

LUDMILA ROSA BERGSTEN TORRALBA

|

ESTUDO DE FUNGOS DA COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE REFERÊNCIA DO
INCQS E DE FUNGOS ISOLADOS DE SEDIMENTOS DE IGARAPÉS EM MANAUS
(AM) COM CAPACIDADE DE DESCOLORIR E DETOXIFICAR CORANTES TÊXTEIS

PPGVS/INCQS

FIOCRUZ

2008

ESTUDO DE FUNGOS DA COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE REFERÊNCIA DO
INCQS E DE FUNGOS ISOLADOS DE SEDIMENTOS DE IGARAPÉS EM MANAUS
(AM) COM CAPACIDADE DE DESCOLORIR E DETOXIFICAR CORANTES TÊXTEIS

LUDMILA ROSA BERGSTEN TORRALBA

Mestrado Acadêmico

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Orientadora: Dr^a. Manuela da Silva

Rio de Janeiro

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Título: Estudo de fungos da Coleção de Microrganismos de Referência do INCQS e de fungos isolados de sedimentos de igarapés em Manaus (AM) com capacidade de descolorir e detoxificar corantes têxteis.

Ludmila Rosa Bergsten Torralba

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

Aprovada:

Prof^a. Dr^a. Verônica Viana Vieira
(INCQS/FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Cláudia Alessandra Aiub
(INCQS/FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Viridiana Santana Ferreira-Leitão
(Instituto de Tecnologia – INT)

Orientadora: _____
Prof^a. Dr^a. Manuela da Silva
(INCQS/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Bergsten-Torralba, Ludmila Rosa

Estudo de fungos da Coleção de Microrganismos de Referência do INCQS e de fungos isolados de sedimentos de igarapés em Manaus (AM) com capacidade de descolorir e detoxificar corantes têxteis./ Ludmila Rosa Bergsten Torralba. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008.

xxv, 106p., il., tab.

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

1. Fungos filamentosos. 2. Corantes têxteis. 3. Toxicidade. 4. Biodegradação. 4. Mutagenicidade.

“Study of fungi of the Collection Reference Microorganisms of INCQS and fungi isolated from sediments from igarapés in Manaus (AM) with the ability to decolorize and detoxified textile dyes”

Dedicatória

Aos meus pais, irmãos e marido,
que sempre me incentivaram,
em todos os momentos,
me fazendo ter esperanças.

A DEUS POR TUDO QUE É E REPRESENTA

Agradecimentos

Agradeço a todos que participaram no desenvolvimento deste trabalho, em especial:

À minha orientadora Dr^a. Manuela da Silva com quem aprendi tantas coisas e cresci profissionalmente. Obrigada pelo grande apoio, compreensão, apertos, correções e por ter acreditado no meu potencial;

Ao programa de pós-graduação do INCQS por ter contribuído na minha formação profissional e por acreditar na importância deste trabalho;

À Fundação de desenvolvimento científico e tecnológico em saúde (FIOTEC) pela bolsa auxílio concedida nos dois anos de curso;

Ao Departamento de Microbiologia do INCQS, em especial à Renata Trotta, Cláudia Souto, Suely Fracalanza, Paola Cardarelli, Érica Scheidegger, Eliana Duarte, Maria Esther e Carmen Lúcia que me apoiaram neste período e pelos momentos inesquecíveis que passei ao lado de cada um de forma especial;

À Ana Paula Alcides e Marília M. Nishikawa pelo apoio e pela contribuição para a melhoria textual desta dissertação;

À Will Robson, José Marcos, Eliete da Silva e Leonardo do Setor de Meios de cultura pelo apoio e preparo dos meios e soluções e ainda à Mônica, Jorge e Sineide do Setor de Esterilização pelo preparo de materiais.

Aos funcionários do Departamento de Química, Cláudia Maria, Sinea Mendes e Filipe Soares pela colaboração na realização das análises espectrofotométricas;

À Danielly M. de Paiva, do Departamento de Biologia - IOC pela amizade e auxílio na realização dos testes de toxicidade com microcrustáceo;

À Dr^a Helena Zamith do Setor de Ensaio Toxicológicos - DFT por ceder o espaço e conhecimento para realização do Ensaio Cometa;

À técnica Taline Conde pela amizade e pelo grande auxílio na realização do Ensaio Cometa;

À colega Virgínia por dispor cordialmente vários conhecimentos químicos no decorrer deste trabalho;

À Indústria Dystar por fornecer os corantes têxteis;

Ao grupo da Dr^a. Silvana Jacob pela coleta de sedimento da margem de igarapés em Manaus -AM;

À Dr^a. Cláudia Aiub pelo apoio e dicas para melhoria deste trabalho e por ter conseguido, na fase final deste trabalho, o contato para realização do Teste de Ames;

Ao Dr. Israel Felzenszwalb do Departamento de Biofísica na UERJ por ceder o espaço e material para a realização do Teste de Ames;

Aos amigos de turma Clarice, Thadeu, Priscilla, Aline Dias, Rafaela e Marcus Vinícius pela valiosa amizade e pelos momentos de descontração em meio a tantos estresses;

Ao funcionário e amigo Carlos Roberto pela ajuda nos momentos mais complicados e pelo grande carinho demonstrado por mim;

Ao Laboratório de Fungos de Referência, Msc. Marília M. Nishikawa e Miguel M. Fialho pelo apoio, amizade e pelo espaço cedido para realização deste trabalho;

Ao Aluno de graduação, Felipe, por ter me auxiliado na realização do Teste de Ames em fins de semana e por me acompanhar nas idas e vindas da UERJ para Fiocruz;

À Dr^a. Viridiana Leitão e sua aluna Michelly do Instituto Nacional de Tecnologia (INT) por ceder um dos corantes utilizados neste trabalho;

OBRIGADO A TODOS QUE PARTICIPARAM DESTA CONQUISTA!!!

Resumo

Os problemas associados à indústria têxtil provêm especialmente da utilização de corantes, visto que a maioria é recalcitrante e alguns apresentam caráter mutagênico e carcinogênico. Agências reguladoras relacionadas à saúde pública, incluindo a Vigilância Sanitária, devem atuar conjuntamente com outros segmentos voltados à saúde ambiental no intuito de reduzir ou eliminar os riscos provenientes deste setor. Deste modo vem sendo investigada a capacidade de fungos de descolorir e detoxificar diferentes tipos de corantes têxteis. Amostras de sedimentos de cinco igarapés na região de Manaus (AM) foram coletados com intuito de isolar fungos com capacidade de descolorir eficientemente os corantes Vermelho Reativo 198 (V198) e Azul Reativo 21 (A21). Os fungos isolados foram testados juntamente com fungos da Coleção de Microrganismos de Referência do INCQS, àqueles eficientes na descoloração foram avaliados na presença de outro corante, Azul Reativo 214 (A214) e da mistura dos 3 corantes (MXC). Os tratamentos foram avaliados toxicologicamente utilizando os ensaios ecotoxicológico com o microcrustáceo *Daphnia pulex*, de genotoxicidade com células sanguíneas (Ensaio Cometa) e de mutagenicidade com a bactéria *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames). Os isolados de Manaus não foram considerados eficientes na descoloração, pois adsorveram o corante, ao contrário dos fungos da Coleção do INCQS, *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211, e do fungo de referência *Lentinula edodes* INCQS 40220. Ambos apresentaram descoloração completa de V198, A21, A214 e MXC. *L. edodes* reduziu 93% da toxicidade de V198 e 95% de A21 no teste com as *daphnias* e 60% da genotoxicidade da mistura MXC, entretanto em outros experimentos avaliados pelos testes com as *daphnias* e bactérias (Teste de Ames) houve aumento da toxicidade. *P. simplicissimum* foi capaz de reduzir 87% da toxicidade do corante V198 e 94% de A21, mas aumentou a toxicidade de A214 e de MXC com as *daphnias*. Não foi detectada genotoxicidade nos tratamentos por este fungo, contudo com as bactérias todos os tratamentos foram citotóxicos e alguns também foram mutagênicos. Portanto, os fungos selecionados são eficientes na descoloração dos corantes, no entanto os resultados de toxicidade demonstram a grande importância e necessidade da realização ensaios toxicológicos associados aos estudos de descoloração para garantir menores riscos ao ambiente e à saúde da população.

Abstract

The problems associated with the textile industry are especially due to the use of dyes, since the majority is recalcitrant and some of them might be mutagenic and carcinogenic. Regulatory agencies related to public health, including the Health Surveillance, must act jointly with other segments regarding environmental health in order to reduce or eliminate the risks from this sector. Thus the ability of fungi to decolorize and reduce the toxicity of different types of textile dyes have been investigated. Sediment samples of five igarapés of Manaus region – (AM) were collected in order to isolate fungi able to efficiently decolorize Reactive Red 198 (V198) and Reactive Blue 21 (A21). The fungal isolates were tested simultaneously with fungi from the Reference Collection of Microorganisms of INCQS. The fungi that efficiently decolorized the dyes were evaluated in the presence of another dye, Reactive Blue 214 (A214), and a mixture of the 3 dyes (MXC). The treatments were toxicologically evaluated using ecotoxicological test with the microcrustacean *Daphnia pulex*, genotoxicity test with blood cells (SGE – Assay Comet) and mutagenicity test with the bacteria *Salmonella typhimurium* (Ames Test). None of the fungi isolated from Manaus was efficient on decolorization without adsorbing the dye, differently of the fungi from the Culture Collection, *Penicillium simplicissimum* (INCQS 40211) and *Lentinula edodes* (INCQS 40220). Both showed complete decolorization of V198, A21, A214 and MXC. *L. edodes* reduced 93% of the toxicity of V198 and 95% of A21 with *daphnia* test and 60% of the genotoxicity the mixture MXC, however in other experiments evaluated by tests with *daphnia* and bacteria (Ames Test) the toxicity increased. *P. simplicissimum* reduced 87% of the toxicity of V198 and 94% of A21, but increased the toxicity of A214 and MXC with the *daphnias*. Genotoxicity was not detected in the treatments by this fungus, however with the bacteria all the treatments were cytotoxic and some of them also were mutagenic. Therefore, the fungi selected were efficient on dye decolorization, nevertheless the toxicological results demonstrated the great importance and need of decolorization studies to be associated with toxicological tests to ensure risks reduced risks to the environment and the population health.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos corantes estudados: A – Vermelho Reativo 198; B –Azul Reativo 21; C – Azul Reativo 214.....	19
Figura 2. Esquema do processamento das amostras de sedimento de igarapés em Manaus – AM.....	23
Figura 3. Esquema do isolamento dos fungos de sedimento.....	24
Figura 4. Esquema de avaliação toxicológica utilizando o microcrustáceo <i>Daphnia pulex</i>	28
Figura 5. Esquema do ensaio de citotoxicidade e do Ensaio Cometa utilizando sangue periférico humano.....	29
Figura 6. Ensaio de viabilidade celular para o Ensaio Cometa: Visualização de lâmina através de microscópio de fluorescência, células viáveis (verde) e mortas (laranja).	30
Figura 7. Classes de dano ao DNA. A- classe 0 (sem dano); B – classe 1 (dano leve); C – classe 2 (dano moderado) e D – classe 3 (dano severo).....	30
Figura 8. Esquema do ensaio de mutagenicidade utilizando a bactéria <i>Salmonella typhimurium</i>	34
Figura 9. Esquema do ensaio de citotoxicidade utilizando a bactéria <i>Salmonella typhimurium</i>	35
Figura 10. Frascos de IDB incubados com corante V198 na concentração de 100 ppm, onde A é o controle e B é o tratamento, e de 200 ppm, onde C é o controle e D é o tratamento, após 7 dias de incubação	38
Figura 11. Frascos de IDB incubados com corante A21 na concentração de 100 ppm, onde A é o controle e B é o tratamento, e de 200 ppm, onde C é o controle e D é o tratamento, após 7 dias de incubação	38
Figura 12. Frascos de IDN incubados com corante V198 na concentração de 100 ppm, onde A é o controle e B é o tratamento, e de 200 ppm, onde C é o controle e D é o tratamento, após 7 dias de incubação	38
Figura 13. Frascos de IDN incubados com corante A21 na concentração de 100 ppm, onde A é o controle e B é o tratamento, e de 200 ppm, onde C é o controle e D é o tratamento, após 7 dias de incubação	39
Figura 14. Frascos de IR incubados com corante V198 na concentração de 100 ppm, onde A é o controle e B é o tratamento, e de 200 ppm, onde C é o controle e D é o tratamento, após 7 dias de incubação.....	39

Figura 15. Frascos de IR incubados com corante A21 na concentração de 100 ppm, onde A é o controle e B é o tratamento, e de 200 ppm, onde C é o controle e D é o tratamento, após 7 dias de incubação.	39
Figura 16. Características macroscópicas apresentadas por <i>A. japonicus</i> (DKNA1) nos meios de cultura: A – MEA; B – CYA25; C – CYA37; D – CY20S e E – CZ.....	42
Figura 17. Características microscópicas apresentadas por <i>A. japonicus</i> (DKNA1): A – detalhe da vesícula, das fiálides e dos conídios; B – estipes e cabeças conidiais.	42
Figura 18. Características microscópicas apresentadas por <i>Acremonium</i> sp. A – anastomose entre hifas hialinas, B – detalhe dos esporos cilíndricos e alongados, C – detalhe dos esporos globosos agrupados em forma de flor nas extremidades das fiálides e D – micélio ramificado e hialino	43
Figura 19. Características apresentadas por <i>Fusarium</i> sp. (A) Característica macroscópica em PDA + V198 e (B) Característica microscópica com detalhe de microconídios.....	44
Figura 20. A – Frasco do controle corante V198 (100 ppm); B – Frasco do tratamento com <i>A. japonicus</i> DKNA1 após 28 dias de incubação	46
Figura 21. Espectros de absorvância de <i>Fusarium</i> sp. RV1 na presença do corante V198. A) Pico característico de 520 nm no tempo 0; B) desaparecimento do pico característico em 19 dias; C) Novo pico de 476nm em 28 dias de incubação com <i>Fusarium</i> sp RV1	49
Figura 22. Gráfico do percentual de descoloração dos corantes V198 e A21 por <i>L. edodes</i> INCQS 40220 em 28 dias de incubação.....	50
Figura 23. 1 – Frascos antes da filtração; 2 - Frascos filtrados em membrana 0,22 µm. A – Controle corante A21 (100 ppm); B – Frasco do tratamento com <i>A. japonicus</i> DKNA1 após 28 dias.....	53
Figura 24. Frascos contendo o corante V198 tratados por <i>P. simplicissimum</i> INCQS 40211. A – 2 dias; B - 5 dias; C – 7 dias e D – 14 dias de incubação.....	58
Figura 25. Frascos contendo o corante A21 tratados por <i>P. simplicissimum</i> INCQS 40211. A – 2 dias; B - 5 dias; C – 7 dias e D – 14 dias de incubação.....	58
Figura 26. Frascos contendo o corante A214 tratados por <i>P. simplicissimum</i> INCQS 40211. A – 2 dias; B - 5 dias; C – 7 dias e D – 14 dias de incubação.....	58
Figura 27. Frascos contendo a mistura dos corantes MXC tratados por <i>P. simplicissimum</i> INCQS 40211. A – 2 dias; B - 5 dias; C – 7 dias e D – 14 dias de incubação.....	58
Figura 28. Frascos contendo o corante V198 tratados por <i>L. edodes</i> . A – controle V198; B – 2 dias; C- 5 dias; D – 7 dias e E – 14 dias de incubação	60

Figura 29. Frascos contendo o corante A21 tratados por <i>L. edodes</i> . A – controle A21; B – 2 dias; C- 5 dias; D – 7 dias e E – 14 dias de incubação	60
Figura 30. Frascos contendo o corante A214 tratados por <i>L. edodes</i> . A – controle A214; B – 2 dias; C- 5 dias; D – 7 dias e E – 14 dias de incubação	60
Figura 31. Frascos contendo a mistura dos corantes MXC tratados por <i>L. edodes</i> . A – controle MXC; B – 2 dias; C- 5 dias; D – 7 dias e E – 14 dias de incubação	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Princípios dos ensaios toxicológicos realizados no estudo	26
Quadro 2. Relação de linhagens utilizadas no teste de mutagenicidade e suas características genotípicas.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações referentes aos corantes utilizados	20
Tabela 2. Dados e características físico-químicas referentes aos pontos de coleta da região de Manaus	23
Tabela 3. Percentual de descoloração das amostras de sedimento de igarapés da Região de Manaus - AM	40
Tabela 4. Identificação dos isolados de sedimento de igarapés em Manaus – AM.....	41
Tabela 5. Percentual de descoloração dos fungos testados somente na presença do corante V198 por 28 dias de incubação.....	50
Tabela 6. Percentual de descoloração dos fungos testados somente na presença do corante A21 por 28 dias de incubação.....	53
Tabela 7. Resumo do percentual de descoloração dos fungos testados em 28 dias de incubação.....	54
Tabela 8. Percentual de descoloração dos corantes V198, A21, A214 e MXC por <i>L. edodes</i> INCQS 40220 e <i>P. simplicissimum</i> INCQS 40211 em 14 dias de incubação.....	55
Tabela 9. Resultados do ensaio toxicológico com microcrustáceo <i>Daphina pulex</i> dos isolados que apresentaram melhor percentual de descoloração dos corantes V198 e A21 após 28 dias de incubação	63
Tabela 10. Resultados do ensaio toxicológico com microcrustáceo <i>Daphina pulex</i> dos fungos selecionados testados em V198, A21, A214 e na mistura, MXC após 14 dias de incubação.....	66
Tabela 11. Relação dos grupos de controle comparados com as respectivas amostras testadas após a realização do Ensaio Cometa utilizando células sanguíneas.....	68
Tabela 12. Resultados do Ensaio Cometa e do ensaio de citotoxicidade em células sanguíneas humana	70
Tabela 13. Relação dos grupos controle comparados com as respectivas amostras testadas após a realização do Teste de Ames e citotoxicidade utilizando a bactéria <i>Salmonella typhimurium</i>	72
Tabela 14. Teste de mutagenicidade e de toxicidade utilizando a linhagem TA97 de <i>S. typhimurium</i>	74
Tabela 15. Teste de mutagenicidade e de toxicidade utilizando a linhagem TA98 de <i>S. typhimurium</i>	77
Tabela 16. Teste de mutagenicidade e de toxicidade utilizando a linhagem TA100 de <i>S. typhimurium</i>	78

Tabela 17. Teste de mutagenicidade e de toxicidade utilizando a linhagem TA102 de <i>S. typhimurium</i>	80
Tabela 18. Resumo dos resultados positivos em relação à toxicidade e mutagenicidade no Teste de Ames, à genotoxicidade no Ensaio Cometa e à toxicidade com o microcrustáceo <i>Daphnia pulex</i>	81

SIGLAS E ABREVIATURAS

- λ_{\max} – Absorbância máxima
- 4-NQO – 4-Nitroquinilona-1-N-Óxido
- A21 – Azul Reativo 21
- A214 – Azul Reativo 214
- Aa – Absorbância máxima após a descoloração
- Ab – Absorbância máxima antes da descoloração
- AS – Azida Sódica
- BPF – Baixo Ponto de Fusão
- BrEt – Brometo de Etídio
- CAS – (sigla em inglês) – Número de registro no Serviço de Resumo Químico
- CCT – Coleção de Culturas Tropical
- C.I. – Colour Index
- CZ – Agar Czapek Dox
- CYA – Ágar Czapek Extrato de Levedura
- CY20S – Ágar Czapek Extrato de Levedura com 20% de Sacarose
- CYP – Citocromo oxidase
- DNA – Ácido Desoxirribonucléico
- et al. – e colaboradores
- FDA – Diacetato de Fluoresceína
- FTd – Fator de Toxicidade
- g – Grama
- h – Horas
- HB – Histidina-Biotina
- his - Histidina
- IA – Igarapé Acará
- IDB- Igarapé Reserva Ducke ponto Bo
- IDN – Igarapé Reserva Ducke ponto N
- I.M. – Índice de Mutagenicidade
- INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
- IR – Igarapé Ramal Água Branca
- LB – Luria Bertani
- Le – *Lentinula edodes*
- mA – MiliAmpere

