

**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 AERÓBICA DO CORANTE ALARANJADO G POR *Candida rugosa* SJL6 ISOLADA DO RIO SUBAÉ – BAHIA

TIAGO DE ARAÚJO PINHO ALCÂNTARA

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
SETEMBRO - 2014**

DESCOLORAÇÃO AERÓBICA DO CORANTE ALARANJADO G POR *Candida rugosa* SJL6 ISOLADA DO RIO SUBAÉ – BAHIA

TIAGO DE ARAÚJO PINHO ALCÂNTARA

BIÓLOGO

UNIVERSIDADE CATÓLICA DO SALVADOR – 2010

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^a Márcia Luciana Cazetta
Co-orientação: Prof. Dr^a Norma Suely Evangelista Barreto

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

SETEMBRO – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

A347d

Alcântara, Tiago de Araújo Pinho.

Descoloração aeróbica do corante alaranjado G por *Cândida rugosa* SJL6 isolada do Rio Subaé – Bahia / Tiago de Araújo Pinho Alcântara. – Cruz das Almas, BA, 2014. 63f.; il.

Orientadora: Márcia Luciana Cazetta.

Coorientadora: Norma Suely Evangelista Barreto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1. Biodegradação – Resíduos industriais. 2. Biodegradação – Aspectos ambientais. 3. Rio Subaé – Análise. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 628.50154

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

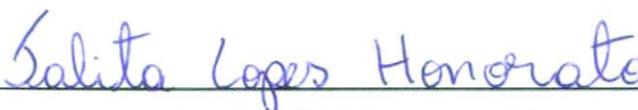
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
TIAGO DE ARAÚJO PINHO ALCÂNTARA



Prof.ª. Dr.ª Márcia Luciana Cazetta
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)
(Orientadora)



Prof. Dr. Helio Mitoshi Kamida
Universidade Estadual de Feira de Santana (UESF)



Prof.ª. Dr.ª. 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 _____.

Cruz das Almas
Setembro – 2014

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Márcia Luciana Cazetta pela orientação tranquila, paciente e pela confiança depositada no meu potencial técnico-científico, discutindo de igual para igual as problemáticas que se apresentavam em torno desse trabalho, contribuindo muito para os meus primeiros passos como um pesquisador.

À Prof. Dra. Norma Suely Evangelista Barreto por toda a atenção, durante os contatos pré-seleção de Mestrado, para definição de orientação e linha de pesquisa. Além da grande hospitalidade e, claro, de todo suporte, apoio e colaboração para elaboração dessa pesquisa.

A todos os professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela contribuição acadêmica e profissional.

A todos os estagiários do Laboratório de Bioquímica pelo companheirismo e contribuições durante a minha estadia.

À Juliana Mota pelas análises moleculares; À Diego Lopes pelos toques envolvendo ensaios com *Allium cepa* ; Ao professor, MSc. Leopoldo Barreto pelos equipamentos e dicas essenciais para os testes de toxicidade com microcrustáceo.

Aos meus familiares que sempre apoiaram minhas escolhas acadêmicas e profissionais.

À minha companheira, Verônica Martins pela companhia, amor e carinho mais do que especial durante essa jornada, além das inúmeras correções ortográficas, incentivo e apoio.

As meninas do NEPA pela receptividade, carinho, amizade e auxílio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na minha jornada, muito obrigado!

“No fim tudo dá certo, e se não deu certo é porque ainda não chegou ao fim”.

(Fernando Sabino)

RESUMO

ALCÂNTARA, T. A. P. Descoloração aeróbica do corante alaranjado G por *Candida rugosa* SJL6 isolada do Rio Subaé – Bahia

A indústria têxtil produz um enorme volume de água contaminada, cujos contaminantes mais impactantes são os corantes. Os efluentes industriais são normalmente tratados por métodos físicos e químicos, os quais nem sempre são capazes de degradar moléculas dos azo corantes. Além disso, possuem um alto custo e produzem elevadas quantidades de lodo químico. Os azo corantes representam a maioria dos corantes sintéticos produzidos, principalmente devido à facilidade e custo-benefício de sua síntese, sendo extensivamente utilizados em diversos setores da indústria. Nesse contexto, métodos biológicos de descoloração surgem como alternativas ecologicamente corretas e economicamente viáveis. Por essa razão, a busca por microrganismos com este potencial biotecnológico constitui um grande passo para o desenvolvimento de métodos alternativos de tratamento de resíduos de indústrias têxteis. Sendo assim, nesse trabalho, uma triagem foi realizada para selecionar leveduras com potencial para descoloração de azo corantes. Os isolados foram provenientes do Rio Subaé – Bahia. Uma levedura, identificada durante o trabalho como *Candida rugosa* foi utilizada para estudos de biodescoloração do azo corante Alaranjado G. Foram estudados diferentes parâmetros sobre as taxas de descoloração e crescimento celular: concentrações do corante (100 a 500 ppm), temperatura (20 °C a 40 °C), concentração de glicose (0 a 5%) e pH inicial (3 a 8). Também foram realizados bioensaios de toxicidade com *Artemia salina* para detectar a CL50 dos metabólitos formados após a descoloração e com *Allium cepa* para determinar os efeitos citotóxicos e genotóxicos do corante e dos metabólitos formados após a descoloração. Sob as melhores condições de 30°C, pH 3 e 1% de glicose, a *C. rugosa* foi capaz de remover mais de 99% da cor de 200 ppm do Alaranjado G e acima de 93% a 500 ppm. Os ensaios de toxicidade revelaram que houve aumento da toxicidade após a descoloração.

Palavras-chave: Levedura, biodegradação, azo corantes.

ABSTRACT

ALCÂNTARA, T. A. P. Aerobic decolorization of Orange G dye by *Candida rugosa* SJL6 isolated from Subaé River – Bahia

The textile industry produces a large volume of contaminated water. The most impactful contaminants are the dyes. Industrial effluents are usually treated by physical and chemical methods. These methods are not always capable of degrading molecules of the azo dyes. Moreover, they have a high cost and produce large amounts of sludge. The azo dyes are the most common synthetic dyes produced, mainly due to the ease and cost-effectiveness of its synthesis. These dyes are extensively used in various industry sectors. In this context, biological methods of decolorization appear as eco-friendly and economically viable alternatives. For this reason, the search for biotechnological potential microorganisms is a major step towards the development of alternative methods of waste treatment of textile industries. Therefore, in this work, screening was performed to select yeasts with potential for decolorization of azo dyes. The isolates are from the Subaé River - Bahia. A yeast identified in this work as *Candida rugosa* was used to study the biodecolorization of azo dye Orange G. Different parameters on the rate of decolorization and cell growth were studied: dye concentrations (100 to 500 ppm), temperature (20 ° C to 40 ° C), glucose concentration (0 to 5%) and initial pH (3 to 8). Toxicity bioassays with *Artemia salina* for detecting the LC50 of the metabolites formed after decolorization and *Allium cepa* to determine the cytotoxic and genotoxic effects of the dye and the metabolites formed after decolorization were also conducted. Under the best conditions of 30°C, pH 3, 1% glucose, *C. rugosa* was able to remove more than 99% of the color Orange of G (200 ppm) and above 93% at 500ppm. Toxicity tests revealed that there was increased toxicity after decolorization.

Keywords: Yeast, biodegradation, azo dyes

SUMÁRIO

CAPITULO I: REVISÃO DE LITERATURA

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERÊNCIAL TEÓRICO	12
2.1	Corantes	12
2.2	Problemática ambiental das industriais têxteis	14
2.3	Toxicidade dos azo corantes	16
2.4	Métodos de tratamentos de efluentes têxteis	17
2.4.1	Métodos físicos	17
2.4.2	Métodos químicos	18
2.4.3	Métodos biológicos	20
2.5	Mecanismos de biodescoloração	21
2.6	Fatores que interferem na descoloração	23
2.7	Descoloração por leveduras através da biodegradação enzimática	25
2.8	Perspectivas futuras	31
3	REFERÊNCIAS	31

CAPITULO II: BIODESCOLORAÇÃO AERÓBICA DO CORANTE TIPO AZO ALARANJADO G POR *Candida rugosa* SJL6

	Resumo	42
1	INTRODUÇÃO	42
2	MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1	Corante	44
2.2	Meio de cultura	44
2.3	Triagem das leveduras	44
2.4	Identificação molecular da levedura	45
2.5	Ensaio de descoloração	46
2.6	Método analítico	47
2.7	Ensaio de toxicidade	47
2.7.1	Toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i>	47
2.7.2	Toxicidade com <i>Allium cepa</i>	48
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1	Triagem	49

3.1 Identificação molecular.....	50
3.2 Efeito de diferentes parâmetros nas taxas de descoloração e crescimento de <i>C. rugosa</i>.....	51
3.2.1 Concentração inicial do corante	51
3.2.2 Concentração de glicose	53
3.2.3 Temperatura.....	54
3.2.4 pH.....	55
3.2.5 Ensaio de validação	56
3.3 Ensaio de Toxicidade.....	56
4 CONCLUSÕES.....	58
5 AGRADECIMENTOS.....	59
6 REFERÊNCIAS	59

CAPITULO I

REVISÃO DE LITERATURA

Capítulo formatado de acordo com as normas da ABNT NBR 14724:2011

1 INTRODUÇÃO

O número de estudos da descoloração de corantes têxteis vem crescendo nas últimas décadas (PANDEY et al., 2007; SOLÍS et al., 2012). A principal razão para isso é devido ao fato da indústria têxtil ser uma das mais poluentes, pois gera efluentes capazes de poluir os corpos hídricos, uma vez que geralmente são descartados no meio ambiente sem tratamento ou tratados de forma insuficiente (JIN et al., 2007; SOLÍS et al., 2012). Acredita-se que mais de 280.000 toneladas de corantes têxteis sejam descartadas por efluentes industriais todo ano no planeta (JIN et al., 2007).

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, além da natureza recalcitrante dos azo corantes (FARYAL e HAMEED, 2005; SAVIN e BUTNARU, 2008). Valores elevados de DBO e DQO podem aumentar o consumo de oxigênio dissolvido, provocando a mortandade de peixes, aparecimento de espuma e aumento da toxicidade (VON SPERLING, 1996). Além disso, os corantes afetam negativamente as taxas fotossintéticas impedindo a penetração da luz no corpo de água e, quando catalisados por enzimas específicas, podem gerar aminas aromáticas, que são conhecidas por sua elevada toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade (SÓLIS et al., 2012).

Os azo corantes representam 70% do total de corantes utilizados na indústria (TONY et al., 2009). O sucesso da larga utilização desses corantes está relacionado à sua fácil síntese e custo-benefício, sua estabilidade e uma grande variedade estrutural, o que permite uma variedade de cores e aplicações (CHANG et al., 2004), pois, além das industriais têxteis, esses corantes são muito utilizados nas industriais de papel, alimentos, couro, cosméticos e medicamentos (TELKE et al., 2008).

A crescente preocupação no tratamento dos efluentes têxteis tem motivado o desenvolvimento de diversas pesquisas, em diferentes áreas do conhecimento, na tentativa de encontrar metodologias mais eficazes para a remoção dos corantes (SOLÍS, 2012). Os tratamentos físicos e químicos têm sido os mais utilizados, porém, sem muito êxito já que costumam apresentar alto custo e por não serem capazes de degradar completamente as moléculas dos azo corantes, gerando uma parcela significativa de lodo químico e criando um segundo problema de poluição, a

disposição final do resíduo (ANJANEYULU et al., 2005; BAFANA et al., 2011; SARATALE et al., 2011).

Os métodos biológicos (biorremediação) são considerados ecologicamente corretos, com custo competitivo, produção de menos lodo, além de ser passível a obtenção de produtos finais de baixa toxicidade, ou mineralização dos compostos (RAI et al., 2005). Nesse contexto, a cada dia diversos microrganismos vêm sendo selecionados para o desenvolvimento de novos tratamentos.

Devido ao seu aparato enzimático, os fungos apresentam um grande potencial na descoloração de corantes do tipo azo (MARTORELL et al., 2012). Através do sistema enzimático oxidativo e ligninolítico não específico, estes microrganismos são capazes de mineralizar diferentes tipos de corantes sintéticos (YANG et al., 2005). Entretanto, alguns fatores dificultam a utilização de fungos filamentosos no tratamento de resíduos industriais, podendo citar, as rigorosas condições para produção das enzimas, o risco de contaminação bacteriana em condições não estéreis dos efluentes líquidos, o lento crescimento em relação a microrganismos unicelulares, além da produção do micélio que, muitas vezes, torna os fungos pouco adaptáveis a tratamentos de efluentes (AKSU, 2003; YU e WEN, 2005).

A utilização de leveduras apresenta diversas vantagens biotecnológicas, não somente pelo rápido crescimento, mas pelo fato de resistirem a ambientes desfavoráveis, além de possuírem aparato enzimático semelhante ao dos fungos filamentosos (MARTORELL et al., 2012). Dessa forma, esse grupo de microrganismos vem sendo muito eficientes na descoloração de azo corantes (YANG et al., 2008; LIU et al., 2011; PAJOT et al., 2011; TAN et al., 2013).

O objetivo desse trabalho foi selecionar e identificar uma levedura com potencial para descoloração de corantes do tipo azo. Estudar os efeitos de diversas variáveis sobre a descoloração e avaliar a toxicidade final do processo de degradação.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Corantes

Como descrito no histórico dos corantes, redigido pela Associação Brasileira da Indústria Química (ABIQUIM), o homem utiliza as cores há mais de 20 mil anos. O primeiro corante a ser conhecido pela humanidade foi o Negro-de-Fumo (*Carbon Black*). Por volta de 3.000 a.C., foram produzidos alguns pigmentos inorgânicos sintéticos, como o Azul Egípcio. Porém, somente em 1856, o químico William H. Perkin (1838-1929) obteve, como produto da oxidação da anilina (C_6H_7N) com o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), um precipitado de coloração avermelhada denominado de Malva e, a partir daí, iniciou-se uma corrida dos químicos para síntese de novos corantes.

Corantes têxteis são substâncias coloridas que, quando aplicadas às fibras, resultam em uma coloração permanente e resistente ao desbotamento por exposição ao suor, luz, água e outros agentes químicos e biológicos (RAI, 2005).

O *Colour Index* é um catálogo da *Society of Dyers and Colourists* que reúne todos os corantes e pigmentos listados sob nomes aceitos universalmente. Em sua edição mais recente são descritas, aproximadamente, 13.000 estruturas químicas e 37.000 nomes comerciais. Nas últimas décadas, a indústria gerou milhões de toneladas desses compostos, sendo estimado que cerca de 700 mil toneladas de corantes e pigmentos são produzidas anualmente em todo mundo. Estes corantes apresentam estruturas moleculares complexas e de difícil degradação (ZANONI e CARNEIRO, 2001).

A molécula de um corante é dividida em duas partes principais: (a) cromóforo, responsável por conferir cor ao composto através da absorção de parte da energia radiante, formados geralmente por grupos retiradores de elétrons, cujos mais importantes são: $C=C$, $-C=N-$, $-C=O$, $-N=N-$, NO_2 , $-NO$ e (b) auxocromo, responsável por intensificar a cor e aumentar a afinidade com o substrato, como os grupos amino, carboxílicos e hidroxilícos. A molécula do corante também pode conter grupos solubilizantes, responsáveis pela solubilidade, substantividade e lavabilidade, como grupos sulfônicos e aminas quartenárias (TWARDOKUS, 2004; ZILLE, 2005). Normalmente, os corantes costumam ser classificados de acordo com a maneira como se fixam à fibra, dentre eles, os reativos, ácidos, básicos, diretos, dispersivos,

azóicos, à cuba, de enxofre, pré-metalizados e branqueadores (Tabela 1) (ZANONI e CARNEIRO, 2001).

