

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

JOICE FERREIRA ANDRADE SANTOS

**POTENCIAL DO FUNGO *Trametes lactinea* NOS PROCESSOS DE
DESCOLORAÇÃO E DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DO CORANTE TÊXTIL
ÍNDIGO CARMIM**

JOÃO PESSOA

2024

JOICE FERREIRA ANDRADE SANTOS

**POTENCIAL DO FUNGO *Trametes lactinea* NOS PROCESSOS DE
DESCOLORAÇÃO E DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DO CORANTE TÊXTIL
ÍNDIGO CARMIM**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso) como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Leonor Alves de Oliveira da Silva

Coorientadora: Me. Jackelly Felipe de Oliveira

JOÃO PESSOA

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237p Santos, Joice Ferreira Andrade.

Potencial do fungo *Trametes lactinea* nos processos de descoloração e degradação enzimática do corante têxtil índigo carmim / Joice Ferreira Andrade Santos. - João Pessoa, 2024.

69 p.

Orientação: Leonor Alves de Oliveira da Silva.

Coorientação: Jackelly Felipe de Oliveira.

TCC (Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas) - UFPB/CCEN.

1. Descoloração. 2. Biodegradação. 3. Corantes. 4. Fungo. 5. Biologia. I. Silva, Leonor Alves de Oliveira da. II. Oliveira, Jackelly Felipe de. III. Título.

UFPB/CCEN

CDU 57(043.2)

JOICE FERREIRA ANDRADE SANTOS

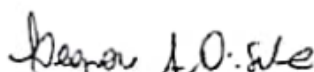
**POTENCIAL DO FUNGO *Trametes lactinea* NOS PROCESSOS DE
DESCOLORAÇÃO E DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DO CORANTE TÊXTIL
ÍNDIGO CARMIM**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso) como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Data: 09/05/2024

Resultado: 10,0

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Leonor Alves de Oliveira da Silva (UFPB)

Orientadora



Documento assinado digitalmente
SARAH SIGNE DO NASCIMENTO
Data: 09/05/2024 15:44:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Sarah Signe do Nascimento (UFPE)

Avaliadora



Profa. Dra. Krystyna Gorlach Lira (UFPB)

Avaliadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Lúcia e João, que me apoiaram e me incentivaram nessa caminhada, que se preocuparam em me proporcionar acesso aos livros, às línguas, ao conhecimento, e que sempre deram o seu melhor para que eu pudesse me dedicar aos estudos.

Aos meus irmãos, Ana Rita e Natan, com quem compartilho muitas risadas e que me ajudam com pequenas ações diárias que fazem toda a diferença.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio.

Ao meu companheiro Samuel por me motivar, por me esperar no laboratório, por me tranquilizar nos momentos difíceis e tornar os meus dias mais leves. Seu apoio foi essencial para eu conseguir concluir o curso.

À minha orientadora, professora Leonor Alves, por ter me acolhido no laboratório e me mostrado um caminho na Biologia, por toda paciência e compreensão, por todos os ensinamentos, e por ser uma referência, uma verdadeira inspiração como cientista e professora.

Aos meus colegas de laboratório Davi, Lucas e Gabriela que muito me ajudaram nos últimos dois anos e com quem compartilho o interesse por desvendar os mistérios da Microbiologia.

À Jackelly pelas orientações e ensinamentos, por ser também uma referência para mim como cientista.

Aos funcionários e servidores do DBM, em especial à Dona Alda, pela ajuda e disposição.

Aos meus colegas da turma 2018.1 Alana, Gabriel, Letícia, Natália, Paulo, Rafael, Rafisa e Wanderley, com quem pude trocar ideias e dividir muitos momentos ao longo desses quase seis anos de graduação.

À Lidiane, que tive a honra de conhecer quando fomos monitoras de Biologia e Fisiologia Celular em 2019 e que se tornou uma referência e inspiração para mim.

A todos os professores do curso de Ciências Biológicas que de alguma forma iluminaram minha mente e fizeram crescer minha curiosidade e paixão pela Biologia.

Aos membros da banca que aceitaram o convite para avaliar este trabalho e contribuir para minha formação.

À equipe do LACOM, em especial ao técnico Saulo de Tarso, por contribuir com os resultados deste trabalho.

RESUMO

A indústria têxtil é responsável pela produção de efluentes altamente concentrados contendo grande quantidade de corantes provenientes das etapas de tingimento e lavagem. Os corantes têxteis são substâncias tóxicas cujo descarte nos ecossistemas aquáticos provoca inúmeros danos ao meio ambiente e riscos à saúde humana. A maioria dos métodos de tratamento não promove a degradação completa dos corantes, por isso existe a necessidade em desenvolver novas estratégias. Uma delas é a biorremediação, que consiste no uso de microrganismos capazes de remover os contaminantes do efluente. Muitas espécies de fungos têm essa capacidade, por isso se apresentam como alternativa sustentável para o tratamento de efluentes coloridos. O presente trabalho objetivou avaliar o potencial da espécie *Trametes lactinea* na descoloração do corante têxtil índigo carmim, utilizado no tingimento de peças jeans, cuja degradação eficiente é ainda um desafio. Esta espécie produz enzimas lacase, uma enzima oxidase que degrada polímeros complexos e apresenta potencial para degradar moléculas de corante. Um teste inicial de descoloração, realizado em meio líquido contendo o corante índigo carmim e discos de inóculo, revelou 47% de descoloração após 120 horas. Visando otimizar esse processo por ação enzimática, realizou-se um planejamento fatorial e um delineamento composto central rotacional (DCCR) para encontrar condições ótimas de atividade da lacase produzida por *T. lactinea*. A partir dos resultados destes ensaios e da análise estatística, a adição de 0,4 mg de ácido tânico ao meio de cultivo e 120 horas de incubação foram as condições ótimas encontradas. Assim, o fungo foi cultivado nessas condições para obtenção de um extrato enzimático ótimo que em seguida foi utilizado para descoloração do índigo carmim, em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL da solução do corante e 5 mL do extrato. O extrato apresentou atividade máxima da lacase de 87,5 U/mL e 100% descoloração após 15 dias. Espectroscopias na região do infravermelho (FTIR) e na região do ultravioleta (UV-Vis) evidenciaram diferenças entre os espectros das amostras controle e tratadas. Os dados obtidos apontam que o fungo *Trametes lactinea* é capaz de descolorir soluções do corante índigo carmim pelo mecanismo de degradação enzimática e que a lacase produzida provavelmente contribui com a biodegradação.

Palavras-chave: Descoloração; Biodegradação; Corantes têxteis; Lacase.

ABSTRACT

The textile industry generates highly concentrated effluents, containing a lot of synthetic dyes residues applied in the dyeing and washing processes. The textile dyes are toxic compounds, so the effluent discharged in water bodies cause serious damage to the environment and risks to the human health. Most effluent treatment methods do not promote the complete degradation of these dyes, and for that reason, there is a demand for the development of new strategies. One of the strategies is bioremediation, which consists of the use of microorganisms that can degrade contaminants from the effluent. Many species of fungi have this ability, therefore showing potential to be used as a sustainable alternative for the treatment of colored wastewater. This research aims to evaluate the potential of the fungus *Trametes lactinea* on the decolorization of the textile dye indigo carmine, which is used to dye denim and is difficult to degrade. This species produces laccases, oxidases that are capable of degrading complex organic matter and have the potential to degrade dye molecules. The first decolorization test, carried out in liquid medium containing indigo carmine dye and fungal inoculum, revealed 47% decolorization after 120 hours. In order to optimize the decolorization by enzymatic degradation, factorial design and central composite design studies were conducted to determine optimal conditions for laccase activity produced by *T. lactinea*. As a result of these studies and the statistical analysis, the addition of 0.4 mg of tannic acid to the medium and 120 hours of incubation were found to be the best conditions. Therefore, the fungus was cultured under these conditions to produce an optimum enzyme mixture to be used in the decolorization of indigo carmine dye, carried out in Erlenmeyer flasks containing 50 mL of the dye solution plus 5 mL of the enzyme mixture. 87.5 U/mL was the maximum laccase activity measured and it was observed 100% decolorization rate after 15 days. FTIR and UV-Vis spectroscopies highlighted differences between the spectra of the control samples and treated samples. The findings indicate that *Trametes lactinea* enzymes can degrade indigo carmine and that laccase probably plays a role in the biodegrading process.

Keywords: Decolorization; Biodegradation; Textile dyes; Laccase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Calças jeans tingidas com o corante sintético índigo carmim.	19
Figura 2 - Estrutura química do corante índigo carmim.....	20
Figura 3 - Aspecto macro morfológico do fungo <i>Trametes lactinea</i> em ambiente natural.....	28
Figura 4 - Estrutura tridimensional da enzima lacase (LacIIIb, obtida do fungo <i>Trametes versicolor</i>). As esferas azuis 1, 2, 3a e 3b representam os átomos de cobre.	30
Figura 5 - Reação geral de oxirredução de compostos fenólicos catalisada pela enzima lacase.	30
Figura 6 - Gráfico da varredura do corante índigo carmim (solução de 25 ppm), evidenciando o pico de absorbância no comprimento de onda 610 nm.	33
Figura 7 - Metodologia de dosagem da enzima lacase (7a) e metodologia de dosagem das proteínas solúveis totais (7b).	39
Figura 8 - Atividade da lacase, percentual de descoloração do corante índigo carmim e atividade específica da lacase para cada experimento do planejamento fatorial.....	46
Figura 9 - Diagrama de Pareto destacando a relação entre as variáveis independentes tempo e ácido tânico sobre a variável resposta atividade da lacase.	46
Figura 10 - Diagrama de Pareto destacando a relação entre as variáveis independentes tempo, ácido tânico e a interação glicose/farelo de trigo sobre a variável resposta atividade específica da lacase.....	47
Figura 11 - Superfície de resposta para as variáveis concentração de ácido tânico e tempo de cultivo evidenciando as condições ótimas de cultivo.	50
Figura 12 - Descoloração do corante índigo carmim após 7 dias (12a), 15 dias (12b) e 21 dias (12c) de tratamento com complexo enzimático produzido por <i>T. lactinea</i> . O controle é o último frasco à direita em todas as imagens.	53
Figura 13 - Espectros vibracionais na região do infravermelho da amostra controle (solução de índigo carmim, 20 ppm).....	56
Figura 14 - Espectros vibracionais na região do infravermelho da amostra tratada após 15 dias de tratamento.....	57

Figura 15 - Espectro de absorção da amostra controle em verde (solução do corante índigo carmim, 20 ppm) e das amostras tratadas após 15 dias, em vermelho, e 21 dias, em amarelo. A linha azul representa a varredura da água. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos corantes de acordo com a estrutura química....	20
Tabela 2 - Classificação dos corantes pelo modo de fixação à fibra têxtil.....	21
Tabela 3 - Métodos físicos, químicos e biológicos utilizados na remediação de efluentes e suas vantagens e desvantagens.....	24
Tabela 4 - Variáveis independentes e os níveis avaliados no planejamento fatorial 2^{5-1}	34
Tabela 5 - Matriz do planejamento fatorial 2^{5-1} evidenciando os níveis avaliados para cada variável nos ensaios.....	34
Tabela 6 - Variáveis independentes e os níveis avaliados no delineamento composto central rotacional (DCCR).....	37
Tabela 7 - Matriz do DCCR evidenciando os níveis avaliados para cada variável nos ensaios.....	38
Tabela 8 - Atividade da lacase (U/mL), concentração de proteínas solúveis (mg/mL) e atividade específica da lacase por miligrama de proteína (U/mg) dos ensaios do planejamento fatorial 2^{5-1} , e percentual de descoloração do índigo carmim pelas amostras obtidas dos ensaios do planejamento.....	45
Tabela 9 - Atividade da lacase (U/mL), concentração de proteínas solúveis (mg/mL) e atividade específica da lacase (U/mg) do extrato produzido nas condições ótimas encontradas para ácido tânico (0,4 mg) e tempo de cultivo (120 horas).....	51
Tabela 10 - Percentuais de descoloração do corante índigo carmim após 7, 15 e 21 dias de tratamento com extrato enzimático produzido pelo fungo <i>Trametes lactinea</i>	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1	A indústria têxtil e a poluição dos corpos de água	15
3.2	Corantes têxteis	17
3.3	Tratamento de efluentes têxteis	23
3.4	Fungos como biorremediadores de efluentes industriais	26
3.4.1	Ecologia e metabolismo de fungos	26
3.4.2	Potencial biotecnológico dos fungos	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	Microrganismo	31
4.2	Corante índigo carmim	32
4.3	Ensaio enzimáticos e testes de descoloração para determinação de condições ótimas	33
4.3.1	Planejamento fatorial fracionário 2^{5-1}	33
4.3.2	Teste de descoloração utilizando extratos obtidos dos experimentos do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1}	36
4.3.3	Delineamento composto central rotacional (DCCR)	37
4.4	Produção do extrato enzimático nas condições ótimas de cultivo	39
4.5	Ensaio de descoloração do corante índigo carmim pelo extrato enzimático	40
4.6	Análise da estrutura do corante índigo carmim	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42

5.1	Ensaio inicial de descoloração do índigo carmim pela espécie <i>Trametes lactinea</i>	42
5.2	Avaliação da influência das variáveis glicose, farelo de trigo, ácido tânico, sulfato de cobre e tempo de cultivo na atividade enzimática	43
5.3	Avaliação das condições ótimas para atividade da lacase	49
5.4	Quantificação da enzima lacase e das proteínas solúveis totais do extrato produzido nas condições ótimas de cultivo	50
5.5	Descoloração do corante índigo carmim com extrato enzimático produzido nas condições ótimas de cultivo	52
5.6	Avaliação da degradação das moléculas do corante pela análise das técnicas de FTIR e de UV-Vis	55
6	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

A atividade têxtil faz parte da história da humanidade e desempenha um papel fundamental no fornecimento de roupas e acessórios para a população. No entanto, devido a produção em larga escala, necessária para atender as demandas da população e ainda seguir as tendências do mercado da moda, o setor têxtil é atualmente um dos que mais poluem o meio ambiente, impactando, sobretudo, os ecossistemas aquáticos (KISHOR *et al.*, 2021; ALMEIDA; DILARRI; CORSO, 2016; BERRADI *et al.*, 2019).

A produção de uma peça de roupa envolve muitas etapas, desde a produção da fibra têxtil até o tingimento e acabamento da peça. Durante o tingimento, são adicionados corantes sintéticos à fibra que, em seguida, passa por sucessivas lavagens para retirada do excesso de corante. Esse excedente representa cerca de 15% do volume de corante aplicado e passa a compor o efluente têxtil, cujo destino final são os corpos de água (MOYO; MAKHANYA; ZWANE, 2022; ARDILA-LEAL *et al.*, 2021; BENTO *et al.*, 2020; YADAV *et al.*, 2021).

A presença dos corantes no ambiente aquático pode causar diversos danos, como alterações no pH, transparência e temperatura da água, aumento da concentração de compostos orgânicos, causando a diminuição do oxigênio dissolvido e o aumento da demanda bioquímica de oxigênio, o que pode desencadear o processo de eutrofização, além de tornar a água imprópria para uso humano (BERRADI *et al.*, 2019; RAWAT *et al.*, 2022). Além disso, os corantes têxteis são substâncias tóxicas que apresentam potencial cancerígeno, representando riscos à saúde dos organismos aquáticos e à saúde humana (LELLIS *et al.*, 2019; BABU *et al.*, 2019; BERRADI *et al.*, 2019).

Assim, os efluentes devem passar por tratamento antes do descarte no meio ambiente. No entanto, o tratamento para remoção dos corantes é dificultado pelas propriedades químicas destes compostos. A presença de anéis benzênicos e duplas ligações em sua estrutura confere alta estabilidade molecular e resistência à degradação (BENKHAYA; M'RABET; HARFI, 2020). Ou seja, o efluente têxtil continua sendo um perigo para o meio ambiente mesmo depois de tratado (SHARMA; SHARMA; SONI, 2021; LELLIS *et al.*, 2019). No Brasil, muitas fábricas de produção têxtil se concentram na região Nordeste e representam uma atividade econômica

extremamente importante para a região (BRAGA; ABREU, 2017; VIANA; ROCHA; NUNES, 2008). Alguns polos industriais, como o polo de jeans em Toritama (PE), produzem efluentes bastante concentrados que quando descartados no ambiente aquático geram inúmeros impactos negativos (SANTOS *et al.*, 2012; BRAGA; ABREU, 2017).

Nesse sentido, surge a necessidade de pesquisar e desenvolver métodos que promovam maior eficiência dos tratamentos de efluentes têxteis, de maneira sustentável e econômica. Uma das alternativas que apresenta bastante potencial é o método de biodegradação dos corantes (KHAN *et al.*, 2023). A biodegradação é um processo natural em que enzimas catalisam a conversão de compostos orgânicos em compostos simples. Muitas espécies de fungos produzem enzimas que catalisam a degradação de compostos fenólicos e recalcitrantes e, de modo similar, podem ser capazes de degradar moléculas de corante, como já foi evidenciado por vários trabalhos através de diferentes metodologias (KHAN *et al.*, 2023; MISHRA; MAITI, 2019).

Os fungos do gênero *Trametes* recebem destaque nessa área. São fungos do filo Basidiomycota que atuam na decomposição da madeira, degradando componentes da parede celular, e produzem a enzima lacase (CARDOSO, 2023). A lacase é uma multicobre oxidase que catalisa a oxidação do substrato com a redução do oxigênio à água. São enzimas de grande interesse industrial, pois conseguem atuar sobre uma ampla variedade de substratos, sendo esta uma das principais vantagens em sua utilização (JOSHI *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2023). Diversos estudos descrevem o potencial de espécies deste gênero na descoloração e degradação de corantes, associados a atuação da lacase (FERREIRA-SILVA *et al.*, 2022; GRASSI *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2023; RAMÍREZ-MONTOYA *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2020).