MEA – Agar Extrato de Malte e Peptona
mg – Miligrama
mL – Mililitro
 μL - Microlitro
 μm – Micrômetro
mM – Milimolar
MMS – Metil Metano Sulfonato
MXC – Mistura de corantes
NADP – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NBR – Norma Brasileira
nm – Nanômetro
NaOH – Hidróxido de Sódio
NBR – Norma Brasileira
°C – Graus/Celsius
OD – Oxigênio Dissolvido
PBS – Tampão Fosfato-Salina
PDA – Agar Batata Dextrose
PDB – Caldo Batata Dextrose
Pen – *Penicillium simplicissimum*
PFN – Ponto de Fusão Normal
pH – Potencial hidrogênio
rpm – Rotações por minuto
SDB – Caldo Sabouraud Dextrose
SUS – Sistema Único de Saúde
TFS – Tampão Fosfato de Sódio
tons – Toneladas
UA – Unidades Arbitrárias
UAT – Unidades Arbitrárias Totais
UV – Ultra-Violeta
V – Volt
V198 – Vermelho Reativo 198
VB – Vogel-Bonner
VIS – Visível
VISA – Vigilância Sanitária

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. SAÚDE E AMBIENTE	2
1.2. INDÚSTRIA TÊXTIL	3
1.3. CORANTES TÊXTEIS	5
1.3.1. Classificação dos corantes	5
1.3.2. Química dos corantes	6
1.3.3. Toxicidade dos corantes	7
1.4. TRATAMENTO DE EFLUENTES	9
1.4.1. Tratamento químico	10
1.4.2. Tratamento físico	11
1.4.3. Tratamento biológico	11
1.5. BIORREMEDIAÇÃO	12
1.6. FUNGOS COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE POLUENTES	13
2. OBJETIVOS	17
2.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. REAGENTES QUÍMICOS	19
3.2. MEIOS DE CULTURAS E SOLUÇÕES	20
3.2.1. Isolamento e ensaio de descoloração	20
3.2.2. Identificação e manutenção dos fungos filamentosos isolados	20
3.2.3. Ensaio de citotoxicidade utilizando células sanguíneas e Ensaio Cometa	21
3.2.4. Ensaio de citotoxicidade utilizando bactérias e Teste de Ames	21
3.3. SELEÇÃO DE FUNGOS DE SEDIMENTO DE IGARAPÉS EM MANAUS (AM) E DA COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE REFERÊNCIA DO INCQS EFICIENTES NA DESCOLORAÇÃO DE CORANTES	22
3.3.1. Seleção das amostras de sedimento de igarapés com capacidade de descolorir corantes	22
3.3.2. Isolamento dos fungos de sedimento de igarapés	24
3.3.2.1. Caracterização morfológica e identificação dos isolados	24

3.4. SELEÇÃO DE FUNGOS DE SEDIMENTO DE IGARAPÉS EM MANAUS (AM) E DA COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE REFERÊNCIA DO INCQS COM CAPACIDADE DE DESCOLORIR EM MEIO LÍQUIDO	24
3.4.1. Estudo da descoloração de corantes em meio líquido pelos fungos selecionados.....	25
3.4.2. Determinação da descoloração dos corantes	25
3.5. AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO MEIO DE CULTURA PÓS-TRATAMENTO FÚNGICO	26
3.5.1. Avaliação de toxicidade com o microcrustáceo <i>Daphnia pulex</i>.....	27
3.5.2. Avaliação de genotoxicidade com sangue periférico humano (Ensaio Cometa)	28
3.5.2.1. Ensaio de citotoxicidade utilizando sangue periférico humano	28
3.5.2.2. Ensaio Cometa	30
3.5.3. Ensaio de mutagenicidade utilizando a bactéria <i>Salmonella typhimurium</i> (Teste de Ames).....	31
3.5.3.1. Linhagens	32
3.5.3.2. Teste de Ames	33
3.5.3.3. Ensaio de citotoxicidade utilizando a bactéria <i>Salmonella typhimurium</i>	34
3.6. PRESERVAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. SELEÇÃO DE FUNGOS DE SEDIMENTO DE IGARAPÉS DE MANAUS (AM) E DA COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE REFERÊNCIA DO INCQS EFICIENTES NA DESCOLORAÇÃO DE CORANTE	37
4.1.1. Seleção das amostras de sedimento com capacidade de descolorir corantes	37
4.1.2. Isolamento de fungos do sedimento de igarapés.....	40
4.1.3. Caracterização morfológica e identificação dos isolados	40
4.1.3.1. DKNA1 – <i>Aspergillus japonicus</i>	41
4.1.3.2. DKBV1 – <i>Acremonium</i> sp.	42
4.1.3.3. RV1 – <i>Fusarium</i> sp.	43
4.1.3.4. DKBV2 – dematiáceo e DKNA2 – <i>Aspergillus</i> sp.	44
4.1.4. Seleção de fungos isolados de sedimento de igarapés em Manaus e da Coleção de Microrganismos de Referência com capacidade de descolorir em meio líquido	44
4.1.4.1. Fungos testados na presença do corante V198.....	45

4.1.4.1.1. <i>Aspergillus japonicus</i> DKNA1	45
4.1.4.1.2. <i>Aspergillus</i> sp. DKNA2.....	46
4.1.4.1.3. Associação de <i>Aspergillus japonicus</i> DKNA1 e <i>Aspergillus</i> sp. DKNA2.....	46
4.1.4.1.4. <i>Acremonium</i> sp. DKBV1.....	47
4.1.4.1.5. dematiáceo DKBV2.....	47
4.1.4.1.6. Associação <i>Acremonium</i> sp. DKBV1 e dematiáceo DKBV2	48
4.1.4.1.7. <i>Fusarium</i> sp. RV1	48
4.1.4.1.8. <i>Lentinula edodes</i> INCQS 40220.....	49
4.1.4.2. Fungos testados na presença do corante A21.....	51
4.1.4.2.1. <i>Psilocybe</i> sp. INCQS 40212	51
4.1.4.2.2. <i>Ceriporiopsis</i> sp. INCQS 40260	51
4.1.4.2.3. <i>Aspergillus japonicus</i> DKNA1	52
4.1.4.2.4. <i>Lentinula edodes</i> INCQS 40220.....	52
4.1.5. Estudo da descoloração em meio líquido pelos fungos selecionados	54
4.2.5. Avaliação Toxicológica do Meio de Cultura Pós-tratamento fúngico	61
4.2.5.1. Avaliação toxicológica, com o microcrustáceo <i>Daphnia pulex</i> , de <i>A. japonicus</i> e <i>L. edodes</i> após 28 dias de incubação na presença dos corantes V198 e A21	62
4.2.5.2. Avaliação toxicológica dos fungos selecionados <i>P. simplicissimum</i> INCQS 40211 e <i>L. edodes</i> INCQS 40220 após 14 dias de incubação na presença dos corantes V198, A21, A214 e da mistura MXC.....	64
4.2.5.2.1. Avaliação de toxicidade com o microcrustáceo <i>Daphnia pulex</i> ..	64
4.2.5.2.2. Avaliação de genotoxicidade utilizando sangue periférico humano (Ensaio Cometa).....	67
4.2.5.2.3. Ensaio de mutagenicidade utilizando a bactéria <i>Salmonella typhimurium</i> (Teste de Ames).....	71
4.2.5.2.3.1. Resposta tóxica e mutagênica utilizando a Linhagem TA97	72
4.2.5.2.3.2. Resposta tóxica e mutagênica utilizando a Linhagem TA98	75
4.2.5.2.3.3. Resposta tóxica e mutagênica utilizando a Linhagem TA100	77
4.2.5.2.3.4. Resposta tóxica e mutagênica utilizando a Linhagem TA102	78

4.3.5. Resumo de todos os ensaios toxicológicos realizados após o tratamento dos corantes V198, A21, A214 e da mistura MXC pelos fungos selecionados ...	80
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
6. CONCLUSÕES.....	88
7. PERSPECTIVAS	90
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Saúde e ambiente

As civilizações humanas sempre provocaram modificações no ambiente, e com o surgimento das grandes cidades e das diversas formas de poluição resultantes da moderna sociedade industrial houve um aumento do impacto sobre o ambiente e, conseqüentemente, sobre a saúde, sendo assim os problemas ambientais têm se tornado cada vez mais críticos e freqüentes causando alterações na qualidade do solo, ar e água (KUNZ et al., 2002).

A Revolução Industrial trouxe um acelerado crescimento da produção, do mercado e do consumo, fazendo emergir novas configurações sociais e novos desafios para o setor de saúde. Deste modo, o mundo industrializado trouxe mais riscos e perigos à saúde ambiental e humana, assim como de suas futuras gerações, ampliando-se gradativamente o escopo da proteção da saúde em decorrência da introdução de novos padrões na produção envolvendo agentes radiológicos, químicos e biológicos, ameaçando a segurança sanitária (COSTA, 2001).

Ações promocionais e preventivas no âmbito da saúde ocupam lugar de destaque após a identificação dos fatores determinantes dos agravos que acometem as populações ao longo do tempo. A partir das observações empíricas a respeito da ocorrência de doenças, as comunidades antigas foram estabelecendo leis e regulamentos acerca de muitos aspectos da vida comunitária, visando à proteção da saúde pública (LUCCHESE, 2001a).

A vigilância sanitária (VISA) originou-se no Brasil entre os séculos XVIII e XIX, com o surgimento da noção de “polícia sanitária”, que tinha como função regulamentar o exercício da profissão e combater o charlatanismo. Exercia ainda o saneamento da cidade, através de fiscalização de embarcações, cemitérios e de comércio de alimentos com o objetivo de evitar a propagação das doenças (LUCCHESE, 2001a; EDUARDO & MIRANDA, 2006).

A Constituição Federal de 1988 propôs, considerando as novas percepções sobre a saúde pública, defini-la como direito social e instituiu o Sistema Único de Saúde (SUS) como meio de concretizar esse direito. O artigo 200 da Constituição Federal estabelece como competência do SUS controlar e fiscalizar procedimentos, produtos e substâncias de interesse para a saúde (BRASIL, 1988).

Para regulamentar a estrutura e o funcionamento do SUS, foi aprovada a Lei Orgânica da Saúde nº 8.080 de 1990, que definiu a função da VISA como um conjunto de ações capazes de prevenir, diminuir ou eliminar riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários

decorrentes do ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse à saúde (BRASIL, 1990). Esta legislação permite que se perceba e analise a VISA sob o ponto de vista de um espaço de intervenção do Estado, com a prioridade de trabalhar no sentido de adequar o sistema produtivo de bens e serviços de interesse sanitário, e os ambientes, às demandas sociais de saúde, para os indivíduos e para a coletividade, e às necessidades do sistema de saúde (LUCCHESI, 2001b). Portanto, é de responsabilidade da VISA, respeitada a legislação em vigor, regulamentar, controlar e fiscalizar os produtos e serviços que envolvam risco à saúde pública (BRASIL, 1999).

Para que seja efetiva a prevenção, diminuição ou eliminação dos riscos é necessário que se conheçam as possíveis causas das doenças e os mecanismos pelos quais os indivíduos estão expostos. O conhecimento sobre os riscos pode levar a um processo de recomendação de ações sanitárias que prevê medidas e atividades fundadas cientificamente para a prevenção de doenças (TAMBELLINI & CÂMARA, 2002).

No Brasil vem crescendo entre os profissionais da área de saúde coletiva o conhecimento sobre a relação entre a categoria ambiente e o padrão de saúde/doenças das populações. A área de saúde coletiva incorporou a saúde ambiental entre suas questões prioritárias, coincidindo com uma maior preocupação nos meios acadêmicos com problemas de saúde relacionados ao ambiente, além do crescimento e maior visibilidade dos movimentos ecológicos (TAMBELLINI & CÂMARA, 2002).

Deste modo, para vincular a saúde à ecologia é preciso articular suas relações com a produção e a tecnologia, identificando as situações de risco que antecedem os efeitos considerados adversos à saúde (AUGUSTO, 2005), pois este conhecimento pode levar a um processo de recomendação de ações sanitárias que prevê medidas e atividades fundadas cientificamente para a prevenção de doenças (TAMBELLINI & CÂMARA, 2002).

2.2. Indústria têxtil

A indústria têxtil, um importante setor dentro da economia brasileira, constitui uma atividade tradicional e apresenta alto potencial poluidor. A partir de seus processos são gerados efluentes líquidos, constituídos por uma mistura complexa de compostos coloridos e tóxicos, incluindo compostos cancerígenos, assim como emissões gasosas e resíduos sólidos (ROBINSON et al., 2001a).

No Brasil as primeiras indústrias têxteis foram implantadas no ano de 1850 e foi peça fundamental na estratégia de desenvolvimento da política industrial brasileira, uma vez que foi através dela que o Brasil iniciou seu processo de industrialização (HASSEMER & SENS,

2002; MELO, 2005). Hoje o Brasil é importante produtor de artigos têxteis, ocupando a sétima posição na produção de fios e tecidos planos e a terceira na produção de malha. No entanto, no comércio internacional sua participação ainda é pequena, estando apenas entre os 20 maiores comerciantes de têxteis no mundo. O consumo *per capita* de têxteis no Brasil cresceu de 8,3 kg/habitante em 1990 para 9,5 kg/habitante em 1999 – crescimento acumulado superior ao da população, embora ainda seja considerado um nível baixo em relação ao consumo médio dos maiores mercados mundiais (LIMA, 2004).

O setor na década passada era constituído por aproximadamente 5.000 empresas espalhadas pelo País, das quais apenas 11% eram consideradas de grande porte e 21% de pequeno e médio porte. As microempresas atingiam 68% do total e representavam a grande maioria do setor (VIEIRA, 1995). Cerca de 75% das indústrias estavam localizados na região sul (Santa Catarina), sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e nordeste (Pernambuco, Bahia e Ceará) (GUARATINI & ZANONI, 2000).

Durante o processamento na indústria têxtil há consumo de significativa soma de água, energia e produtos químicos, sendo que o principal problema no efluente têxtil está na presença de corantes liberados, pois mesmo utilizando-se corantes de elevada capacidade de fixação, como o do tipo azo que são utilizados em 60 a 70% de todos os artigos têxteis produzidos (VANDEVIVERE et al., 1998), admite-se que, em média, 10-15% de toda a carga de corantes utilizada em operações de tingimento é perdida nos efluentes industriais e eventualmente lançados no ambiente (SINGH, 2006).

A concentração dos corantes do tipo azo é menor do que muitos outros químicos encontrados nos efluentes, mas sua cor é visível em baixas concentrações, tornando este poluente um problema em potencial para o ambiente (HASSAMER & SENS, 2002), pois impede a entrada de luz na água, o que resulta a diminuição da fotossíntese e consequentemente a oxigenação da água causando a morte de diversos organismos.

Segundo a Resolução do CONAMA nº 357/05 os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água após o devido tratamento, e o efluente não deverá causar ou possuir potencial que resulte em efeitos tóxicos.

Seguindo uma tendência mundial, as indústrias de corantes e têxteis no Brasil têm dedicado esforços para atender as regras de proteção ambiental, entretanto grande porcentagem destas indústrias são pequenas empresas, dificultando a atividade de fiscalização (GUARATINI & ZANONI, 2000). Assim, existe a necessidade da união de diferentes órgãos

de fiscalização relacionados à saúde pública, incluindo a Vigilância Sanitária, e a saúde ambiental no intuito de controlar, reduzir ou eliminar os riscos provenientes deste setor.

2.3. Corantes têxteis

Até a metade do século XIX, só existiam pigmentos naturais, provenientes de vegetais, insetos, moluscos e minerais, como o anil e a cochinha, ambos intensamente produzidos na América Central e que “morreram de morte sintética quando, por volta de 1850, os químicos alemães inventaram as anilinas e outras tintas mais baratas para tingir os tecidos” (GALEANO, 1976, p. 139). A intensa inovação tecnológica ao redor de 1915 manteve a Alemanha com monopólio sobre a produção de corante sintético até a Segunda Guerra Mundial, após este período a indústria de corantes dos Estados Unidos se tornou a maior fonte exportadora destes produtos (SALEM, 1995).

No Brasil, desde seu descobrimento sua história está relacionada à produção de corantes. A começar pelo nome do país, uma vez que este é proveniente da madeira “Pau-Brasil”, fonte natural de corante avermelhado. A produção industrial de corantes sintéticos no país foi introduzida logo após a Primeira Guerra Mundial e atualmente supre 60% de sua demanda doméstica (GUARATINI & ZANONI, 2000; ZANONI & CARNEIRO, 2001).

Há mais de 100.000 corantes descritos que estão disponíveis comercialmente, com produção de 7×10^5 tons por ano sendo 26.500 tons somente no Brasil (NIGAM et al., 1996; KUNZ et al., 2002).

Os corantes do tipo azo são constituintes de corantes reativos, que diferem de todas as outras classes de corantes por se ligarem a fibras têxteis, tais como algodão, através de ligações covalentes que conferem grande resistência à degradação. Eles apresentam características favoráveis de cor brilhante, lavagem rápida, técnicas simples de aplicação com baixo consumo de energia (ROBINSON et al., 2001a; AKSU & DÖNMEZ, 2003; HARAZONO & NAKAMURA, 2005), assim por apresentarem estas características são utilizados em larga escala pelas indústrias.

2.3.1. Classificação dos corantes

Os corantes podem ser classificados de acordo com a estrutura química, por seu uso ou método de aplicação. Os químicos na prática adotam os termos oriundos da estrutura química tais como: azo corantes, antraquinonas e ftalocianinas. Os tecnólogos utilizam os termos de acordo com o uso ou método de aplicação, como corantes básicos, ácidos, diretos, dispersivos e reativos (HAO et al., 2000; HUNGER, 2003).

O *Colour Index* (CI), catálogo da *Society of Dyers and Colourists* e publicado pela *American Association of Textile Chemists and Colorists* e pela *British Society of Dyers and Colorists*, contém uma lista organizada de nomes e números para designar os diversos tipos de corantes onde estão registrados mais de 8 mil corantes orgânicos sintéticos associados à indústria têxtil. Estes corantes podem ser (MIRSHRA & TRIPATHY, 1993; FU & VIRARAGHAVAN, 2001):

- Aniônicos: diretos, ácidos e reativos;
- Catiônicos: básicos;
- Não aniônicos: dispersivos.

1.3.2. Química dos corantes

A molécula do corante utilizada para tingimento da fibra têxtil pode ser dividida em duas partes principais, o grupo cromóforo e os auxocromos.

Os grupos cromóforos atribuem coloração aos corpos aromáticos, estes são tão importantes que freqüentemente a classificação de muitos corantes é dada pelo principal cromóforo que possuem (FU & VIRARAGHAVAN, 2001; HUNGER, 2003).

A outra parte da molécula do corante ligada ao grupo cromóforo, os auxocromos (intensificadores de cor), são responsáveis pela fixação do corante à fibra. Estes são constituídos por heteroátomos (O, N, S, Cl, etc) com ao menos um par de elétrons livres, possibilitando a interação destes grupos com as fibras (SHORE, 1990). De modo geral, os corantes podem ser escritos seguindo a seguinte equação: ***Corantes = cromóforos + auxocromos***.