Tabela 1: Classificação dos azo corantes quanto fixação às fibras.

	Substrato	Estrutura química
Ácido	Nylon, lã, seda, poliamida sintética, tintas e couro	Azo, antraquinona, trifenilmetano, azina, xanteno, nitro e nitroso
Azóico	Algodão, rayon, poliéster	Azo
Básico	Papel, nylon modificado, poliéster e tinta	Azo, azina, xanteno, acridina, antraquinona, difenilmetano, caianina
Direto	Algodão, viscose, papel, couro e nylon	Azo, ftalocianina, estilbeno, oxazine
Disperso	Polyester, poliacrilonitrila, nylon e acetato celulose	Azo, antraquinona, estirilo, nitro
Reativo	Algodão, lã, seda e nylon	Azo, antraquinona, ftalocianina, formazano, oxazina e de base
Solvente	Plástico, gasolina, vernizes, lacas, tintas, gorduras, óleos e ceras	Azo, antraquinona, trifenilmetano e ftalocianina
Enxofre	Algodão e rayon	Estrutura indeterminada
Cuba	Algodão, rayon e lã	Antraquinona, índigo e tioindigoides

Fonte: Adaptado de Hunger (2007).

Os azo corantes constituem a classe mais importante e mais utilizada mundialmente no tingimento de fibras, representando mais de 70% de toda linha de corantes comerciais empregados para este fim (TONY et al., 2009). Isso pode ser explicado devido à sua fácil síntese e custo-benefício, sua estabilidade e sua enorme variedade estrutural que lhe confere as diferentes cores (CHANG et al., 2004). Além da indústria têxtil, os azo corantes são largamente utilizados também nas indústrias de papel, alimentos, couro, cosméticos e farmacêuticas (TELKE et al., 2008).

Corantes pertencentes ao grupo azo são caracterizados pela presença de um ou mais agrupamentos AZO (-N=N-) ligados a sistemas aromáticos (Figura 1), o que contribui para a natureza xenobiótica destes compostos, dificultando muito a degradação (CHANG et al., 2000). Com base no número de agrupamentos azo, o corante pode ser classificado como monoazo, diazo, triazo e poliazo (ROBERT et al., 2008). Os grupos azo são geralmente ligados a anéis de benzeno e naftaleno,

mas também pode ser ligado a grupos heterocíclicos aromáticos ou alifáticos (GHALY et al., 2014).

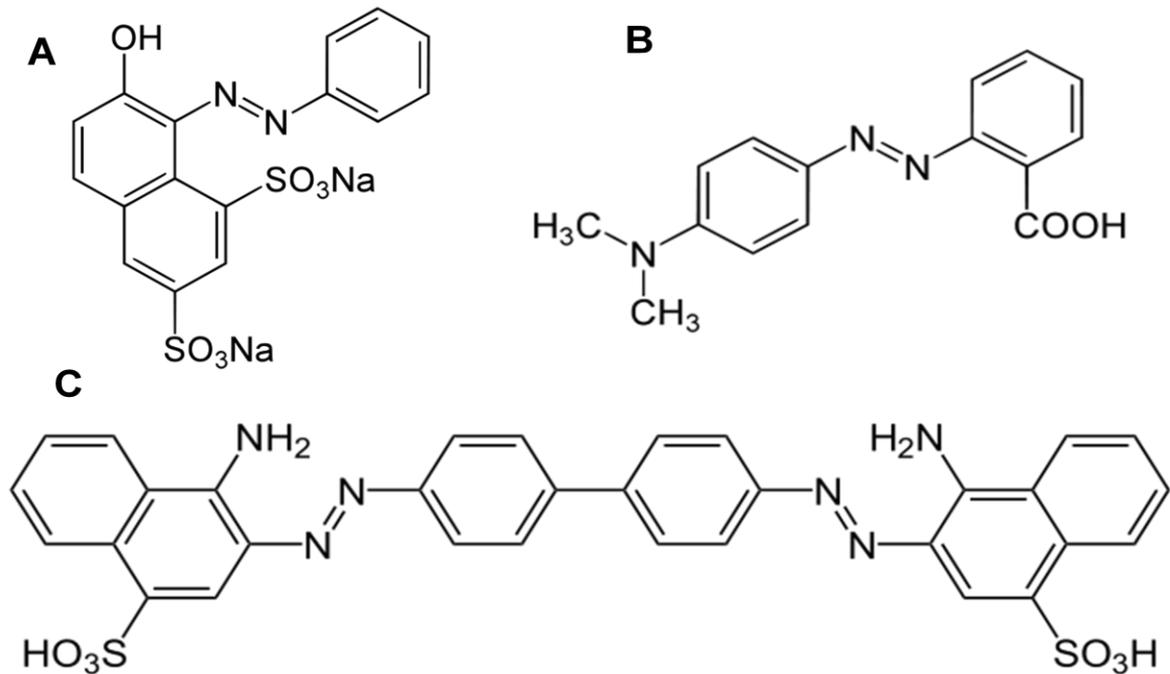


Figura 1: Estruturas moleculares de diferentes azo corantes: (A) Alaranjado G; (B) Vermelho de Metila (C) Vermelho Congo.

Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com>

2.2 Problemática ambiental das industriais têxteis

Os azo corantes, na condição de um xenobiótico, são substâncias químicas que não são naturais aos organismos vivos expostos a estes compostos, uma substância exógena, estranha ou um material antropogênico (GREN, 2012). Isso significa que os organismos não possuem um aparato enzimático específico para absorção e digestão destes compostos. Por conta disso, esses corantes representam um dos maiores problemas nos lançamentos de efluentes têxteis no ambiente, já que podem causar sérios danos ambientais. Além disso, uma grande quantidade dos corantes é perdida devido à inadequada fixação à fibra e perdas durante a retirada de excessos nas etapas finais de lavagem e acabamento (PEARCE et al., 2003)

Além da larga utilização de corantes, a indústria têxtil é considerada uma das maiores ameaças ao meio ambiente também por produzir uma grande quantidade

de gases, líquidos e resíduos sólidos (GHALY et al., 2014). Uma variedade de substâncias químicas e uma grande quantidade de água são utilizadas durante as etapas da produção. Estima-se que 200 litros de água são necessários para produzir 1 kg de produto final, sendo assim, algo em torno de 1000 – 3000 m³ de águas residuais são gerados após processamento de 12 - 20 toneladas de material têxtil por dia (MALIK, 2002; NTULI et al., 2009). Essa água residual contém uma grande quantidade de corantes e outros produtos químicos que são potencialmente prejudiciais ao meio ambiente.

Os efluentes têxteis, se não tratados de forma adequada e lançados diretamente em um corpo receptor, podem causar malefícios ao meio, prejudicando inclusive posteriores utilizações dessas águas (MOTA, 1995). A presença de corantes nos corpos hídricos podem provocar hemorragias, náuseas, ulcerações e irritações de pele e dermatites em seres humanos (TUFEKCI et al., 2007). Em determinadas condições de pH, os níveis de solubilidade de diversas substâncias podem ser alterados, influenciando na distribuição das formas livre e ionizada dos compostos químicos, definindo inclusive o potencial de toxicidade de vários elementos (LIBÂNIO, 2008).

A coloração também pode bloquear a penetração da luz solar através da superfície da água, reduzindo as taxas fotossintéticas dos organismos presentes (BAFANA et al., 2011). Von Sperling (1996) aponta que valores elevados de DBO e DQO podem causar diversos problemas nos corpos hídricos, entre eles, o consumo de oxigênio dissolvido, provocando a mortandade de peixes, aparecimento de espuma e aumento da toxicidade, além de reduzir o processo de reoxigenação, impedindo o crescimento de organismos fotoautotróficos (TUFEKCI et al., 2007).

Substâncias inorgânicas nos efluentes têxteis tornam a água imprópria para uso, devido ao excesso de sais solúveis que, mesmo em pequenas quantidades, podem ser tóxicos para os organismos aquáticos (MASUPHA, 2007). Produtos como o ácido clorídrico, hipoclorito de sódio, hidróxido de sódio, sulfureto de sódio e corantes reativos são tóxicos para a vida marinha (BLOMQVIST, 1996).

A resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) nº 357/05, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água, diretrizes ambientais para o seu enquadramento e estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes, determina que o corpo receptor não pode sofrer alterações visíveis. Entretanto, tratamentos capazes de remover a cor geralmente não degradam

completamente as moléculas dos azo corantes, produzindo substâncias com propriedades carcinogênicas e mutagênicas, como aminas aromáticas, toluidinas, benzidinas, radicais livres, entre outras (JAIN et al., 2003). Portanto, o tratamento adequado e eficaz dos efluentes da indústria têxtil continua sendo uma problemática ambiental, uma vez que os níveis de compostos descartados, bem como seu tratamento devem ser muito bem estudados e monitorados, principalmente acerca da toxicidade dos azo corantes e seus intermediários.

2.3 Toxicidade dos azo corantes

Segundo Zanoni e Carneiro (2001), apenas um pequeno número de corantes pode apresentar toxicidade aguda. Além disso, essa toxicidade, como definido pelos critérios da União Europeia para a classificação de substâncias perigosas, é muito baixa (SCOTT e MOORE, 2000). A toxicidade atribuída aos azo corantes não são em função do corante propriamente dito, mas sim pelos seus produtos da degradação. A ligação azo é a porção da molécula mais propensa à degradação por mecanismos enzimáticos de diversos microrganismos, possibilitando a liberação e aminas com elevada toxicidade aguda, crônica e carcinogenicidade (BAFANA et al., 2011).

Os seres humanos são expostos a aminas aromáticas derivadas de corantes de diversas formas. Corantes azo presentes nos produtos alimentares ou têxteis podem ser metabolizados pela microbiota intestinal ou da pele, levando à exposição às aminas tóxicas. Stingley et al. (2010) demonstraram que a maioria das bactérias da pele pode reduzir Vermelho de metila e Alaranjado II, liberando aminas aromáticas. Da mesma forma, Xu et al. (2010) demonstraram a redução de alguns corantes por bactérias do colón humano. Além disso, um estudo mostrou atividade mutagênica em água para beber, na qual foi detectada a contaminação por efluentes têxteis contendo azo corantes (ALVEZ DE LIMA et al., 2007).

Uma vez que os efluentes têxteis são descartados nos corpos de água, diversos estudos de ecotoxicidade, utilizando organismos marinhos como indicadores, vêm sendo realizados. Novotný et al. (2006) estudaram a toxicidade de azo corantes em diversos microrganismos, mostrando que o corante causou inibição da luminescência de *Vibrio fischeri* e inibição do crescimento da microalga *Selenastrum capricornutum*. Os efeitos tóxicos foram atribuídos às aminas

aromáticas produzidas pela degradação. Essas aminas se mostraram, também, muito tóxicas para organismos aquáticos como Dáfnias, peixes e moluscos (RAMOS et al., 2002).

Além disso, em trabalho usando plantas como indicadoras, Prasad e Rao (2013) observaram o efeito negativo do corante Vermelho direto 22 sobre os organismos *Vigna mungo*, *Sorghum bicolor* e *Vigna radiata*, além da redução do índice mitótico em bulbos de *Allium cepa*.

2.4 Métodos de Tratamentos de efluentes têxteis

A fixação do corante às fibras, nas indústrias, não é completa, resultando em efluente que ainda contém esses compostos (BAFANA et al., 2011). Estima-se que entre 2 a 50% dos corantes são perdidos durante o processo de tingimento (MCMULLAN et al., 2001). Esses corantes são desenvolvidos para resistirem a agentes físicos, químicos e biológicos e, portanto, são dificilmente degradados por métodos convencionais de tratamento (BAFANA et al., 2011). Em função do descarte indesejável desse efluente, diversos métodos físicos, químicos e biológicos têm sido aplicados para o tratamento antes do descarte.

2.4.1 Métodos físicos

Métodos convencionais como coagulação e floculação são utilizados como tratamentos primários em diversos tipos de efluentes industriais, principalmente por serem economicamente viáveis (BAFANA et al., 2011). Entretanto a efetividade desses métodos parece estar restrita a alguns corantes da classe disperso e enxofre, com baixa capacidade para corantes ácidos, diretos, reativos e a cuba (SARATALE et al., 2011). Além disso, a baixa eficiência na remoção da cor e o acúmulo de lodo produzido limita a aplicação das técnicas (VANDEVIVERE et al., 1998).

A adsorção é um dos métodos mais populares para tratamentos de efluentes, uma vez que possui um baixo custo, flexibilidade, simplicidade e fácil operação (BAFANA et al., 2011). Contudo, o processo de adsorção é influenciado por muitos fatores físico-químicos, como a interação entre o corante e o adsorvente, área de superfície do adsorvente, tamanho da partícula, temperatura, pH e tempo de contato

(GUPTA e SUHAS, 2009). Apesar de carbono ativado ser um adsorvente muito eficaz para vários tipos de corantes, não é frequentemente utilizado devido ao seu custo elevado (ROBINSON et al., 2001). Para tornar o processo economicamente viável, alguns pesquisadores testam materiais de baixo custo como adsorventes, a exemplo da 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 e VIRARAGHAVAN, 1997). No entanto, a aplicação prática destes adsorventes tem sido limitada por problemas associados com a regeneração ou disposição, alta produção de lodo, baixa eficácia em relação à vasta gama de corantes e alto custo (KARCHER et al., 2001; ANJANEYULU et al., 2005).

Segundo Saratale et al. (2011), métodos de filtração, como ultrafiltração, osmose reversa e nanofiltração têm sido utilizados para a reutilização de água e recuperação química. Na indústria têxtil, a utilização de membranas oferece possibilidades interessantes para a separação de corantes hidrolisados e auxiliares de tingimento, o que reduz simultaneamente a cor, DBO e DQO da água residual. Vários tipos de membranas de nanofiltração de diversos materiais como poliamida e cerâmica têm apresentado bons resultados na remoção de cor, especialmente quando aplicados depois dos passos de coagulação e floculação (MO et al., 2008; BHATTACHARYA et al. 2010). No entanto, as membranas têm algumas desvantagens significativas, como elevado investimento, incrustação e a produção de resíduos secundários que necessitam de tratamentos adicionais (ROBINSON et al., 2001; DOS SANTOS et al., 2007).

2.4.2 Métodos químicos

Métodos de oxidação química permitem a destruição ou decomposição das moléculas do corante e, para isso, utilizam agentes oxidantes, tais como o ozônio (O_3), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e permanganato (MnO_4). A modificação da composição química de um composto, ou um grupo de compostos, acontece na presença desses agentes oxidantes e, assim, as moléculas de corante se tornam suscetíveis à degradação (METCALF et al., 2003). Entretanto, essas técnicas geralmente não são economicamente viáveis e, quando os corantes são removidos, o acúmulo de lodo pode criar um problema de poluição secundário. Outra

possibilidade de poluição secundária irá surgir por causa da utilização de produtos químicos em excesso, além do alto consumo de energia elétrica (SARATALE et al., 2011).

O ozônio é um agente oxidante muito bom devido ao seu elevado potencial de oxidação em comparação com cloro e H_2O_2 e, além disso, possui elevada reatividade com diversos azo corantes (ALATON et al., 2002). No entanto, o tempo de vida curto, a ineficácia contra corantes dispersos e os insolúveis em água, a baixa capacidade de remoção de DQO, bem como o elevado custo do ozônio, limita a aplicação prática desta técnica (ANJANEYULU et al., 2005).