Fundamentado por essa linha de pesquisa, o presente trabalho teve como objetivo utilizar o fungo da espécie *Trametes lactinea* para promover a descoloração do corante têxtil índigo carmim, um corante amplamente utilizado na indústria têxtil, responsável pela famosa cor azul do jeans. Objetivou-se verificar se ocorre a degradação das moléculas do corante por ação de enzimas produzidas por esta espécie e avaliar a influência de vários fatores sobre a produção e atividade da lacase produzida por *T. lactinea*, com o intuito de encontrar condições ótimas para a atividade desta enzima e para obtenção de altos índices de descoloração.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar cepa do fungo *Trametes lactinea* para descolorir soluções do corante têxtil índigo carmim, visando contribuir com conhecimento sobre o potencial de uso de microrganismos na descoloração de efluentes industriais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar o índice de descoloração de soluções contendo o corante têxtil índigo carmim utilizando o fungo *Trametes lactinea*;

Determinar condições ótimas para a atividade enzimática a partir da análise da influência de diferentes fatores na produção de proteínas solúveis totais e na atividade de enzimas lacase por meio de um planejamento fatorial;

Investigar o papel da lacase na descoloração do corante têxtil índigo carmim;

Avaliar a biodegradação a partir da análise da estrutura do corante índigo carmim após o tratamento fúngico, pela espectroscopia de infravermelho e espectroscopia no ultravioleta visível.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 A indústria têxtil e a poluição dos corpos de água

A indústria têxtil é uma das principais atividades econômicas responsáveis pela poluição hídrica, pois produz grandes volumes de água residual proveniente dos processos industriais, contendo os mais diversos compostos químicos utilizados nesses processos, tais como sais, surfactantes, umectantes, dispersantes, fixadores e resíduos de corantes. A água residual da atividade têxtil constitui o efluente têxtil, altamente poluente, que é despejado nos corpos d'água, afetando a saúde e o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos (ADANE; ADUGNA; ALEMAYEHU, 2021; ARDILA-LEAL *et al.*, 2021; BOOM *et al.*, 2022; BORAN *et al.*, 2019).

A produção têxtil ocorre em várias etapas e cada uma delas requer a aplicação de diversos produtos químicos e grandes volumes de água (MADHAV *et al.*, 2018). Todo o processo se inicia com a produção da fibra têxtil, que é a matéria-prima para a fiação e produção dos tecidos, e que pode ser de origem natural, como o algodão, ou sintética, como o poliéster, por exemplo (GUARATINI; ZANONI, 2000; NUNES, 2019).

A primeira etapa após a tecelagem é a engomagem, que consiste em revestir a fibra com substâncias adesivas, como álcool polivinílico ou carboximetilcelulose, formando uma camada protetora e melhorando a adesão entre os fios. Essas substâncias são removidas em seguida com a ação de enzimas bacterianas e/ou substâncias químicas auxiliares, em geral de caráter ácido. A terceira etapa é a limpeza da fibra com produtos alcalinos e a quarta etapa consiste no branqueamento da fibra com peróxido de hidrogênio ou ácido peracético. A etapa seguinte é a mercerização, processo de aplicação de soda cáustica para dar brilho, fortalecer a fibra e aumentar a afinidade aos corantes que serão aplicados na etapa seguinte, de tingimento e estamparia (ADANE; ADUGNA; ALEMAYEHU, 2021; NUNES, 2019). Nesta etapa, são adicionados corantes e aditivos que auxiliam na fixação do corante, havendo também um grande consumo de água, que chega a 100 litros de efluente por quilo de tecido (ALMEIDA; DILARRI; CORSO, 2016). A última etapa é o acabamento, onde são adicionadas substâncias para conferir resistência a radiação ultravioleta, manchas, atividade microbiana, calor, entre outros fatores que poderiam danificar a

peça, e assim retardar o desbotamento do tecido (ADANE; ADUGNA; ALEMAYEHU, 2021; KISHOR *et al.*, 2021; NUNES, 2019).

Após a adição dos corantes, a peça passa por sucessivas lavagens industriais para retirar o excesso de corante aplicado. Por isso, a etapa de tingimento é a principal contribuinte para a carga poluente do efluente têxtil, pois mesmo com a ação de agentes fixadores, os corantes não aderem completamente à fibra, gerando efluentes coloridos contendo muitos resíduos de corantes que não se fixaram (ADANE; ADUGNA; ALEMAYEHU, 2021; ALMEIDA; DILARRI; CORSO, 2016; NUNES, 2019; RAMOS *et al.*, 2021; RANE; JOSHI, 2021). Estima-se que 15% do corante aplicado seja perdido nesse processo de lavagem pós-tingimento, o que corresponde a 200 mil toneladas de corantes sendo descartados nos corpos d'água anualmente, considerando-se a produção têxtil mundial (RAMOS *et al.*, 2021; KISHOR *et al.*, 2021; JUTINICO-SHUBACH *et al.*, 2022; AMEEN *et al.*, 2021; BERRADI *et al.*, 2019).

Como os corantes apresentam cor intensa, uma pequena quantidade dessas substâncias na água já é suficiente para causar enormes danos ao meio ambiente e gerar impactos imediatos. A presença do corante na água forma uma camada colorida que diminui a passagem da luz solar, afetando a atividade fotossintética de algas e microrganismos que constituem os organismos produtores do ecossistema (ALMEIDA *et al.*, 2012; ARDILA-LEAL *et al.*, 2021; RAMOS *et al.*, 2021; WAGHMODE *et al.*, 2019). Essa situação pode desencadear muitos outros problemas como a diminuição do alimento disponível para os animais aquáticos que se alimentam dos fotossintetizantes, e a diminuição da concentração de oxigênio dissolvido, afetando a sobrevivência dos organismos naquele ambiente contaminado (ARDILA-LEAL *et al.*, 2021; KHAN *et al.*, 2023).

O efluente têxtil é rico em resíduos de corantes e muitos outros compostos orgânicos utilizados nas diversas etapas de produção, provocando também o aumento da concentração de matéria orgânica na água, alterando o pH, a salinidade e aumentando a demanda bioquímica de oxigênio, uma medida que traduz o consumo de oxigênio das bactérias decompositoras aeróbias. Logo, a alta demanda indica um alto consumo devido à presença de muita matéria orgânica e a proliferação das bactérias, podendo desencadear um processo de eutrofização (ARDILA-LEAL *et al.*, 2021; BERRADI *et al.*, 2019; SHARMA; SHARMA; SONI, 2021; SEHAR *et al.*, 2022). A composição do efluente têxtil inclui também muitos compostos inorgânicos, como

hidróxido de sódio, amônia, cloretos, nitratos, e até mesmo metais pesados como cromo, arsênico e zinco (BELTRAME, 2000; ARDILA-LEAL *et al.*, 2021).

No Brasil, a indústria têxtil se configura como um setor de grande importância social e econômica, empregando milhões de pessoas e colocando o país como o 5º maior produtor mundial de têxteis, com expressiva produção em estados do Nordeste, como Ceará, Pernambuco e Paraíba (ALMEIDA; DILARRI; CORSO, 2016; CARDOSO; BESSEGATO; ZANONI, 2016; BRAGA; ABREU, 2017; VIANA; ROCHA; NUNES, 2008). Essa produção elevada gera efluentes concentrados cujo descarte, infelizmente, ainda é bastante falho, pois as empresas realizam o tratamento mínimo para evitar penalidades, ou pior, diluem o efluente para diminuir a intensidade da cor, driblando a legislação e se eximindo da responsabilidade ambiental (ALMEIDA; DILARRI; CORSO, 2016).

A norma que dispõe sobre as condições de tratamento e lançamento de efluentes em corpos d'água é a Resolução CONAMA nº 430/2011, que estabelece critérios para o lançamento dos efluentes, como pH entre 5 e 9, remoção mínima de 60% da demanda bioquímica de oxigênio, temperatura inferior a 40°C, concentrações máximas, em miligramas por litro, de compostos orgânicos e inorgânicos, entre outras exigências (Resolução CONAMA nº 430/2011). A resolução prevê também o automonitoramento do efluente pelos responsáveis pela fonte poluidora, o que pode facilitar alterações nas amostras antes de serem levadas para os laboratórios acreditados pelo INMETRO. Outro problema é a baixa fiscalização por parte dos órgãos ambientais estaduais (ALMEIDA; DILARRI; CORSO, 2016; GUARATINI; ZANONI, 2000).

3.2 Corantes têxteis

Corantes são compostos orgânicos que modificam a cor do substrato ao qual são aplicados, sendo solúveis em água ou solvente orgânico. São utilizados para os mais diversos fins na indústria têxtil, farmacêutica, alimentícia, em cosméticos, entre outros (ARDILA-LEAL *et al.*, 2021; ZANONI; YAMANAKA, 2016). A molécula de corante se caracteriza pela presença de um grupo funcional que consegue absorver luz no espectro visível (400 - 700 nm). Este grupo é denominado cromóforo e é o que determina a cor do corante pela porção refletida da luz. Duplas ligações conjugadas favorecem esse fenômeno, devido a deslocalização dos elétrons (BENKHAYA;

M'RABET; HARFI, 2020; MARTINS; SUCUPIRA; SUAREZ, 2015). A molécula apresenta também grupos auxiliares em sua estrutura chamados auxocromos, que estão ligados ao cromóforo e podem influenciar a solubilidade e a intensidade do corante (BOOM *et al.*, 2022; BENKHAYA; M'RABET; HARFI, 2020; BERRADI *et al.*, 2019; SEHAR *et al.*, 2022).

Na atividade têxtil, o uso de substâncias coloridas para tingir fibras e tecidos data de pelo menos 2.000 anos a.C. Essas substâncias eram obtidas de fontes naturais, como raízes e frutos, mas com as demandas iniciadas no século XIX durante a Revolução Industrial e a descoberta da mauveína, um corante acidentalmente produzido pelo químico William Perkin em 1856 e considerado o primeiro corante sintético produzido, os corantes naturais começaram a ser substituídos pelos químicos sintéticos (ARDILA-LEAL *et al.*, 2021; CARNEIRO; ZANONI, 2016; BENKHAYA; M'RABET; HARFI, 2020). As principais vantagens dos corantes sintéticos são a produção em grandes quantidades, sem a preocupação com o esgotamento da matéria prima, a estabilidade química das moléculas, o baixo custo de obtenção e a grande variedade de cores, muitas das quais dificilmente seriam encontradas ou obtidas da natureza (ARDILA-LEAL *et al.*, 2021; CARNEIRO; ZANONI, 2016; POSTREL, 2021).

Um dos corantes mais antigos e bastante difundido na indústria é o índigo carmim. Originalmente, era obtido de forma natural das plantas do gênero *Indigofera* sp. ou da *Isatis tinctoria*, mas atualmente é sintetizado para ser utilizado na indústria, especialmente na indústria têxtil para o tingimento de peças jeans. Como são peças bastante populares mundialmente e nunca saem de moda, existe uma grande demanda para produção desse tecido e conseqüentemente para produção do corante índigo carmim, responsável por conferir a famosa cor azul característica do jeans (Figura 1). Estima-se uma produção anual de 20.000 toneladas deste corante no mundo, sendo o Brasil o segundo maior produtor (BOOM *et al.*, 2022; CHOWDHURY *et al.*, 2020; VIANA; ROCHA; NUNES, 2008). É um corante que apresenta baixa fixação à fibra, de modo que o volume perdido durante a lavagem industrial pode chegar a 30% do que foi aplicado no tingimento, correspondendo a um desperdício aproximado de 2 milhões de toneladas por ano, considerando-se a quantidade de peças jeans produzidas mundialmente (BABU *et al.*, 2019; BUSCIO; CRESPI; GUTIÉRREZ-BOUZÁN, 2014). Por isso, os efluentes provenientes de grandes polos

industriais são bastante concentrados, apresentando coloração azul. É o que acontece, por exemplo, no agreste de Pernambuco, em cidades famosas pela produção de jeans, como Toritama, Caruaru e Santa Cruz do Capibaribe, onde águas residuais de cor azul intensa poluem o rio Capibaribe (BRAGA; ABREU, 2017).

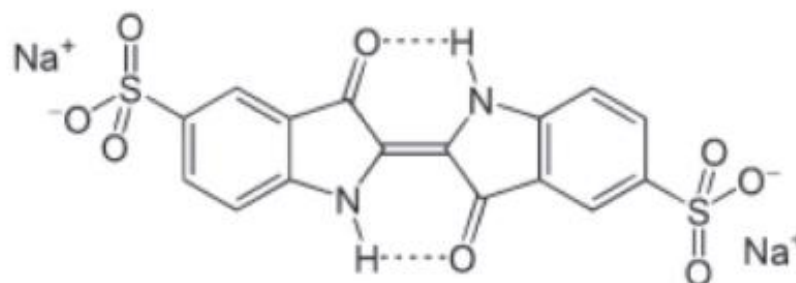
Figura 1 - Calças jeans tingidas com o corante sintético índigo carmim.



Fonte: This Is the Real Reason Blue Is the Most Common Denim Color. Reader's Digest, 2022.

Os corantes são classificados de acordo com a estrutura química do cromóforo (Tabela 1) e, além disso, de acordo com o modo de fixação à fibra têxtil (Tabela 2). O índigo carmim pertence à classe dos corantes indigóides, devido a sua estrutura química que apresenta anéis benzênicos, dupla ligação e átomos de nitrogênio (Figura 2) (CHOWDHURY *et al.*, 2020). É também classificado como um corante do tipo vat, também chamados de corantes à cuba ou à tina, pelo modo como é fixado à fibra têxtil, que ocorre com a adição de uma solução alcalina para reduzir a molécula à uma forma solúvel em água (forma leuco), que posteriormente é oxidada por ação do ar de volta à sua forma original (GUARATINI; ZANONI, 2000; BOOM *et al.*, 2022; BERRADI *et al.*, 2019; CHOUDHURY, 2017). Os corantes são adicionados na etapa de tingimento e precisam apresentar afinidade ao substrato que será colorido, por isso existem tantos tipos distintos de corantes que servem para colorir diferentes tipos de fibra (CARDOSO; BESSEGATO; ZANONI, 2016).

Figura 2 - Estrutura química do corante índigo carmim.



Fonte: Chowdhury, M.F. *et al.* Current treatment technologies and mechanisms for removal of indigo carmine dyes from wastewater: A review. *Journal of Molecular Liquids*, v. 318, 2020.

Tabela 1 - Classificação dos corantes de acordo com a estrutura química.

Classes	Estrutura do cromóforo	Corantes
Azo	N=N	Disperse Red 13
Nitroso	NO ou N-OH	Acid Green 1
Nitro	NO ₂ ou N-OH	Acid Orange 3
Índigoide	Anéis benzênicos com dois grupos NH e dois grupos C=O	Índigo carmim
Antraquinona	Anéis aromáticos com grupamentos carbonila	Reactive Blue 4
Ftalocianina	Compostos macrocíclicos, formados por anéis isoindóis	Direct Blue 86
Metinas	Cadeia de grupos -CH= em estrutura conjugada	Basic Red 12
Sulfurosos	Estrutura de benzotiazol	Sulphur Black 1
Metalizados	Presença de átomos de cobre, crômio e cobalto	Acid Black 180

Fonte: Adaptado de Berradi *et al.*, 2019; Carneiro; Zanoni, 2016; Nunes, 2019.

Tabela 2 - Classificação dos corantes pelo modo de fixação à fibra têxtil.

Classes	Modo de fixação à fibra	Principais tipos de fibras
Azoicos	Sintetizado sobre a fibra com impregnação por ação de um agente de acoplamento	Algodão, viscose, poliéster
Ácidos (aniônicos)	Interação iônica com a fibra	Poliamida, lã, seda
Básicos (catiônicos)	Interação iônica com a fibra	Lã, algodão, acrílico
À cuba/à tina/vat	Redução a forma solúvel (leuco), seguida de oxidação de volta ao estado original	Algodão, viscose, lã
Dispersivos	Dispersão por hidrólise sobre a fibra	Poliéster, poliamida, acrílico
Reativos	Grupo eletrófilo que se liga covalentemente à fibra	Algodão, lã, seda poliamida
Diretos	Interação com a fibra por interações de Van der Waals	Algodão, viscose, seda
De enxofre	Redução a forma solúvel (leuco), seguida de oxidação de volta ao estado original, com formação de pontes polissulfeto	Fibras celulósicas (algodão, linho, viscose, etc.)
Branqueadores	Aplicado em forma de suspensão	Todas as fibras
Pré-metalizados	Presença de grupos hidroxila ou carboxila que interagem com íons metálicos	Lã, couro

Fonte: Adaptado de Guaratini; Zanoni, 2000; Carneiro; Zanoni, 2016.

Diversos estudos relatam os efeitos tóxicos dos corantes em animais aquáticos, como microcrustáceos e peixes, e em algas e plantas aquáticas. Mortalidade das larvas, inibição da reprodução e do crescimento são alguns desses efeitos observados nos animais, enquanto a inibição do crescimento e diminuição do conteúdo de proteína e de clorofila são alguns dos efeitos em organismos autotróficos (VACCHI *et al.*, 2016; SHARMA; SHARMA; SONI, 2021). Além disso, as moléculas de corante, principalmente dos corantes pouco solúveis em água, podem formar aglomerados e causar danos físicos, como diminuição da locomoção em microcrustáceos (VACCHI *et al.*, 2016).

