-32.

MATTHEWS, R.S. (1995). *Artemia salina* as a test organism for measuring superoxide-mediated toxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, v.18, n. 5, p. 919-922.

MECHICHI, T; MHIRI, N.; SAYADI, S. (2006). Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from *Trametes trogii*. v. 64, n. 6, p. 998-1005.

MIRANDA, R.C.M.; de BARROS GOMES, E.; PEREIRA, N.; MARIN-MORALES, M.A.; MACHADO, K.M.G.; GUSMÃO, N.B. (2013). Biotreatment of textile effluent in static bioreactor by *Curvularia lunata* URM 6179 and *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181. *Bioresource technology*, v. 142, p. 361-367.

NIGAM, P.; ARMOUR, G.; BANAT, I.M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. (2000). Physical removal of textile dyes effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed, agricultural residues. *Bioresource technology*, v. 72, n. 3, p. 219-226.

NIGAM, P.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; SINGH, D. (1996). Microbial process for the decolourization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. *Process Biochemistry*, v. 31, n. 5, p. 435-442.

OSMA, J.F.; TOCA-HERRERA, J.L.; RODRÍGUEZ-COUTO, S. (2010). Transformation pathway of Remazol Brilliant Blue R by immobilised laccase. *Bioresource technology*, v. 101, n. 22, p. 8509-8514.

PADMAVATHY, S.; SANDHYAN, S.; SWAMINATHAN, K.; SUBRAHMANYAM, Y.V.; CHAKRABARTI, T.; KAUL, S.N. (2003). Aerobic decolourisation of reactive azo dyes in presence of cosubstrates. *Chemical Biochemical Engineering Q*, v.17, n. 2, p. 147e-151.

PAJOT, H.F.; DELGADO, O.D.; FIGUEROA, L.I.C.; FARIÑA, J.I. (2011). Unraveling the decolourizing ability of yeast isolates from dye-polluted and virgin environment: an ecological and taxonomical overview. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 99, n. 3, p. 443-456.

PERLATTI, B.; FERNANDES, J.B.; FORIM, M.R. (2012). Validation and application of HPLC–ESI-MS/MS method for the quantification of RBBR decolorization, a model for highly toxic molecules, using several fungi strains. *Bioresource technology*, v.124, p. 37-44.

PRASAD, A.A.; RAO, K.B. (2013). Aerobic biodegradation of Azo dye by *Bacillus cohnii* MTCC 3616; an obligately alkaliphilic bacterium and toxicity evaluation of metabolites by different bioassay systems. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 97, n. 16, p. 7469-7481.

QU, Y.; CAO, X.; MA, Q.; SHI, S.; TAN, L.; LI, X.; ZHOU, H.; ZHANG, X.; ZHOU, J. (2012). Aerobic decolorization and degradation of Acid Red B by a newly isolated *Pichia* sp. TCL. *Journal of hazardous materials*, v. 223, p. 31-38.

QU, Y.; SHI, S.; MA, F.; YAN, B. (2010). Decolorization of reactive dark blue K-R by the synergism of fungus and bacterium using response surface methodology. *Bioresource technology*, v. 101, n. 21, p. 8016-8023.

RAMALHO, P.A.; CARDOSO, M.H.; CAVACO-PAULO, A., RAMALHO, M.T. (2004). Characterization of azo reduction activity in a novel ascomycete yeast strain. *Applied and environmental microbiology*, v. 70, n. 4, p. 2279-2288.

RAMALHO, P.A.; SCHOLZE, H.; CARDOSO, M.H.; RAMALHO, M.T.; OLIVEIRA-CAMPOS, A.M. (2002). Improved conditions for the aerobic reductive decolourisation of azo dyes by *Candida zeylanoides*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, n. 6, p. 848-854.

RIZZO, L. (2011). Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water research*, v. 45, n. 15, p. 4311-4340.

ROBINSON, T.; CHANDRAN, B.; NIGAM, P. (2001). Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolorization of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 29, n. 8, p. 575-579.

SARATALE, R.G.; SARATALE, G.D.; CHANG, J.S.; GOVINDWAR, S.P. (2009). Decolorization and biodegradation of textile dye Navy Blue HER by *Trichosporon beigelii* NCIM- 3326, *Journal of Hazardous Materials*, v. 166, n. 2, p. 1421-1428.

SARATALE, R.G.; SARATALE, G.D.; CHANG, J.S.; GOVINDWAR, S.P. (2011). Bacterial Decolorization and Degradation of azo dyes: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 42, n. 1, p. 138-157.

SARIOGLU, M.; BISGIN, T. (2007). Removal of Maxilon Yellow GL in a mixed methanogenic anaerobic culture. *Dyes and pigments*, v. 75, n. 3, p. 544-549.

SENTHILKUMAR, S.; PERUMALSAMY, M.; PRABHU, H.J. (2014). Decolourization potential of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on synthetic dye bath effluent containing Amido black 10B. *Journal of Saudi Chemical Society*, v. 18, n. 6, p. 845-853.

SILVA, M.C.; TORRES, J.A.; DE SÁ, L.R.V.; CHAGAS, P.M.B., FERREIRA-LEITÃO, V.S.; CORREA, A.D. (2013). The use of soybean peroxidase in the decolourization of Remazol Brilliant Blue R and toxicological evaluation of its degradation products. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 89, p. 122-129.

SOLÍS, M.; SOLÍS, A.; PÉREZ, H.I.; MANJARREZ, N.; Flores, M. (2012). Microbial decolouration of azo dyes: a review. *Process Biochemistry*, v. 47, n. 12, p. 1723-1748.

TAN, L., LI, H., NING, S., & XU, B. (2014). Aerobic decolorization and degradation of azo dyes by suspended growing cells and immobilized cells of a newly isolated yeast *Magnusiomyces ingens* LH-F1. *Bioresource Technology*, v. 158, p. 321-328.

TAN, L.; NING, S.; ZHANG, X.; SHI, S. (2013). Aerobic decolorization and degradation of azo dyes by growing cells of a newly isolated yeast *Candida tropicalis* TL-F1. *Bioresource technology*, v. 138, p. 307-313.

TELKE, A.; KALYANI, D.; JADHAV, J.; GOVINDWAR, S. (2008). Kinetics and mechanism of Reactive Red 141 degradation by a bacterial isolate *Rhizobium radiobacter* MTCC 8161, *Acta Chimica Slovenica*, v. 55, n. 2, p. 320.

WANG, H.; SU, J.K.; ZHENG, X.W.; TIAN, Y.; XIONG, X.J.; ZHENG, T.L. (2009). Bacterial decolorization and degradation of the reactive dye Reactive Red 180 by *Citrobacter* sp. CK3, *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 63, n. 4, p. 395-399.

WANG, L.; YAN, J.; HARDY, W.; MOSLEY, C.; WANG, S.; YU, H. (2005). Light-induced mutagenicity in *Salmonella* TA102 and genotoxicity/cytotoxicity in human T-cells by 3,3'-dichlorobenzidine: a chemical used in the manufacture of dyes and pigments and in tattoo inks. *Toxicology*, v. 207, n. 3, p. 411-418.

YAN, J.; CHEN, D.; YANG, E.; NIU, J.; CHEN, Y.; CHAGAN, I. (2014). Purification and characterization of a thermotolerant laccase isoform in *Trametes troglia* strain and its potential in dye decolorization. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 93, p. 186-194.

YANG, Q.; YEDILER, A.; YANG, M.; KETTRUP, A. (2005). Decolourization of an azo dye, Reactive Black 5 and MnP production by yeast isolate: *Debaryomyces polymorphus*. *Biochemical engineering journal*, v. 24, n. 3, p. 249-253.

YANG, Q.; TAO, L.; YANG, M.; ZHANG, H. (2008). Effects of glucose on the decolorization of Reactive Black 5 by yeast isolates. *Journal of Environmental Sciences*, v. 20, n. 1, p. 105-108.

YEMENDZHIEV, H., ALEXIEVA, Z., KRASTANOV, A. (2009). Decolorization of synthetic dye Reactive Blue 4 by mycelial culture of white-rot fungi *Trametes versicolor* 1. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 23, n. sup1, p. 230-232.

YU, Z., & WEN, X. (2005). Screening and identification of yeasts for decolorizing synthetic dyes in industrial wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 56, n.2, p. 109-114.

## **CAPITULO 2**

### **Descoloração do corante Alaranjado G por leveduras isoladas de moluscos de água doce sob condições otimizadas de cultivo**

## **Decolorization of Orange G by yeasts isolated from freshwater molluscs under optimized culture conditions**

### **Resumo**

O comprometimento de ecossistemas com o lançamento de corantes industriais em efluentes, e a natureza recalcitrante dos corantes azo, aumentou o interesse em técnicas de biodegradação nos processos de remediação de águas residuais. Nesse contexto, foram estudados efeitos dos parâmetros de cultivo como pH, concentração de corante, temperatura e concentração de glicose na habilidade de descoloração do corante Alaranjado G. Foram utilizados duas leveduras identificados como *Candida* sp. e *Pichia kudriavzevii* isoladas de moluscos do Rio Subaé, Bahia-Brasil. As duas leveduras apresentaram descoloração do Alaranjado G acima de 95% em pH ácido, concentração de glicose entre 0,5 % e 2%, temperatura de 35 °C a 45 °C, na concentração de 100 ppm do corante. Os ensaios com *Artemia salina* do corante tratado e não tratado mostrou que houve diminuição da toxicidade com valores da CL<sub>50</sub> de 7,14 % e de 17,19 %, para *Candida* sp. e *Pichia kudriavzevii*, respectivamente, após 24 horas. Os ensaios com as sementes de alface demonstraram que o crescimento das radículas e a porcentagem de germinação foram maiores após 120 horas de incubação. Esses resultados indicam que embora a descoloração Alaranjado G tenha sido efetiva para os dois isolados, houve a formação de intermediários tóxicos durante os ensaios de descoloração.