Os grupos de corantes mais utilizados são:

- Azo corantes** → Esta classe é a mais importante com mais de 50% de todos os corantes comerciais e têm sido mais estudada que qualquer outra classe. São corantes produzidos, em sua maioria, a partir da reação de diazotação de uma amina primária e se caracterizam por apresentarem um ou mais grupos azo (-N=N-) e geralmente associados a grupos auxocrômicos (-OH ou -NH) e sistemas aromáticos (SHORE, 1990).
- Antraquinonas** → Esta é a 2ª classe mais importante de corantes apresentando uma larga escala de cores e inclui alguns dos mais antigos corantes. São fortemente coloridos mesmo na ausência do grupo auxocromo (HUNGER, 2003).

c Ftalocianinas → Os mais importantes cromógenos do século XX foram os derivados das ftalocianinas, introduzidos em 1934. O termo ftalocianina foi usado pela primeira vez por Linstead em 1933 para descrever uma classe de corantes orgânicos, cujas cores variam do azul ao verde amarelado. O nome ftalocianina é originado dos termos gregos *naphtha* para óleo mineral e *cyanine* para azul escuro. Estes compostos são análogos a duas porfirinas naturais: a clorofila e a hemoglobina. As ftalocianinas formam complexos com numerosos metais, e os complexos com cobre são os mais comuns (HUNGER, 2003).

1.3.3. Toxicidade dos corantes

A avaliação e o conhecimento das propriedades químicas, físicas, ecológicas e toxicológicas de corantes são essenciais para avaliar sua influência no ambiente e estimar se o produto apresenta um perigo potencial (HUNGER, 2003). Os riscos toxicológicos de corantes sintéticos à saúde humana estão intrinsicamente relacionados ao modo e tempo de exposição, ingestão oral, sensibilização da pele e sensibilização das vias respiratórias (GUARATINI & ZANONI, 2000).

Os corantes sintéticos, extensivamente utilizados pela indústria têxtil, exibem uma grande diversidade de estruturas, sendo a maioria deles corantes do tipo azo. Devido à importância comercial, o impacto e a toxicidade dos corantes que são liberados no ambiente têm sido muito estudados (FORGACS et al., 2004). Em estudo realizado por Ryberg et al. (2006) foi observado que o contato com corantes têxteis pode causar reações alérgicas, tais como dermatites e ainda sinais atípicos como urticária e eritema multiforme.

Os corantes reativos (que incluem os azo corantes) são os mais utilizados no Brasil e caracterizam-se por apresentarem grupos quimicamente ativos capazes de reagir covalentemente com celulose, porém esta reação é estendida às proteínas o que, comprovadamente, resulta na reação com moléculas biologicamente importantes. Portanto, resíduos destes corantes podem ser altamente nocivos quando presentes em qualquer organismo vivo. Além disso, estes compostos na forma não hidrolisada apresentam alta estabilidade hidrolítica em meio neutro, permitindo um longo tempo de vida destes compostos em ambiente aquático (GUARATINI & ZANONI, 2000).

Quanto à classificação de toxicidade, alguns corantes ácidos, básicos e azo corantes têm sido identificados como tóxicos agudos para peixes, crustáceos, algas e bactérias (OLLEGAARD apud NOVOTNÝ et al., 2006). A maioria dos corantes azo requer ativação

metabólica, ou seja, redução e quebra da grupo azo em aminas aromáticas, para exibir mutagenicidade em testes *in vitro*, em animais e humanos, deste modo é necessária a avaliação destes corantes em relação aos efeitos nocivos à saúde humana (CHUNG & CERNIGLIA, 1992; NOVOTNÝ et al., 2006).

Os efeitos genotóxicos, que causam dano ao DNA, de corantes têxteis, principalmente no caso de alguns corantes do tipo azo, são discutidos e seu uso tem sido drasticamente reduzido na Europa, com base na regulamentação nacional e no certificado de qualidade têxtil (EU flower, Oeko-Tex Standard 100), mas ainda são um problema em países fora da Europa (SCHNEIDER et al., 2004).

Compostos com potencial genotóxico podem resultar em dois processos celulares: o processo de morte celular ou em um processo de reparo, caso o reparo seja correto não ocasionará nenhum dano ao organismo, já se ocorrer um reparo incorreto resultará em uma mutação que poderá ter como consequência doenças hereditárias, envelhecimento celular e/ou ainda o câncer, ou seja, um composto genotóxico pode exibir mutagenicidade e posteriormente levar a carcinogenicidade.

Visto que existe uma grande exposição do ambiente e da população a diferentes compostos altamente tóxicos, há necessidade da realização de testes capazes de detectar compostos genotóxicos e mutagênicos a fim de minimizar o potencial risco a saúde. Para detectar compostos genotóxicos vêm sendo utilizado o Ensaio Cometa, também conhecido como eletroforese em gel de célula única, e para a detecção de substâncias mutagênicas pode ser aplicado o Teste de Ames, utilizando a bactéria *Salmonella typhimurium*, estes ensaios são importantes, pois são utilizados de maneira preditiva.

Tsuda et al. (2000) observaram resposta genotóxica, utilizando o ensaio cometa, em 17 dos 24 azo corantes testados após a administração em camundongos. Outro tipo de corante, verde malaquita (Verde Básico 4), um composto triarilmetano, foi avaliado em células de ovário de hamster, e apresentou danos ao DNA deste animal (FESSARD et al., 1999; SCHNEIDER et al., 2004).

Em estudo realizado por Novotný et al. (2006) foi observado que o corante azo Laranja Reativo 16 apresentou efeito mutagênico e em outro estudo Jäger et al. (2004) observaram que dos 53 corantes testados 15 foram positivos no Teste de Ames, incluindo azo corantes e antraquinonas.

Os azo corantes Vermelho Direto 28, Azul Direto 6, Marrom Direto 95 e Preto Direto 28 foram administrados em macaco do gênero *Rhesus*, e após a ingestão dos corantes foram

detectadas benzidina e monoacetilbenzidina como metabólitos na urina (RINDE & TROLL, 1975 apud HUNGER, 2003). Outro estudo com o azo corante Resacor azul 2F (azul Direto 15) demonstrou que após a metabolização deste por azoredutases presentes em células do fígado, em bactérias intestinais e na microbiota presente na superfície da pele, foi liberada a 3,3'-dimetoxibenzidina (HILDENBRAND et al., 1999). As benzidinas, entre outras aminas aromáticas, são conhecidas como potentes carcinógenos em humanos (CHUNG et al., 2006).

Outros tipos de corantes, como antraquinonas, ftalocianinas entre outros, também vêm sendo investigados quanto à toxicidade. No entanto, ainda são escassas as informações disponíveis sobre a toxicidade destes corantes. O Teste de Ames tem sido utilizado para avaliar efeitos mutagênicos de alguns corantes antraquinonas, como no caso do Azul Dispersivo 3 que apresentou efeitos mutagênicos (NOVOTNÝ et al., 2006). Já em outro estudo o derivado do antraquinona Azul Dispersivo 1 foi descrito como agente indutor de tumor de bexiga em ratos (TAMARO et al., 1975; NOVOTNÝ et al., 2006).

O câncer de bexiga é o 11º câncer mais comum, contabilizando de 3-4% de todos as doenças. O primeiro câncer de bexiga descrito em humanos foi pela exposição ocupacional às aminas aromáticas arilaminas, incluindo 2-naftilamina, 4-aminobifenil, e benzidinas, principalmente em trabalhadores de indústria têxtil (YU et al., 2002).

Para pessoas que trabalham no processo de manufatura dos corantes azo e consumidores, existe o risco destes corantes serem incorporados por inalação, digestão ou contato dérmico e em seguida poderem ser metabolizados pelo organismo, possibilitando mecanismos genotóxicos e a formação de câncer (HILDENBRAND et al., 1999).

1.4. Tratamento de efluentes

A remoção de corantes tem sido um objeto de grande atenção nos últimos anos, não somente por sua toxicidade, mas também por sua visibilidade quando liberados por efluentes. Existe uma variedade de tratamentos químicos e físicos para os efluentes têxteis, no entanto são altamente custosos e não muito eficientes, tornando-se comercialmente menos atraentes. O tratamento biológico é uma alternativa de menor custo e ambientalmente mais aceitável (BANAT et al., 1996).

Corantes sintéticos, como os corantes do tipo azo, caracterizados por apresentarem um ou mais grupamentos -N=N- ligados a sistemas aromáticos que conferem grande resistência à degradação natural, não são degradados uniformemente em tratamentos biológicos convencionais. Sob condições anaeróbias os corantes do tipo azo são metabolizados

resultando em aminas aromáticas, compostos tóxicos, mutagênicos e por vezes cancerígenos (CHUNG & STEVENS JR., 1993; ROBINSON et al., 2001a; WEISBURGER, 2002).

Portanto, dentre os resíduos industriais, os corantes provenientes das indústrias têxteis são os mais difíceis de serem tratados. Os corantes são detectáveis pelo olho humano, mesmo em concentrações de 1 mg L^{-1} , e especificamente, no caso de corantes reativos a concentração mínima detectável é da ordem de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (GUARATINI & ZANONI, 2000). Alguns corantes podem ser ainda acumulados por plantas expostas a efluentes da indústria têxtil e conseqüentemente passar pela cadeia alimentar, contaminando outros organismos, incluindo o homem (ZANONI & CARNEIRO, 2001). Há, portanto, uma procura por agentes biológicos não só capazes de degradarem o efluente têxtil de forma mais eficiente, mas também de reduzirem sua toxicidade.

A legislação ambiental, cada vez mais rigorosa, está obrigando que os efluentes industriais sejam tratados antes do descarte, para evitar problemas ecológicos e toxicológicos sérios (PASCHOAL & TREMILIOSI-FILHO, 2005). Deste modo uma grande diversidade de tratamentos químicos, físicos e biológicos para efluentes têxteis tem sido desenvolvida para a remoção de cor de águas e para reduzir o impacto sobre o ambiente e à saúde humana.

As tecnologias envolvem adsorção em matrizes orgânicas e inorgânicas, descoloração por fotocatalise e/ou processos oxidativos, decomposição enzimática, entre outras (FORGACS et al., 2004). O emprego de métodos biológicos e químicos combinados no tratamento de efluentes também tem mostrado grande eficiência. Porém o tratamento biológico é o mais utilizado pela indústria têxtil (PASCHOAL & TREMILIOSI-FILHO, 2005).

1.4.1. Tratamento químico → O tratamento químico por floculação é geralmente o mais eficiente e o mais robusto na remoção da cor. O processo envolve adição de um agente floculante, tais como íon férrico (Fe^{3+}) e alumínio (Al^{3+}), no efluente que induz a floculação. Um coagulante pode também ser adicionado para auxiliar o processo. O produto final é um lodo concentrado (SELCUK, 2005; PASCHOAL & TREMILIOSI-FILHO, 2005). Outro método para tratamento destes efluentes é a oxidação química, este procedimento utiliza agentes oxidantes como ozônio, peróxido de hidrogênio ou permanganato de sódio para forçar a degradação de moléculas orgânicas mais resistentes. Entretanto, estes tratamentos são muito caros e possuem escala limitada (HUNGER, 2003). No caso do tratamento por ozônio, um inconveniente muitas vezes encontrado nos

estudos de degradação refere-se ao aumento da toxicidade devido à produção de alguns intermediários da reação (SELCUK, 2005).

1.4.2. Tratamento físico → Dentre os processos físicos mais utilizados no tratamento de efluentes têxteis, a remoção de cor por adsorção em carbono ativado vem sendo intensamente estudada. O carbono ativado é muito efetivo na remoção de baixas concentrações de substâncias químicas solúveis, incluindo corantes. Seu principal problema é sua capacidade limitada, pois permite a remoção de cor apenas a partir do efluente diluído (HUNGER, 2003). Recentemente o estudo de alguns agentes alternativos utilizando-se de biomassa como adsorvente também tem despertado a atenção. A utilização de tecnologias de membranas, como osmose reversa, microfiltração, nanofiltração e ultrafiltração têm se tornado muito atrativa por possibilitarem a reutilização da água no processo industrial. Por outro lado, envolvem custo muito elevado (KUNZ et al., 2002).

1.4.3. Tratamento biológico → Há dois tipos de tratamento biológico, o aeróbio (ÖZTÜRK & ABDULLAH, 2006) e o anaeróbio (MANU & CHAUDHARI, 2002). O tratamento biológico é a técnica mais comum utilizada no tratamento de efluentes, tem sido utilizada por mais de 150 anos. O lodo ativado é um processo essencialmente aeróbio que oxida a matéria orgânica a CO_2 , H_2O , NH_4 . O ar é provido por aeração mecânica ou por um difusor. Uma característica importante do lodo ativado é a recirculação de uma grande proporção da biomassa. Essa prática ajuda a manter um elevado número de microrganismos que efetivamente oxidam compostos orgânicos em um tempo relativamente curto. Entretanto, a quantidade de lodo formada é muito alta, sendo uma séria desvantagem desse método. No caso de efluentes têxteis, os corantes não são removidos completamente, apenas em torno de 10-20%, portanto este método tradicional não é eficiente na remoção de cor (HUNGER, 2003; DURÁN, 2004). Nos últimos anos, os fungos têm sido intensamente estudados para o tratamento de vários tipos de corantes liberados por efluentes (SANTOS et al., 2004). Fungos são capazes de metabolizar uma diversidade de compostos presentes em efluentes (KIRBY et al., 2000). Os basidiomicetos tais como os gêneros *Lentinula*, *Trametes*, *Pleurotus*, *Phanerochaete*, entre outros, são capazes de degradar diversos poluentes, além de serem eficientes na redução da toxicidade do efluente (DELLAMATRICE et al., 2005).

As rotinas de remediação tipicamente utilizadas pela indústria têxtil de pequeno porte envolvem processos de coagulação química, adsorção em carbono ativado e, menos freqüentemente, processos de ultrafiltração. Em indústrias de maior porte, os processos biológicos, principalmente sistema de lodos ativados, são utilizados preferencialmente (KUNZ et al., 2002).

1.5. Biorremediação

A contaminação de solos, sedimentos, águas subterrâneas e superficiais e ar por compostos orgânicos tóxicos tornou-se um dos maiores problemas enfrentados pelo mundo industrializado de hoje. As áreas contaminadas geralmente estão impactadas por uma mistura de poluentes. Uma estratégia alternativa para contornar este problema de contaminação é a biorremediação (da SILVA & ESPOSITO, 2004).

A biorremediação é definida como um processo tecnológico pelo qual sistemas biológicos são utilizados para tratar a poluição e restaurar a qualidade ambiental, reduzindo a concentração dos poluentes a níveis considerados seguros, por meio da degradação destes compostos. Os sistemas biológicos mais utilizados na biorremediação são os microbiológicos, principalmente bactérias, fungos filamentosos e leveduras (da SILVA & ESPOSITO, 2004).

A biorremediação pode ser aplicada *in situ*, sem a remoção da matriz contaminada, ou *ex situ*, pela remoção da matriz. As tecnologias *in-situ* incluem bioestimulação, ou seja, adição de nutrientes que aumenta a atividade microbiana nativa; bioaugmentação, que ocorre com adição de linhagens microbianas exógenas degradadoras. Estas duas tecnologias ainda podem ser mais eficientes com a adição de surfactantes, que auxilia a metabolização dos compostos poluentes, facilitando o transporte destes substratos orgânicos para o interior das células microbianas ou diminuindo as interações superficiais contaminante/solo; a adição de enzimas comerciais, que favorecem a oxidação de moléculas de difícil degradação em moléculas de fácil assimilação pelos microrganismos; e a bioventilação. Estas tecnologias possuem um baixo custo relativo quando comparadas às tecnologias *ex-situ* como “landfarming”, biopilhas e biorreatores (ALEXANDER, 1999).

Nos últimos anos a degradação de poluentes, incluindo corantes, por fungos vêm sendo avaliada com resultados muito promissores. Portanto, estes organismos podem ser aplicados na biorremediação de efluentes (SINGH, 2006).

1.6. Fungos com potencial de degradação de poluentes

Vem sendo investigada a capacidade de diversos fungos metabolizarem diferentes tipos de poluentes. No ambiente, os fungos são responsáveis pela maioria das transformações que caracterizam as ciclagens de matéria orgânica. A capacidade dos fungos de adaptar rapidamente o seu metabolismo a diferentes fontes de carbono e energia é um fator essencial para a sua sobrevivência. Essa flexibilidade metabólica se deve à produção de uma grande quantidade de enzimas intra e extracelulares, não específicas, capazes de degradar polímeros de origem vegetal, assim como uma grande variedade de outras moléculas orgânicas, tanto de alta, quanto de baixa massa molar (da SILVA & ESPOSITO, 2004). Graças a essas enzimas com grande capacidade catalítica e o fato de possuírem hifas que penetram o substrato, alcançando mais facilmente os poluentes, os fungos se apresentam como agentes eficientes na degradação de moléculas complexas e também na biorremediação (WAINWRIGHT, 1992; GRAVESEN et al., 1994).

A degradação de moléculas complexas por fungos é através de dois sistemas enzimáticos, um extracelular, envolvendo enzimas ligninolíticas e outra intracelular, envolvendo o sistema enzimático citocromo P-450 monooxigenase e a epóxido hidrolase (ATLAS & CERNIGLIA, 1995). Também já foram observadas enzimas hidrolíticas como: amilases, glicoamilases, lipases, pectinases e proteases envolvidas em processos de biodegradação de biopolímeros relativamente simples pelos fungos (BENNET et al., 2002).

Fungos ligninolíticos, fungos que apresentam enzimas ligninolíticas e que geralmente são da classe dos basidiomicetos, têm sido amplamente estudados quanto ao seu potencial de degradar uma diversidade de compostos tóxicos, incluindo corantes empregados na indústria têxtil (KIRBY et al., 2000; MINUSSI et al., 2001; NOVOTNÝ et al., 2001; MARTINS et al., 2002; HARAZONO & NAKAMURA, 2005; ÖZSOY et al., 2005). A utilização destes fungos no tratamento de poluentes ocorre especialmente por apresentarem mecanismos não específicos na degradação de lignina, um polímero natural que apresenta estrutura aromática complexa de difícil degradação, pela produção de enzimas como manganês peroxidase, lacase e lignina peroxidase (BENNET et al., 2002).

Fungos ligninolíticos como *Lentinula edodes* (SANTOS et al., 2004; BOER et al., 2004), *Trametes versicolor* (HEINFLING et al., 1997) e *Phanerochaete chrysosporium* (CONNELLY et al., 1999) demonstraram grande potencial de degradar vários tipos de corantes, que pode ser atribuída não somente às suas enzimas extracelulares, mas também à presença de sideróforos, quelantes específicos com alta afinidade por metais, os quais formam

complexos altamente estáveis, e citocromo P-450. Já foi constatada a produção de sideróforos durante a descoloração de efluente têxtil por *L. edodes* (da SILVA & ESPOSITO, 2004).

L. edodes é um cogumelo asiático sendo o 2º cogumelo mais popular no mundo, conhecido como shiitake. Este fungo é eficiente na produção de manganês peroxidase e lacase, enzimas que mineralizam uma grande variedade de xenobióticos como hidrocarbonetos, bifenilas, pesticidas organoclorados, pentaclorofenol (HAVATNI & MÉCS, 2003) e ainda corantes industriais (SANTOS et al., 2004).

Degradação de substâncias húmicas por fungos também vem sendo estudada por se tratarem de substâncias semelhantes aos compostos aromáticos, apresentando estruturas mais complexas e condensadas do que a lignina (GRAMSS et al., 1999). Portanto, fungos com capacidade de degradar ácidos húmicos apresentam alto potencial na degradação de outros compostos aromáticos, que fazem parte da estrutura química de diversos poluentes, incluindo dos corantes têxteis. Nos últimos anos tem se destacado o tratamento de efluentes industriais têxteis por meio de degradação biológica, mais especificamente na remoção de cor destes efluentes por fungos (DIAS et al., 2003).

A eficiência de fungos não basidiomicetos, cujo sistema enzimático envolvido na degradação de poluentes é, em muitos casos, intracelular, têm sido menos avaliada. Entretanto alguns pesquisadores vêm obtendo resultados promissores com estes fungos (KIM & SHODA, 1999; CHA et al., 2001). Fungos como *Aspergillus fumigatus* (JIN et al., 2007), *Umbelopsis isabellina* e *Penicillium gastrivorus* (YANG et al., 2003) têm demonstrado capacidade de descolorir corantes. Em estudo realizado por Ambrósio & Campos-Takaki (2004) *Cunninghamella elegans* apresentou capacidade de descolorir 3 corantes distintos. Em outro estudo, *Funalia troggi* foi capaz de descolorir até 98% de 2 corantes (ÖZOY et al., 2005).