A toxicidade causada pela presença desses compostos na água decorre também da quebra das moléculas sob condições anaeróbicas, gerando produtos que podem ser ainda mais tóxicos do que a molécula completa. É o caso dos corantes azoicos, cuja degradação incompleta gera grupos amina que são agentes mutagênicos (ABADULLA *et al.*, 2000; ALMEIDA; DILARRI; CORSO, 2016; MADHAV *et al.*, 2018).

Muitos corantes têxteis são também bioacumulativos. Ou seja, uma vez absorvidos por um organismo podem ser passados adiante para outros organismos da cadeia trófica, inclusive para o ser humano, ao consumir peixes e outros frutos do mar de ambiente contaminado. O contato ou a ingestão da água contaminada pode ocasionar problemas de pele, náuseas e problemas respiratórios, entre outros males, além dos riscos de desenvolvimento de câncer, pois as moléculas de corantes são potencialmente mutagênicas (LELLIS *et al.*, 2019; MOYO; MAKHANYA; ZWANE, 2022; FERNANDES; SALVADORI, 2016; KHAN *et al.*, 2023; KISHOR *et al.*, 2021; BERRADI *et al.*, 2019; SHARMA; SHARMA; SONI, 2021). Irritações na pele e nos olhos e complicações respiratórias e gastrointestinais são alguns dos problemas que podem ser provocados pelo contato com o corante índigo carmim (BABU *et al.*, 2019; BOOM *et al.*, 2022).

Muitas comunidades utilizam água dos rios para diversos fins, como banho, lazer e pesca. Por isso, existe uma preocupação real quanto à qualidade da água disponível para a população, e especialmente para as pessoas que lidam diretamente com os cursos de água (KATHERESAN; KANSEDO; LAU, 2018).

3.3 Tratamento de efluentes têxteis

Por conta dos riscos que os efluentes oferecem ao meio ambiente e à saúde humana, eles devem passar por estações de tratamento para redução da carga poluente e da intensidade de cor. No entanto, existem ainda muitos desafios na remediação desses efluentes relacionados à remoção dos compostos químicos e à toxicidade dos resíduos produzidos durante o tratamento (RAMOS *et al.*, 2021; CARDOSO; BESSEGATO; ZANONI, 2016).

Um dos grandes desafios na remoção dos corantes é a degradação eficiente, pois os corantes são substâncias recalcitrantes, sintetizadas para resistir à descoloração, altas temperaturas, atividade microbiana, entre outros fatores. Além disso, existe a dificuldade em encontrar métodos abrangentes, que consigam remover diferentes tipos de corantes com eficiência, pois os efluentes contêm uma grande diversidade de corantes que são utilizados no tingimento, já que são necessários corantes com características específicas que permitam a adesão à cada tipo de fibra (ALMEIDA *et al.*, 2012; CARDOSO; BESSEGATO; ZANONI, 2016). Um outro desafio é realizar a remediação sem gerar subprodutos mais ou igualmente tóxicos às moléculas originais. A degradação incompleta de corantes azo, por exemplo, produz aminas aromáticas, que são compostos tóxicos, assim como alguns métodos físico-químicos, como a ozonização, utilizam reagentes tóxicos e geram intermediários danosos ao meio ambiente (RANE; JOSHI, 2021; CARDOSO; BESSEGATO; ZANONI, 2016).

Portanto, o método ideal seria aquele que conseguisse promover a maior taxa de descoloração, com degradação das moléculas de diferentes tipos de corantes, sem gerar produtos tóxicos da reação de degradação, e que tenha bom custo benefício, unindo baixo custo de operação e manutenção no menor tempo possível. Os métodos mais eficientes são aqueles que chegam perto disso, ou que atendam ao maior número desses critérios (ADANE; ADUGNA; ALEMAYEHU, 2021; KATHERESAN; KANSEDO; LAU, 2018).

No cenário real, os métodos de remediação dos efluentes têxteis são variados e o tratamento do efluente pode ocorrer a partir da combinação de diferentes métodos, visando atingir o máximo de eficiência dentro das possibilidades existentes. Esses métodos podem ser de natureza física, química ou biológica e o principal objetivo é

transformar as substâncias poluentes em compostos inócuos (Tabela 3) (ADANE; ADUGNA; ALEMAYEHU, 2021; ALVES *et al.*, 2019; KATHERESAN; KANSEDO; LAU, 2018; MOYO; MAKHANYA; ZWANE, 2022; PEREIRA *et al.*, 2010).

Tabela 3 - Métodos físicos, químicos e biológicos utilizados na remediação de efluentes e suas vantagens e desvantagens.

Métodos físicos	Vantagens	Desvantagens
Adsorção	Alta eficiência e afinidade pelos poluentes	Custo elevado
Filtração	Remoção eficiente	Produção de lodo concentrado
Flotação	Remoção eficiente de sólidos e matéria orgânica	Geração de lodo residual
Métodos químicos	Vantagens	Desvantagens
Foto catálise	Reagentes acessíveis e não tóxicos	Baixa eficiência na remoção de corantes
Oxidação	Alta estabilidade	Custo elevado; geração de subprodutos indesejados
Ozonização	Estado gasoso, não altera o volume do efluente	Custo elevado; produção de subprodutos tóxicos
Métodos biológicos	Vantagens	Desvantagens
Biodegradação	Degradação eficiente; baixa produção de subprodutos indesejáveis	Controle constante das condições; alguns corantes são resistentes à degradação biológica
Biossorção	Econômico; material pode ser reutilizado	Geração de biomassa contaminada
Processos aeróbios e anaeróbios	Eficiência na remoção de DBO (aeróbios); baixa produção de lodo (anaeróbios)	Baixa degradação de corantes

Fonte: Adaptado de Adane; Adugna; Alemayehu, 2021; Ardila-Leal *et al.*, 2021; Cardoso; Bessegato; Zanoni, 2016.

Adsorção, filtração e remoção por troca iônica são alguns dos métodos de natureza física utilizados e apresentam vantagens como a facilidade de operação e aplicabilidade a uma ampla variedade de corantes. Porém, apresentam desvantagens como o alto custo operacional, manutenção frequente, geração de lodo residual e baixa eficiência na remoção de corantes (ADANE; ADUGNA; ALEMAYEHU, 2021; KHAN *et al.*, 2023).

Os métodos químicos consistem em processos de oxidação, como foto catálise e ozonização, que são bastante eficazes, mas também costumam ser dispendiosos e geram subprodutos que podem ser igualmente tóxicos às moléculas de corante (KHAN *et al.*, 2023; KATHERESAN; KANSEDO; LAU, 2018).

De maneira geral, as técnicas convencionais que utilizam métodos físico-químicos são suficientes para atingir os parâmetros estabelecidos pelos órgãos ambientais, mas nenhum método promove a remoção completa dos contaminantes. Muitos métodos diminuem a cor e a concentração de corantes e demais poluentes, sem necessariamente degradar as moléculas. Ou seja, o efluente, mesmo após tratamento, ainda contém estruturas químicas tóxicas e cancerígenas e é descartado nos ecossistemas aquáticos (SHARMA; SHARMA; SONI, 2021; LELLIS *et al.*, 2019). Além disso, a maioria dos métodos empregados apresentam alto custo, necessitam manutenção constante ou produzem também resíduos não biodegradáveis, entre outras limitações (ADANE; ADUGNA; ALEMAYEHU, 2021).

Os métodos de natureza biológica se apresentam como alternativas mais sustentáveis devido a utilização de microrganismos, ou enzimas produzidas pelos microrganismos, consumindo e gerando produtos que são biodegradáveis. Bactérias, fungos e algas são alguns dos organismos utilizados. Algumas vantagens desses métodos são o menor custo e a infraestrutura mais simples, em comparação aos processos físico-químicos (ADANE; ADUGNA; ALEMAYEHU, 2021). Existem processos aeróbios, como o de lodo ativado que é bastante utilizado na indústria com o objetivo de remover resíduos por decantação, apresentando boa eficiência e baixo custo. Existem também os processos anaeróbios, que utilizam biodigestores onde ocorrem as reações de decomposição de compostos biodegradáveis, produzindo gás carbônico ou metano. No entanto, nem os processos aeróbios nem os anaeróbios são eficientes quanto à remoção de corantes (BELTRAME, 2000; BORAN *et al.*, 2019).

Para atuar na remediação dos corantes, bioissorção e biodegradação são os principais processos promissores em tratamentos biológicos. A bioissorção consiste na utilização da biomassa como matriz para adsorção dos poluentes, podendo ser utilizada a biomassa viva ou morta. Já na biodegradação, a remoção dos poluentes ocorre por ação das enzimas produzidas e secretadas pelos microrganismos, capazes de catalisar a quebra das ligações das moléculas dos compostos, convertendo-os em compostos simples e outros subprodutos (ADANE; ADUGNA; ALEMAYEHU, 2021).

Esses métodos também apresentam desvantagens, como a produção de lodo residual, devido ao crescimento excessivo do microrganismo, ou a utilização de microrganismos que precisam de condições específicas a serem mantidas, exigindo manutenção e controle constantes das condições. Além disso, métodos biológicos sozinhos podem não ser suficientes para a remoção de todos os compostos envolvidos nos processos industriais, necessitando a combinação com outros métodos (ADANE; ADUGNA; ALEMAYEHU, 2021). O tempo necessário para que a biodegradação ocorra e a baixa produção enzimática para escala industrial são também algumas limitações, por isso alguns métodos são considerados lentos para aplicação industrial (ARDILA-LEAL *et al.*, 2021; TAPIA-TUSSELL *et al.*, 2011).

Soluções vêm sendo desenvolvidas para minimizar essas limitações, a exemplo da tecnologia de cultura imobilizada, que permite o controle do crescimento e o reaproveitamento da cultura, ou a utilização de mediadores redox para acelerar a degradação dos corantes (ALAM *et al.*, 2023; ARDILA-LEAL *et al.*, 2021; BIRHANLI *et al.*, 2022; RANE; JOSHI, 2021).

3.4 Fungos como biorremediadores de efluentes industriais

3.4.1 Ecologia e metabolismo de fungos

Os fungos são organismos eucariontes, quimio-heterotróficos, uni ou multicelulares, e suas células são caracterizadas pela parede celular composta pelo polissacarídeo quitina. Os fungos multicelulares apresentam estrutura vegetativa, onde estão as células envolvidas no crescimento e catabolismo, e as estruturas reprodutivas, relacionadas à reprodução, que pode acontecer de forma sexuada ou assexuada. A massa celular é chamada de colônia e é composta por hifas, que são filamentos de várias células conectadas capazes de crescer a ponto de formar uma massa filamentosa macroscópica chamada micélio (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Estes organismos secretam enzimas no meio extracelular e essas enzimas clivam as ligações de moléculas orgânicas complexas, convertendo-as em moléculas simples. As células fúngicas absorvem as micromoléculas produzidas na reação e assim obtêm energia. Muitos fungos são capazes de metabolizar carboidratos

complexos, o que permite que cresçam em ambientes desfavoráveis a outros organismos (MADIGAN *et al.*, 2016; MOSTAFA *et al.*, 2019).

Em geral, são microrganismos aeróbios, como é o caso da maioria dos fungos filamentosos, ou anaeróbios facultativos, como as leveduras, mas existem algumas poucas espécies anaeróbias. Podem crescer em ambientes de condições consideradas adversas para a vida, como baixa umidade, pH ácido e salinidade alta (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Os fungos são de extrema importância ecológica uma vez que atuam como decompositores, promovendo a ciclagem de matéria orgânica e atuando na manutenção do equilíbrio biológico do ecossistema. Além disso, estabelecem importantes relações com plantas, auxiliando a absorção de minerais do solo pelas raízes, e com algas formando líquens, que muitas vezes são os primeiros organismos a colonizar espaços, tornando ambientes inóspitos em locais mais propícios ao estabelecimento de outros seres vivos e uma futura comunidade clímax (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; MARQUETE, 2012).

O Reino Fungi é dividido em cinco grandes grupos: Chytridiomycetes, Zygomycetes, Glomeromycetes, Ascomycetes e Basidiomycetes. Este último grupo é bastante diverso, incluindo mais de 30.000 espécies descritas, e sua principal característica é a presença de uma estrutura reprodutiva chamada basídio, onde os esporos são formados. Os principais fungos decompositores da madeira pertencem a este filo e podem ser classificados como fungos de podridão branca ou fungos de podridão marrom (ANDRADE, 2011).

A espécie *Trametes lactinea* (família Polyporaceae, ordem Polyporales, classe Agaricomycetes, filo Basidiomycota) é uma das espécies relacionadas à podridão branca da madeira. Macroscopicamente, apresenta basidioma espesso que é esbranquiçado quando jovem e que passa a ter tons cinzas quando maduro (Figura 3). Microscopicamente, apresenta hifas conectivas e basidiósporos em formato cilíndrico. É uma espécie de distribuição pantropical que já foi registrada em países como Brasil, Jamaica, Guiana, Venezuela, África do Sul, Filipinas, Austrália e China. No Brasil, há registros nos estados do Acre, Amazonas, Pará, Pernambuco, Rondônia, Sergipe e São Paulo (HAO *et al.*, 2021; PINTO, 2006; MADIGAN *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2020; ANDRADE, 2011; FERNANDES *et al.*, 2024).

Figura 3 - Aspecto macro morfológico do fungo *Trametes lactinea* em ambiente natural.



Fonte: *Trametes lactinea* Berk. Global Biodiversity Information Facility, 2024.

Assim como outras espécies de fungos envolvidos na decomposição branca da madeira, *T. lactinea* produz enzimas ligninolíticas, incluindo as enzimas lacases, que são enzimas que atuam na degradação de compostos fenólicos, como a lignina, e apresentam potencial para degradar moléculas de corantes sintéticos. Vários estudos relatam a produção de lacases pela espécie *T. lactinea* e o potencial de utilização dessa espécie e de outras do gênero na remediação dos efluentes e na degradação de corantes (ABADULLA *et al.*, 2000; ALAM *et al.*, 2023; AMARAL *et al.*, 2004; ANDRADE, 2011; BAKAR *et al.*, 2023; CAVALCANTE *et al.*, 2021; FERREIRA-SILVA *et al.*, 2022; GRASSI *et al.*, 2011; NEVES *et al.*, 2013; NYANHONGO *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2023; RAMÍREZ-MONTOYA *et al.*, 2015; SI; PENG; CUI, 2013; XU *et al.*, 2020; YEMENDZHIEV; ALEXIEVA; KRASTANOV, 2009).

3.4.2 Potencial biotecnológico dos fungos

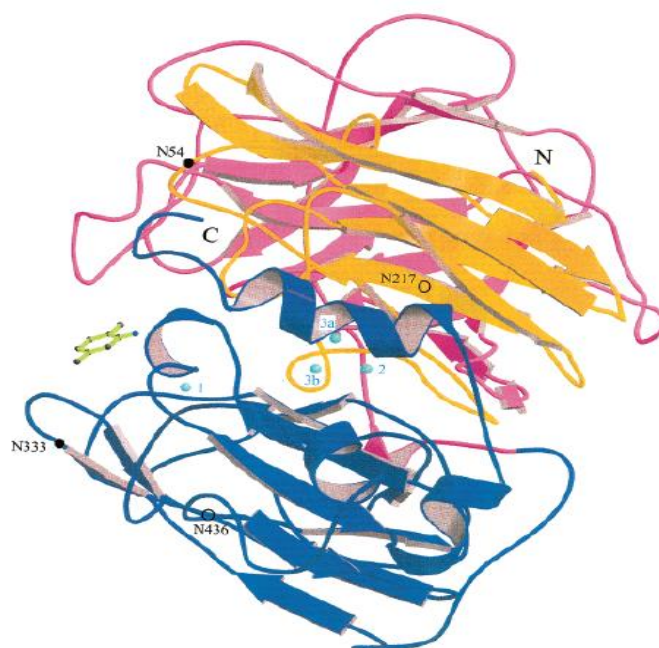
Os fungos produzem enzimas que catalisam a degradação de moléculas complexas em moléculas simples que são metabolizadas como fonte de carbono e energia. Este mecanismo natural pode ser aproveitado com um viés biotecnológico na remediação de efluentes poluídos, pois essas enzimas podem ter a capacidade de degradar moléculas de corante, que também são complexas e de difícil degradação

(ALMEIDA *et al.*, 2012; ARDILA-LEAL *et al.*, 2021; CAVALCANTE *et al.*, 2021; FERREIRA-SILVA *et al.*, 2022; SOARES, 2013; XU *et al.*, 2020).

A biorremediação com fungos pode ocorrer por biossorção e biodegradação, sendo esta a alternativa que se baseia na ação das enzimas sobre o substrato poluente. As principais enzimas com potencial para degradar corantes são as enzimas polifenoloxidasas, pois catalisam a degradação de compostos fenólicos e muitos corantes são formados por estruturas fenólicas (ALMEIDA *et al.*, 2012; SOARES, 2013). As enzimas ligninolíticas são um grupo de polifenoloxidasas que degradam a lignina, um polímero de estrutura complexa e resistente, sendo a lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase as três principais enzimas ligninolíticas (ZACCARIA, 2017). Essas enzimas apresentam potencial de uso na remediação dos efluentes (ARDILA-LEAL *et al.*, 2021; FERREIRA-SILVA *et al.*, 2022).