Palavras-chave: Biodegradação, corante azo, fungos.

### **Abstract**

The commitment of ecosystems with the release of industrial dyes in wastewater, and the recalcitrant nature of azo dyes, increased interest in biodegradation techniques in wastewater remediation processes. In this context, the effects were studied on culture parameters as pH, dye concentration, temperature and concentration of glucose in the decolorization ability of the dye Orange G. Were used 2 yeasts identified as *Candida* sp. and *Pichia kudriavzevii* from Subaé River molluscs. The two yeasts showed Orange G decolorization above 95% at acidic pH, glucose concentration between 0.5% and 2 %, 35 °C to 45 °C, at a concentration of 100 ppm. The experiments with *Artemia salina* of the treated and untreated dye showed decreased toxicity, with LC<sub>50</sub> values of 7.14 % and 17.19%, for *Candida* sp. and *Pichia kudriavzevii*, respectively after 24 hours. Assays with lettuce seeds, showed that the growth of sprouts and the germination percentage was higher after 120 hours of incubation. These results indicate that although the Orange G decolorization has been effective for both isolates, there was the formation of toxic intermediates during decolorization assays.

Keywords: biodegradation, dye azo, fungi

## 1.0 Introdução

Devido ao crescimento populacional e ao aumento da atividade industrial, os problemas ambientais têm se tornado cada vez mais críticos e frequentes (Saratale *et al.*, 2011). O baixo aproveitamento dos insumos faz com que as indústrias sejam responsáveis pela geração de grandes volumes de resíduos os quais, geralmente, contêm altas cargas de sais dissolvidos, surfactantes, sólidos suspensos, coloração e matéria orgânica, principalmente na forma de moléculas complexas de corantes (Mechichi *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2012). Segundo Rai *et al.* (2005), corantes sintéticos são definidos como moléculas que são capazes de conferir cor a diferentes tipos de substratos, são resistentes à luz solar, água, produtos químicos, incluindo agentes oxidantes, e a ação microbiana. Os azo corantes representam a maioria, correspondendo a mais de 3000 variedades diferentes de todos os corantes produzidos, devido à facilidade e eficácia de custo de sua síntese, sua estabilidade e variedade de cores disponíveis em comparação com corantes naturais (Chang *et al.*, 2004). Tais corantes, incluem o Alaranjado G, que é um corante largamente utilizado em indústrias têxteis (Christiane *et al.*, 2013). A característica principal dessa classe de corantes é a presença de uma ou mais ligações azo ( $-N=N-$ ) ligados a compostos aromáticos (Liao *et al.*, 2013).

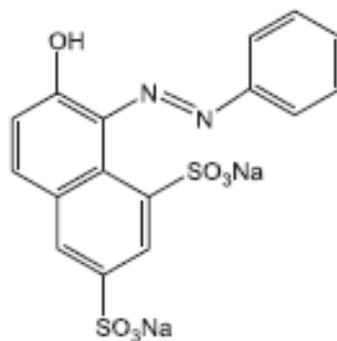
Devido à grande mistura de corantes têxteis com estruturas complexas lançadas em um efluente, a absorção da luz pelos vegetais e animais do ambiente aquático pode ser comprometida, provocando modificações nas atividades fotossintetizantes da biota aquática (Peternel *et al.*, 2006; Solis *et al.*, 2012). Dessa forma, a contaminação dos corpos de água, e o conseqüente comprometimento destes, têm levado à realização de estudos com o intuito de desenvolver tecnologias capazes de minimizar o volume, a coloração e a toxicidade dos efluentes industriais (Pandey *et al.*, 2007; Solis *et al.*, 2012). Numerosos processos físico-químicos têm sido utilizados visando o tratamento destes despejos, no

entanto, esses processos apresentam custo elevado e baixa eficiência para remoção de cor e matéria orgânica dissolvida (Eichlerová *et al.*, 2007; Garcia-Montaña *et al.*, 2008; Salgado *et al.*, 2009). A biorremediação, ou seja, a remoção de poluentes por métodos biológicos, possui vantagem significativa quando comparada com os outros métodos por ser considerada ecologicamente correta, apresentar menores custos de operação e possibilitar a transformação dos compostos tóxicos e recalcitrantes em moléculas menores, atóxicas, ou até mesmo levar à total mineralização do corante (Rai *et al.*, 2005; Saratale *et al.*, 2011; Solis *et al.*, 2012; Rauf e Ashaf, 2012). Diferentes autores já demonstraram que algumas espécies de fungos como *Pleurotus ostreatus*, *Pichia* sp., *Penicillium* sp. e *Candida tropicalis* apresentaram potencial de descolorir corantes azo através de biossorção ou degradação (Katuri *et al.*, 2009; Arora *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2010, 2012). Nesse contexto, buscamos avaliar o efeito de diferentes parâmetros como temperatura, concentração inicial do corante, diferentes concentrações da fonte de carbono na descoloração e pH durante os ensaios de descoloração do corante azo Alaranjado G tratado por leveduras isoladas de moluscos do Rio Subaé, Bahia- Brasil.

## **2.0 Material e métodos**

### **2.1 Corante**

O corante utilizado foi o Alaranjado G (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), com fórmula química representada por  $C_{16}H_{10}N_2O_7S_2Na_2$ , sendo, mais precisamente o sal dissódico do ácido 7-hidroxi-8-(fenilazo)-1,3-naftalenodissulfônico. Possui massa molecular de 452,37 u, solubilidade em água aproximada de 80 a 108,6 g.L<sup>-1</sup> e em etanol de 2,2 g.L<sup>-1</sup>. Uma solução estoque na concentração final de 10.000 ppm foi realizada pela dissolução do corante em água destilada.



**Figura 1:** Estrutura química do Alaranjado G (Niu et al., 2012)

## 2.2 Micro-organismos utilizados nos ensaios de descoloração

Foram utilizadas duas leveduras, *Candida* sp e *Pichia kudriavzevii*, que fazem parte da micoteca do laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia que apresentaram taxas de descoloração de 80% do corante Alaranjado G durante 24 horas de incubação. As leveduras foram isoladas de moluscos coletados no município de São Francisco do Conde, na Baía de Todos os Santos, considerando o eixo longitudinal do rio Subaé (da nascente a foz). Foram realizadas três coletas em três unidades amostrais correspondendo, as regiões agrícolas (longitude 12° 33' 52.4" e latitude 038° 41' 40.5"), urbana (12° 35' 35.8" e latitude de 038° 41' 47.7") e estuarina (longitude de 12° 37' 52.9" e latitude de 038° 40' 55.0") nos meses de novembro de dezembro de 2010 e janeiro de 2011.

## 2.3 Ensaios de descoloração utilizando diferentes parâmetros de cultivo

A fim de otimizar as condições para o tratamento efetivo do Alaranjado G foram realizados ensaios de descoloração durante o período de 24 horas, sob agitação de 150 rpm com variadas condições de cultivo: pH (2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8), concentrações iniciais do corante (50, 100, 200, 300 e 400 ppm), concentrações de glicose (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0%), e

temperaturas de incubação (20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C). Todos os ensaios foram realizados em triplicata utilizando o Meio Normal de Descoloração (MND) modificado (Ramalho *et al.*, 2004), constituído por (%): extrato de levedura (0,25),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,013),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,05) e glicose (2). O controle foi realizado com o MND com corante sem micro-organismo. As amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 20 minutos e os sobrenadantes foram analisados em espectrofotômetro no comprimento de onda de 476 nm. A porcentagem de descoloração foi obtida através da seguinte fórmula:

$$\text{Descoloração (\%)} = (A-B)/A \times 100,$$

Onde: (A) indica a absorbância do meio não inoculado e (B) indica a absorbância residual do meio.

#### **2.4 Determinação da biomassa dos isolados**

Após os ensaios de descoloração, todo o conteúdo dos frascos de Erlenmeyers foi transferido para tubos de centrífuga. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos com rotação de 5.000 rpm, o sobrenadante foi retirado e a biomassa contida no fundo do tubo foi lavada com água destilada e centrifugada novamente. As biomassas dos isolados foram determinadas em espectrofotômetro e representadas pela absorbância em 600 nm ( $\text{D.O.}_{600}$ ). Para evitar que o valor da  $\text{D.O.}_{600}$  ultrapassasse 1.0, as amostras foram analisadas após diluições de 12 vezes. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

#### **2.5 Screening do comprimento de onda do produto de degradação**

O produto da degradação de cada isolado, nas condições ótimas de descoloração foi monitorado em espectrofotômetro. As amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 20 minutos e os sobrenadantes foram analisados nos comprimentos de onda de 400-800 nm em diferentes intervalos de tempo (24, 48, 72 e 96 horas).

