**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Expressão de enzimas de *Pleurotus spp.* e descoloração do corante azul
índigo**

Gilda Mariano Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2014**

Gilda Mariano Silva
Bacharel em Ciências Biológicas

Expressão de enzimas de *Pleurotus spp.* e descoloração do corante azul índigo

Orientador:
Profa. Dra. **REGINA TERESA ROSIM MONTEIRO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Silva, Gilda Mariano
Expressão de enzimas de *Pleurotus spp.* e descoloração do corante azul índigo /
Gilda Mariano Silva. - - Piracicaba, 2014.
121 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Azul índigo 2. Bagaço 3. Cana-de-açúcar 4. Enzimas 5. *Pleurotus* 6. Vinhaça
I. Título

CDD 576.11925
S586e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu querido e amado pai, que fez nascer a luz da ciência e da investigação em nossa casa e a alimentou incansavelmente. Dedico também aos meus sobrinhos, que poderão fazer com que essa luz cresça e ilumine a trajetória da humanidade em direção à integração com a biosfera.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro, por me aceitar em seu grupo de pesquisa, por propiciar todo o desenvolvimento deste projeto de mestrado e por contribuir com a construção do meu perfil de pesquisadora.

À Capes, pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste projeto.

À Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de aprendizado e de crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Gabriel Adrián Sarriés, que contribuiu imensamente para o desenvolvimento deste trabalho e pelas preciosas horas de discussão de ideias.

À colega Suely Gonçalves, por ter me recebido com tanta cortesia, por dedicar seu tempo à análise do SMS por FTIR e pela colaboração com a discussão dos resultados.

Ao Prof. Dr. Valter Arthur e ao funcionário Paulo Cassieri Neto, responsáveis pelo procedimento de irradiação.

Ao Grupo São Martinho – Usina Iracemápolis, por ter recebido a mim e a meus colegas e pelo fornecimento de vinhaça.

Ao colega Gustavo Franco de Mendonça, responsável pela produção de cogumelos na “Moushrooms” e ao Antônio, seu colaborador, por terem me recebido tão bem e pelo fornecimento do substrato comercial.

Aos funcionários do Cena, todos sempre cordiais e solícitos. Agradeço em especial às queridas bibliotecárias Marília, Renata e Raquel, com seu carinho e dedicação.

Ao Prof. Dr. Walter Siqueira Paes e à toda a equipe responsável pelo curso de proteção radiológica, por compartilhar conosco conhecimentos e experiências de vida de uma forma tão rica e iluminadora.

Aos amigos e colegas de bancada Gleison, Joyce, Gabi, Gislayne, Luís Eduardo, Djanira, João Paulo, Camila e Vinicius, por fazerem do nosso laboratório um espaço de colaboração e bom humor, pelos tantos ensinamentos e pelas contribuições ao meu trabalho.

Aos amigos Luana, Gabi Machineski, Ana Paula Mendes, Joyce Froza, Raisal, Natalia Naranjo-Guevara e Daniel Villamontero, sempre ao meu lado nessa jornada e nunca me deixando terminar o dia sem um sorriso no rosto.

À minha família, o pilar mais forte, e aos meus mais queridos Danilo Teiti Iwai, Nicoli Briganti e Letizia Patriarca, por acreditarem em mim, pelo estímulo constante, pela estrutura emocional, pela eterna paciência e pelo amor.

À família Cordão De Ouro, em especial ao Pastel e à Priscila, por terem garantido a minha qualidade de vida ao longo do mestrado. Agradeço por terem feito de mim uma pessoa melhor.

“O mais corajoso dos atos ainda é pensar com a própria cabeça.
Em voz alta.”

Coco Chanel

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABELAS	19
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	21
1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos:	25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 A Indústria sucroalcooleira no Brasil	27
3.2 Vinhaça de cana-de-açúcar	28
3.2.1 Legislação pertinente à disposição de vinhaça	33
3.3 Resíduos lignocelulósicos	34
3.3.1 Bagaço de cana-de-açúcar	35
3.3.2 A produção de cogumelos e o “Spent mushroom waste”	36
3.4 Corantes e a indústria têxtil	38
3.4.1 Corante índigo	38
3.4.2 Efluentes têxteis	40
3.5 Fungos ligninolíticos e suas tecnologias	41
3.5.1 <i>Pleurotus spp.</i>	43
3.5.2 Enzimas ligninolíticas	44
3.5.2.1 Lacase (EC 1.10.3.2)	45
3.5.2.2 Peroxidase (EC 1.11.1.7)	47
3.5.2.3 Manganês Peroxidase (EC 1.11.1.13)	48
3.5.3 Fermentação submersa (SmF)	49
3.5.4 Fermentação em estado sólido (SSF)	52
3.6 Avaliação ecotoxicológica de resíduos e efluentes	53
3.6.1 <i>Daphnia similis</i>	54
3.6.2 <i>Hydra attenuata</i>	55
3.7 Esterilização via radiação gama	56
3.8 Espectroscopia Infravermelho por transformadas de Fourier	57

4 MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1 Vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar	59
4.2 Microrganismos – obtenção e cultivo	59
4.2.1 Produção do inóculo “spawn” das linhagens em uso.....	59
4.2.2 Cultivo das linhagens para fins experimentais.....	60
4.3 Cultivo de <i>P. sajor-caju</i> e <i>P. ostreatus</i> em vinhaça (SmF).....	60
4.3.1 Atividade enzimática.....	61
4.3.1.1 Lacase (EC 1.10.32).....	62
4.3.1.2 Peroxidase (EC 1.11.1.7)	62
4.3.1.3 Manganês peroxidase (EC 1.11.1.13)	63
4.3.2 Descoloração da vinhaça.....	63
4.3.3 Toxicidade da vinhaça tratada (<i>D. similis</i>).....	64
4.3.3.1 Cultivo e manutenção de <i>D. similis</i>	64
4.4 Crescimento de <i>P. sajor-caju</i> e <i>P. ostreatus</i> em SSF (bagaço de cana) e descoloração do azul índigo	65
4.4.1 Ensaio de descoloração com extrato enzimático.....	65
4.4.2 Ensaio de descoloração com bagaço inoculado	66
4.5 <i>P. ostreatus</i> (shimeji branco) crescido em SMS comercial	66
4.5.1 Atividade enzimática do composto da produção industrial (SMS).....	67
4.5.2 Descoloração do azul índigo pelo SMS	67
4.5.2.1 Irradiação do SMS	68
4.5.3 Ensaio de descoloração	68
4.5.4 Análise do SMS irradiado por FTIR, antes e após a adsorção do azul índigo.....	68
4.5.5 Toxicidade do azul índigo tratado (<i>H. attenuata</i>).....	69
4.5.5.1 Cultivo e manutenção de <i>H. attenuata</i>	69
4.6 Análise estatística dos dados.....	70
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1 Cultivo de <i>P. sajor-caju</i> e <i>P. ostreatus</i> em vinhaça (SmF).....	71
5.1.1 Biomassa fúngica	71
5.1.1 Atividade enzimática - lacase, peroxidase e MnP em SmF	74
5.1.2 Descoloração da vinhaça.....	79
5.1.3 Toxicidade da vinhaça tratada (<i>D. similis</i>).....	82
5.2 Atividade enzimática de <i>P. sajor-caju</i> e <i>P. ostreatus</i> em SSF (bagaço de cana) e descoloração de corante índigo	84

5.2.1 Atividade enzimática - lacase e MnP em SSF.....	84
5.2.3 Ensaios de descoloração	87
5.2.3.1 Descoloração com extrato enzimático.....	87
5.2.3.2 Descoloração com bagaço inoculado	89
5.3 <i>P. ostreatus</i> (shimeji branco) crescido em SMS comercial.....	91
5.3.1 Atividade enzimática do SMS – lacase, peroxidase e MnP	91
5.3.4 Descoloração do azul índigo pelo SMS.....	95
5.3.5 Análise do SMS irradiado por FTIR, antes e após a adsorção do azul índigo	98
5.3.6 Toxicidade do azul índigo tratado (<i>H. attenuata</i>).....	100
6 CONCLUSÃO.....	103
REFERÊNCIAS	105
ANEXOS.....	117

RESUMO

Expressão de enzimas de *Pleurotus spp.* e descoloração do corante azul índigo

A vinhaça, o bagaço de cana e corantes têxteis descartados são resíduos econômica e ambientalmente importantes. As enzimas inespecíficas e a capacidade adsorptiva dos fungos do gênero *Pleurotus* e do substrato exaurido da produção de cogumelos (SMS) os destacam na biorremediação. O objetivo deste trabalho é avaliar a produção de ligninases por *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* em fermentação submersa (SmF) e em fermentação sólida (SSF) e aplicar estas na descoloração e detoxificação da vinhaça e do corante azul índigo. Na SmF, as espécies foram crescidas em vinhaça diluída a 50%, livres ou aderidas (“bio ball”). A biomassa e atividade das enzimas lacase, peroxidase e MnP foram medidas. Avaliou-se a descoloração da vinhaça tratada e sua toxicidade (*D. similis*, 48 h). No primeiro experimento de SSF, as espécies cresceram em bagaço+vinhaça. Examinou-se a produção de lacase e MnP e a descoloração de uma solução de azul índigo (pH 4,5) pelo sobrenadante e em contato com o bagaço inoculado. No segundo experimento, avaliou-se as enzimas lacase, peroxidase e MnP dos SMS 1 e 2 (*P. ostreatus*) em água destilada, tampão citrato-fosfato (pH 5) e solução de Ringer e a descoloração da mesma solução de corante pelos substratos, irradiados ou não. Caracterizou-se o material irradiado, com e sem corante (FTIR) e determinou-se a toxicidade do índigo (*H. attenuata*, 96 h). Em 12 dias de SmF, a biomassa das duas espécies, nos dois tratamentos, foi equivalente. *P. ostreatus* com bio ball exibiu maiores atividades de lacase e MnP em seis dias e de peroxidase e MnP em 12, sendo a última semelhante à atividade por *P. ostreatus* livre. *P. sajor-caju* aderido teve, aos 12 dias, a maior atividade de lacase. Em todos os ensaios, *P. sajor-caju* descoloriu mais a vinhaça. A vinhaça tratada se tornou menos tóxica para *D. similis*. Ao 14º dia de crescimento em bagaço, não detectou-se atividade da MnP e a lacase de *P. sajor-caju* foi maior do que a de *P. ostreatus*: 14 e 0,4 UI g⁻¹, respectivamente. O azul índigo foi melhor descolorido pelo sobrenadante de *P. sajor-caju* do que por *P. ostreatus*; a descoloração com bagaço inoculado foi igual para ambos. Para o SMS, a atividade enzimática foi semelhante em todas as extrações. A lacase se destacou no SMS 1, atingindo 2 UI g⁻¹ com 0,1 g mL⁻¹ de água destilada. Com 2,5 g deste substrato, a descoloração de 20 e 60 mL da solução de índigo foi maior com o material não irradiado do que com o irradiado. Para o SMS 2, essa diferença ocorreu apenas com 60 mL. A análise por FTIR revelou a presença de grupos de ligação com o corante. O espectro do SMS 2 diferiu do material controle (sem corante), sugerindo uma maior interação do que no SMS 1. O corante tratado pelo SMS se tornou muito mais tóxico para *H. attenuata*. Concluiu-se que os resíduos propiciaram a expressão enzimática em *P. sajor-caju* e *P. ostreatus*, a descoloração da vinhaça e do azul índigo e a redução de toxicidade da vinhaça.

Palavras-chave: Azul índigo; Bagaço; Cana-de-açúcar; Enzimas; *Pleurotus*; Vinhaça

ABSTRACT

Enzymes expression by *Pleurotus* spp. and discoloration of indigo blue dye

Sugarcane bagasse and vinasse, as well as discharged textile dyes, are economically and environmentally important wastes. *Pleurotus* fungi and their spent mushroom waste (SMS) are noticed for their biosorption capacity and for producing unspecific enzymes. The aim of this work is: a) assess ligninases production by *P. sajor-caju* and *P. ostreatus* under submerged fermentation (SmF) and solid state fermentation (SSF); b) perform the discoloration and evaluate the detoxification of vinasse and indigo blue dye by those enzymes. Under SmF, the fungi were grown in vinasse 50% with or without a carrier (bio ball). Biomass and laccase, peroxidase and MnP activities were measured, as well as vinasse discoloration and its toxicity (*D. similis*, 48 h). At the first SSF experiment, the species were inoculated on bagasse+vinasse and laccase and MnP activities were measured; the discoloration of the indigo blue solution was performed with both the enzymatic broth and the inoculated bagasse. The second SSF experiment regarded two SMS from *P. ostreatus* (SMS 1 and 2). Laccase, peroxidase and MnP activities were measured after extraction with distilled water, phosphate-citrate buffer (pH 5) and Ringer solution. The discoloration of the same indigo solution (irradiated or not materials), followed by FTIR analysis of the irradiated substrate, were performed. The toxicity of treated and untreated indigo blue was given by *H. attenuata* (96 h). After 12 days under SmF, both species, grown free or with the carrier, produced the same biomass amount. Immobilized *P. ostreatus* gave the best results for laccase and MnP (six days), MnP (12 days), along with free *P. ostreatus*, and peroxidase (12 days). Peroxidase (six days) was better produced by free *P. ostreatus*; laccase (12 days) was higher for immobilized *P. sajor-caju*. Vinasse was more extensively discolored by *P. sajor-caju* in all treatments. Treated vinasse became less toxic for *D. similis*. After 14 days growing on bagasse, both species produced laccase (14 UI g⁻¹ for *P. sajor-caju* and 0,4 for *P. ostreatus*) and no MnP activity was observed. Indigo blue was better discolored by *P. sajor-caju* enzymatic broth (74% at the proportion of 2:8); the discoloration with inoculated bagasse was statistically the same for both fungi. Regarding the SMS, laccase was the outstanding enzyme for SMS 1, reaching 2 UI g⁻¹ with distilled water 0,1 g mL⁻¹. Non irradiated SMS performed a better discoloration of the indigo dye solution than irradiated SMS 1 with 20 and 60 mL of solution. For SMS 2, a greater discoloration by the non-irradiated material compared to the irradiated one was achieved only with 60 mL of the indigo blue solution. SMS 2 + indigo blue spectra was different than the control material (no dye), suggesting that SMS 2 interacted more with the dye than SMS 1. The indigo blue solution had its toxicity towards *H. attenuata* increased after interacting with SMS 1 and 2. This work concluded that the studied wastes allowed enzymes expression by *P. sajor-caju* and by *P. ostreatus*, the discoloration of vinasse and indigo blue and a decrease in vinasse toxicity.

Keywords: Bagasse; Enzymes; Indigo blue; *Pleurotus*; Sugarcane; Vinasse

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A madeira e seus componentes.....	34
Figura 2 - Estrutura molecular do corante índigo, reduzido e oxidado.....	39
Figura 3 - Esquema simplificado do ciclo catalítico da enzima lacase.....	46
Figura 4 - Esquema simplificado do ciclo catalítico da enzima MnP.....	48
Figura 5 - Pellets de <i>P. sajor-caju</i> crescido em vinhaça.....	50
Figura 6 - Esquema dos efeitos tóxicos morfológicos em <i>H. attenuata</i>	56
Figura 7 - Esquema representativo de um espectrômetro do tipo FTIR.....	58
Figura 8 - “Bio balls” antes (A) e após a colonização por <i>P. ostreatus</i> (B).....	61
Figura 9 – Unidade produtora de cogumelos <i>P. ostreatus</i> (SMS 1), evidenciando-se o micélio na superfície.....	67
Figura 10 – Bloco de produção de shimeji comercial (SSC 2) exibindo frutificação três semanas após seu descarte.....	93
Figura 11 – Espectro no infravermelho dos SMS 1 (a) e 2 (b) irradiados (gama, 5 + 7,5 kGy), após exposição a diferentes volumes da solução de corante índigo.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização da vinhaça de acordo com sua origem.....	29
Tabela 2 - Biomassa seca (g L^{-1}) produzida durante 12 dias por <i>P. sajor caju</i> e <i>P. ostreatus</i> , micélio aderido e livre.....	71
Tabela 3 - Biomassa seca (g L^{-1}) produzida em vinhaça por <i>P. sajor caju</i> e <i>P. ostreatus</i> em estudos prévios.....	72
Tabela 4 – Atividade das enzimas lacase, peroxidase e MnP (UI L^{-1}) de <i>P. sajor-caju</i> e <i>P. ostreatus</i> após seis dias de cultivo em vinhaça 50%, micélio livre e aderido.....	74
Tabela 5 - Atividade das enzimas lacase, peroxidase e MnP (UI L^{-1}) do sobrenadante de <i>P. sajor-caju</i> e <i>P. ostreatus</i> após seis dias de cultivo em vinhaça 50%, em estudos prévios.....	75
Tabela 6 – Atividade das enzimas lacase, peroxidase e MnP (UI L^{-1}) de <i>P. sajor-caju</i> e <i>P. ostreatus</i> (livres e aderidos) após 12 dias de cultivo em vinhaça 50%.....	77
Tabela 7 - Atividade das enzimas lacase, peroxidase e MnP (UI L^{-1}) de <i>P. sajor-caju</i> e <i>P. ostreatus</i> após 12 dias de cultivo em vinhaça 50%, em estudos prévios.....	77
Tabela 8 – Descoloração da vinhaça por <i>P. sajor-caju</i> e <i>P. ostreatus</i> (livres e aderidos) após 6 dias.....	80
Tabela 9 – Descoloração da vinhaça por <i>P. sajor-caju</i> e <i>P. ostreatus</i> (livres e aderidos) após 12 dias.....	80
Tabela 10 - Valores de CL_{50} (48 h) para <i>D. similis</i> - vinhaça in natura (controle) e tratada por <i>P. sajor-caju</i> e <i>P. ostreatus</i>	83
Tabela 11 - Atividade enzimática de <i>P. sajor-caju</i> e <i>P. ostreatus</i> , cultivados em bagaço de cana-de açúcar por 14 dias - 28°C	84
Tabela 12 - Porcentagens de descoloração de índigo (0,02%) nas diferentes proporções corante:extrato enzimático v/v ($\lambda = 580 \text{ nm}$).....	87
Tabela 13 - Porcentagens de descoloração do corante azul índigo ($\lambda = 580 \text{ nm}$) por bagaço com e sem inoculação de <i>P. sajor-caju</i> e <i>P. ostreatus</i> crescidos por 12 dias.....	89
Tabela 14 – Atividade enzimática da lacase do SMS 1 de <i>P. ostreatus</i> cultivado por 90 dias na proporção de $0,1 \text{ g de SMS mL}^{-1}$ de extrator.....	91
Tabela 15 – Atividade enzimática da lacase do SMS 2 de <i>P. ostreatus</i> cultivado por 90 dias, na proporção de $0,1 \text{ g de SMS mL}^{-1}$ de extrator.....	91
Tabela 16 - Atividade enzimática da peroxidase dos SMS 1 e 2 de <i>P. ostreatus</i> cultivado por 90 dias, nas proporções de 0,1 e $0,033 \text{ g mL}^{-1}$, de acordo com o extrator.....	91

Tabela 17 - Atividade enzimática da peroxidase dos SMS 1 e 2 de <i>P. ostreatus</i> cultivado por 90 dias, nas proporções de 0,1 e 0,033 g mL ⁻¹ , de acordo com o substrato.....	92
Tabela 18 - Atividade enzimática da MnP dos SMS 1 e 2 de <i>P. ostreatus</i> cultivado por 90 dias, na proporção de 0,1 g de SMS mL ⁻¹ de extrator.....	92
Tabela 19 – Porcentagem de descoloração do azul índigo (0,02%, $\lambda = 580$ nm) pelo SMS 1, nos volumes de 10, 20 e 60 mL, por 2,5 g de SMS de <i>P. ostreatus</i> cultivado por 90 dias e irradiado (gama, 5 +7,5 kGy) ou não.....	95
Tabela 20 – Porcentagem de descoloração do azul índigo (0,02%, $\lambda = 580$ nm) pelo SMS 2, nos volumes de 10, 20 e 60 mL, por 2,5 g de SMS de <i>P. ostreatus</i> cultivado por 90 dias e irradiado (gama, 5 +7,5 kGy) ou não.....	95
Tabela 21 - Valores de CL ₅₀ (96 h) para <i>H. attenuata</i> – solução de azul índigo (controle) e após sua adsorção pelos SMS 1 e 2.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE	Concentração efetiva
CENO	Concentração de efeito não observado
CEO	Concentração de efeito observado
CI	Concentração inibitória
CL	Concentração letal
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CTC	Capacidade de troca catiônica
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
EIV	Espectroscopia infravermelho
EIVTF	Espectroscopia Infravermelho por transformadas de Fourier
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAU-ONU	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FTIR	“Fourier Transform Infrared”
HAPs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
LiP	Lignina peroxidase
MBBR	“Moving bed bioreactor”
MINTER	Ministro de Estado do Interior
MnP	Manganês peroxidase
PEG	Polietilenoglicol
PUF	“Polyurethane foam”
RBRM	Reator biológico de leito móvel
SmF	“Submerged fermentation”
SMC	“Spent mushroom compost”
SMS	“Spent mushroom waste”
SSF	“Solid state fermentation”
VC	valor crônico
UV	Ultra-violeta

1 INTRODUÇÃO

Efluentes e resíduos de composição complexa são gerados pelo homem em proporções crescentes ao longo dos anos. Estes descartes atingem todas as fases de um ambiente e podem sofrer alterações moleculares, apresentando efeitos de toxicidade (CHIACCHIERINI; RESTUCCIA; VINCI, 2004). Como tentativa de se contornar essa problemática, vêm sendo desenvolvidas, ao longo das últimas décadas, tecnologias que se agrupam no ramo da biorremediação e da biodegradação. Estas emergem como uma forma de aplicar os mecanismos já existentes na natureza para o tratamento de efluentes/resíduos antropogênicos, buscando-se, de forma integrada, viabilidade econômica e ambiental (SEN; CHAKRABARTI, 2009).

Os basidiomicetos do gênero *Pleurotus*, assim como outros fungos ligninolíticos, são microrganismos promissores para a degradação de moléculas poluentes. Isso porque muitas destas apresentam estrutura molecular semelhante à dos componentes da lignina, sendo passíveis de oxidação pelo sistema enzimático inespecífico e de alto potencial redox dos fungos da podridão branca (JURADO et al., 2011). A literatura reporta aplicações desses organismos na degradação de resíduos como fenóis, organoclorados, pesticidas, corantes, efluentes municipais, lodo de ETE, vinhaça etc. (BARR;AUST, 1994; DENIZLI et al., 2005; DELLAMATRICE, 2005; SOUZA, 2012).

Em relação ao tratamento de corantes, os fungos da podridão branca têm sido descritos como um dos grupos de microrganismos mais promissores porque, além das características já mencionadas, produzem enzimas extracelulares, capazes de solubilizar compostos pouco disponíveis. Além disso, como seu metabolismo é aeróbio, não há a formação de amins aromáticas (ALI, 2010).

Uma vez que esses organismos são capazes de crescer em resíduos agrícolas (como palha de arroz, de algodão, bagaço e vinhaça de cana-de-açúcar), estes permitem o reaproveitamento de materiais, normalmente vistos como descarte, na geração de produtos de alto valor agregado, como biomassa de elevado valor nutricional aplicável na alimentação animal e enzimas purificadas (JURADO et al., 2011; CASTRO et al., 2007). Resíduos lignocelulósicos também são a base do substrato de produção comercial de cogumelos, ramo no qual o gênero *Pleurotus* se destaca, e o resíduo sólido dessa atividade (“spent mushroom waste” - SMS), suas enzimas e sua microbiota têm sido empregados na biorremediação (SINGH et al., 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar a expressão de ligninases pelos fungos *Pleurotus sajor-caju* e *P. ostreatus*, comparando-se a eficiência das produções em fermentação submersa (SmF) com e sem material suporte e em fase sólida (SSF).

2.2 Objetivos específicos

- Comparar a eficiência da produção enzimática em fermentação submersa, em presença e ausência de material suporte;
- Obter enzimas de *Pleurotus* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar umedecido com vinhaça e avaliar sua capacidade de descolorir o corante azul índigo;
- Analisar o substrato de produção comercial de *P. ostreatus* quanto à obtenção de enzimas e descoloração do azul índigo;
- Avaliar a descoloração e a toxicidade da vinhaça (com e sem “bio ball”), pela ação das enzimas ligninolíticas, e do corante azul índigo, pelas enzimas, bagaço de cana e substrato da produção comercial de *P. ostreatus*;
- Comparar a produtividade de ligninases entre os sistemas SmF e SSF e avaliar sua viabilidade de utilização;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A Indústria sucroalcooleira no Brasil

A coleta de dados realizada pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAU-ONU) mostra que, entre 1950 e 2007, a área global destinada ao cultivo da cana-de-açúcar mais do que triplicou e a quantidade de cana colhida aumentou em quase seis vezes. Atualmente, uma grande parcela da produção mundial é concentrada em poucos países - os três maiores produtores são responsáveis por 60% da colheita (FISCHER et al., 2008).

O Brasil está entre os maiores produtores de cana-de-açúcar, junto com Índia, China e Tailândia, e se destaca por ter sido responsável por um terço do total da colheita da cana em 2007 (FISCHER et al., 2008). A extensão territorial nacional ocupada por esse cultivo é de, aproximadamente, 6,5 milhões de hectares (0,6% do território) (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE ACÚCAR - UNICA, 2007). No cenário nacional, o estado de São Paulo se apresenta como o maior produtor de açúcar e etanol, tendo moído, na safra 2011/2012, 305.636.316 toneladas de cana, o que resultou na produção de 21.112.970 toneladas de açúcar e 11.639.325 toneladas de etanol (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2012).

A importância do setor sucroalcooleiro vem desde os tempos coloniais, tendo este se estabelecido como o segundo ciclo produtivo do Brasil e sendo amplamente reestruturado na década de 1930, com forte intervenção estatal (UNICA, 2007). Nos anos recentes, assiste-se a uma valorização do etanol combustível, como forma de ganho de autonomia em relação ao petróleo e ao aumento do preço do açúcar no mercado. Paralelamente, a crise ambiental favorece o setor com o crescimento da alcoolquímica pela exaltação da assim chamada Química Verde e pela necessidade de redução da emissão de gases-estufa. Como consequência, vivenciamos a modernização e o aumento de eficiência do complexo sucroalcooleiro, o que levou este setor a ser um dos mais de ponta e competitivos do mundo (FISCHER et al., 2008; LAIME et al., 2011; GOES; MARRA; SILVA, 2008).

De acordo com Fischer e colaboradores (2008), em média, 300.000 hectares por ano foram convertidos em lavoura canavieira entre 2000 e 2007 e a perspectiva é de que essa média aumente ao longo dos anos. Um crescimento desse setor implica, necessariamente, num aumento da produção de seus resíduos e das áreas cultivadas por cana-de-açúcar, o que acaba ocasionando uma intensificação da pressão sobre áreas de vegetação nativa, particularmente sobre o cerrado e matas ciliares (AMARAL et al., 2008; FISCHER et al., 2008).

Fischer e colaboradores (2008) ressaltam que a indústria sucroalcooleira também possui, historicamente, um mercado potencial poluidor (tanto para a água como para o ar e para o solo) e sua magnitude varia de acordo com as tecnologias adotadas nos processos produtivos. As principais fontes de poluentes são a água de lavagem da cana e a vinhaça. Este potencial nocivo fez com que a indústria sucroalcooleira procurasse tornar sua produção sustentável em relação ao meio ambiente, adotando medidas como: controle biológico de pragas, combate à perda do solo por erosão, redução no uso de fertilizantes sintéticos e da perda de água e diminuição da emissão de gases-estufa com a eliminação da queimada. Outra tendência do setor é a busca por alternativas tecnológicas que permitam a reincorporação de resíduos à cadeia produtiva, como o uso da vinhaça e da torta de filtro como fertilizantes (AMARAL et al., 2008; AGUIAR-FILHO, 2008).

3.2 Vinhaça de cana-de-açúcar

A vinhaça (vinhoto, tiborna, calda, etc.) é o resíduo da fermentação do mosto de melaço ou do mosto de caldo. Geralmente, 60% desta provem do mosto de caldo e 40% de uma mistura desses. De acordo com Rossetto e Santiago (2009), a vinhaça de melaço é mais concentrada do que a de caldo. Algumas de suas características são: coloração escura, pH ácido, baixo teor de sólidos, alta temperatura na fonte (aproximadamente, 107°C), altos valores de DBO e DQO, elevados teores de potássio e reduzido conteúdo de nitrogênio, fósforo, cálcio e magnésio (AMARAL et al., 2008).

A Tabela 1 elenca algumas características e componentes da vinhaça de cana-de-açúcar, de acordo com sua origem. A composição e a quantidade dos diferentes componentes podem variar em função das características do vinho e do caldo utilizado, das técnicas empregadas no preparo do mosto e na fermentação alcoólica e das linhagens de leveduras empregadas no processo. As propriedades químicas da vinhaça também estão ligadas à composição do caldo e esta, por sua vez, é dependente das características do solo e do microclima da região. Dessa forma, pode-se afirmar que o meio físico tem uma influência sobre as particularidades desse resíduo e, portanto, deve ser adotada uma estratégia específica para o manejo da vinhaça proveniente de regiões distintas (FREIRE; CORTEZ, 2000a).