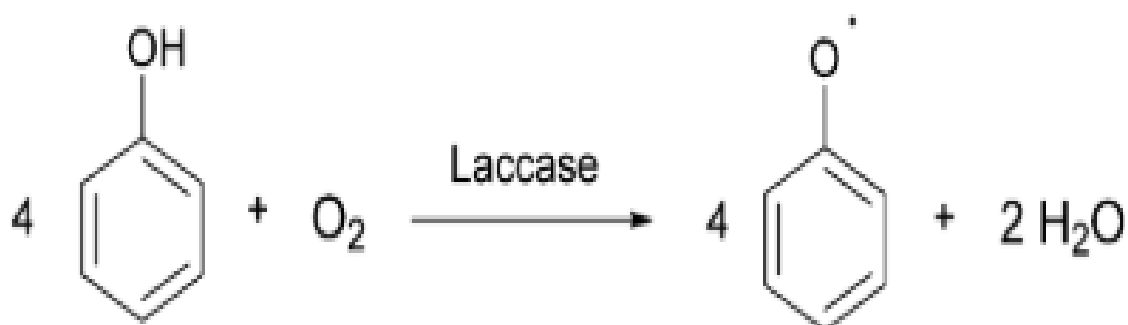
Dentre os grupos de enzimas ligninolíticas, o grupo das lacases (EC 1.10.3.2) é bastante investigado quanto ao seu potencial de degradação das moléculas de corantes. São enzimas oxidases que apresentam átomos de cobre em sua estrutura (Figura 4), em geral quatro átomos, e catalisam as reações a partir da redução do oxigênio a água. Após quatro ciclos de oxidação, ocorre a redução de uma molécula de oxigênio e a formação de duas moléculas de água (VIIKARI *et al.*, 2009; CARDULLO; MUCCILLI; TRINGALI, 2022) (Figura 5). Estão envolvidas não só na degradação e mineralização da lignina, mas também em outros processos como a formação do basidiocarpo e síntese de pigmentos (ARDILA-LEAL *et al.*, 2021). Apresentam baixa especificidade ao substrato, de modo que podem agir sobre uma variedade de substratos, inclusive compostos não-fenólicos, o que é bastante interessante do ponto de vista industrial (AMARAL *et al.*, 2004; BAKAR *et al.*, 2023; MANDIC *et al.*, 2019; SI *et al.*, 2021).

Figura 4 - Estrutura tridimensional da enzima lacase (LacIIIb, obtida do fungo *Trametes versicolor*). As esferas azuis 1, 2, 3a e 3b representam os átomos de cobre.



Fonte: Bertrand, T. *et al.* Crystal Structure of a Four-Copper Laccase Complexed with an Arylamine: Insights into Substrate Recognition and Correlation with Kinetics. *Biochemistry*, v. 41, n. 23, 2002.

Figura 5 - Reação geral de oxirredução de compostos fenólicos catalisada pela enzima lacase.



Fonte: Cardullo, N.; Muccilli, V.; Tringali, C. Laccase-mediated synthesis of bioactive natural products and their analogues. *RSC Chemical Biology*, v. 3, n. 614, 2022.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia de Microrganismos, localizado no Departamento de Biologia Molecular (DBM) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), localizado no Campus I da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.1 Microrganismo

A espécie *Trametes lactinea* é um fungo filamentosos que se destaca dentro do grupo de pesquisa, apresentando potencial na descoloração de corantes sintéticos e na produção da enzima lacase, e por isso foi considerado para este trabalho. Ferreira-Silva *et al.* (2022) e Santana (2022) demonstraram o potencial de uso dessa espécie na descoloração do corante índigo carmim. A cepa utilizada nos experimentos já havia sido coletada por Ferreira-Silva *et al.* (2022) no campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em região de Mata Atlântica, em 2019, e depositada na Coleção de Culturas Micoteca URM, do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da UFPE. Para o presente trabalho, a cepa, que estava estocada no laboratório sob refrigeração, foi repicada em placas de Petri em meio Bushnell Haas Agar (BHA), que foram incubadas na estufa a 30°C por 7 dias para crescimento da cultura.

Screening da produção da lacase por *Trametes lactinea*

Para avaliar o potencial da espécie na descoloração do corante índigo carmim, foi realizado um teste em meio líquido Sabouraud Dextrose contendo solução do corante, preparada na concentração de 25 ppm. Em dois frascos de Erlenmeyer de 50 mL, foram adicionados 10 mL do meio, 5 mL da solução de corante e três discos de 9 mm da cultura crescida em BHA, em cada frasco. Antes da inoculação, foi realizada a autoclavagem do meio com corante a 121°C por 15 minutos. Os frascos ficaram incubados na estufa a 30°C por 120 horas, juntamente com o controle negativo, constituído por 10 mL do meio líquido e 5 mL da solução de corante, sem adição do microrganismo.

Após as 120 horas de incubação, os ensaios foram filtrados em filtros de papel e centrifugados para obtenção do sobrenadante, utilizado como amostra para leitura de absorbância no espectrofotômetro. Os valores de absorbância foram utilizados

para calcular o percentual de descoloração (Equação 1). As leituras foram feitas em duplicata e os cálculos foram feitos com base na média de absorbância.

Equação 1 - Cálculo do percentual de descoloração do corante.

$$D (\%) = \left[\frac{Abs\ controle - Abs\ amostra}{Abs\ controle} \right] \times 100$$

Onde:

Abs controle – valor de absorbância da amostra controle;

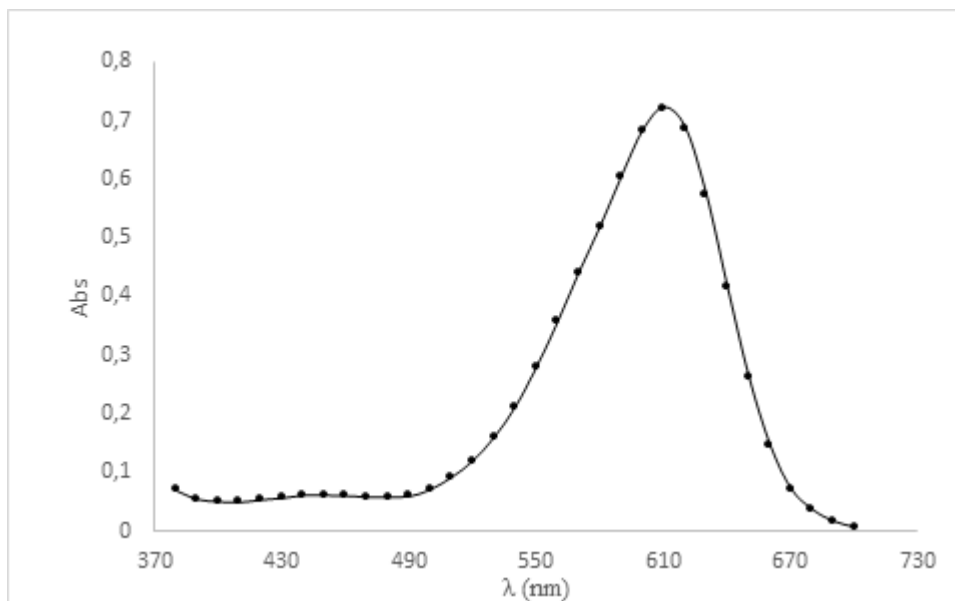
Abs amostra – valor de absorbância da amostra tratada.

4.2 Corante índigo carmim

O corante utilizado foi o corante sintético índigo carmim adquirido comercialmente da empresa Sigma-Aldrich. Foi realizada uma varredura do corante no espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 380 nm a 700 nm, fazendo a leitura a cada 10 nm, para verificar em qual comprimento de onda ocorre maior absorbância. A solução do corante utilizada para fazer a varredura foi preparada na concentração de 25 ppm.

A varredura revelou um pico de absorbância em 610 nm (Figura 6), corroborando informações de outros trabalhos realizados com o corante índigo carmim (BOOM *et al.*, 2022; GUPTA *et al.*, 2022; ALENCAR; ARAÚJO, 2020; BORAN *et al.*, 2019; RAMYA; ANUSHA; KALAVATHY, 2008). Por isso, as amostras dos ensaios de descoloração foram lidas no espectrofotômetro nesse comprimento de onda, para cálculo do percentual de descoloração (Equação 1).

Figura 6 - Gráfico da varredura do corante índigo carmim (solução de 25 ppm), evidenciando o pico de absorbância no comprimento de onda 610 nm.



Fonte: a autora (2022).

4.3 Ensaio enzimáticos e testes de descoloração para determinação de condições ótimas

4.3.1 Planejamento fatorial fracionário 2^{5-1}

Foi realizado um planejamento fatorial a fim de avaliar a influência de algumas variáveis sobre a atividade da lacase produzida por *T. lactinea*. Cinco variáveis independentes foram consideradas e o planejamento foi do tipo fracionário 2^{5-1} com 3 repetições do ponto central, totalizando 19 ensaios. As variáveis independentes foram: concentrações de glicose, farelo de trigo, ácido tânico, sulfato de cobre e tempo de cultivo em dias (Tabela 4). A variável resposta mensurada foi a atividade da enzima lacase. A matriz do planejamento foi obtida com o auxílio do software Statistica versão 7.0 (Tabela 5).

Tabela 4 - Variáveis independentes e os níveis avaliados no planejamento fatorial 2^{5-1} .

	Glicose (g)	Farelo de trigo (g)	Ácido tânico (mg)	Solução de CuSO₄.5H₂O 1M (µL)	Tempo de cultivo (dias)
Nível (-)	0,025	0,25	0,2	200	5
Nível (+)	0,075	0,75	0,4	500	15
Ponto central	0,050	0,50	0,3	350	10

Fonte: a autora (2024).

Tabela 5 - Matriz do planejamento fatorial 2^{5-1} evidenciando os níveis avaliados para cada variável nos ensaios.

Ensaio	Glicose	Farelo de trigo	Ácido tânico	Solução de CuSO₄.5H₂O 1M	Tempo de cultivo
1	-1	-1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1	-1
4	1	1	-1	-1	1
5	-1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1	1
8	1	1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1
10	1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	1	1
12	1	1	-1	1	-1
13	-1	-1	1	1	1
14	1	-1	1	1	-1
15	-1	1	1	1	-1
16	1	1	1	1	1
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0

Fonte: a autora (2024).

Esses ensaios foram realizados em meio mínimo preparado a partir de adaptações do meio de Olga *et al.*, 1998 (OLGA *et al.*, 1998; VISWANATH *et al.*, 2008), contendo (por litro): 0,6 g de KH_2PO_4 , 0,001 g de ZnSO_4 , 0,04 g de K_2HPO_4 , 0,05 g de MnSO_4 , 0,05 g de MgSO_4 ; pH 4,5. Para esses ensaios, a cepa foi repicada em placas de Petri em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e incubada por 7 dias, na estufa a 30°C, para obtenção de uma cultura nova como fonte de inóculo.

Em cada um dos 19 frascos, correspondentes a cada ensaio do planejamento, foram adicionados 50 mL do meio e dois discos de 9 mm da cultura fúngica crescida em BDA. Além disso, foram adicionados os fatores glicose, farelo de trigo, ácido tânico e sulfato de cobre pentahidratado conforme as quantidades descritas na matriz do planejamento para cada ensaio. Todos os ensaios foram incubados no shaker com agitação de 50 rpm, na temperatura de 30°C, e o tempo de incubação variou conforme a matriz do planejamento. Ao final do tempo para cada ensaio, os frascos eram retirados do shaker, os ensaios eram filtrados em filtros de papel e centrifugados (120 rpm por 10 minutos) para obtenção de amostras do extrato enzimático produzido pelo fungo. As amostras foram utilizadas para fazer a dosagem de proteínas solúveis totais e da enzima lacase.

Quantificação da lacase

A metodologia de dosagem da enzima lacase consistiu em adicionar 1000 μL de solução tampão de acetato de sódio (concentração 50 mM e pH 5,5), 600 μL de substrato ABTS [2-2'-azino-bis (3-etilbentiazolina-6-ácido sulfônico)], na concentração de 1,6 mM, e 600 μL do extrato enzimático em tubos de eppendorf. Os tubos ficaram no banho maria a 37°C por 10 minutos e em seguida foram colocados no espectrofotômetro para leitura da absorbância no comprimento de onda de 420 nm. A amostra branca foi composta apenas pela solução de tampão acetato de sódio (BOURBONNAIS *et al.*, 1997).

Quantificação das proteínas solúveis totais

A dosagem de proteínas totais foi feita pelo método de Bradford, com adição de 1500 μL de água destilada, 200 μL do reagente de Bradford e 200 μL do extrato enzimático em tubos de eppendorf, deixados no abrigo da luz por 15 minutos e realização da leitura de absorbância no espectrofotômetro no comprimento de onda 595 nm. O branco foi composto por água destilada (BRADFORD, 1976).

Os valores de absorvância foram utilizados para calcular a unidade de atividade enzimática (Equação 2) (ZACCARIA, 2017), com base na absorvidade molar do ABTS ($\epsilon_{420\text{nm}} = 36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). A unidade de atividade enzimática (U/mL) foi definida como 1 μmol do produto da reação formado por minuto (BOURBONNAIS *et al.*, 1997).

Equação 2 - Cálculo da atividade enzimática em unidade por litro.

$$\frac{U}{L} = \frac{Abs \cdot t \cdot Vt \cdot 10^6}{\epsilon \cdot Va}$$

Onde:

Abs – valor da absorvância da amostra;

t – tempo de reação (minutos);

Vt – volume total da reação (mL);

Va – volume da amostra (mL);

ϵ – coeficiente de absorvidade molar do substrato ABTS;

10^6 – conversão de U/L em U/mL.

A concentração de proteínas foi determinada pela equação da curva-padrão feita previamente com solução de albumina ($R^2 = 0,9737$) utilizando os valores de absorvância obtidos da leitura no espectrofotômetro pelo método de Bradford.

Análise estatística

A análise estatística foi feita através da análise de Pareto, que permite verificar quais parâmetros testados afetam significativamente a variável resposta, nesse caso, a atividade da lacase. A análise foi realizada no software Statistica 7.0.

4.3.2 Teste de descoloração utilizando extratos obtidos dos experimentos do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1}

Foram obtidas amostras a partir do filtrado de cada um dos 19 ensaios do planejamento fatorial para realizar testes de descoloração do índigo carmim. Em 19 frascos Erlenmeyer, foram adicionados 50 mL de solução do corante índigo carmim (2,35 mg/mL) e 15 mL de extrato enzimático, obtido de cada ensaio do planejamento fatorial. Preparou-se uma solução controle com 50 mL do corante e 15 mL de água

destilada. Os frascos foram incubados a 35°C por 48 horas em agitação de 50 rpm. Após este período, foi feita a leitura da solução controle e das amostras descoloridas no espectrofotômetro em 610 nm, pico de absorbância do índigo carmim. Os valores de absorbância foram utilizados para calcular os percentuais de descoloração (Equação 1).

4.3.3 Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Os dados obtidos do planejamento fatorial fracionário serviram como base para a realização de um delineamento composto central rotacional (DCCR), visando encontrar as condições ótimas de cultivo para a atividade enzimática por *T. lactinea*. Essa metodologia permite chegar à região do ótimo a partir da realização de experimentos sequenciais que representam uma amostra da região experimental, possibilitando economia de tempo e recursos (MATEUS; BARBIN; CONAGIN, 2001).

A análise de Pareto do planejamento fatorial revelou significância dos fatores concentração de ácido tânico e tempo de cultivo em dias. Nesse sentido, o DCCR considerou apenas essas duas variáveis independentes, com 5 níveis (Tabela 6) para cada e 3 repetições do ponto central, totalizando 11 ensaios, para a variável resposta atividade da lacase. A matriz do planejamento foi obtida com auxílio do software Statistica (Tabela 7).

Tabela 6 - Variáveis independentes e os níveis avaliados no delineamento composto central rotacional (DCCR).

	Ácido tânico (mg)	Tempo de cultivo (horas)
Nível (-1,41)	0,12	52
Nível (-1)	0,2	72
Nível 0	0,4	120
Nível 1	0,6	168
Nível 1,41	0,86	188

Fonte: a autora (2024).

Tabela 7 - Matriz do DCCR evidenciando os níveis avaliados para cada variável nos ensaios.

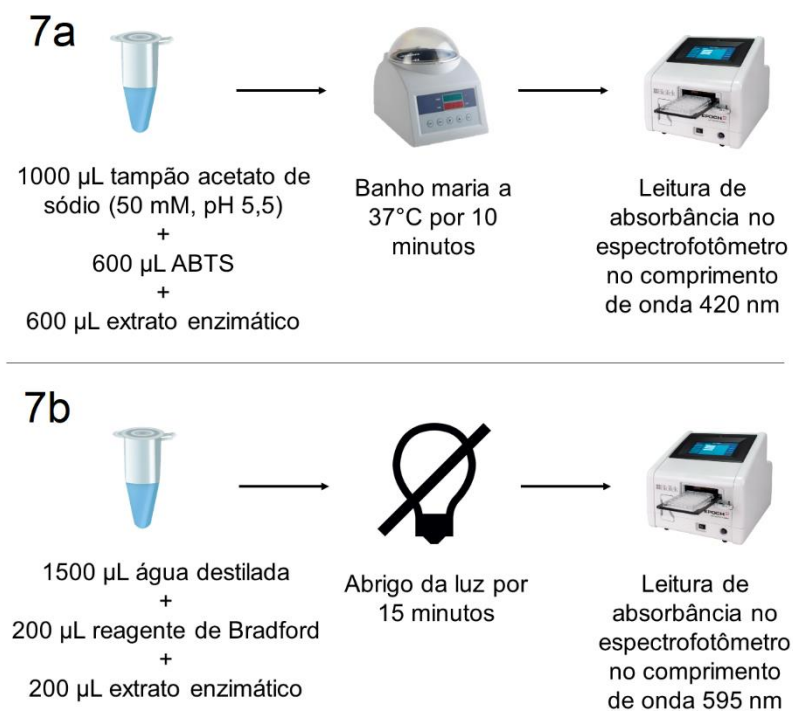
Ensaio	Ácido tânico	Tempo de cultivo
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Fonte: a autora (2024).