## **2.6 Testes de toxicidade**

### **2.6.1 Ensaios com sementes de alface (*Lactuca sativa*)**

Os biotestes foram realizados com aquênios do mesmo lote de alface (*Lactuca sativa* L.) cv. Crespa Mônica (FELTRIN). Os testes de germinação foram feitos de acordo com Sobrero e Ronco (2008) com adaptações, utilizando 3 repetições com 20 sementes distribuídas em cada placa de Petri (9 cm de diâmetro). As placas foram forradas com papel para germinação, umedecidas com 2 mL de solução nas concentrações de 6, 12, 25, 50 e 100% de cada sobrenadante antes (controle negativo) e após a descoloração nas condições otimizadas, e vedadas com papel filme. Foram utilizados 2 mL de água destilada no grupo controle positivo. As placas foram cobertas com papel escuro e incubadas por 5 dias a temperatura ambiente. Após o período de incubação, foram determinadas a medida do comprimento das radículas (cm), e a taxa de germinação (%) das sementes de cada placa.

### **2.6.2 Ensaios com *Artemia salina***

Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados com náuplios de *Artemia salina*, de acordo com método descrito por Matthews (1995) com algumas adaptações. Para eclosão, foi adicionado 1 g de cisto de *Artemia salina* em um recipiente contendo 3 L de água artificial do mar. Os cistos foram mantidos em movimento constante por meio de uma bomba de ar por 24 h em temperatura de 30 °C com constante iluminação. Após este período, 10 náuplios do microcrustáceo foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de diferentes concentrações (6, 12, 25, 50, 100%) do corante e do sobrenadante após a etapa de descoloração nas condições otimizadas. Os ensaios foram mantidos em temperatura ambiente por 24 horas. O controle foi realizado somente com água artificial do mar. Todos os testes foram realizados em triplicata. O resultado foi obtido pela contagem do número de Artemias vivas em cada tubo de ensaio. O cálculo da  $CL_{50}$ , ou seja,

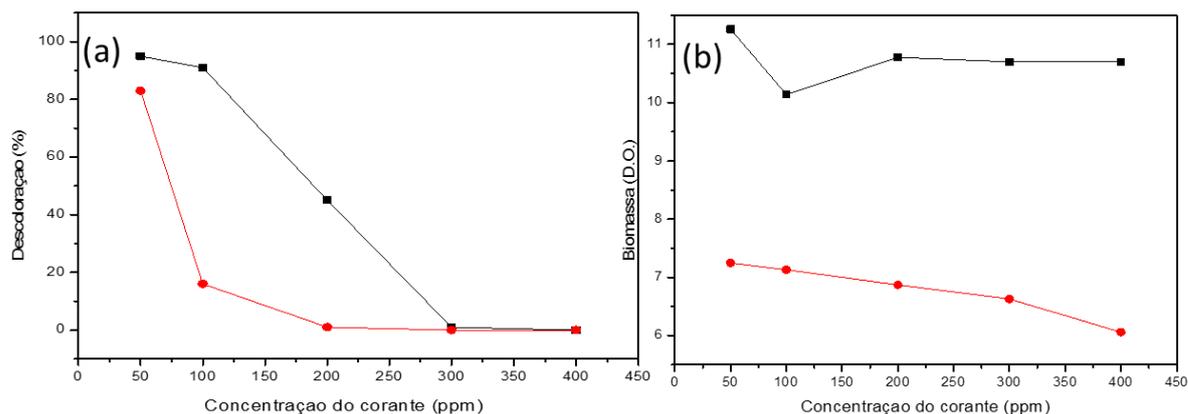
concentração em que se observa a mortalidade de 50% ou mais dos organismos teste expostos, foi determinada usando o programa Trimmed Spearman-Kärber (An, 2006).

### 3.0 Resultados e Discussão

#### 3.1 Efeito de diferentes parâmetros na descoloração do corante e no crescimento das leveduras

##### 3.1.1 Efeito da concentração inicial do corante

O efluente descartado pelas indústrias apresenta diferentes concentrações dos corantes, entre 20 e 200 ppm, e a capacidade de um micro-organismo de degradar esse material é um fator importante para uma descoloração efetiva (Ayed *et al.*, 2011). No presente estudo, foi observado que a descoloração do Alaranjado G por *Candida* sp. e *Pichia kudriavzevii*, diminuiu à medida que a concentração do corante aumentou. As maiores taxas de descoloração, de 86% a 95%, ocorreram nas concentrações de 50 ppm, diminuindo consideravelmente a partir de 100 ppm para *Pichia kudriavzevii*. No entanto, o isolado de *Candida* sp. foi capaz de descolorir até 90% do corante na concentração de 100 ppm e manteve uma taxa de descoloração acima de 40 % em 200 ppm. (Figura 2a).



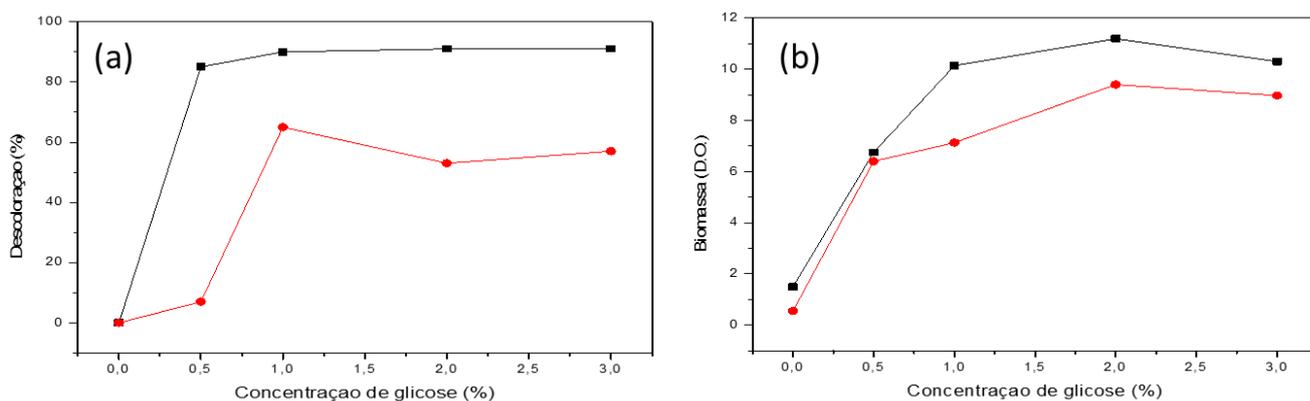
**Figura 2:** Efeito da concentração inicial do corante nas taxas de descoloração do Alaranjado G (a) e no crescimento celular (b) para *Candida* sp. (■) e *Pichia kudriavzevii* (●) em meio MND contendo 2% de glicose, pH 5,0 a 25 °C durante 24 horas de incubação.

Esse comportamento é comum, não somente para leveduras, mas para diferentes espécies de micro-organismos. Resultados obtidos por diferentes autores evidenciam a relação inversa entre concentração inicial e descoloração do corante, como descrito para o Alaranjado G por *Pycnoporus sanguineus* e por *Shingomonas* sp. (Christiane *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2014). Qu *et al.* (2012) também encontraram diminuição nas taxas de descoloração por *Pichia* sp. TCL com o aumento da concentração do corante Vermelho Ácido B. Resultados obtidos por Tan *et al.* (2013) com *Candida tropicalis* TL-F1 demonstraram descoloração eficiente de 97% do corante Brilhante Escarlate GR em 20 ppm, mas com o aumento da concentração para 500 ppm, a taxa de descoloração caiu para 58,8%. Acredita-se que a queda na taxa de descoloração em maiores concentrações do corante ocorra devido aos seus efeitos tóxicos ou pela produção de metabólitos intermediários tóxicos pelos micro-organismos (Hsueh e Chen, 2007; Pearce *et al.*, 2003; Jadhav *et al.*, 2007). Em contrapartida, em nossos experimentos, o aumento da concentração do corante não interferiu no crescimento celular, que se manteve constante até 400 ppm para a *Candida* sp. Por outro lado, *Pichia kudriavzevii* teve seu crescimento fortemente afetado pelo aumento da concentração do corante, o que pode explicar sua baixa taxa de descoloração a partir de 50 ppm (Figura 2b). Segundo Tan *et al.* (2013), o aumento na concentração do corante não demonstrou efeitos inibitórios na biomassa de *Candida tropicalis* TL-F1, uma vez que as curvas de crescimento da levedura se mantiveram constantes. Resultados semelhantes foram encontrados por Martorell *et al.* (2012) durante a descoloração de diferentes corantes por *Williopsis saturnus*. Além disso, Leelakriangsak e Borisut (2012) testando a descoloração de diferentes concentrações de corantes azo, inclusive o Alaranjado G, também não encontraram efeitos inibitórios no crescimento celular durante 24 horas de incubação.

### 3.1.2 Efeito da concentração de glicose

A fonte de carbono possui relevante importância como fonte de energia para manutenção dos micro-organismos e como doadores de elétrons, necessários para a quebra da ligação azo (Yemendzhiev *et al.*, 2009). Além do tipo de fonte de carbono, é importante considerar sua concentração, uma vez que a mesma deve ser suficiente para satisfazer as necessidades de crescimento microbiano e possibilitar a descoloração. Dessa forma, foram estudadas diferentes concentrações de glicose na descoloração do Alaranjado G a 100 ppm. De acordo com a Figura 3a, observa-se-se que nenhum dos isolados foi capaz de descolorir o corante na ausência de uma fonte de carbono adicional, demonstrando a dependência da glicose para efetiva descoloração. Para *Pichia kudriavzevii* a concentração ótima de glicose foi de 1%, enquanto que *Candida* sp. demonstrou elevada taxa de descoloração a partir de 0,5% de glicose.