Em estudos de biodegradação de corantes, além do desaparecimento destes compostos, também devem ser monitorados outros parâmetros que demonstrem a redução de toxicidade após o tratamento fúngico, visto que o metabolismo envolvido nos processos de biodegradação pode, às vezes, resultar na formação de metabólitos tóxicos (LEVIN et al., 2004). A toxicidade de corantes do tipo azo e ftalocianina foi extensivamente reduzida após degradação pelos fungos ligninolíticos *Trametes versicolor* e *Bjerkandera adusta* (HEINFLING et al., 1997). Apesar da comprovada eficiência da aplicação de fungos nos tratamentos de efluentes, esta é ainda subestimada na prática (COULIBALY et al., 2003). Este fato, possivelmente, seja devido ao menor número de estudos comprovando a eficiência dos fungos em biodegradação comparativamente aos estudos envolvendo bactérias.

Com base nestes estudos e pelo fato dos fungos filamentosos serem capazes de mineralizar poluentes, transformando-os em CO₂, H₂O e biomassa através de seu sistema enzimático não específico e altamente oxidativo, além de possuírem hifas que os capacitam a penetrar o solo eficientemente, a sua utilização no processo de biorremediação de áreas contaminadas por corantes têxteis é uma alternativa muito promissora (TOH et al., 2003; BOER et al., 2004; SANTOS et al., 2004).

A grande descarga de efluentes têxteis no ambiente e, conseqüentemente, maiores preocupações pelos órgãos de regulação que exigem tratamentos mais eficientes, fez crescer a busca por tratamentos biológicos alternativos, tais como a biorremediação utilizando fungos. Assim, fungos do acervo da Coleção de Microrganismos de Referência do INCQS, amostras de fungos provenientes de sedimento e seus isolados foram investigados quanto a sua capacidade de descolorir meios na presença de corantes do tipo azo e ftalocianina de cobre, intensamente utilizados nos processos de tingimento pela indústria têxtil brasileira, além de avaliar a toxicidade do produto final obtido após os tratamentos, aliando-se desta forma os estudos microbiológicos aos estudos toxicológicos.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

Estudar a capacidade de amostras de sedimentos de igarapés na região de Manaus (AM), seus isolados e ainda dos fungos filamentosos da Coleção de Microrganismos de Referência do INCQS na descoloração de corantes provenientes da indústria têxtil e avaliar a toxicidade antes e após os tratamentos fúngicos.

2.1. Objetivos específicos

1. Avaliar o potencial de descoloração de amostras coletadas de sedimento, com alto teor de ácido húmico das margens de igarapés, da região de Manaus (AM);
2. A partir das amostras de sedimento que se mostrarem positivas na descoloração dos corantes em meio líquido, realizar o isolamento dos fungos;
3. Caracterizar morfológicamente e identificar os fungos filamentosos isolados das amostras positivas;
4. Avaliar a capacidade dos fungos isolados de sedimento de Manaus (AM) e de *Psilocybe* sp. INCQS 40212, *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211 e *Ceriporiopsis* sp. INCQS 40260, comparativamente ao fungo filamentoso de referência *Lentinula edodes* INCQS 40220 (CCT 4519), depositados na Coleção de Microrganismos de Referência do INCQS, de descolorir os corantes em meio líquido;
5. Realizar avaliação toxicológica do meio líquido, com o microcrustáceo *Daphnia pulex*, após tratamento por *Lentinula edodes* e com os demais fungos filamentosos que demonstrarem eficiência na descoloração dos corantes;
6. Selecionar os fungos das amostras de sedimento e da Coleção de Microrganismos de Referência do INCQS com melhor capacidade de descoloração e detoxificação;
7. Avaliar a capacidade dos fungos selecionados em descolorir outros tipos de corantes e a mistura de 3 corantes;
8. Realizar avaliação toxicológica com o microcrustáceo *Daphnia pulex*, a genotoxicidade com sangue periférico humano e a mutagenicidade com bactérias, após o tratamento dos corantes pelos fungos selecionados e por *Lentinula edodes*;

3. Materiais & Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia (INCQS), no Setor de Fungos de Referência chefiado pela MSc. Marília M. Nishikawa, com colaboração do grupo de pesquisa coordenado pela Dr^a. Silvana do Couto Jacob do Departamento de Química (INCQS) que realizou as coletas de sedimento de igarapés em Manaus (AM); do Setor de Ensaios Toxicológicos chefiado pela Dr^a. Helena Zamith do Departamento de Farmacologia e Toxicologia (INCQS) que auxiliou na realização do Ensaio Cometa; do grupo de pesquisa coordenado pelo Dr. Israel [Felzenszwalb do](#) Departamento de Biofísica e Biometria do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (UERJ) que auxiliou na realização do teste de Ames; e do Departamento de Biologia (IOC) onde foram realizados os ensaios ecotoxicológicos utilizando o microcrustáceo *Daphnia pulex* pela MSc. Danielly de Paiva Magalhães.

3.1. Reagentes Químicos

Foram preparadas soluções estoques de 3 corantes, o corante azo Remazol Vermelho RB (DyStar, Suzano, SP, Brasil), também conhecido como Vermelho Reativo 198 (V198); a ftalocianina Remazol Azul Turquesa (DyStar, Suzano, SP, Brasil), também conhecida como Azul Reativo 21 (A21); o corante azo Azul Marinho Drimarene X-GN 150 (doado pelo Instituto Nacional de Tecnologia - INT, Rio de Janeiro, RJ), também conhecido como Azul Reativo 214 (A214) (Figura 1), dissolvendo-os em água destilada estéril e filtrando-os em membrana 0,22 µm. Estes corantes foram escolhidos como representantes de corantes comercialmente usados pela indústria têxtil, além da mistura dos 3 corantes (MXC) adicionando proporcionalmente cada um dos corantes solubilizados anteriormente ao meio de cultura. As informações referentes aos corantes estão descritas na Tabela 1.

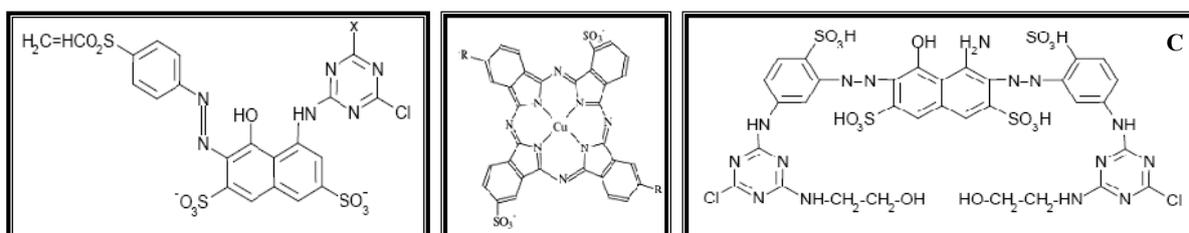


Figura 1: Estrutura química dos corantes estudados: A – Vermelho Reativo 198; B – Azul Reativo 21; C – Azul Reativo 214.

Tabela 1: Informações referentes aos corantes utilizados neste estudo.

Nome no C.I.	Nome comercial	Abreviação	C.I.	Nº CAS	Classificação do corante	λ_{\max} (nm)
Vermelho Reativo 198	Remazol Vermelho RB	V198	18221	145017-98-8	Monoazo	520
Azul Reativo 21	Remazol Azul Turquesa G 133%	A21	ND	131257-19-1	Ftalocianina de cobre	675
Azul Reativo 214	Azul marinho Drimarene X-GN 150	A214	ND	141255-32-5	Diazo	608
-	-	MXC	-	-	Mistura dos corantes	620

Nota: C.I. – Colour Index; λ_{\max} - Espectro máximo de absorbância; ND – Não disponível; Nº CAS (sigla em inglês) – Número de registro no Serviço de Resumo Químico;

3.2. Meios de culturas e soluções

3.2.1. Isolamento e ensaio de descoloração

Para isolamento e purificação de fungos coletados de sedimento dos igarapés da Região de Manaus foi usado Caldo Sabouraud Dextrose (SDB) (1% de peptona e 4% de dextrose) acrescido de cloranfenicol (400 mg/mL) como meio de enriquecimento, o meio Caldo Batata Dextrose (PDB) (20% de caldo de batata e 2% de dextrose) e o meio Ágar Batata Dextrose (PDA) (meio PDB acrescido de 2% de ágar) para o isolamento e pré-seleção dos fungos com capacidade de descolorir corantes. Para o estudo de descoloração em meio líquido pelos fungos selecionados e pelos fungos da Coleção de Microrganismos de Referência do INCQS também foi usado PDB (KIM et al., 1995; ZHENG et al., 1999).

3.2.2. Identificação e manutenção dos fungos filamentosos isolados

Para identificação dos fungos filamentosos isolados de sedimentos foram utilizados os meios Ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA) (0,1% de K_2HPO_4 , 1% de concentrado de Czapek extrato de malte, 0,5% de extrato de levedura, 3% de sacarose e 1,5% de ágar), Ágar Extrato de Malte e Peptona (MEA) (2% de extrato de malte, 0,1% de peptona e 2% de glicose e 2% de ágar), Ágar Czapek Dox (CZ) (1% de concentrado de Czapek extrato de malte, 0,1% de K_2HPO_4 , 3% de sacarose, 1,75% Ágar) e Ágar Czapek extrato de levedura com 20% de sacarose (CY20S) (0,1% de K_2HPO_4 , 1% de concentrado de Czapek extrato de malte, 5% de

extrato de levedura, 2% de sacarose e 1,5% de Ágar) (KLICH, 2002). Os meios Ágar Extrato de Malte e Peptona (MEA) e Ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA) também foram utilizados para manutenção dos fungos filamentosos.

3.2.3. Ensaio de citotoxicidade utilizando células sanguíneas e Ensaio Cometa

Para o ensaio de citotoxicidade com sangue total humano foi utilizada a solução de 0,6% de brometo de etídio (BrEt) e 4% de diacetato de fluoresceína (FDA) dissolvidos em 95,4% de PBS (83,8% de NaCl, 2,1% de KCl, 12% de Na₂HPO₄ e 2,1% de KH₂PO₄) pH 7,4 para análise da viabilidade das células em microscópio de fluorescência.

Para fixação nas lâminas, no Ensaio Cometa, foi utilizado agarose em ponto de fusão normal (PFN) à 1,5%, na segunda camada de agarose foi usado agarose em baixo ponto de fusão (BPF) à 0,5%. No Ensaio Cometa foi utilizado solução de lise (solução 1: 79,3% de cloreto de sódio, 20,1% de EDTA dissódico, 0,6% de Tris; solução 2: 1% de Triton X 100 e 10% de DMSO), para a eletroforese foi utilizada a solução tampão alcalino (2,9% de NaOH e 0,5% de EDTA dissódico). Após a corrida foi utilizada a solução de tampão de neutralização (48,5% de Tris) e para fixação das lâminas foi utilizado etanol (99,5%).

3.2.4. Ensaio de citotoxicidade utilizando bactérias e Teste de Ames

Para realização do ensaio de citotoxicidade utilizando bactérias de *Salmonella typhimurium* foi usado o meio Louria Bertani (LB) líquido (1% de bacto triptona, 0,5% de bacto extrato de levedura e 1% de NaCl) para obtenção da cultura de bactérias. Para realização do ensaio foi utilizado o meio LB sólido, ou seja, LB líquido acrescido de 1,5% de ágar, ambos os meios foram ajustados para pH 7. Para a realização das diluições das bactérias foi usado tampão fosfato de sódio 0,2M (TFS) (0,3% de NaH₂PO₄ e 4,3% de Na₂HPO₄) em pH 7,4.

No teste de Ames os meios foram preparados de acordo com MARON & AMES (1983). Foram preparados top ágar (gelose) (0,7% de ágar e 0,5% de NaCl) para adição em meio mínimo glicosado que é composto por 1,5% de ágar, 2% de sais de Vogel-Bonner (VB) 50X (1% de MgSO₄, 10% de ácido cítrico monohidratado, 51% de K₂HPO₄ e 18% de NaH₂PO₄) e 5% de glicose. Em ambos os ensaios foi utilizado 0,5 mM de histidina-biotina (HB) misturados ao top ágar, na proporção de 10:1.

Foi utilizado o liófilo da fração S9 adquirida do laboratório Molecular Toxicology Inc. (MOLTOXTM, USA), preparada a partir de fígado de ratos pré-induzidos por bifenil-policlorinato (Aroclor 1254), um indutor para a produção de enzimas microsossomais CYP

(citocromos oxidases). Esta fração revela se a amostra teste ao ser metabolizada apresenta efeito mutagênico. Foi preparado 4% da fração liofilizada ao qual foi acrescido de 2% da solução de sais (4M MgCl₂ e 0,4 M KCl), 0,5% de glicose-6P, 4% de NADP, 50% de tampão fosfato e 39,5% de água destilada, todos mantidos em gelo durante o experimento. Para os testes sem ativação metabólica, ou seja, na ausência da fração S9, foi utilizado TFS.

3.3. Seleção de fungos de sedimento de igarapés em Manaus (AM) e da Coleção de Microrganismos de Referência do INCQS eficientes na descoloração de corante.

3.3.1. Seleção das amostras de sedimento de igarapés com capacidade de descolorir corantes.

Amostras de sedimento foram coletadas de quatro pontos da margem de igarapés na região de Manaus: dois na Reserva Ducke (Reserva do IMPA), denominados de Igarapé da Reserva Ducke N (IDN) e Igarapé da Reserva Ducke Bolívia (IDB), outro também na Reserva Ducke, chamado de Igarapé de Acará (IA), e o quarto, fora da Reserva Ducke, no Igarapé de Ramal Água Branca (IR), todos livres de impactos ambientais. Os dados e as características físico-químicas referentes aos pontos de coleta estão apresentados na Tabela 2. A partir de cada amostra, foram tomados 30 g de sedimento e dissolvidos em 270 mL de água estéril. Depois de homogeneizado em liquidificador por 5 minutos, 2 mL da mistura foram inoculados em 400 mL de meio de enriquecimento SDB acrescido de cloranfenicol (400 ppm), que foi incubado por 5 dias a 28°C em agitação de 140 rpm. Após incubação, foram transferidos 3 mL da cultura para 100 mL de meio PDB complementado com 100 e 200 ppm dos corantes V198 e A21, separadamente (KIM et al., 1995; KIRBY et al., 2000; ROBINSON et al., 2001b). Em seguida, foram incubados por 7 dias a 28°C, em agitação de 140 rpm e realizada a leitura em espectrofotômetro. Experimentos controle foram realizados incubando o meio PDB, sem fungo, com as mesmas concentrações testadas dos dois corantes (Figura 2). Os ensaios foram realizados em duplicata e ao abrigo da luz.

Tabela 2: Dados e características físico-químicas referentes aos pontos de coleta da região de Manaus.

Pontos de coleta	Data da coleta	Características do local	pH	Temperatura da água (°C)	Profundidade (cm)	O ₂ dissolvido (mg/mL)	GPS		Código
							S	W	
Igarapé da Reserva Ducke N-S 3 L-O 7	01/03/2005	Água limpa	ND	ND	ND	ND	02°58'42,6"	59°56'34,9"	IDN
Igarapé da Reserva Ducke ponto Bolívia	01/03/2005	Água limpa	4,3	25,4	22	4,28	02°59'28,5"	59°56'29,0"	IDB
Igarapé de Ramal Água Branca	28/02/2005	Água limpa, presença de peixe e camarão. Zona de Malária	4,4	25,4	44	5,63	02°54'07,4"	59°54'25,2"	IR
Igarapé de Acará	02/03/2005	Água limpa	ND	ND	ND	ND	02°56'41,0"	59°57'28,9"	IA

ND: não determinado.

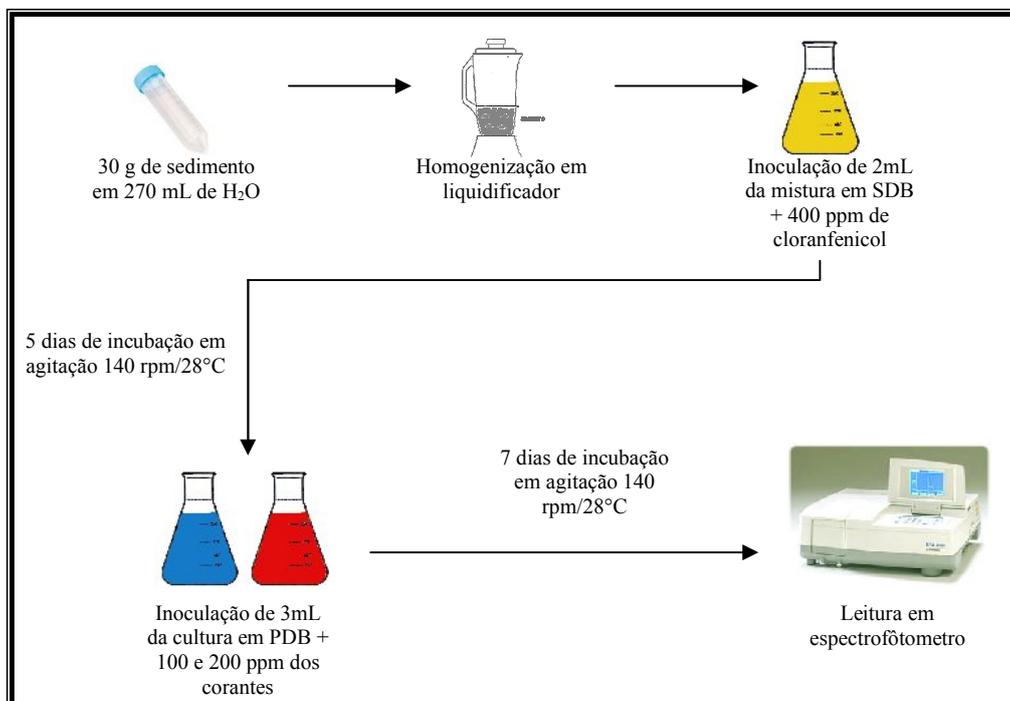


Figura 2: Esquema de processamento das amostras de sedimento de igarapés em Manaus-AM.

3.3.2. Isolamento dos fungos do sedimento de Igarapés

Das culturas que apresentaram descoloração visível a olho desarmado e por espectrofotometria (análise descrita no item 3.4.2.), em comparação com os controles, foram utilizados 0,2 mL para inocular meio sólido PDA, contendo 200 ppm de corante, que foram incubados a 28°C por 7 dias. As colônias que se desenvolveram foram isoladas, purificadas e inoculadas em MEA e CYA (Figura 3) (YANG et al., 2003). Os ensaios foram realizados em duplicata e ao abrigo da luz.

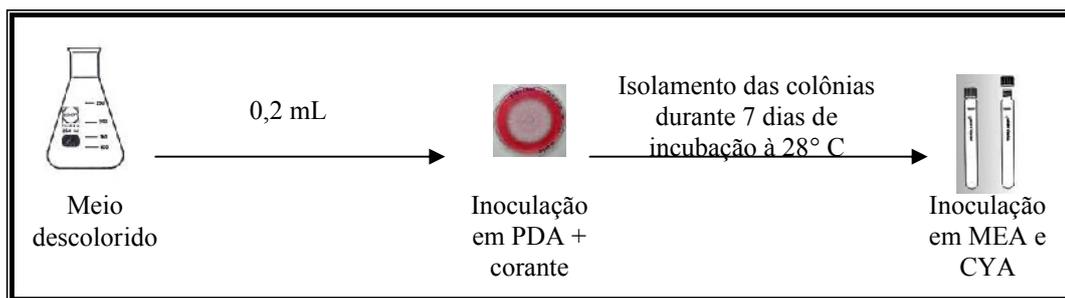


Figura 3: Esquema do isolamento dos fungos de sedimento.