Cada ensaio foi composto por 50 mL do meio mínimo líquido, adaptado de Olga *et al.* (1998), enriquecido com 0,025 gramas de glicose, 0,25 gramas de farelo de trigo e 200 μL CuSO_4 (1 M), autoclavados a 121°C por 15 minutos, com a posterior adição de dois discos de 9 mm do fungo *T. lactinea*, previamente crescido em meio BDA. Em seguida, adicionou-se ácido tânico nas concentrações descritas na matriz do delineamento para cada ensaio e o tempo de incubação também variou de acordo com a matriz. Os ensaios ficaram incubados no shaker, em agitação de 50 rpm.

Ao final do tempo de cultivo para cada ensaio, os frascos eram retirados do shaker, os ensaios eram filtrados em papel filtro e as amostras obtidas eram utilizadas para dosagem das proteínas solúveis totais e da lacase. As metodologias de dosagem utilizadas foram as mesmas utilizadas nos experimentos do planejamento fatorial (Figura 7).

Figura 7 - Metodologia de dosagem da enzima lacase (7a) e metodologia de dosagem das proteínas solúveis totais (7b).



Fonte: a autora (2024).

4.4 Produção do extrato enzimático nas condições ótimas de cultivo

Realizou-se um ensaio para obtenção de um extrato enzimático nas condições ótimas atingidas a partir dos experimentos anteriores (0,4 mg de ácido tânico e 120 horas de incubação). O fungo *T. lactinea* foi repicado em meio Sabouraud Ágar em placas de Petri, que foram incubadas na estufa a 30°C por 7 dias para crescimento do microrganismo. O meio de cultivo foi o mesmo utilizado nos ensaios anteriores, adaptado de Olga *et al.* (1998) e autoclavado (121°C, 15 minutos), e os ensaios foram feitos em quintuplicata. Em cada um dos cinco frascos foram adicionados 50 mL do meio, 0,025 gramas de glicose, 0,25 gramas de farelo de trigo e 200 µL de CuSO₄ (1 M), assim como 0,4 mg de ácido tânico e dois discos de 9 mm do fungo crescido em Sabouraud Agar. Os ensaios foram incubados no shaker, em agitação de 50 rpm, a 35°C, por 120 horas.

Após esse período de 120 horas, os ensaios foram retirados do shaker e filtrados em papel filtro, para extração do complexo enzimático produzido e liberado

pelo fungo nas condições ótimas testadas. O filtrado constituiu o extrato enzimático que foi utilizado para promover a descoloração do corante índigo carmim. Além disso, as amostras foram centrifugadas e submetidas aos testes de dosagem de proteínas solúveis totais e de lacase, seguindo as mesmas metodologias utilizadas em etapas anteriores deste trabalho (Figura 7).

4.5 Ensaio de descoloração do corante índigo carmim pelo extrato enzimático

Para avaliar se a descoloração do corante índigo carmim ocorre por ação enzimática, sem a presença de massa celular fúngica, realizou-se um ensaio de descoloração com o complexo enzimático produzido por *T. lactinea* nas condições ótimas testadas (presença de 0,4 mg de ácido tânico e incubação por 120 horas). O ensaio foi feito em quintuplicata, cada frasco contendo 50 mL da solução do corante índigo carmim, preparada na concentração de 20 ppm, e 5 mL de amostra do extrato enzimático. A solução controle foi composta apenas por 50 mL da solução do corante índigo carmim (20 ppm).

Os frascos foram incubados no shaker, em agitação de 50 rpm, a 30°C por 7, 15 e 21 dias. Ao final de cada tempo de ensaio, amostras eram retiradas para realizar a leitura de absorvância no espectrofotômetro no comprimento de onda de 610 nm, e assim calcular os percentuais de descoloração (Equação 1).

4.6 Análise da estrutura do corante índigo carmim

Também foram extraídas amostras para realização de espectroscopia de infravermelho e espectroscopia de ultravioleta (UV-Visível), com o intuito de avaliar se houve modificação da estrutura química das moléculas do corante nas soluções tratadas com o complexo enzimático (YADAV *et al.*, 2021; SOSA-MARTÍNEZ *et al.*, 2020).

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi a técnica usada e foi feita pela equipe do Laboratório de Análises de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), localizado no CCEN/UFPB Campus I. A análise foi realizada por ATR (reflectância total atenuada) com as amostras líquidas retiradas dos ensaios tratados após 7, 15 e 21 dias, e amostras do ensaio controle retiradas após 7, 15 e 21 dias também, na região de 4000-600 cm^{-1} , 16 acumulações e resolução de 4,0.

A espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) foi realizada no equipamento Multiskan GO/Thermo Scientific leitor de microplacas (modelo KineticLoop1) na faixa de 300 a 700 nm de comprimento de onda, que fica no Laboratório Multiusuário do DBM (LMDBM), no CCEN/UFPB Campus I.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio inicial de descoloração do índigo carmim pela espécie *Trametes lactinea*

Esse experimento de descoloração e a varredura do corante índigo carmim fizeram parte de um trabalho apresentado no Congresso Internacional de Saúde e Meio Ambiente - CINASAMA e publicado como capítulo de livro no ebook “Ciências Naturais, Agrárias e Exatas: Pesquisa, tecnologia e aplicabilidade” de 2023 (SANTOS; NASCIMENTO; SILVA, 2023).

O ensaio de descoloração revelou 47% de descoloração do índigo carmim após os cinco dias de tratamento. Outros estudos também demonstraram a capacidade da espécie *T. lactinea* e de outras espécies do mesmo gênero para descolorir soluções coradas, com percentuais variados de descoloração. Ferreira-Silva *et al.* (2022) avaliaram a descoloração do corante índigo carmim com discos dos fungos *T. villosa* e *T. lactinea*, obtendo 96,11% com *T. villosa*, e 81,40% e 85,09% com *T. lactinea* após 120 horas. Oliveira *et al.* (2023) avaliaram a descoloração do efluente têxtil obtido de um polo industrial de jeans com várias cepas fúngicas, tendo a cepa de *T. lactinea* descolorido 51,35% do efluente após 5 dias. Oliveira *et al.* (2010) avaliaram a descoloração de diferentes corantes sintéticos adicionando discos de micélio de *T. villosa* às soluções coloridas e obtiveram descoloração máxima de 92% do corante amarelo cibracron em meio suplementado com sacarose em um período de 24 horas.

No presente trabalho, foi observada adsorção do corante pela biomassa, pois o micélio passou a apresentar tom azul, corroborando outros trabalhos realizados com diferentes espécies do gênero *Trametes*. A maioria dos trabalhos verificam que a bioadsorção acontece, mas geralmente contribui pouco para o processo de descoloração, não sendo considerado o principal mecanismo de descoloração observado para esses fungos (ABADULLA *et al.*, 2000; LIBRA; BORCHERT; BANIT, 2003; ORTIZ-MONSALVE, 2015; CARDOSO, 2023; PERTIWI; DEWI; SARI, 2020). Assim, os experimentos seguintes foram realizados visando otimizar o processo de descoloração por degradação enzimática.

5.2 Avaliação da influência das variáveis glicose, farelo de trigo, ácido tânico, sulfato de cobre e tempo de cultivo na atividade enzimática

Sabe-se que muitos fatores podem acelerar ou prejudicar o processo de descoloração, por exercerem influência no metabolismo do microrganismo em questão (ALAM *et al.*, 2023; ALMEIDA *et al.*, 2012). Objetivando avaliar a influência de alguns fatores sobre a atividade enzimática por *T. lactinea*, realizou-se o planejamento fatorial do tipo fracionário 2^{5-1} . O planejamento fatorial é uma metodologia de triagem que permite avaliar a influência de um grande número de fatores sobre uma variável resposta a partir de um número reduzido de ensaios, além de considerar as inter-relações entre as variáveis (CUNICO *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2023; MATTIETTO; MATTA, 2012).

As variáveis independentes avaliadas foram as concentrações de glicose, farelo de trigo, ácido tânico, sulfato de cobre e o tempo de cultivo. O ácido tânico atua como substrato indutor da produção de lacase (ALMEIDA *et al.*, 2012), e a glicose serviu como uma fonte de carbono extra, o que pode melhorar a performance do fungo na produção de enzimas, algo discutido e sugerido em outros trabalhos (AMARAL *et al.*, 2004; AMEEN *et al.*, 2021). O farelo de trigo é obtido do grão de trigo. Por isso, contém lignina além de ser rico em carboidratos, incluindo a celulose, atuando como fonte de nutriente para o fungo e fornecendo substrato para a lacase. O sulfato de cobre pode atuar como indutor da produção de lacase por ser uma fonte de cobre, elemento necessário para sua atividade, já que compõe o sítio catalítico da enzima (XU *et al.*, 2020; BERTRAND *et al.*, 2002).

Detectou-se a produção e atividade de lacase por *T. lactinea* nas diferentes condições testadas nos experimentos do planejamento fatorial, com resultados bastante variados (Tabela 8) (Figura 8). Observa-se que a maioria das amostras que tiveram os valores mais expressivos de atividade enzimática ficaram incubadas por 5 dias (120 horas) e tinham 0,4 mg de ácido tânico, o que sugere que concentrações de ácido tânico abaixo de 0,4 mg podem não ser suficientes para estimular a produção de lacase por *T. lactinea*, e que um período de tempo acima de 120 horas não é necessário, o que é interessante para aplicação prática. O período de 120 horas pode ser também um indicativo de que, após esse tempo, a enzima vai perdendo atividade, ou ainda que esse seja o tempo suficiente para consumir o ácido tânico e a glicose

disponíveis, diminuindo a produção de enzimas (LIBRA; BORCHERT; BANIT, 2003; CAVALCANTE *et al.*, 2021; ALMEIDA *et al.*, 2012; COUTO, 2007). A diminuição na atividade de lacase após vários dias pode ser atribuída também à produção de proteases, situação que pode ser contornada pela utilização de extrato purificado de lacase ou por imobilização da cultura (LIBRA; BORCHERT; BANIT, 2003). Os resultados corroboram essas hipóteses, pois as menores concentrações de lacase (U/mg de proteína) foram observadas nas amostras que ficaram incubadas pelo tempo máximo avaliado, de 15 dias.

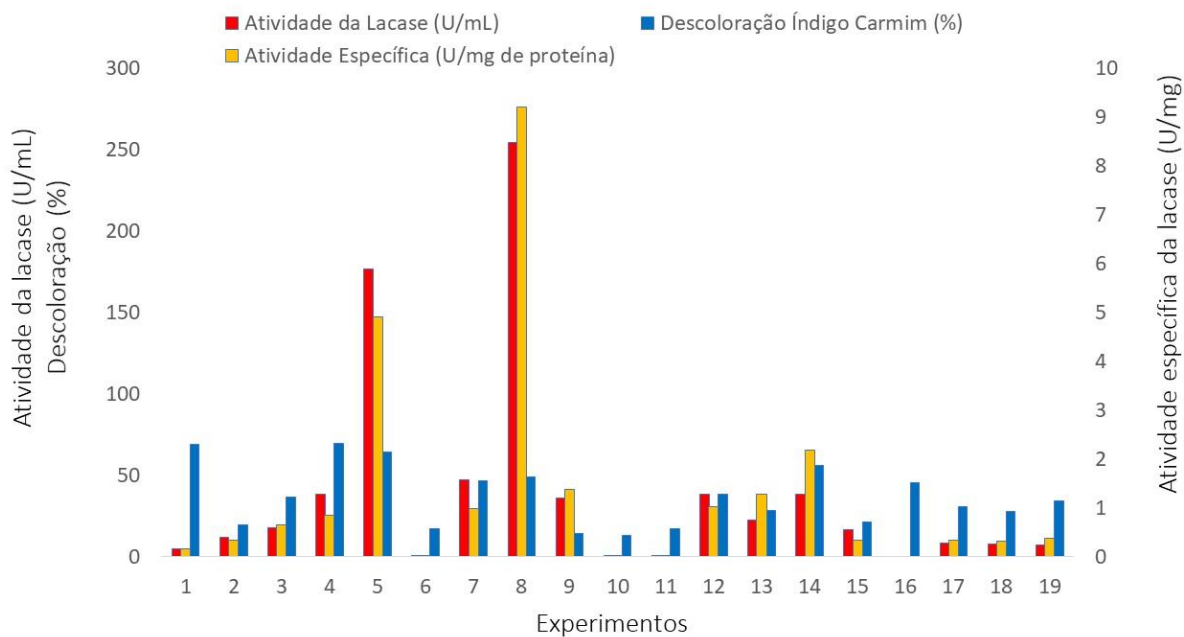
A análise estatística pelo diagrama de Pareto revelou que os fatores ácido tânico e tempo são estatisticamente significativos, pois cruzam a linha de referência, sugerindo que esses fatores exercem influência significativa sobre a atividade da lacase (Figura 9). O diagrama também foi plotado para a variável resposta atividade específica (U/mg), e para essa variável resposta a relação combinada de glicose e farelo de trigo também cruza a linha de referência (Figura 10). Ambos os compostos atuam como fonte de nutrientes, e o farelo de trigo é também uma fonte de nitrogênio e contém lignina. Assim, a ação conjunta desses fatores estimulando a atividade da lacase pode ser explicada pela utilização da glicose como fonte primária de carbono e o farelo de trigo como indutor metabólico.

Tabela 8 - Atividade da lacase (U/mL), concentração de proteínas solúveis (mg/mL) e atividade específica da lacase por miligrama de proteína (U/mg) dos ensaios do planejamento fatorial 2^{5-1} , e percentual de descoloração do índigo carmim pelas amostras obtidas dos ensaios do planejamento.

Amostras	Atividade da lacase (U/mL)	Concentração de proteínas solúveis totais (mg/mL)	Atividade específica da lacase (U/mg)	Descoloração (%)
1	4,575	29,057	0,157	69,25
2	12,20	36,389	0,335	19,54
3	17,791	27,171	0,654	36,71
4	38,125	45,188	0,843	69,52
5	176,900	35,970	4,917	64,17
6	0,203	21,515	0,009	17,12
7	47,275	48,121	0,982	46,82
8	254,166	27,590	9,212	48,78
9	36,091	26,124	1,381	14,24
10	0,711	23,610	0,030	13,27
11	0,203	38,694	0,005	17,44
12	38,125	37,227	1,024	38,32
13	22,570	17,534	1,287	28,51
14	38,633	17,744	2,177	56,09
15	16,775	50,844	0,329	21,56
16	-	17,953	-	45,50
17	8,235	23,610	0,348	30,71
18	8,031	24,657	0,325	27,82
19	7,116	19,000	0,374	34,04

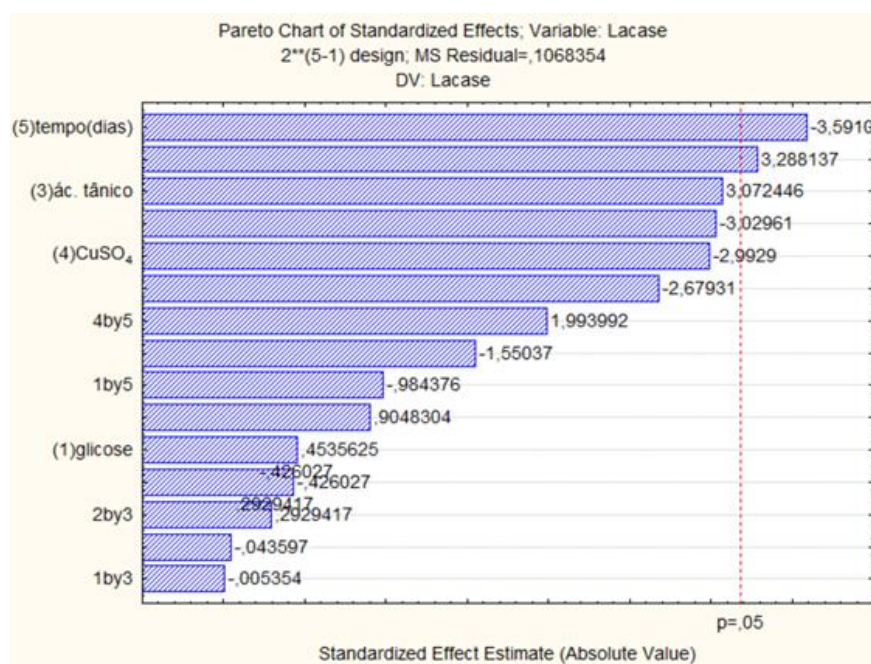
Fonte: a autora (2024).

Figura 8 - Atividade da lacase, percentual de descoloração do corante índigo carmim e atividade específica da lacase para cada experimento do planejamento fatorial.