Tabela 1 - Caracterização da vinhaça de acordo com sua origem - adaptado de Marques (2006)

Parâmetro	Melaço	Caldo	Misto
pH	4,2-5	3,7-4,6	4,4-4,6
Temperatura (°C)	80-100	80-100	80-100
DBO (mg L ⁻¹ O ₂)	25.000	6.000-16.500	19.800
DQO (mg L ⁻¹ O ₂)	65.000	15.000-33.000	45.000
Sólidos totais (mg L ⁻¹)	81.500	23.700	52.700
Sólidos voláteis (mg L ⁻¹)	60.000	20.000	40.000
Sólidos fixos (mg L ⁻¹)	21.500	3.700	12.700
Nitrogênio (mg L ⁻¹ N)	450-1610	150-700	480-710
Fósforo (mg L ⁻¹ P ₂ O ₅)	100-290	10-210	9-200
Potássio (mg L ⁻¹ K ₂ O)	3.740-7.830	1.200-2.100	3.340-4.600
Cálcio (mg L ⁻¹ CaO)	450-5.180	130-1.540	1.330-4.570
Magésio (mg L ⁻¹ MgO)	420-1.520	200-490	580-700
Sulfato (mg L ⁻¹ SO ₄)	6.400	600-760	3.700-3730
Carbono (mg L ⁻¹ C)	11.200-22.900	5.700-13.400	8.700-12.100
Relação C/N	16-16,27	19,7-21,07	16,4-16,43
Matéria orgânica (mg L ⁻¹)	63.400	19.500	3.800
Subst. redutoras (mg L ⁻¹)	9.500	7.900	8.300

De acordo com a literatura, há uma geração de 10 a 18 litros de vinhaça para cada litro de etanol; as indústrias mais modernas, no entanto, conseguem restringir a produção em uma faixa de 10 a 12 L. Apesar da existência de algumas alternativas tecnológicas, o principal destino da vinhaça ainda é sua reaplicação na lavoura canavieira por meio de uma técnica conhecida como fertirrigação. Os valores nutricionais da vinhaça, assim como os da torta de filtro, são conhecidos desde a década de 50, porém sua aplicação como fertilizante teve início apenas nos anos 70 e intensificou-se no final do século XX, período em que o preço dos fertilizantes químicos aumentou consideravelmente e a questão ambiental se tornou mais relevante no cenário nacional (ROSSETTO; SANTIAGO, 2009).

Segundo a Embrapa (2010), a fertirrigação pode ser definida como a irrigação de uma cultura com a dissolução de fertilizantes na água, o que favorece a manutenção dos nutrientes em suas concentrações adequadas. Marques (2006) descreve que há três formas de aplicação

da vinhaça em campo: por infiltração, diretamente com caminhões e com moto bombas acopladas a caminhões. A adoção de cada sistema depende das condições locais e deve assegurar a correta dosagem deste fertilizante. Fuess e Garcia (2014) estimam que o volume anual de vinhaça depositada pela fertirrigação atinja, no Brasil, 325 bilhões de litros.

Fuess e Garcia (2014) ressaltam que a fertirrigação permite a correção dos solos, pois sua agregação é reestabelecida, além de que há um aumento em sua capacidade de troca catiônica, bem como de seu poder de retenção hídrica. Essa técnica também tem uma influência benéfica sobre a microbiota edáfica, o que resulta em um consumo dos ácidos da vinhaça, elevando seu pH. Esses fatores favorecem o ciclo vegetativo da cana-de-açúcar e aumentam sua riqueza sacarina e a pureza do caldo resultante.

A microbiota do solo, enriquecida pela presença de vinhaça, pode exercer funções relativas ao ciclo do nitrogênio, à mineralização de moléculas orgânicas e à modificação da estrutura edáfica. É sabido que a vinhaça, por adicionar matéria orgânica ao solo, promove sua humificação e facilita a mobilização de seus nutrientes (FREIRE; CORTEZ, 2000b).

Apesar dos benefícios proporcionados pela devolução de matéria orgânica ao solo com a aplicação de vinhaça via fertirrigação, considera-se que este resíduo tenha um poder poluidor cerca de 100 vezes superior ao do esgoto doméstico por suas altas cargas de matéria orgânica, nitrogênio, fósforo, sulfato e potássio. A vinhaça é tida como um fator de insalubridade, não só pelo potencial poluidor, mas também pelo mau cheiro, turbidez e cor da água que a recebe; esta também é associada ao surgimento de endemias como a esquistossomose, a malária e a amebíase (LAIME et al., 2011; FUESS; GARCIA, 2014).

Laime e colaboradores (2011) comentam que a prática de despejo da vinhaça nos corpos d'água é tão antiga quanto a própria indústria sucroalcooleira, bem como o conhecimento de seus efeitos nocivos. Esse evento proporciona o apodrecimento da água do sistema, uma vez que o grande aporte de matéria orgânica (DBO na faixa de 12.000 a 20.000 ppm) torna o balanço de oxigênio negativo.

Em relação aos aspectos físico-químicos do solo, a vinhaça, quando aplicada em razões próximas a $1.000 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$, pode trazer efeitos como a redução do alumínio disponível e o aumento da capacidade de troca catiônica e do teor de potássio, podendo resultar na lixiviação desse elemento. Estudos também relatam uma possível perda de cálcio e magnésio nos solos e redução de seu teor de argila (FREIRE; CORTEZ, 2000c).

De acordo com Rezende (1983a), a vinhaça de mosto de melaço, quando aplicada no solo em quantidades superiores a $50 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$, tem a propriedade de aumentar sua condutividade elétrica e, conseqüentemente, a pressão osmótica. Essa alteração se dá,

principalmente, pelos níveis de nitrogênio e fósforo nesse resíduo e pode estar associada ao desencadeamento de um processo de salinização. O mesmo autor ressalta que os cátions bivalentes da vinhaça possuem a capacidade de dispersar as partículas coloidais de textura média, o que levaria ao empobrecimento do solo pela lixiviação dos minerais e reduz sua porosidade.

Paulino e colaboradores (2010) mostraram que esse resíduo, quando aplicado durante 12 anos consecutivos ou mais, pode aumentar o grau de compactação dos solos. Consequentemente, a dificuldade de penetração das raízes da cana-de-açúcar aumenta, fazendo com que estas se concentrem na camada do solo compreendida entre 20 e 40 cm. Rossetto e Santiago (2009) também alertam para o risco de contaminação do lençol freático pela lixiviação de ânions, em especial, pelo excesso de potássio.

Além do potencial poluidor da vinhaça relacionados à fertirrigação ou de sua disposição enquanto efluente, existem os problemas decorrentes de seu armazenamento em áreas de sacrifício (bacias ou lagoas de acumulação), que é o destino do volume que excede a necessidade de fertirrigação (FREIRE; CORTEZ, 2000a). Segundo Marques (2006), estes tanques devem ser obrigatoriamente revestidos com lona plástica, manta asfáltica, argila compactada ou concreto, porém essas condições não são sempre respeitadas. A partir destes reservatórios, a vinhaça pode percolar para o subsolo e contaminar o lençol freático, desprender compostos poluentes na atmosfera, desencadear a proliferação de microrganismos e larvas de insetos ou, até mesmo, ser carregada para cursos d'água próximos em ocasiões de enxurradas (REZENDE, 1983b).

Do ponto de vista ecológico, a vinhaça é capaz de desestruturar a teia trófica de ambientes de água doce. Esse desequilíbrio é ocasionado, principalmente, pela mortandade do fito e do zooplâncton e de plantas aquáticas (resultado da eutrofização e da turbidez da água) e por reduzir o pH e o oxigênio dissolvido do meio; efeitos notadamente tóxicos a peixes, anfíbios e crustáceos também são relatados (REZENDE, 1983b).

As evidentes externalidades socioambientais provocadas pela vinhaça e os decorrentes impedimentos legais de seu descarte no meio ambiente como resíduo bruto levaram à busca por novas tecnologias que permitam o reaproveitamento deste resíduo. Atualmente, as principais alternativas ao descarte da vinhaça são, de acordo com Laime e colaboradores (2011) e Marques (2006), as seguintes:

- Digestão anaeróbia ou aeróbia (grande redução da BOD e, no primeiro caso, produção de metano);
- Produção de leveduras e alimentação animal (rações e produção de cogumelos);
- Construção civil (adição ao cimento);
- Incineração (alimentação de caldeiras);
- Reciclagem via fermentação (elimina a necessidade de diluição em água).
- Composição de fertilizantes organo-minerais

Fuess e Garcia (2014) descrevem que o manejo e o tratamento da vinhaça também englobam técnicas pioneiras como: substrato para o crescimento de microalgas, fitorremediação e uso como fonte de nutrientes na biorremediação de solos.

O mais recomendado pelas agências de saneamento é o tratamento biológico, que se inicia com uma digestão anaeróbia e, em seguida, passa por processos aeróbios (FREIRE; CORTEZ, 2000d). A biodigestão anaeróbia é considerada mais vantajosa do que a aeróbia, pois gera menos lodo, aceita teores mais altos de matéria orgânica e produz o biogás metano. Segundo Silva (2012), um metro cúbico de vinhaça tem o potencial de gerar dez metros cúbicos de biogás. Os estudos em usinas que empregam a biodigestão da vinhaça mostram que esse processo pode reduzir seu poder corrosivo (FREIRE; CORTEZ, 2000d). Vale ressaltar que a maioria dessas tecnologias requer um alto gasto de energia para a evaporação da água.

A principal dificuldade da aplicação da biodigestão da vinhaça é seu alto custo econômico e, por isso, ainda não é aplicada na maioria das indústrias. O que pode favorecer sua implementação é a comercialização do biogás produzido, mas a demanda por este ainda é muito pequeno (FREIRE; CORTEZ, 2000d).

A partir da contextualização acima, depreende-se que o problema ambiental da vinhaça não é inerente à sua produção, mas é resultado do grande volume gerado que excede a necessidade de fertirrigação e outros usos agropecuários (como alimentação animal). Os mais prováveis eventos de poluição ambiental são do volume armazenado em áreas de sacrifício, a partir das quais pode ocorrer percolação e contaminação do lençol freático, volatilização de poluentes e contaminação de corpos d'água superficiais (REZENDE, 1983b).

Do ponto de vista biotecnológico, uma aplicação bastante valiosa que não foi mencionada pela revisão de Laime e colaboradores é o uso da vinhaça como meio de cultivo

de microrganismos e obtenção de seus produtos metabólicos. Os trabalhos de Aguiar-filho, Ferreira e Monteiro (2010), Ferreira (2009) e Souza (2012), por exemplo, valeram-se da vinhaça para a produção de enzimas ligninolíticas. O trabalho de Souza (2012), além do mais, permitiu que essas enzimas fossem empregadas na descoloração do corante têxtil azul índigo. Silva (2012) também traz exemplos do uso da vinhaça na geração de massa seca e proteína alimentar de leveduras.

3.2.1 Legislação pertinente à disposição de vinhaça

Apesar do conhecimento dos danos provocados pela disposição da vinhaça em corpos d'água ter sido adquirido de forma empírica e há alguns séculos, as primeiras regulamentações legais visando à contenção desses malefícios ambientais surgiram apenas no início do século XX e, a partir dessas, começaram os estudos destinados ao desenvolvimento de usos alternativos desse subproduto, sendo o primeiro deles a fertirrigação (LAIME et al., 2011).

A revisão elaborada por Laime e colaboradores (2011) traz um resumo das principais legislações brasileiras pertinentes à vinhaça. Segundos esses autores, estas são:

1. Portaria MINTER n° 323, de 29/11/1978: veta a disposição de vinhaça nos mananciais superficiais.
2. Portaria MINTER n° 323, de 03/11/1980: mesma finalidade da portaria anterior.
3. Resolução CONAMA n° 0002, de 05/06/1984: estabelece que as unidades produtoras realizem estudos que sejam apresentados como um projeto de resolução, especificando normas para o controle da poluição oriunda de seus efluentes e da água lavagem da cana.
4. Resolução CONAMA n° 0001, de 23/01/1986: Constrange as novas usinas ou usinas já existentes que queiram fazer ampliações a apresentar o EIA/RIMA.
5. Lei n° 6.134, de 02/06/1988, art. 5°, do Estado de São Paulo: determina que “os resíduos líquidos, sólidos ou gasosos, provenientes de atividades agropecuárias, industriais, comerciais ou de qualquer outra natureza, só poderão ser conduzidos ou lançados de forma a não poluírem as águas subterrâneas”.

O uso de vinhaça como fertilizante, no estado de São Paulo, é regulamentado pela Portaria P. 4231 (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB, 2006). Segundo esta legislação, a definição da dose a ser aplicada é relacionada à saturação de potássio no cálculo da capacidade de troca catiônica (CTC); a portaria também exige o monitoramento das áreas subterrâneas, o que permite um maior controle de uma possível contaminação. Além dessa portaria, a CETESB exige que, anualmente, cada unidade produtora de açúcar e álcool apresente um plano de aplicação da vinhaça, como medida fiscalizadora (UNICA, 2007).

Do ponto de vista legal, a vinhaça é classificada como um resíduo sólido de classe II (resíduo não inerte), uma vez que suas características a inviabilizam para o seu lançamento na rede pública de esgoto ou em corpos d'água.

3.3 Resíduos lignocelulósicos

A madeira é considerada como o substrato mais abundante na terra e é constituída de lignina e dos polissacarídeos celulose, hemicelulose e pectina, além de algumas proteínas (Figura 1). Dessa forma, a composição média de um resíduo agrícola é de 30 a 40% de celulose, 20 a 30% de hemicelulose e 15 a 35% de lignina; de maneira geral, a biomassa vegetal é pobre em nitrogênio e fósforo. Uma vez que essas moléculas não ocorrem isoladamente, mas sim intimamente ligadas, é comum o uso dos termos “resíduos lignocelulósicos” ou “lignoproteicos” (MOORE; ROBSON; TRINCI, 2011).

Figura 1 - A madeira e seus componentes

Adaptado de http://www.ipe.ethz.ch/laboratories/ltr/education/Studienarbeiten/Wood_structure

Apesar da enorme abundância de materiais lignocelulósicos na biosfera, uma fração muito pequena destes têm importância econômica: sua grande maioria não é aproveitada pelos principais setores que fazem uso de materiais vegetais (agricultura e indústrias têxtil e de papel e celulose) e ainda é abordada como resíduo. Nos últimos anos, no entanto, a crescente população humana e a depleção de recursos naturais têm feito com que esse panorama sofra modificações e está em curso uma busca por aplicações industriais e biotecnológicas da biomassa vegetal como uma tentativa de se agregar valor a esse conjunto de moléculas de alta potencialidade energética (JURADO et al., 2011).

3.3.1 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar é um dos muitos resíduos lignocelulósicos provenientes da agricultura que tem sido empregado na fermentação sólida (SSF) e nos campos da biodegradação e biorremediação. Este é notado por ser amplamente disponível e de baixo custo. De acordo com Karp e colaboradores (2012), a produção anual deste resíduo é de 186 milhões de toneladas por ano e, segundo Gusmão e colaboradores (2013), seu preço é de US\$ 0,015 Kg⁻¹. Pompeu (2010) descreve que a composição média deste material é a seguinte: 45% de celulose, 25% de hemicelulose, 20% de lignina e o restante de substâncias categorizadas como componentes estranhos.

Além das características mencionadas acima, o bagaço, como mostrado pelo trabalho de Aguiar Filho, Ferreira e Monteiro (2010), se apresenta como um material promissor para o crescimento de basidiomicetos ligninolíticos e para a expressão de ligninases. O bagaço também pode ser considerado um material de interesse biotecnológico pela sua capacidade de adsorver diferentes moléculas. Gusmão e colaboradores (2013) descrevem que os grupos OH⁻ presentes nas macromoléculas se combinam a outras substâncias (como EDTA) e ganham novas propriedades adsorptivas. A literatura traz exemplos de aplicações do bagaço na adsorção de corantes (azul índigo, verde malaquita) (SOUZA, 2012; XING; DENG, 2009) e metais (Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺) (KARNITZ et al., 2007; PEREIRA et al., 2009).

A fermentação do bagaço por fungos pode dar-se após um pré-tratamento físico e/ou químico ou com o material *in natura*. Os pré-tratamentos têm a função de aumentar a biodisponibilidade da celulose e são, normalmente, efetuados com H₂SO₄, NaOH, explosão por vapor, aquecimento, moagem, solventes orgânicos, CO₂, etc. (POMPEU, 2010). Os pré-tratamentos também podem favorecer o desenvolvimento do micélio e, conseqüentemente, a

síntese dos produtos de interesse, uma vez que estes aumentam a porosidade do material (GOWTHAMAN; KRISHNA; MOO-YOUNG, 2001).

3.3.2 A produção de cogumelos e o “Spent mushroom waste”

Os cogumelos se destacam por sua importância gastronômica. Segundo Eira (2004), os cogumelos de *P. ostreatus*, por exemplo, são considerados de excelente qualidade gastronômica, possuindo teor proteico particularmente elevado e grande quantidade de vitaminas, como tiamina, ácido fólico, niacina e ácido ascórbico.

Assim como descrito por Eira (2004), existe uma associação direta entre a fungicultura e o reaproveitamento de resíduos agroindustriais, uma vez que o substrato para o crescimento dos corpos de frutificação é composto de resíduos como escórias de serrarias, bagaços, palhas e outras sobras das agroindústrias do trigo, algodão, arroz e milho e esterco de diversas origens. A literatura revela que os materiais escolhidos para a composição dos substratos é bastante variável, indicando que esta se relaciona à disponibilidade de cada material dentre as regiões produtoras.

Os resíduos utilizados para a montagem do bloco de produção são misturados e a mistura é tamponada com calcário, recebe sulfato de cálcio (propicia a aeração e a retenção de água) e, antes da inoculação, passa por compostagem, pasteurização e condicionamento químico, físico e biológico. A relação C/N do material final varia de acordo com a espécie cultivada. Por exemplo, para o cultivo de *Agaricus spp*, a relação deve ser entre 25 e 50/1, enquanto que para *P. ostreatus* (shimeji), esta deve ser entre 50 e 100/1 (EIRA, 2004).

Eira (2004) descreve que o gênero *Pleurotus*, o mais cultivado para a produção de cogumelos comestíveis, apresenta espécies mais resistentes e mais adaptáveis a condições climáticas, fatores estes que fazem deste grupo um ótimo candidato a ser cultivado no Brasil. Seus cogumelos podem ser cultivados em uma ampla gama de substratos orgânicos, porém a eficiência produtiva varia entre os compostos escolhidos. Algumas espécies cultivadas para fins alimentícios são: *P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *P. ostreatoroseus*, *P. eous*, *P. pulmonarius* e *P. conrncoipiae*.

De acordo com Singh e colaboradores (2011), o resíduo da produção comercial de cogumelos de *P. ostreatus* shimeji e *P. sajor-caju*, também conhecido como SMS (“spent mushroom substrate”) ou SMC (“spent mushroom compost”) é um material que merece atenção por sua riqueza em enzimas ligninolíticas. O SMS é definido como uma mistura de micélio, enzimas extracelulares e materiais vegetais comumente usados na fungicultura

(PHAN; SABARATNAM, 2011). Singh, Ahlawar e Rajor (2012) também destacam que o SMS pode atuar como adsorbente de variadas moléculas e abriga uma diversificada comunidade de bactérias e fungos heterotróficos (ex. *Schizophyllum commune*, *Aspergillus fumigatus* e *Bacillus spp.*) que pode contribuir para a oxidação de xenobióticos.

Estima-se que, para cada quilograma de cogumelo produzido, haja o descarte de cinco quilogramas deste substrato; uma fazenda média descarta cerca de 25 toneladas em um mês e destinação deste acaba sendo um problema (PHAN; SABARATNAM, 2011). Seus principais destinos finais são: incineração, soterramento, compostagem com resíduos domésticos, dispersão no terreno e disposição em aterros (SINGH et al., 2011). Por outro lado, suas potenciais aplicações biotecnológicas são: alimentação animal, geração de energia, produção agrícola, produção de enzimas e biorremediação (PHAN; SABARATNAM, 2011). Zhou e colaboradores (2012) citam que o SMS vem sendo empregado na adsorção de petróleo, pentaclorofenol, cobre, cádmio e cromo.

Acredita-se que a prevalência da expressão de uma enzima ou de outra seja dependente tanto da composição do substrato quanto da espécie fúngica cultivada (PHAN; SABARATNAM, 2011). Um ponto importante discutido pelos mesmos autores é a técnica utilizada para a extração dessas proteínas e destaca-se que a extração por um sistema bifásico aquoso pode ser promissora.

Trabalhos como os de Singh e colaboradores (2011), Zhou e colaboradores (2012) e Papinutti e Forchiassin (2010) têm revelado que as enzimas contidas no SMS são eficientes na promoção da descoloração de soluções de corantes azo, catiônicos, antraquinonas, heterocíclicos, indigóides e trifenilmetano. Os autores também evidenciaram o papel adsorvivo deste resíduo e que este varia de acordo com: tipo corante, pH do meio, quantidade e dimensões das partículas do SMS. Singh, Abdullah e Vikineswary (2003) também registraram uma redução da toxicidade em mais de 50% das soluções de corante, de acordo com o teste com *Artemia salina*, com a aplicação de extrato enzimático de *P. sajor-caju*.

Ao final do ciclo produtivo do fungo, os materiais vegetais utilizados têm sua área de superfície específica aumentada (ZHOU et al., 2012). Doble e Kumar (2005a) comentam que a biosorção é vantajosa quando o corante é tóxico demais para permitir a viabilidade celular e descrevem que há a possibilidade de que a biomassa fúngica utilizada seja regenerada. Esse procedimento pode ser efetuado com álcoois (metanol e etanol), soluções alcalinas ou surfactantes não iônicos, como o Tween.

3.4 Corantes e a indústria têxtil

Segundo os dados trazidos pela revisão de Ali (2010) e por Doble e Kumar (2005b), a produção anual de corantes gira em torno de 7×10^5 toneladas anuais e compreende cerca de 10.000 moléculas diferentes. Esse volume é aplicado num amplo leque de indústrias (alimentícia, farmacêutica, cosmética, têxtil, de papel e celulose, do couro, etc.). Uma vez que as aplicações são tão diversificadas, também o são as estruturas moleculares dessas substâncias que, além de serem altamente recalcitrantes, são frequentemente tóxicas.

A parte da molécula de corante responsável pela absorção da luz e, consequentemente, por conferir sua cor específica, é conhecida como grupo cromóforo. Essa região é caracterizada pela presença de heteroátomos, como N, S e O, e por ligações duplas. Doble e Kumar (2005a) descrevem que os corantes podem ser categorizados de acordo com características de sua aplicação, origem, propriedades físicas ou químicas ou então pelo setor em que é empregado. A classificação sistemática de acordo com a estrutura química é reunida em um documento publicado pela Sociedade de Corantes e Coloristas, conhecido como “color index”. De acordo com este índice, os corantes são divididos em categorias como: nitro, nitroso, azinas, azóicos, carotenoides, xantenos, antraquinonas, indigóides, etc.

A ABIT (Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção) posiciona o Brasil como o quinto maior produtor do setor têxtil porque produtivo de confecção é o quarto maior do mundo. O país também se apresenta como o segundo maior produtor e terceiro maior consumidor mundial de denim. O denim, ou jeans, é usualmente tingido com o corante azul índigo e este processo gera, em média, uma perda de cinco a 20% desta substância, o que pode interferir nos processos ecológicos que ocorrem no ambiente aquático (PASCHOAL; TREMILIOSI-FILHO, 2005).

3.4.1 Corante índigo

De acordo com Balan e Monteiro (2001), os corantes indigóides e antraquinonas são as maiores famílias de corantes do tipo Vat, também conhecidos como corantes à tina ou à cuba. Roessler e Jin (2003) comentam que a quantidade de corantes do tipo vat usada em um ano gira em torno de 30.000 toneladas. Estes corantes são aplicados nas fibras por um processo conhecido como “vatting”: o corante, originalmente insolúvel em água, é reduzido para sua forma *leuco*, solúvel e com afinidade por fibras celulósicas ou animais (Figura 2); uma vez absorvido, este é re-oxidado para sua forma original, novamente insolúvel e com a

coloração restaurada. Os agentes redutores, principalmente compostos de enxofre, são descartados como águas de lavagem, podendo gerar impactos ambientais (ASPLAND, 1992; ROESSLER; JIN, 2003).

Figura 2 – Estrutura molecular do corante índigo, reduzido e oxidado. Adaptado de McKee e Zanger (1991)

Souza (2012) reporta que o corante índigo, o mais importante dos corantes vat, passou a ser sintetizado industrialmente em 1897, o que levou a uma redução em seu custo e a um ganho de qualidade no tingimento; seu uso foi intensificado a partir dos anos 70. Inicialmente extraído das plantas *Indigophera spp.* e *Isatis tinctoria*, hoje o índigo é totalmente sintético e é muito empregado porque apresenta baixa solidez e resistência à abrasão, à lavagem e ao alvejamento, características estas que, justamente, conferem ao jeans a aparência desejada (ASPLAND, 1992). Outros aspectos desses corantes que valorizam seu uso são: bom grau de fixação, tempo de tingimento relativamente curto (160 m min^{-1}) e baixo consumo de água (SOUZA, 2012).

Souza (2012) descreve que o tingimento de fibras naturais, como algodão e linho, com corantes vat não só foi uma prática bem estabelecida nos últimos 90 anos, mas também tem o potencial de permanecer no mercado, passando por aprimoramentos. Melhorias nos processos industriais relativos aos corantes vat compreendem, como descrito por Roessler e Jin (2003), a substituição dos agentes redutores inorgânicos por moléculas orgânicas ou por hidrogenação catalítica.

Uma preocupação do setor têxtil tem sido a recuperação do corante descartado que, de acordo com Souza (2012), pode ser viabilizada com o emprego de membranas polissulfonadas. Estas, apesar de seu alto custo, geram uma economia que permite seu auto-financiamento em menos de dois anos. Pascoal e Tremiliosi-Filho (2005) descrevem que a recuperação e o reaproveitamento do azul índigo também podem ser efetuados pelo processo de eletrofloculação.

3.4.2 Efluentes têxteis

Os efluentes das indústrias têxteis são caracterizados por valores variáveis de DBO e DQO, de acordo com cada etapa do processamento do tecido (ZAHARIA; SUTEU, 2014). Estes são, caracteristicamente, ricos em gorduras, impurezas, nutrientes, compostos de enxofre e resíduos da engomagem. Outros compostos frequentes são surfactantes, sabões, sais e compostos clorados (DOBLE; KUMAR, 2005b). Águas coloridas que atingem corpos d'água podem trazer efeitos tóxicos, aumentam sua DBO, afetam a solubilidade de gases e sua transparência e interferem na qualidade estética do ambiente (FARACO et al., 2009).

Uma questão importante no que diz respeito aos efluentes industriais é a natureza e a toxicidade de seus metabólitos secundários. Assim como descrito por Zaharia e Suteu (2014), frequentemente verifica-se que os produtos resultantes da quebra das moléculas dos corantes apresentam toxicidade, mutagenicidade ou carcinogenicidade. Exemplos desses metabólitos nocivos são o naftaleno e a benzidina.

Como mencionado por Fu e Viraraghavan (2001) e por Ali (2010), a aplicação de microrganismos e suas enzimas, no tratamento desses efluentes tem se mostrado mais eficiente do que os tratamentos convencionais (floculação, flotação e sistemas biológicos instalados em ETEs). As principais vantagens dessa tecnologia são: aplicabilidade sobre moléculas recalcitrantes e em altas concentrações, independência de um período de adaptação dos microrganismos, reduzido volume de lodo e alto controle do processo (KARAM; NICELL, 1997). Singh e colaboradores (2012) também mencionam que esse tipo de tratamento pode ser menos dispendioso em relação a métodos físico-químicos e gera um resíduo final com menor conteúdo salino e toxicidade reduzida.

Ali (2010) descreve que os microrganismos apresentam um papel duplo no tratamento de efluentes têxteis: além de alguns deles degradarem corantes por vias enzimáticas, muitos conseguem adsorver essas moléculas em suas células, vivas ou mortas. Em termos de biorremediação, a biosorção (definida como a captação e o acúmulo de uma substância na biomassa) não é tão promissora, já que pode-se considerar que ela apenas faz com que o problema mude de lugar; do ponto de vista industrial, no entanto, o aprisionamento dos corantes nas células pode ser vantajoso por permitir a recuperação desses compostos.

Quando se fala em biodegradação de corantes, implica-se o catabolismo dessas moléculas por ação biológica, seja este parcial ou completo (mineralização). A redução ou eliminação da cor de uma solução de corantes é resultante da clivagem do grupo cromóforo e

esta não é garantia de que a solução teve seu caráter tóxico e/ou poluidor eliminado (ALI, 2010; ZAHARIA; SUTEU, 2014).

A produção de enzimas capazes de clivar os corantes também não é o único fator que determina a eficiência do tratamento biológico dessas moléculas. De acordo com Doble e Kumar (2005a), a concentração de corante no meio é bastante importante, bem como o pH, eletronegatividade, nível de aeração, temperatura, composição do efluente como um todo, potencial redox e tipos de produtos de reação formados. Além do mais, tem sido demonstrado que corantes de massa molecular menor e com menos substituições são degradados mais rapidamente do que aqueles de massa molecular alta e muitas ramificações.