O método utilizando hipoclorito de sódio funciona atacando o agrupamento amino dos corantes, além de iniciar e acelerar a clivagem da ligação azo. A cloração de efluentes com a utilização de cloro ativo ou por adição de hipoclorito foi demonstrado por vários pesquisadores (OLIVEIRA et al. 2007). No entanto, o uso de cloro para remoção de corante é cada vez menos frequente, devido aos impactos negativos nos corpos hídricos após o despejo e a liberação de aminas aromáticas cancerígenas (BAFANA et al., 2011).

O método de reação de Fenton utiliza-se do reagente de Fenton (H_2O_2 -Fe(II)). É relativamente barato e também tem alta remoção de DQO, além de ser eficiente na descoloração de corantes solúveis e insolúveis, mas a geração de lodo associado com essa metodologia também limita a sua utilização (ROBINSON et al., 2001).

O método de tratamento fotoquímico utiliza radiação ultravioleta (UV) para ativar produtos químicos, tais como H_2O_2 , resultando na produção de radicais hidroxilas que degradam as moléculas de corante em CO_2 e H_2O . O processo de H_2O_2 /UV é a tecnologia POA (Processo de Oxidação Avançada) mais eficaz, principalmente devido à remoção de cor elevada (até 95%), ausência de formação de lodo e remoção de DQO em um curto espaço de tempo (ALATON et al., 2002). Entretanto, é menos eficaz para efluentes altamente coloridos, com corantes dispersos e a cuba, além de conduzir à formação de subprodutos indesejáveis, enquanto o uso ineficiente de luz UV aumenta o custo do processo (PEARCE et al., 2003). Observando o crescimento do número de pesquisas na área, muitos desses problemas podem ser resolvidos com o tempo.

A oxidação eletroquímica é uma técnica relativamente nova com pouco ou nenhum consumo de produtos químicos e de acumulação de lodo. Porém, o custo

elevado da energia elétrica necessária também pode limitar utilização deste processo (MORAWSKI et al., 2001).

2.4.3 Métodos biológicos

Embora muitos dos métodos citados anteriormente tenham potencial para descoloração, eles envolvem procedimentos complicados ou não economicamente viáveis (ZHANG et al., 2004). Dessa forma, entram em cena os tratamentos biológicos ou biorremediação, que se trata de uma área de investigação fundamental nas ciências ambientais, na qual microrganismos mais adaptados aos resíduos desenvolvem-se naturalmente, transformando produtos químicos tóxicos em formas menos danosas (SARATALE et al., 2011). O tratamento biológico se torna uma alternativa mais econômica e tem atraído grande interesse devido à eficiência, versatilidade, custos de operação e por ser considerado um método ecologicamente correto, produzindo menos lodo, evitando poluição secundária (VERMA et al., 2003; MOOSVI et al., 2005; BAFANA et al., 2011) e consumindo menos água quando comparado a métodos físico-químicos (BANAT et al., 1996; RAI et al., 2005).

Conseqüentemente, uma grande diversidade de espécies tem sido testada para a descoloração e mineralização de vários corantes atualmente (KURADE et al., 2012; MARTORELL et al., 2012; QU et al., 2012; TAN et al., 2014). Muitos microrganismos, pertencentes aos mais diversos grupos taxonômicos, tem sido relatados por suas habilidades para descolorir corantes sintéticos (CHANG et al., 2001; GAO et al., 2006; RAMYA et al., 2008), incluindo bactérias, fungos filamentosos, leveduras e microalgas (SARATALE et al., 2011).

Alguns azo corantes presentes nos corpos de água apresentam alta toxicidade para a vida aquática, mas não reduzem significativamente o crescimento de algas (ACUNER e DILEK, 2004) que podem ser encontradas crescendo em efluentes industriais (DUBEY et al., 2011). Portanto, as microalgas se tornam uma opção para a biorremediação de efluentes têxteis, uma vez que esses organismos não precisam de fontes de carbono adicional. Em contraste com as bactérias e os fungos, que dependem de tais fontes, algas produzem energia a partir da luz solar e obtém o carbono do ar atmosférico, tornando o cultivo mais barato (SAHA et al., 2010). Entretanto, a maior taxa de descoloração registrada por microalgas foi apenas 82% do corante Vermelho metil (20 ppm) (EL-SHEEKH et al., 2009).

Segundo Solís et al (2012), um dos organismos mais aplicados a biorremediação de efluentes têxteis são bactérias, em função da facilidade de cultivo, rápido crescimento e capacidade de sobreviver em condições extremas de salinidade e temperatura. Corantes azo são geralmente resistentes ao ataque de bactérias em condições aeróbias (KODAM et al., 2005; OLA et al., 2010), porque a presença de oxigênio normalmente inibe a atividade de redução da ligação azo (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 e LEU, 2008).

Diversos estudos têm demonstrado um potencial de descoloração de azo corante por fungos da podridão branca (MARTORELL et al., 2012). Esses organismos foram capazes de mineralizar diferentes tipos de corantes sintéticos através do sistema enzimático oxidativo e do ligninolítico não específico, incluindo lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase (Lac). Fungos filamentosos comumente utilizados são *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* e *Coriolus versicolor* (YANG et al., 2005). Entretanto, alguns fatores dificultam a utilização de fungos no tratamento de resíduos industriais, entre eles, as rigorosas condições para produção da enzima, o risco de contaminação bacteriana nas condições não estéreis dos efluentes líquidos, o lento crescimento em relação a microrganismos unicelulares, além da produção do micélio que muitas vezes torna os fungos pouco adaptáveis a tratamentos de efluentes (AKSU, 2003; YU e WEN, 2005). Dessa forma o uso de leveduras apresenta diversas vantagens biotecnológicas, não somente pelo rápido crescimento, mas pelo fato dessas, assim como os fungos ligninolíticos, serem capazes de resistirem a ambientes desfavoráveis (MARTORELL et al., 2012). Além disso, leveduras são encontradas de forma abundante e diversificada no lodo resultante de tratamento de efluentes (YANG et al., 2011), sendo por isso, muito eficientes no tratamento de efluentes com elevado teor orgânico (YANG et al., 2008).

2.5 Mecanismos de biodescoloração

A descoloração de azo corantes, geralmente, ocorre através de três mecanismos: biossorção, bioacumulação e biodegradação (DAS e CHARUMATHI, 2012). Biossorção é um mecanismo de adsorção no qual a superfície adsorvente é

um material biológico. No caso de leveduras, e outros microrganismos em geral, bioadsorção é definida como a ligação de solutos à biomassa, viva ou morta, através de um processo que não envolve energia metabólica ou transporte (TOBIN et al., 1994). A capacidade de bioadsorção de um microrganismo é atribuída a componentes da parede celular, que contem diferentes grupos funcionais, como amina, carboxila, hidroxila, fosfatos e outros grupos carregados, capazes de causar uma forte atração entre o corante e a parede da célula (VITOR e CORSO, 2008).

Alguns métodos de pré-tratamento podem modificar a capacidade de adsorção pela biomassa, como a autoclavagem (LIM et al., 2010). Altas temperaturas causam ruptura na parede celular aumentando a superfície de contato com o corante e, desta forma, células mortas têm vantagens como biosorventes em comparação a células vivas, uma vez que não precisam de nutrientes e podem ser guardadas e utilizadas por períodos extensos (FU e VIRARAGHAVAN, 2001). Os parâmetros que influenciam na bioadsorção são as condições de pH, temperatura, tempo de contato, concentração do corante e do adsorvente, estrutura do corante e tipos de microrganismos (ALTAF et al., 2010; AMBRÓSIO et al., 2012).

Segundo Das e Charumathi (2012), no processo de bioacumulação, existe um passo inicial de rápida acumulação do composto através da ligação a superfície da biomassa, independente do metabolismo microbiano. Esse passo é seguido de um segundo processo dependente do metabolismo, capaz de realizar um acúmulo intracelular de uma grande quantidade de poluentes em comparação ao primeiro passo.

O processo de biodegradação, ou degradação enzimática é geralmente considerado como um fenômeno de transformação de compostos orgânicos por microrganismos. A biodegradação fornece fonte de carbono e energia para o crescimento microbiano e assume um papel fundamental na reciclagem de materiais no ecossistema natural. Os poluentes podem ser degradados em moléculas mais simples e não tóxicas (mineralização) ou degradados parcialmente (biotransformação) (DAS e CHARUMATHI, 2012).

Em condições de anaerobiose, a degradação de corantes azo ocorre primeiramente com a clivagem da ligação azo, com o auxílio de uma azorreductase anaeróbica e da transferência de elétrons através de um mediador redox, que funciona como um transportador de elétrons entre o corante extracelular e a reductase intracelular (MCMULLAN et al., 2001; CHACKO e SUBRAMANIAM, 2011).

Existem evidências indicando que a atividade da azoredutase está associada a diferentes tipos de genes, o que indica a possível atividade de mais de uma redutase, dependendo do microrganismo e das condições de cultura (RAMALHO et al., 2002). Com isto, várias enzimas azoredutases têm sido identificadas e estão presentes em microrganismos como bactérias, algas e leveduras. Por outro lado, a degradação oxidativa de azo corantes é catalisada por enzimas como lacase, lipase, manganês peroxidase, diclorofenol-indofenol redutase (NADH-DCIP), tirosinase (Tyr), azo redutase e aminopirina N-dimetilase (JADHAV et al., 2007; MAJEAU et al., 2010; MARTORELL et al., 2012).

2.6 Fatores que interferem na descoloração

Fontes de carbono e nitrogênio possuem uma grande importância na descoloração por microrganismos. As diferentes características metabólicas microbianas evidenciam diferenças na absorção de fontes de carbono, afetando a descoloração dos corantes. Apesar de existirem relatos de leveduras que conseguem utilizar o corante como única fonte de carbono e/ou nitrogênio (JADHAV e GOVINDWAR, 2006; MARTORELL et al., 2012), o processo de degradação do corante é altamente associado ao crescimento celular e seu metabolismo primário (LUCAS et al., 2006; YANG et al., 2008; MARTORELL et al., 2012). Além disso, os azo corantes são deficientes em carbono, portanto a biodegradação sem uma fonte alternativa de energia é muito difícil (ASGHER et al., 2008; TONY et al., 2009). Portanto, de modo geral, células de leveduras não crescem sem glicose ou qualquer outra fonte de carbono facilmente metabolizável (SOLIS et al., 2012), uma vez que são importantes fontes de energia para o crescimento e manutenção dos microrganismos, além de doadores de elétrons, necessários para a quebra da ligação azo (YEMENDZHIEV et al., 2009).

Em diversos trabalhos foi observado que a presença de glicose é essencial a biodescoloração. A frutose também se apresentou como uma potencial fonte de carbono (MOOSVI et al., 2007), além do amido, que apresenta uma importância na indústria têxtil, pois é muito utilizado no processo de finalização e, portanto, pode estar disponível para os microrganismos nos tanques de tratamentos de efluentes (BABU et al., 2007). Outras fontes também foram testadas, como sacarose e maltose (JIN et al., 2007; PONRAJ et al., 2011), bem como algumas fontes mais

econômicas tais como melaço e bagaço de cana (GONEN e AKSU et al., 2009; DAS et al., 2011).

Tratando-se da fonte de carbono, é de fundamental importância considerar a quantidade utilizada, uma vez que esta tem de ser suficiente para o crescimento microbiano e a descoloração. Porém, concentrações elevadas de carbono podem reduzir a descoloração, visto que os microrganismos utilizam preferencialmente as fontes facilmente disponíveis no lugar do corante (KUMAR et al., 2009). Além disso, a concentração deve ser baixa o suficiente para limitar o crescimento da biomassa e permitir a degradação, a partir da atividade metabólica, sem ampliar o processo de bioadsorção (KHOUNI et al., 2012).

Fontes de nitrogênio também possuem importância para a biodescoloração. Diferentes fontes de nitrogênio testadas foram responsáveis por aumentos consideráveis na descoloração de diversos corantes por diversos microrganismos. Entre essas fontes destacam-se extrato de levedura, peptona, extrato de carne e casca de arroz (MOOSVI et al., 2007).

O estudo da concentração do corante é um fator essencial na descoloração de azo corantes, já que possibilita saber o intervalo de concentração que cada microrganismo consegue descolorir. Na literatura podem ser encontrados trabalhos com diversos corantes com suas concentrações variando entre 10 a 5000 ppm (KALYANI et al., 2009; CHARUMATHI e NILANJANA, 2010; LIU et al., 2011; WAGHMODE et al., 2011). Diversos autores relataram que o aumento da concentração reduz gradualmente a taxa de descoloração (YU e WEN, 2005; QU et al., 2012; TAN et al., 2013), provavelmente em função da toxicidade dos corante e/ou dos metabólitos resultantes da biodescoloração (WANG et al., 2009).

O efeito da temperatura na descoloração não possui um padrão, varia de acordo com características inerentes ao microrganismo e/ou as enzimas envolvidas no processo. Por exemplo, para leveduras, a maioria dos resultados obtidos concentram temperaturas na faixa entre 25 °C e 28 °C como melhores temperaturas (ERTUGRUL et al., 2008; CHARUMATHI e NILANJANA, 2010; GRASSI et al., 2011; LIU et al., 2011). Para fungos filamentosos, a maioria das temperaturas ótimas se concentra entre 25 °C e 35 °C (GRASSI et al., 2011; CANO et al., 2012; TAPIA-TUSSEL et al., 2013;), enquanto que para bactérias as melhores temperaturas relatadas estão entre 30 °C e 37 °C (AYED et al., 2011; KURADE et al., 2011; MAHMOOD et al., 2011; OGUGBUE et al., 2012).

Da mesma forma, a influência do pH está associada a características específicas de cada grupo de microrganismo. De maneira geral, fungos filamentosos e leveduras realizam a descoloração em pH ácido, enquanto bactérias atuam na faixa de pH neutro e alcalino (JADHAV et al., 2008; EVANGELISTA-BARRETO et al., 2009; Liu et al., 2011; AYED et al., 2011; SEN, et al., 2012).

2.7 Descoloração por leveduras através da biodegradação enzimática

Como já discutido, as leveduras apresentam diversas vantagens biotecnológicas em relação aos fungos filamentosos, além de tratar-se de um grupo pouco estudado, em comparação às bactérias.

Os mecanismos de descoloração por leveduras envolvem adsorção, degradação enzimática ou a combinação de ambos (SOLIS et al., 2012). As leveduras do grupo dos Ascomycetos são capazes de descolorir corantes reativos por biodegradação, redução da ligação azo, biossorção ou degradação catalítica por enzimas ligninolíticas (MEEHAN et al., 2000; YU e WEN, 2005; LUCAS et al., 2006; YANG et al., 2008). Entretanto, existem muito menos relatos envolvendo leveduras dos grupos dos Basidiomicetos na descoloração (MARTORELL et al., 2012).

O processo de biossorção gera um acúmulo de biomassa e formação de lodo que, posteriormente, necessitaria de um destino final, provocando um segundo problema de poluição. Por isso, a bioprospecção e o estudo da descoloração por leveduras, focados na degradação enzimática, vem crescendo nos últimos anos (Tabela 2).