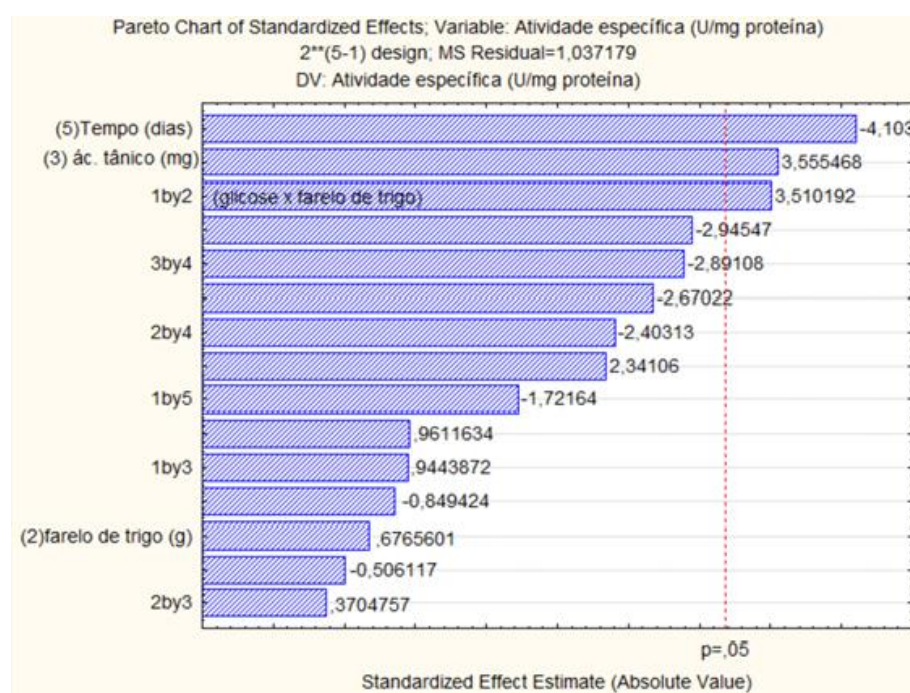
Fonte: a autora (2024).

Figura 9 - Diagrama de Pareto destacando a relação entre as variáveis independentes tempo e ácido tânico sobre a variável resposta atividade da lacase.



Fonte: a autora (2024).

Figura 10 - Diagrama de Pareto destacando a relação entre as variáveis independentes tempo, ácido tânico e a interação glicose/farelo de trigo sobre a variável resposta atividade específica da lacase.



Fonte: a autora (2024).

Os fatores concentração de glicose, concentração de farelo de trigo e concentração de sulfato de cobre individualmente não tiveram significância estatística para a atividade da lacase, ao contrário do que já foi observado em outros trabalhos. Em Yuri *et al.* (2006), a presença de glicose como fonte de carbono favoreceu a produção da lacase pelo fungo *T. versicolor*, mas a variação na concentração de glicose não exerceu influência significativa sobre a atividade enzimática, apesar de ter influenciado o crescimento celular. Quando combinada com outras fontes de carbono, como frutose e sacarose, a glicose é prontamente consumida como principal fonte de carbono para crescimento e outras fontes de carbono são utilizadas no metabolismo de síntese de proteínas (STRONG, 2011; UMAR; AHMED, 2022).

Umar & Ahmed (2022) notaram que a produção e atividade da lacase foi altamente dependente da concentração e das fontes de carbono, e que a glicose em altas concentrações pode inibir a síntese de lacase nos fungos basidiomicetos. Além disso, a razão entre concentração de carbono e de nitrogênio disponíveis no meio tem influência importante sobre o metabolismo fúngico, de modo que mudanças na concentração de glicose podem afetar a síntese de lacase por alterar a razão C/N

(CORRÊA, 2023; UMAR; AHMED, 2022; XU *et al.*, 2020). Suplementar o meio com mais de uma fonte de carbono, além da glicose, e encontrar a razão C/N ótima para produção da lacase por *T. lactinea* podem ser pontos de partida para trabalhos futuros.

Em Jutinico-Shubach *et al.* (2022), trabalhando com fungo da família Cyphellaceae (Basidiomycota), amostras suplementadas com farelo de trigo tiveram atividade de lacase significativamente maior do que as amostras suplementadas com outras fontes de carbono, como casca de banana, de arroz e espiga de milho. Corrêa (2023) estudou o efeito do farelo de trigo como fonte lignocelulolítica para o fungo *Trametes versicolor* e *Trichoderma asperellum*, e obteve maior atividade de lacase para *T. versicolor* no meio suplementado com farelo de trigo após 6 dias. Ao combinar farelo de trigo e bagaço de uva, o pico de atividade de *T. versicolor* ocorreu em 5 dias.

Em Rosales, Couto e Sanromán (2007), Galhaup *et al.* (2002) e Lonappan *et al.* (2017), a adição de sulfato de cobre favoreceu a atividade da lacase pelas espécies *Trametes hirsuta*, *Trametes pubescens* e *Trametes versicolor*, respectivamente. A influência de indutores pode variar bastante e depende muito de cada espécie, das concentrações utilizadas e do momento em que é adicionado ao meio de cultura (FILLAT *et al.*, 2016; STRONG, 2011).

Esses compostos e suas concentrações afetam o metabolismo fúngico, podendo influenciar positiva ou negativamente tanto a síntese quanto a atividade da lacase, como já foi demonstrado por outros trabalhos testando cada composto individualmente (GALHAUP *et al.*, 2002; MOSTAFA *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2020; AMEEN *et al.*, 2021; CORRÊA, 2023), mas a análise estatística deste planejamento não evidenciou relação estatística significativa entre cada um dos fatores com a atividade da lacase por *T. lactinea*.

Quanto à descoloração, o ensaio realizado com as amostras de cada ensaio do planejamento revelou percentuais bem diferentes, com descoloração mínima de 13,27% e máxima de 69,25% (Tabela 8). Esses percentuais corroboram outros estudos, também realizados em meio líquido com adição de discos de micélio, sobre a capacidade dos fungos *Trametes* em descolorir corantes sintéticos por degradação enzimática (ABADULLA *et al.*, 2000; CARDOSO, 2023; FERREIRA-SILVA *et al.*, 2022; NEVES *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2010; PERTIWI; DEWI; SARI, 2020; SANTANA, 2022). Nota-se que nas amostras com os melhores resultados (1 e 4), a

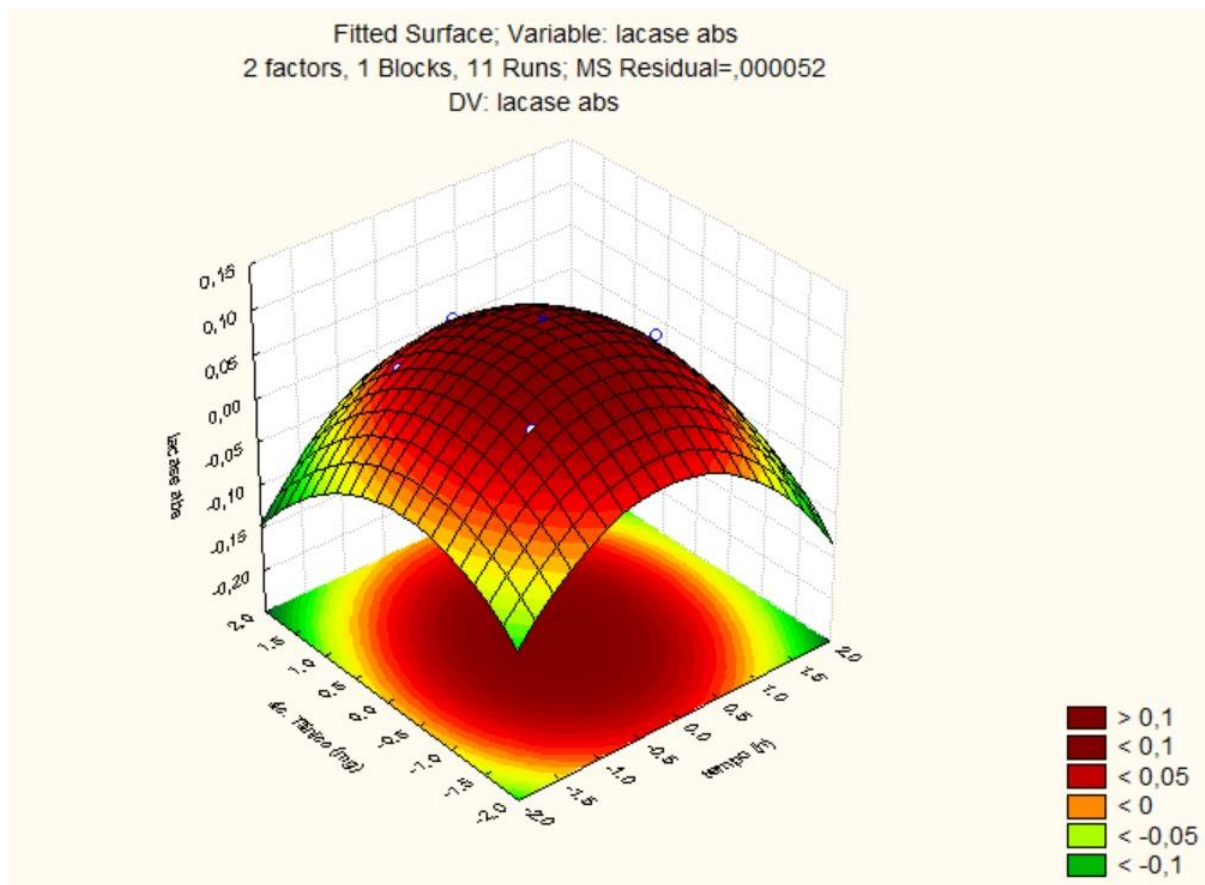
atividade específica de lacase foi baixa em comparação com outras amostras que tiveram percentual menor de descoloração, o que pode ser explicado pela atuação de outras enzimas que não foram quantificadas, como a manganês peroxidase e lignina peroxidase, que também promovem a degradação de compostos fenólicos (SANTANA, 2022; GRASSI *et al.*, 2011).

As amostras 5 e 8 tiveram os resultados mais expressivos de atividade da lacase e também tiveram bons resultados de descoloração, 64,17% e 48,78%, respectivamente. No entanto, observa-se que outras amostras também tiveram bons resultados com menor atividade enzimática, sugerindo a possível atuação de outras enzimas que não foram quantificadas neste trabalho.

5.3 Avaliação das condições ótimas para atividade da lacase

O DCCR foi realizado com base nos fatores ácido tânico e tempo de cultivo, que mostraram significância estatística sobre a produção enzimática, a fim de encontrar condições ótimas para obtenção de um extrato enzimático. A análise dos resultados da dosagem de lacase revelou que a melhor combinação consistiu em adicionar 0,4 mg de ácido tânico ao meio e incubar por 120 horas, para a atividade da lacase (Figura 11). Essas condições haviam sido observadas nos resultados dos experimentos do planejamento fatorial, mas o delineamento foi importante para confirmar, já que envolveu uma análise mais específica, restrita a essas duas variáveis, e com mais níveis avaliados.

Figura 11 - Superfície de resposta para as variáveis concentração de ácido tânico e tempo de cultivo evidenciando as condições ótimas de cultivo.



Fonte: a autora (2024).

O tempo de 120 horas corrobora o estudo de Ortiz-Monsalve (2015), que observou maior atividade da lacase por *Trametes villosa* entre 96 e 144 horas, quando o fungo inicia o metabolismo secundário, após a fase de crescimento, pois as enzimas ligninolíticas são fruto do metabolismo secundário.

5.4 Quantificação da enzima lacase e das proteínas solúveis totais do extrato produzido nas condições ótimas de cultivo

No extrato enzimático produzido nas condições ótimas encontradas, foi detectada produção e atividade da lacase, e quantificou-se também as proteínas solúveis totais. Os resultados são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Atividade da lacase (U/mL), concentração de proteínas solúveis (mg/mL) e atividade específica da lacase (U/mg) do extrato produzido nas condições ótimas encontradas para ácido tânico (0,4 mg) e tempo de cultivo (120 horas).

Amostra	Atividade da lacase U/mL	Concentração de proteínas solúveis totais mg/mL	Atividade específica da lacase U/mg
1	35,6	0,8425	42,25
2	31,5	0,9385	33,56
3	27,5	0,9865	27,87
4	34,6	0,9958	34,74
5	87,5	0,9911	88,28

Fonte: a autora (2024).

Os resultados obtidos para atividade da lacase corroboram os de outros trabalhos. Eichlerová e Baldrian (2020) testaram a produção de lacase por várias espécies de basidiomicetos, incluindo diferentes cepas das espécies *T. hirsuta* e *T. versicolor*, e obtiveram atividade máxima da lacase variando entre 2,85 e 63,54 U/mL. Couto (2007) estudou a produção de lacase por *T. hirsuta* em meio contendo substrato suporte de papel e observou atividade máxima de 7,695 U/mL após 9 dias de cultivo. Yuri *et al.* (2006) estudaram o efeito das concentrações de carbono e nitrogênio na produção de lacase por *T. versicolor* e notaram atividade máxima da lacase de 33,7 U/mL após 72 horas.

São poucos os trabalhos publicados sobre a atividade da lacase produzida por *T. lactinea*, mas os resultados obtidos neste trabalho corroboram os de outros estudos sobre a atividade de enzimas produzidas por esta espécie. Ferreira-Silva *et al.* (2022) obtiveram 0,000750 U/mL de atividade máxima da lacase produzida por *T. lactinea*.

Ressalta-se que, dentro de um viés biotecnológico, os resultados observados nesse trabalho podem ser considerados baixos. Uma possível solução é a utilização de indutores para aumentar a produção e/ou de mediadores redox para obter maior atividade enzimática e assim aumentar a eficiência do tratamento (ARDILA-LEAL *et al.*, 2021; FOROOTANFAR *et al.*, 2016; SOARES; AMORIM; COSTA-FERREIRA,

2001). A adição de mediadores redox ou de outros indutores diferentes do ácido tânico pode ser necessária para estimular a síntese e atividade da lacase por *T. lactinea*.

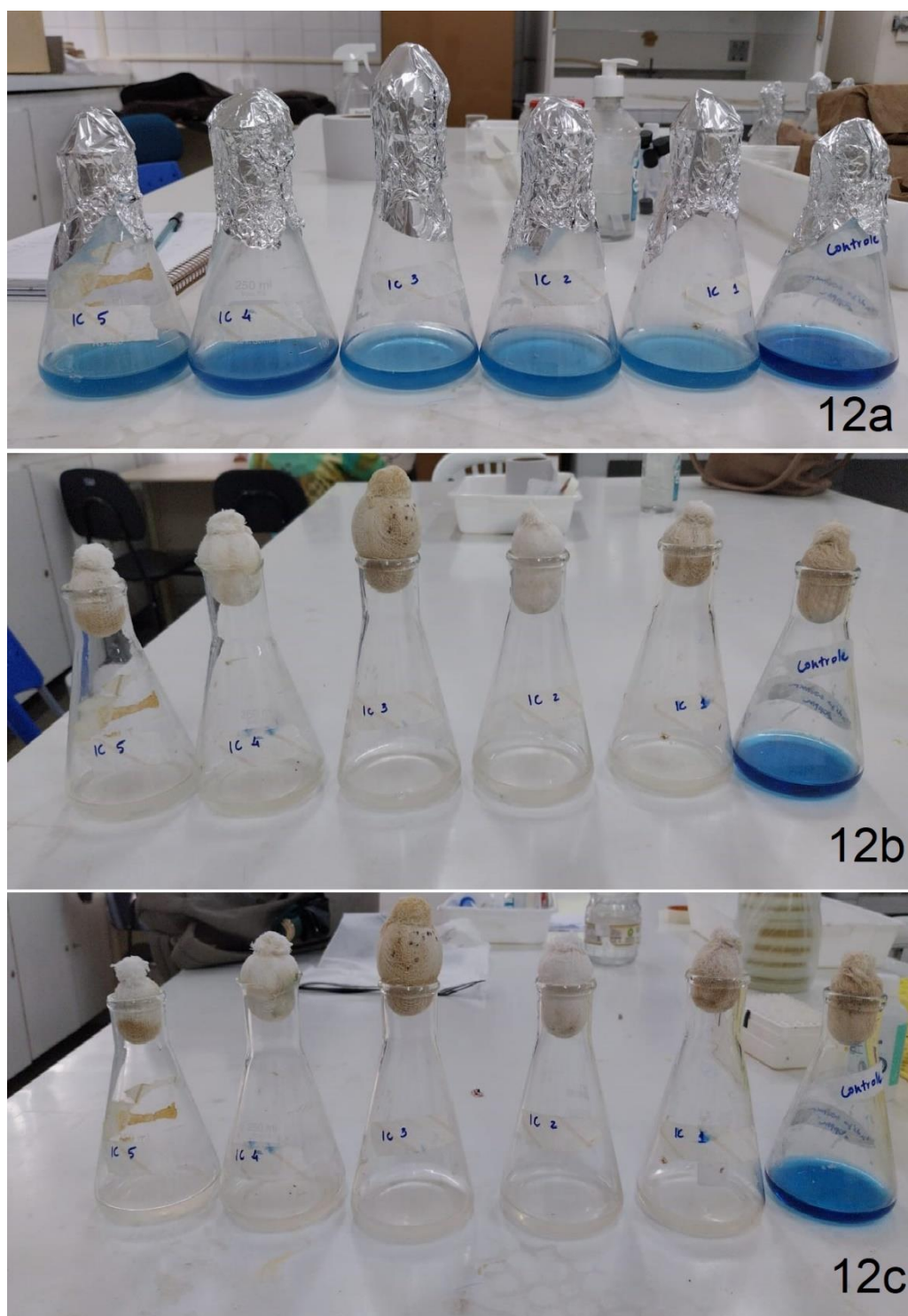
5.5 Descoloração do corante índigo carmim com extrato enzimático produzido nas condições ótimas de cultivo

A utilização de biomassa para descolorir soluções pode ser um problema tanto pelo crescimento excessivo da colônia quanto pela inibição do crescimento que pode ser causado pela presença de alguns compostos (ARDILA-LEAL *et al.*, 2021). Além disso, a lacase é produzida pelo metabolismo secundário do fungo, e por essa razão, o crescimento não controlado e a síntese de proteases podem prejudicar a atividade da lacase (COUTO; TOCA-HERRERA, 2007). Por isso, mesmo observando que *T. lactinea* também promove a descoloração por biossorção, optou-se por realizar um ensaio de descoloração utilizando apenas o extrato enzimático produzido nas condições ótimas de cultivo.