3.5 Fungos ligninolíticos e suas tecnologias

Por conta da complexidade estrutural da madeira, os microrganismos, em especial os fungos, catabolizam seus componentes de forma diferenciada: os fungos da podridão macia (principalmente ascomicetos do solo) degradam a celulose e a hemicelulose de forma rápida, porém atacam a lignina lentamente; aqueles da podridão marrom (cerca de 200 espécies de basidiomicetos), por outro lado, são especializados na degradação de celulose e hemicelulose, mas quase não exercem ação sobre a lignina; os fungos da podridão branca (cerca de 2000 espécies, principalmente basidiomicetos), por sua vez, atacam principalmente a lignina. Vale ressaltar que a quebra da lignina de origem natural é uma atividade exclusiva do reino Fungi (MOORE; ROBSON; TRINCI, 2011).

A celulose, um polímero não ramificado de monômeros de glicose unidos por ligações β -1,4, é o composto orgânico mais abundante no planeta. Sua estrutura é composta por frações amorfas e cristalinas. Enquanto que as primeiras são catabolizada por hidrólise ácida, as segundas são resistente a essa reação, fazendo com que permaneçam oligômeros compostos de 100 a 300 moléculas de glicose. O complexo multienzimático que degrada a celulose extracelularmente (celulossoma) é composto por endoglucanases, exoglucanases e cellobiases (MOORE; ROBSON; TRINCI, 2011).

A hemicelulose (ou poliose), diferentemente da celulose, é um polímero ramificado que contém hexoses, pentoses e, eventualmente, os ácidos acético e urônico. As enzimas responsáveis pela degradação da hemicelulose são denominadas de acordo com seu substrato: galactanases, mananases, xilanases, etc (FERRAZ, 2004; MOORE; ROBSON; TRINCI, 2011).

A lignina é um polímero fenilpropanólico intensamente ramificado de alto peso molecular. Os monolignóis são derivativos metoxilados do benzeno e se apresentam como estruturas diversificadas. Esse polímero é rico em ligações carbono-carbono e éteres, o que faz com que seu metabolismo seja possível apenas de forma oxidativa e com uma variedade de enzimas que atuam numa série de processos: desmetilação, quebra de anéis benzênicos, clivagem das ligações éteres, oxidação da cadeia lateral de propano. As enzimas-chave que atuam neste processo são consideradas como pertencentes às famílias lacase, peroxidase, lignina peroxidase e manganês peroxidase. Outras moléculas de grande importância são a enzima glioxal oxidase, que produz H_2O_2 extracelular, e o álcool veratrílico, que protege as enzimas contra sua inativação pelo peróxido de hidrogênio (MOORE; ROBSON; TRINCI, 2011).

De forma geral, pode-se dizer que, do total da biomassa cultivada na agricultura, apenas 10 a 20% é aproveitado para fins alimentícios e a grande maioria é destinada a apodrecer, seja na forma de compostagem ou não. Nesse sentido, a atividade dos fungos lignocelulolíticos é de grande valia para a reciclagem desses materiais (MOORE; ROBSON; TRINCI, 2011). Do ponto de vista industrial, os fungos ligninolíticos permitem que os carboidratos de materiais complexos se tornem acessíveis e sejam aproveitados como substratos metabólicos, o que faz com que estes passem de resíduos a matérias primas. Além da incorporação desses resíduos na alimentação animal e na indústria de biocombustíveis, esses podem ser aplicados biotecnologicamente na produção de metabólitos ativos, como alcaloides, antibióticos, enzimas e antioxidantes (JURADO et al., 2011).

Além da função de reciclagem de resíduos agrícolas, os fungos ligninolíticos e suas enzimas vêm sendo empregados biotecnologicamente em uma ampla de setores: biopolpação, transformação química de medicamentos, remoção de fenóis em vinhos, biorremediação (degradação de PCBs, organofosforados, pesticidas, etc.), detoxificação de efluentes, biobranqueamento, etc. (MOORE; ROBSON; TRINCI, 2011; CAÑAS; CAMARERO, 2010). Essa ampla gama de aplicações é possível porque muitos dos compostos que se deseja remover em processos industriais e/ou de biorremediação possuem estrutura molecular semelhante à dos componentes da lignina, sendo passíveis de oxidação pelo sistema inespecífico dos fungos da podridão branca (JURADO et al., 2011).

Silva e Esposito (2004) descrevem que os fungos se destacam em relação a outros microrganismos em aplicações de biorremediação pela presença de hifas que penetram o substrato com facilidade e alcançam os poluentes. Além disso, estes apresentam plasticidade metabólica, o que permite uma rápida adaptação a diferentes fontes de carbono e energia.

Os basidiomicetos ligninolíticos da podridão branca são também considerados os microrganismos mais eficientes na degradação de corante e essa eficiência está diretamente relacionada ao sistema ligninolítico e seu potencial redox, uma vez que muitos corantes têm estrutura molecular semelhante à da lignina. Outro fator que faz com que os fungos se destaquem é a produção de enzimas extracelulares, capazes de solubilizar compostos pouco disponíveis (ALI, 2010). Doble e Kumar (2005a) citam como empecilhos ao tratamento de efluentes têxteis pelos basidiomicetos os baixos valores de pH e a necessidade de alguns compostos que podem não estar presentes no efluente.

O tratamento de efluentes têxteis por vias bacterianas pode ocorrer de forma mais rápida do que aquele por vias fúngicas, no entanto, como mencionado na revisão compilada por Ali (2010), se a degradação bacteriana se der em anaerobiose, haverá a formação de aminas aromáticas (compostos potencialmente tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos) e um sistema que combine anaerobiose e aerobiose deverá ser implementado para a remoção desses compostos nocivos. Os basidiomicetos da podridão branca, por serem organismos aeróbios, dispensam um tratamento consecutivo de seus produtos de reação.

3.5.1 *Pleurotus spp.*

Cohen, Persky e Hadar (2002) descrevem que o gênero *Pleurotus* é um grupo de fungos cosmopolitas de importância alimentar, ambiental, biotecnológica e medicinal. Gao e colaboradores (2010) também atestam que esse grupo se destaca em relação a outros fungos porque suas enzimas têm uma tolerância a temperaturas mais baixas e recebem menos influência negativa da microbiota indígena do solo.

O sistema enzimático ligninolíticos de *Pleurotus* tem sido amplamente estudado e pode-se afirmar que sua aplicação no campo da biorremediação é potencialmente mais eficiente do que o uso de consórcios de microrganismos não ligninolíticos. A literatura também traz inúmeros exemplos da capacidade de *Pleurotus spp.* de mineralizar moléculas recalcitrantes: organofosforados, atrazinas, HAPs, etc. (COHEN; PERSKY; HADAR, 2002).

A medicina tradicional associa ao gênero algumas propriedades medicinais e, assim como apresentado na revisão de Wasser e Weis (1999), diversos estudos caracterizaram polissacarídeos com atividade imunomoduladora, antitumoral, antibiótica, antiviral, hematológica, dentre outras. Pode-se dizer, portanto, que, de uma maneira global, o universo *Pleurotus* permanece inexplorado em muitos de seus aspectos e apresenta um grande potencial biotecnológico.

3.5.2 Enzimas ligninolíticas

Fungos ligninolíticos são de particular destaque para aplicações em biorremediação e biodegradação por duas principais razões:

1. O sistema enzimático ligninolítico possui alto potencial redox, o que permite que as enzimas sejam expressas em concentrações de poluentes altas o suficiente para inibir a atividade ou o crescimento de outros microrganismos;

2. A biodegradação da lignina requer o ataque de enzimas inespecíficas, capazes de clivar diversos substratos, o que possibilita sua atuação sobre uma ampla gama de poluentes (DURÁN; ESPOSITO, 1997; BARR; AUST, 1994). Ferraz (2004) comenta que a função de cada enzima no conjunto de reações que leva à mineralização da lignina não está bem estabelecida, porém, de maneira geral, estas podem ser divididas entre fenoloxidasas (lacases e peroxidases) e enzimas produtoras de H_2O_2 (glicose oxidase, glioxal oxidase e metanol oxidase).

O organismo-modelo no estudo do mecanismo de degradação da lignina é o basidiomiceto da podridão branca *Phanerochaete chrysosporium*, por meio do qual determinou-se que esta atividade é parte do metabolismo secundário e é desencadeada pela escassez de nitrogênio. Para o gênero *Pleurotus*, no entanto, parece que esta relação de causa e efeito não é tão significativa quanto em *P. chrysosporium* e suas espécies são capazes de produzir as enzimas ligninolíticas mesmo na fase de crescimento e em condições normais de suprimento de nitrogênio (MOORE; ROBSON; TRINCI, 2011; RODRIGUEZ et al., 2004).

As principais ligninases pertencem a três grupos: lacases (EC 1.10.32), manganês-peroxidases (MnP - EC 1.11.1.13) e lignina peroxidases (LiP – EC 1.11.1.14), sendo estas expressas pelos basidiomicetos em proporções diferentes (NOVOTNY et al., 2004). De acordo com Ferraz (2004), ordenando-se as enzimas por potencial de oxidação, temos que LiPs > MnPs > Lacases. Cohen (2002) menciona que o gênero *Pleurotus* não é produtor de LiP.

A versatilidade dessas enzimas permite que elas sejam empregadas na indústria de papel e celulose e têxtil, tratamento de efluentes industriais, etc. (BARR; AUST, 1994). De acordo com Ribas (2006), a vinhaça também é um resíduo apropriado para ser degradado por essas enzimas porque apresenta moléculas que atuam como substrato, como fenóis, melanoidinas, furfurais ácidos e ácidos orgânicos.

Apesar de os fungos basidiomicetos estarem entre os melhores produtores de enzimas ligninolíticas, ainda não há uma metodologia para a produção em larga escala desses

compostos. Isso se deve, sobretudo, ao fato de que esta é dependente de diversos fatores, tais quais presença de materiais lignocelulósicos e de indutores, pH do caldo de fermentação, condições de cultivo, natureza e concentração da fonte de carbono e fonte de nitrogênio (PRASAD et al., 2005).

3.5.2.1 Lacase (EC 1.10.3.2)

Enzimas da família lacase (benzenidiol: oxigênio oxidoreduases) são oxigenases contendo cobre que usam como substrato *orto*- e *para*-fenóis e são importantes na degradação de moléculas derivadas da degradação da lignina. Essas enzimas são abundantemente produzidas por fungos ligninolíticos, mas também estão envolvidas em outras funções, como proteção contra o estresse, interações planta-patógeno e morfogênese (MOORE; ROBSON; TRINCI, 2011; GIARDINA et al., 2009).

Lacases são produzidas por bactérias, fungos e plantas, porém as lacases fúngicas são de maior interesse biotecnológico. Isso se dá por uma diferença de potencial redox: normalmente, estas enzimas são classificadas como tendo potencial redox alto ou entre o baixo e o médio (entre 790 e 430 mV) e os fungos, em geral, sintetizam lacases com poder oxidativo maior do que as bactérias (PISCITELLI et al., 2011).

Segundo Giardina e colaboradores (2009), as lacases formam maior subgrupo de oxidases azuis multicobre. Em seus três sítios ativos há a presença de átomos de cobre, que catalisam a oxidação de uma ampla gama de substratos aromáticos (polifenóis, poliaminas, íons inorgânicos, *orto* e *para*-difênóis, etc.), concomitantemente à redução de um oxigênio, dando origem a uma molécula de água.

Os átomos de cobre das lacases se apresentam da seguinte maneira: um átomo tipo 1 (Cu1), um átomo tipo 2 (Cu2) e dois tipo 3 (Cu3). Os dois últimos tipos se arranjam em um “cluster” trinuclear. O cobre tipo 1 é o aceptor de elétrons primário e, a partir dele, ocorrem quatro oxidações subsequentes ao fim das quais os elétrons são transferidos ao “cluster” trinuclear e há formação de água pela redução do oxigênio molecular (GIARDINA et al., 2009). O ciclo catalítico simplificado da lacase está representado na Figura 3, abaixo.

Figura 3 - Esquema simplificado do ciclo catalítico da enzima lacase. Adaptado de Ferraz (2004)

Os substratos fenólicos, quando clivados pela lacase, dão origem a radicais que, de acordo com as condições do meio, se envolvem em reações não catalíticas que resultam em polimerizações, oxidações, desmetilações e quebras alquil-arílicas. A habilidade da lacase de clivar substratos fenólicos pode ter surgido como um mecanismo de defesa contra moléculas aromáticas altamente reativas: promovendo a polimerização destas moléculas, elas se tornam menos reativas, conseqüentemente, produzem menos radicais oxigênio e diminuem o estresse oxidativo nos organismos (DURÁN, 2004; GIARDINA et al, 2009).

A existência de “clusters” de genes de lacases e diferentes isoformas dessas enzimas nos faz refletir sobre o porquê da necessidade dessas variações para o metabolismo fúngico. Uma possível explicação é a de que a lacase apresenta diferentes funções ao longo do ciclo de vida desses organismos, como interações patogênicas e de competição, produção de pigmentos e formação do corpo de frutificação. Estudos sobre a patogenicidade de fungos, por exemplo, mostraram a expressão de lacase apenas em presença do hospedeiro vegetal, sugerindo que a enzima teria um papel na degradação de sua lignina e de compostos tóxicos produzidos pela planta (GIARDINA et al., 2009).

Os principais fatores que induzem a transcrição das lacases são: estágio de crescimento do fungo, patogenicidade, metais, compostos aromáticos e fontes de carbono e nitrogênio. Em relação às fontes de C e N, elas influenciam a produção de lacase tanto por suas concentrações, quanto de acordo com suas origens e da proporção entre as duas. Alguns metais, além do cobre, também possuem a capacidade de atuar como indutores, por exemplo: cádmio, prata e magnésio.

Os compostos aromáticos que atuam como indutores têm estrutura relacionada à da lignina, como o álcool veratrílico, o ácido ferúlico e alguns corantes. Alguns destes, sendo abundantes na serapilheira, podem atuar de forma sinérgica com a humificação e favorecer a degradação de poluentes *in situ* (CAÑAS; CAMARERO, 2010).

Cañas e Camarero (2010) descrevem que moléculas grandes e substratos não fenólicos, que não se ligam à enzima por causa de impedimentos estéricos, também podem ser oxidados pelas lacases. Estas reações dependem da presença de mediadores, como o ABTS, moléculas heterocíclicas contendo o grupo N-OH e o ácido *p*-cumárico. Segundo Moore, Robson e Trinci (2011), esses compostos adicionais atuam como cossustratos e também funcionam como oxidantes difusíveis. A maioria dos mediadores conhecidos ainda é sintética e de alto custo, o que torna necessária a prospecção de mediadores de ocorrência natural e inócuos ao meio ambiente (GIARDINA et al., 2009).

3.5.2.2 Peroxidase (EC 1.11.1.7)

As enzimas agrupadas na categoria Peroxidase são oxidoredutases capazes de clivar uma ampla variedade de substratos, sejam estes aromáticos ou não, em presença de peróxidos. A reação generalizada dessas enzimas está representada na seguinte equação, de acordo com Nakayama e Amashi (1999):

Ocorrendo em plantas, animais e microrganismos, esses catalizadores possuem inúmeras funções que variam de acordo com o grupo taxonômico. Algumas de seus papéis são: oxidação de fenóis, ligação de polissacarídeos e defesa contra patógenos; estas também têm sido aplicadas em análises clínicas, na espectrofotometria de biomoléculas e em imunoensaios (NAKAYAMA; AMASHI, 1999; CAMPOS; SILVEIRA, 2003).

Diferentemente das lacases, as peroxidases possuem, como grupo prostético, uma protoporfirina que contém ferro (III). No primeiro estágio da catálise, o ferro (III) sofre oxidação pelo peróxido, dando origem a um intermediário instável (composto I) e a uma molécula de água pela redução do peróxido. Numa segunda etapa, o composto I oxida o substrato, dando origem ao composto II e liberando um radical livre. Posteriormente, o composto II sofre redução por um segundo substrato, o que permite a regeneração do ferro (III) e provoca a liberação de mais um radical livre (HAMID; REHMAN, 2009).

Por sua notada habilidade em degradar fenóis, as peroxidases têm sido empregadas no tratamento de efluentes, solos contaminados, resíduos industriais e produtos alimentícios. Hamid e Rehman (2009) citam exemplos na literatura do emprego destas enzimas na remoção de compostos aromáticos em soluções aquosas e na descoloração de corantes. Os mesmos autores apontam como característica notória destas enzimas a capacidade de precipitar

compostos nocivos pela indução da formação de polímeros mistos que são facilmente removíveis do efluente.

A degradação de estruturas fenólicas com o emprego de peroxidases é, segundo Hamid e Rehman (2009), eficiente e economicamente vantajosa, porém os mesmos autores ressaltam que estas têm sua atividade prejudicada pela presença de oligômeros, polímeros e radicais livres. Estas complicações são minimizadas com a imobilização da enzima em, por exemplo, PEG.

3.5.2.3 Manganês Peroxidase (EC 1.11.1.13)

As peroxidases dependentes do manganês, ou manganês-peroxidases, são uma família de hemoproteínas glicosiladas (MOORE; ROBSON; TRINCI, 2011). De acordo com Ferraz (2004), o potencial de oxidação das MnPs é suficiente apenas para remover elétrons de estruturas fenólicas, ou seja, elas não atuam sobre estruturas aromáticas não fenólicas. No entanto, os estudos de Jensen et al. (1996) apud Cohen, Persky e Hadar (2002) e de Kapich et al. (1999) apud Cohen, Persky e Hadar (2002) sugerem um mecanismo para a oxidação indireta desses compostos: quando ocorre a oxidação de ácidos graxos insaturados pela MnP, as frações não fenólicas da lignina sofrem uma lenta co-oxidação (COHEN; PERSKY; HADAR, 2002).

Seu mecanismo de ação é dependente de H_2O_2 e se dá da seguinte maneira: o peróxido ativa a enzima e produz um composto deficiente em dois elétrons que, para voltar a seu estado inicial promove duas reduções: o primeiro elétron provém de uma estrutura fenólica, enquanto que o segundo não está diretamente ligado à atividade da enzima, mas é proveniente de uma segunda estrutura fenólica que se oxidou pela redução do complexo formado entre o íon Mn^{3+} e o oxalato. O íon Mn^{3+} (formado pela oxidação do Mn^{2+}), portanto, age como um oxidante difusível, capaz de atuar a uma certa distância da enzima (COHEN; PERSKY; HADAR, 2002; FERRAZ, 2004). A Figura 4, abaixo, representa o ciclo catalítico da MnP de forma simplificada, como esquematizado por Ferraz (2004).

Figura 4 – Esquema simplificado do ciclo catalítico da enzima MnP. Adaptado de Ferraz (2004)

Estudos com ligninas sintéticas têm demonstrado que a mineralização desta molécula ocorre mesmo em baixas concentrações de MnP, sugerindo uma menor importância desta enzima nesse processo final. Contudo, sua capacidade de desmetilar e deslignificar a polpa Kraft sugere que a MnP tenha um papel mais representativo nas primeiras etapas da ligninólise (DURÁN, 2004).

3.5.3 Fermentação submersa (SmF)

A fermentação submersa tem sido extensamente utilizada no campo industrial, aonde é comum o emprego de reatores que favoreçam uma produção em escala. Essa tecnologia também tem sido empregada na remoção de poluentes desde os últimos 40 anos e teve como protagonistas fungos dos gêneros *Saccharomyces*, *Aspergillus* e *Phanerochaete*. Os sistemas para sua execução implicam, frequentemente, em um grande aporte de água e energia. (GONZALEZ et al., 2013; RODRIGUES, 2012).

Cohen, Persky e Hadar (2002) citam que a fermentação submersa tem sido usada para a produção de proteína fúngica ou de agentes flavorizantes. Os mesmos autores comentam que os pellets que se formam apresentam uma composição de biomoléculas muito semelhante a dos cogumelos produzidos em fermentação sólida, o que indica que o valor nutricional do fungo se mantém. Confortin e colaboradores (2008) descrevem que outro uso importante da fermentação submersa como técnica de cultivo de fungos, em especial, do gênero *Pleurotus*, é a produção de exopolissacarídeos (EPS). Essas moléculas se destacam no campo biotecnológico porque várias delas possuem propriedades antitumorais, hipoglicêmicas e imunoestimuladoras.

Cultivos submersos de fungos multicelulares em biorreatores fazem com que esses organismos cresçam em pellets ou em filamentos. A formação de pellets (Figura 5) favorece interações de superfície e permite a ocorrência de reações de hidroxilação, fundamentais em muitas vias de degradação de compostos aromáticos; filamentos, por outro lado, propiciam a ocorrência de reações lentas, como reduções (RODRIGUES, 2012).

Figura 5 – Pellets de *P. sajor-caju* crescido em vinhaça (SmF)

A morfologia de crescimento e a quantidade de biomassa gerada estão relacionadas às características estruturais do biorreator e das condições culturais, que também determinam a resistência dos pellets. É importante conhecer as variáveis que levam às diferentes morfologias porque a produtividade de um dado composto é dependente da agregação celular na cultura submersa (MÁRQUEZ-ROCHA et al., 1999; BETTIN et al., 2011).

Segundo Rodrigues (2012), o emprego de biorreatores na micorremediação de forma competitiva é dependente do profundo conhecimento das variáveis envolvidas neste processo. Dentre estas, pode-se citar: tamanho do inóculo, composição do meio, interações entre microrganismos, adição de cossubstratos, velocidade de degradação dos poluentes, pH, temperatura, oxigenação e aeração, contaminantes e tempo de retenção hidráulica.

Uma técnica simples que pode ser acoplada à fermentação submersa é a imobilização celular em um meio de suporte. O suporte permite uma maior superfície de contato entre o micélio e o resíduo a ser tratado (WANDERLEY et al., 2012). Segundo Rodrigues (2006), a imobilização de microrganismos em materiais sólidos, que se dá por auto-imobilização ou por adesão induzida, previne a migração de células. A adesão induzida é realizada combinando-se o microrganismo a um material poroso ou fibroso com o auxílio de uma substância gelatinosa ou uma membrana.

Harding e colaboradores (2009) e Rodrigues (2006) comentam que fungos são especialmente adaptados ao crescimento sobre superfícies e essa característica é evidenciada pelo crescimento apical das hifas, pelo seu sistema de nutrição absorptivo e pela secreção de enzimas digestivas e de polissacarídeos com propriedades adesivas. Dessa forma, o uso de materiais suporte na fermentação submersa pode ser considerado uma aproximação a suas condições fisiológicas naturais (RODRIGUES, 2006).

Os reatores biológicos de leito móvel (RBLM ou MBBR, na sigla em inglês) são sistemas híbridos, isto é, estes combinam culturas livres e aderidas a um material suporte. Essa combinação, segundo Wolff, Paul e Costa (2010), permite uma maior concentração de biomassa e aperfeiçoa o tratamento do efluente sem um significativo acréscimo na produção de lodo. Além disso, Martins (2003) destaca que a inclusão de materiais de suporte no meio maximiza o contato entre os microrganismos e o efluente, otimiza a remoção da carga orgânica e reduz o tempo de retenção hídrica.

Os materiais suporte apropriados para o uso nos sistemas MBBR, segundo Wolff, Paul e Costa (2010) e Martins (2003), devem apresentar as seguintes características:

- Alta rugosidade: protege as células contra as forças de cisalhamento, fornece maior superfície de adesão e de troca de matéria e influencia a morfologia do biofilme;
- Alta porosidade: facilita a adesão da biomassa;
- Boa resistência mecânica: permite que o material suporte seja submetido a agitação mecânica;
- Capacidade de adsorção: tanto dos substratos, como dos subprodutos gerados e das enzimas;
- Baixo custo: dependendo do sistema, a quantidade de material suporte pode ser elevada ou pode fazer-se necessário o emprego de um material específico, o que encarecerá o processo.
- Tamanho ideal para as dimensões do reator.

Os materiais poliméricos sintéticos (plásticos como PVC, poliestireno, poliuretano e polipropileno) são os mais utilizados em leitos móveis hoje em dia pelas seguintes características: são atóxicos, suas características físicas são preservadas após o crescimento microbiano, o custo é baixo, a resistência mecânica é alta e sua densidade é ligeiramente menor que a da água. Alguns suportes constituídos desses materiais são espumas e esferas de

poliuretano e anéis e cilindros vazados (MARTINS, 2003). Alguns polímeros naturais também são utilizados, como a quitosana, o alginato, a quitina e a celulose (RODRIGUES, 2006).

De acordo com Park e colaboradores (2010), o poliuretano (PU) tem sido descrito como um meio de suporte eficiente na imobilização de biomassa e os suportes deste material exercem três funções que contribuem para o tratamento de efluentes têxteis: biosorção, biodegradação e bioacumulação. Os mesmos autores também relatam que processos de descoloração por fungos da podridão branca em RBLM são mais resistentes a variações de pH e exposição a substâncias tóxicas.

3.5.4 Fermentação em estado sólido (SSF)

Esse tipo de fermentação é considerado mais semelhante às condições ambientais e fisiológicas normalmente encontradas pelos fungos e, sob alguns aspectos, tem gerado resultados melhores do que a fermentação submersa. Diferentemente dos pellets que se formam quando fungos são crescidos em meio líquido (caracterizados por grandes diâmetros e reduzidas áreas de superfícies), o micélio, em meio sólido se desenvolve como placas de agregados celulares que recobrem o suporte e, conseqüentemente, ganham uma ampla superfície de troca gasosa, o que dispensa agitação mecânica (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2002).

Estudos mencionados por Viniegra-González e colaboradores (2002) mostram que, em condições de alta DBO, o sistema de fermentação em estado sólido (SSF) é superior ao SmF em relação à produção de biomassa. Outras vantagens apontadas por Gonzalez e colaboradores (2013) são: menor contaminação por outros microrganismos devido ao baixo teor de água, menor consumo de água e necessidade de espaço e maior concentração e estabilidade molecular do produto formado.

Viniegra-González e colaboradores (2002) também discutem o fato de que as diferentes condições de crescimentos podem gerar comportamentos fisiológicos distintos. Os autores citam um estudo em que a produção de pectinases em altas concentrações de sacarose é inibida em SmF e estimulada em SSF e esse resultado é explicado por três propriedades da SSF: altas taxas de produção de biomassa, aparente resistência à repressão catabólica e baixa degradação da enzima por proteases. Por outro lado, a SSF apresenta algumas dificuldades no que diz respeito à transferência de massa e calor, dificultando sua aplicação em grande escala, o controle da cultura e a recuperação do produto formado (GONZALEZ et al., 2013).

Jurado e colaboradores (2011) mencionam que a fermentação em estado sólido se destaca em relação à fermentação líquida porque permite o reaproveitamento de resíduos agroindustriais e sua conversão em bioprodutos de alto valor agregado. Os mesmos autores citam como exemplo a produção de lacase com base em resíduos agrícolas: esta é vantajosa porque o material a ser utilizado, além de amplamente disponível, apresenta os requisitos nutricionais e os indutores necessários para o crescimento do fungo e a expressão enzimática, além de que o rendimento é mais alto e as enzimas, mais estáveis.

A porosidade do material, o tamanho de suas partículas e a presença de inibidores são fatores, que, frequentemente, se apresentam como empecilhos para a SSF e costumam ser contornados realizando-se um pré-tratamento físico-químico (JURADO et al., 2011).

3.6 Avaliação ecotoxicológica de resíduos e efluentes

De forma geral, pode-se considerar que uma ampla gama dos efluentes se apresenta como uma mistura complexa de compostos que interagem, de maneira dinâmica e complexa, entre si e com as diversas fases do ambiente que o recebe. Desta forma, surge a necessidade de que as tradicionais análises físicas e químicas sejam complementadas por uma ciência que permita a compreensão dos efeitos biológicos resultantes dessas interações. E é nesse sentido que se encaixa a ecotoxicologia: o conjunto de técnicas analíticas e ecotoxicológica é o que elucida avaliações e previsões de riscos ambientais (ZAGATTO, 2006).

As avaliações ecotoxicológicas devem fazer parte não só dos estudos de áreas contaminadas ou referentes a despejos de efluentes e resíduos no ambiente, mas também é imperativo que estas sejam aplicadas com caráter preventivo, fazendo parte do processo de desenvolvimento de um novo produto químico (ZAGATTO, 2006). Neste contexto, Vidali (2001) ressalta a importância de se levar em consideração os efeitos da degradação biológica de um composto, uma vez que o ataque enzimático pode produzir moléculas menos ou mais nocivas e menos ou mais persistentes.

De acordo com Pandard et al. (2006) e Mozeto e Zagatto (2006), os testes ecotoxicológicos são uma boa ferramenta para averiguar os resultados de uma degradação, especialmente quando esta envolve efluentes de composição complexa, pois as respostas biológicas evidenciam efeitos sinérgicos, aditivos, antagônicos e de potencialização que não aparecem em análises físico-químicas ou em avaliações isoladas dos contaminantes.

Organismos que são representativos de seu habitat têm sido usados como modelos em bioensaios que avaliam a ecotoxicidade de inúmeras moléculas. Esses ensaios, de acordo com

Aragão e Araújo (2006), são desenvolvidos com as premissas de proporcionarem boas aproximações à realidade, serem de baixo custo, fácil execução e interpretação dos resultados, aplicáveis em avaliações de risco e diretamente relacionáveis aos efeitos ambientais da substância.