Tabela 2. Descoloração de azo corantes por leveduras através do processo de biodegradação

Espécie	Condições e enzimas	Corante, concentração %descoloração	Referência
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	Aerobiose; pH 5-7, Glicose 0,5%, 24h; MnP	Preto reativo 5 (200 ppm), 98%	Yang et al., 2005
<i>Pseudozyma rugulosa</i>	Aerobiose; pH 5-6 28°C, Glicose 2% 24h	Vermelho brilhante Reativo K-2BP (200 ppm), 99%	Yu e Wen, 2005

<i>Candida krusei</i>	Aerobiose; pH 5-6 28°C, Glicose 2% 24h	Vermelho brilhante Reativo K-2BP (200 ppm), 99%	Yu e Wen, 2005
<i>Candida oleophila</i>	Aerobiose; 26°C, Glicose 0,5%; Lac, MnP	Preto reativo 5 (200 ppm), 100%	Lucas et al., 2006
<i>Candida oleophila</i> / Fenton	Aerobiose combinado com processo avançado de oxidação, 24h	Preto reativo 5 (500 ppm), 91%	Lucas et al., 2007
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Anaerobiose; pH 6, 30°C, 16 min; LiP, NADH-DCIP redutase, Tyr, azoredutase	Vermelho de metila (100 ppm), 100%	Jadhav et al., 2007
<i>Galactomyces geotrichum</i>	Aerobiose; pH 3, 30°C, 1h; Lac, Lip, NADH-DCIP redutase	Vermelho de metila (100 ppm), 100%	Jadhav et al., 2008
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	Aerobiose; 28°C, Glicose 1%, 24h; MnP	Preto Reativo 5 (200 ppm), 100%	Yang et al., 2008
<i>Candida tropicalis</i>	Aerobiose; 28°C, Glicose 1%, 24h; MnP	Preto Reativo 5 (200 ppm), 100%	Yang et al., 2008
<i>Candida rugopelliculosa</i>	Anaerobiose; pH 4-5, 28°C, Glicose 0,5%, 48h	Azul reativo 13 (50 ppm), 90%	Liu et al., 2011
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Aerobiose; 25°C, Glicose 2%, 36h	Azul RR-BB (200 ppm), 97%; Vermelho 7B-HE (200 ppm), 99%	Pajot et al., 2011
<i>Trichosporon akiyoshidainum</i>	Aerobiose; 25°C, Glicose 2%, 36h	Azul RR-BB (200 ppm), 91%; Vermelho 7B-HE (200 ppm), 95%	Pajot et al., 2011
<i>Galactomyces geotrichum</i>	Aerobiose; pH 7, 30°C, 24h, Glicose 0,5%; NADH-DCIP redutase, Lac	Mistura de vários corantes (70 ppm), 88%	Waghmode et al., 2011
<i>Candida rugosa</i>	Aerobiose; 48h - 144h	Vermelho reativo 198; 141 (100 ppm), 100%	Do Nascimento et al., 2012
<i>Galactomyces geotrichum</i>	Anaerobiose, Consórcio com <i>Brevibacillus laterosporus</i> ; pH 9, 40°C, 18h; VaC, Lac, NADH-DCIP redutase	Escalate RR, (50 ppm) 98%	Kurade et al., 2012
<i>Williopsis californica</i>	Aerobiose; 25°C, Glicose 2%, 72h; MnP, Tyr	Preto B-V (200 ppm), 86%	Martorell et al., 2012
<i>Williopsis saturnus</i>	Aerobiose; 25°C, Glicose 2%, 72h; MnP, Tyr	Amarelo 4R-HE (200 ppm), 90%;	Martorell et al., 2012

		Preto B-V (200 ppm), 91%	
<i>Candida sp.</i>	Aerobiose; 25°C, Glicose 2%, 72h; MnP, Tyr	Preto B-V (200 ppm), 96%	Martorell et al., 2012
<i>Trichosporon porosum</i>	Aerobiose; 25°C, Glicose 2%, 72h; MnP, Tyr	Preto B-V (200 ppm), 95%; Vermelho 7B-HE, 91%	Martorell et al., 2012
<i>Pichia sp</i>	Aerobiose; 30°C, Glicose 1%, 10h	Vermelho Acido B (100 ppm), 90%	Qu et al., 2012
<i>Issatchenkia orientalis</i>	Aerobiose; pH 7, 32°C; Glicose 1%, 18h	Preto reativo 5, 200 ppm) 98%	Jafari et al., 2014
<i>Candida tropicalis</i>	Aerobiose; pH 4-6, 35°C, Glicose 0,4-1%, 24h	Acido brilhante scarlet GR (100 ppm), 100%	Tan et al., 2013
<i>Magnusiomyces ingens</i>	Aerobiose; Células imobilizadas, pH 5-7, 30°C, Glicose 0,4%, 7h	Vermelho Acido B (300 ppm), 100%	Tan et al., 2014

Como pode ser observado, grande parte das leveduras realiza a descoloração por meio da degradação enzimática, na presença de oxigênio, demonstrando que o oxigênio é importante para completa descoloração.

. A agitação aumenta a transferência de massa e oxigênio entre as células e o meio de cultura e, além disso, a atividade enzimática pode depender da presença do oxigênio se o mecanismo for aeróbio (RAMALHO et al., 2004; SOLÍS et al., 2012).

Em uma triagem realizada por Yu e Wen (2005), 44 leveduras de uma coleção de microrganismos foram testadas para a capacidade de descoloração de azo corantes. Dois novos isolados, *Pseudozyma rugulosa* Y-48 e *Candida krusei* G-1 foram selecionados. Ambos puderam remover mais de 99% da cor do corante Vermelho brilhante reativo K-2BP (200 ppm) após 24 horas.

A levedura *Candida rugosa*, isolada de uma amostra de sedimento de uma área não impactada no semiárido do Nordeste brasileiro, foi capaz de descolorir 100% do corante Vermelho reativo 198 (100 ppm) após 48 horas e 100% do Vermelho reativo 141 (100 ppm) após 144 horas. Os resultados mostram que microrganismos isolados de áreas não impactadas também podem ter potencial para descoloração de azo corante (DO NASCIMENTO et al., 2012).

Pajot et al. (2011) realizaram um trabalho cujo objetivo foi revelar a habilidade de descoloração de isolados de leveduras provenientes de locais não poluídos e isolados de efluente têxtil. Foi observada a descoloração de 97,6% do corante Azul RR-BB e 99,87% do Vermelho 7B-HE pela *Pichia kudriavzevii* e 91,4 e 95,3% dos mesmos corantes para *Trichosporon akiyoshidainum*. Essas taxas de descoloração foram obtidas após 36 horas de experimento, sob agitação, na temperatura de 25 °C, sendo isoladas leveduras com potencial para descoloração de ambos os ambientes. Reforçando que, embora seja esperado que microrganismos isolados de locais impactados por corantes devam ser mais adaptados, nada impede que leveduras isoladas de locais não impactados apresente potencial superior, uma vez que as enzimas não possuem especificidade para o corante.

Em uma triagem de leveduras, isoladas da mesma região que o trabalho citado anteriormente, uma floresta úmida localizada na Argentina, Martorell et al. (2012) selecionaram isolados capazes de realizar a descoloração de quatro azo corantes em meio sólido, porém, focando em microrganismos capazes de utilizar o corante como única fonte de carbono e nitrogênio, sugerindo uma nova forma de bioprospecção. Nos ensaios realizados em meio líquido, agora com a presença de glicose, quatro isolados se destacaram pela capacidade de descoloração acima de 90%. Após 72 horas de experimento na temperatura de 25 °C, *Williopsis californica* MM 4018 removeu mais de 96% da cor do Preto k B-V, *W. saturnus* MM 4034 foi responsável pela remoção de 90% do Amarelo 4R-HE e 91,5% do Preto B-V. A *Candida sp.* MM 4035 descoloriu 96% do Preto B-V, enquanto que o *Trichosporon porosum* MM 4037 descoloriu mais de 95% do Preto B-V e mais de 91% do Vermelho 7B-HE. As atividades das enzimas MnP e Tyr foram observadas para todas as leveduras descolorindo o Preto B-V.

A degradação do corante é bastante associada com o processo de crescimento da levedura e do seu metabolismo primário (LUCAS et al., 2006; YANG et al., 2008; MARTORELL et al., 2012). Embora Pajot et al. (2011) e Martorell et al. (2012) tenham proposto que leveduras oligotróficas com alto potencial de descoloração podem crescer em meio contendo apenas o corante como fonte de carbono e energia, de modo geral, as leveduras não crescem sem uma fonte de carbono que seja facilmente metabolizada (SOLIS et al., 2012).

O papel da glicose na descoloração do azo corante Preto reativo 5 (200 pm) pelas leveduras *Debaryomyces polymorphus* e *Candida tropicalis* foi estudado por

Yang et al. (2008). Os resultados indicaram que a degradação estava altamente associada com o crescimento celular e a presença de glicose no meio de cultura. A remoção da cor saltou, respectivamente, de 76,4% e 92,7% após 60 horas, para 100% entre 18 e 24 horas após o aumento da glicose de 0,5% para 1%.

A concentração ótima de glicose entre 0,5% a 1% é relatada por diversos autores. Por exemplo, uma levedura identificada como *Pichia sp.* TCL, isolada de sedimento marinho, descoloriu mais de 90% do Vermelho ácido B (100 ppm) após 10 horas em condições de aerobiose quando a concentração de glicose utilizada foi de 1% (QU et al., 2012).

Jafari et al. (2014) isolaram uma levedura de lodo ativado capaz de descolorir mais de 98% do azo Preto reativo 5 (200 ppm). As melhores condições para descoloração foram com 1% de glicose e a 32°C. O isolado foi identificado como *Issatchenkia orientalis* JKS2. O mesmo isolado foi capaz de remover entre 95% e 99% da cor de outros azo corantes.

Tan et al. (2013) observaram a descoloração do corante Ácido Escarlate Brilhante GR (100 ppm) pela levedura *Candida tropicalis* TL-F1 após 24 horas. As taxas ótimas para a descoloração ocorreram em condições de agitação, entre 0,4 a 1% de glicose, na temperatura de 35 °C com pH entre 4 e 6.

A concentração do corante utilizada na maioria dos trabalhos variou entre 20 e 200 ppm, uma vez que essas são concentrações de corante normalmente encontradas em efluentes têxteis. Entretanto, diversas leveduras são capazes de tolerar concentrações ainda maiores.

A *Candida rugopelliculosa* HLX-2 removeu 90% da cor do azo corante Azul reativo 13 (50 ppm) após 48 horas. A eficiência ótima foi obtida sob agitação em pH 5,0 na temperatura de 28 °C. A taxa de descoloração ficou em torno de 80% quando a concentração do corante foi aumentada para 2000 ppm (LIU et al., 2011).

Buscando um melhor entendimento sobre as vias metabólicas de descoloração dos azo corantes, e otimização de processos, muitos trabalhos concentram seus estudos na identificação das enzimas envolvidas no processo. Dentro desse contexto, Yang et al. (2005) observaram a correlação entre a presença do corante Preto reativo 5 (200 ppm) e a produção da enzima MnP pela *Debaryomyces polymorphus* isolada de uma planta de tratamento de efluente. O isolado descoloriu completamente o corante após 24 horas de cultivo com a adição

de 0,5% de glicose e pH entre 5 e 7, sendo observada uma boa correlação entre a degradação do corante e a produção da enzima.

A atividade da MnP também foi observada por Lucas et al. (2006), durante o estudo da descoloração do corante Preto reativo 5 (200 ppm) por *Candida oleophila*. Os autores observaram que a descoloração ocorreu durante a fase de crescimento e a atividade de Lac também foi observada.

Além das já citadas, outras enzimas como LiP, NADH-DCIP redutase e azoredutases são frequentemente detectadas em trabalhos de descoloração. Jadhav et al. (2007) observaram essas enzimas na descoloração do Vermelho de metila por *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. No ano seguinte, o mesmo autor detectou as mesmas enzimas na descoloração por *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360, o qual removeu mais de 88% da cor de uma mistura de diversos corantes azo e não azo (WAGHMODE et al., 2011).

A descoloração por leveduras pode ser realizada com células livres e também imobilizadas. Células imobilizadas de *Magnusiomyces ingens* LH-F1, isolada de sedimento marinho, puderam descolorir o Vermelho Ácido GR (50 – 300 ppm) entre 4 e 7 horas. Enquanto células livres precisaram de um tempo entre 10 e 44 horas. As melhores condições para descoloração, observadas em ambos os estudos, foram com agitação, na concentração de 0,4% de glicose, a 30 °C e pH entre 5 e 7 (TAN et al., 2014).

É possível notar que, na maioria dos trabalhos, condições ácidas e temperatura variando entre 25 °C – 30 °C são as melhores condições para a descoloração por leveduras. Isso pode ser associado às condições ótimas para produção das enzimas envolvidas e/ou do crescimento celular.

O uso de técnicas físico-químicas e biológicas podem ser conjugadas com o uso de leveduras para descoloração de azo corantes. Sendo assim, em outro trabalho realizado por Kurade et al. (2012), um consórcio formado pela bactéria *Brevibacillus laterosporus* MTCC 229 e pela levedura *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360 foi responsável pela remoção de 98% da cor do corante Escarlata RR (50 ppm) após 18 horas em condições estáticas, a 40 °C com pH 9.0. As possíveis enzimas envolvidas no processo foram a Veratil álcool oxidase (Vac), Lac, Tyr e NADH-DCIP redutase. Os autores obtiveram a completa mineralização do corante em menor tempo quando comparado às culturas individuais.

Combinando um método avançado de oxidação (Reagente de Fenton) seguido do processo aeróbico mediado pela *C. oleophila*, Lucas et al. (2007) observaram que a descoloração do corante Preto reativo 5 foi mais efetiva, uma vez que os métodos separadamente descoloriram o corante na concentração de 200 ppm, enquanto os métodos conjugados foram capazes de remover mais de 91% da cor do corante na concentração de 500 ppm.

2.8 Perspectivas futuras

Como pode ser observado, o desafio de desenvolver tecnologias eficazes e aplicáveis para o tratamento de efluentes têxteis persiste até os dias atuais. As leis estão se tornando mais rígidas e as indústrias precisam, de algum modo, se adequar às novas legislações. O excesso do uso de água é um problema que já tem sido minimizado por diversas indústrias atualmente, incluindo as têxteis. Entretanto, a utilização e descarte dos azo corantes continuam sendo um grande problema ambiental. Portanto, novas metodologias precisam ser desenvolvidas para tratar do problema.

Isolamento de novos microrganismos e enzimas para fins de biorremediação, bem como o uso de consórcios microbianos podem ser conjugados com métodos físico-químicos ou processos avançados de oxidação para reduzir problemas secundários de poluição. Além disso, conhecer os mecanismos biológicos e químicos envolvidos no processo de biodescoloração fornecem dados para o desenvolvimento de azo corantes que sejam mais suscetíveis aos tratamentos dos efluentes.

3 REFERÊNCIAS

ABIQUIM. **Associação Brasileira da Indústria Química**. Corantes e pigmentos. 2012. Disponível em: <http://www.abiquim.org.br/canais.asp?id=15>. Acesso em: 18/01/2013

ACUNER, E.; DILEK, F. B. Treatment of tectilon yellow 2G by *Chlorella vulgaris*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 5, p. 623-631, 2004.

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.

ALATON, I. A.; BALCIOGLU, I.A.; BAHNEMANN, D.W. Advanced oxidation of a reactive dyebath effluent: comparison of O₃, H₂O₂/UV-C and TiO₂/UV-A processes. **Water Research**, v. 36, n. 5, p. 1143-1154, 2002.

ALTAF, A. et al. Different techniques recently used for the treatment of textile dyeing effluents: a review. **Journal of Chemical Society of Pakistan**, v. 32, n. 1, p. 115 – 124, 2010.