Estudos demonstraram que a glicose atua como um substrato co-metabólico para estabilizar o metabolismo microbiano, aumentar o crescimento celular e a descoloração do corante (Yang *et al.*, 2005; Waghmode *et al.*, 2011). No entanto, a concentração deve ser suficientemente baixa para limitar o crescimento da biomassa, permitindo a atividade metabólica sem reforçar o processo de bioissorção (Khouni *et al.*, 2012). Além disso, concentrações elevadas de carbono podem ocasionar menor porcentagem de descoloração, porque os micro-organismos podem utilizar a fonte de carbono, preferencialmente, ao invés do corante (Mohana *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009). De modo geral, células de leveduras não crescem sem glicose ou qualquer outra fonte de carbono facilmente metabolizável (Solis *et al.*, 2012), como demonstrado na Figura 3b e também descrito para outras espécies de leveduras como *Debaryomyces polymorphus* e *Candida tropicalis* (Yang *et al.*, 2008).



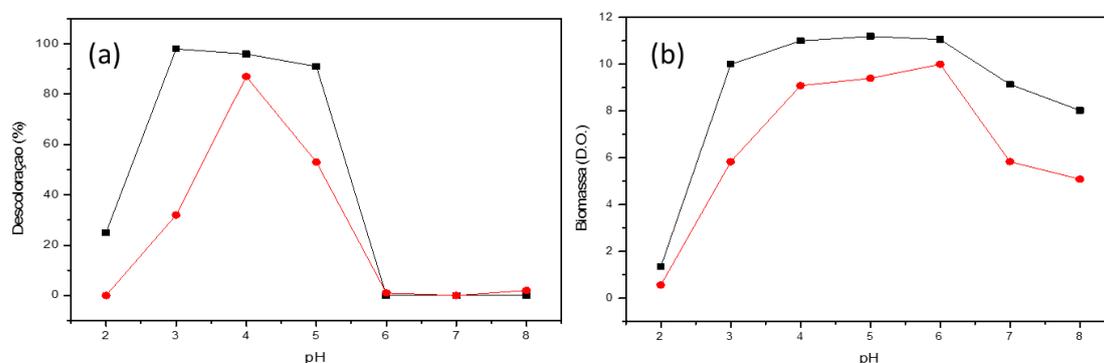
**Figura 3:** Efeito da concentração de glicose na descoloração biológica do Alaranjado G a 100 ppm (a) e crescimento celular (b) para os isolados *Candida* sp. (■) e *Pichia kudriavzevii* (●) em meio MDN, com pH 5,0 a 25 °C durante 24 horas de incubação.

### 3.1.3 Efeito do pH

O pH do meio é um dos fatores que afetam a cor da solução, a solubilidade do corante, a atividade enzimática e, conseqüentemente, o grau de descoloração do corante (Solís *et al.*, 2012). Valores extremos de pH associados aos efluentes têxteis tem mostrado a inibição da degradação de corantes azo por comunidades microbianas desses efluentes. Assim, a tolerância a essas condições é também um importante parâmetro para uma eficiente biotransformação do corante azo em efluentes (Manu e Chauhari, 2003; Sen e Demirer, 2003; Asad *et al.*, 2007).

Foram pesquisados diferentes valores de pH, variando de 2 a 8 em meio de cultura com concentração inicial do corante em 100 ppm com o objetivo de determinar a influência do pH na taxa de descoloração. De acordo com a Figura 4a, pode-se concluir que *Candida* sp. demonstrou capacidade de descolorir totalmente o Alaranjado G em uma faixa de pH entre 3 a 5, com maior porcentagem de descoloração no pH 3,0. Para *Pichia kudriavzevii*, o valor ótimo para descoloração foi de 4,0 com queda significativa nos outros valores de pH. Assim as condições ácidas proporcionaram melhores taxas de descoloração para os três isolados.

O intervalo de pH entre 4,0 a 6,0 estimulou o crescimento celular para todos os isolados, indicando que, nesse caso, as melhores taxas de descoloração acompanharam o crescimento celular (Figura 4b).



**Figura 4:** Efeito do pH na descoloração biológica do Alaranjado G na concentração de 100 ppm (a) e no crescimento celular (b) em meio MND contendo 2% de glicose pelos isolados *Candida sp.* (■) e *Pichia kudriavzevii* (●) a 25 °C durante 24 horas de incubação.

A preferência das enzimas de fungos pelo pH ácido foi observada também por Hadibarata *et al.* (2013) estudando a descoloração do corante Preto Reativo 5 pelo fungo *Pleurotus eryngii* F032. O'Mahony *et al.* (2002) afirmaram que o pH ótimo de 3 a 5 é adequado para o crescimento e produção enzimática para fungos, principalmente os da podridão branca. Em trabalho envolvendo *Candida rugopelliculosa* HLX-2, foi observado a descoloração em mais de 80% do Azul Reativo 13 em pH entre 3 e 6, com inibição do processo quando o pH ultrapassa 8 (Liu *et al.*, 2011). Também em condição de acidez, a melhor faixa de pH para descoloração do Brilhante Escarlata Gr por *Candida tropicalis* TL-F1 ficou entre 4 e 6 (Tan *et al.*, 2013). Jadhav *et al.* (2008) demonstraram que durante a descoloração do corante Vermelho de Metila, a levedura *Galactomyces geotrichum* foi capaz de descolorir o corante na faixa de pH entre 3 e 5, com a melhor taxa de descoloração em pH 3,0.

Em pH alcalino não foi observada descoloração do meio, indicando que os isolados podem não ser eficientes em ambientes com intensa variação de pH. Foi observado

também que, em todos os pH estudados, houve uma tendência para a acidificação ou neutralização do meio na presença do micro-organismo. De acordo com Sirianuntapiboon *et al.* (2004), o pH do meio diminuiu para valores menores que 4,0 depois da incubação em seus ensaios de descoloração. Esse fato pode estar correlacionado com o metabolismo da glicose durante a fase de crescimento exponencial do micro-organismo, que libera ácidos orgânicos provenientes da glicólise e ciclo de Krebs para o meio de cultura (Ramalho *et al.*, 2002).

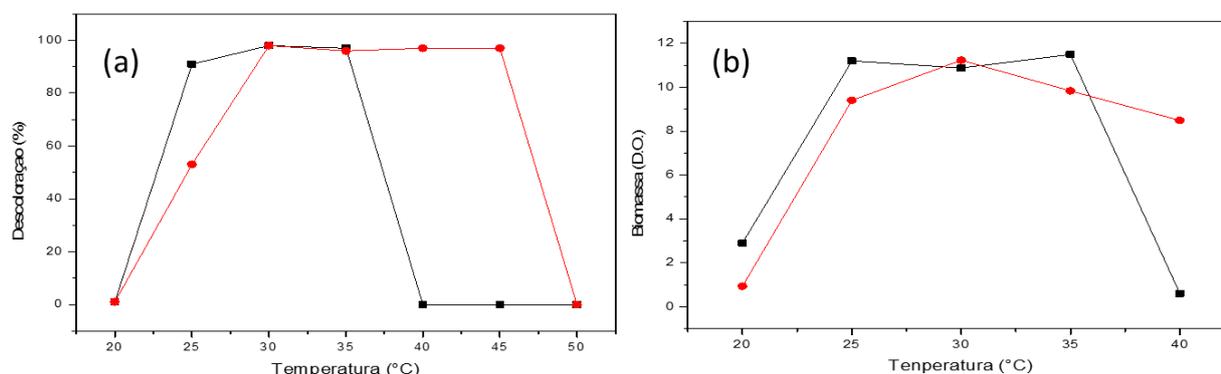
De acordo com Santos *et al.* (2007), a clivagem redutiva dos grupamento azo é considerada como a primeira etapa na descoloração biológica de corantes azo, a qual seria catalisada por azoredutases produzidas pelos micro-organismos. Todavia, a descoloração de diferentes corantes azo tem sido relacionada com a atividade enzimática, não de uma, mas de variadas enzimas. Segundo Eichlerová *et al.* (2006), a descoloração do Corante Alaranjado G pelos fungos *Pleurotus calyptratus* e *Ischnoderma resinosum* ocorreu, principalmente, devido à atividade enzimática da lacase; o mesmo foi observado por Christiane *et al.* (2013) na degradação do Alaranjado G por *Pycnoporus sanguineus*. Chagas e Durrant (2001), encontraram elevada atividade enzimática de manganês peroxidase,  $\beta$ -glucosidase e lacase durante a descoloração do Alaranjado G por *Phanerochaete chrysosporium*. Enquanto os fungos da podridão branca estão mais associados com a produção de enzimas ligninolíticas durante a descoloração de corantes, as leveduras apresentam atividade de azoredutases, além das enzimas ligninolíticas. Como relatado por Govindwar *et al.* (2014), durante a descoloração do corante Amarelo 84A utilizando *Galactomyces geotrichum*, a descoloração foi pela ação de lacase e tirosinase intracelular, bem como de azoredutases, como NADH-DCIP redutase e riboflavina redutase. Martorell *et al.* (2012) demonstraram também, que a descoloração do corante Preto B-V ocorreu devido a produção das enzimas manganês peroxidase e tirosinase por

*Trichosporon porosum*. Yang *et al.* (2003), por outro lado, demonstraram a produção de uma enzima ligninolítica, a manganês peroxidase, na descoloração do Preto Reativo 5 por *Debaryomyces polymorphus* e *Candida tropicalis*.

### 3.1.4 Efeito da temperatura

As maiores taxas de descoloração de corantes azo são geralmente relacionadas à temperatura ótima de crescimento de cada micro-organismo (Angelova *et al.*, 2007; Ozdemir *et al.*, 2008; Ali, 2010). No presente estudo foram analisadas diferentes temperaturas, variando de 20 °C a 50 °C para avaliar possíveis correlações entre a temperatura e a taxa de descoloração do corante. De acordo com a Figura 5a, pode-se observar que a temperatura ótima para a *Candida* sp. variou entre 25 °C a 35 °C, e que a partir de 35 °C cessou completamente a descoloração. No entanto, para *Pichia kudriavzevii* os valores ótimos ficaram na faixa de 30 °C a 45 °C.