Segundo Messias (2012), o emprego de espécies de diferentes níveis tróficos nesses estudos traz resultados mais próximos à realidade. Alguns dos organismos apropriados para a avaliação da toxicidade de efluentes e resíduos líquidos são: *Hydra attenuata* (consumidor secundário), *Daphnia magna* e *Daphnia similis* (consumidores primários) e *Raphidocelis subcapitata* (produtor).

Aragão e Araújo (2006) descrevem que, dentre os ensaios desenvolvidos em laboratório, estes podem ter a finalidade de avaliar efeitos agudos ou crônicos. Os primeiros são danos severos que se apresentam em um curto período de tempo (1-4 dias) e, geralmente, se manifestam com a morte ou imobilidade do organismo-teste. Os testes de toxicidade crônica, por outro lado, têm como objetivo avaliar a exposição dos organismos a níveis subletais de poluentes, o que acaba existindo com mais frequência no ambiente; esses efeitos mais sutis (inibição de crescimento ou da reprodução, alterações comportamentais, teratogenicidade, etc.) revelam-se ao longo de todo o ciclo de vida do organismo, em uma fase específica deste ou em um dado componente de sua fisiologia. Os testes crônicos, apesar de mais fiéis à realidade, acabam sendo mais onerosos por seu tempo de duração, que pode variar de algumas semanas a diversos meses.

Os resultados dos testes ecotoxicológicos são expressos por valores estatísticos que representam médias dos efeitos: concentração efetiva (CE) ou concentração inibitória (CI) e concentração letal (CL) para os testes de toxicidade aguda. Para os testes de toxicidade crônica, os parâmetros mais utilizados são: maior concentração que não causa efeito ao organismo-teste (CENO), menor concentração que causa efeito significativo ao organismo-teste (CEO) e valor crônico (VC). É comum que os resultados sejam expressos como a concentração mediana que causa o efeito analisado em 50% dos organismos, isto é, CE50, CL50, etc. (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006).

3.6.1 *Daphnia similis*

O gênero *Daphnia* é um grupo de microcrustáceos planctônicos de água doce (cladóceros) que se alimentam por filtração. Estes têm sido empregados em testes de ecotoxicologia aquática por apresentarem algumas vantagens fisiológicas e ecológicas, como,

por exemplo: ciclo de vida curto, reprodução por partenogênese, pequeno porte (0,5-5 mm) e alta sensibilidade a poluentes. Essas características permitem seu cultivo em laboratório e maximizam a uniformidade dos resultados (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2006).

Assim como descrito por Domingues e Bertoletti (2006), a sensibilidade dos organismos, e, portanto, a efetividade dos testes, é dependente das condições de manutenção em laboratório, que devem suprir as necessidades ambientais e alimentares de cada espécie. No Brasil, as condições de cultivo de *D. similis* são definidas pela norma ABNT-NBR 12713, de 2004.

3.6.2 *Hydra attenuata*

O gênero *Hydra* compreende organismos sésseis e ubíquos em ambientes de água doce. Esta se situa um nível trófico acima de *D. similis*, ou seja, são consumidores secundários, alimentando-se de microcrustáceos, como copépodas, e larvas de peixe. Do ponto de vista ecológico, este gênero contribui para a estruturação do plâncton em lagoas (QUINN, GAGNÉ; BLAISE, 2012).

Blaise e Kusui (1997) relatam que a espécie *Hydra attenuata* tem sido empregada desde os anos 80 na avaliação do potencial teratogênico de inúmeras substâncias, porém seu uso como organismo-teste da toxicidade de efluentes era bastante escasso até a década de 90. Atualmente, *H. attenuata* tem sido empregada na avaliação ecotoxicológica de inúmeros efluentes e substâncias (estrogênios, metais pesados, fármacos) (GASPAROTTO, 2011).

Esta espécie é usada em ensaios de ecotoxicidade por ser representativa de ambientes de água doce. Além do mais, os organismos são robustos, suportam intensa manipulação em laboratório, são facilmente cultivados e mantidos em condições controladas e, assim, como *D. similis*, se reproduzem por vias assexuadas, o que confere uniformidade e reprodutibilidade aos resultados. O uso desses organismos são ainda mais vantajosos quando leva-se em consideração que os testes com *H. attenuata* são de baixo custo e de fácil execução (QUINN; GAGNÉ; BLAISE, 2012; BLAISE; KUSUI, 1997).

Os efeitos de uma substância nociva sobre um indivíduo de *H. attenuata* são divididos em sub-letais e letais. Como representado na Figura 6, em um teste de toxicidade aguda, o primeiro sinal visível de que o organismo está sendo negativamente afetado pela substância em teste é a formação de “bulbos” nas extremidades de seus tentáculos (estágio “bulbo”). Se o efeito persistir, os tentáculos se contraem (estágio “tentáculos encurtados”) e depois são perdidos (estágio “tulipa”); a morte se verifica com a desintegração do organismo. Os

primeiros dois estágios são considerados sub-letais, pois se a condição do meio melhorar, os efeitos serão revertidos; o estágio “tulipa”, por sua vez, é considerado equivalente à morte do indivíduo (QUINN; GAGNÉ; BLAISE, 2012; SANTOS, 2008).

Figura 6 – Esquema dos efeitos tóxicos morfológicos em *H. attenuata*. 1) indivíduo normal; 2) estágio “bulbo”; 3) “tentáculos encurtados”; 4) “tulipa”; 5) morte

3.7 Esterilização via radiação gama

Dentre os diferentes graus de eliminação da carga microbiana de um dado material e/ou ambiente, a esterilização é definida como a eliminação de todos os tipos de microrganismos, incluindo-se formas ativas e inativas (esporos). Estima-se que um processo de esterilização permita a sobrevivência de um organismo para cada milhão eliminado e considera-se que moléculas como enzimas e toxinas não sejam necessariamente eliminadas. Os principais agentes esterilizantes são: vapor úmido combinado a pressão (autoclavagem), calor (30 min a 170°C), agentes químicos (compostos clorados, óxido de etileno), radiação UV e radiações ionizantes (TSAI, 2006).

A radiação se destaca em relação aos demais métodos de sanitização completa por poder ser aplicada a diversos substratos sem provocar modificações em suas propriedades; seu único efeito deve ser sobre os microrganismos. Esta é particularmente interessante para compostos termossensíveis, uma vez que sua emissão de calor é bastante baixa e não deforma o material. Limitações das técnicas que utilizam radiação se referem aos altos custos de implantação e de controle de suas operações (TSAI, 2006; MORIYA; MÓDENA, 2008).

Os aparelhos de emissão gama são, normalmente, irradiadores com uma fonte selada de cobalto-60 (^{60}Co). Este tipo de radiação é ionizante, isto é, possui energia suficiente para interagir com os átomos da matéria e arrancar elétrons de seus orbitais e, portanto, é capaz de

desestruturar o DNA (TSAI, 2006; NOUAILHETAS, 1998). De acordo com Moriya e Módena (2008), radiações ionizantes se destacam em relação às não ionizantes pelo seu maior potencial de penetração, podendo atravessar materiais empacotados.

Shimokawa e colaboradores (2007) mencionam que estudos anteriores demonstraram que a irradiação por raios gama de materiais lignocelulósicos (bagaço, serragem, palha de arroz e joio) aumentou a taxa de sacarificação enzimática destes. Além do mais, os mesmos autores reportam que a radiação gama contribui para a despolimerização da celulose e resulta em uma moagem facilitada em relação ao material não tratado.

3.8 Espectroscopia Infravermelho por transformadas de Fourier

A espectroscopia infravermelho (EIV) é uma técnica de química analítica bem estabelecida que permite uma associação entre um espectro luminoso e estruturas moleculares, elucidando, também, a presença de determinados grupos funcionais. Até a década de 70, a EIV era baseada em princípios dispersivos, porém, após esse período, a tendência analítica foi a de se trabalhar com o princípio da interferometria. Isso quer dizer que, ao invés de medir padrões de difração, os aparelhos passariam a analisar a diferença de fase entre dois feixes luminosos: um que passou pela amostra e foi modificado por ela e outro que não sofreu qualquer modificação (ALVES, 2002; GRIFFITHS, 1983). Essa mudança fez com que o método da transformada de Fourier, utilizado no interferômetro de Michelson, fosse incorporado à EIV.

A técnica moderna é conhecida pela sigla FTIR (do inglês “Fourier transform infrared”), ou EIVTF (Espectroscopia Infravermelho por transformadas de Fourier), em português. O espectrômetro baseado em FTIR possui uma série de espelhos, uma fonte emissora de radiação e um detector. Um feixe de radiação policromática é emitido a partir de uma fonte e passa por uma lâmina divisora, que dá origem a dois feixes que percorrem caminhos ópticos de acordo com sua reflexão em um espelho fixo e um móvel; posteriormente, estes são captados pelo detector, gerando um interferograma. A construção do interferograma leva em consideração diferenças entre os caminhos ópticos dos dois feixes. A transformada de Fourier permite que o interferograma se relacione ao espectro óptico: para cada angulação do espelho móvel, o caminho óptico será diferente e corresponderá a um ponto no espectro.

A passagem do feixe luminoso pelo interferômetro ocorre antes que este atinja a amostra. Ao passar pelo compartimento que abriga a amostra, o feixe sofre alterações por ser

parcialmente absorvido e passa pelos processos de condensação e focalização antes de chegar ao detector.

Apesar de existirem diversos fabricantes de espectrômetros do tipo FTIR, todos eles seguem o mesmo padrão do esquema representado na Figura 7.

Figura 7 – Esquema representativo de um espectrômetro do tipo FTIR (adaptado de ALVES, 2002)

De acordo com Alves (2002), a incorporação da transformada de Fourier à espectroscopia no infravermelho permitiu que algumas limitações da técnica anterior fossem corrigidas, como as dificuldades de se ler amostras higroscópicas e soluções aquosas. O FTIR também trouxe aumento de desempenho e resolução aos aparelhos, juntamente com a informatização do processo, o que torna os dados armazenáveis, rastreáveis e representáveis da melhor forma, de acordo com a interpretação necessária.

De acordo com Passos (2013), a técnica FTIR tem sido empregada no campo da biodegradação porque, além de identificar os grupos funcionais presentes, esta detecta possíveis modificações e desaparecimento dos mesmos, fenômenos frequentes quando substratos são clivados por enzimas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar

A vinhaça de cana-de-açúcar utilizada neste trabalho foi coletada em Setembro de 2012 (safra 2012/2013) na dorna da Usina Iracema, administrada pelo Grupo São Martinho e localizada em Iracemápolis, SP (22°35'18" S e 47°31'55" O). O material foi mantido em câmara fria a 4°C.

O bagaço, moído e seco, foi gentilmente concedido pelo Laboratório de Radiobiologia e Ambiente/CENA-USP. Este foi mantido em um tambor de metal fechado hermeticamente e mantido à temperatura ambiente, durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

4.2 Microrganismos – obtenção e cultivo

O presente trabalho foi desenvolvido com o emprego de duas espécies do gênero *Pleurotus*: *P. ostreatus* (shimeji) e *P. sajor-caju* CCB 020, cultivadas recorrentemente no Laboratório de Ecologia Aplicada (CENA/USP). Ambas são mantidas em inóculo “spawn” ou em placas de Petri (meio MEA), a 4°C.

4.2.1 Produção do inóculo “spawn” das linhagens em uso

O inóculo “spawn” (ou “semente-inóculo”) dos fungos foi elaborado de acordo com a metodologia de Rosolen (2004) apud Souza (2012). Esta técnica, de acordo com Aguiar-filho (2008), além de permitir uma preservação da viabilidade dos fungos, minimiza alterações genéticas e/ou enzimáticas passíveis de serem geradas no processo de repicagem constante.

Para cada fungo, 75 g de grãos de trigo frescos foram submersos em água durante 24 h. Após esse período, os grãos foram cozidos por 30 min em autoclave parcialmente tampada, o pH foi ajustado com 0,2% de CaCO₃ e 0,8% de CaSO₄ e realizou-se a esterilização do material por autoclavagem (30 min, 121°C, 1 atm). Atingida a temperatura ambiente, o material foi levado à câmara de fluxo laminar, aonde foi inoculado com três discos de micélio do fungo de interesse; os sacos inoculados foram mantidos em estufa por 20 dias a 28°C e armazenados sob refrigeração após este período.

4.2.2 Cultivo das linhagens para fins experimentais

Ao longo do curso dos experimentos, os fungos foram semanalmente repicados em meio sólido MEA, constituído de 3% de extrato de malte (Himedia Laboratories), 1,5% de ágar bacteriológico (Acumedia) e 0,3% de peptona (Himedia Laboratories) e autoclavado (15 min a 121°C e 1 atm) antes do plaqueamento. A repicagem, realizada em câmara de fluxo laminar horizontal (Pachane, PA 100), permite a manutenção da viabilidade do organismo. Esta foi realizada selecionando-se uma placa para extração de um disco de micélio ($\varnothing = 1$ cm) de sua periferia e este foi transferido para o centro uma placa nova contendo o mesmo meio de cultivo. Após a transferência, o material foi mantido sob as mesmas condições que as placas iniciais, isto é, a 28°C em estufa de incubação (Tecnal, TE 381).

4.3 Cultivo de *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* em vinhaça (SmF)

A primeira avaliação da vinhaça constituiu-se de um teste da capacidade de crescimento do fungo neste material. Este foi realizado em mesas de agitação orbital (Tecnal TE-420), em diferentes diluições em água (25, 50, 75 e 100%). O experimento foi conduzido por sete dias, a 150 rpm e ao abrigo de luz; avaliou-se, visualmente, o desenvolvimento de micélio nos frascos e a descoloração da vinhaça (em triplicata).

A partir dos resultados obtidos, iniciou-se o cultivo em batelada de *P. ostreatus* e *P. sajor-caju*. Este se deu em fermentação submersa (SmF) com o micélio livre no meio líquido ou imobilizado em material suporte. 12 frascos Erlenmeyers de 500 mL foram utilizados para cada linhagem; cada frasco recebeu 250 mL de vinhaça diluída a 50%, previamente autoclavada (15 min a 121°C), três discos de micélio (*P. sajor-caju* ou *P. ostreatus*) e metade dos frascos recebeu uma esfera de polipropileno de 4 cm de diâmetro, a qual permitiu a imobilização dos fungos por adesão (“bio ball” – Figura 8). O experimento foi conduzido por 12 dias em agitação orbital, à temperatura ambiente, 150 rpm e ao abrigo de luz, sendo efetuadas medidas de atividade enzimática e descoloração da vinhaça ao 6º e ao 12º dia. Seis frascos contendo apenas vinhaça a 50% foram mantidos em agitação orbital durante os 12 dias, a título de controle, sendo seis deles retirados após o 6º dia.

Figura 8 – “Bio balls” antes (A) e após a colonização por *P. ostreatus* (B)

Após a incubação, o material foi filtrado a vácuo (papel de filtro Whatman nº 1 – 85 mm Ø), o sobrenadante foi separado para avaliação da atividade enzimática e a biomassa foi congelada em nitrogênio líquido, mantida a -18°C durante 48 h e submetida à liofilização por 72 h (Thermo Savant, Modulyod 115), assim como descrito por Sartori (2011). Uma vez liofilizada, a biomassa foi quantificada por gravimetria, macerada em almofariz, misturada a água destilada (10% m v⁻¹), centrifugada por 15 minutos a 3060 rpm e o sobrenadante foi coletado para medição da atividade enzimática. As leituras foram realizadas em duplicata.

4.3.1 Atividade enzimática

Os sobrenadantes resultantes da filtração do conteúdo dos frascos nos quais se deu o desenvolvimento dos fungos e proveniente da eluição da biomassa liofilizada em água destilada foram utilizados para a avaliação da atividade enzimática, expressa em Unidades Internacionais por litro de caldo enzimático (UI L⁻¹). Uma Unidade Internacional é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar um mol de substrato em um minuto. Foram avaliadas três das principais enzimas ligninolíticas produzidas pelos basidiomicetos estudados: lacase, peroxidase e manganês peroxidase (MnP).

Reagentes

- **Tampão citrato-fosfato:** em 50 mL de H₂O destilada, adicionou-se 0,48 g de ácido cítrico e 0,67 g de fosfato de sódio bibásico; o pH foi ajustado para 5.
- **Siringaldazina:** em 50 mL de etanol P.A., adicionou-se 0,05 g de siringaldazina (Santa Cruz Biotechnology).
- **Peróxido de hidrogênio:** em 50 mL de H₂O destilada, adicionou-se 33 µL de H₂O₂.

- **Lactato de sódio:** em 50 mL de H₂O destilada, adicionou-se 1,2 mL de lactato de sódio.
- **Tampão succinato de sódio:** em 50 mL de H₂O destilada, adicionou-se 2,7 g de succinato de sódio.
- **Albumina bovina:** em 50 mL de H₂O destilada, adicionou-se 0,25 g de albumina bovina (Albumine Bovine Fraction V, Biomadicals Inc).
- **Sulfato de manganês:** em 50 mL de H₂O destilada, adicionou-se 0,017 g de MnSO₄.
- **Vermelho de fenol:** em 50 mL de H₂O destilada, adicionou-se 0,05 g de vermelho de fenol (Vetec).
- **Hidróxido de sódio:** em 50 mL de H₂O destilada, adicionou-se 4,0 g de NaOH.

Todos os reagentes foram mantidos sob refrigeração (-18°C para a albumina bovina e 4°C para as demais) e as soluções foram renovadas bimensalmente.

4.3.1.1 Lacase (EC 1.10.32)

Assim como descrito por Sartori (2011), a atividade da enzima lacase foi avaliada segundo a metodologia proposta por Szklarz et al. (1989), segundo a qual a atividade enzimática é medida pela oxidação de moléculas de siringaldazina em solução alcoólica (0,1% m/v). Em um tubo de microcentrífuga de 1500 µL, adicionam-se 540 µL de H₂O destilada, 60 µL de sobrenadante, 300 µL de tampão citrato-fosfato e 100 µL de siringaldazina (iniciador da reação).

A leitura da absorbância ($\lambda = 525 \text{ nm}$ - espectrofotômetro Femto 432) foi realizada tanto em amostras não fervidas como em amostras fervidas em tubos de ensaio (10 x 100 mm) durante 10 min. As leituras se deram logo após a adição de siringaldazina (t_0) e 10 minutos depois ($t+10$). O coeficiente de extinção molar utilizado para a siringaldazina oxidada foi de $6,5 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.3.1.2 Peroxidase (EC 1.11.1.7)

A metodologia aqui seguida foi aquela proposta por Szklarz *et al.* (1989). Esta também usa a siringaldazina como substrato enzimático, porém faz-se necessário a adição do cofator H₂O₂. Em um tubo de microcentrífuga de 1500 µL, adicionam-se 540 µL de H₂O destilada, 60

μL de sobrenadante, 200 μL de tampão citrato-fosfato, 100 μL de H_2O_2 e 100 μL de siringaldazina (iniciador da reação).

A leitura da absorbância foi realizada a 460 nm (espectrofotômetro Femto 432). As medidas foram executadas tanto em amostras não fervidas como em amostras fervidas em tubos de ensaio (10 x 100 mm) durante 10 minutos. O coeficiente de extinção molar utilizado para a siringaldazina oxidada foi de $2,94 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.3.1.3 Manganês peroxidase (EC 1.11.1.13)

A avaliação da atividade da enzima MnP também foi realizada de acordo com Sartori (2011) e segue a metodologia proposta por Kuwahara e colaboradores (1984), que consiste no monitoramento da oxidação do vermelho de fenol na presença de Mn^{2+} e H_2O_2 . Em um tubo de microcentrífuga de 1500 μL , adicionam-se 540 μL de H_2O destilada, 60 μL de sobrenadante, 100 μL de soro albumina bovina, 100 μL de tampão lactato de sódio, 100 μL de succinato de sódio, 50 μL de MnSO_4 , 50 μL de H_2O_2 e 100 μL de vermelho de fenol.

Da mesma forma que para as demais enzimas, foi feita uma leitura de absorbância ($\lambda = 610 \text{ nm}$ - espectrofotômetro Femto 432) logo após o iniciador da reação que, neste caso, é o vermelho de fenol (t_0) e após 10 minutos, quando adicionaram-se 40 μL de NaOH à mistura). As medidas foram executadas tanto em amostras não fervidas como em amostras fervidas em tubos de ensaio (10 x 100 mm) durante 10 minutos. O coeficiente de extinção molar utilizado para o vermelho de fenol oxidado foi de $4,460 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.3.2 Descoloração da vinhaça

O sobrenadante coletado após a remoção da biomassa fúngica por filtração teve sua absorbância medida com a finalidade de se avaliar a descoloração da vinhaça (espectrofotômetro Femto 432, $\lambda = 475 \text{ nm}$). A descoloração foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\frac{\text{Absorbância inicial} - \text{absorbância observada}}{\text{Absorbância inicial}} \times 100$$

4.3.3 Toxicidade da vinhaça tratada (*D. similis*)

Ao término do experimento em SmF, a biodegradação da vinhaça foi avaliada pelo teste de toxicidade aguda com a espécie *D. similis* (MESSIAS, 2008). O teste de toxicidade foi conduzido de acordo com a metodologia proposta por Dutka (1997) apud Messias (2008). Em frascos de polietileno de 30 mL contendo a amostra em diferentes concentrações (triplicata) foram colocados cinco neonatos com até 24 h de idade e estes foram mantidos durante 48 h em estufa de incubação a 24°C. As diluições das amostras foram: 6,25, 12,5, 25 e 50%. Foi também realizado um controle negativo, em que os organismos foram mantidos apenas em água reconstituída, sob as mesmas condições que os demais.

Após as 48 h de exposição, avaliou-se a quantidade de organismos mortos em todos os frascos e os resultados das contagens foram utilizados para a determinação da concentração letal (CL₅₀, 48 h) da vinhaça de cana-de-açúcar após os diferentes tratamentos. O Cálculo da CL₅₀ foi realizado com auxílio do programa PriProbit.

4.3.3.1 Cultivo e manutenção de *D. similis*

As culturas de *D. similis* foram provenientes das culturas do Laboratório de Ecologia Aplicada (CENA/USP), as quais são mantidas de acordo com as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 12713 - ABNT (2004) apud Messias (2008) e renovadas a cada 45 dias, quando a taxa de reprodução e a sobrevivência das fêmeas reprodutoras se reduzem consideravelmente. As culturas foram elaboradas a partir de neonatos (20 a 40 indivíduos) provenientes de uma cultura anterior. Estes foram acondicionados em frascos cristalizadores cilíndricos (150 x 75 mm) contendo aproximadamente 400 mL de meio de cultivo (meio MS, a base de micronutrientes). Os frascos de cultura foram cobertos com filme plástico transparente perfurado e mantidos em incubadora, à temperatura de 22±1°C.

A cada dois dias, efetuava-se a separação das fêmeas adultas e juvenis e realizava-se a alimentação dos organismos com 2 mL de uma suspensão da alga *Raphidocelis subcapitata* com densidade de 10⁵ indivíduos mL⁻¹ e um mL de um alimento composto a base de leveduras em pó e ração de peixe.

4.4 Crescimento de *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* em SSF (bagaço de cana) e descoloração do azul índigo

A metodologia aqui empregada foi baseada no trabalho de Souza (2012). Utilizou-se uma solução aquosa de corante azul índigo (Guarany, 18-Azul índigo) a 0,02% m/v, com pH ajustado para 4,5.

Os inóculos foram preparados em placas de Petri contendo meio MEA e incubados durante sete dias. Após o crescimento, três discos de micélio (1 cm Ø) foram transferidos para sacos plásticos contendo 15 g de bagaço de cana-de-açúcar umedecidos com 30 mL de vinhaça a 50%. Estes foram fechados com tampão de algodão e mantidos em estufa de incubação (Tecnal TE-381) por 14 dias a 28°C.

A atividade enzimática dos fungos crescidos em bagaço de cana-de-açúcar foi avaliada utilizando-se tampão citrato-fosfato (pH 5) como solução extratora (30 g de bagaço L⁻¹). A extração foi realizada em frasco Erlenmeyer de 250 mL agitados manualmente por 5 minutos; em seguida, o material foi filtrado a vácuo em papel de filtro Whatman n° 1 (85 mm Ø) e o sobrenadante foi utilizado para as leituras espectrofotométricas, assim como descrito nos itens 4.3.1.1 e 4.3.1.3.

4.4.1 Ensaio de descoloração com extrato enzimático

Três gramas de bagaço inoculado (por ambos os fungos) foram colocados em frasco Erlenmeyer contendo 90 mL de tampão citrato-fosfato (pH 5). A mistura foi agitada e filtrada em papel de filtro Whatman n° 1 (85 mm Ø). A descoloração do corante azul índigo foi realizada com a solução enzimática proveniente desta extração, em tubos de ensaio (10 x 100 mm), em banho-maria (Tecnal TE 054 MAG e Marconi MA-127), a 35°C e durante 20 minutos.

De acordo com a metodologia proposta por Souza (2012), os ensaios foram conduzidos em quatro repetições com as seguintes proporções solução de corante: extrato enzimático: 8:2, 6:4 e 2:8, num volume final de 1000 µL; durante este período, os tubos foram agitados em vórtex a cada dois minutos, de forma a facilitar o contato enzima-substrato. A descoloração da solução de azul índigo foi avaliada por espectrofotometria (Femto 432) logo em seguida, no comprimento de onda de 580 nm.

4.4.2 Ensaio de descoloração com bagaço inoculado

Porções de quatro gramas de bagaço de cana-de-açúcar inoculado com *Pleurotus* foram adicionadas em frascos Erlenmeyer contendo a solução do corante azul índigo 0,02% na proporção de 0,2 g mL⁻¹ e estes foram mantidos em banho-maria (Tecnal TE 054 MAG e Marconi MA-127) a 35°C. Observando-se a descoloração visualmente, o ensaio foi conduzido durante 15 minutos. O mesmo procedimento foi realizado com bagaço não inoculado para a verificação da adsorção independente da ação enzimática. Foram realizadas três repetições de cada tratamento e o controle foi considerado a solução do corante apenas mantida a 35°C.

A atividade enzimática (lacase e manganês peroxidase) foi medida após a filtração a vácuo do material em filtro APFF 47 mm (Millipore), seguindo-se os mesmos procedimentos mencionados anteriormente (itens 4.4.1.1 e 4.4.1.3). A descoloração foi medida no mesmo equipamento, no comprimento de onda de 580 nm.

4.5 *P. ostreatus* (shimeji branco) crescido em SMS comercial

O substrato sólido da produção comercial de *Pleurotus ostreatus* (shimeji branco) foi obtido em uma chácara produtora localizada no bairro Vila Prudente (Piracicaba, SP, 22°44'35" S e 47°36'44" O). Foram estudados materiais de dois fornecedores de substratos distintos ("spent mushroom waste" – SMS 1 e SMS 2), sendo estes de composição diferente e inoculados com linhagens distintas. Estes são dispostos em prateleiras (SMS 1) ou permanecem suspensos em ganchos (SMS 2) e são mantidos em estufa durante todo o ciclo produtivo. Cada unidade produtora (Figura 9) pesa cerca de oito quilogramas quando é recebida pelo produtor e, no final do ciclo (90 dias), a massa é de aproximadamente 2,5 kg.

Figura 9 – Unidade produtora de cogumelos *P. ostreatus* (SMS 1), evidenciando-se o micélio na superfície

4.5.1 Atividade enzimática do composto da produção industrial (SMS)

Os procedimentos aplicados sobre o SMS foram baseados nos trabalhos de Singh, Abdullah e Vikineswary (2003), Ball e Jackson (1995) e Zhou et al. (2012). Ao fim do ciclo produtivo, duas unidades produtoras do SMS 1 foram trazidas ao laboratório e com estas foi realizada uma avaliação da atividade enzimática do material e de sua capacidade de adsorver o corante azul índigo.

O material com micélio vivo foi desagregado manualmente e uma porção de 30 g de cada foi separada para a atividade das enzimas. As extrações das enzimas foram realizadas com 1 g de SMS misturado a água destilada, tampão citrato-fosfato (pH 5) ou solução de Ringer, em duas proporções diferentes: $0,1 \text{ g mL}^{-1}$ e $0,033 \text{ g mL}^{-1}$. A solução de Ringer foi elaborada com NaOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e tampão fosfato-potássio ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5) e foi usada após ser quatro vezes diluída.

Após mistura dos extratores com o SMS em vórtex, o material foi centrifugado a 3060 rpm durante 10 minutos. Realizado este processo, o sobrenadante foi coletado para avaliação das enzimas lacase, peroxidase e manganês peroxidase, assim como descrito nos itens 4.4.1.1, 4.4.1.2 e 4.4.1.3.

4.5.2 Descoloração do azul índigo pelo SMS

A avaliação da capacidade de descoloir do SMS de *P. ostreatus* foi conduzida por duas comparações:

- a) Entre as taxas de descoloração obtidas com o material *in natura* e após ser esterilizado por radiação gama;
- b) Entre os materiais concedidos por dois fornecedores (SMS 1 E 2), de forma a se discutir a composição do substrato e a diferença entre as duas linhagens.