ALVES DE LIMA, R. O. et al. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 626, n. 1, p. 53-60, 2007.

AMBRÓSIO, S. T. et al. A biosorption isotherm model for the removal of reactive azo dyes by inactivated mycelia of *Cunninghamella elegans* UCP542. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 452-462, 2012.

ANJANEYULU, Y.; CHARY, N. Sreedhara; RAJ, D. Samuel Suman. Decolourization of industrial effluents—available methods and emerging technologies—a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 245-273, 2005.

ASGHER, M. et. al. Optimization of medium for decolorization of Solar golden yellow R direct textile dye by *Schizophyllum commune* IBL-06. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 61, n. 2, p. 189-193, 2008.

AYED, L. et al. Decolorization and degradation of azo dye Methyl Red by an isolated *Sphingomonas paucimobilis*: Biototoxicity and metabolites characterization. **Desalination**, v. 274, n. 1, p. 272-277, 2011.

BABU, R. et al. Textile technology cotton textile processing waste generation and effluent treatment. **Journal of Cotton Science**, v. 11, p. 141-153, 2007.

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

BANAT, I. M. et al. Microbial decolorization of textile- dye-containing effluents: a review. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 217, 1996.

BHATTACHARYA, P. et al. Crossflow microfiltration using ceramic membrane for treatment of sulphur black effluent from garment processing industry. **Desalination**, v. 261, n. 1, p. 67-72, 2010.

BLOMQUIST, A. **Food and fashion: Water management and collective action among irrigation farmers and textile industrialists in South India**. Linköping University Electronic Press,, 1996.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente, CONAMA. **Resolução CONAMA Nº 357**, de 18 de março de 2005. Diário Oficial da União, n.53, p.58-63, 2005.

CANO, M. et al. Decoloración de CD2 (café directo 2) por enzimas intracelulares y extracelulares de *Trametes versicolor*. **Interciencia**, v. 37, n. 4, p. 294-298, 2012.

CHACKO, J. T. et al. Enzymatic degradation of azo dyes-A review.**International Journal of Environmental Sciences**, v. 1, n. 6, p. 1250-1260, 2011.

CHANG, J. S.; CHEN, B.; 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.

CHANG, J. S. et al. Azo dye decolorization with a mutant *Escherichia coli* strain. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 9, p. 807-812, 2000.

CHANG, J. S. et al. Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. **Water Research**, v. 35, n. 12, p. 2841-2850, 2001.

CHARUMATHI, D.; DAS, N. Bioaccumulation of synthetic dyes by *Candida tropicalis* growing in sugarcane bagasse extract medium. **Advances in Biological Research**, v. 4, p. 233 – 240, 2010.

DAS, D.; CHARUMATHI, D.; DAS, N. Bioaccumulation of the synthetic dye Basic Violet 3 and heavy metals in single and binary systems by *Candida tropicalis* grown in a sugarcane bagasse extract medium: Modelling optimal conditions using response surface methodology (RSM) and inhibition kinetics. **Journal of hazardous materials**, v. 186, n. 2, p. 1541-1552, 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.

DOS SANTOS, A. B.; CERVANTES, F. J.; VAN LIER, J. B. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2369-2385, 2007.

DUBEY, S. K. et al. Studies on Cyanobacterial biodiversity in paper mill and pharmaceutical industrial effluents. **British Biotechnol J**, 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.

ERTUĞRUL, S.; BAKIR, M.; DÖNMEZ, G. Treatment of dye-rich wastewater by an immobilized thermophilic cyanobacterial strain: *Phormidium* sp. **ecological engineering**, v. 32, n. 3, p. 244-248, 2008.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S. et al. Cometabolic decolorization of the reactive azo dye orange II by *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986. **Textile Research Journal**, v. 79, n. 14, p. 1266-1273, 2009.

FARYAL, R. A. N. I.; HAMEED, A.. Isolation and characterization of various fungal strains from textile effluent for their use in bioremediation. **Pakistan Journal of Botany**, v. 37, n. 4, p. 1003, 2005.

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

GAO, D. W.; WEN, X. H.; QIAN, Y. Decolourization of reactive brilliant red K-2BP by White rot fungus under sterile-non-sterile conditions. **Journal of Environmental Science**, v. 18, n. 3 p. 428 – 432, 2006.

GHALY, A. E. et al. Production, Characterization and Treatment of Textile Effluents: A Critical Review. **Journal of Chemical Engineering & Process Technology**, v. 5, p. 182, 2014.

GÖNEN, F; AKSU, Z. Predictive expressions of growth and Remazol Turquoise Blue-G reactive dye bioaccumulation properties of *Candida utilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 1, p. 15-21, 2009.

GRASSI, E. et al. Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 4, p. 635-643, 2011.

GREN, I. Microbial transformation of xenobiotics. **Chemick**, v. 66, n. 8, p. 835-842, 2012.

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

HUNGER, K.(Ed.). **Industrial dyes: chemistry, properties, applications**. John Wiley & Sons, 2007.

JADHAV, J. P. et al. Decolourization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. **Chemosphere**, v. 68, n. 2, p. 394-400, 2007.

JADHAV, J. P.; GOVINDWAR, S. P. Biotransformation of malachite green by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. **Yeast**, v. 23, n. 4, p. 315-323, 2006.

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

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

JAIN, R.; BHARGAVA, M.; SHARMA, N.. Electrochemical studies on a pharmaceutical azo dye: Tartrazine. **Industrial & engineering chemistry research**, v. 42, n. 2, p. 243-247, 2003.

JIN, X. C. et al. Decolorization of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 1, p. 239-243, 2007.

KALYANI, D. C. et al. Ecofriendly biodegradation and detoxification of Reactive Red 2 textile dye by newly isolated *Pseudomonas* sp. UK1. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, n. 2-3, p. 735 – 742, 2009.

KARCHER, S.; KORNMÜLLER, A.; JEKEL, M.. Screening of commercial sorbents for the removal of reactive dyes. **Dyes and pigments**, v. 51, n. 2, p. 111-125, 2001.

KHOUNI, I.; MARROT, B.; AMAR, R.. 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.

KODAM, K. M. et al. Microbial decolorization of reactive azo dyes under aerobic conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 367-370, 2005.

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.

KURADE, M. B.; WAGHMODE, T. R.; GOVINDWAR, S. P. Preferential biodegradation of structurally dissimilar dyes from a mixture by *Brevibacillus laterosporus*. **Journal of hazardous materials**, v. 192, n. 3, p. 1746-1755, 2011.

KURADE, M. B. et al. Decolorization of textile industry effluent containing disperse dye Scarlet RR by a newly developed bacterial-yeast consortium BL-GG. **Chemical Engineering Journal**, v. 184, p. 33-41, 2012.

LIBÂNIO, M. **Fundamentos de qualidade e tratamento da água**. 2. ed. Campinas: Átomo, 2008. p. 11-70.

LIM, S.; CHU, W.; PHANG, S. Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. **Bioresource technology**, v. 101, n. 19, p. 7314-7322, 2010.

LIN, Y.; LEU, J. 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.

- LIU, X. et al. Biochemical degradation pathway of reactive blue 13 by *Candida rugopelliculosa* HXL-2. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 135-141, 2011.
- LUCAS, M. S. et al. 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.
- LUCAS, M.S. et al. Degradation of a textile reactive Azo dye by a combined chemical–biological process: Fenton's reagent-yeast. **Water research**, v. 41, n. 5, p. 1103-1109, 2007.
- MAHMOOD, S. et al. Isolation and screening of azo dye decolorizing bacterial isolates from dye-contaminated textile wastewater. **Soil and Environment**, v. 30, n. 1, p. 7-12, 2011.
- MAJEAU, J.A. BRAR, S. K.; TYAGI, R. D.. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2331-2350, 2010.
- 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.
- MARTORELL, M. M.; PAJOT, H. F.; DE FIGUEROA, L. I. C. 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.
- MASUPHA, M. M. **Water Management at a Textile Industry: A Case Study in Lesotho**. University of Pretoria, 188p, 2007.
- MCMULLAN, G. et al. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 1-2, p. 81-87, 2001.
- MEEHAN, C. et al. Decolorization of Remazol Black-B using a thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3. **Environment international**, v. 26, n. 1, p. 75-79, 2000.
- METCALF, L.; EDDY, H.; TCHOBANOGLIOUS, G. **Wastewater engineering: treatment, disposal, and reuse**. McGraw-Hill, 2003.
- MO, J. H. et al. Treatment of dye aqueous solutions using nanofiltration polyamide composite membranes for the dye wastewater reuse. **Dyes and Pigments**, v. 76, n. 2, p. 429-434, 2008.
- MOOSVI, S.; KEHARIA, H.; MADAMWAR, D.. Decolourization of textile dye Reactive Violet 5 by a newly isolated bacterial consortium RVM 11.1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 667-672, 2005.
- 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.

MORAWSKI, B.; QUAN, S.; ARNOLD, F. H. Functional expression and stabilization of horseradish peroxidase by directed evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 76, n. 2, p. 99-107, 2001.

MOTA, S. **Preservação e conservação de recursos hídricos**. 2ª edição Rio de Janeiro: ABES, 200p., 1995.

NOVOTNÝ, C. et al. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo-and anthraquinone dyes. **Chemosphere**, v. 63, n. 9, p. 1436-1442, 2006.

NTULI, F. et al. Characterization of effluent from textile wet finishing operations. **Proceedings of the World Congress on Engineering and Computer Science**, v. 1, 2009.

OGUGBUE, C. J.; SAWIDIS, T.; ORANUSI, N. A. Bioremoval of chemically different synthetic dyes by *Aeromonas hydrophila* in simulated wastewater containing dyeing auxiliaries. **Annals of microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1141-1153, 2012.

OLA, I. O. et al. Aerobic decolourization of two reactive azo dyes under varying carbon and nitrogen source by *Bacillus cereus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 5, 2010.

OLIVEIRA, F. H. et al. Electrochemical oxidation of an acid dye by active chlorine generated using Ti/Sn (1- x) Ir x O₂ electrodes. **Journal of applied electrochemistry**, v. 37, n. 5, p. 583-592, 2007.

OOI, T. et al. 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.

PAJOT, H. F. et al. Unraveling the decolourizing 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.

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

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.

PONRAJ, M.; JAMUNARANI, P.; ZAMBARE, V. Isolation and optimization of culture conditions for decolorization of true blue using dye decolorizing fungi. **Asian Journal of experimental biological sciences**, v. 2, n. 2, p. 270-76, 2011.

PRASAD, A. A. S.; RAO, B. K. V. 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, 2013.

QU, Y. et al. Aerobic decolorization and degradation of Acid Red B by a newly isolated *Pichia* sp. TCL. **Journal of hazardous materials**, v. 223, p. 31-38, 2012.

RAI, H. S. et al. 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.

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. et al. 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.

RAMALHO, P. A. et al. Characterization of azo reduction activity in a novel ascomycete yeast strain. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2279-2288, 2004.

RAMOS, E. U.; VAAL, M. A.; HERMENS, J. L. M. Interspecies sensitivity in the aquatic toxicity of aromatic amines. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 11, n. 3, p. 149-158, 2002.

RAMYA, M.; ANUSHA, B.; KALAVATHY, S. Decolorization and biodegradation of Indigo carmine by a textile soil isolate *Paenibacillus larvae*. **Biodegradation**, v. 19, n. 2, p. 283-291, 2008.

ROBERT, L.; JOSEPH, F.; ALEXANDER, A. **Fisher's Contact Dermatitis in: Textiles and Shoes**. BC Decker Inc, Ontario, p. 339-401, 2008.

ROBINSON, T. et al. 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. et al. 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.

SARATALE, R. G. et al. 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. et al. Ecofriendly degradation of sulfonated diazo dye CI Reactive Green 19A using *Micrococcus glutamicus* NCIM-2168. **Bioresource technology**, v. 100, n. 17, p. 3897-3905, 2009.

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

SCOTT, B.; MOORE, L. **Assessment of the risks to human health posed by azo colorants in toys, writing inks and paper products, and analysis of the**

advantages and drawbacks of restrictions on their marketing and use: final report. European Union. European Commission, LGC Limited, Teddington, 200p., 2000.

SEN, K.; PAKSHIRAJAN, K.; SANTRA, S. B. Modelling the biomass growth and enzyme secretion by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in presence of a toxic pollutant. **Journal of Environmental Protection**, v. 3, n. 1, p. 114-119, 2012.

SOLÍS, M. et al. Microbial decolouration of azo dyes: a review. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1723-1748, 2012.

STINGLEY, R. L. et al. Metabolism of azo dyes by human skin microbiota. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. 1, p. 108-114, 2010.

TAN, L. et al. 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, 2013.

TAN, L. et al. 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, 2014.

TAPIA-TUSSELL, R. et al. New laccase-producing fungi isolates with biotechnological potential in dye decolorization. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 50, p. 10134-10142, 2013.

TELKE, A. et al. Kinetics and mechanism of TELKE, Amar et al. 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, 2008.

TOBIN, J. M.; WHITE, C.; GADD, G. M. Metal accumulation by fungi: applications in environmental biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 126-130, 1994.

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

TUFEKCI, N.; SIVRI, N.; TOROZ, I. Pollutants of textile industry wastewater and assessment of its discharge limits by water quality standards. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 7, n. 2, p. 97-103, 2007.

TWARDOKUS, R. G. **Reuso de água no processo de tingimento da indústria têxtil.** 2004. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina.

VANDEVIVERE, P.; BIANCHI, R.; VERSTRAETE, W. Review: Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: Review of emerging technologies. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 72, n. 4, p. 289-302, 1998.

VERMA, P.; MADAMVAR, D. Decolourisation of synthetic dyes by a newly isolated strain of *Serratia marcescens*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 6 p. 615 – 618, 2003.

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.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Editora UFMG, 1996.

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.

WANG, H. et al. Biological decolorization of the reactive dyes Reactive Black 5 by a novel isolated bacterial strain *Enterobacter* sp. EC3. **Journal of Hazardous Materials**, v. 171, n. 1, p. 654-659, 2009.

XU, H. et al. Sudan azo dyes and Para Red degradation by prevalent bacteria of the human gastrointestinal tract. **Anaerobe**, v. 16, n. 2, p. 114-119, 2010.

YANG, Q. et al. 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. et al. 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.

YANG, Q. et al. Wastewater treatment systems harbor specific and diverse yeast communities. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58, p. 168-176, 2011.

YEMENDZHIEV, H.; ALEXIEVA, Z.; KRASTANOV, A. Decolorization of synthetic dye Reactive Blue 4 by mycelial culture of white-rot fungi *Trametes versicolor*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, n. 3, p. 1337, 2009.

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.

ZANONI, M. V. B.; CARNEIRO, P. A. O descarte dos corantes têxteis. **Ciência Hoje**, v. 29, n. 174, p. 61-64, 2001

ZHANG, F. et al. Effects of dye additives on the ozonation process and oxidation by-products: a comparative study using hydrolyzed CI Reactive Red 120. **Dyes and pigments**, v. 60, n. 1, p. 1-7, 2004..

ZILLE, A. et al. Degradation of azo dyes by *Trametes villosa* laccase over long periods of oxidative conditions. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6711-6718, 2005.