O crescimento da *Candida* sp., se manteve crescente até 35 °C, ao passo que para *Pichia kudriavzevii* o crescimento se manteve elevado até 40 °C (Figura 5b). Esses resultados demonstram que a temperatura possui efeito significativo nas taxas de descoloração e no crescimento celular.

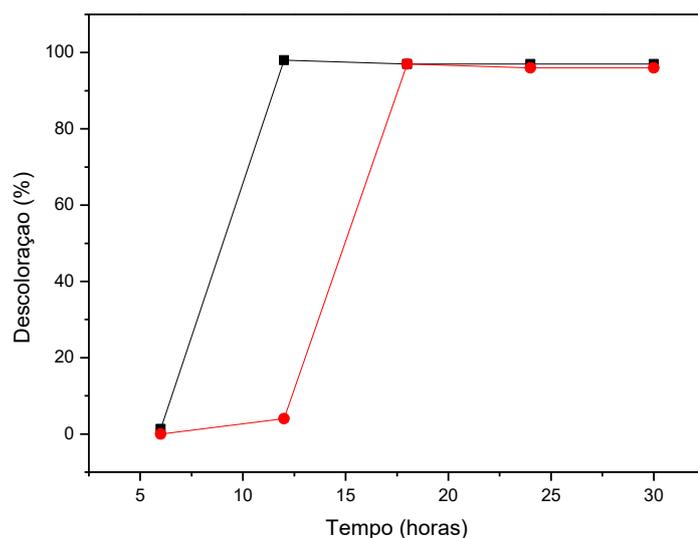


**Figura 5:** Efeito da temperatura na descoloração biológica (a) e crescimento celular (b) do Alaranjado G a 100 ppm em meio MND contendo 2% de glicose para os isolados *Candida* sp. (■) com pH 3,0 e *Pichia kudriavzevii* (●) com pH 4,0 durante 24 horas de incubação.

Diferentes fungos possuem diferentes temperaturas ótimas de crescimento, com a maioria crescendo entre 25 °C e 35 °C (Fu e Viraraghavan, 2001). Estudos sugerem que o declínio da descoloração em altas ou baixas temperaturas pode ocorrer por causa da perda da viabilidade celular e/ou da desnaturação de enzimas envolvidas no processo de descoloração (Chang *et al.*, 2001; Jadhav *et al.*, 2007). Foi observado que durante a descoloração do corante Preto Reativo 5 e Vermelho de Metila por *Yarrowia lipolytica* e *Galactomyces geotrichum*, respectivamente, as melhores taxas de descoloração ocorreram na temperatura de 30 °C (Jadhav *et al.*, 2008; Aracagök e Cihangir, 2013). Além disso, Jafari *et al.* (2014) observaram que 32 °C foi a temperatura ótima para a descoloração do Preto reativo 5 por *Issatchenkia orientalis* JKS6. O efluente de indústrias têxteis e que envolvem processos de tingimento são produzidos em temperaturas elevadas, entre 40 °C e 70 °C (Santos *et al.*, 2004), dessa forma, a utilização de micro-organismos termotolerantes e termofílicos em sistemas de descoloração são os mais apropriados para aplicação em processos de biorremediação de efluentes coloridos.

### **3.2 Testes de validação das melhores condições de cultivo para descoloração**

Foram realizados ensaios de descoloração do Alaranjado G a 100 ppm nas melhores condições para cada isolado. Foram utilizados os seguintes parâmetros: para *Candida* sp. foi utilizado pH 3,0, temperatura de 35°C e 2% de glicose; e para *Pichia kudriavzevii*, pH 4,0 temperatura de 45 °C e 2% de glicose. De acordo com a Figura 6, pode-se observar que *Candida* sp. atingiu a máxima taxa de descoloração após 12 horas de incubação, enquanto que *Pichia kudriavzevii* obteve elevada taxa de descoloração após 18 horas. Esses valores praticamente se mantiveram até 30 horas de incubação. Na condição otimizada o tempo de descoloração diminuiu para todos os isolados, entre 25% e 50%.



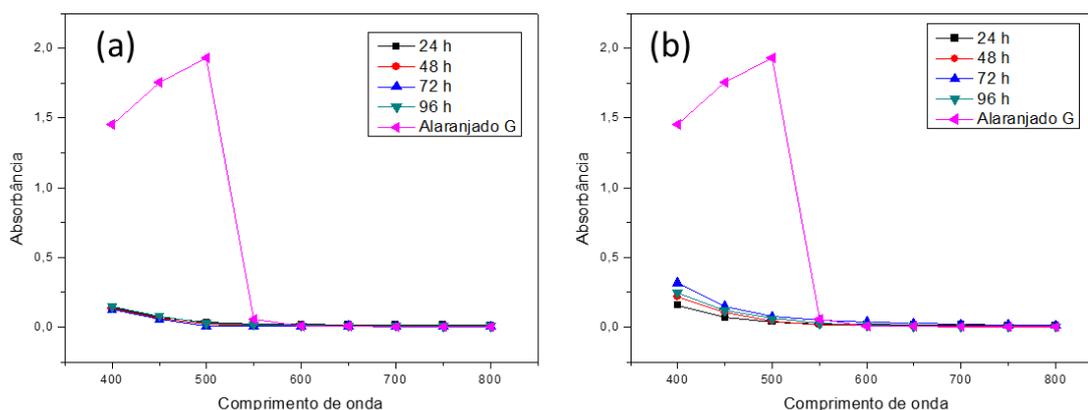
**Figura 6:** Taxa de descoloração em melhores condições para os isolados *Candida* sp. (■) e *Pichia kudriavzevii* (●) durante 30 horas de incubação em intervalos de 6 horas.

O tempo necessário para atingir a máxima descoloração de corantes varia com o micro-organismo utilizado. A descoloração do Vermelho Ácido B pela levedura *Magnusiomyces ingens* LH-F1 alcançou mais de 95% durante 12 horas de incubação em condições otimizadas (Tan *et al.*, 2014). De acordo Tan *et al.* (2013) *Candida tropicalis* TL-F1 foi capaz de descolorir mais de 97% do Ácido Brillante Scarlet Gr em 24 h quando a concentração variava entre 20 a 100 ppm. Em outro estudo, *Pseudozyma rugulosa* Y-48 e *Candida krusei* G-1 descoloriram 99% do vermelho brilhante reativo L-2BP a 200 ppm após 24 h, diminuindo gradativamente a descoloração conforme o aumento das concentrações do corante (Yu e Wen, 2005). No estudo realizado por Matias *et al.* (2013), a levedura *Candida infanticola* UFSJ 6A as melhores taxas de descoloração do corante Preto Reativo 5 ocorreram após 72 horas utilizando  $4\text{g.l}^{-1}$  e 250 ppm de concentração de glicose e corante, respectivamente. Em adição no estudo realizado por Christiane *et al.* (2013), o fungo *Pycnoporus sanguineus* levou cerca de 15 dias para descolorir 80 % do Alaranjado G e resultados semelhantes foram encontrados por Novotny *et al.* (2001) que demonstraram a dificuldade de *Irpex lacteus* em descolorir corantes mono ou diazo como o

Orange G. Segundo Chagas e Durrant, (2001), analisando a descoloração da Tartazina e Amaranço pelos fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus sajorcaju*, tiveram máxima descoloração de corantes azo em 8 e 4 dias, respectivamente. Assim, quando comparado com fungos filamentosos, e com outras espécies de leveduras, os isolados utilizados nesse estudo apresentaram melhor performance em menor tempo na descoloração do corante azo.

### 3.3 Análise do produto da degradação

O produto da descoloração foi monitorado por espectrofotometria nos comprimentos de onda entre 400 e 800 nm, em diferentes intervalos de tempo (24, 48, 72 e 96 horas). A Figura 7 mostra as diferenças nas absorvâncias do Alaranjado G antes e depois da descoloração pelos isolados de *Candida* sp. e *Pichia kudriavzevii*. No comprimento de onda de 476 nm o valor da absorvância para o produto da descoloração foi de praticamente zero para todos os tempos estudados. Além disso, foi observado que o pico de absorvância do corante não tratado praticamente desapareceu independente do tempo de incubação. De acordo com Asad (2007), em processos de descoloração envolvendo a biodegradação, o principal pico de absorção da luz visível do corante desaparece completamente ou há a formação de outros picos. A diferença nos valores de absorvância indica que houve a formação de produtos intermediários incolores com a hidrólise do grupamento azo, formando aminas aromáticas incolores (Tripathi e Srivastava, 2014). As diferenças nos picos de absorvância entre o corante tratado e não tratado foram relatadas por diferentes autores (Govindwar *et al.*, 2014; Jadhav *et al.*, 2011; Saha *et al.*, 2010). De acordo com Tripathi e Srivastava (2014), na descoloração do Alaranjado G por *Bacillus megaterium* houve a quebra ligação azo com consequente formação de fenilidrazina, aldeído e derivados do naftaleno. Resultados semelhantes foram encontrados por Kolekar *et al.* (2008) após a descoloração do Laranja Ácido 10 por *Bacillus fusiformis*.



**Figura 7:** Espectro UV-VIS do Alaranjado G antes e depois da biodegradação pelos isolados de *Candida* sp. (a) e *Pichia kudriavzevii* (b) durante 96 horas de incubação.