4.5.2.1 Irradiação do SMS

Ambos os materiais em estudo (SMS 1 e 2) foram irradiados em porções de 125 g, acondicionados em sacos de polipropileno fechados com fita adesiva. A irradiação foi efetuada no Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia (LIARE/CENA-USP), em irradiador Gammacell-220 com a administração de uma dose de cinco kGy de radiação gama, seguida por outra de 7,5 kGy.

4.5.3 Ensaio de descoloração

O experimento para avaliação da capacidade de adsorção e descoloração do corante azul índigo (solução aquosa 0,02%, pH 4,5) pelo SMS foi conduzido em banho-maria (Tecnal TE 054 MAG e Marconi MA-127), a 35°C. 2,5 g de SMS (1 e 2) foram adicionados à solução de corante em três volumes (10, 20 e 60 mL), o que representa uma quantidade de 2, 4 e 12 mg de corante por frasco, respectivamente. A solução, acondicionada em frascos cilíndricos de vidro, foi previamente deixada em banho-maria até que a temperatura desejada fosse atingida. O experimento foi conduzido com três repetições para cada tratamento.

Após 30 min, os sólidos foram removidos por filtração a vácuo em filtro APFF 47 mm (Millipore) para determinação das porcentagens de descoloração, avaliadas em espectrofotômetro de luz (Femto 432) a 580 nm. O material sólido constituído de SMS irradiado com corante adsorvido foi reservado e congelado a -4°C para a análise FTIR.

4.5.4 Análise do SMS irradiado por FTIR, antes e após a adsorção do azul índigo

Após o congelamento do material por 48 h, este foi liofilizado durante 72 h (Thermo Savant, Modulyod 115) e macerado em almofariz de porcelana até que sua aparência fosse de pó. Os materiais grosseiros que não puderam ser macerados foram removidos manualmente e o restante foi acondicionado em tubos Falcon de 15 mL e enviado ao Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (UNESP/Rio Claro), aonde foi analisado por FTIR, o que

permitiu a identificação dos grupos funcionais do SMS e a elucidação de suas ligações com a molécula do azul índigo.

4.5.5 Toxicidade do azul índigo tratado (*H. attenuata*)

Ao término do experimento em SSF, a biodegradação do corante azul índigo em solução aquosa foi avaliada pelo teste de toxicidade aguda com a espécie *H. attenuata*. O teste de toxicidade foi conduzido de acordo com a metodologia proposta por Trottier et al. (1997). Efetuou-se a diluição das amostras em meio de cultura de *H. attenuata* nas seguintes concentrações: 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 75 e 100%. As amostras diluídas foram distribuídas em placas de poliestireno de 12 cavidades (quatro mL por cavidade) em três repetições. Em cada cavidade foram colocados três indivíduos saudáveis e sem brotamentos. Três cavidades foram preenchidas apenas com meio de cultivo, a título de controle. As placas foram mantidas durante 96 h em estufa de incubação a 24°C.

Após as 96 h de exposição, avaliou-se a quantidade de organismos mortos (indivíduos no estágio “tulipa” ou desintegrados) e os resultados das contagens foram utilizados para a determinação da concentração letal (CL₅₀, 96 h) do corante antes e depois dos diferentes tratamentos. O Cálculo da CL₅₀ foi com auxílio do programa PriProbit.

4.5.5.1 Cultivo e manutenção de *H. attenuata*

Os indivíduos de *H. attenuata* foram provenientes das culturas do Laboratório de Ecologia Aplicada (CENA/USP), as quais são mantidas de acordo com as recomendações de Blaise (2000).

Os organismos são mantidos em frascos cristalizadores cilíndricos (150 x 75 mm) revestidos com papel alumínio em sua parte inferior, cobertos com filme plástico transparente perfurado e acondicionados em incubadora (24±1°C), com fotoperíodo de 12 h. O meio de cultura para sua manutenção foi preparado com CaCl₂·2H₂O e N-tris (hidroximetil) metil 1,2 aminoetanosulfônico (tampão TES), ambos dissolvidos em água e com pH final do meio ajustado para 7,00±0,1.

A alimentação dos organismos foi realizada a cada 48 h e constitui-se de indivíduos de *Artemia salina*, eclodidos e mantidos em aeração e aquecimento 24 h antes. Esses crustáceos são lavados em meio de cultivo de *H. attenuata* antes de sua administração e, cerca de duas

horas após sua inserção nos frascos de cultura de *H. attenuata*, o meio é trocado de forma a se retirar os detritos da alimentação.

4.6 Análise estatística dos dados

Os resultados analisados foram valores médios e seus respectivos desvios-padrão obtidos a partir das repetições de cada tratamento e foram realizadas no Laboratório de Análises Estatísticas – ESALQ/USP, com o programa SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 2013) e através da técnica ANOVA (MONTGOMERY, 2005) para delineamentos inteiramente casualizados com arranjo de tratamentos fatorial. Utilizaram-se testes de comparações múltiplas de Tukey, Duncan, T de Student e F de Fischer-Snedecor para comparação estatística de medias (MONTGOMERY, 2005).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cultivo de *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* em vinhaça (SmF)

5.1.1 Biomassa fúngica

Ambas as espécies apresentaram crescimento adequado em vinhaça diluída a 50% (Tabela 2), porém percebeu-se, visualmente, que *P. sajor-caju* cresceu mais lentamente que *P. ostreatus*. Concentrações superiores de vinhaça mostraram-se inviáveis para o desenvolvimento dos fungos.

Tabela 2 - Biomassa seca (g L^{-1}) produzida durante 12 dias por *P. sajor caju* e *P. ostreatus*, micélio aderido e livre

Tratamento	Biomassa seca (g L^{-1})	
	<i>P. sajor-caju</i>	<i>P. ostreatus</i>
Micélio aderido	6,041±1,919Aa	A3,923±0,471Aa
Mcélio livre	7,239±0,660Aa	A4,576±4,123Aa

Comparações entre espécies são mostradas pelas letras minúsculas, em linha e, entre os tratamentos, pelas letras maiúsculas, em coluna. Médias com nenhuma letra em comum diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,1$)

Assim como mostrado pela Tabela 2, percebe-se que, em um período de 12 dias, ambos os fungos se desenvolveram em todos os ensaios e, como mostrado pelo teste de Tukey, a quantidade de biomassa gerada não diferiu entre as espécies e tampouco entre os tratamentos. Na presença de “bio balls”, contudo, observou-se, visualmente, um crescimento inicial mais rápido do micélio do que no meio sem estas. O mesmo fenômeno foi descrito por Téllez-Téllez e colaboradores (2008) ao comparar a biomassa de *P. ostreatus* em meio líquido e imobilizado em cubos de espuma de poliuretano (PUF).

Em relação à produção de biomassa com o micélio livre ou aderido, pode-se dizer que, de acordo com a literatura, o efeito do suporte sobre este parâmetro é variável. O resultado aqui obtido, por exemplo, é discordante daquele obtido por Sampedro e colaboradores (2009), em que os basidiomicetos da podridão branca *Panus tigrinus* e *Phlebia sp.* apresentaram índices de crescimento maiores quando imobilizados em PUF ou em caule de milho picado do que quando cultivados livres. Prasad e colaboradores (2005), por outro lado, observaram que *P. ostreatus* imobilizado em PUF atingiu um menor valor de biomassa do que o micélio livre

e esse resultado foi interpretado como uma maior concentração da energia na produção de lacase ao invés de no crescimento pelo fungo imobilizado.

Outro ponto relevante é que a biomassa mensurada neste estudo (Tabela 2) foi menor, para ambas as espécies, do que aquela alcançada, com vinhaça 100%, em estudos prévios (Tabela 3). Para *P. sajor-caju*, a quantidade de biomassa se aproximou daquela obtida por Ferreira et al. (2010): 10,6 g L⁻¹ após 12 dias de cultivo e com o pH da vinhaça corrigido. Vale ressaltar que alguns estudos identificaram que parece não existir relação entre a produção de biomassa e a expressão de enzimas, como, por exemplo, a lacase (BETTIN et al., 2009; LETTERA et al., 2011).

Tabela 3 - Biomassa seca (g L⁻¹) produzida em vinhaça por *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* em estudos prévios

Referência	Biomassa seca (g L ⁻¹)		
	Dias de cultivo	<i>P. sajor-caju</i>	<i>P. ostreatus</i>
Wadt (2008)*	12	11,1	11,6
Ferreira et al. (2010)*	12	10,6	n.d
Sartori (2011)*	15	12,73	13,27

*: vinhaça 100%; n.d. = não determinado

A correção do pH da vinhaça para seis, como demonstrado por Wadt (2008) e Ferreira et al. (2010), é favorável por fazer com que as condições do meio se tornem mais próximas àquelas consideradas ótimas para a atividade das enzimas ligninolíticas, porém esse procedimento torna o processo mais difícil de ser aplicado *in situ*, o que é uma das propostas deste trabalho.

O crescimento adequado dos fungos só foi possível com a vinhaça diluída, enquanto que, nos trabalhos citados na Tabela 3, os fungos se desenvolveram em vinhaça pura com pH ajustado para seis. Essa divergência nos resultados está relacionada ao fato de que a composição da vinhaça varia entre as safras e entre as usinas produtoras e, assim como apontado por Parnaudeau e colaboradores (2008), essa diferença faz com que o mesmo resíduo passe por diferentes vias de mineralização. Outro fator relevante, mencionado por Rodriguez e colaboradores (2003), é o de que a vinhaça apresenta compostos recalcitrantes e inibidores do crescimento fúngico (fenóis, furfurais, pré-melanodinas) que, em dadas concentrações, inviabilizam seu desenvolvimento.

O sucesso no desenvolvimento de biomassa fúngica em vinhaça é de grande valia como alternativa ao aproveitamento do excedente deste material. Enquanto que o acúmulo deste resíduo em áreas de sacrifício pode levar a problemas ambientais e de salubridade (REZENDE, 1983b), seu emprego como meio de cultura para fungos comestíveis é interessante para a alimentação animal, uma vez que, de acordo com Eira (2004), a biomassa de *Pleurotus* crescido em SmF possui as mesmas qualidades nutricionais de seus cogumelos e se mostrou palatável a peixes da espécie *Danio rerio* (SARTORI, 2011). A biomassa fúngica também é importante fonte de metabólitos e exopolissacarídeos e pode ser empregada como inóculo na produção comercial de cogumelos (WADT, 2008; COHEN; PERSKY; HADAR, 2002).

Os resultados supracitados mostram que parece não haver um padrão para o crescimento fúngico em materiais suporte inseridos em meio líquido. Faz-se necessária uma melhor compreensão da adesão do micélio ao veículo através do estudo das propriedades químicas da superfície do micélio. No caso da espécie *Phanerochaete chrysosporium*, por exemplo, Guimarães e colaboradores (2002) estudaram os componentes de sua tensão superficial e o estudo foi inconclusivo quanto à natureza das interações entre o micélio e o suporte.

Apesar de o efeito da presença de material suporte não ter sido significativo para a produção de biomassa, deve-se considerar que esta técnica apresenta vantagens operacionais. Como mencionado por Spina et al. (2012), o desenvolvimento do micélio de forma imobilizada evita entupimento nos reatores, permitindo a repetição de ciclos de operação sem problemas no aparelho, o que acarreta em uma economia para o sistema como um todo. Melhorias nas tecnologias de SmF são valiosas porque este sistema, segundo Bettin e colaboradores (2009), proporciona um maior desenvolvimento de biomassa em menos tempo, comparando-se com a SSF, além ter sua manipulação facilitada e propiciar uma maior dispersão e adaptação do fungo.

O uso de agitação mecânica na fermentação submersa favorece a aeração, porém este proporciona a desestabilização na biomassa e a subsequente liberação de fragmentos de micélio na solução (SPINA et al., 2012). Esse fenômeno foi observado neste trabalho: apesar da adesão do micélio à superfície da “bio ball”, como visível na Figura 8, observou-se presença de micélio no meio ao longo de todo o curso do experimento.

Segundo os mesmos autores, uma vez superado o obstáculo da agitação, o micélio aderido se torna mais resiliente a condições estressantes, como valores extremos de pH e presença de compostos tóxicos. A porosidade do material é fundamental por permitir o

crescimento do fungo de forma homogênea e garantir o abrigo do micélio ao estresse mecânico. Essa informação é bastante relevante para o presente trabalho, pois os veículos empregados (“bio balls”), além de apresentarem fissuras e saliências que permitem a ancoragem das hifas, são constituídos de plástico poroso (polipropileno), porém acredita-se que sua porosidade não seja suficiente para garantir a estabilidade do micélio de *Pleurotus*.

Os meios de suporte aqui utilizados (“bio balls”) foram desenvolvidos para o mercado de aquários e são empregados com a finalidade de abrigar colônias de bactérias aeróbias nitrificantes. Segundo Spina et al. (2012), a maioria dos materiais suporte empregados em escala industrial também foi desenvolvida para estes organismos, o que pode representar uma inadequação à pluricelularidade dos fungos.

5.1.1 Atividade enzimática - lacase, peroxidase e MnP em SmF

Os resultados de atividade enzimática da lacase, peroxidase e MnP após seis dias estão expressos na Tabela 4, abaixo. Como pode-se perceber, a expressão das três enzimas foi observada apenas no sobrenadante de *P. ostreatus*, com ou sem material suporte. A Tabela 5 resume os resultados de atividade enzimática por trabalhos desenvolvidos anteriormente no Laboratório de Ecologia Aplicada com a mesma linhagem de *P. sajor-caju* e com *P. ostreatus*, ambos crescidos em vinhaça.

Tabela 4 – Atividade das enzimas lacase, peroxidase e MnP (UI L⁻¹) de *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* após seis dias de cultivo em vinhaça 50%, micélio livre e aderido
Atividade enzimática (UI L⁻¹)

Tratamento	Componente	Lacase	Peroxidase	MnP
<i>P. ostreatus</i> livre	sobrenadante	0,280±0,437B	19,84±0,606A	0,162±0,397B
	micélio	0,024±0,059B	2,834±4,743B	0,000±0,000B
<i>P. sajor-caju</i> livre	sobrenadante	0,003±0,007B	0,000±0,000B	0,181±0,252B
	micélio	n.d.	n.d.	n.d.
<i>P. ostreatus</i> aderido	sobrenadante	2,377±3,537A	3,725±4,805B	0,965±0,718AB
	micélio	1,192±1,308AB	1,399±1,540B	1,968±2,641A
<i>P. sajor-caju</i> aderido	sobrenadante	0,008±0,011B	0,213±0,521B	0,405±0,356B
	micélio	n.d.	n.d.	n.d.

Comparações entre espécies e componentes são mostradas pelas letras à direita, em coluna. Médias com nenhuma letra em comum diferem pelo teste de Duncan, $p < 0,1$)

Tabela 5- Atividade das enzimas lacase, peroxidase e MnP (UI L⁻¹) do sobrenadante de *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* após seis dias de cultivo em vinhaça 50%, em estudos prévios

Referência	Atividade enzimática (UI L ⁻¹)		
	Lacase	Peroxidase	MnP
Ferreira <i>et al.</i> (2010)* - <i>P. sajor-caju</i>	350	n.d.	45~
Sartori (2011)* - <i>P. ostreatus</i>	0	0	0
Sartori (2011)* - <i>P. sajor-caju</i>	0	0	0
Souza (2012) - <i>P. ostreatus</i>	0	0	0~
Souza (2012) - <i>P. sajor-caju</i>	0	0	6,7

* = vinhaça a 100%; ~ = valores aproximados.

Em relação à enzima lacase, a Tabela 4 mostra que, para *P. ostreatus*, sua atividade foi favorecida pela presença da “bio ball”, sendo o maior obtido no sobrenadante (22,38 UI L⁻¹). A atividade no micélio de *P. ostreatus* imobilizado não diferiu, estatisticamente, daquela medida no sobrenadante nem de todos os demais resultados. As atividades de *P. ostreatus* livre e de *P. sajor-caju* (livre e aderido) não diferiram estatisticamente.

Como pode ser constatado pelas Tabelas 4 e 5, os valores de atividade enzimática da lacase no sobrenadante ao sexto dia divergem daqueles determinados por Sartori (2011) e Souza (2012) ao estudar *P. ostreatus* e *P. sajor-caju*, ambos crescendo em vinhaça pura. Os dois autores não detectaram lacase nos cultivos ao sexto dia e, além disso, Souza observou que a produção lacase de *P. ostreatus* crescendo em vinhaça se dá por volta do nono dia. Ferreira e colaboradores (2010), por outro lado, verificaram que *P. sajor-caju* produziu cerca de 350 UI L⁻¹ de lacase e que esta estava em ascensão atingindo um pico de 400 UI L⁻¹ ao nono dia de cultivo.

Em relação à peroxidase, verificou-se a maior atividade no micélio de *P. ostreatus* livre (19,84 UI L⁻¹). Este resultado diferiu dos estudos de Sartori (2011) e Souza (2012), que não detectaram esta enzima em cultivos de seis dias (Tabela 5). Uma maior atividade por *P. ostreatus* crescendo livre não era esperada, pois, de acordo com Hamid e Rehman (2009), esta enzima tende a ter uma maior atividade quando imobilizada por sofrer menos com a presença de oligômeros, polímeros e radicais livres.

Em relação à atividade da MnP ao sexto dia, verificou-se que esta, assim como a lacase, atingiu valores mais altos em *P. ostreatus* aderido à “bio ball”; no micélio, a atividade foi de 1,97 UI L⁻¹ e foi estatisticamente diferente das atividades de *P. ostreatus* livre e de *P.*

sajor-caju (livre e aderido). A atividade no sobrenadante de *P. ostreatus* imobilizado não diferiu, estatisticamente, daquela medida no micélio e tampouco de todos os demais resultados. Maiores valores desta enzima em presença do suporte podem estar relacionados ao fato de que esta necessita dos co-fatores Mn^{2+} e H_2O_2 para sua atividade, pois é possível que a “bio ball” permita uma maior concentração dessas moléculas.

Averiguou-se também, que as atividades da MnP diferiram de todos os trabalhos citados na Tabela 5. Enquanto que Ferreira e colaboradores (2010) registraram uma atividade próxima a 45 UI L^{-1} e observaram que a produção da MnP estava em ascensão neste período, Sartori (2011) e Souza (2012) verificaram que, para estas espécies, a atividade da MnP foi nula ou considerada não significativa ao sexto dia.

O fato de que este experimento tenha gerado valores positivos das três enzimas ao sexto dia de fermentação submersa pode estar relacionado à diluição da vinhaça, pois enquanto os trabalhos previamente citados trabalharam com vinhaça pura, este utilizou o material a 50%. Este resultado também pode estar relacionado ao fato de que a presença da “bio ball” favoreceu o crescimento do micélio no período inicial de incubação.

Avaliando-se a atividade do sobrenadante do ensaio com duração de 12 dias (Tabela 6), verificou-se a produção de todas as enzimas em quase todos os tratamentos. Comparando-se esta Tabela com a Tabela 4, percebe-se uma variação nos tratamentos que se destacaram para cada enzima, sobretudo para a lacase e para a peroxidase, o que pode ter relação com uma modificação no padrão de aeração pela presença do suporte (BETTIN *et al.*, 2011). A Tabela 7 resume os resultados de atividade enzimática por trabalhos anteriores com a mesma linhagem de *P. sajor-caju* e com *P. ostreatus*, ambos crescidos em vinhaça por 12 dias.

Tabela 6 – Atividade das enzimas lacase, peroxidase e MnP (UI L⁻¹) de *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* (livres e aderidos) após 12 dias de cultivo em vinhaça 50%

Tratamento	Componente	Lacase	Peroxidase	MnP
<i>P. ostreatus</i> livre	sobrenadante	0,933±1,248B	0,626±0,902AB	1,868±1,141A
	micélio	0,131±0,159B	0,084±0,185B	0,598±1,027B
<i>P. sajor-caju</i> livre	sobrenadante	0,100±0,152B	0,381±0,412AB	0,554±0,280B
	micélio	0,305±0,303B	0,779±0,763AB	0,598±0,635B
<i>P. ostreatus</i> aderido	sobrenadante	2,951±1,452B	1,091±1,415A	1,601±1,253A
	micélio	0,197±0,315B	0,940±1,181AB	0,990±1,235AB
<i>P. sajor-caju</i> aderido	sobrenadante	0,153±0,215B	0,111±0,222B	0,604±0,425B
	micélio	9,526±14,629A	0,683±1,013AB	0,511±0,397B

Comparações entre espécies e componentes são mostradas pelas letras à direita, em coluna. Médias com nenhuma letra em comum diferem pelo teste de Duncan, $p < 0,1$

Tabela 7- Atividade das enzimas lacase, peroxidase e MnP (UI L⁻¹) de *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* após 12 dias de cultivo em vinhaça 50%, em estudos prévios

Referência	Atividade enzimática (UI L ⁻¹)		
	Lacase	Peroxidase	MnP
Ferreira <i>et al.</i> (2010)* - <i>P. sajor-caju</i>	45~	n.d.	65~
Souza (2012) - <i>P. ostreatus</i>	1259-1463	350	2,61
Souza (2012) - <i>P. sajor-caju</i>	681	527	174

* = vinhaça a 100%; ~ = valores aproximados

A Tabela 6 mostra que a atividade enzimática da lacase não diferiu, estatisticamente, em todos os tratamentos, com exceção do micélio de *P. sajor-caju*, que exibiu o valor mais alto: 9, 53 UI L⁻¹. Como mencionado no item 5.1.1, *P. sajor-caju* cresceu mais lentamente do que *P. ostreatus*, e, por este motivo, inferiu-se que sua produção de lacase tenha sido mais tardia em relação a *P. ostreatus*, apresentando um pico de atividade por volta do 12º dia.

Os valores de atividade enzimática da lacase aqui expostos são consideravelmente inferiores a aqueles determinados por Souza (2012), onde são relatadas 1259 UI L⁻¹ de atividade aos 12 dias em *P. ostreatus*. Um padrão semelhante ao de Souza foi encontrado por Bettin e colaboradores (2009), em que a lacase apresentou seu pico de atividade ao décimo primeiro dia, em meio contendo caseína e sacarose em diferentes concentrações. Esses dois estudos servem de respaldo para que se suponha que, no presente estudo, o pico da lacase também tenha sido próximo a 12 dias.

A atividade da peroxidase medida após 12 dias teve seu maior valor no sobrenadante de *P. ostreatus* aderido. Assim como descrito por Hamid e Rehman (2009), é esperado que a atividade da peroxidase seja favorecida pela imobilização, já que a enzima permanece menos exposta a substâncias inativadoras. O sobrenadante de *P. sajor-caju* livre e o micélio de *P. ostreatus* livre apresentaram valores de atividade estatisticamente menores do que a atividade do sobrenadante de *P. ostreatus* aderido. Os demais não diferiram nem do maior e nem dos menores valores.

De acordo com o perfil enzimático da peroxidase de *P. sajor-caju* e de *P. ostreatus* elaborada por Souza (2012), esta teve seus picos entre o 12° e o 15° dia. (Tabela 7) Sartori (2011), por outro lado, não obteve atividade significativa desta enzima em *P. ostreatus* após 15 dias e, em *P. sajor-caju*, esta foi de 29,56 UI L⁻¹.

Diferentemente do que foi registrado no ensaio de seis dias, a atividade da MnP no sobrenadante de *P. ostreatus* imobilizado não diferiu daquela determinada no sobrenadante da mesma espécie crescida livre. Por outro lado, estes dois valores foram maiores que as atividades nos demais tratamentos, com exceção do micélio de *P. ostreatus* imobilizado, cuja atividade não diferiu dos dois maiores valores e tampouco dos demais, inferiores aos primeiros. Diferentemente do estudo de Souza (2012), *P. sajor-caju* se mostrou menos promissor do que *P. ostreatus* na expressão das enzimas peroxidase e MnP, indicando diferenças entre as linhagens do último empregadas nos referidos trabalhos.

A linhagem estudada também pode ser um fator que contribuiu para as grandes discrepâncias entre as atividades enzimáticas determinadas no presente estudo e os valores obtidos por Souza (2012) e Sartori (2011), uma vez que os primeiros estudos foram realizados com *P. ostreatus* proveniente de uma Coleção de Culturas de basidiomicetos enquanto que, neste trabalho, utilizou-se uma linhagem de *P. ostreatus* isolada da produção comercial de cogumelos. Outro fator relevante é que este trabalho foi realizado com vinhaça de outra safra e, presumivelmente, de composição diferente. Assim como evidenciado pelos trabalhos de Ferreira e colaboradores (2010) e de Pompeu (2010), é esperado que o padrão de produção de enzimas varie de acordo com o microrganismo, com as o substrato utilizado e com o tempo de cultivo.

Catalisadores de origem biológica têm sido um atrativo para a indústria porque, além de permitirem a obtenção de produtos com altos níveis de pureza, estes atuam em condições brandas, e com grandes rendimentos (BAPTISTA et al., 2012). Dentro deste contexto, as enzimas da família lacase são foco de diversos estudos biotecnológicos, pois atuam sobre uma ampla diversidade de substratos. Bettin e colaboradores (2009) descrevem que a fermentação

submersa é uma técnica apropriada para a obtenção destes catalisadores e fazem referência a estudos que mostram que a combinação da presença de compostos aromáticos com meios limitados em carbono e nitrogênio é extremamente benéfica à produção da lacase, o que favorece seu uso na biodegradação e biorremediação.

Além de poder clivar muitas moléculas, a lacase se destaca em relação às ligninases por não requerer a presença de H_2O_2 para sua atividade. Esta característica é vantajosa do ponto de vista operacional e também ambiental, já que o único produto secundário de sua reação é água. Por outro lado, seu potencial redox não é tão alto, fazendo com que mediadores sejam necessários para a degradação de compostos não fenólicos (CAÑAS; CAMARERO, 2010).

As enzimas peroxidases podem ser encaradas como menos vantajosas do ponto de vista operacional, uma vez que estas necessitam de peróxido de hidrogênio como co-fator e são consideradas pouco estáveis. Por outro lado, estas são superiores à lacase no sentido de que, assim como descrito por Hamid e Rehman (2009), possibilitam a degradação de moléculas que não são substratos dessas enzimas pela da formação de polímeros mistos e, como mencionado por Cohen, Persky e Hadar (2002), estas podem oxidar substratos não fenólicos de forma indireta.

Cameron, Timofeevski e Aust (2000) afirmam que as enzimas LiP e MnP são consideradas o núcleo do sistema enzimático ligninolítico. As LiPs, no entanto, não são produzidas pelo gênero *Pleurotus*. Ambas possuem potencial redox mais alto do que da maioria das peroxidases. As enzimas Peroxidase e MnP, aqui estudadas, não necessitam da presença de álcool veratrílico para a degradação de compostos não fenólicos, o que já não vale para as LiPs (RODRIGUEZ et al., 2004).

5.1.2 Descoloração da vinhaça

Em relação à descoloração da vinhaça, ambos os fungo foram capazes de descolorir este resíduo ($\lambda = 475$ nm), em todos os tratamentos, o que pode ser visto nas Tabelas 8 (após seis dias) e 9 (após 12 dias). As Tabelas evidenciam uma alteração nos padrões de descoloração do sexto para o 12º dia: na Tabela 8, a única diferença observada foi nas taxas de descoloração entre os micélios livres de *P. sajor-caju* (65,9%) e de *P. ostreatus* (17,8%), enquanto que, na Tabela 9, a diferença foi entre o micélio aderido das espécies (87,8 e 40,2%, respectivamente). A comparação entre seis e 12 dias (Anexo A) mostrou que as taxas de descoloração se mantiveram constantes, com exceção do ensaio com *P. ostreatus* livre, em

que a porcentagem de descoloração aumentou do primeiro para o segundo ensaio. Vale ressaltar que a vinhaça *in natura*, diluída a 50% (controle), não sofreu descoloração após seis ou 12 dias.

Tabela 8 – Descoloração da vinhaça por *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* (micélio livre e aderido) após 6 dias

Tratamento	Descoloração (%)	
	<i>P. sajor-caju</i>	<i>P. ostreatus</i>
Micélio aderido	67,33±3,555Aa	44,23±3,163Ba
Micélio livre	65,90±5,666Aa	17,84±2,106Bb

Comparações entre os tratamentos são mostrados pelas letras maiúsculas, em coluna e, entre as espécies, pelas letras minúsculas, em linha. Médias com nenhuma letra em comum diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 9 – Descoloração da vinhaça por *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* (micélio livre e aderido) após 12 dias

Tratamento	Descoloração (%)	
	<i>P. sajor-caju</i>	<i>P. ostreatus</i>
Micélio livre	88,70±1,875Aa	75,01±1,167Aa
Micélio aderido	87,84±6,045Aa	40,17±2,948Bb

Comparações entre os tratamentos são mostrados pelas letras maiúsculas, em coluna e, entre as espécies, pelas letras minúsculas, em linha. Médias com nenhuma letra em comum diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

A Tabela 4 mostra que, ao sexto dia, *P. ostreatus* aderido foi responsável pelos maiores valores de atividade da lacase e da MnP, o que pode justificar a maior descoloração da vinhaça por este fungo crescido com suporte do que crescido sem ela. No mesmo período, o sobrenadante de *P. sajor-caju* aderido não produziu mais enzimas que qualquer outro tratamento, porém as enzimas de seu micélio não foram medidas. É possível que o micélio desta espécie tenha apresentado atividade enzimática maior do que a de *P. ostreatus* livre, o que justificaria a maior taxa de descoloração.