3.3.2.1. Caracterização morfológica e identificação dos fungos isolados

A morfologia dos fungos filamentosos isolados foi examinada macroscopicamente através de observação das colônias, e microscopicamente através do preparo de lâminas coradas com lactofenol e azul de algodão, com exame em microscópio ótico Olympus BH-2. Com base nestas observações e seguindo critérios determinados pela literatura pertinente, os fungos foram identificados, quando possível, ao nível de espécie.

3.4. Seleção de fungos isolados de sedimento de Igarapés em Manaus e da Coleção de Microrganismos de Referência do INCQS com capacidade de descolorir em meio líquido

Os fungos filamentosos isolados de sedimento (item 3.3.2.), juntamente com os fungos da Coleção de Microrganismos de Referência do INCQS, *Lentinula edodes* INCQS 40220 (CCT 4519), fungo de referência, e os fungos *Ceriporiopsis* sp. INCQS 40260 (CCT 6629), *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211 (CCT 6686) e *Psilocybe* sp. INCQS 40212 (CCT 6614), fungos anteriormente isolados de sedimento estuarino contaminado por diferentes poluentes industriais, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, e que apresentaram capacidade de degradar pireno (da SILVA et al., 2003a), foram cultivados em PDA adicionado de 200 ppm do corante V198 ou A21 e incubados por 5 dias a 28°C. Destas

culturas foram retirados 3 discos de 5 mm de diâmetro da periferia da colônia e usados para inocular 50 mL de meio PDB em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Os frascos inoculados foram incubados por 2 dias a 28°C sob agitação de 140 rpm (HEINFLING-WEIDTMANN et al., 2001; MÁXIMO et al., 2003). Após este período foi adicionado 100 ppm do corante ao meio líquido. As culturas continuaram sendo incubadas nas mesmas condições anteriores por mais 28 dias. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e ao abrigo da luz. O meio de cultura com corante, mas sem fungo foi utilizado como controle (da SILVA et al., 2003b). A partir deste experimento foram selecionados os fungos a serem testados com os demais corantes e para a realização de todos os testes toxicológicos.

3.4.1. Estudo da descoloração de corantes em meio líquido pelos fungos selecionados

Os fungos selecionados a partir do experimento realizado no item 3.4. foram cultivados em PDA adicionado de 200 ppm dos corantes, V198, A21, A214 e MXC, e incubados por 5 dias a 28°C. Destas culturas foram retirados 9 discos de 5 mm de diâmetro da periferia da colônia e usados para inocular 150 mL de meio PDB em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Os frascos inoculados foram incubados por 2 dias a 28°C sob agitação de 140 rpm (HEINFLING-WEIDTMANN et al., 2001; MÁXIMO et al., 2003). Após este período foi adicionado 100 ppm dos corantes ao meio líquido. As culturas continuaram sendo incubadas nas mesmas condições anteriores por mais 14 dias e realizada leitura em espectrofotômetro, sendo analisado o pico característico dos corantes testados (Tabela 1). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e ao abrigo da luz. O meio de cultura com corante, mas sem fungo foi utilizado como controle (da SILVA et al., 2003b).

3.4.2. Determinação da descoloração dos corantes

O nível de descoloração obtido nos frascos provenientes das culturas de sedimento e inoculadas em meio PDB (item 3.3.1) foram analisadas nos tempos 2, 4 e 7 dias após a adição dos corantes. Para os fungos filamentosos selecionados no item 3.4. e os da Coleção de Microrganismos de Referência do INCQS o nível de descoloração foi analisado por 28 dias nos tempos: 0, 2, 5, 7, 14, 16, 19, 21 e 28 dias (MARTINS et al., 2002). Para os fungos selecionados como mais eficientes na descoloração dos corantes (item 3.4.1.), o nível de descoloração foi analisado por 14 dias nos tempos: 0, 2, 5, 7 e 14 dias (ARORA & CHANDER, 2004). Durante todo o experimento foram utilizados frascos controle contendo o meio de cultura com corante e sem inóculo e o meio sem corante e sem inóculo que foi utilizado como branco. O sobrenadante do cultivo de *Lentinula edodes* INCQS 40220 foi utilizado como controle positivo.

Deste modo, a partir das culturas testadas foram retirados 2 mL e transferidos para tubos tipo Eppendorf® que foram em seguida centrifugados a 10000rpm/10min/4°C, 0,5 mL do sobrenadante foi diluído 10 vezes em água purificada para a análise em espectrofotômetro (Shimadzu – UV-1601, Japão). Os espectros foram lidos entre 200 e 700 nm com a absorbância de 0,00A à 1,00A. Com base nestes resultados o percentual de descoloração foi calculado de acordo com a fórmula: $Ab-Aa/Ab*100$, sendo Ab o máximo de Absorbância antes da descoloração e Aa o máximo de absorbância após a descoloração. As absorbâncias analisadas foram as dos picos característicos referentes a cada corante (Tabela 1) (ÖZSOY et al., 2005).

Através do espectro de absorção do corante também foram confirmados estes resultados: quando ocorre degradação do corante, o pico característico do corante desaparece e nos casos de adsorção pelo micélio, o pico característico apenas diminui (GLENN & GOLD, 1983). Os demais espectros obtidos na faixa de 200 à 700 nm foram analisados com relação a transformação do corante (JUNGHANNS et al., 2007), através do aparecimento de novos picos, e a formação de compostos coloridos (COOKSON, 1995). Também foi considerada a análise visual, pois a adsorção pode ser observada pela coloração da biomassa (VITALI, 2005).

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

Os fungos considerados mais eficientes na descoloração foram avaliados quanto à detoxificação utilizando o teste com o microcrustáceo *Daphnia pulex*. Subseqüentemente os fungos que foram eficientes nesta etapa de avaliação toxicológica também foram avaliados pelo Ensaio Cometa (Eletroforese em Gel de Célula Única) (ENSAIO COMETA, 2007) e pelo Teste de Ames com a bactéria *Salmonella typhimurium* (AMES et al., 1973; MARON & AMES, 1983). No Quadro 1 estão descritos os princípios de cada teste utilizado.

Quadro 1: Princípio dos ensaios toxicológicos realizados no estudo.

Teste Toxicológico	Bioindicador	Princípio do teste
Toxicidade aguda	Microcrustáceo <i>Daphnia pulex</i>	Identifica substâncias com potencial tóxico
Ensaio Cometa ou eletroforese em Gel de célula única	Sangue periférico total humano	Identifica substâncias com potencial genotóxico e danos em células individualizadas
Teste de Ames	Bactéria <i>Salmonella typhimurium</i>	Identifica substâncias mutagênicas

3.5.1. Avaliação de toxicidade com o microcrustáceo *Daphnia pulex*

As *Daphnias* spp. pertencem ao filo Arthropoda, classe Crustácea, e ordem Cladocera, este microcrustáceo planctônico atua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática e se alimenta através de filtração da matéria orgânica suspensa. Dentre os microcrustáceos as *daphnias* são conhecidas como pulgas d'água (RUPPERT & BARNES, 1996).

O cultivo destes organismos depende essencialmente da água e do alimento utilizado. A água deve propiciar aos organismos sobrevivência e reprodução. Neste estudo foi utilizado para desenvolvimento das daphnias a água Minalba® e para alimentá-las foi utilizada a alga *Scenedesmus subspicatus*. As culturas foram mantidas em temperatura controlada 24°C ±2 por 24h, as fêmeas se reproduzem por partenogênese, o que garante que os indivíduos são clones um do outro, cada lote produz em torno de 15 a 20 indivíduos, exclusivamente fêmeas.

Deste modo, para a realização do teste da toxicidade resultante após a descoloração dos corantes pelos fungos mais eficientes, foi primeiramente avaliado pelo ensaio ecotoxicológico utilizando o microcrustáceo *Daphnia pulex* seguindo o protocolo da NBR 12713 (ABNT, 2004).

Antes da realização do experimento foram medidas as grandezas que influenciam na sobrevivência das daphnias, tais como pH e oxigênio dissolvido (OD).

No momento da análise, a água de diluição (Minalba®) foi oxigenada até atingir 100% de saturação com o objetivo de minimizar o efeito das amostras com características de redução do oxigênio dissolvido (OD). O valor mínimo de OD nos experimentos para ser validado foi de 2 mg/mL. As daphnias vivem em meio com pH entre 7,0 e 8,0, assim as amostras com pH ácido ou básico foram ajustadas para pH neutro, através da adição de HCl 1N, para amostras básicas, e NaOH 1N, para amostras ácidas.

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

Após a exposição das daphnias ao tratamento fúngico por 24h foram medidos pH, oxigênio dissolvido (OD) e estimado o fator de toxicidade (FTd) (Figura 4). O FTd corresponde à menor diluição da amostra em que não ocorre imobilidade ou mortalidade em mais de 10% dos organismos. Os resultados foram expressos com percentual de mortalidade dos organismos após 24h de exposição.

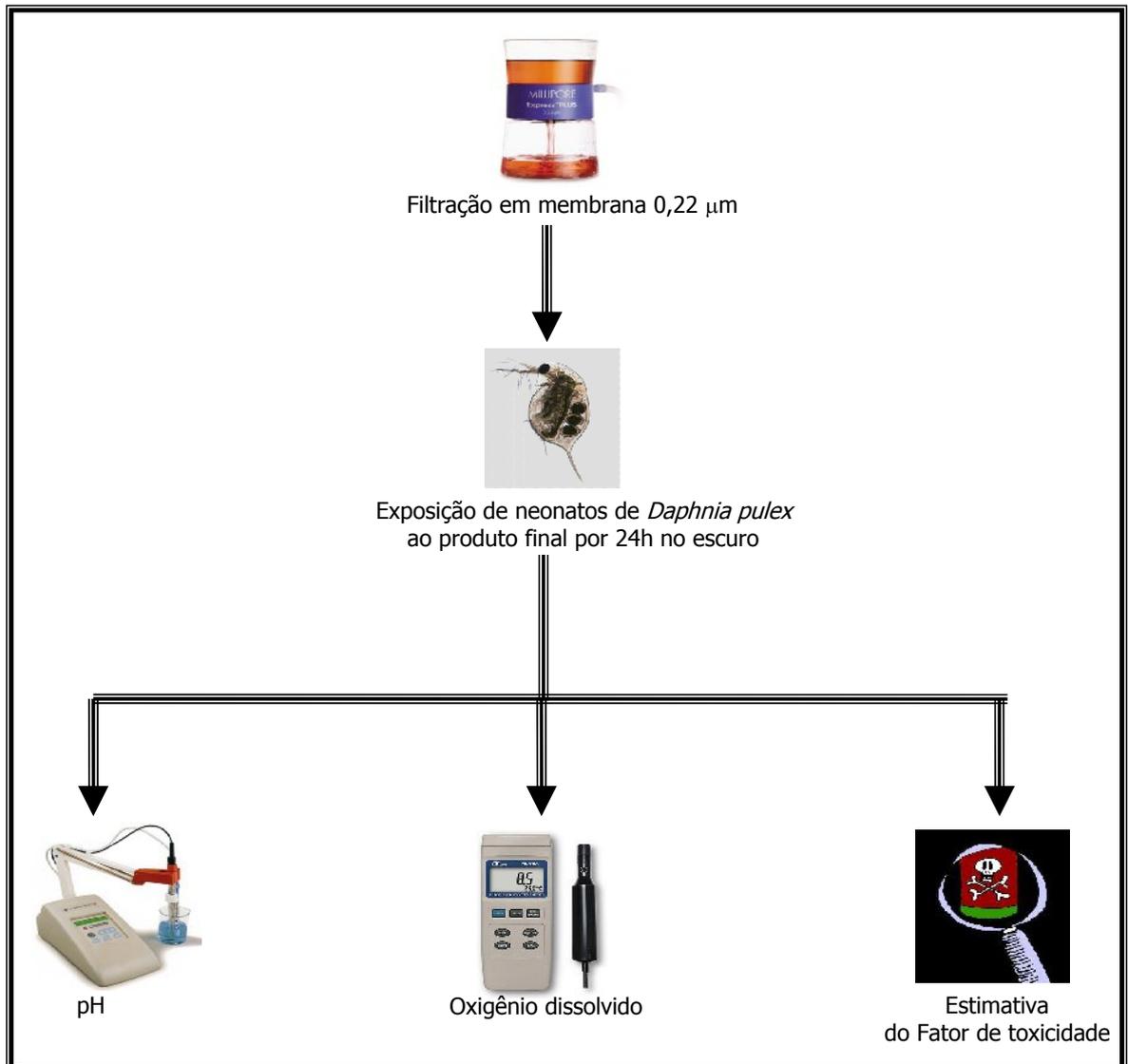


Figura 4: Esquema de avaliação toxicológica utilizando o microcrustáceo *Daphnia pulex*

3.5.2. Avaliação de genotoxicidade com sangue periférico humano (Ensaio Cometa)

O Ensaio Cometa foi utilizado a fim de avaliar o dano estrutural ao DNA, ou seja, a genotoxicidade das substâncias. Assim, este teste não é utilizado para detectar mutações pontuais, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em quebras simples e/ou duplas na cadeia de DNA.

Após 14 dias de incubação os frascos contendo os fungos selecionados na presença dos corantes testados e na ausência do corante (item 3.4.1.) foram filtrados em membrana de 0,22 µm e utilizados na avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade em células sanguíneas totais.

3.5.2.1. Ensaio de citotoxicidade utilizando sangue periférico humano

Visto que o processo citotóxico leva, inevitavelmente, à formação de quebras de fita dupla no DNA, o Ensaio Cometa deve ser realizado em condições mínimas de toxicidade celular. Assim, foi conduzido juntamente ao Ensaio Cometa o teste de viabilidade celular (Figura 5) das amostras filtradas e dos controles. A partir deste teste foi observado se a amostra testada não causou dano superior a 30% das células sanguíneas totais.

Seguindo a metodologia de Hartmann & Speit (1997) foi utilizado o volume de 100 μ l de células sanguíneas totais humanas (sangue periférico), obtido de sexo masculino (saudável, não fumante, 30 anos), que foram misturadas à 100 μ l das amostras teste filtradas (item 3.4.1.) e aos controles: controle-solvente (PDB, H₂O e PBS), controle-positivo Metil Metanosulfonato (MMS) 0,04 mM e controle celular (sem tratamento), em seguida foram incubadas à 37°C por 2h. Duzentas células foram analisadas através de microscópio de fluorescência (Nikon – Japão) com aumento de 400X utilizando 50 μ l da solução BrEt e FDA para a análise da viabilidade celular. As células viáveis apresentam fluorescência verde e as células mortas laranja (Figura 6) (HARTMANN & SPEIT, 1997; ENSAIO COMETA, 2007). Assim, o resultado foi expresso através do percentual de células viáveis, sendo considerado tóxico quando causou morte superior a 30%.

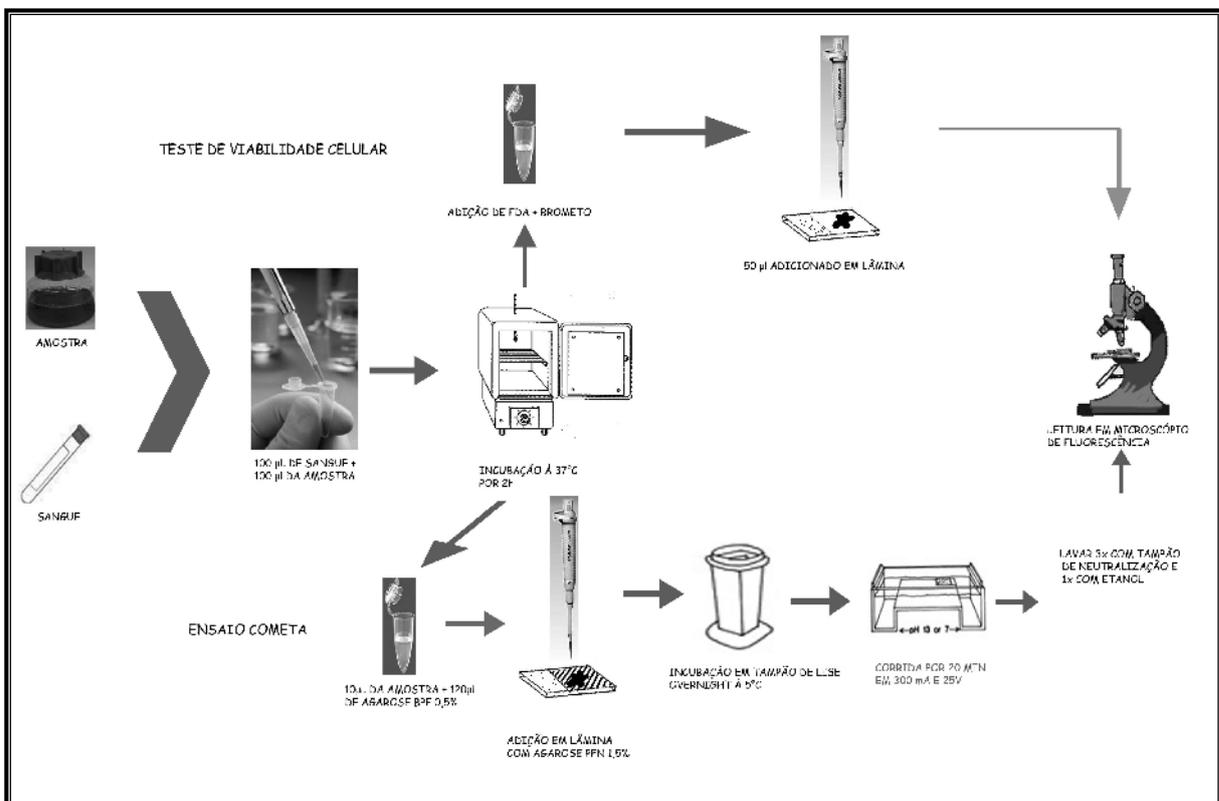


Figura 5: Esquema do ensaio de citotoxicidade e do Ensaio Cometa utilizando sangue periférico humano.

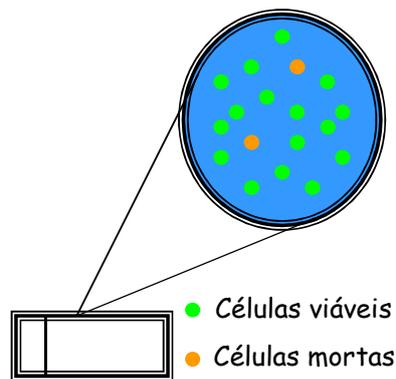


Figura 6: Ensaio de viabilidade de celular para Ensaio Cometa: Visualização de lâmina através de microscópio de fluorescência de células viáveis (verde) e mortas (laranja).

3.5.2.2. Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa foi realizado de acordo com Hartmann e Speit (1997) com algumas modificações apresentadas na referência Ensaio Cometa (2007) (Figura 5). O volume de 100 μ l de células sanguíneas foi misturado às amostras teste e aos controles incubados à 37°C. Após 2h 120 μ l de agarose BPF 0,5% à 37°C foi misturada à 10 μ l de cada tubo tipo Eppendorf® contendo as amostras de controles e tratamentos e após serem homogeneizados foram imediatamente pipetados em lâminas com agarose PFN.

As lâminas preparadas em duplicata foram guardadas em geladeira à 5°C por 5 minutos e em seguida foram imersas em solução de lise celular e armazenadas em geladeira à 5°C overnight. Após este período as lâminas foram colocadas em cuba de eletroforese com tampão alcalino por 20 minutos e em seguida foi realizada a corrida de eletroforese em 25 V, 300 mA por 20 minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com tampão de neutralização e colocadas em etanol por 10 minutos.