### 3.4 Ensaios de toxicidade

#### 3.4.1 Ensaios com *Artemia salina*

Os ensaios de toxicidade aguda, realizados utilizando as diluições do corante sem tratamento e tratado demonstraram que em relação ao isolado de *Candida* sp., o valor da  $CL_{50}$  foi de 7,14 % após 24 horas de degradação; porém, após 120 horas não foi possível obter um valor médio de letalidade indicando que, possivelmente, houve o aumento da toxicidade com o aumento do tempo de incubação. O isolado de *Pichia kudriavzevii* também demonstrou aumento da toxicidade à medida que aumentou o tempo de incubação, uma vez que o valor da  $CL_{50}$  em 24 horas foi de 17,19 % e em 120 horas foi de 11,21 % (Tabela 1).

**Tabela 1:** Valores da  $CL_{50}$  para as amostras tratadas pelas leveduras *Candida* sp. e *Pichia kudriavzevii* e amostras não tratadas do Alaranjado G durante 24 e 120 horas de incubação.

Isolados	$CL_{50}$ em 24 h	$CL_{50}$ em 120 h
<i>Candida</i> sp.	7,14 %	-
<i>Pichia kudriavzevii</i>	17,19 %	11,21 %
Alaranjado G	-	-

Para a degradação ser considerada eficiente, os metabólitos formados devem possuir menor nível de toxicidade decorrente da completa mineralização das moléculas, sem a formação de metabólitos tóxicos. Assim, o aumento da toxicidade dos metabólitos formados no decorrer da descoloração e um baixo valor da CL<sub>50</sub> indicam que houve apenas uma degradação parcial do corante, e que houve a formação de intermediários mais tóxicos após 120 horas de incubação. De acordo com Isik e Sponza (2004), o composto formado durante o processo de descoloração que não é biodegradável é responsável pela toxicidade. Por exemplo, as aminas aromáticas formadas são mais tóxicas que seu composto original. Assim, pode-se inferir que a descoloração ocorreu somente através da hidrólise do grupo cromóforo, ou seja, da ligação azo, sem a mineralização do corante, uma vez que o produto da degradação continuou sendo tóxico.

#### **3.4.2 Ensaios de fitotoxicidade com sementes de alface (*Lactuca sativa*)**

Os testes de fitotoxicidade foram realizados para avaliar o impacto do corante tratado e não tratado na vegetação, uma vez que efluentes são lançados no ecossistema. De acordo com as Tabelas 2 e 3, as diferentes concentrações utilizadas do sobrenadante (corante tratado) mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos com 24 e 120 horas, sendo que nos tratamentos com 120 horas as médias dos comprimentos das radículas e as porcentagens da germinação das sementes foram iguais ou maiores que no tratamento por 24 horas até a concentração de 100% (letras minúsculas na horizontal) e iguais ou maiores do que no corante não tratado até a concentração de 50 %.

Pode-se observar também que, dentro do tempo de 24 horas, à medida que aumentou a concentração do sobrenadante de 6% até 100%, ocorreu a diminuição da taxa de germinação e do crescimento das radículas. No entanto, dentro do tempo de 120 horas, o aumento da concentração não afetou estatisticamente a taxa da germinação até a concentração de 50% para o isolado de *Candida* sp., enquanto para o isolado de *Pichia*

*kudriavzevii* não houve diferença estatística na germinação até 25% (Tabela 3, letras maiúsculas na vertical). Para o crescimento radicular, quanto maior a concentração do sobrenadante, maior a inibição do crescimento da raiz. Entretanto, essa inibição foi sempre menor do que no controle (corante não tratado) na mesma diluição após 120 horas de incubação, até a concentração de 50%. Dessa forma, pode-se observar que o maior tempo de incubação diminuiu a toxicidade dos metabólitos tanto para o crescimento das radículas como para a germinação das sementes. A despeito dos efeitos positivos sobre a germinação e crescimento radicular do corante tratado, ainda assim, os resultados sugerem que não houve a total mineralização do corante, uma vez que, em todos os tratamentos, na concentração de 100% foram observados efeitos inibitórios sobre os parâmetros analisados.

**Tabela 2:** Crescimento da radícula (cm) em diferentes concentrações do corante tratado e não tratado durante 24 e 120 horas de incubação.

Diluições (%)	Corante não tratado	<i>Candida sp.</i>		<i>Pichia kudriavzevii</i>	
		24 h	120 h	24 h	120 h
0	2,56 <sub>aC</sub>	2,56 <sub>aC</sub>	2,56 <sub>aD</sub>	2,56 <sub>aD</sub>	2,56 <sub>aC</sub>
6	0,82 <sub>aB</sub>	1,26 <sub>bB</sub>	2,89 <sub>cD</sub>	1,59 <sub>bC</sub>	3,32 <sub>cE</sub>
12	0,64 <sub>aB</sub>	1,24 <sub>bB</sub>	2,39 <sub>cC</sub>	1,64 <sub>bC</sub>	2,97 <sub>cD</sub>
25	0,65 <sub>aB</sub>	0,42 <sub>aA</sub>	2,04 <sub>bC</sub>	1,54 <sub>bC</sub>	2,41 <sub>cC</sub>
50	0,49 <sub>aA</sub>	0,37 <sub>aA</sub>	1,14 <sub>bB</sub>	0,81 <sub>bB</sub>	0,65 <sub>bB</sub>
100	0,46 <sub>bA</sub>	0,01 <sub>aA</sub>	0,26 <sub>aA</sub>	0,01 <sub>aA</sub>	0,01 <sub>aA</sub>

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na horizontal e maiúsculas na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade.

**Tabela 3:** Taxa de germinação (%) de sementes em diferentes concentrações do corante tratado e não tratado.

Diluições (%)	Corante não tratado	<i>Candida sp.</i>		<i>Pichia kudriavzevii</i>	
		24h	120h	24h	120h
0	95,0 <sub>aB</sub>	95,0 <sub>aE</sub>	95,0 <sub>aB</sub>	95,0 <sub>aD</sub>	95,0 <sub>aC</sub>
6	85,0 <sub>aB</sub>	76,6 <sub>aD</sub>	93,3 <sub>bB</sub>	75,0 <sub>aC</sub>	97,5 <sub>bC</sub>
12	95,0 <sub>bB</sub>	80,0 <sub>aD</sub>	93,3 <sub>bB</sub>	83,7 <sub>aC</sub>	92,5 <sub>aC</sub>

25	86,2 <sub>b B</sub>	65,0 <sub>a C</sub>	98,3 <sub>c B</sub>	75,0 <sub>a C</sub>	95,0 <sub>b C</sub>
50	80,0 <sub>b B</sub>	23,3 <sub>a B</sub>	93,3 <sub>b B</sub>	30,0 <sub>a B</sub>	37,5 <sub>a B</sub>
100	10,0 <sub>a A</sub>	1,0 <sub>a A</sub>	71,6 <sub>b A</sub>	1,0 <sub>a A</sub>	1,0 <sub>a A</sub>

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na horizontal e maiúsculas na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade.

A diminuição da fitotoxicidade do corante tratado em relação ao corante não tratado tem sido amplamente relatada por diferentes autores. De acordo com Saratale *et al.* (2013), a fitotoxicidade dos metabólitos gerados após a degradação do corante Vermelho de Remazol foi menor que a do corante não tratado. Resultados semelhantes foram encontrados por Govindwar *et al.* (2014) e Vijayalakshmidēvi e Muthukumar (2015) avaliando a fitotoxicidade da descoloração do corante Amarelo Reativo e de um efluente têxtil, respectivamente. De acordo com Ma *et al.* (2014), o tratamento do corante Laranja Reativo 16 por *Ganoderma* sp. também demonstrou diminuição da fitotoxicidade em relação ao corante não tratado.

Cabe ressaltar que a utilização de diferentes organismos nos testes de toxicidade aguda pode resultar em diferenças de sensibilidade entre os mesmos. Os resultados de toxicidade demonstraram que a sensibilidade mais elevada se deu para a *Artemia salina*, comparando com a sensibilidade das sementes de *Lactuca sativa*. Assim, devido às diferenças de sensibilidade, são recomendados testes com vários tipos de organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos do ambiente, sendo eles produtores primários, representados por algas ou plantas superiores, consumidores primários, tais como microcrustáceos, e consumidores secundários, representados por peixes (Costa *et al.*, 2008; García-Lorenzo *et al.*, 2009).

#### 4.0 Conclusões

Os resultados apresentados neste estudo indicaram que diferentes fatores abióticos podem contribuir para a descoloração de azo corantes.

Elevadas taxas de descoloração ocorreram em condições ácidas de pH e baixa concentração de glicose.

A faixa de temperatura ótima ficou entre 25 °C e 35 °C, mas, o isolado de *Pichia kudriavzevii* merece destaque por apresentar características termotolerantes, com elevadas taxas de descoloração em uma ampla faixa de temperatura, inclusive até 45 °C. Do ponto de vista industrial, essa característica é de alta relevância na bioremediação, uma vez que os efluentes geralmente apresentam elevada temperatura.

Em relação aos bioensaios de toxicidade, os organismos utilizados demonstraram ser eficientes como bioindicadores de toxicidade aguda. Embora para a *Artemia salina* o corante tratado tenha sido mais tóxico, os testes com sementes de alface apresentaram menor toxicidade do que o corante não tratado. O produto da descoloração em período de 120 horas, de um modo geral, demonstrou valores de crescimento das radículas e de taxas de germinação maiores que o corante não tratado.