Os resultados da descoloração (Tabela 10) discordam dos dados de atividade da lacase apresentados na seção 5.4, pois observa-se baixa atividade para altos percentuais de descoloração. Essa diferença pode sugerir a atuação de outras enzimas não quantificadas, como a lignina peroxidase e manganês peroxidase, no processo de descoloração. Esses dados corroboram o trabalho de Amaral *et al.* (2004), realizado com *Trametes versicolor* para descolorir um efluente têxtil real e um sintético.

A avaliação visual permitiu perceber uma diferença significativa entre as cores da solução controle e das soluções tratadas (Figura 12). As soluções tratadas, com o passar do tempo, ficaram com a cor bem menos intensa, chegando a uma descoloração aparentemente completa após o período máximo de 21 dias. Os percentuais de descoloração foram bastante significativos após 7 dias, chegando a 100% após 15 dias em algumas amostras e após 21 dias em todas as amostras tratadas com o extrato enzimático produzido pelo fungo *T. lactinea* (Tabela 10).

Figura 12 - Descoloração do corante índigo carmim após 7 dias (12a), 15 dias (12b) e 21 dias (12c) de tratamento com complexo enzimático produzido por *T. lactinea*. O controle é o último frasco à direita em todas as imagens.



Fonte: a autora (2024).

Tabela 10 - Percentuais de descoloração do corante índigo carmim após 7, 15 e 21 dias de tratamento com extrato enzimático produzido pelo fungo *Trametes lactinea*.

Amostra	Percentual de descoloração (%)		
	7 dias	15 dias	21 dias
1	53,70	99,24	100
2	46,30	99,62	100
3	51,85	98,10	100
4	35,18	100	100
5	50	100	100
Média e desvio padrão	47,41 ± 7,36	99,40 ± 0,78	100 ± 0,00

Fonte: a autora (2024).

Esses resultados corroboram trabalhos realizados com outras espécies do gênero *Trametes*. Grassi *et al.* (2011) utilizou o filtrado do fungo *T. trogii* e extrato puro da lacase produzido pela mesma espécie para descolorir diferentes corantes, incluindo o índigo carmim, cujo percentual de descoloração chegou a 84,5% com o filtrado em meia hora e ultrapassou 80% com o extrato da lacase após 24 horas. Ramírez-Montoya *et al.* (2015) utilizaram lacase produzida por *T. versicolor*, em estado livre e imobilizada em matriz de carbono mesoporoso, na descoloração do índigo carmim (Acid Blue 74) e outros corantes e obtiveram resultados de descoloração acima de 90%. Zeng *et al.* (2011), utilizando extrato de lacase produzido por *T. trogii*, obteve 85,2% de descoloração do corante Remazol Brilliant Blue R. Em Boran *et al.* (2019), a descoloração do índigo carmim (100 mg/L) chegou a 57%, utilizando extrato bruto de lacase obtido da espécie *T. trogii*, nas condições de pH 3 e temperatura de 30°C, em apenas 300 segundos (5 minutos). Nyanhongo *et al.* (2002) obtiveram descoloração máxima de 58% do índigo carmim (250 mg/L) após 3 horas, em pH 4,5 e temperatura de 50°C, utilizando extrato de lacase produzido por *T. modesta*.

A descoloração deve ter sido favorecida também pela condição de agitação de 50 rpm a qual os frascos, contendo a solução de corante e os 5 mL de extrato enzimático, ficaram incubados, pois a agitação promove um aumento do oxigênio dissolvido na água, contribuindo com a atividade enzimática e a degradação pelas enzimas oxidases (MOYO; MAKHANYA; ZWANE, 2022).

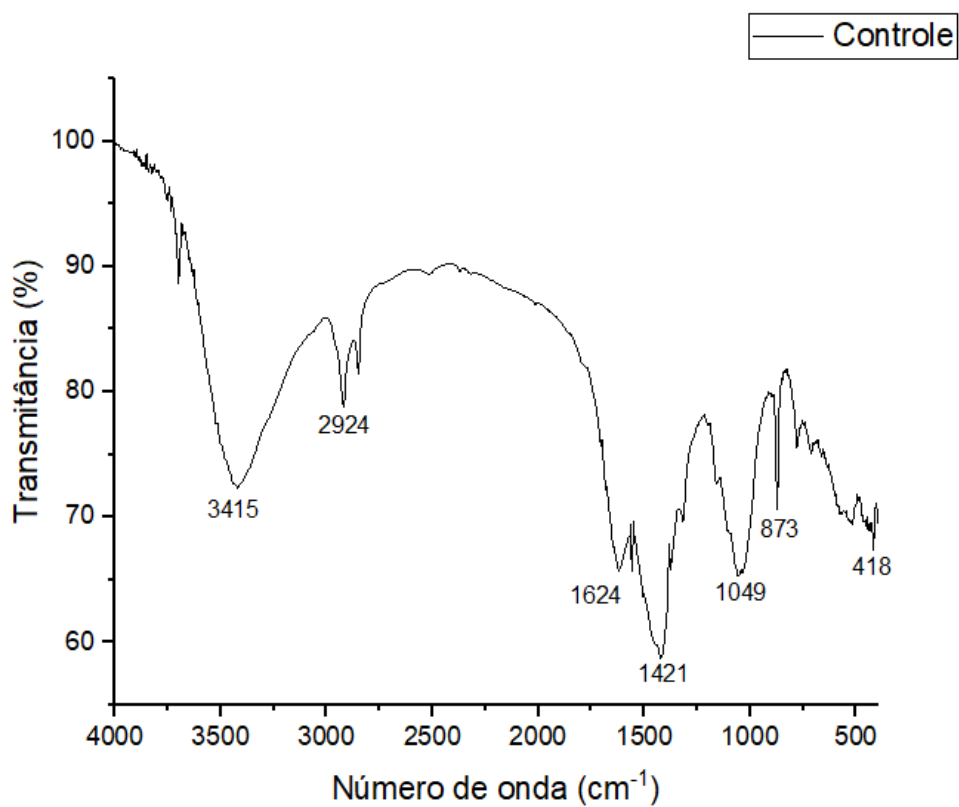
Observa-se que existem muitos dados e trabalhos publicados sobre a utilização do gênero *Trametes* no processo de descoloração e degradação de corantes e efluentes têxteis, principalmente com as espécies *T. versicolor* e *T. trogii*, mas há poucos trabalhos com a espécie *T. lactinea*. Os trabalhos realizados com esta espécie investigaram a descoloração utilizando os discos de micélio do fungo inoculados na solução de corante ou efluente colorido, mas não foram encontrados trabalhos que tenham utilizado apenas o extrato enzimático, produzido previamente pelo fungo, para descolorir as soluções.

5.6 Avaliação da degradação das moléculas do corante pela análise das técnicas de FTIR e de UV-Vis

A espectroscopia de infravermelho (ATR-FTIR), realizada com uma amostra controle e uma amostra tratada com extrato enzimático, evidenciou diferenças entre as amostras (Figuras 13 e 14). Na amostra controle, composta pela solução do corante na concentração de 20 ppm, as bandas/picos de transmitância ocorrem nos mesmos números de onda observados em análises de FITR do índigo carmim realizada por Lyrio *et al.*, 2023. As bandas destacadas são referentes à região do cromóforo do corante, que apresenta grupos funcionais de amida (1638 cm^{-1}), ligação S=O (1032 cm^{-1}) e anel aromático (734 cm^{-1}) (LYRIO *et al.*, 2023).

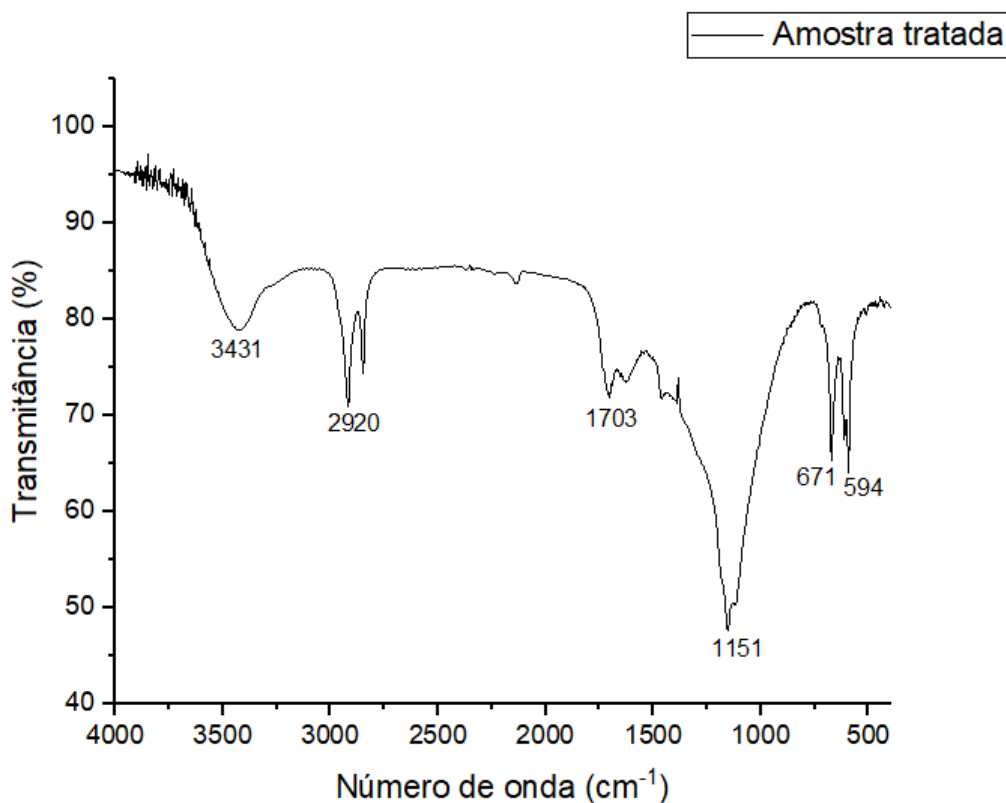
A espectroscopia da amostra tratada, no entanto, não apresenta essas mesmas bandas destacadas, indicado a ocorrência de alterações na estrutura química do corante. Essas alterações podem ser atribuídas à ação das enzimas produzidas pelo fungo *T. lactinea*.

Figura 13 - Espectros vibracionais na região do infravermelho da amostra controle (solução de índigo carmim, 20 ppm).



Fonte: a autora (2024).

Figura 14 - Espectros vibracionais na região do infravermelho da amostra tratada após 15 dias de tratamento.

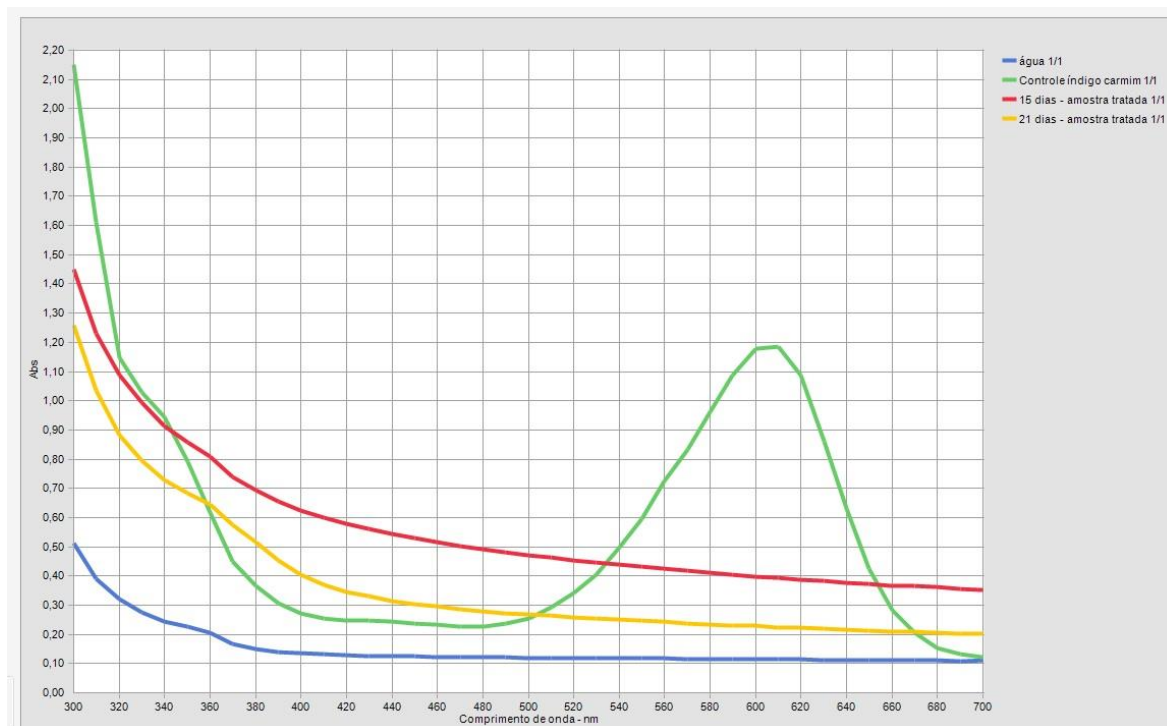


Fonte: a autora (2024).

As bandas largas observadas entre 4000 e 3000 cm^{-1} caracterizam grupos hidroxila (-OH), que neste trabalho são atribuídos a bandas de água, já que as soluções estavam diluídas em água destilada (PAVIA, 2016).

Os resultados da varredura na espectroscopia UV-Vis também evidenciam modificações na estrutura do corante ao comparar o espectro de absorção da amostra controle e das amostras tratadas (Figura 15). Na amostra controle, é possível observar o pico de absorbância do corante em 610 nm, o que não acontece nas amostras tratadas, sugerindo a quebra das ligações do grupo cromóforo.

Figura 15 - Espectro de absorção da amostra controle em verde (solução do corante índigo carmim, 20 ppm) e das amostras tratadas após 15 dias, em vermelho, e 21 dias, em amarelo. A linha azul representa a varredura da água.



Fonte: a autora (2024).

6 CONCLUSÕES

O trabalho realizado permitiu observar que o fungo *Trametes lactinea* consegue descolorir soluções do corante têxtil índigo carmim.

Detectou-se a produção e atividade de enzimas lacase, sendo possível observar uma provável contribuição desta enzima para o processo de biodegradação, mas que outras enzimas não quantificadas neste trabalho também podem estar atuando.

A adição de 0,4 mg de ácido tânico ao meio de cultivo e a duração de 120 horas de incubação se apresentaram como condições ótimas para a atividade da lacase produzida por *T. lactinea*.

O extrato enzimático produzido nas condições ótimas descritas foi capaz de descolorir a solução do corante índigo carmim com uma média de 47,41% após 7 dias, 99,40% após 15 dias e 100% após 21 dias.

O presente trabalho demonstrou a utilização de um extrato enzimático sem o micélio como uma metodologia eficaz para realizar a degradação do índigo carmim pela espécie *T. lactinea*, o que pode ser vantajoso, pois evita a inibição das enzimas pelo crescimento excessivo e não gera biomassa residual, sendo que esse método foi usado pela primeira vez neste trabalho.

O fungo *Trametes lactinea* apresenta potencial para descolorir soluções e degradar corantes têxteis. Estudos futuros são necessários para obter maior atividade da lacase, investigar a atuação de outras enzimas no processo de biodegradação e promover a descoloração de outras soluções coloridas.

REFERÊNCIAS

- ABADULLA, E. *et al.* Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from *Trametes hirsuta*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3357-3362, 2000.
- ADANE, T.; ADUGNA, A. T.; ALEMAYEHU, E. Textile Industry Effluent Treatment Techniques. **Journal of Chemistry**, 2021.
- ALAM, R. *et al.* Understanding the biodegradation pathways of azo dyes by immobilized white-rot fungus, *Trametes hirsuta* D7, using UPLC-PDA-FTICR MS supported by in silico simulations and toxicity assessment. **Chemosphere**, v. 313, 2023.
- ALENCAR, E. O. A.; ARAÚJO, A. C. V. Estudo estatístico para o uso de material nanoestruturado na remoção dos corantes Vermelho Congo e Índigo Carmim em meio aquoso. **Geama**, v. 6, n. 3, p. 60-70, 2020.
- ALMEIDA, D. G. *et al.* Descoloração do corante Índigo Carmim e produção de Lacase por fungos filamentosos. **Scientia Plena**, v. 8, n. 5, 2012.
- ALMEIDA, E. J. R.; DILARRI, G.; CORSO, C. R. A indústria têxtil no Brasil: Uma revisão dos seus impactos ambientais e possíveis tratamentos para os seus efluentes. **Projeto Qualidade de Água**, Boletim das Águas, Ministério Público Federal, 2016.
- ALVES, A.T. A. *et al.* Revisão sistemática de literatura: estudo de caso sobre a remoção de cor de águas residuais têxteis. **Geama**, v. 5, n. 3, 2019.
- AMARAL, P. F. F. *et al.* Decolorization of Dyes from textile wastewater by *Trametes versicolor*. **Environmental Technology**, v. 25, n. 11, p. 1313-1320, 2004.
- AMEEN, F. *et al.* Decolorization of acid blue 29, disperse red 1 and Congo red by different indigenous fungal strains. **Chemosphere**, v. 271, 2021.
- ANDRADE, Ângela Lúcia Carvalho de. **Aspectos do crescimento e influência de parâmetros físicos na atividade da lacase do fungo amazônico *Trametes lactinea***. 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2011.
- ARDILA-LEAL, L. D. *et al.* A Brief History of Colour, the Environmental Impact of Synthetic Dyes and Removal by Using Laccases. **Molecules**, v. 26, n. 3813, 2021.
- BABU, A. N. *et al.* Removal of Hazardous Indigo Carmine Dye from Waste Water Using Treated Red Mud. **Materials Today: Proceedings**, v. 17, p. 198-208, 2019.
- BAKAR, B. *et al.* Immobilization of *Trametes troglia* laccase on polyvinylpyrrolidone-coated magnetic nanoparticles for biocatalytic degradation of textile dyes. **Biocatalysis and Biotransformation**, 2023.