CAPITULO II

BIODESCOLORAÇÃO AERÓBICA DO CORANTE TIPO AZO ALARANJADO G POR *Candida rugosa* SJL6

Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista International
Biodeterioration & Biodegradation

BIODESCOLORAÇÃO AERÓBICA DO CORANTE TIPO AZO ALARANJADO G POR *Candida rugosa* SJL6

RESUMO

Uma levedura com alto potencial para descoloração de corantes do tipo azo foi isolada de amostras de água de um rio poluído. O isolado, designado como SJL6, foi identificado como *Candida rugosa* com base no sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior (26S) do rRNA. Estudos de biodescoloração foram realizados utilizando corante Alaranjado G como modelo. Foram estudados, pela primeira vez para essa espécie, diferentes parâmetros sobre as taxas de descoloração e crescimento celular: concentrações do corante (100 a 500 ppm), temperatura (20 °C a 40 °C), concentração de glicose (0 a 5%) e pH inicial (3 a 8). Também foram realizados bioensaios de toxicidade com *Artemia salina* para detectar a CL₅₀ dos metabólitos formados após a descoloração e com *Allium cepa* para determinar os efeitos citotóxicos e genotóxicos do corante e dos metabólitos formados após a descoloração. Sob as melhores condições de 30 °C, pH 3 e 1% de glicose, *C. rugosa* foi capaz de remover mais de 99% da cor de 200 ppm do Alaranjado G e acima de 93% a 500ppm. Os ensaios de toxicidade revelaram que houve aumento da toxicidade após a descoloração.

Palavras-Chave: Descoloração, leveduras, azo corantes,

1. INTRODUÇÃO

O número de estudos da biodescoloração de corantes têxteis vem crescendo nos últimos anos (Pandey et al., 2007; Solís et al., 2012). A principal razão para isso é o fato da indústria têxtil ser uma das mais poluentes, pois gera efluentes capazes de poluir os corpos hídricos, uma vez que geralmente são descartados no meio ambiente sem tratamento ou tratados de forma insuficiente (Jin et al., 2007; Solís et al., 2012). Estima-se que mais de 280.000 toneladas de corantes têxteis são descartadas como efluentes industriais todo ano no planeta (Jin et al., 2007).

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, além da natureza recalcitrante dos azo corantes (Faryal e Hameed, 2005; Savin e Butnaru, 2008). Valores elevados de DBO e DQO podem causar o consumo de oxigênio dissolvido, provocando a mortandade de peixes e outros organismos aquáticos (Von Sperling, 1996). Além disso, alguns corantes quando metabolizados por enzimas

específicas podem gerar aminas aromáticas, que são conhecidas por sua elevada toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade (Sólis et al., 2012).

Os azo corantes representam 70% do total de corantes utilizados na indústria (Tony et al., 2009). O sucesso da larga utilização desses corantes está relacionado à sua fácil síntese e custo-benefício, sua estabilidade e uma grande variedade estrutural, o que permite uma variedade de cores (Chang et al., 2004) e aplicações, pois, além das indústrias têxteis, esses corantes são muito utilizados nas indústrias de papel, alimentos, couro, cosméticos e medicamentos (Telke et al., 2008).

A crescente preocupação com o tratamento de efluente têxtil tem motivado o desenvolvimento de diversas pesquisas, em diferentes áreas do conhecimento, na tentativa de encontrar metodologias mais eficazes para remoção dos corantes (Solís, 2012). Os tratamentos físicos e químicos têm sido os mais utilizados, porém sem muito êxito já que costumam apresentar altos custos e por não serem capazes de degradar completamente as moléculas dos azo corantes, gerando uma parcela significativa de lodo químico, criando um segundo problema de poluição, a disposição final dos resíduos (Anjaneyulu et al., 2005; Bafana et al., 2011; Saratale et al., 2011).

O uso da biorremediação tem sido considerado ecologicamente correto, com custo competitivo, produção de menos lodo, além de ser passível a obtenção de produtos finais de baixa toxicidade, ou total mineralização dos compostos (Rai et al., 2005). Nesse contexto, a cada dia diversos microrganismos vêm sendo selecionados para o desenvolvimento de novos tratamentos.

Devido ao seu aparato enzimático, os fungos apresentam um grande potencial na descoloração dos corantes do tipo azo (Martorell et al., 2012). Através do sistema enzimático oxidativo e ligninolítico não específico, estes microrganismos são capazes de mineralizar diferentes tipos de corantes sintéticos (Yang et al., 2005). Entretanto, alguns fatores dificultam a utilização dos fungos filamentosos no tratamento de resíduos industriais, podendo citar, as rigorosas condições para produção da enzima, o risco de contaminação bacteriana em condições não estéreis dos efluentes líquidos, o lento crescimento em relação aos microrganismos unicelulares, além da produção do micélio que muitas vezes torna os fungos pouco adaptáveis a tratamentos de efluentes (Aksu, 2003; Yu e Wen, 2005).

A utilização de leveduras apresenta diversas vantagens biotecnológicas, não somente pelo rápido crescimento, mas pelo fato de resistirem a ambientes

desfavoráveis (Martorell et al., 2012). Sendo assim, as leveduras vêm sendo muito eficientes na descoloração de azo corantes (Yang et al., 2008; Liu et al., 2011; Pajot et al., 2011; Tan et al., 2013).

Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi selecionar e identificar uma levedura com potencial para descoloração de corantes do tipo azo, estudando os efeitos de diversas variáveis sobre a descoloração, bem como avaliar a toxicidade final do processo de degradação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Corante

O azo corante utilizado como modelo neste estudo foi o Alaranjado G (C.I. Name: Acid Orange 10) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Uma solução estoque foi preparada pela dissolução do pó do corante em água destilada, com a concentração final de 10000 ppm e posteriormente esterilizado por filtração a vácuo (Filtro Millipore, 0.22 µm, Millipore Corp., Bedford, USA).

2.2. Meio de cultura

Para o teste de descoloração, foi utilizado o Meio normal de descoloração modificado (MND), composto por Extrato de levedura (0.25%), KH_2PO_4 (0.5%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.05%), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.013%), glicose (2%) (Ramalho et al., 2004). Após esterilização do meio em autoclave a 121°C por 20 minutos, uma alíquota do corante Alaranjado G previamente filtrada foi adicionada ao meio até as concentrações finais a serem testadas (100, 200, 300, 400 e 500 ppm). O pH foi ajustado para 5.0 com ácido ortofosfórico.

2.3. Triagem das leveduras

Foram estudadas 84 leveduras do acervo de microrganismos do Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Brasil. As leveduras são de origem ambiental, isoladas de água e moluscos bivalves do Rio Subaé.

A triagem para a capacidade de descoloração em meio sólido foi realizada em placas de Petri contendo 20 mL de Agar-MND modificado (Ramalho et al., 2004) e a concentração final do corante de 100 ppm. As placas foram inoculadas a partir de uma solução celular padronizada ($DO_{550} = 0.8$) de culturas ativadas em Agar-MND e incubadas a 25 °C por 24 h.

Após o período de incubação, as placas foram avaliadas quanto à produção de halos de descoloração e a coloração da colônia. A coloração da colônia foi avaliada por inspeção visual e expressa por Unidade Arbitrária de Coloração da Colônia (UACC). O valor da UACC variou entre 0 (sem manchas) a 2 (colônias muito coloridas) (Pajot et al., 2011). Os halos de descoloração foram avaliados pela transparência e facilidade de visualização e expressos por Unidade Arbitrária de Transparência dos Halos (UATH). O UATH variou entre 0 (Sem halo visível) a 2 (Halo altamente visível). Isolados com baixo valor de UACC e alto valor de UATH foram selecionados e submetidos ao ensaio de descoloração em meio líquido.

Os ensaios de descoloração em meio líquido foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultura e concentração final do corante de 100 ppm. Uma suspensão celular de 5 mL ($DO_{550} = 0.8$), preparada a partir de uma cultura de 24 h foi utilizada para a inoculação. Os frascos foram incubados a 25 °C com agitação de 150 rpm e sem agitação por 24 h. Os ensaios foram realizados em triplicata e como controles abiótico e biótico foram utilizados o mesmo meio sem levedura e sem corante, respectivamente. Após incubação, foram retiradas alíquotas de 2 mL de cada frasco e centrifugadas a 5000 rpm por 10 min. O sobrenadante obtido foi utilizado para análise da taxa de descoloração. A levedura com maior taxa de descoloração foi selecionada.

2.4. Identificação molecular da levedura

A extração do DNA foi realizada de acordo com as metodologias de Sampaio et al. (2001) e Almeida (2005). A caracterização molecular foi realizada a partir do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior (26S) do rRNA utilizando os *primers* NL1 (5'- GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG - 3') e NL4 (5'- GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (O'Donnell, 1993). Para ambas as ampliações, foram utilizados os seguintes reagentes e concentrações: 10 ng DNA, 1x de tampão da enzima Taq DNA polimerase, 3,7 mM de $MgCl_2$, 0,6 pmol/ μL de dNTPs, 0,4

pmol/ μ L de cada primer, 5 U de Taq DNA polimerase, com volume final ajustado para 50 μ L com água ultra pura estéril. Foram incluídos nos experimentos 10 ng de DNA de *Saccharomyces cerevisiae*, como controle positivo. As amplificações foram feitas em termociclador Peqstar 96 Universal Gradient (Peqlab, Baviera, ALE) programado para uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 min., seguido de 28 ciclos de três etapas: desnaturação (94 °C, 30 seg), anelamento (58 °C, 1 min), e extensão (72 °C, 2 min); e uma extensão final a 72 °C por 5 min. Após a amplificação, as amostras foram submetidas a reações de sequenciamento. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 0,8%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV. Os fragmentos obtidos foram purificados com o Kit GFX PCR (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) e em seguida, os amplicons foram sequenciados pelo sequenciador automático ABI 310 (Applied Biosystem, Foster City, USA) do laboratório de Genética molecular da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e uma segunda corrida de sequenciamento foi realizada usando o sequenciador ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster city, USA) da empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda (Rio grande do sul, BR). As sequências obtidas foram comparadas com aquelas incluídas no banco de dados GenBank, usando o Básico Local Alignment Search Tool (BLAST em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.5. Ensaio de descoloração

Os ensaios de descoloração foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio MND com o Alaranjado G. As condições fixadas foram concentração final do corante de 200 ppm, pH 5.0, glicose 2% e incubação a 25 °C. Uma suspensão celular de 5 mL ($DO_{550} = 0.8$), preparada a partir de uma cultura em MND de 24 h foi utilizada para inocular os frascos. Os frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm por 24 h. Foram estudados os efeitos de diferentes variáveis na descoloração e crescimento do microrganismo, incluindo a concentração inicial do corante (100, 200, 300, 400 e 500 ppm do Alaranjado G), concentração de glicose (0% a 5%), pH (3 a 8) e temperatura (20, 25, 30, 35 e 40 °C). Após incubação, foram retiradas alíquotas de 2 mL de cada frasco e centrifugadas a 5000 rpm por 10 min. O sobrenadante obtido foi utilizado para análise da taxa de descoloração. Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.6. Método analítico

A taxa de descoloração foi monitorada por espectrofotometria e avaliada pela diminuição da absorvância, sendo expressa pela fórmula:

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

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

A faixa do comprimento de onda foi fixada pela absorção máxima do corante na região do visível, a 476nm.

Para determinação da biomassa, o *pellet* residual da centrifugação foi lavado em água destilada e centrifugado novamente e, após diluição, realizada leitura a 550 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.7. Ensaio de toxicidade

2.7.1. Toxicidade aguda com *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade aguda foi realizado com náuplios de *Artemia salina*, de acordo com método descrito por Matthews et al. (1995) com algumas adaptações. Para eclosão, foi adicionado 1g de cisto de *A. salina* em um Béquer de 1 L contendo 500 mL de água artificial do mar com densidade de 30 ppt. Os cistos foram mantidos em movimento constante por meio de uma bomba de ar imersa no béquer por 24 h a temperatura ambiente. Após este período, 10 náuplios do microcrustáceo foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de água do mar artificial e diferentes concentrações (2.08, 4.2, 8.3, 16.6, 25, 33, 50, 75%) do corante e do sobrenadante após etapa de descoloração. Os ensaios foram mantidos em temperatura ambiente por 24 h. O controle negativo continha somente água artificial do mar. Todos os testes foram realizados em triplicata. A leitura foi realizada pela contagem do número de Artemias vivas em cada tubo de ensaio. O cálculo da CL₅₀ foi determinada usando o programa Trimmed Spearman-Kärber (An, 2006).

2.7.2. Toxicidade com *Allium cepa*

O teste utilizando bulbos de cebola (*Allium cepa*) foi realizado segundo descrição de Fiskesjö (1985), com algumas adaptações. Bulbos de *A. cepa* de aproximadamente 2 cm, com catafilos externos brancos, mesmas origens, não germinados foram adquiridos da feira local de Cruz das Almas, Bahia, Brasil. Antes do teste, os catafilos externos secos foram removidos sem danificar o meristema radicular e lavados em água corrente. Em seguida, os bulbos foram colocados em água destilada para proteger as células primordiais da desidratação e mantidas no escuro por 48 h. A água destilada foi trocada diariamente. Após os 3 dias, os bulbos com melhor crescimento radicular (1,5 – 2,0 cm) foram selecionados.

Foram utilizados 5 bulbos para cada tratamento do experimento. Os bulbos foram colocados em tubos de ensaio de 20 mL com as raízes em contato com o sobrenadante do ensaio de descoloração. Uma solução do corante sem o processo de descoloração também foi testada. No controle negativo foi utilizado água destilada. Após 24 h de exposição, as raízes foram retiradas e mantidas em solução fixadora de Carnoy durante 24 h e posteriormente armazenadas em etanol (70%) sob refrigeração até o momento do preparo das lâminas.

Para o preparo das lâminas, as raízes foram retiradas do etanol, lavadas e hidrolisadas em HCl 1 M a 60 °C por 8 min. Posteriormente, em uma lâmina, foi adicionada uma gota de ácido acético (45%) e a coifa da raiz removida, sendo posteriormente coberta com uma lamínula e esmagada. O conjunto lâmina-lamínula foi congelado por 5 minutos a -80°C, a lamínula foi retirada e o material corado com Giemsa (10%) por 2 min. A lâmina foi levada ao microscópio óptico para observação no aumento de 400x. Um total de 5000 células por tratamento foram analisadas. Os seguintes parâmetros foram observados: (a) índice mitótico (IM) (1000 células por bulbo); (b) aberrações cromossômicas (AC's) no ciclo mitótico (1000 células por bulbo); e (c) presença de micronúcleos (MN) (1000 células por bulbo). Os dados foram analisados no programa Assistat versão 7.7, por meio da análise de variância (ANOVA) do teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Triagem

Nos ensaios de descoloração em meio sólido, foi observado a formação de halos incolores em 25 dos 84 isolados analisados. 8 isolados foram selecionadas seguindo os critérios de baixo valor de UACC e alto valor de UATH.

Na busca por leveduras com alta capacidade de biodegradação e baixo potencial de bioadsorção, alguns autores relacionam o tamanho do halo de descoloração com a baixa coloração das colônias para nortear a seleção dos microrganismos (Pajot et al., 2007; Martorell et al., 2012). No presente trabalho, não foi observada diferença significativa entre os tamanhos dos halos formados, sendo levada em consideração a transparência dos mesmos. A diferença observada nos diferentes isolados sugere que este critério pode ser considerado na seleção de leveduras na descoloração de azo corantes em meio sólido, embora essas observações não forneçam informações acerca das taxas de descoloração.