Esses resultados sugerem que houve a biotransformação do corante, ocorrendo apenas uma degradação parcial da molécula.

Ressalta-se assim a importância de mais estudos para a identificação desses metabólitos produzidos e de consórcios com outros micro-organismos a fim de tentar mineralizar a molécula do corante.

## **Referências Bibliográficas**

ALI, Hazrat. Biodegradation of synthetic dyes-a review. 2010. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 213, n. 1-4, p. 251-273.

ALI, L., ALHASSANI, H., KARUVANTEVIDA, N., RAUF, M.A., ASHRAF, S.S., 2014. Efficient aerobic degradation of various Azo dyes by a *Sphingomonas* sp isolated from petroleum sludge. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, v. 5, n. 3, p. 1-10.

AN, Y.J., 2006. Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. *Chemosphere*, v. 62, n. 8, p. 1359-1365.

- ANGELOVA, B., AVRAMOVA, T., STEFANOVA, L., MUTAFOV, S., 2008. Temperature effect on bacterial azo bond reduction kinetics: an Arrhenius plot analysis. *Biodegradation*, v. 19, n. 3, p. 387-393.
- ARACAGÖK, Y.D., CIHANGIR, N., 2013. Decolorization of Reactive Black 5 by *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658. *American Journal of Microbiological Research*, v. 1, n. 2, p. 16-20.
- ARORA, S., SAINI, H., SINGH, K., 2011. Biological decolorization of industrial dyes by *Candida tropicalis* and *Bacillus firmus*. *Water Science & Technology*, v. 63, n. 4, p. 761-768.
- ASAD, S., AMOOZEGAR, M.A., POURBABAEI, A., SARBOLOUKI, M.N., DASTGHEIB, S.M.M., 2007. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 11, p. 2082-2088.
- AYED, L., MAHDHI, A., CHEREF, A., BAKHROUF, A., 2011. Decolorization and degradation of azo dye Methyl Red by an isolated *Sphingomonas paucimobilis*: biotoxicity and metabolites characterization. *Desalination*, v. 274, n. 1, p. 272-277.
- CHAGAS, E.P., & DURRANT, L.R., 2001. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 29, n. 8, p. 473-477.
- CHANG, J. S., CHEN, B.Y., LIN, Y.S., 2004. Stimulation of bacterial decolorization of an azo dye by extracellular metabolites from *Escherichia coli* strain NO3. *Bioresource Technology*, v. 91, n. 3, p. 243-248.
- CHANG, J.S., CHOU, C., LIN, Y.C., LIN, P.J., HO, J.Y., HU, T. L., 2001. Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. *Water Research*, v. 35, n. 12, p. 2841-2850.
- CHRISTIANE, A., STEEVE, M., JEAN-BOSCO, S.T., KOR, N.M., BRAMA, I., ERIC, G., PHILIPPE, G., 2013. Biodegradation of Reactive Blue 4 and Orange G by *Pycnoporus sanguineus* Strain Isolated in Gabon. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*.
- COSTA, C.R., OLIVI, P., BOTTA, C.M., ESPINDOLA, E.L., 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1820-1830.
- EICHLEROVA, I., HOMOLKA, L., NERUD, F., 2007. Decolorization of high concentrations of synthetic dyes by the white rot fungus *Bjerkandera adusta* strain CCBAS 232. *Dyes and Pigments*, v. 75, n. 1, p. 38-44.
- FU Y.; VIRARAGHAVAN, T., 2001. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource Technology*. v. 79, n. 3, p. 251-262.
- GARCÍA-LORENZO, M.L., MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, M.J., PEREZ-SIRVENT, C., MOLINA, J., 2009. Ecotoxicological evaluation for the screening of areas polluted by mining activities. *Ecotoxicology*, v. 18, n. 8, p. 1077-1086.
- GARCÍA-MONTAÑO, J., DOMENECH, X., GARCÍA-HORTAL, J.A., TORRADES, F., PERAL, J., 2008. The testing of several biological and chemical coupled treatments for Cibacron Red FN-R azo dye removal. *Journal of Hazardous Materials*, v. 154, n. 1, p. 484-490.

GOVINDWAR, S.P., KURADE, M.B., TAMBOLI, D.P., KABRA, A.N., KIM, P.J., WAGHMODE, T. R., 2014. Decolorization and degradation of xenobiotic azo dye Reactive Yellow-84A and textile effluent by *Galactomyces geotrichum*. *Chemosphere*, v. 109, p. 234-238

HADIBARATA, T., ADNAN, L.A., YUSOFF, A.R.M., YUNIARTO, A., ZUBIR, M. M.F.A., KHUDHAIR, A.B., NASER, M.A., 2013. Microbial decolorization of an azo dye reactive black 5 using white-rot fungus *Pleurotus eryngii* F032. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 224, n. 6, p. 1-9.

HSUEH, C.C., CHEN, B.Y., 2007. Comparative study on reaction selectivity of azo dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 141, n. 3, p. 842-849.

IŞIK, M., SPONZA, D.T., 2004. Monitoring of toxicity and intermediates of CI Direct Black 38 azo dye through decolorization in an anaerobic/aerobic sequential reactor system. *Journal of Hazardous Materials*, v. 114, n. 1, p. 29-39.

JADHAV, J.P., PARSHETTI, G.K., KALME, S.D., GOVINDWAR, S.P., 2007. Decolourization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. *Chemosphere*, v. 68, n. 2, p. 394-400.

JADHAV, S.U., KALME, S.D., GOVINDWAR, S.P., 2008. Biodegradation of methyl red by *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 62, n. 2, p. 135-142.

JADHAV, S. B., PHUGARE, S.S., PATIL, P.S., JADHAV, J.P., 2011. Biochemical degradation pathway of textile dye Remazol red and subsequent toxicological evaluation by cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress studies. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 65, n. 6, p. 733-743.

JAFARI, N., SOUDI, M.R., KASRA-KERMANSHAHI, R., 2014. Biodecolorization of textile azo dyes by isolated yeast from activated sludge: *Issatchenkia orientalis* JKS6. *Annals of Microbiology*, v. 64, n. 2, p. 475-482.

KATURI, K.P., MOHAN, S.V., SRIDHAR, S., PATI, B.R., SARMA, P.N., 2009 Laccase-membrane reactors for decolorization of an acid azo dye in aqueous phase: process optimization. *Water Research*, v. 43, n. 15, p. 3647-3658.

KHOUNI, I., MARROT, B., AMAR, R.B., 2012. Treatment of reconstituted textile wastewater containing a reactive dye in an aerobic sequencing batch reactor using a novel bacterial consortium. *Separation and Purification Technology*, v. 87, p. 110-119.

KOLEKAR, Y.M., PAWAR, S.P., GAWAI, K.R., LOKHANDE, P.D., SHOUCHE, Y. S., KODAM, K.M., 2008. Decolorization and degradation of Disperse Blue 79 and Acid Orange 10, by *Bacillus fusiformis* KMK5 isolated from the textile dye contaminated soil. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 18, p. 8999-9003.

KUMAR, K., DASTIDAR, M.G., SREEKRISHNAN, T.R., 2009. Effect of process parameters on aerobic decolourization of reactive azo dye using mixed culture. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, v. 58, p. 962-965.

LEELAKRIANGSAK, M., BORISUT, S., 2012. Characterization of the decolorizing activity of azo dyes by *Bacillus subtilis* azoreductase AzoR1. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, v. 34, n. 5, p. 509-516.

- LIAO, C.S., HUNG, C.H., CHAO, S.L., 2013. Decolorization of azo dye reactive black B by *Bacillus cereus* strain HJ-1. *Chemosphere*, v. 90, n. 7, p. 2109-2114.
- LIU, X., ZHANG, J., JIANG, J., LI, R., XIE, Z., LI, S., 2011. Biochemical degradation pathway of reactive blue 13 by *Candida rugopelliculosa* HXL-2. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 65, n. 1, p. 135 – 141.
- MA, L., ZHUO, R., LIU, H., YU, D., JIANG, M., ZHANG, X., YANG, Y., 2014. Efficient decolorization and detoxification of the sulfonated azo dye Reactive Orange 16 and simulated textile wastewater containing Reactive Orange 16 by the white-rot fungus *Ganoderma* sp. En3 isolated from the forest of Tzu-chin Mountain in China. *Biochemical Engineering Journal*, v. 82, p. 1-9.
- MANU, B., CHAUDHARI, S., 2003. Decolorization of indigo and azo dyes in semicontinuous reactors with long hydraulic retention time. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 8, p. 1213-1221.
- MARTORELL, M. M., PAJOT, H. F., de FIGUEROA, L. I., 2012. Dye-decolourizing yeasts isolated from Las Yungas rainforest. Dye assimilation and removal used as selection criteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 66(1), 25-32.
- MATIAS, K.T.S., GONÇALVES, D.B., SILVA, A.P.R., VIEIRA, M.S., GALDINO, A.S., GRANJEIRO, P.A., SILVA, A., 2013. Uso da Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) na descoloração do corante Preto Reativo 5 pela levedura *Candida infanticola* UFSJ 6A isolada de efluente têxtil. *BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports*, v. 2, n. 2esp, p. 51-53.
- MATTHEWS, R.S., 1995. *Artemia salina* as a test organism for measuring superoxide-mediated toxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 18, n. 5, p. 919-922.
- MECHICHI, T., MHIRI, N., SAYADI, S., 2006. Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from *Trametes trogii*. *Chemosphere*, v. 64, n. 6, p. 998-1005.
- MOHANA, S., SHRIVASTAVA, S., DIVECHA, J., MADAMWAR, D., 2008. Response surface methodology for optimization of medium for decolorization of textile dye Direct Black 22 by a novel bacterial consortium. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 3, p. 562-569.
- NOVOTNÝ, Č., RAWAL, B., BHATT, M., PATEL, M., ŠAŠEK, V., MOLITORIS, H. P., 2001. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *Journal of Biotechnology*, v. 89, n. 2, p. 113-122.
- O'MAHONY, T., GUIBAL, E., TOBIN, J.M., 2002. Reactive dye biosorption by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, n. 4, p. 456-463.
- OZDEMIR, G., PAZARBASI, B., KOCYIGIT, A., OMEROGU, E.E., YASA, I., KARABOZ, I., 2008. Decolorization of Acid Black 210 by *Vibrio harveyi* TEMS1, a newly isolated bioluminescent bacterium from Izmir Bay, Turkey. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 8, p. 1375-1381.
- PANDEY, A., SINGH, P., IYENGAR, L., 2007. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 59, n. 2, p. 73-84.
- PEARCE, C.I., LLOYD, J.R., GUTHRIE, J.T., 2003. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and pigments*, v. 58, n. 3, p. 179-196.