Pela Tabela 6, pode-se perceber que, ao 12º dia, o micélio *P. sajor-caju* aderido apresentou a maior atividade de lacase e, portanto, sugere-se que esta tenha sido responsável pela maior taxa de descoloração em relação a *P. ostreatus* aderido. Ferreira e colaboradores (2011), ao crescer *P. sajor-caju* em vinhaça, obtiveram elevados valores de atividade da lacase e consideraram que esta contribui de forma significativa para sua descoloração.

Na Tabela 6, verifica-se também que as atividades de *P. ostreatus* livre não foram maiores do que aquelas de *P. ostreatus* aderido, o que indica uma possível interferência da

“bio ball” na descoloração da vinhaça. Téllez-Téllez e colaboradores (2008), por exemplo, discutem uma possível redução na aeração pelo uso de PUF para a imobilização de *P. ostreatus*.

Ao estudar a descoloração da vinhaça por fungos da podridão branca de outros gêneros, Kumar e colaboradores (1998) observaram que houve remoção de cor apenas quando havia uma fonte de carbono prontamente disponível no meio. No presente estudo, assim como nos trabalhos de Rodríguez e colaboradores (2003), Ferreira e colaboradores (2011), Sartori (2011) e Souza (2012), os fungos do gênero *Pleurotus* foram capazes de descolorir a vinhaça sem nenhuma fonte de carbono adicional.

Ferreira e colaboradores (2010) e Souza (2012), ao crescer *P. sajor-caju* em vinhaça por 15 e 30 dias, respectivamente, chegaram a 99% e cerca de 60% de descoloração. Os maiores resultados obtidos neste trabalho (88-89% de descoloração por *P. sajor-caju* após 12 dias) são intermediários em relação a aqueles determinados por Souza (2012) e por Ferreira e colaboradores (2010).

Assim como mostrado pelo estudo de Kumar et al. (1998), podem existir relações entre a descoloração da vinhaça e o pH do meio. Considerando-se que não houve correção do pH da vinhaça, diferentemente do estudo de Ferreira e colaboradores (2010), pode-se dizer que as taxas de descoloração aqui obtidas mostram a grande eficiência desses microrganismos como promotores da descoloração da vinhaça, já que, mesmo sem a correção do pH, as taxas se aproximaram daquelas medidas com o pH do resíduo ajustado.

A cor da vinhaça é, principalmente, consequência da presença de melanoidinas, corantes naturais que ocorrem em diversos alimentos e efluentes de destilarias (FERREIRA et al., 2010). Souza também ressalta a contribuição de outras substâncias, como caramelos, polifenóis e produtos de degradação alcalina; com exceção dos caramelos, esses compostos apresentam estruturas fenólicas. Fuess e Garcia (2014) descrevem que, na vinhaça, as melanoidinas surgem pela ocorrência da reação de Maillard entre o açúcar e as proteínas presentes. Essas moléculas são resistentes à degradação por muitos microrganismos e, portanto, dificilmente serão removidas por um processo como lodo ativado (MIYATA; IWAHORI; FUJITA, 1998).

Assim como mencionado por Miyata, Iwahori e Fujita (1998), a capacidade de fungos da podridão branca de degradar melanoidinas já é conhecida na literatura. Os mesmos autores avaliaram a descoloração de uma solução de melanoidina pelo fungo *T. hirsutus* e concluíram que as enzimas peroxidase e MnP desempenham um papel chave na descoloração dessas substâncias; a lacase também foi detectada, porém em baixa quantidade. A participação das

enzimas lacase, peroxidase e MnP na descoloração da vinhaça foi demonstrada nos trabalhos de Souza (2012) e Ferreira e colaboradores (2011). Estes, por outro lado, obtiveram elevados valores de atividade da lacase e consideraram que esta contribui de forma significativa para a remoção da cor da vinhaça.

Considerando-se as observações de Viniegra-González e colaboradores (2002) acerca da fermentação em fase sólida, pode-se dizer que a “bio ball” tem um papel semelhante a um material sólido a ser colonizado no que diz respeito ao aumento de superfície reativa e de troca gasosa e, nesse sentido, poderia propiciar uma descoloração mais rápida, justificando as observações relativas à descoloração no ensaio de seis dias. Seguindo o mesmo raciocínio, Spina e colaboradores (2012) ponderam que a descoloração, em presença do material suporte, é favorecida pela existência de um micro-ambiente protegido do efluente. Se esse espaço existir, as enzimas poderiam atuar até mesmo em faixas de pH desfavoráveis, pois os valores poderiam ser diferentes nas reentrâncias do material suporte.

Rodríguez e colaboradores (2003) mencionam que a cor é uma importante característica dos efluentes à qual, muitas vezes, não se dá a devida atenção. Essa negligência deve desaparecer, pois reduzir a cor significa remover do efluente grupos cromóforos e moléculas de alto peso molecular, ambos com potenciais tóxicos ao ambiente. De acordo com Ferreira e colaboradores (2010), as principais técnicas atualmente empregadas em campo na descoloração da vinhaça são: degradação enzimática, floculação com moléculas sintéticas ou biopolímeros, coagulação com sais de alumínio ou ferro e oxidação dos produtos derivados da floculação. Os mesmos autores ressaltam que, de uma maneira geral, estes tratamentos não se mostram muito eficientes.

5.1.3 Toxicidade da vinhaça tratada (*D. similis*)

Os valores de CL₅₀ referentes ao efeito tóxico da vinhaça e seus diferentes tratamentos para o organismo *D. similis* tratada pelos fungos dados de toxicidade, estão elencados na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores de CL₅₀ (48 h) para *D. similis* - vinhaça in natura (controle) e tratada por *P. sajor-caju* e *P. ostreatus*

Tratamento	Dias de incubação	CL ₅₀ (48 h, %)
<i>P. sajor-caju</i> aderido	6	18,1
	12	16,4
<i>P. sajor-caju</i> livre	6	24,2
	12	7,2
<i>P. ostreatus</i> aderido	6	11,7
	12	16,2
<i>P. ostreatus</i> livre	6	13,4
	12	10,7
Controle (vinhaça 50%)	0	0,002

Ferreira e colaboradores (2011) conduziram testes de ecotoxicidade da vinhaça pura com quatro organismos-teste distintos (*P. subcaptata*, *H. attenuata*, *D. magna* e *D. similis*). Enquanto que a vinhaça pura apresentou uma CL₅₀ (48 h) de 2,2% para *D. similis*, o mesmo parâmetro para a vinhaça tratada foi de 21,022%. No presente estudo, no entanto, a vinhaça *in natura* (50%) ocasionou a mortalidade de todos os organismos e o melhor valor de CL₅₀ (48 h) para *D. similis* foi obtido pela vinhaça tratada por *P. sajor-caju* crescido por seis dias de forma livre (24,2%), valor este comparável ao obtido no estudo previamente citado de Ferreira e colaboradores (2011).

Como já mencionado, a vinhaça é rica em metais e outras substâncias que podem ser tóxicas a diferentes organismos (fenóis, melanoidinas, sulfatos, etc.). Em relação aos organismos aquáticos, como *D. similis*, o conteúdo de amônia neste resíduo é de particular importância. A revisão compilada por Fuess e Garcia (2014) menciona alguns trabalhos que encontraram valores tóxicos de amônia na vinhaça entre 100 e 500 mg L⁻¹.

A peroxidase é uma enzima com potencial de reduzir a toxicidade de efluentes têxteis, como mostrado pelo trabalho de De Souza e colaboradores (2007) apud Hamid e Rehman (2009). No referido estudo, os autores trabalharam com a peroxidase da raiz-forte (horseradish peroxidase – HRP) e a toxicidade avaliada pelo teste com *D. magna*. Pode-se supor, portanto, que, pelo menos, algumas isoformas dessa enzima são capazes de catalisar a clivagem de substratos fenólicos, também presentes na vinhaça de forma a gerar compostos atóxicos.

5.2 Atividade enzimática de *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* em SSF (bagaço de cana) e descoloração de corante índigo

O crescimento das duas linhagens de *Pleurotus* em bagaço de cana-de-açúcar durante 14 dias mostrou-se abundante e eficiente para produção da enzima lacase, capazes de descolorir soluções do corante têxtil azul índigo (Tabela 10). Esse resultado está de acordo com as observações de Souza (2012), Piscitelli e colaboradores (2011) e Gassara e colaboradores (2008), segundo as quais celulose, hemicelulose e lignina são compostos com conhecida propriedade de estimular a produção de lacases e peroxidases. O mesmo efeito estimulante foi encontrado para as espécies *Dadealea avida*, *Lentinula edodes* e *Polyporus sanguineus* (ARORA; GILL, 2000).

Foi observado também que o bagaço adsorve o corante e, mesmo não inoculado, promove a descoloração da solução. Essa propriedade, como descrito na revisão compilada por Sanghi e Verma (2013), tem sido amplamente empregada no campo da descoloração de efluentes têxteis, o que caracteriza o bagaço como um adsorvente de baixo custo e amplamente disponível.

5.2.1 Atividade enzimática - lacase e MnP em SSF

A atividade enzimática da lacase produzida por *P. sajor-caju* após 14 dias de incubação em bagaço de cana-de-açúcar umedecido com vinhaça foi cerca de 10 vezes maior do que da mesma enzima de *P. ostreatus*. Por outro lado, a atividade de manganês peroxidase não foi detectada em ambas as espécies (Tabela 10).

Tabela 11 - Atividade enzimática de *P. sajor-caju* e *P. ostreatus*, cultivados em bagaço de cana-de açúcar por 14 dias a 28°C

Espécie	Atividade da lacase (UI g ⁻¹)	Atividade da MnP (UI g ⁻¹)
<i>P.sajor-caju</i>	13,98 ±1,258A	0,000±0,000A
<i>P. ostreatus</i>	1,060±1,134B	0,000±0,000A

Comparações entre as espécies são mostradas pelas letras à direita, em coluna. Médias com nenhuma letra em comum diferem pelo teste T de Student (p< 0,01)

A expressão de enzimas ligninolíticas pelos basidiomicetos *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* em bagaço de cana-de-açúcar umedecido com vinhaça foi previamente estudado por no Laboratório de Ecologia Aplicada (CENA-USP). Os resultados obtidos nesses estudos estão resumidos no Anexo B.

Os resultados obtidos por Aguiar-Filho (2008), utilizando a mesma linhagem de *P. sajor-caju*, mostraram picos de atividade da lacase ao sexto dia ($10,53 \text{ UI g}^{-1}$ de bagaço), enquanto que a produção da mesma por *P. ostreatus* (outra linhagem) foi mais tardia, apresentando picos no 24º dia ($325,23 \text{ UI g}^{-1}$). A MnP, por outro lado, apresentou seu pico ao 12º dia em *P. sajor-caju* ($17,93 \text{ UI L}^{-1}$) e ao 21º dia em *P. ostreatus* ($27,69 \text{ UI L}^{-1}$). Vale ressaltar que o referido estudo utilizou diferentes formas de pré-tratamento do bagaço (2% H_2SO_4 , 1,5% NaOH , 2% H_2O_2 e uma combinação entre NaOH , e H_2O_2), procedimentos estes que aumentam a biodisponibilidade da celulose e podem favorecer o desenvolvimento do micélio, bem como a síntese de compostos extracelulares, como as enzimas ligninolíticas (GOWTHAMAN; KRISHNA; MOO-YOUNG, 2001). Mais uma vez, estes tratamentos são difíceis de serem aplicados *in situ* e, por isso, não foram adotados neste trabalho.

Ao 15º dia de cultivo, a atividade da lacase de *P. sajor-caju* medida por Aguiar-Filho, Ferreira e Monteiro (2010) se encontrava entre um e três UI g^{-1} , enquanto que, no presente estudo, o valor encontrado ao 14º dia foi de 14 UI g^{-1} , próximo ao pico encontrado ao 12º dia por esses autores (Anexo B), o que pode indicar que sua expressão pode ter começado mais tarde ou que esta se manteve mais estável. O perfil enzimático da lacase de *P. ostreatus* cultivado em SSF por Aguiar-Filho (2008) mostrou um grande aumento de atividade após o 12º dia (que passou de valores próximos de zero a $298,46 \text{ UI g}^{-1}$ no 15º dia), seguido de um aumento até um pico de $325,23 \text{ UI g}^{-1}$, que foi sucedido por uma brusca queda a valores novamente próximos de zero até o fim do ensaio. Tratando-se da mesma espécie, é possível que o perfil enzimático da lacase tenha sido semelhante ao encontrado por Aguiar-Filho, Ferreira e Monteiro (2010) e, desta maneira, a metodologia de avaliação da atividade enzimática (avaliação apenas ao fim de 14 dias) não pôde detectar o pico de atividade.

Pompeu (2010), trabalhando com a mesma linhagem de *P. sajor-caju* também crescida em bagaço, observou valores de atividade da lacase de $371,1 \text{ UI L}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Diferentemente da metodologia aqui descrita, Pompeu (2010) utilizou bagaço de cana-de-açúcar sem a adição de vinhaça, enriquecido com extrato de levedura e, assim como Aguiar-Filho, Ferreira e Monteiro (2010), pré-tratado com H_2SO_4 0,5%. O valor obtido nesse estudo, apesar de ser inferior, é resultante do emprego de uma metodologia que exige menor manipulação e

menores gastos financeiros e, além do mais, se demonstrou eficiente na descoloração do corante índigo a 0,02%.

A atividade da enzima lacase de *P. sajor-caju* medida após 14 dias de fermentação sólida (14 UI g⁻¹) foi maior do que aquela determinada no ensaio conduzido em fermentação submersa com *P. ostreatus* e *P. sajor-caju*, aproximando-se apenas à atividade de *P. sajor-caju* aderido (Tabela 6). De acordo com a revisão elaborada por Viniegra-González e colaboradores (2002), é esperado que a fermentação sólida leve a valores mais altos de atividade enzimática do que a submersa, uma vez que nesse sistema é mais difícil que ocorra repressão catabólica, a atividade proteolítica é menor e há uma maior superfície para trocas gasosas, sem contar que as condições ambientais são mais próximas à natureza dos fungos filamentosos.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a atividade enzima MnP não foi detectada em ambas as espécies estudadas. Como mostrado pelo trabalho de Souza (2012), a MnP expressa por *Pleurotus* em fermentação sólida pode não apresentar um perfil enzimático linear, isto é, sua atividade será irrisória na maioria dos dias de cultivo, com poucos picos de atividade alta ao longo do período do ensaio. Considerando esta informação, é possível que o pico de produção da MnP tenha sido perdido pela forma de amostragem adotada (medição da atividade ao fim de 14 dias), ou então que a adição do tampão de extração tenha feito com que uma baixa atividade não pudesse ser detectada pela metodologia empregada (KUWAHARA et al., 1984).

Outra possível explicação é a de que, segundo Cameron, Timofeevski e Aust (2000), os fungos da podridão branca parecem ter desenvolvido uma ampla gama de mecanismos para a produção de peróxido de hidrogênio e é possível que processos diferentes sejam ativados sobre distintas condições nutricionais. Neste contexto, considera-se que o conjunto de nutrientes disponíveis nas condições deste ensaio tenha proporcionado uma produção muito baixa ou nula de H₂O₂, impedindo a atividade da MnP.

O sucesso no crescimento dos fungos sobre o bagaço de cana e na produção de enzimas ligninolíticas por estes, evidenciado por este trabalho e por estudos anteriores (AGUIAR-FILHO; FERREIRA; MONTEIRO, 2010; POMPEU, 2010; SOUZA, 2012), se apresenta como uma excelente alternativa tecnológica para a produção comercial destes compostos tão valorizados. Gassara e colaboradores (2008) afirmam que as matérias primas podem representar de 40 a 60% do custo da produção de enzimas e, conseqüentemente, a fermentação sólida se apresenta como uma técnica vantajosa do ponto de vista econômico, uma vez que esta permite o aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de

enzimas ligninolíticas. Como previamente mencionado, o bagaço de cana é um resíduo bastante disponível no Brasil e seu preço gira em torno de US\$ 0,015 Kg⁻¹ (GUSMÃO et al., 2013).

Além das vantagens econômica do uso do bagaço, este pode ser mais promissor para a expressão das enzimas de interesse do que outros resíduos lignocelulósicos, como palha de trigo e de arroz. Este resultado foi verificado no estudo de Arora e Gill (2000), com o fungo *P. floridensis*: em relação ao meio sem adição de materiais lignocelulósicos, o meio com bagaço teve uma produção de lacase 84 vezes maior em relação ao meio mineral, enquanto que a palha de trigo resultou em uma atividade 59% maior e a de arroz, 22 vezes.

5.2.3 Ensaios de descoloração

5.2.3.1 Descoloração com extrato enzimático

O extrato enzimático mostrou-se eficiente no que diz respeito à descoloração da solução de azul índigo (Tabela 12). *P. sajor caju* descoloriu o índigo em maior intensidade que *P. ostreatus* nas três proporções (teste de Tukey, $p < 0,05$), chegando a 74% na proporção 2:8 v/v de corante e extrato enzimático. Na proporção 8:2, *P. sajor-caju* descoloriu a solução de índigo cerca de três vezes mais do que *P. ostreatus*. A análise estatística também revelou que, considerando-se cada espécie, houve uma forte correlação entre a taxa de descoloração e a proporção corante:extrato enzimático ($p < 0,001$) e, como era esperado, a melhor proporção para a descoloração foi a de 2:8; a proporção de 6:4 foi intermediária e a de 8:2 foi classificada como a menos promissora para a descoloração dessa solução. Este padrão evidencia que a descoloração é inversamente proporcional à quantidade de corante na amostra. Ressalta-se que a solução de azul índigo (controle) não sofreu descoloração.

Tabela 12 - Porcentagens de descoloração de índigo (0,02%) nas diferentes proporções corante:extrato enzimático v/v ($\lambda = 580$ nm)

Amostra	2:8	6:4	8:2
<i>P. sajor-caju</i>	73,81±0,397Aa	67,90±1,447Ab	10,21±2,047Ac
<i>P. ostreatus</i>	58,60±1,213Ba	40,22±1,725Bb	C3,110±1,067Bc

Comparações entre as proporções são mostradas pelas letras minúsculas, em linha, e comparações entre as espécies, pelas letras maiúsculas, em coluna. Médias com nenhuma letra em comum diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

A correlação dos valores de descoloração aqui determinados com as atividades enzimáticas dos fungos crescidos em bagaço permite a inferência de que a lacase, por ter apresentado uma atividade cerca de 30 vezes maior em *P. sajor-caju* do que em *P. ostreatus* (14 e 0,4 UI g⁻¹, respectivamente), foi responsável pelas maiores taxas de descoloração do índigo da primeira espécie em relação à segunda.

A literatura demonstra que enzimas ligninolíticas como LiP e MnP estão claramente relacionadas à descoloração de corantes sintéticos de diversas naturezas (HAMID; REHMAN, 2009; DIWANIYAN et al., 2001). Para a espécie *P. sajor-caju* (que não produz LiP), Faraco e colaboradores (2009) consideram que as lacases têm um papel maior nessa degradação do que a MnP, podendo atuar sobre corantes do tipo azo, antraquinonas e derivados de trifenilmetano.

A revisão elaborada Husain (2006) traz inúmeros exemplos do papel da lacase na descoloração de diversos corantes. O poder oxidativo das lacases dos basidiomicetos é mais alto do que a de outros fungos (como, por exemplo, ascomicetos), fazendo com que estas sejam mais promissoras na descoloração. Diferenças nas taxas de descoloração atingidas pelas lacases desse grupo se relacionam a propriedades catalíticas específicas de cada enzima, à estrutura do corante e às condições de produção da enzima. O mesmo autor ressalta que o papel das diferentes ligninases na descoloração depende tanto da estrutura do corante quanto da espécie empregada, fazendo com que não haja, necessariamente, uma enzima mais eficiente em absoluto.

Utilizando a mesma linhagem de *P. sajor-caju* com 15 dias de crescimento, Souza (2012) obteve os seguintes valores de descoloração do azul índigo a 8:2 e 6:4: 35,69% e 54,48%, respectivamente. No mesmo trabalho, Souza verificou que tanto as enzimas MnP quanto a lacase foram expressas e suas atividades foram, respectivamente, de 11,58 e 51,95 UI L⁻¹. Os resultados aqui obtidos são concordantes com os de Souza (2012) e também são promissores no que diz respeito à degradação do índigo por *P. sajor-caju* e a importância da enzima lacase na degradação do índigo.

O presente estudo e o de Souza (2012) determinaram que o corante azul índigo pode ser descolorido mesmo em ausência do bagaço, o que pode ser interpretado como uma predominância da atividade enzimática em relação à adsorção. Estes resultados diferem daqueles determinados por Ranzani (2002), que testou a descoloração do azul índigo por diversas espécies deste gênero crescidas em bagaço de cana e concluiu que esta se dava apenas presença de bagaço.

Balan e Monteiro (2001) estudaram a degradação do azul índigo a 0,02% v/v pela mesma linhagem de *P. sajor-caju* utilizada por Souza (2012) e no presente estudo. O microrganismo, crescido em meio líquido com o corante, proporcionou 70% de descoloração após 24 h de incubação, valor próximo aos obtidos no presente estudo após 15 minutos nas proporções 6:4 e 2:8 corante:extrato enzimático.

Diwaniyan e colaboradores (2001), ao estudar oito linhagens de basidiomicetos ligninolíticos crescidos em fase líquida, observaram que seis destas descoloriram o corante índigo Carmine a 0,02% em taxas superiores a 80%, porém este valor foi obtido após 192 h. A partir desses resultados, pode-se inferir que a descoloração promovida por *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* em SSF é promissora e potencialmente mais rápida do que a descoloração proporcionada pelos mesmos fungos crescidos em fase líquida.

5.2.3.2 Descoloração com bagaço inoculado

A descoloração da solução do corante azul índigo (0,02%) com adição de bagaço de cana-de-açúcar, inoculado ou não, sofreu descoloração por adsorção e por degradação por vias enzimáticas, como pode ser observado na Tabela 13.

Tabela 13 - Porcentagens de descoloração do corante azul índigo ($\lambda = 580$ nm) por bagaço com e sem inoculação de *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* crescidos por 12 dias

Amostra	% descoloração
Controle	0C
Bagaço não inoculado	88,24±0,398B
<i>P. sajor-caju</i>	93,11±1,541A
<i>P. ostreatus</i>	91,24±2,216AB

Letras diferentes na coluna mostram diferenças significativas entre os valores (Teste de Tukey, $p < 0,05$)

O bagaço inoculado com *P. sajor-caju* proporcionou uma descoloração estatisticamente maior do que o bagaço não inoculado (Tabela 12), resultado este concordante com o estudo de Souza (2012). A inoculação com *P. ostreatus*, por outro lado, levou a valores de descoloração que não foram diferentes nem daquela promovida por *p. sajor-caju* e tampouco da descoloração efetuada pelo bagaço sozinho. A capacidade de adsorção também

foi verificada pela intensa coloração azul, tanto do micélio como do bagaço, ao término dos 12 dias de duração do experimento.

Zhou e colaboradores (2012) descrevem que os diversos materiais lignocelulósicos utilizados como biosorbentes têm sua capacidade adsorptiva proporcionada pela presença de uma variedade de grupos de ligação com afinidade por íons, como hidroxilas, carboxilas e amidogen. Fu e Viraraghavan (2001) ressaltam que a adsorção se configura como um eficiente processo de remoção de cor, o que explica as maiores taxas de descoloração atingidas pela adição de bagaço inoculado e de bagaço sem inoculação em relação à descoloração pelo extrato enzimático. Outro ponto relevante é que, diferentemente de outros materiais comumente utilizados como adsorventes na remoção de cor de efluentes (como o carvão ativado), o bagaço de cana-de-açúcar é um material de baixo custo e amplamente disponível.

Verificou-se que o bagaço atua como adsorvente e que os bagaços inoculados com ambos os fungos apresentaram porcentagens de descoloração maiores em relação ao bagaço não inoculado. Fu e Viraraghavan (2001) também apontam que o micélio vivo pode exercer um duplo papel: além de efetuar a biodegradação, este também contribui para a adsorção, o que justifica uma maior degradação em presença do micélio e do bagaço do que apenas com o extrato enzimático. Papinutti e Forchiassin (2012) ressaltam que a capacidade adsorptiva da quitina tem sido descrita na literatura e que a máxima adsorção do índigo por esta é de, aproximadamente, 6 mg g^{-1} .

Souza (2012) demonstrou que a descoloração é maior com extrato enzimático de doze dias de incubação, no qual ambas as enzimas estão em abundância do que com o extrato de seis dias, que contém principalmente lacase. Este trabalho, por outro lado, demonstra que a lacase teve um papel superior, se não prioritário, na descoloração do corante índigo em relação à MnP. Os estudos conduzidos por Young e Yu (1996) e por Diwaniyan e colaboradores (2001) ao estudar a descoloração de diversos corantes (inclusive do índigo) por fungos da podridão branca, também observaram que a atividade da MnP não foi suficiente para a remoção de cor das soluções em estudo. Dessa forma, pode-se dizer que o papel de cada enzima pode variar de acordo com as condições do experimento e com as isoformas produzidas.

5.3 *P. ostreatus* (shimeji branco) crescido em SMS comercial

5.3.1 Atividade enzimática do SMS – lacase, peroxidase e MnP

A metodologia empregada na extração das enzimas dos SMS 1 e 2 possibilitou a obtenção de atividade das enzimas lacase, peroxidase e MnP. A Tabela 14 mostra os valores de atividade da lacase na proporção de 0,1 g de SMS mL⁻¹ de extrator, e a Tabela 15 mostra os mesmos valores para o SMS 2.

Tabela 14 – Atividade enzimática da lacase do SMS 1 de *P. ostreatus* cultivado por 90 dias na proporção de 0,1 g de SMS mL⁻¹ de extrator

Extração	Atividade enzimática (UI g ⁻¹ de SMS)
H ₂ O destilada	1,995±0,587A
Tampão citrato-fosfato (pH 5)	0,043±0,074B
Sol. de Ringer	0,000±0,000B

As atividades são comparadas em colunas. Médias com nenhuma letra em comum diferem pelo teste de Tukey (p < 0,05)

Tabela 15 – Atividade enzimática da lacase do SMS 2 de *P. ostreatus* cultivado por 90 dias, na proporção de 0,1 g de SMS mL⁻¹ de extrator

Extração	Atividade enzimática (UI g ⁻¹ de SMS)
H ₂ O destilada	0,000±0,000A
Tampão citrato-fosfato (pH 5)	0,097±0,167A
Sol. de Ringer	0,097±0,167A

As atividades são comparadas em colunas. Médias com nenhuma letra em comum diferem pelo teste de Tukey (p < 0,05)

Dentre as enzimas estudadas, a lacase se destacou no SMS 1 e o valor mais alto de atividade desta enzima foi obtido com o uso de água destilada na proporção de 0,1 g mL⁻¹ (2 UI g⁻¹ de SMS). Para o SMS 2, as atividades de lacase obtidas com os três extratores foram iguais e equivalentes a zero.

Em relação à peroxidase, não ocorreram interações significativas e os efeitos principais que apresentaram significância estatística foram: extração (Tabela 16) e substrato (Tabela 17). A Tabela 16 mostra que, pelo teste de Tukey (p<0,05), a água destilada foi o melhor extrator e a solução de Ringer, o pior; o tampão citrato-fosfato não diferiu estatisticamente dos demais extratores. A Tabela 16, por sua vez, mostra diferenças na atividade da peroxidase entre os substratos (teste F, p<0,1).

Tabela 16 - Atividade enzimática da peroxidase dos SMS 1 e 2 de *P. ostreatus* cultivado por 90 dias, nas proporções de 0,1 e 0,033 g mL⁻¹, de acordo com o extrator

Extração	Atividade enzimática (UI g ⁻¹ de SMS)	n
H ₂ O destilada	0,619±0,515A	12
Tampão citrato-fosfato (pH 5)	0,402±0,520AB	12
Sol. de Ringer	0,000±0,000C	12

As atividades são comparadas em colunas. Médias com nenhuma letra em comum diferem pelo teste de Tukey (p < 0,05). n = número de observações

Tabela 17 - Atividade enzimática da peroxidase dos SMS 1 e 2 de *P. ostreatus* cultivado por 90 dias, nas proporções de 0,1 e 0,033 g mL⁻¹, de acordo com o substrato

Substrato	Atividade enzimática (UI g ⁻¹ de SMS)	n
SMS 2	0,467±0,587A	18
SMS 1	0,214±0,328B	18

As atividades são comparadas em colunas. Médias com nenhuma letra em comum diferem pelo teste F de Fischer-Snedecor (p < 0,1). n = número de observações

Para a enzima MnP, não ocorreram interações significativas e tampouco verificaram-se diferenças estatisticamente significantes entre os efeitos (Tabela 18). Os valores de atividade das três enzimas estudadas em ambos os substratos e com as duas proporções de solução extratora se encontram no Anexo C.