Para melhor avaliar as taxas de descoloração das 8 leveduras pré-selecionadas, foram realizados ensaios em meio líquido. Desses isolados, 7 apresentaram um alto potencial para descolorir o Alaranjado G em condições de agitação. Os isolados codificados como SD5, SJU4, SA4, OJU1, SD8, SJL6, SD4 obtiveram taxas de descoloração variando entre 94,3% e 98,2%, não havendo descoloração nos ensaios realizados sem agitação (Tabela 1). A levedura com maior taxa de descoloração em 24 h (SJL6) foi selecionada para os testes posteriores.

Tabela 1. Descoloração do Alaranjado G (100 ppm) em meio líquido por isolados pré-selecionados após 24 horas nas condições de: 25 °C, pH 5, 150 rpm.

Isolado	Descoloração (150 rpm)	Descoloração sem agitação
SJL6	98,25%	0,00%
SA4	97,96%	0,00%
OJU1	98,09%	0,00%
SF4	65,04%	0,00%
SD4	94,35%	0,00%
SD5	98,07%	0,00%
SD8	97,76%	0,00%
SJU4	97,53%	0,00%

3.1. Identificação molecular

Um total de 7 isolados foram submetidos ao sequenciamento parcial da região D1/D2 do RNA ribossomal. Na Tabela 2 estão apresentadas as espécies que obtiveram entre 99 e 100% de identidade com a sequência obtida através do sequenciamento.

Tabela 2. Identificação das leveduras com potencial para descoloração de corantes do tipo azo

Isolado	Amplicon (bp) *	Cobertura Alinhamento (%)	Identidade nucleotídeos (%)	Taxon	Número acesso
SD5	592	97	100	<i>Pichia kudriavzevii</i>	KJ469959.1
SJU4	591	98	99	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	JQ686918.1
SA4	507	97	100	<i>Pichia kudriavzevii</i>	KJ469959.1
SD8	588	97	100	<i>Issatchenkia orientalis</i>	JN032661.1/ JQ419897.1
SJL6	616	96	99	<i>Candida cylindracea</i>	EU011644.1
SD4	590	99	100	<i>Cryptococcus laurentii</i>	GU369970.1/ FJ743631.1
OJU1	589	97	100	<i>Pichia kudriavzevii</i>	KJ469959.1

* Todos os fragmentos amplificados foram sequenciados em ambas as direções (*forward e reverse*); o fragmento apresentado corresponde à sequência mais longa entre os dois.

O sequenciamento do domínio D1/D2 dos isolados SD5, SA4, OJU1 e SD8 mostraram 100% de identidade com *Pichia kudriavzevii* QK-1 e *Issatchenkia orientalis* F701. Ambos os nomes são sinônimos e, portanto, tratam-se da mesma espécie de levedura, antes conhecida como *Candida krusei* (Castellani, 1910).

Há relatos de *Issatchenkia orientalis* isolada de lodo ativado descolorindo diversos azo corantes, ou seja, até 98% de descoloração do corante Preto reativo 5 (5000 ppm) após 36 h, e 95 a 99% dos corantes Alaranjado reativo 16, Vermelho reativo 198, Azul direto 71, Amarelo direto 12 e Preto direto 22 (Jafari et al., 2014). Pajot et al. (2011) também relataram a descoloração de até 97% de Vilmafix® Azul RR-BB e 99% de Vilmafix® Vermelho 7B-HE para esta espécie. Adicionalmente, *I. orientalis* (*C. krusei* G-1) foi responsável pela descoloração de até 99% do corante Vermelho brilhante reativo K-2BP (200 ppm) (Yu e Wen, 2005).

O sequenciamento do domínio D1/D2 do isolado SJU4 apresentou 99% de identidade para *Torulaspota delbrueckii* PT-13. Não há relatos de descoloração de azo corantes por essa levedura. Entretanto, sabe-se que *T. delbrueckii* pode produzir a enzima manganês peroxidase, lipases e protease, sugerindo um grande potencial para a degradação de macromoléculas e compostos aromáticos (Yang et al., 2013)

O sequenciamento do domínio D1/D2 do isolado SD4 apresentou 100% de identidade com *Cryptococcus laurentii* Jmudeb008. Dias et al. (2010) relataram a descoloração de azo corantes por essa levedura sem discutir maiores detalhes sobre o processo de degradação.

O isolado com melhor potencial para descoloração, e estudado com mais detalhes, foi o SJL6. Esse isolado apresentou 99% de identidade com as sequencias do domínio D1/D2 de *Candida cylindracea* NRRL Y-17506. Também chamada de *Candida rugosa*, é uma levedura bem conhecida na produção de lipase. Embora não existam muitos relatos de sua utilização na descoloração de azo corantes, esta levedura apresenta elevada capacidade de descoloração de outros corantes. *C. rugosa* INCQS 71011 isolada de amostras de sedimento de água cristalina foi capaz de descolorir 100% do azo corante Vermelho reativo 198 (100 ppm) em 48 h, 100% do corante Vermelho reativo 141 após o período de 144 h e 76% do Azul reativo 214 após 168 h (do Nascimento et al., 2013).

3.2. Efeito de diferentes parâmetros nas taxas de descoloração e crescimento de *C. rugosa*

3.2.1. Concentração inicial do corante

As taxas de descoloração e crescimento microbiano estão representadas na Figura 1A. Foi possível observar que *C. rugosa* foi capaz de remover mais de 98% da cor após 24 h nas concentrações de 100 ppm e 200 ppm de Alaranjado G. Embora o aumento da concentração inicial do corante, a partir de 300 ppm, tenha diminuído a taxa de descoloração, a levedura ainda foi capaz de promover a descoloração do corante em 93% até 500 ppm. A diminuição na taxa de descoloração na concentração do corante de 500 ppm sugere ação tóxica do corante e/ou dos metabólitos intermediários após a clivagem do grupo cromóforo

(Wang et al., 2009). A redução da biomassa conforme o aumento da concentração do corante é muito discreta, portanto a *C. rugosa* é capaz de tolerar as concentrações estudadas.

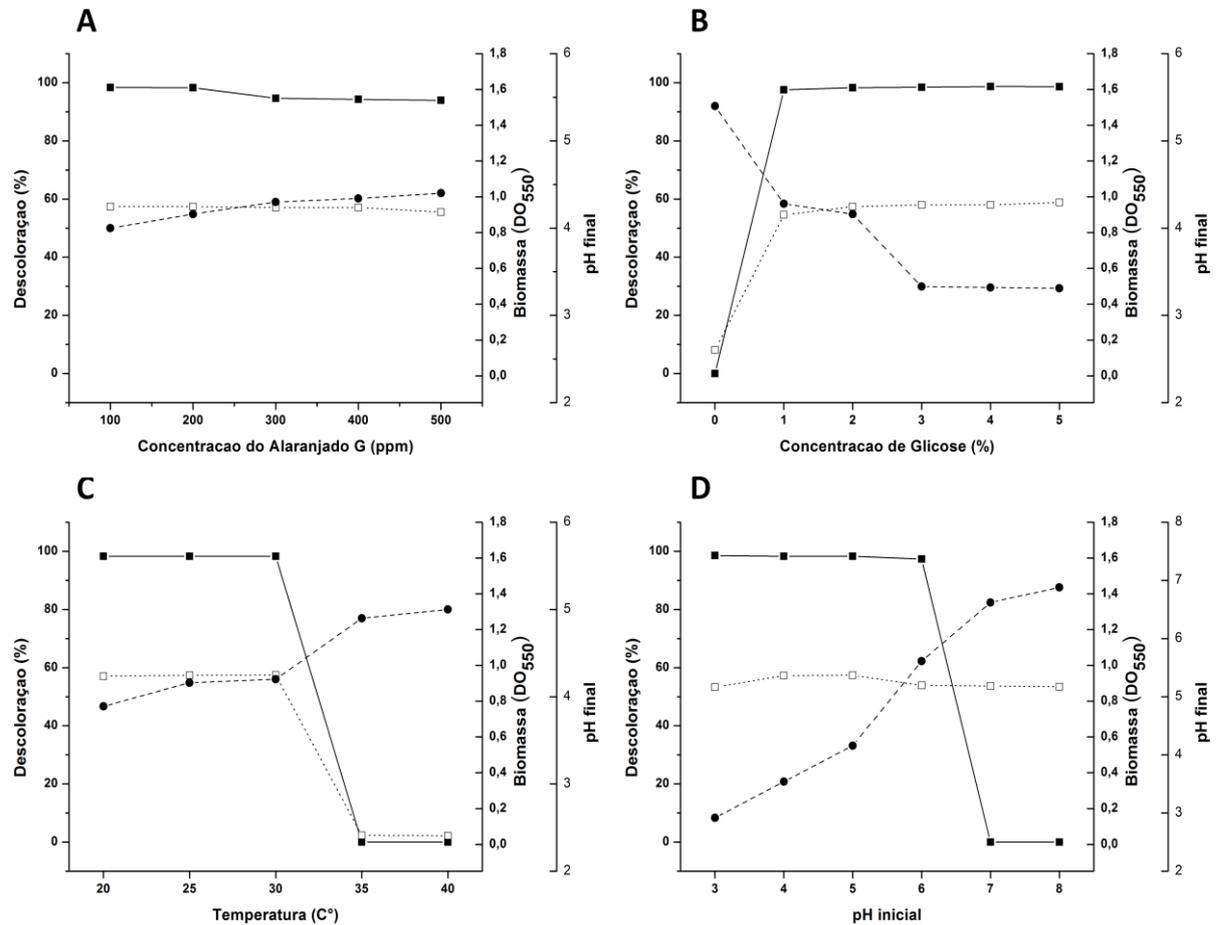


Figura 1. Efeitos de algumas variáveis incluindo: concentração inicial do Alaranjado G (A), concentração de glicose (B), temperatura (C) e pH inicial (D) sobre a descoloração do Alaranjado G (200 ppm) (■), biomassa (□) e pH final dos ensaios (●) após 24 h.

Resultados obtidos por diferentes autores evidenciam a relação inversa entre concentração inicial e descoloração do corante. *Issatchenkia orientalis* JKS6 foi capaz de descolorir mais de 99% do corante Preto Reativo 5 (500 ppm) em 36 h de experimento, porém, a taxa de descoloração caiu para de menos de 40% na concentração de 1000 ppm (Jafari et al., 2014). Tan et al. (2013) observaram que *Candida tropicalis* TL-F1 foi capaz de descolorir mais de 97% do Acido Brilhante Scarlet Gr em 24 h quando a concentração variava entre 20 a 100 ppm, porém houve redução significativa nas concentrações de 120 e 140 ppm. *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).

Os efluentes têxteis apresentam variação nas concentrações dos corantes, em uma faixa entre 20 a 200 ppm e, portanto, a habilidade de um microrganismo em realizar a degradação em uma ampla faixa de concentração se torna um fator importante para uma biodescoloração efetiva (Parshetti et al., 2010, Ayed et al., 2011). Assim, os resultados obtidos nos ensaios de descoloração em função da concentração inicial do corante por *C. rugosa* mostraram-se bastante promissores. Baseado nesses dados, a concentração de 200 ppm foi fixada para os estudos das demais variáveis.

3.2.2. Concentração de glicose

A figura 1B mostra os efeitos da concentração de glicose no meio de cultura sobre a descoloração do alaranjado G. Com os resultados, foi possível observar que a *C. rugosa* não consegue realizar a degradação na ausência de uma fonte externa de carbono e energia. Apesar de existirem relatos de leveduras que conseguem utilizar o corante como única fonte de carbono e/ou nitrogênio (Pajot et al., 2011; Martorell et al., 2012), o processo de degradação do corante é altamente associado ao crescimento celular e seu metabolismo primário (Lucas et al., 2006; Yang et al., 2008; Martorell et al., 2012). Portanto, de modo geral, células de leveduras não crescem sem glicose ou qualquer outra fonte de carbono facilmente metabolizável (Solis et al., 2012), como descrito para outras espécies leveduras como *Debaryomyces polymorphus* e *Candida tropicalis* (Yang et al., 2008).

O acréscimo de glicose no meio de cultura, necessária para a descoloração, não apresentou diferença expressiva nas taxas de descoloração a partir do acréscimo de 1%. Isto constitui um dado interessante, uma vez que uma menor concentração de fonte de carbono poderá representar menores custos no desenvolvimento de um futuro processo de biodegradação. Além disso, segundo Qu et al. (2012), elevada concentração de glicose no meio de cultura pode inibir a degradação, uma vez que, ao ultrapassar certo limite, os microrganismos tendem a utilizar a fonte externa de energia ao invés do corante. Entretanto, essa inibição não foi observada nesse estudo até a concentração máxima estudada.

O aumento da concentração da glicose favoreceu o crescimento celular, pois foi observado um ligeiro aumento da biomassa. Também foi observado a diminuição do pH final conforme o aumento da concentração de glicose inicial. Portanto, não é descartada a hipótese de que a diminuição do pH, em função do metabolismo da glicose, também influencia na descoloração.

Em um estudo sobre o efeito da glicose na descoloração, *D. polymorphus* e *C. tropicalis* removeram 100% do azo corante Preto reativo 5 em 24 h quando a concentração da glicose foi de 1% (Yang et al., 2008). Na descoloração do Vermelho ácido B, *Pichia* sp. TCL foi capaz de remover mais de 90% da cor quando a concentração de glicose estava entre 1 e 1.5% (Qu et al., 2012).

3.2.3. Temperatura

A Figura 1C mostra os efeitos da temperatura sob a descoloração e crescimento celular. As taxas de descoloração do Alaranjado G não apresentaram variação na faixa entre 20 °C a 30 °C, o mesmo acontecendo para a biomassa, sugerindo que esta faixa corresponde às condições ótimas para o crescimento celular e, conseqüentemente, para a descoloração, uma vez que estes dois mecanismos biológicos estão correlacionados. Entretanto, a partir de 35 °C, cessa completamente a descoloração, acompanhada pelo decréscimo acentuado da produção de biomassa. Estes resultados podem ser explicados pela perda de viabilidade celular e/ou à desnaturação das enzimas responsáveis pela descoloração (Wang et al., 2009)

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 Ácido B por *Magnusiomyces ingens* LH-F1 também foi de 30 °C, cessando completamente na temperatura de 40 °C (Tan et al., 2014).

3.2.4. pH

Com relação ao pH do meio de cultivo (Figura 1D), a descoloração ocorreu acima de 98% na faixa entre 3 e 6, quanto mais ácido o pH, existe um discreto aumento da descoloração, sendo 3 o pH ótimo. A partir do pH 7 não foi observado nenhuma remoção da cor. Os resultados mostram que a faixa ideal para o crescimento celular é entre pH 4 e 5, porém não há grande variação na biomassa entre os pHs estudados. Como em pH 6, 7, 8 não foi observado uma queda acentuada da biomassa, não se pode correlacionar a melhor condição de crescimento, em função do pH, e a descoloração. Sugerindo que a relação entre pH e descoloração está associada as condições de atuação e produção das enzimas envolvidas no processo de degradação.

O pH 3 também foi considerado ótimo na descoloração do corante Vermelho metil por *Galactomyces geotrichum* (Jadhav et al., 2008). Em trabalho com *C. 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 Acido brilhante Scarlet Gr por *C. tropicalis* TL-F1 ficou entre 4 e 6 (Tan et al., 2013).

A descoloração de azo corantes por leveduras não está restrita a condições ácidas. Na descoloração do Vermelho ácido B por *M. ingens* LH-F1, a descoloração foi muito eficiente na faixa de pH entre 5 e 7 (Tan et al., 2014). Já na descoloração de uma mistura de corantes azo e não azo por *G. geotrichum*, 7 foi considerado o pH ótimo (Waghmode et al., 2011). É conhecido que o crescimento ótimo de fungos, de maneira geral, e a máxima atividade de enzimas ligninolíticas, que são muito associadas à descoloração de azo corantes, são observados em condições de baixo pH (Shah e Patel, 2014).