As lâminas secas foram coradas com 30 μ l de brometo de etídio e analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon - Japão), com aumento de 200X. Foram analisadas 50 células por lâmina, ou seja, foi avaliado o dano em 100 células sanguíneas (2 lâminas) de acordo com a intensidade da cauda dos cometas, em 4 diferentes classes (0 a 3) como demonstrado na Figura 7. Os resultados dos diferentes grupos de tratamento foram expressos em percentual de células nas 4 diferentes classes e unidades arbitrárias (UA). Posteriormente, foram comparados utilizando o teste t de student unicaudal. Observações não pareadas entre o grupo tratado e o grupo controle $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (WATANABE et al., 2005).

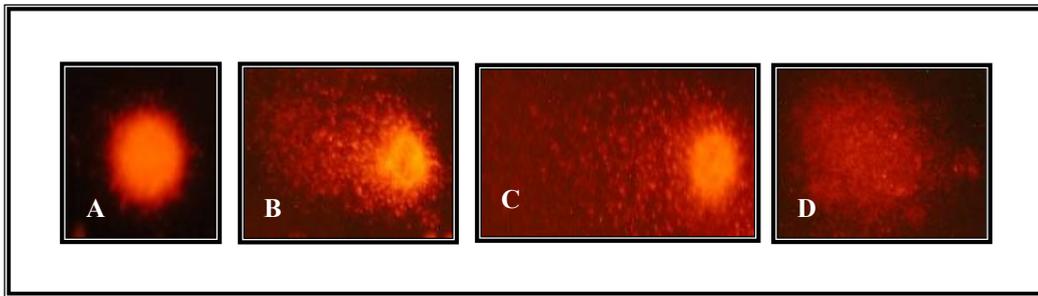


Figura 7: Classes de Dano ao DNA. A – classe 0 (sem dano); B – classe 1 (dano leve); C – classe 2 (dano moderado) e D – classe 3 (dano severo).

3.5.3. Ensaio de mutagenicidade utilizando a bactéria *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames).

O Teste de Ames baseia-se na indução de mutações reversas em linhagens de *Salmonella typhimurium*, auxotróficas para o aminoácido histidina (his^-), e mede-se a reversão para o estado prototrófico (his^+). O teste utiliza várias linhagens mutantes construídas para detectar mutações por deslocamento do quadro de leitura ou por substituição de pares de base no DNA. Cada uma das cepas contém um tipo diferente de mutação em um dos vários genes que governam a síntese de histidina (*operon* histidina), e não pode crescer, a não ser que este aminoácido seja incorporado ao meio de cultura (RIBEIRO et al., 2003).

As bactérias utilizadas neste ensaio têm capacidade metabólica limitada, não apresentam a maioria das enzimas envolvidas no processo da biotransformação, que ocorre em mamíferos. Como o teste é empregado com um sentido preditivo, torna-se necessário adicionar um sistema extrínseco de “ativação metabólica”, neste caso foi utilizada a mistura S9. Esta mistura é preparada em fígados de ratos previamente tratados com um indutor (Aroclor 1254) de enzimas microsossomais de metabolização de xenobióticos.

Assim, este ensaio foi utilizado com o intuito de evidenciar se a amostra testada e/ou seus metabólitos interagem diretamente com a molécula de DNA bacteriano, revertendo o efeito de uma mutação pré-existente, de modo que as bactérias recuperem a capacidade de sintetizar histidina.

3.5.3.1. Linhagens

Foram utilizadas as linhagens TA97, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*. As características genéticas referentes a cada linhagem estão descritas no Quadro 2. Para preparo das linhagens 100 µl de cultura estoque (50% glicerol, 50% LB líquido) de cada uma das linhagens foram inoculadas em 10 mL de meio LB líquido, em seguida incubado à 37°C, 131 rpm, por 16h, para obtenção de densidade de aproximadamente 2×10^9 células/mL.

Quadro 2: Relação de linhagens utilizadas no teste de mutagenicidade e suas respectivas características genotípicas.

Linhagem	Genótipo	Característica
<i>S. typhimurium</i> TA97	<i>hisD6610 rfa ΔuvrB⁻ bio⁻ R⁺</i>	Detecta mutação do tipo frameshift, por adição de bases
<i>S. typhimurium</i> TA98	<i>hisD3052 rfa ΔuvrB⁻ bio⁻ R⁺</i>	Detecta mutação do tipo frameshift, por adição ou deleção de bases
<i>S. typhimurium</i> TA100	<i>hisG46 rfa ΔuvrB⁻ bio⁻ R⁺</i>	Detecta mutação pontual de G-C para T-A
<i>S. typhimurium</i> TA102	<i>hisG46 rfa uvrB⁺ bio⁺ R⁺</i>	Detecta mutação pontual de T-A para G-C

Nota: *his* – mutação responsável pela síntese de histidina; *rfa* – permeabilidade da membrana de lipossacarídeos; *uvrB* – gene responsável pelo reparo no DNA; *bio* – mutação responsável pela síntese de biotina; R⁺ - adição de plasmídeo de resistência a ampicilina; Fonte: Maron & Ames, 1983

Como apresentado no Quadro 1, cada cepa possui além de mutação no *operon* histidina (*his*) que impede as linhagens sintetizem esta aminoácido essencial para o desenvolvimento, há outras modificações genéticas adicionais, como as mutações *rfa*, *uvrB* e o fator de resistência à ampicilina (R⁺), ou seja o plasmídeo pKM101.

A superfície das bactérias é, em geral, coberta por uma parede de constituição lipopolissacarídica que serve como barreira à penetração de substâncias químicas. A mutação *rfa* elimina parte da parede bacteriana, tornando as bactérias que a possuem mais permeáveis às substâncias e completamente não patogênicas (AMES et al., 1973).

A mutação *uvrB* consiste na deleção deste gene que codifica o sistema de reparo do DNA por excisão de nucleotídeos. Neste caso, o aduto formado pela ligação covalente da substância química com o DNA não é retirado por este mecanismo de reparo fiel, aumentando a ocorrência de mutagênese. Esta deleção estendeu-se até o gene *bio* e, como consequência, as bactérias contendo a mutação também requerem biotina para se desenvolverem (MARON & AMES, 1983). Assim, com estas modificações na *S. typhimurium* o ensaio torna-se muito sensível, e podem ser detectadas quantidades muito pequenas do agente mutagênico.

3.5.3.2. Teste de Ames

Neste ensaio as amostras filtradas após o tratamento fúngico (item 3.4.1.), os controles negativos e os controles positivos foram misturados a 100 µl da cultura de bactérias preparadas previamente (item 3.5.3.1.) e acrescidos de 500 µl de tampão fosfato de sódio (TFS), pH 7,4 (ou 500 µl da mistura S9 nos ensaios com ativação metabólica).

Após 5 minutos adicionou-se 2 mL de “top ágar” suplementado com traços de histidina e biotina, insuficiente para possibilitar a formação de colônias, mas permite que se sucedam as primeiras divisões celulares que são indispensáveis para que ocorra a expressão das mutações. Homogeneizou-se e foram vertidas em placa de Petri contendo o meio mínimo. Em seguida as placas foram incubadas por 72h a 37°C. Após a incubação foi realizada a contagem das colônias revertentes por placa. O ensaio foi realizado em triplicata e ao abrigo de luz. A Figura 8 apresenta o esquema simples do procedimento.

Como controles foram utilizados água (H₂O), o meio de cultura PDB usado anteriormente para crescimento dos fungos (item 3.2.1.), PDB+V198, PDB+A21, PDB+A214, PDB+MXC e como controles positivos, para confirmação da reversão, foram utilizados 4-nitroquinolona-N-óxido (4-NQO) (1 mg/mL) para as linhagens TA97, TA98 e TA102 e Azida Sódica (AS) (0,1 mg/mL) para a linhagem TA100.

Para calcular os valores dos índices de mutagenicidade (IM) obtidos em relação a seus respectivos controles foi utilizado o seguinte cálculo: n° médio de revertentes da amostra (espontâneas + induzidas) / n° médio de revertentes do controle. Os dados foram analisados em programa Excel utilizando o teste T unicaudal, quando $p < 0,05$ foi considerado significativo. A mutagenicidade foi considerada positiva quando IM foi igual ou maior que 2,0 e induziu aumento significativo de revertentes e negativo quando IM foi menor que 2,0.

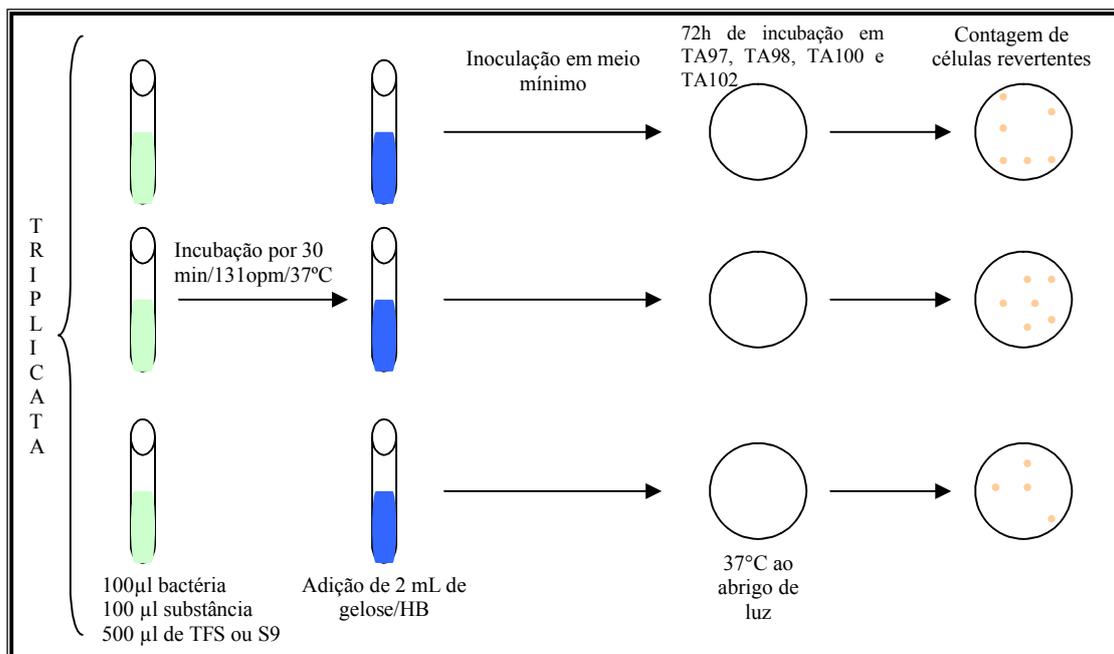


Figura 8: Esquema do ensaio de mutagenicidade utilizando a bactéria *Salmonella typhimurium*.

3.5.3.3 Ensaio de citotoxicidade utilizando a bactéria *Salmonella typhimurium*

A toxicidade das amostras foi estimada a partir da análise de crescimento em meio rico (LB) a fim de verificar se as amostras testadas, na presença (+S9) e na ausência (-S9) de metabolização, influenciaram no resultado negativo à mutagenicidade.

Deste modo, simultaneamente ao teste de Ames foram retirados 10 µL de 2 tubos de cada amostra teste acrescido de TFS ou S9 (item 3.5.3.2.) e realizadas 3 diluições em TFS até se obter aproximadamente 10^2 células. Em seguida, foram inoculados 100 µL da amostra diluída em meio LB sólido que foram espalhados com o auxílio de pérolas de vidro. Após 24h de incubação à 37°C, foram realizadas as contagens das colônias nas placas. Este experimento foi realizado em duplicata. Os controles utilizados foram os mesmos do teste de Ames (item 3.5.3.2.). Para calcular o percentual de sobrevivência foi realizado o seguinte cálculo: n° médio de colônias da amostra * 100 / n° médio de colônias do controle. Quando o total de colônias foi inferior a 70% em relação ao controle a substância foi considerada tóxica (Figura 9).

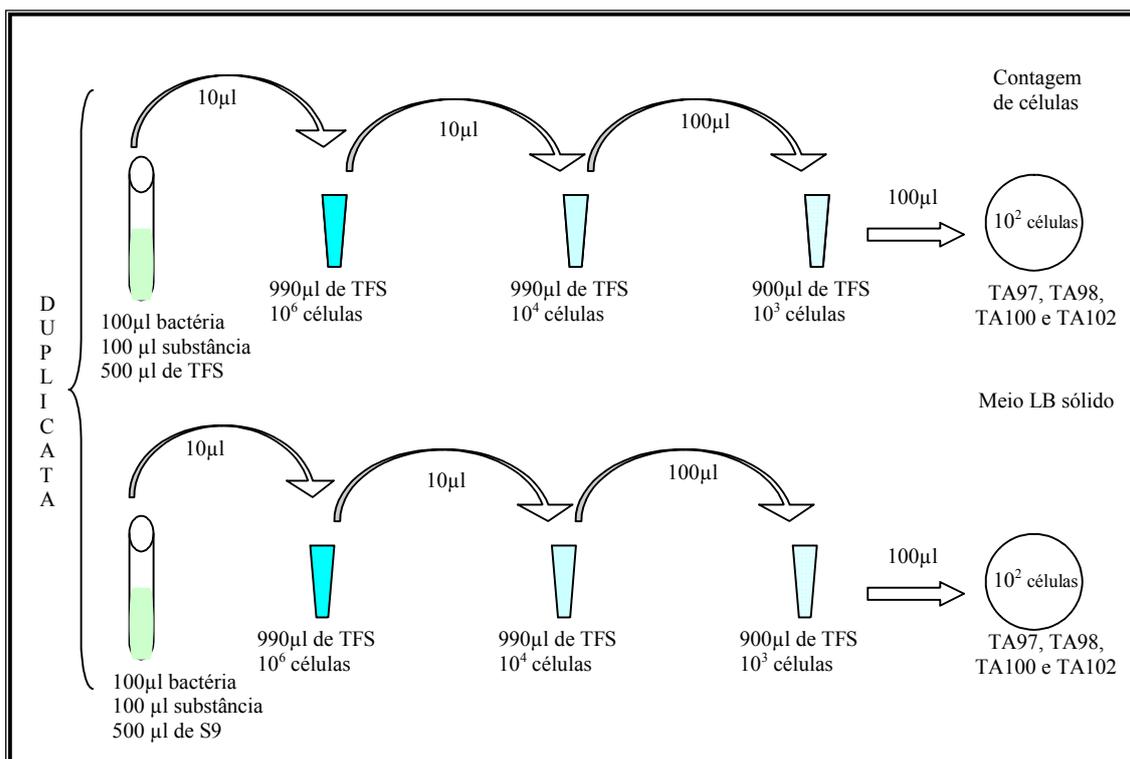


Figura 9: Esquema do ensaio de citotoxicidade utilizando a bactéria *Salmonella typhimurium*.

3.6. Preservação dos fungos filamentosos

Os fungos filamentosos isolados e selecionados foram mantidos em tubos contendo MEA e CYA e congelados em glicerol a -70°C , procedimento já realizado para os fungos da Coleção de Microrganismos de Referência do INCQS, o fungo anamórfico *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211, e os basidiomicetos *Psilocybe* sp. INCQS 40212, *Lentinula edodes* INCQS 40220 (CCT 4519) e *Ceriporiopsis* sp. INCQS 40260.

4. Resultados & Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção de fungos de sedimento de igarapés em Manaus (AM) e da Coleção de Microrganismos de Referência do INCQS eficientes na descoloração de corantes

4.1.1. Seleção das amostras de sedimento com capacidade de descolorir corantes

Após 2 dias de incubação das amostras ambientais foi realizada a análise visual dos meios e observado que em todos os frascos de IDB e IDN ocorreu completa descoloração, porém a biomassa fúngica apresentou coloração respectiva ao corante utilizado, caracterizando adsorção do corante.

Quanto à análise por espectrofotometria as médias com o percentual de descoloração estão descritos na Tabela 3. Com base nos cálculos de absorvância dos picos característicos foi confirmado que os frascos de IDB com o corante V198 (Figura 10) e com A21 (Figura 11), e de IDN com V198 (Figura 12) e com A21 (Figura 13) apresentaram alto percentual de descoloração, com média entre 85 e 100% em 2 dias, e em 7 dias 100% em todos os frascos testados.

Com relação aos frascos de IR, a biomassa não adsorveu os corantes, pois esta apresentava coloração cinza. Já o sobrenadante apresentou coloração diferente do corante utilizado, marrom claro com V198 (Figura 14) e cinza com A21 (Figura 15). Como descrito na Tabela 3 o frasco de IR na presença de V198 (100 ppm) apresentou bons resultados na análise por espectrofotometria com média de descoloração de 85% ao fim de 7 dias de incubação e na concentração maior (200 ppm) foi de 73%.

Junghanns et al. (2007) observaram que após o tratamento de diferentes corantes por fungos, novos espectros foram obtidos, indicando a formação de metabólitos. Foi observado o desaparecimento do pico característico do corante de 520 nm e o surgimento de novo espectro de aproximadamente 474 nm em 7 dias. Assim com base nesta observação, na coloração da biomassa e na coloração do meio é possível inferir que ocorreu degradação do corante nos frascos de IR na presença do corante V198.

Na presença do corante A21, a descoloração ocorrida nos frascos de IR foi de 79% em 100 ppm, e em 200 ppm de 32% após 7 dias de incubação. O tratamento de A21 por IR apresentou perfil diferente do observado com o corante V198, pois não foi observado desaparecimento do pico característico (675 nm) e nem o surgimento de um novo pico. Deste

modo, pode-se inferir que a coloração mais escura do meio deve-se provavelmente pela liberação de pigmentos coloridos ao meio, tornando o meio com coloração diferente da inicial.

Os frascos que apresentaram menor percentual de descoloração foram os de IA, onde os melhores resultados foram, na presença do corante V198 (100 ppm) com 37,7% e na presença do corante A21 (100 ppm) com 32% (Tabela 3).

Apesar da biomassa dos frascos de IDN e IDB terem demonstrado características de adsorção do corante, a coloração da biomassa era mais clara que o corante utilizado. Assim os fungos, possivelmente, estavam atuando tanto enzimaticamente na descoloração quanto na adsorção de forma abiótica. Portanto, os frascos de IDN e IDB foram selecionados para o próximo experimento, assim como o frasco de IR pelo fato do pico referente ao corante V198 (520 nm) ter desaparecido.

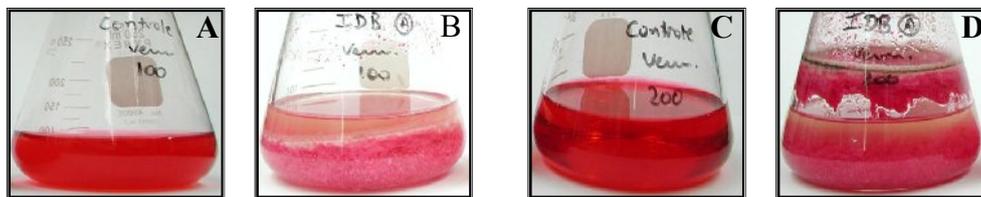


Figura 10: Frascos de IDB incubados com corante V198 na concentração de 100 ppm, onde A é o controle e B é o tratamento, e de 200 ppm, onde C é o controle e D é o tratamento, após 7 dias de incubação.

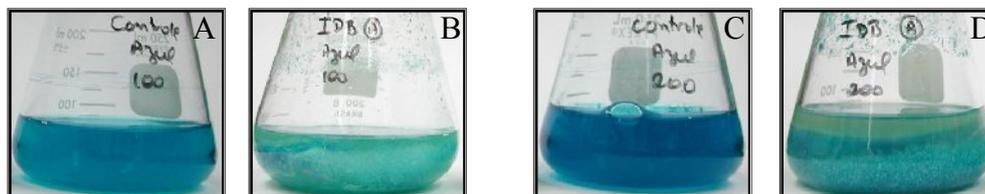


Figura 11: Frascos de IDB incubados com corante A21 na concentração de 100 ppm, onde A é o controle e B é o tratamento, e de 200 ppm, onde C é o controle e D é o tratamento, após 7 dias de incubação.