Tabela 18 - Atividade enzimática da MnP dos SMS 1 e 2 de *P. ostreatus* cultivado por 90 dias, na proporção de 0,1 g de SMS mL⁻¹ de extrator

Substrato	Extração	Atividade enzimática (UI g ⁻¹ de SMS)
SMS 1	H ₂ O destilada	0,299±0,342A
	Tampão citrato-fosfato (pH 5)	0,573±0,225A
	Sol. de Ringer	0,498±0,547A
SMS 2	H ₂ O destilada	0,000±0,000A
	Tampão citrato-fosfato (pH 5)	0,299±0,194A
	Sol. de Ringer	0,498±0,270A

As atividades são comparadas em colunas. Médias com nenhuma letra em comum diferem pelo teste de Tukey (p < 0,05)

Os substratos trazidos ao laboratório mantiveram o microrganismo vivo, o que foi evidenciado pelo desenvolvimento de corpos de frutificação durante um período de 30 dias após seu descarte pelo produtor (Figura 10). Entretanto, os valores reportados nas Tabelas 13 a 17 deixaram evidente que o material, neste estágio, já não se mostra muito favorável para a obtenção de enzimas ligninolíticas.

Figura 10 – Bloco de produção de shimeji comercial (SMS 2) exibindo frutificação três semanas após seu descarte

Ao avaliar a produção de enzimas ligninolíticas por *Phanerochaete chrysosporium* crescido em diferentes resíduos (lodo da indústria de papel e celulose, polpa de maçã e efluentes das indústrias pesqueira e cervejeira), Gassara e colaboradores (2008) observaram que a centrifugação gerou valores de MnP e LiP mais altos do que a filtração a vácuo; no mesmo estudo, verificou-se que o pH do tampão não se correlacionou à atividade enzimática, diferindo de estudos prévios. No caso do SMS, a centrifugação se apresentou como uma metodologia mais eficiente do que a filtração no sentido de que proporcionou a obtenção de um sobrenadante mais límpido, no entanto, sugere-se que esta técnica tenha mantido no meio substâncias que interferiram com a leitura das enzimas, uma vez que o líquido obtido não era totalmente desprovido de cor.

A atividade enzimática de acordo com as diferentes metodologias de extração revelaram que as três soluções empregadas e em ambas as proporções se mostraram estatisticamente equivalentes, desta forma considerou-se que a melhor forma de extração dessas enzimas nestes substratos é com água destilada na proporção de $0,033 \text{ g mL}^{-1}$, isto porque é a metodologia mais simples e menos dispendiosa. O trabalho de Ball e Jackson

(1995) comparou metodologias de extração de endoxilanas de SMS e verificou que o uso de água destilada produziu uma atividade mais alta do que o uso da solução de Ringer.

As baixas atividades enzimáticas encontradas no SMS podem ser devidas à idade do material (90 dias). É importante avaliar a possibilidade de se trabalhar com o fungo antes que este chegue ao final de sua capacidade de produção de cogumelos. Singh, Abdullah e Vikineswary (2003) utilizaram um SMS de *P. sajor-caju* coletado um mês antes de seu descarte e obtiveram atividades de lacase que variaram entre 1,22 e 7,59 U g⁻¹ de SMC.

Cada bloco de substrato para a produção de cogumelos pesa cerca de oito quilogramas e este recebe o inóculo fúngico em uma proporção de 1 a 2% da massa úmida do bloco (EIRA, 2004). Singh, Abdullah e Vikineswary (2003) descrevem que o gênero *Pleurotus*, assim como outros basidiomicetos, apresenta duas fases em seu ciclo de vida. A primeira consiste na completa colonização do substrato e, de acordo com Eira (2004), dura entre 14 e 21 dias; a segunda fase é aquela na qual ocorrem as frutificações. No caso da produção da qual coletou-se o SMS, a primeira fase dura cerca de um mês e as frutificações ocorrem em intervalos de 10 a 15 dias. Em cada fase, o fungo se encontra em um estágio metabólico distinto, fazendo com que cada momento apresente um padrão de produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas distinto (SINGH; ABDULLAH; VIKINESWARY, 2003).

Outro fator que deve ser levado em consideração é o de que, assim como descrito por Ahn e colaboradores (2002), enzimas podem ter sua atividade inviabilizada ou drasticamente reduzida pela presença de condições desfavoráveis de pH, presença de proteases, adsorção por colóides ou inibição pela matéria orgânica do solo. É de se esperar que o SMS, por ser um material complexo no qual existe uma comunidade de microrganismos, esteja sujeito a esses tipos de complicações. Ahn e colaboradores (2002), bem como Pompeu (2010), também afirmam que a degradação dos fenóis do bagaço pela lacase pode levar à produção de substâncias húmicas que, por sua vez, comprometem a atividade e a estabilidade de enzimas ligninolíticas.

Assim como descrito por Singh, Abdullah e Vikineswary (2003), um ponto importante do uso desses substratos como fonte de enzimas é que, apesar dos níveis de atividades serem, em geral, mais baixos do que aqueles determinados em sistemas de fermentação líquida, estes não geram um acúmulo de biomassa, que nem sempre pode ser aproveitada e que pode ser um empecilho no tratamento de efluentes em escala industrial. Outra vantagem deste material é seu baixo custo em relação às enzimas isoladas.

Ranzani (2002) também comenta que resíduos sólidos da agricultura sobre os quais se cresceu o fungo, como bagaço de cana ou a mistura de materiais que compõe o SMS, podem

ser usados para alimentação animal, na geração de biogás, como adubo orgânico e como biosorbentes na remediação de solos. Em relação à biorremediação, Papinutti e Forchiassin comentam que o SMS se destaca em relação ao uso de um inóculo fúngico *in situ* porque contorna o longo tempo de crescimento do microrganismo e sua competição com a microbiota indígena.

5.3.4 Descoloração do azul índigo pelo SMS

O SMS se mostrou bastante eficiente na descoloração da solução de corante azul índigo. A Tabela 19 mostra as porcentagens de descoloração para o SMS 1 e a Tabela 20, para o SMS 2. As Tabelas registram que a descoloração atingida se encontrou entre 40 e 80%, de acordo com o volume da solução de corante empregado.

Tabela 19 – Porcentagem de descoloração do azul índigo (0,02%, $\lambda = 580$ nm) pelo SMS 1, nos volumes de 10, 20 e 60 mL, por 2,5 g de SMS de *P. ostreatus* cultivado por 90 dias e irradiado (gama, 5 +7,5 kGy) ou não

Tratamento	Volume da solução de azul índigo 0,02%, pH 4,5 (mL)		
	10	20	60
Não irradiado	44,51±8,762Aa	57,51±8,365Aa	46,43±3,491Aa
Irradiado	33,55±1,098Aa	42,21±0,886Ba	17,09±0,786Bb

SMS = “Spent mushroom waste”. As comparações entre os tratamentos são mostradas pelas letras maiúsculas, em coluna, e as comparações entre os volumes, pelas letras minúsculas, em linha. As médias com nenhuma letra em comum diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 20 – Porcentagem de descoloração do azul índigo (0,02%, $\lambda = 580$ nm) pelo SMS 2, nos volumes de 10, 20 e 60 mL, por 2,5 g de SMS de *P. ostreatus* cultivado por 90 dias e irradiado (gama, 5 +7,5 kGy) ou não

Tratamento	Volume da solução de azul índigo 0,02%, pH 4,5 (mL)		
	10	20	60
Não irradiado	A78,07±0,165A	A70,92±3,365A	A69,10±1,074A
Irradiado	A79,67±0,043A	A69,67±4,480A	B26,55±1,550 B

SMS = “Spent mushroom waste”. As comparações entre os tratamentos são mostradas pelas letras maiúsculas, em coluna, e as comparações entre os volumes, pelas letras minúsculas, em linha. As médias com nenhuma letra em comum diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

A Tabela 19 mostra que, para, ambos os materiais, verificaram-se diferenças significativas entre os tratamentos irradiado e não irradiado. Para o SMS 1, estas se deram nos ensaios com 20 e 60 mL e, para o SMS 2, no ensaio com 60 mL. Essa informação é uma

indicação de que, nas três proporções da solução do corante, a atividade biológica teve um papel mais significativo do que a adsorção pelo substrato no que diz respeito à descoloração da solução do azul índigo. Sugere-se que a não ocorrência da mesma diferença no ensaio de 10 mL esteja relacionada ao fato de que a quantidade de corante neste não tenha sido suficiente para a ativação do sistema ligninolítico. Esses dados, por si só, mostram que os dois substratos, bem como as linhagens de *P. ostreatus* neles inoculadas, apresentam características distintas, o que está de acordo com a avaliação visual de ambos os materiais.

As diferenças de descoloração entre os SMS 1 não irradiado e irradiado foram atribuídas à enzima lacase, que exibiu atividade de 2 UI g⁻¹ de SMS (Tabelas 14 e 15). De acordo com Ali (2010), estudos correlacionam, de forma positiva, a atividade da lacase e de outras enzimas e a descoloração do corante têxtil azul brilhante de Remazol.

Para o SMS 2, por outro lado, pode se dizer que, de acordo com a Tabela 17, a peroxidase possa ter contribuído para que o material não irradiado descolorisse mais o azul índigo do que o material não irradiado. A peroxidase de *P. ostreatus* tem sido associada à descoloração de uma série de corantes, como mostrado pelas revisões de Hamid e Rehman (2009) e de Husain (2006). Shin, Oh e Kim (1997) apud Hamid e Rehman (2009) associaram a peroxidase de *P. ostreatus* a descoloração do azul brilhante de Remazol. Husain (2006) também traz inúmeros exemplos do papel da MnP na descoloração de corantes (um exemplo é uma descoloração de 98% do corante índigo Carmine pela MnP de *P. chrysosporium*) e, segundo este autor, a peroxidase e a MnP seriam, para alguns grupos de corantes as enzimas mais vantajosas nesse campo tecnológico.

As Tabelas 19 e 20 mostram que, nos três volumes de ensaio, não observaram-se diferenças nas taxas de descoloração com o micélio não irradiado (SMS 1 e 2), porém esta foi menor no ensaio com 60 mL com o micélio irradiado (SMS 1 e 2). Estes resultados foram interpretados em função da capacidade de adsorção do material: nos ensaios com 10 e 20 mL de solução do corante (correspondentes a 2 e 4 mg de azul índigo/2,5 g de SMS), as porcentagens de descoloração do foram as mesmas porque, possivelmente, ambas as proporções estavam dentro da capacidade adsorptiva do material, o que fez com que o papel da atividade enzimática não se destacasse tanto; no ensaio com 60 mL (correspondente a 12 mg de azul índigo/2,5 g de SMS), por outro lado, havia uma maior quantidade de corante e, portanto, é possível que a capacidade adsorção tenha sido superada e a diferença de descoloração do tenha se dado pela presença das ligninases no primeiro, após a estabilização do processos de adsorção.

Zhou e colaboradores (2012), trabalhando com SMS de *P. ostreatus* (resíduos do algodão), com o fungo inativo, também concluiu que a eficiência de remoção do azul de metileno foi diretamente proporcional à dosagem de SMS. Uma vez que o mesmo padrão não foi observado nos ensaios com o material não irradiado, pode-se dizer que a atividade biológica tem um papel mais significativo do que a biosorção, assim como no experimento com bagaço, pois, com proporções menores de SMS não irradiado, a descoloração foi maior do que com o material irradiado. Lau, Tsang e Chiu (2003), ao avaliar a remoção de HAPs pelo SMS de *P. pulmonarius*, também observaram a ocorrência tanto de biosorção quanto de biodegradação e verificaram que a segunda se destacou em relação à primeira.

Comparando-se o ensaio com 20 mL de solução do corante e SMS 2, correspondente a 4 mg de azul índigo/2,5 g de SMS com a descoloração de 20 mL da mesma solução efetuada por 4 g de bagaço de cana-de-açúcar inoculados com a mesma espécie (Tabela 13), pode-se considerar que o resultado aqui obtido é semelhante à descoloração promovida por bagaço inoculado: enquanto que quatro gramas do fungo crescido no bagaço promoveram 91% de descoloração, 2,5 g do SMS de *P. ostreatus* descoloriram a mesma solução em cerca de 70% sobre o mesmo volume da mesma solução, ou seja, a quantidade de SMS empregada foi cerca de 60% da quantidade de bagaço e a descoloração promovida pelo primeiro foi cerca de 70% daquela proporcionada pelo segundo.

Uma vez que taxas de degradação superiores a 50% foram atingidas após uma incubação de, apenas, 30 minutos, sugere-se a avaliação após um tempo de incubação maior, o que poderia favorecer não só a descoloração do índigo blue, como reduzir a toxicidade de produtos de degradação. Papinutti e Forchiassin (2012) registraram um efeito estimulante dos corantes na produção de lacase e MnP pelo SMS de *P. ostreatus* ao longo de 10 dias de incubação, observando picos de produção no quarto dia. É esperado que um resultado semelhante seja observado com os resíduos utilizados neste trabalho e o azul índigo.

Diferentemente dos demais materiais utilizados neste trabalho, o SMS, assim como descrito por Singh, Ahlawat e Rajor (2012), não é constituído apenas pelo micélio de *P. ostreatus*, mas por uma mistura deste com restos vegetais e apresenta uma comunidade microbiana própria, que inclui outras espécies de fungos e bactérias (*Aspergillus fumigatus*, *B. licheniformes*, *B. subtilis*, etc.) e suas respectivas enzimas. O estudo conduzido por Ahlawat e Singh (2011) demonstrou claramente a capacidade de descolorir de diversas bactérias e fungos presentes no SMS de *P. sajor-caju*. Pode-se dizer, portanto, que a descoloração da solução de azul índigo a 0,02% aqui determinada não deve ser encarada como consequência única da

atividade enzimática de *P. ostreatus*, mas é também produto das interações ecológicas que ocorrem nesta comunidade e das relações bioquímicas que existem entre seus metabólitos.

As taxas de descoloração alcançadas pelo micélio irradiado também podem apresentar relação com a diversidade microbiana do SMS. Discorrendo sobre a esterilização da turfa por meio de irradiação Tsai (2006) descreve que alguns microrganismos, devido a seu modo de reprodução, apresentam radio-resistência, como, por exemplo, os actinomicetos. A irradiação é vantajosa porque, ao contrário da autoclavagem e da secagem em forno, conserva a estrutura do SMS, contudo, a dose de radiação aplicada é um fator prioritário para seu sucesso. Comercialmente, a dose recomendada para o uso da turfa como veículo de bactérias fixadoras de nitrogênio é de 50 kGy, cerca de dez vezes maior do que a dose aplicada neste trabalho. Uma alternativa à esterilização por radiação gama utilizada por Papinutti e Forchiassin (2010) é o tratamento com azida sódica visando a inativação do fungo.

5.3.5 Análise do SMS irradiado por FTIR, antes e após a adsorção do azul índigo

A análise do material SMS 1 irradiado (Figura 11a) revelou modificações estruturais no SMS após a exposição à solução do corante no ensaio realizado com 60 mL de solução do corante, indicando que, neste ensaio, a maioria dos grupos de ligação do material interagiu com a solução de azul índigo. Os demais ensaios apresentaram os mesmos padrões espectrais da amostra SMS 1 irradiada que não foi exposta ao corante (controle), podendo ser um indício de que muitos sítios de ligação ainda estão livres.

Figura 11 – Espectro no infravermelho dos SMS 1 (a) e 2 (b) irradiados (gama, 5 + 7,5 kGy), após exposição a diferentes volumes da solução de corante índigo. Linha preta: controle, sem exposição; linha vermelha: 10 mL da solução de corante/ 2,5 g de SMS; linha azul: 20 mL da solução de corante/ 2,5 g de SMS; linha verde: 60 mL da solução de corante/ 2,5 g de SMS

O espectro correspondente à amostra SMS 1 irradiado com 60 mL da solução de corante (linha verde) mostra o aparecimento de um pico que não existe nos demais (874 cm^{-1}), o qual pode ser interpretado como a presença de um grupamento δ -CH fora do plano do anel aromático do corante. Nesta mesma amostra, percebe-se um deslocamento da banda 1375 para 1420 cm^{-1} , o que, de acordo com Zhou e colaboradores (2012), é uma indicação de que o padrão de ligação do grupo carbonila sofreu uma modificação após a biosorção do corante.

Em relação ao composto SMS 2 (Figura 11b), foram observadas as mesmas alterações registradas para o SMS 1 para as três proporções utilizadas, com exceção do controle, ou seja, percebe-se que este interagiu mais com a solução de azul índigo do que o SMS 1. Este resultado se correlaciona positivamente com as taxas de descoloração do azul índigo, pois as análises mostraram que em todos os ensaios, exceto 20 mL com material não irradiado e 60 mL com material irradiado, a descoloração pelo SMS 1 foi menor do que pelo SMS 2 (Anexo D).

O pico de absorbância em 1647 cm^{-1} , por estar entre 1650 e 1590 cm^{-1} , representa uma vibração de deformação do grupo N-H. Esta região destacou-se também no estudo de um SMS conduzido por Yan e Wang (2013). Segundo os mesmos autores, o pico entre 3000 e 2800 cm^{-1} representa vibrações no grupo C-OH.

Lau, Tsang e Chiu (2003) avaliaram os grupos funcionais presentes no SMS de *P. pulmonarius* por FTIR. Esse estudo revelou uma ampla banda de absorção na faixa de 3700 - 3200 cm^{-1} , o que, de acordo com os autores, corresponde à presença de grupamentos -OH, possivelmente oriundos da parede vegetal, e do grupo amido, característico da quitina presente na parede celular fúngica; ambos os grupos funcionais são conhecidos por serem sítios de biosorção. Esta mesma região se destaca nos espectros dos SMS 1 e 2.

Em relação à degradação da lignina e de compostos semelhantes do ponto de vista molecular, Rajarathanan e Bano (1989) apud Souza (2012) afirmam que este processo ocorre por duas vias distintas. Na primeira, os anéis aromáticos são desmetilados e, posteriormente, rompidos, enquanto que na segunda via a abertura do anel é o primeiro passo. A análise dos SMS 1 e 2 irradiado com a técnica FTIR não revelou a abertura do anel enzimático, o que nos leva a conclusão de que o corante se ligou ao SMS, mas foi pouco transformado por ele.

Zhou e colaboradores (2012) comentam que o FTIR é uma técnica importante na comprovação da adsorção do corante pelo SMS.

5.3.6 Toxicidade do azul índigo tratado (*H. attenuata*)

A Tabela 21 resume os dados de toxicidade (CL_{50} , 96 h), determinados pelo teste com *H. attenuata*, de ambos os substratos (SMS 1 e 2) em ambos os tratamentos. Como pode ser verificado nesta Tabela, o corante puro se mostrou atóxico para o organismo avaliado e, em geral teve sua toxicidade aumentada após interagir com os SMS 1 e 2. No ensaio com 60 mL da solução de corante e SMS 2 irradiado, no entanto, a CL_{50} (96 h) foi a mesma do que a da solução da azul índigo não tratada.

Tabela 21 - Valores de CL₅₀ (96 h) para *H. attenuata* – solução de azul índigo (controle) e após sua adsorção pelos SMS 1 e 2

Substrato	Volume da solução do corante (mL)	CL ₅₀ (96 h, %)	
		Não irradiado	Irradiado
SMS 1	60	71,7	60,7
	20	26,2	21,5
	10	15,6	11,7
SMS 2	60	36,1	100
	20	15,6	45,1
	10	8,2	30,7
Controle	-	-	100

Os dados da Tabela 21 mostram, para os SMS 1 e 2, os valores de CL₅₀ (96 h) foram crescentes com volumes crescentes de solução. Em relação aos materiais irradiados, percebe-se que a toxicidade do azul índigo foi menor aonde houve menos descoloração (60 mL, Tabelas 19 e 20.).

Os dados de toxicidade, quando relacionados aos de descoloração da solução de azul índigo pelo SMS (Tabelas 19 e 20) que, nos ensaios com SMS 1 em que se verificou maior descoloração com o material não irradiado do que irradiado (20 e 60 mL), a toxicidade não diferiu muito. Para o SMS 2 com 60 mL, por outro lado, a descoloração foi maior para o material não irradiado e a toxicidade também, sugerindo uma contribuição da atividade biológica para a toxicidade.

Mesmo quando a descoloração foi a mesma entre os tratamentos irradiado e não irradiado (10 mL para o SMS 1 e 10 e 20 mL para o SMS 2, Tabelas 19 e 20), a CL₅₀ (96 h) foi consideravelmente menor do que para o controle, especialmente para os materiais não irradiados. Uma vez que foi descrita a ocorrência de uma ampla variedade de microrganismos no SMS (SINGH; AHLAWA; RAJOR, 2012), é possível inferir que bactérias e outros fungos desta comunidade estejam produzindo metabólitos que não contribuem para a descoloração do índigo, porém aumentam sua toxicidade para *H. attenuata*. Sugere-se, também, que moléculas iônicas possam ter permanecido no material irradiado.

Assim como mencionado por Prigione e colaboradores (2012), a literatura tem demonstrado que descoloração e detoxificação não caminham sempre de mãos dadas e, por isso, os testes de ecotoxicidade devem ser incluídos em todos os estudos que envolvam o tratamento de corantes. Outro ponto importante ressaltado por Ramsey e Nguyen (2002) é o

de que a toxicidade de um corante que passa por biodegradação pode aumentar ou diminuir, de acordo com sua estrutura molecular. No estudo conduzido por Ramsey e Nguyen (2002), verificou-se que, dos sete corantes degradados por *T. versicolor*, dois permaneceram atóxicos, três se tornaram menos tóxicos e dois tiveram sua toxicidade aumentada. O aumento de toxicidade foi interpretado como efeito dos produtos de descoloração.

Singh, Abdullah e Vikineswary (2003) avaliaram a toxicidade de um efluente têxtil tratado por enzimas do SMS de *P. sajor-caju* com o organismo *Artemia salina*. Este estudo mostrou que o tratamento reduziu a toxicidade do efluente em 52,4% após quatro horas, porém observou-se um leve aumento na toxicidade até o fim do experimento e este resultado foi interpretado como uma re-polimerização dos produtos de degradação.

Foi demonstrado que o processo de descoloração de soluções de corantes têxteis pela atividade da lacase pode reduzir tanto a genotoxicidade quanto a citotoxicidade do efluente (RANZANI, 2002; DELLAMATRICE, 2005). Husain (2006) também comenta que o mecanismo catalítico da lacase previne a formação de amins aromáticas tóxicas, podendo reduzir a toxicidade tanto de corantes azo quanto de antraquinonas. As enzimas LiP, MnP e peroxidases diversas, por outro lado, são mais propensas a levar a um aumento da toxicidade do corante, uma vez que estas podem gerar, como compostos intermediários, amins aromáticas, fenóis e outros subprodutos tóxicos (HUSAIN, 2006).

Ao avaliar a toxicidade do corante índigo antes e após o tratamento com *Pleurotus spp.* com *H. attenuata*, Dellamatrice (2005) observou que este corante se tornou menos tóxico após os tratamentos. No presente estudo, por outro lado, a solução de corante azul índigo 0,02% (pH 4,5) íntegra se mostrou atóxica para *H. attenuata*, porém sua forma degradada pelo SMS (vivo ou irradiado) apresentou graus de toxicidade mais elevados do que a primeira. Uma das explicações elaboradas por Dellamatrice (2005) que pode ser aplicada neste estudo é a de que as enzimas presentes no material degradaram os corantes por vias metabólicas que resultaram em metabólitos secundários mais tóxicos do que as moléculas originais.

Apesar do aumento de toxicidade, o tratamento da solução de azul índigo 0,02% por meio dos componentes reativos e inertes do SMS pode ser considerado, biotecnologicamente, como uma preliminar de degradação e detoxificação de efluentes têxteis, já que, como avaliado por Dellamatrice (2005), estes teriam sua biodegradabilidade facilitada e poderiam ser subsequentemente submetidos à degradação microbiana como forma de redução de sua toxicidade.

6 CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados mostram que houve crescimento e expressão de ligninases pelos fungos *P. sajor-caju* e *P. ostreatus*, tanto em SmF (vinhaça a 50%) quanto em SSF (bagaço de cana e SMS).

Em vinhaça a 50%, verificou-se que *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* produziram lacase, peroxidase e MnP e estas atuaram na descoloração e transformação da vinhaça. No ensaio de seis dias, a presença de “bio balls” favoreceu a atividade das enzimas lacase e MnP em *P. ostreatus* e, no ensaio de 12 dias, esta propiciou maiores atividades de lacase em *P. sajor-caju* e de peroxidase e MnP em *P. ostreatus*. O suporte não alterou a produção de biomassa, porém *P. ostreatus* aderido a ela descoloriu menos a vinhaça do que crescido de forma livre. Neste experimento, *P. sajor-caju* foi mais promissor do que *P. ostreatus* em relação à atividade enzimática, à descoloração da vinhaça e à redução de sua toxicidade. A vinhaça teve sua toxicidade reduzida por todos os tratamentos.

Em bagaço de cana-de-açúcar umedecido com vinhaça, ambas as espécies se desenvolveram e houve expressão da enzima lacase, sendo esta cerca de 30 vezes maior para *P. sajor-caju* do que para *P. ostreatus*. Nas três proporções de corante:extrato enzimático estudadas (8:2, 6:4 e 2:8), a solução de azul índigo (0,02%) foi descolorida em menor proporção por *P. ostreatus* do que por *P. sajor-caju*. No estudo com bagaço inoculado, a descoloração promovida por ambas as espécies foi semelhante (cerca de 90%); o bagaço não inoculado também se apresentou como um bom adsorbente, proporcionando uma descoloração superior a 80%, mas, mesmo assim, estatisticamente menor do que o bagaço inoculado, confirmando o papel das enzimas na descoloração.

O estudo do substrato comercial de *P. ostreatus* cultivado por 90 dias (SMS) mostrou que os dois substratos estudados possuem as enzimas lacase e peroxidase e a melhor forma de extração para ambas foi 0,1 g mL⁻¹ de água destilada; Para a MnP, não houve diferença entre os extratores, suas proporções ou substrato analisado. A enzima que mais se destacou no SMS 1 foi a lacase (2 UI L⁻¹). O SMS, irradiado (gama, 5 +7,5 kGy) ou não, permitiu a descoloração da solução de corante índigo após 30 minutos de exposição e concluiu-se, com auxílio da análise FTIR, que esta se deu tanto pela atividade enzimática como pela capacidade de biosorção do material.

O teste de toxicidade com *H. attenuata* mostrou que, após interagir com o SMS, a solução de azul índigo passou de atóxica para extremamente tóxica, confirmando estudos anteriores segundo os quais a degradação do corante pode tornar o ambiente mais tóxico

O crescimento dos fungos em bagaço de cana com posterior extração das enzimas foi a metodologia que propiciou uma maior atividade da enzima lacase (14 UI mL^{-1}), porém o tempo para o desenvolvimento do micélio sobre o resíduo foi maior do que em vinhaça. A utilização das enzimas produzidas em resíduo sólido, bagaço ou SMS pode ser de duas maneiras, ou com extração das enzimas com água ou o próprio substrato com a vantagem de valer-se, também, da ação adsortiva de seus componentes.

O crescimento dos fungos em bagaço de cana foi a metodologia que propiciou uma maior atividade da enzima lacase (14 UI mL^{-1}), porém o tempo de crescimento do micélio sobre o resíduo foi maior do que em vinhaça. A SSF necessita de uma metodologia para extração das enzimas, o que não ocorre em SmF, porém esta tem a vantagem de valer-se, também, da ação adsortiva de seus componentes.

A SmF parece ser mais aplicável em larga escala, uma vez que esta pode ser empregadas em reatores (inclusive do tipo MBBR) e as enzimas estão prontamente disponíveis no caldo. Essa tecnologia, por outro lado, é mais dispendiosa, em termos energéticos e de gasto de água, do que a SSF, sendo assim, a melhor metodologia dependerá das características do problema a ser resolvido.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR FILHO, J.M.M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. 2008. 79 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- AGUIAR FILHO, J.M.M.; FERREIRA, L.F.R.; MONTEIRO, R.T.R. Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. **Brazilian archives of Biology and technology**, Curitiba, v. 53, n. 5, p. 1245-1254, 2010.
- AHLAWAT, O.P.; SINGH, R. Spent substrate from mushroom industry, a potential dye decolorizing agent. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MUSHROOM BIOLOGY AND MUSHROOM PRODUCTS, 7., 2001, Arcachon. **Proceedings...** p. 361-371.
- AHN, M-Y.; DEC, J.; KIM, J-E.; BOLLAG, J-M. Treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 31, p. 1509–1515, 2002.
- ALI, H. Biodegradation of synthetic dyes: a review. **Water Air Soil Pollution**, Dordrecht, v. 213, n. 1/4, p. 251–273, 2010.
- ALVES, O.L. **Espectroscopia infravermelho com transformadas de Fourier**: feliz combinação de velhos conhecimentos de óptica, matemática e informática. Disponível em: <http://lqes.iqm.unicamp.br/images/vivencia_lqes_meptec_espec_iv.pdf>. Acesso em: 07 out. 2014.
- AMARAL, W.A.N.; MARINHO, J.P.; TARASANTCHI, R.; BEBER, A.; GIULIANI, E. Environmental sustainability of sugarcane ethanol in Brazil. In: ZUUBIER, P.; VOOREN, J. V. (Ed.). **Sugarcane ethanol**: contributions to climate change mitigation and the environment. Wageningen: Wageningen Academic Publ., 2008. p. 124-129.
- ARAGÃO, M.A.; ARAÚJO, R.P.A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática**: princípios e aplicações. São Carlos: Ed. Rima, 2006. p. 120-124, 142.
- ARORA, D.S.; GILL, P.K. Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. **Bioresource Technology**, Barking, v. 73, p. 283-285, 2000.
- ASGHER, M.; BHATTI, H.N.; ASHRAF, M.; LEGGE, R. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 19, n. 6, p. 771–783, 2008.
- ASPLAND, J.R. Vat dyes and their application. **Textile Chemist and Colorist**, Research Triangle Park, v. 24, n. 1, p. 22-24, 1992.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO. Perfil do setor têxtil e de confecção em 2013. In: _____. **Tex Brasil**: sobre o setor. Disponível em: <<http://www.texbrasil.com.br/texbrasil/SobreSetor.aspx?tipo=15&pag=1&nav=0&tela=SobreSetor>>. Acesso em: 15 set. 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com *Daphnia spp.* (Cladocera, crustácea). Rio de Janeiro, 2004. 16 p.