Esses resultados são interessantes no desenvolvimento de futuros processos de biodescoloração, uma vez que o pH ácido inibe o crescimento de bactérias contaminantes.

3.2.5. Ensaio de validação

Um estudo cinético foi realizado utilizando as melhores condições estudadas, testando a descoloração do Alaranjado G (200 ppm) pela *C. rugosa* a 25 °C, 1% de glicose e pH 3 (Figura 2). A descoloração iniciou, efetivamente, após 14 h. Após esse período, a taxa de descoloração se manteve praticamente a mesma, sendo ainda observado um discreto aumento da descoloração, evidenciando que pode ser utilizada uma concentração menor de glicose e maior de corante, sem perder a eficiência do processo.

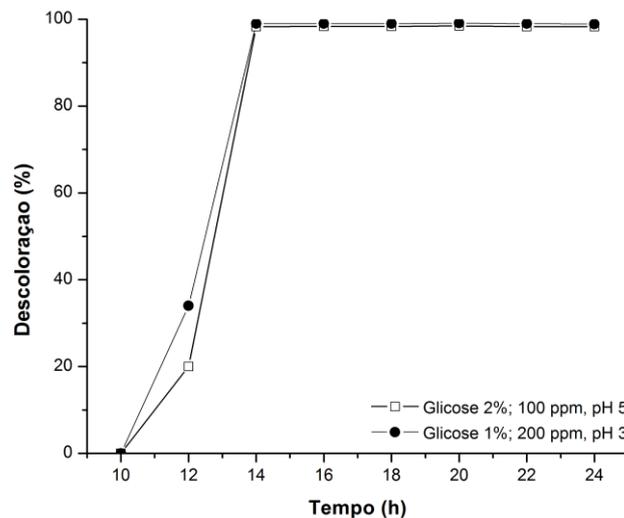


Figura 5. Estudo cinético a descoloração nas condições iniciais (□) e melhores condições (●)

3.3. Ensaio de Toxicidade

O ensaio de toxicidade com náuplios de *A. salina* foi realizado por tratar-se de um teste rápido, barato que oferece uma boa resposta sobre a toxicidade aguda de um determinado composto. Os resultados obtidos mostraram que o produto da degradação teve sua dose letal (CL₅₀) em 17.45%.

No ensaio contendo somente o corante Alaranjado G, em diferentes concentrações, não foi observada mortalidade dos microcrustáceos. Isso sugere que durante processo de descoloração houve a clivagem do grupo cromóforo e a formação de intermediários tóxicos, como aminas aromáticas (Puvanewari et al., 2006).

A utilização da *A. cepa* como indicador de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade mostrou ser um método barato, rápido e sensível para monitoramento da toxicidade. De acordo com os resultados mostrados na Tabela 3, pode ser observado que todos os tratamentos diferem estatisticamente entre si em relação ao índice mitótico. Em relação aos índices de aberrações cromossômicas e micronúcleos, os tratamentos foram diferentes do controle, porém não diferentes entre si. Sendo assim, houve redução significativa do índice mitótico causado pela exposição dos bulbos de *A. cepa* ao corante Alaranjado G na concentração de 200 ppm e uma redução ainda maior após a descoloração.

Tabela 3. Número total de células em interfase e em divisão, índice mitótico (IM), índice de aberrações cromossômicas (AC) e índice de micronúcleos (MN).

Tratamento	Células em interfase	Células em divisão	IM (%) **	AC (%) **	MN (%) *
Controle	4133	867	17,34 ± 0,5 ^a	0,06 ± 0,09 ^b	0 ± 0 ^b
Orange G	4572	428	8,56 ± 0,62 ^b	0,56 ± 0,15 ^a	0,2 ± 0,19 ^a
Sobrenadante	4769	231	4,62 ± 0,76 ^c	0,46 ± 0,21 ^a	0,2 ± 0,10 ^a

Controle: Água destilada

Diferença significativa em relação ao controle negativo ao nível de *P<0,05 e **P<0,001; (ANOVA-Teste de Tukey).

Tais resultados evidenciam o potencial citotóxico, mutagênico e genotóxico do Alaranjado G e o aumento da citotoxicidade após o processo de descoloração. Dentro do grupo das aberrações, puderam ser observadas pontes anafásicas, fragmentos cromossômicos, cromossomos pegajosos (*stickness*) na metáfase, anormalidades nucleares e a presença de micronúcleos, esses últimos, avaliados separadamente.

Eichlerova et al. (2007) observaram os efeitos da toxicidade do Alaranjado G no crescimento e morfologia das hifas de *Dichomitus squalens*, apesar desse fungo ter sido capaz de descolorir o corante com eficiência. Os mesmos autores também observaram a inibição no crescimento da planta *Lemna minor* L. pelo corante.

O aumento da toxicidade após a degradação, em ambos os testes, pode ser atribuído à degradação incompleta, constituindo um processo de biotransformação. Segundo Solis et al. (2012), os metabólitos produzidos após a descoloração, em muitos casos, podem ser mais tóxicos que a molécula original do corante. Toxicidade essa, comumente atribuída às aminas aromáticas que são

frequentemente liberadas após a redução da ligação azo (Pinheiro et al., 2004). Por exemplo, em trabalho realizado com o azo corante Violeta Acido 7, foi observado a toxicidade do azo corante em ratos, e o aumento da toxicidade após o processo de degradação pela bactéria *Pseudomonas putida* em condições estáticas, que foi atribuído as aminas 4-aminoacetanilida e ácido 5-acetamido-2-amino-1-3,6-dihidroxi-naftaleno dissulfônico (Ben Mansour et al., 2010).

De acordo com a literatura, o corante Alaranjado G parece não ser facilmente degradado por microrganismos. Fungos como *Thelephora* sp. e *Pleutorus sajor-caju*, com reconhecido potencial de descoloração de outros corantes tipo azo só puderam remover 30% e 50% da cor do Alaranjado G, respectivamente (Chagas e Durrant, 2001; Selvam et al., 2003). Mesmo que a molécula do Alaranjado G seja mais simples do que outros corantes do tipo azo descoloridos nesses trabalhos, pequenas diferenças estruturais podem afetar a descoloração devido a diferenças na distribuição de elétrons, densidade de carga e fatores estéricos (Knapp et al., 1995).

Em trabalho realizado por Tripathi e Srivastava (2014), a bactéria *Bacillus megaterium* removeu 94.5% da cor do Alaranjado G e os metabólitos intermediários identificados foram derivados de naftaleno e aldeído e a fenilhidrazina. Essa última conhecida pela toxicidade por vias orais, dérmicas e por inalação, além de causar irritação na pele e olhos e estar envolvida diretamente com anemia hemolítica em vertebrados (Shuckla et al., 2012).

Em função da biotransformação do corante em intermediários de difícil degradação e alta toxicidade, não é descartada a possibilidade de que um tempo maior possa contribuir para redução da toxicidade. Além disso, consórcios microbianos são altamente recomendados na tentativa de se obter uma completa degradação do composto.

4. CONCLUSÕES

Os dados demonstram a eficiência na descoloração do corante Alaranjado G pela levedura *C. rugosa*. Além disso, o estudo de diferentes parâmetros na descoloração de corantes tipo azo foi pela primeira vez estudados para essa levedura. Houve 99% de descoloração do Alaranjado G na concentração de 200 ppm após o período de 20 h, podendo tolerar até a concentração de 500 ppm. As melhores condições para descoloração ocorreram em condições de agitação, sob

temperaturas médias, em condições ácidas e com a presença de glicose a 1%. Entretanto, os resultados sugerem uma biodegradação incompleta, no qual os metabólitos se tornaram mais tóxicos do que a molécula original do corante, ressaltando a importância e obrigatoriedade de estudos complementares de toxicidade e/ou de identificação dos metabólitos produzidos, bem como a importância do estudo de novos mecanismos para redução do potencial tóxico dos metabólitos.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), uma fundação do Ministério da Educação do Brasil (MEC), e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo financiamento da pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

- Aksu, Z., & Dönmez, G. (2003). A comparative study on the biosorption characteristics of some yeasts for Remazol Blue reactive dye. *Chemosphere*, 50(8), 1075-1083.
- Almeida, J. M. (2005). Yeast community survey in the Tagus estuary. *FEMS Microbiology Ecology*, 53(2), 295-303.
- An, Y. J. (2006). Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. *Chemosphere*, 62(8), 1359-1365.
- Anjaneyulu, Y., Chary, N. S., & Raj, D. S. S. (2005). Decolourization of industrial effluents—available methods and emerging technologies—a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 4(4), 245-273.
- 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*, 274(1), 272-277.
- Bafana, A., Devi, S. S., & Chakrabarti, T. (2011). Azo dyes: past, present and the future. *Environmental Reviews*, 19(NA), 350-371.
- Ben Mansour, H., Ayed-Ajmi, Y., Mosrati, R., Corroler, D., Ghedira, K., Barillier, D., & Chekir-Ghedira, L. (2010). Acid violet 7 and its biodegradation products induce

- chromosome aberrations, lipid peroxidation, and cholinesterase inhibition in mouse bone marrow. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(7), 1371-1378.
- Castellani, A. (1910). On some subjects of tropical medicine which require further investigation. *J Ceylon Branch Br Med Assoc*, 7, 1-10.
- Chagas, E. P., & Durrant, L. R. (2001). Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(8), 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*, 91(3), 243-248.
- Dias, A. A., Lucas, M. S., Sampaio, A., Peres, J. A., & Bezerra, R. M. (2010). Decolorization of azo dyes by yeasts. In *Biodegradation of Azo Dyes* (pp. 183-193). Springer Berlin Heidelberg.
- do Nascimento, C. R. S., Nishikawa, M. M., Vaz, A. B., & Augusto, C. (2013). Textile azo dye degradation by *Candida rugosa* INCQS 71011 isolated from a non-impacted area in Semi-Arid Region of Brazilian Northeast. *African Journal of Biotechnology*, 12(47), 6636-6642.
- Eichlerová, I., Homolka, L., Benada, O., Kofroňová, O., Hubálek, T., & Nerud, F. (2007). Decolorization of Orange G and Remazol Brilliant Blue R by the white rot fungus *Dichomitus squalens*: Toxicological evaluation and morphological study. *Chemosphere*, 69(5), 795-802.
- Faryal, R. A. N. I., & Hameed, A. (2005). Isolation and characterization of various fungal strains from textile effluent for their use in bioremediation. *Pakistan Journal of Botany*, 37(4), 1003.
- FISKESJÖ, G. (1985). The allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102(1), 99-112.
- Jadhav, S. U., Kalme, S. D., & Govindwar, S. P. (2008). Biodegradation of Methyl red by *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(2), 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*, 64(2), 475-482.
- Jin, X. C., Liu, G. Q., Xu, Z. H., & Tao, W. Y. (2007). Decolorization of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 239-243.
- Knapp, J. S., Newby, P. S., & Reece, L. P. (1995). Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(7), 664-668.

- 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 & Biodegradation*, 65(1), 135-141.
- Lucas, M. S., Amaral, C., Sampaio, A., Peres, J. A., & Dias, A. A. (2006). Biodegradation of the diazo dye Reactive Black 5 by a wild isolate of *Candida oleophila*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(1), 51-55.
- 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.
- Matthews, R. S. (1995). *Artemia salina* as a test organism for measuring superoxide-mediated toxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(5), 919-922.
- O'Donnell, K. (1993). Fusarium and its near relatives in the fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. *CAB International, Wallingford, UK*, 225-233.
- Pajot, H. F., Delgado, O. D., de Figueroa, L. I., & Fariña, J. I. (2011). Unraveling the decolourizing ability of yeast isolates from dye-polluted and virgin environments: an ecological and taxonomical overview. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(3), 443-456.
- Pajot, H.F., Figueroa, L. I. C., Fariña, J. I. (2007) Dye-decolourizing activity in isolated yeasts from the ecoregion of Las Yungas (Tucumán, Argentina). *Enzyme Microbiology and Technology*, 40, 1503–1511.
- Pandey, A., Singh, P., & Iyengar, L. (2007). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59(2), 73-84.
- Parshetti, G. K., Telke, A. A., Kalyani, D. C., & Govindwar, S. P. (2010). Decolorization and detoxification of sulfonated azo dye methyl orange by *Kocuria rosea* MTCC 1532. *Journal of hazardous materials*, 176(1), 503-509.
- Pinheiro, H. M., Touraud, E., & Thomas, O. (2004). Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. *Dyes and Pigments*, 61(2), 121-139.
- Puvaneswari, N., Muthukrishnan, J., & Gunasekaran, P. (2006). Toxicity assessment and microbial degradation of azo dyes. *Indian Journal of Experimental Biology*, 44(8), 618.
- Qu, Y., Cao, X., Ma, Q., Shi, S., Tan, L., Li, X., ... & Zhou, J. (2012). Aerobic decolorization and degradation of Acid Red B by a newly isolated *Pichia* sp TCL. *Journal of Hazardous Materials*, 223, 31-38.
- 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*, 35(3), 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*, 70(4), 2279-2288.
- Sampaio, J. P., Gadanho, M., Santos, S., Duarte, F. L., Pais, C., Fonseca, A., & Fell, J. W. (2001). Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospiridium*: *Rhodospiridium kratochvilovae* and related anamorphic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 687-697.
- 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*, 42(1), 138-157.
- Savin, I. I., & Butnaru, R. (2008). Wastewater characteristics in textile finishing mills. *Environmental Engineering and Management Journal*, 7(6), 859-864.
- Selvam, K., Swaminathan, K., & Chae, K. S. (2003). Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora* sp. *Bioresource Technology*, 88(2), 115-119.
- Shah, M. P., & Patel, K. A. (2014). Microbial Decolorization and Degradation of Remazol Black & Mordant Orange by Microbial Consortia Isolated from Common Effluent Treatment Plant. *International Journal*, 2(3), 117-124.
- Shukla, P., Yadav, N. K., Singh, P., Bansode, F. W., & Singh, R. K. (2012). Phenylhydrazine induced toxicity: a review on its haematotoxicity. *International Journal of Basic and Applied Medical Sciences*, 2, 86-91.
- Solís, M., Solís, A., Pérez, H. I., Manjarrez, N., & Flores, M. (2012). Microbial decolouration of azo dyes: a review. *Process Biochemistry*, 47(12), 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*, 158, 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*, 138, 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*, 55(2), 320.
- Tony, B. D., Goyal, D., & Khanna, S. (2009). Decolorization of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(4), 462-469.
- 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*, 11(7), 1768-1781.

- Von Sperling, M. (1996). Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos (Vol. 1). Editora UFMG.
- 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*, 65(3), 479-486.
- Wang, H., Zheng, X. W., Su, J. Q., Tian, Y., Xiong, X. J., & Zheng, T. L. (2009). Biological decolorization of the reactive dyes Reactive Black 5 by a novel isolated bacterial strain *Enterobacter* sp. EC3. *Journal of Hazardous Materials*, 171(1), 654-659.
- 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*, 20(1), 105-108.
- 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*, 24(3), 249-253.
- Yang, Q., Zhang, H., Li, X., Wang, Z., Xu, Y., Ren, S., & Wang, H. (2013). Extracellular enzyme production and phylogenetic distribution of yeasts in wastewater treatment systems. *Bioresource Technology*, 129, 264-273.
- Yu, Z., & Wen, X. (2005). Screening and identification of yeasts for decolorizing synthetic dyes in industrial wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 56(2), 109-114.