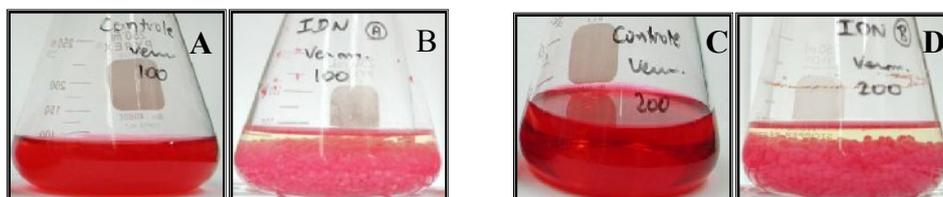


Figura 12: Frascos de IDN incubados com corante V198 na concentração de 100 ppm, onde A é o controle e B é o tratamento, e de 200 ppm, onde C é o controle e D é o tratamento, após 7 dias de incubação.

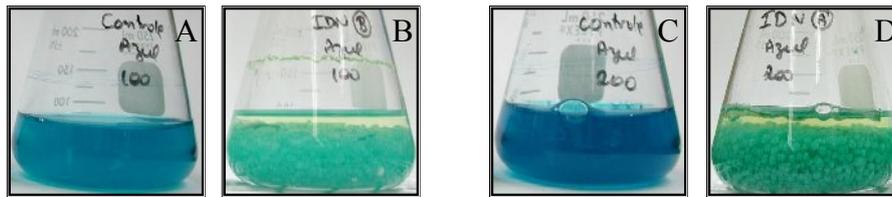


Figura 13: Frascos de IDN incubados com corante A21 na concentração de 100 ppm, onde A é o controle e B é o tratamento, e de 200 ppm, onde C é o controle e D é o tratamento, após 7 dias de incubação.

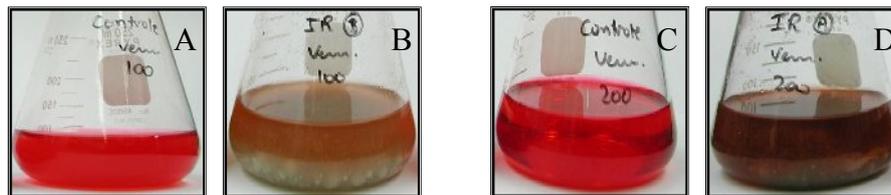


Figura 14: Frascos de IR incubados com corante V198 na concentração de 100 ppm, onde A é o controle e B é o tratamento, e de 200 ppm, onde C é o controle e D é o tratamento, após 7 dias de incubação.

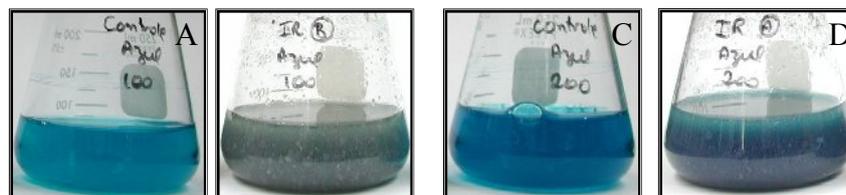


Figura 15: Frascos de IR incubados com corante A21 na concentração de 100 ppm, onde A é o controle e B é o tratamento, e de 200 ppm, onde C é o controle e D é o tratamento, após 7 dias de incubação.

Tabela 3: Percentual de descoloração das amostras de sedimento de igarapés da Região de Manaus - AM

Amostras	Percentual de descoloração (%)		
	2 dias	4 dias	7 dias
IDB – V198 100 ppm	99,6	100	100
IDB – V198 200 ppm	94,2	97,8	100
IDB – A21 100 ppm	100	100	100
IDB – A21 200 ppm	99,6	100	100
IDN – V198 100 ppm	99,8	100	100
IDN – V198 200 ppm	86,6	100	100
IDN – A21 100 ppm	100	100	100
IDN – A21 200 ppm	99,4	100	100
IR – V198 100 ppm	22,9	76,2	85
IR – V198 200 ppm	9,3	72,1	73,2
IR – A21 100 ppm	1	68,1	79
IR – A21 200 ppm	8	43,4	32
IA – V198 100 ppm	22,7	24	37,7
IA – V198 200 ppm	1,5	11	15,4
IA – A21 100 ppm	38,5	47,6	32,4
IA – A21 200 ppm	14,1	10,1	15,6

Nota: IDN – Igarapé Reserva Ducke N; IDB – Igarapé Reserva Ducke ponto Bo; IR – Igarapé Ramal Água Branca; IA – Igarapé Acará.

4.1.2. Isolamento de fungos do sedimento de igarapés

Para isolamento dos fungos presentes nas amostras do sedimento capazes de descolorir os corantes, placas com meio PDA + corante foram inoculadas com as culturas dos frascos que apresentaram bom percentual de descoloração (IDN, IDB e IR) descritos no item 4.1.1.

Assim foram isolados os fungos filamentosos que cresceram em PDA, ou seja, os que prevaleceram na competição pelo substrato e foram tolerantes ao corante. No total foram isolados 5 fungos, sendo 2 de IDN, 2 de IDB e 1 de IR. Estes isolados receberam os códigos DKNA1, DKNA2, DKBV1, DKBV2 e RV1, respectivamente.

4.1.3. Caracterização morfológica e identificação dos isolados

Foram realizadas caracterizações morfológicas dos fungos filamentosos isolados (item 4.1.2). As identificações de cada isolado e seus pontos de coleta estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Identificação dos isolados de sedimento de igarapés em Manaus – AM.

Pontos de coleta	Isolados	Identificação
Reserva Ducke ponto N (IDN)	DKNA1	<i>Aspergillus japonicus</i>
	DKNA2	<i>Aspergillus</i> sp.
Reserva Ducke ponto Bo (IDB)	DKBV1	<i>Acremonium</i> sp.
	DKBV2	dematiaceo
Ramal (IR)	RV1	<i>Fusarium</i> sp.

4.1.3.1. DKNA1 *Aspergillus japonicus*

O isolado identificado como DKNA1 apresentou características comuns à *Aspergillus japonicus*, pois na avaliação macroscópica em MEA foi observada esporulação negra e esparsa, micélio amarelado e verso amarelo. Em CYA25 foi observada esporulação negra compacta no centro e mais esparsa ao redor com bastante micélio estéril de cor amarelada, verso amarelo. Em CYA37 a esporulação era negra compacta e umbtonada, e verso negro. Em CZ a colônia apresentou esporulação negra compacta, micélio creme e verso amarelo limão e em CY20S foi observado micélio estéril creme e felpudo, esporulação esparsa e verso amarelo forte (KLICH & PITT, 1988). Na Figura 16 estão apresentadas as colônias do fungo em todos os meios utilizados para sua identificação.

Também foram observadas características microscópicas como o tamanho do estipe, da fiálide, da vesícula, que apresentou aspecto globoso, e dos conídios que eram globosos e espiculados (Figura 17) (KLICH, 2002; KLICH & PITT, 1988). Espécies deste gênero são freqüentemente encontradas em solo (DOMSH et al., 1980).

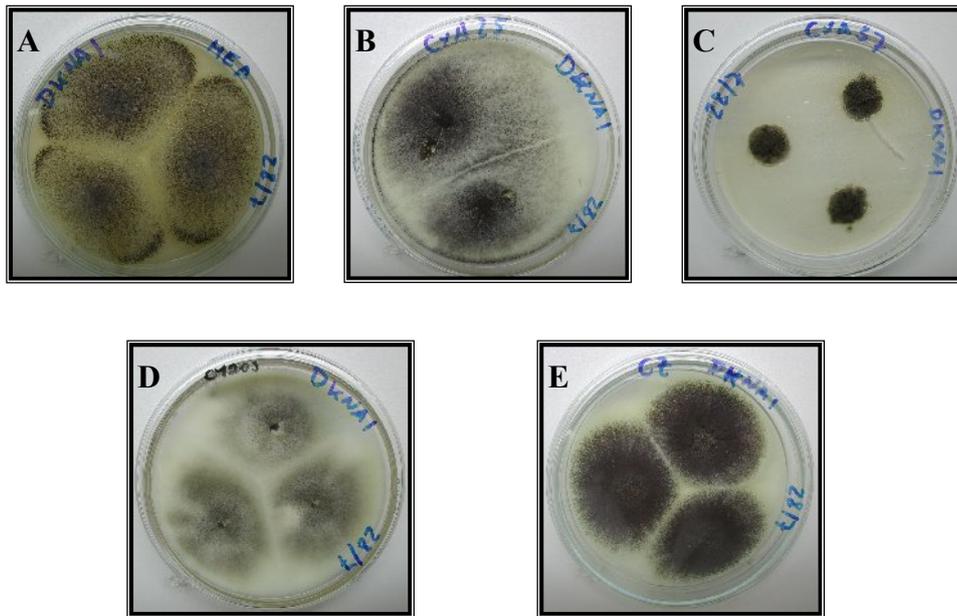


Figura 16: Características macroscópicas apresentadas por *A. japonicus* (DKNA1) nos meios de cultura: A – MEA; B – CYA25; C – CYA37; D – CY20S e E – CZ.

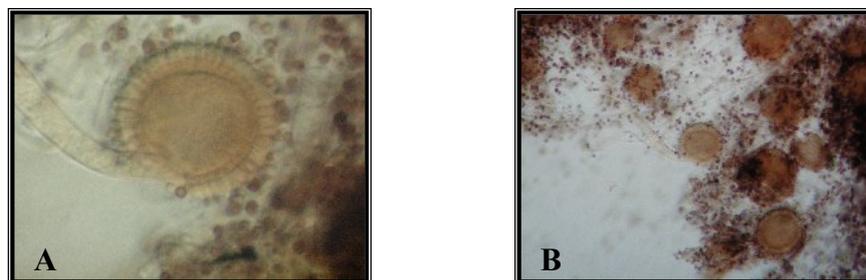


Figura 17: Características microscópicas apresentadas por *A. japonicus* (DKNA1): A – detalhe da vesícula, das fiáldes e dos conídios; B – estipes e cabeças conidiais.

4.1.3.1. DKBV1 *Acremonium* sp.

O isolado DKBV1 apresentou características comuns ao gênero *Acremonium* sp. Macroscopicamente apresentou colônia branca, plana, compacta, com aspecto algodado e crescimento rápido após 5 dias de incubação (SAMSON et al., 2002). As imagens referentes a colônia deste isolado não foram incluídas, pois estavam fora de foco.

Microscopicamente o fungo apresentou micélio septado muito fino (1 - 3 μ m), ramificado e hialino, presença de muitas anastomoses entre as hifas, pequenos esporos globosos agrupados em forma de flor produzidos em frágeis cadeias na extremidade das

fiálides e alguns esporos cilíndricos e alongados (Figura 18). Muitas espécies deste gênero são isoladas de plantas mortas e de solo (DOMSH et al., 1980; SAMSON et al., 2002).

Este isolado não foi identificado quanto ao gênero devido a grande dificuldade existente na identificação de espécies deste gênero e pela escassez de literatura para identificação precisa desta espécie.

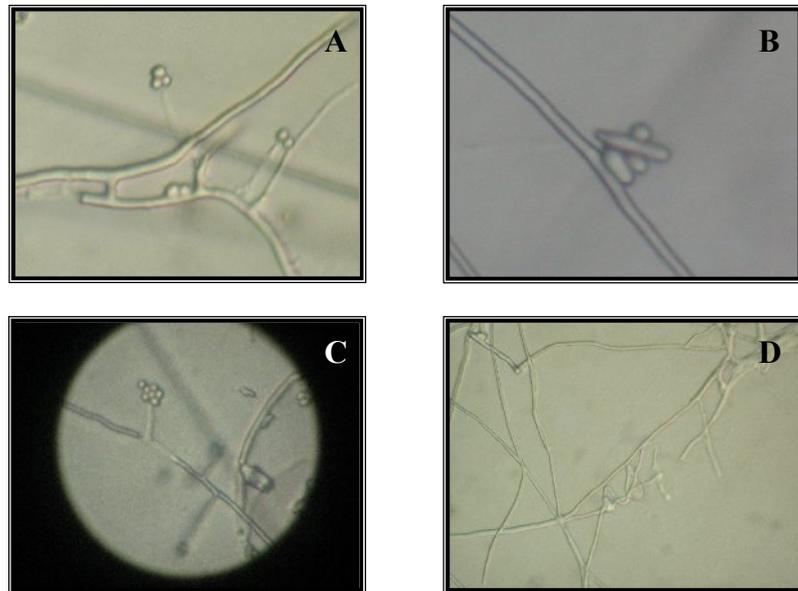


Figura 18: Características microscópicas apresentadas por *Acremonium* sp. A – anastomose entre hifas hialinas, B – detalhe dos esporos cilíndricos e alongados, C – detalhe dos esporos globosos agrupados em forma de flor nas extremidades das fiálides e D – micélio ramificado e hialino.

4.1.3.3. RV1 *Fusarium* sp.

O isolado RV1 foi identificado somente quanto ao gênero como *Fusarium* sp. por apresentar macroscopicamente crescimento rápido em meio sólido, hifas aéreas e microscopicamente diversos microconídios (Figura 19). Espécies deste gênero são comuns em solo (DOMSH et al., 1980; SAMSON et al., 2002). Não foi identificada a espécie, pois espécies deste gênero apresentam grandes variações nas características fenotípicas, sendo assim as caracterizações baseadas somente na morfologia são dificultadas, havendo necessidade de outros métodos taxonômicos, como a molecular, o que leva a taxonomia polifásica (PASCOE, 1990a; PASCOE, 1990b; GUARRO & GENÉ, 1992; NELSON et al., 1994). Mas nesta fase dos experimentos não houve possibilidade para realizar esta outra caracterização.

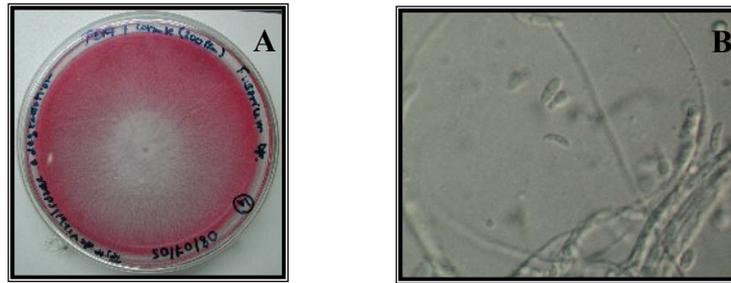


Figura 19: Características apresentadas por *Fusarium* sp. (A) Característica macroscópica em PDA + V198 e (B) Característica microscópica com detalhe de microconídios.

4.1.3.4. DKBV2 dematiaceo e DKNA2 *Aspergillus* sp.

O isolado DKNA2 foi identificado somente ao nível de gênero como *Aspergillus* sp., pois apresentou vesícula e fiálides características a este gênero com presença de conídios globosos. DKBV2 foi identificado como pertencente à família Dematiacea (SUTTON, 1980; ELLIS, 1971), pois apresentou micélio negro. Infelizmente não foi possível registrar as observações morfológicas destes dois fungos através das imagens digitalizadas.

Não foi identificada a espécie do isolado DKNA2, pois as características apresentadas confundiam-se com a de outras espécies do gênero e o isolado DKBV2 não foi identificado, pois não foram observadas as estruturas de reprodução o que não permitiu nem mesmo a identificação do gênero.

4.1.4. Seleção de fungos isolados de sedimento de igarapés em Manaus e da Coleção de Microrganismos de Referência do INCQS com capacidade de descolorir em meio líquido

Foram avaliados individualmente os 5 isolados do sedimento de igarapés em Manaus – AM, *Aspergillus japonicus* DKNA1, *Acremonium* sp. DKBV1, o Dematiaceo DKBV2, *Aspergillus* sp. DKNA2 e *Fusarium* sp. RV1, assim como em associação.

Estudos com microrganismos em associação têm sido realizados e têm apresentado resultados promissores (ASHGER et al., 2007; MACHADO et al., 2006; FANG et al., 2004). Assim foram testados em associação *Acremonium* sp. DKBV1 juntamente com o Dematiaceo DKBV2 e *Aspergillus* sp. DKNA2 em associação com *Aspergillus japonicus* DKNA1, pois estes fungos foram isolados do mesmo ponto de coleta (item 5.2.1.).

Foram avaliados ainda os fungos da Coleção de Microrganismos de Referência, *L. edodes* INCQS 40220, *Psilocybe* sp. INCQS 40212 e *Ceriporiopsis* sp. INCQS 40260.

Inicialmente foram testados na presença de 100 ppm de V198 somente os fungos isolados de sedimento, *Aspergillus japonicus* DKNA1, *Aspergillus* sp. DKNA2, *Acremonium* sp. DKBV1, dematiaceo DKBV2, *Fusarium* sp. RV1 e as associações juntamente com o fungo de referência *L. edodes*. Destes fungos, os que apresentaram boa capacidade de descoloração em relação ao corante V198 foram também testados na presença de A21, na mesma concentração. juntamente com os demais fungos da Coleção de Microrganismos de Referência do INCQS.

Inversamente ao realizado com os isolados de sedimento de Manaus, os fungos da Coleção de Microrganismos de Referência do INCQS foram primeiramente testados com o corante A21 e aqueles que fossem eficientes na descoloração deste corante seriam também testados na presença de V198. Estes fungos foram incluídos posteriormente ao estudo, por isso não seguiram a mesma seqüência usada para os fungos isolados de sedimento de Igarapés em Manaus.

4.1.4.1. Fungos testados na presença do corante V198

Na Tabela 5 estão apresentados os percentuais de descoloração nos tempos 0, 2, 5, 7, 14, 16, 19, 21 e 28 dias de cada isolado testado e as associações na presença de V198 .

4.1.4.1.1. *Aspergillus japonicus* DKNA1

A. japonicus DKNA1 apresentou em 7 dias de incubação 95,3%, de descoloração do corante V198 na concentração de 100 ppm, porém em 14 dias apresentou redução no percentual para 68,9% e em 28 dias alcançou percentual próximo ao inicial (90,4%), esta flutuação pode ter ocorrido devido a adsorção e dessorção do corante pela biomassa (Figura 20). Este mesmo perfil de dessorção do corante foi observado por outras espécies de *Aspergillus* (EL-RAHIM & MOAWAD, 2003).

O pico característico deste corante (520 nm) foi reduzindo após 14 dias de incubação, chegando em 28 dias com pico de 508 nm em uma das duplicatas e na outra o pico desapareceu, segundo Glenn & Gold (1983) somente quando o pico desaparece é possível afirmar que houve degradação, no entanto a biomassa apresentou certa modificação na coloração em 28 dias o que pode caracterizar degradação intracelular, assim por ter reduzido o pico característico e ter modificado a coloração da biomassa este foi selecionado para o teste de descoloração com o corante A21.

A mesma espécie deste estudo, *Aspergillus japonicus*, foi avaliada em outro estudo quanto a capacidade de adsorção de corante azo na concentração de 50 ppm pela biomassa

morta, e obtiveram 4% de descoloração do corante Preto Reativo 8, 9% do Marrom Reativo 9 e 7% do Verde Reativo 19 (KUMARI & ABRAHAM, 2007). Assim é possível inferir que a biomassa viva apresenta maior capacidade de adsorção de corantes do tipo azo.

O alto percentual de descoloração obtida pelas células vivas de *A. japonicus* pode envolver mecanismos mais complexos que a adsorção, como a atuação do sistema enzimático (e.g. oxidases extracelulares e intracelulares) (FU & VIRARAGHAVAN, 2001).