- PETERNEL, I.; KOPRIVANAC, N., KUSIC, H., 2006. UV-based processes for reactive azo dye mineralization. *Water Research*, v. 40, n. 3, p. 525-532.
- QU, Y., CAO, X., MA, Q., SHI, S., TAN, L., LI, X., ZHOU H., ZHANG X., ZHOU, J., 2012. Aerobic decolorization and degradation of Acid Red B by a newly isolated *Pichia* sp. TCL. *Journal of hazardous materials*, v. 223, p. 31-38.
- QU, Y., SHI, S., MA, F., YAN, B., 2010. Decolorization of reactive dark blue KR by the synergism of fungus and bacterium using response surface methodology. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 21, p. 8016-8023.
- RAI, H.S., BHATTACHARYYA, M.S., SINGH, J., BANSAL, T.K., VATS, P., BANERJEE, U.C., 2005. Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry: a review of emerging techniques with reference to biological treatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 35, n. 3, p. 219-238.
- RAMALHO, P.A., CARDOSO, M.H., CAVACO-PAULO, A., RAMALHO, M.T., 2004. Characterization of azo reduction activity in a novel ascomycete yeast strain. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 4, p. 2279-2288.
- RAMALHO, P.A., SCHOLZE, H., CARDOSO, M.H., RAMALHO, M.T., OLIVEIRA-CAMPOS, A. M., 2002 Improved conditions for the aerobic reductive decolourisation of azo dyes by *Candida zeylanoides*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, n. 6, p. 848-854.
- RAUF, M.A., ASHRAF, S.S., 2012. Survey of recent trends in biochemically assisted degradation of dyes. *Chemical Engineering Journal*, v. 209, p. 520-530.
- SAHA, S.K., SWAMINATHAN, P., RAGHAVAN, C., UMA, L., SUBRAMANIAN, G., 2010. Ligninolytic and antioxidative enzymes of a marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511 during Poly R-478 decolourization. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 9, p. 3076-3084.
- SALGADO, B.C.B., NOGUEIRA, M.I.C., RODRIGUES, K.A., SAMPAIO, G.M.M.S., BUARQUE, H.L.D.B., ARAÚJO, R.D.S., 2009. Decolorization of synthetic and laundry wastewater containing indigo and azo dyes by the Fenton, photolytic and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 14, n. 1, p. 1-8.
- SANTOS, A.B., CERVANTES, F.J., VAN LIER, J.B., 2004. Azo dye reduction by thermophilic anaerobic granular sludge, and the impact of the redox mediator anthraquinone-2, 6-disulfonate (AQDS) on the reductive biochemical transformation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 64, n. 1, p. 62-69.
- SANTOS, A.B., CERVANTES, F.J., VAN LIER, J.B., 2007. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 12, p. 2369-2385.
- SARATALE, R.G., GANDHI, S.S., PURANKAR, M.V., KURADE, M.B., GOVINDWAR, S.P., OH, S.E., SARATALE, G.D., 2013. Decolorization and detoxification of sulfonated azo dye CI Remazol Red and textile effluent by isolated *Lysinibacillus* sp. RGS. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 115, n. 6, p. 658-667.

- SARATALE, R.G., SARATALE, G.D., CHANG, J.S., GOVINDWAR, S.P., 2011. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 42, n. 1, p. 138-157.
- ŞEN, S., DEMIRER, G.N., 2003. Anaerobic treatment of real textile wastewater with a fluidized bed reactor. *Water Research*, v. 37, n. 8, p. 1868-1878.
- SILVA, M.C., CORRÊA, A.D., TORRES, J.A., AMORIM, M.T.S.P., 2012. Descoloração de corantes industriais e efluentes têxteis simulados por peroxidase de nabo (*Brassica campestris*). *Química Nova*, v. 35, n. 5, p. 889-894.
- SIRIANUNTAPIBOON, S., ZOHSALAM, P., OHMOMO, S., 2004. Decolorization of molasses wastewater by *Citeromyces* sp. WR-43-6. *Process biochemistry*, v. 39, n. 8, p. 917-924.
- SOBRERO, M. S.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. In: ROMERO, P. R.; CANTÚ, A. M. *Ensayos Toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas em agua y suelo*. 1 ed, Instituto Nacional de Ecología, Semarnat, México, p. 55-68, 2008.
- SOLÍS, M., SOLÍS, A., PÉREZ, H.I., MANJARREZ, N., FLORES, M., 2012. Microbial decolouration of azo dyes: a review. *Process Biochemistry*, v. 47, n. 12, p. 1723-1748.
- TAN, L., LI, H., NING, S., XU, B., 2014. Aerobic decolorization and degradation of azo dyes by suspended growing cells and immobilized cells of a newly isolated yeast *Magnusiomyces ingens* LH-F1. *Bioresource Technology*, v. 158, p. 321-328.
- TAN, L., NING, S., ZHANG, X., SHI, S., 2013. Aerobic decolorization and degradation of azo dyes by growing cells of a newly isolated yeast *Candida tropicalis* TL-F1. *Bioresource Technology*, v. 138, p. 307-313.
- TRIPATHI, A., SRIVASTAVA, S.K., 2014. Biodegradation of orange G by a novel isolated bacterial strain *Bacillus megaterium* ITBHU01 using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 7, p. 1768-1781.
- VIJAYALAKSHMIDEVI, S.R., MUTHUKUMAR, K., 2015. Improved biodegradation of textile dye effluent by coculture. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 114, p. 23-30.
- WAGHMODE, T.R., KURADE, M.B., GOVINDWAR, S.P., 2011. Time dependent degradation of mixture of structurally different azo and non azo dyes by using *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 65, n. 3, p. 479-486.
- YANG, Q., TAO, L., YANG, M., ZHANG, H., 2008. Effects of glucose on the decolorization of Reactive Black 5 by yeast isolates. *Journal of Environmental Sciences*, v. 20, n. 1, p. 105-108.
- YANG, Q., YANG, M., PRITSCH, K., YEDILER, A., HAGN, A., SCHLOTTER, M., KETTRUP, A., 2003. Decolorization of synthetic dyes and production of manganese-dependent peroxidase by new fungal isolates. *Biotechnology Letters*, v. 25, n. 9, p. 709-713.

YANG, Q., YEDILER, A., YANG, M., KETTRUP, A., 2005. Decolorization of an azo dye, Reactive Black 5 and MnP production by yeast isolate: *Debaryomyces polymorphus*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 24, n. 3, p. 249-253.

YEMENDZHIEV, H., ALEXIEVA, Z., KRASTANOV, A., 2009. Decolorization of synthetic dye Reactive Blue 4 by mycelial culture of white-rot fungi *Trametes versicolor* 1. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 23, n. sup1, p. 230-232.

YU, Z., & WEN, X. (2005). Screening and identification of yeasts for decolorizing synthetic dyes in industrial wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 56(2), 109-114.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diferentes micro-organismos possuem capacidade de descoloração de corantes, tendo destaque a utilização de fungos devido ao aparato enzimático diversificado. As leveduras isoladas do Rio Subaé, utilizadas neste estudo, apresentaram elevado potencial de degradação do corante Alaranjado G e RBBR em condições ácidas de cultivo, baixa concentração de glicose e em temperaturas mesófilas, com exceção do isolado SD5 que apresentou termotolerância, descolorindo o corante até 45 °C.

Nos ensaios de toxicidade, utilizando *Artemia salina* como organismo teste, mesmo após o tratamento biológico, o produto da descoloração dos corantes Alaranjado G e RBBR continuou sendo tóxico, com reduzida diminuição da toxicidade após tratamento por 120 horas para alguns isolados. Em relação ao ensaio utilizando as sementes de alface, os efeitos inibitórios na germinação e no crescimento das radículas aumentaram proporcionalmente ao aumento da concentração do produto da degradação do corante mas, de um modo geral, foram menos tóxicos do que o corante não tratado. Dessa forma, pode-se afirmar que houve a biotransformação do corante e não a mineralização, ressaltando a importância de mais estudos envolvendo os possíveis intermediários formados a partir da degradação dos corantes. Entre outras alternativas, pode-se destacar estudos complementares para conhecer as enzimas envolvidas e a possível atuação em diferentes classes de corantes e o consórcio entre diferentes micro-organismos que possuam diferentes vias de degradação a fim de reduzir o máximo da toxicidade dos subprodutos.