BELTRAME, Leocádia Terezinha Cordeiro. **Caracterização de efluente têxtil e proposta de tratamento**. 2000. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2000.

BENKHAYA, S.; M'RABET, S.; HARFI, A. A review on classifications, recent synthesis and applications of textile dyes. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 115, 2020.

BENTO, R. M. F. *et al.* Improvements in the enzymatic degradation of textile dyes using ionic-liquid-based surfactants. **Separation and Purification Technology**, v. 235, 2020.

BERRADI, M. *et al.* Textile finishing dyes and their impact on aquatic environs. **Heliyon**, v. 5, 2019.

BERTRAND, T. *et al.* Crystal Structure of a Four-Copper Laccase Complexed with an Arylamine: Insights into Substrate Recognition and Correlation with Kinetics. **Biochemistry**, v. 41, p. 7325-7333, 2002.

BIRHANLI, E. *et al.* Design of laccase-metal-organic framework hybrid constructs for biocatalytic removal of textile dyes. **Chemosphere**, v. 292, 2022.

BOOM, A. C. *et al.* Determinação da toxidez do Índigo Carmim em solo pelo método respirométrico. **Revista Matéria**, v. 27, n. 2, 2022.

BORAN, F. *et al.* Comparison of indigo carmine decolorization by *Pseudomonas aeruginosa* and crude laccase enzyme from *Funalia trogii*. **Turkish Journal of Biology**, v. 43, p. 37-46, 2019.

BOURBONNAIS, R. *et al.* Reactivities of Various Mediators and Laccases with Kraft Pulp and Lignin Model Compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 12, p. 4627-4632, 1997.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, I.; ABREU, M. J. Social aspects in denim production. *In*: MUTHU, S. S. **Sustainability in Denim**. Elsevier, 2017, p. 283-315.

BUSCIO, V.; CRESPI, M.; GUTIÉRREZ-BOUZÁN, C. A Critical Comparison of Methods for the Analysis of Indigo in Dyeing Liquors and Effluents. **Materials**, v. 7, p. 6184-6193, 2014.

CARDOSO, Fausto Rodrigues. **Estudo dos processos de descoloração do corante vermelho reativo 239 pelo fungo de podridão branca *Trametes cingulata* JUMAD075**. 2023. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal Tecnológica do Paraná, Londrina, 2023.

CARDOSO, J. C.; BESSEGATO, G. C.; ZANONI, M. V. B. Análise crítica dos processos empregados no tratamento de efluentes têxteis. *In*: ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, H. (org.). **Corantes**: caracterização química, métodos de detecção e tratamento. 1 ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016, p. 215-239.

CARDULLO, N.; MUCCILLI, V.; TRINGALI, C. Laccase-mediated synthesis of bioactive natural products and their analogues. **RSC Chemical Biology**, v. 3, p. 614-647, 2022.

CARNEIRO, P. A.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. *In*: ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, H. (org.). **Corantes**: caracterização química, métodos de detecção e tratamento. 1 ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016, p. 13-35.

CAVALCANTE, A. V. *et al.* Utilização de *Trametes versicolor* no processo de degradação de corante índigo carmim. **Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica**, v. 14, n. 1, p. 493-506, 2021.

CHOUDHURY, A. K. R. Environmental impacts of denim washing. *In*: MUTHU, S. S. **Sustainability in Denim**. Elsevier, 2017, p. 49-80.

CHOWDHURY, M. F. *et al.* Current treatment technologies and mechanisms for removal of indigo carmine dyes from wastewater: A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 318, 2020.

Conselho Nacional do Meio Ambiente (Brasil). Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2011.

CORRÊA, Anderson Gabriel. **Produção de enzimas lignocelulolíticas por *Trametes versicolor* e *Trichoderma asperellum* utilizando bagaço de uva e farelo de trigo como substratos**. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Biocombustíveis) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2023.

COUTO, S. R. Laccase from *Trametes hirsuta* Grown on Paper Cuttings: Application to Synthetic Dye Decolorization at Different pH Values. **Engineering in Life Sciences**, v. 7, n. 3, p.229-234, 2007.

COUTO, S. R.; TOCA-HERRERA, J. L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 558-569, 2007.

CUNICO, M. W. M. *et al.* Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 9, n. 1, 2008.

EICHLEROVÁ, I.; BALDRIAN, P. Ligninolytic Enzyme Production and Decolorization Capacity of Synthetic Dyes by Saprotrophic White Rot, Brown Rot, and Litter Decomposing *Basidiomycetes*. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 301, 2020.

FERNANDES, F. H.; SALVADORI, D. M. F. Exposição a corantes: o perigo toxicogenético por trás das cores. *In*: ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, H. (org.).

Corantes: caracterização química, métodos de detecção e tratamento. 1 ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016, p. 139-145.

FERNANDES, M. *et al.* Fungos trametoides (Polyporaceae, Basidiomycota) do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, v. 51, 2024.

FERREIRA-SILVA, V. *et al.* *Trametes lactinea* and *T. villosa* collected in Brazil are able to discolor indigo carmine. **Acta Botanica Brasilica**, v. 36, 2022.

FILLAT, U. *et al.* Screening of eucalyptus wood endophytes for laccase activity. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 589-598, 2016.

GALHAUP, C. *et al.* Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 529-536, 2002.

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 and Biodegradation**, v. 65, p.635-643, 2011.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química Nova**, v. 23, n. 1, 2000.

GUIMARÃES, J. R. *et al.* Descoloração biológica do corante têxtil vermelho do Congo por espécies de *Aspergillus*. **Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, 2017.

GUPTA, T. *et al.* Adsorption of Indigo Carmine Dye by *Acacia nilotica* sawdust activated carbon in fixed bed column. **Scientific Reports**, v. 12, n.15522, 2022.

HAO, J. *et al.* The protective effect and crucial biological pathways analysis of *Trametes lactinea* mycelium polysaccharides on acute alcoholic liver injury in mice based on transcriptomics and metabonomics. **Food Science and Health Wellness**, v. 10, p. 480-489, 2021.

JOSHI, A. U. *et al.* Decolorization and biodegradation of textile di-azo dye Acid Blue 113 by *Pseudomonas stutzeri* AK6. **Biotech**, v. 10, n. 214, 2020.

JUTINICO-SHUBACH, L. M. *et al.* A novel basidiomycete isolated from mangrove swamps in the Colombian Caribbean shows promise in dye bioremediation. **Bioremediation Journal**, v. 26, n. 3, p. 179-197, 2022.

KATHERESAN, V.; KANSEDO, J.; LAU, S. Y. Efficiency of various recent wastewater dye removal methods: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, p. 4676-4697, 2018.

KHAN, M. D. *et al.* Current perspectives, recent advancements, and efficiencies of various dye-containing wastewater treatment technologies. **Journal of Water Process Engineering**, v. 53, 2023.

KISHOR, R. *et al.* Ecotoxicological and health concerns of persistent coloring pollutants of textile industry wastewater and treatment approaches for environmental safety. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, 2021.

LELLIS, B. *et al.* Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, p. 275-290, 2019.

LIBRA, J. A.; BORCHERT, M.; BANIT, S. Competition Strategies for the Decolorization of a Textile-Reactive Dye With the White-Rot Fungi *Trametes versicolor* Under Non-sterile Conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 6, p. 736-744, 2003.

LIU, J. *et al.* Deciphering the alkaline stable mechanism of bacterial laccase from *Bacillus pumilus* by molecular dynamics simulation can improve the decolorization of textile dyes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 443, 2023.

LONAPPAN, L. *et al.* Agro-industrial-Produced Laccase for the Degradation of Diclofenac and Identification of Transformation Products. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, p. 5772-5781, 2017.

LYRIO, M. V. V. *et al.* Comparando a eficiência analítica das técnicas FTIR, UV-VIS, CLAE-DAD e ESI(+)-MS no estudo de corantes alimentares. **Química Nova**, v. 46, n. 5, p. 435-449, 2023.

MADHAV, M. *et al.* A review of textile industry: Wet processing, environmental impacts, and effluent treatment methods. **Environmental Quality Management**, v. 27, p. 31-41, 2018.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MANDIC, M. *et al.* Identification and Characterization of New Laccase Biocatalysts from *Pseudomonas* Species Suitable for Degradation of Synthetic Textile Dyes. **Catalysts**, v. 6, n. 629, 2019.

MARQUETE, I. C. A. A importância dos fungos decompositores para a natureza e para o ser humano. **O professor PDE e os desafios da escola pública paranaense**, Paraná, v. 1, 2012.

MARTINS, G. B. C.; SUCUPIRA, R. R.; SUAREZ, P. A. Z. A Química e as Cores. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1508-1534, 2015.

MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CONAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 6, p. 1537-1546, 2001.

MATTIETTO, R. A.; MATTA, V. M. Utilização de um delineamento composto central rotacional para avaliação microbiológica de polpas de açaí pasteurizadas. **Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Búzios, 2012.

MOSTAFA, A. A. F. *et al.* Decolorization and biotransformation pathway of textile dye by *Cylindrocephalum aurelium*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, p. 1483-1494, 2019.

MOYO, S.; MAKHANYA, B. P.; ZWANE, P. E. Use of bacterial isolates in the treatment of textile dye wastewater: A review. **Heliyon**, v. 8, 2022.

NEVES, F. A. *et al.* Aplicação de fungos de decomposição branca para remoção de cor em simulados de efluentes industriais. **Revista de Biotecnologia e Ciência**, v. 2, n. 2, p. 40-57, 2013.

NUNES, Giovanna Ribeiro. **Geração e tratamento de efluentes da indústria têxtil**. 2019. Monografia (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

NURHAYAT, O. D. *et al.* Bioprospecting three newly isolated white-rot fungi from Berbak-Sembilang National Park, Indonesia for biodecolorization of anthraquinone and azo dyes. **Biodiversitas**, v. 23, n. 2, p. 613-623, 2022.

NYANHONGO, G. S. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. **Water Research**, v. 36, p. 1449-1465, 2002.

OLGA, V. K. S. *et al.* Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 28, p. 47-54, 1998.

OLIVEIRA, J. F. *et al.* Screening of some Brazilian fungi and bacteria able to decolor a textile effluent and evaluation of effluent toxicity on *Artemia salina*. **Revista Ambiente e Água**, v. 18, 2023.

OLIVEIRA, L. H. S. *et al.* Descoloração de corantes sintéticos por Basidiomicetos tropicais brasileiros. **Naturalia**, Rio Claro, v. 33, p. 85-99, 2010.

ORTIZ-MONSALVE, Santiago. **Estudos de descoloração de corantes para couro pelo isolado nativo *Trametes villosa* SC10**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à Espectroscopia**. 2. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.

PEREIRA, A. R. B. *et al.* Biodegradação de corantes e efluentes têxteis por fungos. **HOLOS Environment**, v. 10, n. 2, 2010.

PERTIWI, S.; DEWI, R. S.; SARI, A. A. Decolorization of Indigosol Blue Dye Using *Trametes versicolor* F200 and *Aspergillus* sp. **BioEksata: Jurnal Ilmiah Biologi Unsoed**, v. 2, n. 2, p. 222-226, 2020.

PINTO, Fagner Ferreira. **Degradação de madeiras por fungos: aspectos biológicos e de biorremediação**. 2006. Monografia (Especialista em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

POSTREL, V. **El tejido de la civilización: Cómo los textiles dieron forma al mundo**. Siruela, 2021.

RAMÍREZ-MONTOYA, L. A. *et al.* Decolorization of dyes with different molecular properties using free and immobilized laccase from *Trametes versicolor*. **Journal of Molecular Liquids**, v. 212, p. 30-37, 2015.

RAMOS, M. D. N. *et al.* A critical analysis of the alternative treatments applied to effluents from Brazilian textile industries. **Journal of Water Process Engineering**, v. 43, 2021.

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

RANE, A.; JOSHI, S. J. Biodecolorization and Biodegradation of Dyes: A Review. **The Open Biotechnology Journal**, v. 15, p. 97-108, 2021.

RAWAT, S. *et al.* Plasma polymerized and functional supermagnetic Fe₃O₄ nanostructured templates for laccase immobilization: A robust catalytic system for bio-inspired dye degradation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, p. 82524-82540, 2022.

ROSALES, E.; COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1286-1290, 2007.

SANTANA, Valéria Ferreira da Silva Costa. **Descoloração do corante índigo carmim por Agaricomycetes coletados no Norte e Nordeste do Brasil**. 2022. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

SANTOS, J. F. A.; NASCIMENTO, S. S.; SILVA, L. A. O. Descoloração biológica do corante índigo carmim. *In*: ONE, G. M. C. (org.). **Ciências naturais, agrárias e exatas**: Pesquisa, tecnologia e aplicabilidade. Livro eletrônico. João Pessoa: IMEA, 2023, p. 52-77.

SANTOS, V. L. *et al.* Avaliação do processo Fenton solar no tratamento de efluente gerado por lavanderia de jeans de Pernambuco. **Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Búzios, 2012.

SEHAR, S. *et al.* Recent advances in biodecolorization and biodegradation of environmental threatening textile finishing dyes. **Biotech**, v. 12, n. 186, 2022.

SHARMA, J.; SHARMA, S.; SONI, V. Classification and impact of synthetic textile dyes on Aquatic Flora: A review. **Regional Studies in Marine Science**, v. 45, 2021.

SI, J. *et al.* Selection of a pH- and temperature-stable laccase from *Ganoderma austral* and its application for bioremediation of textile dyes. **Journal of Environmental Management**, v. 299, 2021.

SI, J.; PENG, F.; CUI, B. Purification, biochemical characterization and dye decolorization capacity of an alkali-resistant and metal-tolerant laccase from *Trametes pubescens*. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 49-57, 2013.

SILVA, K. C. *et al.* Café com quimiometria: uma aplicação do planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻¹. **Química Nova**, v. 46, n. 1, p. 98-107, 2023.

SOARES, Bárbara Muniz. **Diversidade de fungos decompositores de madeira presentes em ecossistemas brasileiros: bioprospecção de espécies úteis em processo de biodegradação de poluentes aromáticos**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

SOARES, G. M. B.; AMORIM, M. T. P.; COSTA-FERREIRA, M. Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 123-129, 2001.

SOSA-MARTÍNEZ, J. D. *et al.* Synthetic dyes biodegradation by fungal ligninolytic enzymes: process optimization, metabolites evaluation and toxicity assessment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 400, 2020.

STRONG, P. J. Improved Laccase Production by *Trametes pubescens* MB89 in Distillery Wastewaters. **Enzyme Research**, 2011.

TAPIA-TUSSELL, R. *et al.* New laccase-producing fungi isolates with biotechnological potential in dye decolorization. **African Journal of Biotechnology**, v. 50, n. 10, p. 10134-10142, 2011.

This Is the Real Reason Blue Is the Most Common Denim Color. Reader's Digest, 2022. Disponível em: <https://www.rd.com/article/why-is-denim-blue/>.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

Trametes lactinea Berk. Global Biodiversity Information Facility, 2024. Disponível em: <https://www.gbif.org/species/9259588>.

TUNCAY, D.; YAGAR, H. Decolorization of Reactive Blue-19 textile dye by *Boletus edulis* laccase immobilized onto rice husks, **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 17, p. 3177-3188, 2020.

UMAR, A.; AHMED, S. Optimization, purification and characterization of laccase from *Ganoderma leucocontextum* along with its phylogenetic relationship. **Scientific Reports**, v. 12, n. 2416, 2022.

VACCHI, F. I. Ecotoxicidade de corantes para organismos aquáticos. *In*: ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, H. (org.). **Corantes**: caracterização química, métodos de detecção e tratamento. 1 ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016, p. 123-138.

VIANA, F. L. E.; ROCHA, R. E. V.; NUNES, F. R. M. A indústria têxtil na região Nordeste: gargalos, potencialidades e desafios. **Revista Produção online**, v. 8, n. 3, 2008.

VIIKARI, L. *et al.* Forest Products: Biotechnology in Pulp and Paper Processing. **Applied Microbiology**, 2009.

VISWANATH, M. B. *et al.* Screening and assessment of laccase producing fungi isolated from different environmental samples. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 8, p. 1129-1133, 2008.

WAGHMODE, T. R. *et al.* Sequential photocatalysis and biological treatment for the enhanced degradation of the persistent azo dye methyl red. **Journal of Hazardous Materials**, v. 371, p. 115-122, 2019.

XU, L. *et al.* Laccase production by *Trametes versicolor* in solid-state fermentation using tea residues as substrate and its application in dye decolorization. **Journal of Environment Management**, v. 270, 2020.

YADAV, A. *et al.* Decolourisation of textile dye by laccase: Process evaluation and assessment of its degradation bioproducts. **Bioresource Technology**, v. 340, 2021.

YEMENDZHIEV, H.; ALEXIEVA, Z.; KRASTANOV, A. decolorization of Synthetic Dye Reactive Blue 4 by Mycelial Culture of White-Rot Fungi *Trametes versicolor* 1. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 23, p. 230-232, 2009.

YURI, L. *et al.* Effect of Nutrients on the Production of Extracellular Enzymes for Decolorization of Reactive Blue 19 and Reactive Black 5. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 226-231, 2006.

ZACCARIA, Simone. **Concentração, formulação e caracterização de extratos enzimáticos de lacases produzidas por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em processo submerso**. 2017. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2017.

ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, H. **Corantes**: caracterização química, métodos de detecção e tratamento. 1 ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016.

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