BALL, A.S.; JACKSON, A.M. The recovery of lignocellulose-degrading enzymes from spent mushroom compost. **Bioresource Technology**, Barking, v. 54, n. 3, p. 311-314, 1995.

BAPTISTA, N.M.; SANTOS, A.C.; ARRUDA, F.V.F.; GUSMÃO, N.B. Produção das enzimas lignina peroxidase e lacase por fungos filamentosos. **Scientia Plena**, Aracaju, v. 8, n.1, p. 1-7, 2012.

BARR, D.P.; AUST, S.D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 28, n. 2, p. 78-87, 1994.

BETTIN, F.; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T.A.; SILVEIRA, M.M.; DILLON, A.J.P. Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v. 36, n. 1, p. 1–9, 2009.

BETTIN, F.; ROSA, L.O.; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T.A.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M.M.; DILLON, A.J. Growth kinetics, production, and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. **Process Biochemistry**, Barking, v. 46, p. 758–764, 2011.

BLAISE, C.; KUSUI, T. Acute toxicity assessment of industrial effluents with a microplate-based *Hydra attenuata* assay. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 12, n. 1, p. 53–60, 1997.

CAMERON, M.D.; TIMOFEEVSKI, S.; AUST, S.D. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant composts and xenobiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 54, p. 751-758, 2000.

CAMPOS, A.D.; SILVEIRA, A.M. L. **Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas**. Pelotas: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003. 3 p. (Comunicado Técnico 87).

CAÑAS, A.I.; CAMARERO, S. Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 694–705, 2010.

CASTRO, A.L.A.; PAIVA, P C.A.; BANIS, V.L.; SOUZA DIAS, E; SANTOS, J. Avaliação da produção de *Pleurotus sajor-caju* (FR.) singer utilizando resíduo do beneficiamento têxtil do algodão como substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1286-1290, 2007.

CHIACCHIERINI, E.; RESTUCCIA, D., VINCI, G. Bioremediation of food industry effluents: recent applications of free and immobilised polyphenoloxidases. **Food Science and Technology International**, New York, v. 10, n. 6, p. 373-382, 2004.

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 58, n. 5, p. 582–594, 2002.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Contexto econômico, social e ambiental do setor sucroalcooleiro no Estado de São Paulo**. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/tecnologia-ambiental/cas-em-atividade/56-camara-ambiental-do-setor-sucroalcooleiro>>. Acesso em: 18 set. 2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Perfil do setor do açúcar e do álcool no Brasil**. 2011. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_10_02_11_28_41_perfil_sucro_2012.pdf>. Acesso em: 30 set. 2014.

CONFORTIN, F.G.; MARCHETTO, R.; BETTIN, F.; CAMASSOLA, M.; SALVADOR, M.; DILLON, A.J.P. Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v. 35, n. 10, p. 1149–1155, 2008.

DELLAMATRICE, P.M. **Biodegradação e toxicidade de efluentes têxteis e efluentes da estação de tratamento de águas residuárias de Americana, SP**. 2005. 137 p. Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

DENIZLI, A.; CIHANGIR, N.; TÜZMEN, N.; ALSANCAK, G. Removal of chlorophenols from aquatic systems using the dried and dead fungus *Pleurotus sajor-caju*. **Bioresource Technology**, Barking, v. 96, n. 1, p. 59–62, 2005.

DIWANIYAN, S.; KHARB, D.; RAGHUKUMAR, C.; KUHAD, R.C. Decolorization of synthetic dyes and textile effluents by basidiomycetous fungi. **Water Air Soil Pollut**, Dordrecht, v. 210, p. 409–419, 2010.

DOBLE, M.; KUMAR, A. Degradation of dyes. In: _____. **Biotreatment of industrial effluents**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2005a. p. 111-122.

_____. Textile effluent. In: _____. **Biotreatment of industrial effluents**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2005b. p. 123-132.

DOMINGUES, D.F.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. . In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: Ed. Rima, 2006. p. 155-156, 165-170.

DURÁN, N. Enzimas ligninolíticas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. p. 253.

EIRA, A.F. Fungos comestíveis. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. p. 380-381, 398-404, 419-420.

FARACO, V.; PEZZELLA, C.; MIELE, A.; GIARDINA, P.; SANNIA, G. Bio-remediation of colored industrial wastewaters by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and their enzymes. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 20, n. 2, p. 209-220, 2009.

FERRAZ, A.L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. p. 216, 228-231.

FERREIRA, L.F.R. **Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungo**. 2009. 135 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FERREIRA, L.F.R.; AGUIAR, M.M.; POMPEU, G.B.; MESSIAS, T.G.; MONTEIRO, R.T. Selection of vinasse degrading microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 26, p. 1613–1621, 2010.

FERREIRA, L.F.R.; AGUIAR, M.M.; MESSIAS, T.G.; POMPEU, G.B.; LOPES, A.M.Q.; SILVA, D.P.; MONTEIRO, R.T. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicological and Environmental Safety**, New York, v. 74, p. 132-137, 2011.

FISCHER, G.; TEIXEIRA, E. HIZSNYIK, E.T.; VELTHUIZEN, H.V. Land use dynamics and sugarcane production. In: ZUURBIER, P.; VOOREN, J.V. (Ed.). **Sugarcane ethanol: contributions to climate change mitigation and the environment**. Wageningen: Wageningen Academic, 2008. p. 29-45.

FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A.B. Características dos principais resíduos resultantes da fabricação do açúcar e do álcool. In: _____. (Org.). **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Guaíba: Ed. Agropecuária, 2000a. p. 28-37.

_____. Formas de disposição da vinhaça de cana-de-açúcar. In: _____. (Org.). **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Guaíba: Ed. Agropecuária, 2000b. p. 39-46.

_____. A vinhaça e seu efeito sobre o solo. In: _____. (Org.). **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Guaíba: Ed. Agropecuária, 2000c. p. 47-60.

_____. Biodigestão anaeróbia da vinhaça *in natura*. In: _____. (Org.). **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Guaíba: Ed. Agropecuária, 2000d. p. 155-178.

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

FUESS, L.T.; GARCIA, M.L. Implications of stillage land disposal: a critical review on the impacts of fertigation. **Journal of Environmental Management**, London, v. 145, p. 210-229, 2014.

GAO, D.; DU, L.; YANG, J.; WU, WEI-MIN, LIANG, H. A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. **Critical Reviews in Biotechnology**, London, v. 30, n. 1, p.70–77, 2010.

GASPAROTTO, F.A. **Avaliação ecotoxicológica e microbiológica da água de nascentes urbanas no município de Piracicaba - SP**. 2011. 90 p. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

GASSARA, F.; SATINDER, K.; BRAR, S.K.; TYAGI, R.D.; VERMA, M.; SURAMPALLI, R.Y. Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 49, p. 388–394, 2010.

GIARDINA, P.; FARACO, V.; PEZZELLA, C.; PISCITELLI, A.; VANHULLE, S.; SANNIA, G. Laccases: a never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 67, n. 3, p. 369–385, 2010.

GOES, T.; MARRA, R.; SILVA, G.S. Setor sucroalcooleiro no Brasil: situação atual e perspectivas. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, ano 17, n. 2, p. 39-51, 2008.

GONZALEZ, J.C.; MEDINA, S.C.; RODRIGUEZ, A.; OSMA, J.F.; ALMÉCIGA-DÍAZ, C.J.; SÁNCHEZ, O.F. Production of *Trametes pubescens* Laccase under submerged and semi-solid culture conditions on agro-industrial wastes. **Plos one**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. 1-14, 2013.

GOWTHAMAN, M.K.; KRISHNA, C.; MOO-YOUNG, M. Fungal solid state fermentation: an overview. **Applied Mycology and Biotechnology**, Amsterdam, v. 1, p. 305-352, 2001.

GRIFFITHS, P.R. Fourier transform infrared spectrometry. **Science**, New York, v. 222, p. 297-302, 1983.

GUIMARÃES, C.; MATOS, C.; AZEREDO, J.; MOTA, M.; OLIVEIRA, R. The importance of the morphology and hydrophobicity of different carriers on the immobilization and sugar refinery effluent degradation activity of *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 24, n. 10, p. 795–800, 2002.

GUSMÃO, K.A.G.; GURGEL, L.V.A.; MELO, T.M.S.; GIL, L.F. Adsorption studies of methylene blue and gentian violet on sugarcane bagasse modified with EDTA dianhydride (EDTAD) in aqueous solutions: kinetic and equilibrium aspects. **Journal of Environmental Management**, London, v. 118, p. 135-143, 2013.

HAMID, M.; REHMAN, K. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry**, Barking, v. 115, p. 1177–1186, 2009.

HARDING, M.W.; MARQUES, L.L.R.; HOWARD, R.J. OLSON, M.E. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 17, n. 11, p. 475-480, 2009.

HUSAIN, Q. Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, London, v. 26, p. 201–221, 2006.

JURADO, M.; MARTINEZ, A.T.; MARTINEZ, M.J.; SAPARRAT, M.C.N. Application of white-rot fungi in transformation, detoxification, or revalorization of agriculture wastes: role of laccase in the processes. **Comprehensive Biotechnology**, Amsterdam, v. 6, p. 595-603, 2011. Disponível em

<http://www.cib.csic.es/repositorio_bd/publicacion/3120/urls_enlace/2011-Jurado-ComprehenBiotechnol-6-595.pdf>. Acesso em: 07 out. 2014.

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

KARNITZ, O.J.; GURGEL, L.V.A.; DE FREITAS, R.P.; GIL, L.F. Adsorption of Cu(II), Cd(II), and Pb(II) from aqueous single metal solutions by mercerized cellulose and mercerized sugarcane bagasse chemically modified with EDTA dianhydride (EDTAD). **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 77, n. 3, p. 643-650, 2009.

KARP, S.G.F.; FARACO, V.; AMORE, A.; BIROLO, L.; GIANGRANDE, C.; SOCCOL, V.T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, Barking, v. 114, p. 735-739, 2012.

KUMAR, V.; WAITI, L.; NIGAM, P.; BANAT, I.M.; YADAV, B.S.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Decolorization and biodegradation of anaerobically digested sugarcane molasses spent wash effluent from biomethanation plants by white-rot fungi. **Process Biochemistry**, Barking, v. 33, n. 1, p. 83-88, 1998.

KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; GOLD, M.H.; MORGAN, M.A. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 169, n. 2, p. 247-250, 1984.

LAIME, E.M.O.; FERNANDES, P.D.; OLIVEIRA, D.C.S.; FREIRE, E.A. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 5, n. 3, p. 16-29, 2011.

LAU, K.L.; TSANG, Y.Y.; CHIU, S.W. Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples. **Chemosphere**, Oxford, v. 52, p. 1539–1546, 2003.

LETTERA, V.; VECCHIO, C.D.; PISCITELLI, A.; SANNIA, G. Low impact strategies to improve ligninolytic enzyme production in filamentous fungi: the case of laccase in *Pleurotus ostreatus*. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, n. 334, p. 781-788, 2011.

MARQUES, M.O. Aspectos técnicos e legais da produção, transporte e aplicação de vinhaça. In SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J.C.M (Org.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livrocere, 2006. p. 369-375.

MÁRQUEZ-ROCHA, F.J.; GUILLÉN-NAVARRO, G.K.; VASQUEZ, J.E.S.; VÁZQUEZ-DUHALT, R. Growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* in bioreactors. **Biotechnology Techniques**, Dordrecht, v. 13, n. 1, p. 29–32, 1999.

MARTINS, C.L. **Comportamento de reator de leito fluidizado trifásico aeróbio utilizando diferentes materiais suporte**. 2003. 175 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

MCKEE, J.R.; ZANGER, M. A microscale synthesis of indigo – vat dyeing. **Journal of Chemical Education**, Easton, v. 68, p. 242-244, 1991.

MESSIAS, T.G. **Influência da toxicidade de água e do sedimento dos rios São Joaquim e Ribeirão Claro na bacia do Corumbataí**. 2008. 126 p. Dissertação (Mestrado em Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. 6th ed. New York: John Wiley, 2005.

MOORE, D.; ROBSON, G.; TRINCI, A.P.J. Fungi in ecosystems. In: _____. (Org.). **21st century guidebook to fungi**. New York: Cambridge University Press, 2011. p. 238-245.

MORIYA, T.; MÓDENA, J.L.P. Assepsia e antissepsia: técnicas de esterilização. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 41, n. 3, p. 265-273, 2008.

MOZETO, A.A.; ZAGATTO, P.A. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: Ed. Rima, 2006. p. 29.

NAKAYAMA, T.; AMACHI, T. Fungal peroxidase: its structure, function, and application. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 6, p. 185–198, 1999.

NOUAILHETAS, Y. Radiações Ionizantes e a vida. In: COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR. **Apostila educativa**. Disponível em <http://www.cnen.gov.br/ensino/apostilas/rad_ion.pdf>. Acesso em: 30 set. 2014.

PANDARD, P.; DEVILLERS, J.; CHARISSOU, A.M.; POULSEN, V.; JOURDAIN, M.J.; FÉRARD, J.F.; GRAND, C.; BISPO, A. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 363, n. 1/3, p. 114-125, 2006.

PAPINUTTI, L.; FORCHIASSIN, F. Adsorption and decolorization of dyes using solid residues from *Pleurotus ostreatus* mushroom production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Dordrecht, v. 15, n. 6, p.1102-110, 2010.

PARK, H.O.; OH, S.; BADE, R.; SHIN, W.S. Application of fungal moving-bed biofilm reactors (MBBRs) and chemical coagulation for dyeing wastewater treatment. **KSCE Journal of Civil Engineering**, Dordrecht, v. 15, n. 3, p. 453-461, 2011.

PARNAUDEAU, V.; CONDOM, N.; OLIVER, R.; CASEVIEILLE, P.; RECOUS, S. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. **Bioresource Technology**, Barking, v. 99, p. 1553-1562, 2008.

PASCHOAL, F.M.M.; TREMILIOSI-FILHO, G. Aplicação da tecnologia de eletrofloculação na recuperação do corante índigo blue a partir de efluentes industriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 766-772, 2005.

PASSOS, T.M. **Biodegradação de filmes de Polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHBV), Polietileno de baixa densidade (PEBD) e Blenda de PEBD/PHBV (70/30) com fungos específicos**. 2013. 53 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2013.

PAULINO, J.; ZOLIN, C.A.; BERTONHA, A.; FREITAS, P.S.L.; FOLEGATTI, M.V. Estudo exploratório do uso da vinhaça ao longo do tempo. II. Características da cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 3, p. 244–249, 2011.

PEREIRA, F.V.; GURGEL, L.V.A.; DE AQUINO, S.F.; GIL, L.F. Removal of Zn (2+) from electroplating wastewater using modified wood sawdust and sugarcane bagasse. **Journal of Environmental Engineering**, Reston, v. 135, n. 5, p. 341-350, 2009.

PHAN, C-W.; SARABATNAM, V. Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 96, n. 4, p. 863–873, 2012.

PISCITELLI, A.; DEL VECCHIO, C.; FARACO, V.; GIARDINA, P.; MACELLARO, G.; MIELE, A.; PEZZELLA, C.; SANNIA, G. Fungal laccases: versatile tools for lignocellulose transformation. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 334, n. 11, p.789–794, 2011.

POMPEU, G.B. **Comportamento enzimático de quatro fungos ligninolíticos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar e expostos a duas concentrações de nitrogênio, visando à produção de etanol**. 2010. 96 p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PRASAD, K.K.; MOHAN, S.V.; BHASKAR, Y.V.; RAMANAIAH, S.V.; BABU, V.L.; PATI, B.R.; SARMA, P.N. Laccase production using *Pleurotus ostreatus* 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: influence of culture conditions. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 43, n. 3 p. 301-307, 2005.

QUINN, B.; GAGNÉ, F.; BLAISE, C. *Hydra*, a model system for environmental studies. **International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, v. 56, p. 613-625, 2012.

RAMSEY, J.; NGUYEN, T. Decoloration of textile dyes by *Trametes versicolor* and its effect on dye toxicity. **Biotechnology Letters**, Amsterdam, v. 24, p. 1757–1761, 2002.

REZENDE, J.O. O risco da poluição do ar e da água pela vinhaça. In: _____. **Vinhaça: outra grande ameaça ao meio ambiente**. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia, 1984a. p. 75-82.

_____. O risco da poluição do solo pela vinhaça. In: _____. **Vinhaça: outra grande ameaça ao meio ambiente**. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia, 1984b. p. 57-66.

RIBAS, M.M.F. **Tratamento de vinhaça em um reator anaeróbio operado em batelada sequencial contendo biomassa imobilizada sob condições termofílicas e mesofílicas.** 2006. 198 p. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

RODRIGUES, K.A. **Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenóis de água residuária sintética.** 2006. 145 p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

RODRIGUES, K. Aplicação de fungos em reatores para o tratamento de efluentes industriais. In: RODRIGUES, K.; MARINHO, G. **Fungos e águas residuárias industriais.** Recife: Ed. Imprima, 2012. p. 13-29.

RODRÍGUEZ, S.; FERNÁNDEZ, M.; BERMÚDEZ, R.C.; MORRIS, H. Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus spp.* **Revista Iberoamericana de Micología,** Madrid, v. 20, p. 164-168, 2003.

RODRIGUEZ, E.; NUERO, O.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, A.T.; MARTÍNEZ, M.J. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. **Soil Biology & Biochemistry,** Oxford, v. 36, n. 6, p. 909–916, 2004.

ROESSLER, A.; JIN, X. State of the art technologies and new electrochemical methods for the reduction of vat dyes. **Dyes and Pigments,** London, v. 59, p. 223–235, 2003.

ROSSETO, R.; SANTIAGO, A.D. **Adubação:** resíduos alternativos. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_39_711200516717.html>. Acesso em: 30 set. 2014.

SAMPEDRO, I.; CAJTHAML, T.; MARINARI, S.; STAZI, S.R.; GREGO, S.; MAURIZIO, P.; FEDERICI, F.; D'ANNIBALE, A. Immobilized inocula of white-rot fungi accelerate both detoxification and organic matter transformation in two-phase dry olive-mill residue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington, v. 57, n. 12, p. 5452–5460, 2009.

SANGHI, R.; VERMA, P. Decolorisation of aqueous dye solutions by low-cost adsorbents: a review. **Coloration Technology,** Bradford, v. 129, p. 85–108, 2013.

SANTOS, M.A.P.F. **Avaliação da qualidade da água e sedimento da sub-bacia do rio Corumbataí (SP) por meio de testes ecotoxicológicos.** 2008. 186 p. Tese (Doutorado em Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SARTORI, S.B. **Atividade enzimática e valores nutricionais de *Pleurotus spp.* cultivados em vinhaça.** 2011. 180 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SAS INSTITUTE. **SAS software:** version 9.2. Cary, 2013.

SEN, R.; CHAKRABARTI, S. Biotechnology: applications to environmental remediation in resource exploitation. **Current Science,** Bagalore, v. 97, n. 6, p. 768-775, 2009.

SHIMOKAWA, T.; NAKAMURA, M.; NAGASAWA, N.; TAMADA, M.; ISHIHARA, M. Effect of gamma-ray irradiation on enzymatic hydrolysis of spent corncob substrates from edible mushroom, enokitake (*Flammulina velutipes*) cultivation. **Bulletin of FFPRI**, Tsukuba, v.6, n.1, p. 27-34, 2007.

SINGH, A.D.; ABDULLAH, N.; VIKINESWARY, S. Optimization of extraction of bulk enzymes from spent mushroom compost. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 78, p. 743–752, 2003.

SINGH, A.D.; VIKINESWARY, S.; ABDULLAH, N.; SEKARAN, M. Enzymes from spent mushroom substrate of *Pleurotus sajor-caju* for the decolourisation and detoxification of textile dyes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 27, n. 3, p. 535-545, 2011.

SINGH, R.; AHLAWAT, O.P.; RAJOR, A. Identification of the potential of microbial combinations obtained from spent mushroom cultivation substrates for use in textile effluent decolorization. **Bioresource Technology**, Barking, v. 125, p. 217-225, 2012.

SILVA, G.A. **Avaliação das tecnologias de disposição de vinhaça quanto ao aspecto de desenvolvimento ambiental e econômico**. 2012. 208 p. Tese (Doutorado em Técnica de Fluidos) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

SOUZA, G. **Produção, extração e estabilidade de enzimas ligninolíticas para uso em degradação de compostos poluentes**. 2012. 111p. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

SPINA, F.; ROMAGNOLO, A.; ANASTASI, A.; TIGINI, V.; PRIGIONE, V.; VARESE, G. C. Selection of strains and carriers to combine fungi and activated sludge in wastewater bioremediation. **Environmental Engineering and Management Journal**, Iasi, v. 11, n. 10, p. 1789-1796, 2012.

SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R. K.; SINSABAUGH, R. L.; LINKINS, A. E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, New York, v. 81, p. 234-240, 1989.

TÉLLEZ-TÉLLES, M.; FERNANDÉZ, A. M.; SÁNCHEZ, C.; DÍAZ-GODÍNEZ. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 81, p. 675-679, 2008.

TROTTIER, S.; BLAISE, C.; KUSUI, T.; JOHNSON, E.M. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 12, p. 265-271, 1997.

TSAI, D. **Aplicação da radiação por feixe de elétrons como agente esterilizante de microrganismos em substrato turfoso**. 2006. 119 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear – Aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE ACÚCAR. **Produção e uso do etanol combustível no Brasil**: respostas às questões mais frequentes. 2007. Disponível em <http://www.ambiente.sp.gov.br/wp-content/uploads/publicacoes/etanol/producao_etanol_unica.pdf>. Acesso em: 27 set. 2014.

VIDALI, M. Bioremediation: an overview. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1163-1172, 2001.

VINIEGRA-GONZÁLES, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C.N.; RÓMERO-GOMEZ, S.J.; DÍAS-GODINEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 1/2, p. 157-167, 2003.

WANDERLEY, C.R.P.; ARAÚJO, R.S.; RODRIGUES, K.; MARINHO, G.; MOTA, S. Influência do tipo de inóculo (disperso e imobilizado) no tratamento de água residuária têxtil. In: RODRIGUES, K.; MARINHO, G. (Org.). **Fungos e águas residuárias industriais**. Recife: Ed. Imprima, 2012, p. 112-127.

WASSER, S.P.; WEIS, A.L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Critical Reviews in Immunology**, Boca Raton, v. 19, n. 1, p. 65-96, 1999.

WOLFF, D.B.; PAUL, E.; COSTA, R.H.R. Influência do tipo de material suporte no desempenho de reatores biológicos de leito móvel na remoção de carbono e nitrificação de esgoto sanitário. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 2, p.149-154, 2010.

XING, Y., DENG, D.H. Enhanced adsorption of malachite green by EDTAD modified sugarcane bagasse. **Separation Science and Technology**, New York, v. 44, n. 9, p. 2117-2131, 2009.

YAN, T.; WANG, L. Adsorptive removal of methylene blue from aqueous solutions by spent mushroom substrate: equilibrium, kinetics, and thermodynamics. **Bioresources**, Guangzhou, v. 8, n. 3, p. 4722-4734.

ZAGATTO, P.A. Ecotoxicologia. In ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática**: princípios e aplicações. São Carlos: Ed. Rima, 2006. p. 3, 7.

ZAHARIA, C.; SUTEU, D. Textile organic dyes: characteristics, polluting effects and separation/elimination procedures from industrial effluents; a critical overview. In: PUZYN, T.; MOSTRAG-SZLICHTYNG, A. (Ed.). **Organic pollutants ten years after the stockholm convention**: environmental and analytical update. Rijeka: InTech. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/organic-pollutants-ten-years-after-the-stockholm-convention-environmental-and-analytical-update/textile-organic-dyes-characteristics-polluting-effects-and-separation-elimination-procedures-from-in>>. Acesso em: 03 set. 2014.

ZHOU, Q.; GONG, W.; XIE, C.; YUAN, X.; LI, Y.; BAI, C.; CHEN, S.; XU, N. Biosorption of Methylene Blue from aqueous solution on spent cottonseed hull substrate for *Pleurotus ostreatus* cultivation. **Desalination and Water Treatment**, Hopkinton, v. 29, p. 502-506, 2012.

ANEXOS

Anexo A – Comparação das taxas de descoloração da vinhaça entre os ensaios de seis e 12 dias

Amostra	Descoloração (%)	
	6 dias	12 dias
P. sajor-caju livre	65,90±5,666A	88,70±1,875A
P. sajor-caju aderido	67,33±3,555A	87,84±6,045A
P. ostreatus livre	17,837±2,106A	75,01±1,167A
P. ostreatus aderido	44,23±3,163B	40,17±2,948A

Comparações entre espécies e componentes são mostradas pelas letras à direita, em linha. Médias com nenhuma letra em comum diferem pelo teste de Duncan, $p < 0,1$)

Anexo B – Resumo das atividades enzimáticas (lacase, peroxidase e MnP) dos trabalhos previamente realizados no Laboratório de Ecologia Aplicada com *Pleurotus spp.* crescidos em bagaço e vinhaça

Referência	Fungo	Enzima	Tratamento	Dia do pico	Atividade (UI g ⁻¹)
Aguiar-Filho (2008)	<i>P. sajor-caju</i>	Lacase	Bagaço pré-tratado e vinhaça	6	10,53
		Peroxidase	Bagaço pré-tratado e vinhaça	6	7*
		MnP	Bagaço pré-tratado e vinhaça	12	17,93
	<i>P. ostreatus</i>	Lacase	Bagaço pré-tratado e vinhaça	12-24	298,46-325,23
		Peroxidase	Bagaço pré-tratado e vinhaça	15	19,84
		MnP	Bagaço pré-tratado e vinhaça	21	27,59
Pompeu (2010)	<i>P. sajor-caju</i>	Lacase	Extrato lev. 0,5%	13	1113,3
			Extrato lev. 1%	12	3032,7
		Peroxidase	Extrato lev. 0,5%	12	1113,3
			Extrato lev. 1%	12	2663,6
		MnP	Extrato lev. 0,5%	8	47,1
			Extrato lev. 1%	10	25,4
Souza (2012)	<i>P. sajor-caju</i>	Lacase	Bagaço + vinhaça	6	41,44
		Peroxidase	Bagaço + vinhaça	6	18,48
		MnP	Bagaço + vinhaça	12	69,5
	<i>P. ostreatus</i>	Lacase	Bagaço + vinhaça	21	4,49
		Peroxidase	Bagaço + vinhaça	30	10,03
		MnP	Bagaço + vinhaça	3	<10*

* = valores aproximados

Anexo C – Atividades as enzimas lacase, peroxidase e MnP no SMS de *P. ostreatus* (SMS 1 e 2) cultivado por 90 dias, nas proporções de 0,1 e 0,033 g de SMS mL⁻¹ de extrator

Substrato	Extração	Atividade enzimática (UI g ⁻¹ de SMS) por proporção de extrator					
		Lacase		Peroxidase		MnP	
SMS 1		0,1 g mL ⁻¹	0,033 g mL ⁻¹	0,1 g mL ⁻¹	0,033 g mL ⁻¹	0,1 g mL ⁻¹	0,033 g mL ⁻¹
	AD	1,995±0,587	0,749±0,363	0,183±0,293	0,561±0,516	0,299±0,342	0,000±0,000
	CF	0,043±0,074	0,009±0,016	0,168±0,148	370±0,424	0,573±0,225	0,623±0,243
	SR	0,000±0,000	0,097±0,169	0,000±0,000	0,000±0,000	0,498±0,547	0,511±0,473
SMS 2	AD	0,000±0,000	0,133±0,231	1,111±0,435	0,622±0,514	0,000±0,000	0,722±1,094
	CF	0,097±0,1671	0,016±0,028	0,404±0,610	0,663±0,854	0,299±0,194	0,336±0,306
	SR	0,097±0,167	0,144±0,126	0,000±0,000	0,000±0,000	0,498±0,270	0,797±0,417

AD = água destilada; CF = tampão citrato-fosfato (pH 5); SR = Sol. de Ringer

Anexo D - Descoloração do azul índigo (0,02%, pH 4,5) pelos SMS 1 e 2 em suas formas não irradiada e irradiada (comparação entre substratos)

Substrato	Volume de solução de azul índigo (mL)					
	10		20		60	
	Não irradiado	Irradiado	Não irradiado	Irradiado	Não irradiado	Irradiado
SMS 2	78,10A	78,63A	70,90A	69,67A	69,13A	26,53A
SMS 1	44,50B	33,57B	57,50A	42,23B	46,43B	17,10A

Comparações entre substratos são mostradas pelas letras à direita, em coluna. Médias com nenhuma letra em comum diferem pelo teste de Tukey, $p < 0,05$)