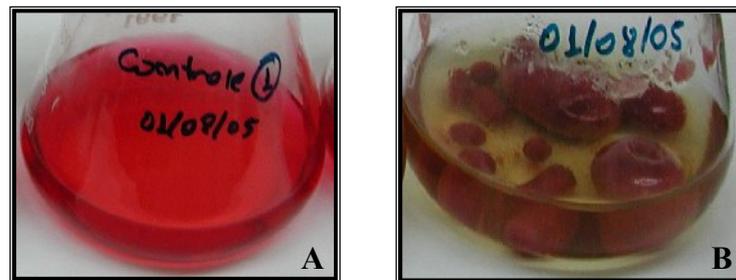


Figura 20: A – Frasco do controle corante V198 (100 ppm); B – Frasco do tratamento com *A. japonicus* DKNA1 após 28 dias de incubação.

4.1.4.1.2. *Aspergillus* sp. DKNA2

Aspergillus sp. DKNA2 na presença do corante V198 em 2 dias apresentou 8,2% de descoloração (Tabela 5), já em 5 dias de incubação apresentou coloração marrom escuro e permaneceu até 28 dias nesta condição. O pico característico do corante (520 nm) não desapareceu e foi observado aumento de um pico na região próxima à 355 nm. Segundo Souza & Peralta-Zamora (2006), as estruturas aromáticas absorvem fortemente na região próxima a 300 nm o que pode caracterizar produção de novos metabólitos, sendo assim esta pode ser a causa do aumento significativo na absorbância nesta região e conseqüentemente do escurecimento do meio, que por outro lado também pode ter sido causado pela a produção de pigmentos coloridos naturalmente produzidos pelos fungos e que confundem a interpretação dos resultados (COOKSON, 1995).

4.1.4.1.3. Associação de *Aspergillus japonicus* DKNA1 e *Aspergillus* sp. DKNA2

Na associação entre *A. japonicus* DKNA1 + *Aspergillus* sp. DKNA2 a descoloração de V198 foi eficiente alcançando em 7 dias de incubação o percentual de 82,8%; em 14 dias apresentou redução drástica (39%) que em 16 dias aumentou novamente (66,1%) e gradativamente subiu o percentual de descoloração até alcançar 78,6% em 28 dias de incubação. O meio apresentou coloração marrom claro e a biomassa vermelha. Ou seja, o resultado obtido em 7 dias voltou a se repetir ao final de 28 dias. A flutuação presente na

descoloração pela associação pode ter ocorrido devido à dessorção e sorção do corante pela biomassa, como ocorreu anteriormente com o isolado DKNA1 (item 4.1.4.1.1)

Sendo assim, não foi possível reproduzir os resultados obtidos a partir dos testes iniciais com as amostras de sedimento IDN de onde estes fungos foram isolados (Tabela 3, item 4.1.1.); provavelmente havia na amostra de sedimento algum fungo mais eficiente, que juntamente com os outros fungos isolados descoloriram eficientemente o corante, mas não foi isolado.

4.1.4.1.4. *Acremonium* sp. DKBV1

Neste estudo *Acremonium* sp. DKBV1 foi capaz de reduzir rapidamente a coloração do meio, apresentando em 2 dias 89,5% de descoloração do corante V198, e em 16 dias alcançou 100% de descoloração, porém em 28 dias a porcentagem retornou ao nível inicial (89,7%) (Tabela 5) e foi observado forte característica de adsorção do corante (Tabela 5). Assim, a flutuação na descoloração pode ter ocorrido devido à dessorção e sorção do corante pela biomassa. Esta observação é confirmada como adsorção do corante, pois segundo Glenn & Gold (1983) no caso de degradação o pico característico desapareceria definitivamente, e nesta avaliação não foi observado o desaparecimento do pico.

Não foram encontrados trabalhos relacionados à descoloração utilizando espécies deste gênero, porém Bhatt et al. (2006), observaram a capacidade de *Acremonium* sp. mineralizar 34% de um contaminante aromático de sedimento marinho, ciclotrimetileno-trinitro-amina, em 58 dias de incubação. Portanto, este gênero apresenta potencial para degradar diferentes compostos.

4.1.4.1.5. dematiaceo DKBV2

O dematiaceo DKBV2 não foi capaz de descolorir eficientemente o corante azo V198 (Tabela 5), intensificou a coloração do meio a partir do 5º dia e ao final de 28 dias tornou o meio vinho escuro. O pico característico do corante (520 nm) não desapareceu e na região próxima a 300 nm houve aumento na absorbância, característica semelhante à apresentada pelo isolado *Aspergillus* sp. DKNA2 (item 4.1.4.1.1.). Ou seja, produtos da degradação ou pigmentos coloridos estão sendo detectados visivelmente e através da espectrofotometria.

4.1.4.1.6. Associação entre *Acremonium* sp. DKBV1 e dematiaceo DKBV2

Na associação entre o dematiaceo DKBV2 e *Acremonium* sp. DKBV1 o corante foi adsorvido pela biomassa, pois apresentou coloração vermelho escuro. O percentual de descoloração do corante inicialmente foi de 14,8% (Tabela 5) e a partir do 7º dia houve intensificação na coloração do meio, tornando-se vermelho escuro. O pico característico do corante não desapareceu e foi observado aumento da absorbância na região próxima a 300 nm. Comparando os resultados dos fungos avaliados isoladamente e em associação, nota-se que o dematiaceo DKBV2 é o responsável pelo escurecimento do meio no tratamento pela associação *Acremonium* sp. DKBV1 com dematiaceo DKBV2 (item 4.1.4.1.4.).

4.1.4.1.7. *Fusarium* sp. RV1

Após 2 dias da adição do corante, o tratamento por *Fusarium* sp. RV1 apresentou descoloração de 74,6%, entre o 5º e o 16º houve oscilações no percentual, em 19 dias alcançou 100% de descoloração e manteve até o fim de 28 dias (Tabela 5). A partir do 5º dia foi observado redução do pico característico, em 19 dias desapareceu e em 21 dias surgiu novo pico. A biomassa apresentou coloração cinza e o meio coloração marrom, o que poderia ser resultado da produção de outros compostos também coloridos.

Na Figura 21 é mostrado o espectro obtido após o tratamento com *Fusarium* sp. RV1 na presença do corante V198, onde observa-se o pico característico de 520 nm do corante no tempo 0, seguido de desaparecimento em 19 dias de incubação e o surgimento do novo pico de aproximadamente 476 nm em 28 dias de incubação.

Junghanns et al. (2007) observaram que após o tratamento de vários corantes por diferentes fungos aquáticos, novos picos além dos picos dos corantes foram obtidos, indicando transformação dos corantes em metabólitos. Com base nos trabalhos de Glenn & Gold (1983), que afirmaram que a degradação do corante é comprovada pelo desaparecimento do pico característico do corante e de Junghanns et al. (2007), este isolado pode também ter transformado o corante em metabólitos que foram detectados através da espectrofotometria.

Rodriguez et al. (1996) avaliaram a capacidade de *Fusarium oxysporum* e *F. solani* de degradarem substâncias aromáticas como a lignina. A eficiência na degradação de lignina por estes isolados foi atribuída a presença de enzimas oxidativas não específicas. A lignina é um composto aromático, portanto estas enzimas podem também estar presentes no *Fusarium* sp. RV1 atuando na degradação do corante V198.

Comparando os resultados obtidos com *Fusarium* sp. RV1 (Tabela 5) com aqueles obtidos anteriormente a partir das culturas do sedimento (IR) (Tabela 3), pode-se afirmar que este isolado era o fungo que estaria atuando nos frascos de IR, pois apresentou as mesmas características observadas inicialmente (item 4.1.1.).

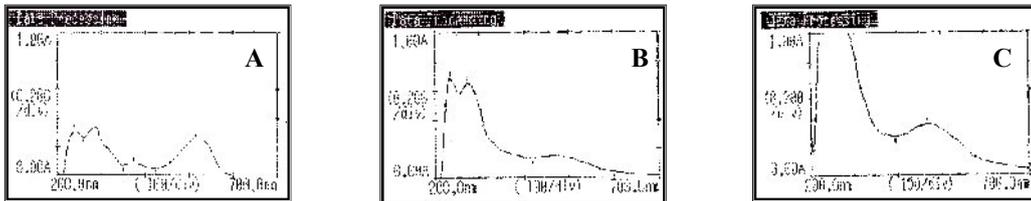


Figura 21: Espectros de absorvância de *Fusarium* sp. RV1 na presença do corante V198. A) Pico característico de 520 nm no tempo 0; B) desaparecimento do pico característico em 19 dias; C) Novo pico de 476nm em 28 dias de incubação com *Fusarium* sp RV1.

4.1.4.1.8. *Lentinula edodes* INCQS 40220

Na Figura 22 está representado em gráfico o perfil de descoloração do corante V198 por *L. edodes* INCQS 40220. Após 5 dias de incubação foi observado 70,7% de descoloração, em 7 dias obteve 95,3% e em 14 dias alcançou 100% de descoloração que foi mantido até 28 dias de incubação (Tabela 5). Em relação ao pico característico do corante, foi observado que foi reduzindo até 7 dias e em 14 dias desapareceu, não reaparecendo até 28 dias, ou seja, esta característica é confirmada como degradação deste corante. Outros estudos (BOER et al. 2004; NAGAI et al. 2002) com esse fungo comprovam sua grande capacidade de descolorir diversos corantes em meio líquido.

Tabela 5: Percentual de descoloração dos fungos testados somente na presença do corante V198 por 28 dias de incubação.

PERCENTUAL DE DESCOLORAÇÃO (%)									
Isolados Tempo	0 dias	2 dias	5 dias	7 dias	14 dias	16 dias	19 dias	21 dias	28 dias
<i>A. japonicus</i> DKNA1	0	53,5	89,5	95,3	68,9	71,1	69,3	74,9	90,4
<i>Aspergillus</i> sp.DKNA2	0	8,2	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. japonicus</i> DKNA1+ <i>Aspergillus</i> sp.DKNA2	0	54,9	78,8	82,8	39	66,1	70,2	78,6	78,6
<i>Acremonium</i> sp. DKBV1	0	89,5	97,6	97,1	98,9	100	95	89,5	89,7
dematiaceo DKBV2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acremonium</i> sp. DKBV1+dematiaceo DKBV2	0	14,8	13,8	0	0	0	0	0	0
<i>Fusarium</i> sp.RV1	0	74,6	53,3	42,7	59,1	52,4	100	100	100
<i>L. edodes</i> INCQS 40220	0	24,2	70,7	90,3	100	100	100	100	100

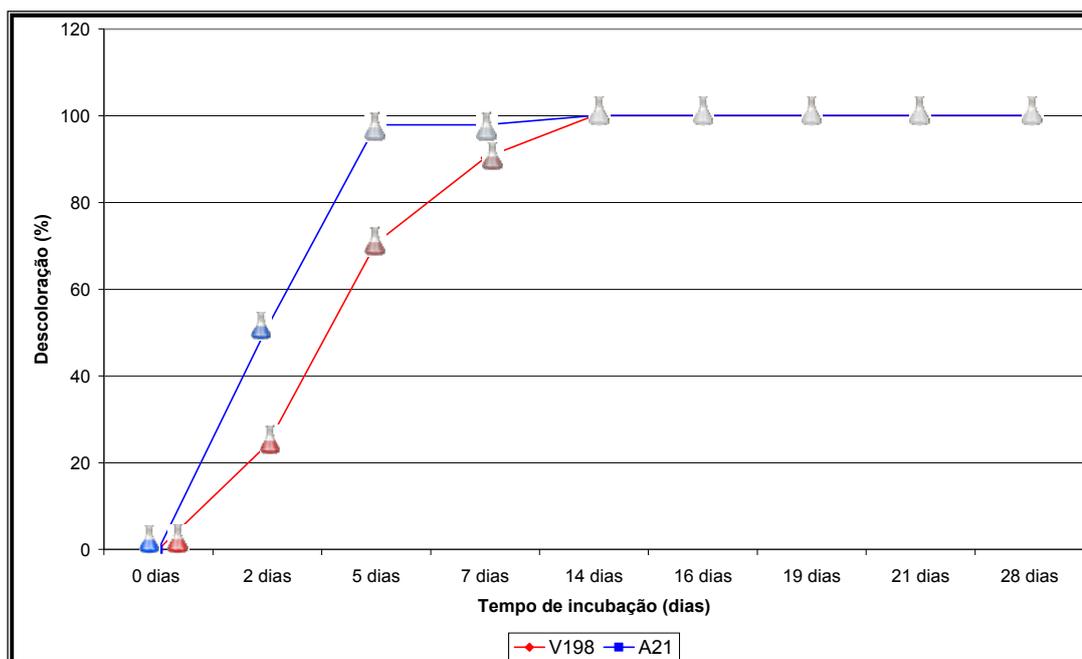


Figura 22: Gráfico do percentual de descoloração dos corantes V198 e A21 por *L. edodes* INCQS 40220 em 28 dias de incubação

4.1.4.2. Fungos testados na presença do corante A21

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados de descoloração do corante tipo ftalocianina A21 em 0, 2, 5, 7, 14, 16, 19, 21 e 28 dias, por *Psilocybe* sp. INCQS 40212, *Ceriporiopsis* sp. INCQS 40260 e *A. japonicus* DKNA1, que dentre aqueles isolados de Manaus foi o fungo que apresentou melhor percentual de descoloração do corante V198 e características de transformação do corante pela biomassa. Apesar de *Fusarium* sp. ter apresentado bom percentual de descoloração, este não foi testado pois apresentou coloração visível no meio após os 28 dias de incubação. O fungo de referência *L. edodes*, também foi avaliado na presença de A21.

4.1.4.2.1. *Psilocybe* sp. INCQS 40212

Psilocybe sp. INCQS 40212 em 14 dias apresentou 98,6% de descoloração na presença do corante A21, no entanto a partir de 16 dias começou a reduzir este percentual e em 28 dias apresentou 41% de descoloração (Tabela 6) e visivelmente o meio estava verde, sendo que o corante tem coloração azul. O pico característico do corante (675 nm) não desapareceu após tratamento por *Psilocybe* sp. INCQS 40212 e apresentou aumento na região próxima a 300 nm, o que pode caracterizar transformação do corante e/ou produção de metabólitos.

Já foi observado em outros estudos que *Psilocybe* sp. apresenta capacidade de degradar compostos aromáticos (da SILVA et al., 2003b) e ainda que pode ser aplicado em biorremediação (COMPART et al., 2007), porém neste estudo esta espécie não apresentou eficiência na descoloração de corantes, sendo assim não foi testado na presença de V198.

4.1.4.2.2. *Ceriporiopsis* sp. INCQS 40260

Após 2 dias de incubação *Ceriporiopsis* sp. INCQS 40260 na presença do corante A21 obteve 11,2% de descoloração, que foi reduzido em 5 dias para 4,8%. No entanto, após esta redução houve aumento da descoloração para 68% no 7º dia seguido de aumento gradual até alcançar 100% em 19 dias de incubação e manteve este percentual até 28 dias (Tabela 6). O pico característico do corante desapareceu em 19 dias e permaneceu até 28 dias, o que caracteriza, segundo Glenn & Gold (1983), a degradação do corante, porém a biomassa estava com coloração respectiva ao corante, azul, caracterizando a adsorção. Deste modo, por ser um fungo basidiomiceto como o fungo de referência *L. edodes* INCQS 40220, e não ter apresentado capacidade superior de descoloração ao do fungo de referência (item 4.1.4.2.3.),

ou seja, sem apresentar característica de adsorção, *Ceriporiopsis* sp. INCQS 40260 não foi testado na presença do corante V198.

4.1.4.2.3. *Aspergillus japonicus* DKNA1

Na presença de A21 este isolado apresentou descoloração mais rápida do meio do que quando na presença de V198 (Tabela 5), pois em 2 dias de incubação descoloriu 96,3% e em 5 dias alcançou 100% de descoloração, porém em 14 dias apresentou decréscimo no percentual para 98,7%, e foi reduzindo este percentual até 21 dias alcançando 68,8% (Tabela 6), ou seja, também apresentou característica de desorção do corante (Figura 23). O pico característico do corante desapareceu após 5 dias de incubação e reapareceu em 14 dias, permanecendo até 28 dias, que confirma se tratar de adsorção do corante (GLENN & GOLD, 1983), não foi observado aumento da absorvância em nenhum dos espectros.

Kumari & Abraham (2007) avaliaram a capacidade da biomassa morta de *A. japonicus* de descolorir 2 ftalocianinas, Azul Reativo 38 e Azul Reativo 3, e foi observado baixo percentual de descoloração, 20% e 12%, respectivamente. Assim, como observado no teste com o corante do tipo azo (item 4.1.4.1.1.), a biomassa viva de *A. japonicus* DKNA1 também apresenta capacidade superior ao da biomassa morta na adsorção de corantes como as ftalocianinas.

Alguns estudos realizados com espécies de *Aspergillus* demonstraram que a utilização destes como adsorventes são uma alternativa interessante para remoção de cor de efluentes (PARSHETTI et al., 2007; FU & VIRARAGHAVAN, 2002). Portanto, *A. japonicus* apresenta potencial como adsorvente.

4.1.4.2.3. *L. edodes* INCQS 40220

A Figura 22 demonstra através de representação gráfica, que o desempenho de descoloração por *L. edodes* INCQS 40220 foi mais rápido na presença de A21 (97,9%) que em V198 (70,7%), no entanto ambos alcançaram 100% em 14 dias de incubação. Assim, foi comprovada a eficiência de *L. edodes* INCQS 40220 na descoloração de diferentes tipos de corantes. Em relação à análise do pico característico de A21, *L. edodes* reduziu o pico até 7 dias e em 14 dias o pico do corante desapareceu e permaneceu nesta condição até 28 dias de incubação.

A Tabela 7 apresenta o resumo dos percentuais de descoloração referentes a cada fungo testado na presença de V198 e de A21 após 28 dias de incubação.



Figura 23: 1 – Frascos antes da filtração; 2 - Frascos filtrados em membrana 0,22 μm . A – Controle corante A21 (100 ppm); B – Frasco do tratamento com *A. japonicus* DKNA1 após 28 dias.

Tabela 6: Percentual de descoloração dos fungos testados somente na presença do corante A21 por 28 dias de incubação.

PERCENTUAL DE DESCOLORAÇÃO (%)									
Isolados Tempo	0 dias	2 dias	5 dias	7 dias	14 dias	16 dias	19 dias	21 dias	28 dias
	<i>Psilocybe</i> sp. INCQS 40212	0	47,5	62,4	70,2	98,6	93,1	88,4	72,6
<i>Ceriporiopsis</i> sp. INCQS 40260	0	11,2	4,8	68	85,2	92,8	100	100	100
<i>A. japonicus</i> DKNA1	0	96,3	100	100	98,7	91,3	88,7	78,8	84,8
<i>L. edodes</i> INCQS 40220	0	51,3	97,9	97,9	100	100	100	100	100

Tabela 7: Resumo do percentual de descoloração dos fungos testados em 28 dias de incubação.

Isolados	Percentual de descoloração	
	V198	A21
<i>Aspergillus japonicus</i> DKNA1	90,4	84,8
<i>Aspergillus</i> sp. DKNA2	0	NT
<i>Aspergillus japonicus</i> DKNA1 + <i>Aspergillus</i> sp. DKNA2	78,6	NT
<i>Acremonium</i> sp. DKBV1	86,7	NT
Dematiaceo DKBV2	0	NT
<i>Acremonium</i> sp. DKBV1 + dematiaceo DKBV2	0	NT
<i>Fusarium</i> sp. RV1	100	NT
<i>L. edodes</i> INCQS 40220	100	100
<i>Psilocybe</i> sp. INCQS 40212	NT	41
<i>Ceriporiopsis</i> sp. INCQS 40260	NT	100

NT – não testado

4.1.5. Estudo da descoloração em meio líquido pelos fungos selecionados

Os fungos isolados de sedimento de igarapés em Manaus apresentaram forte característica de adsorção e dessorção do corante ao longo do período de incubação, sendo que alguns intensificaram a coloração. Sendo assim, nenhum dos isolados foram selecionados para os estudos de descoloração com os demais corantes. Os fungos da Coleção de Microrganismos de Referência, *Psilocybe* sp. INCQS 40212 e *Ceriporiopsis* sp. INCQS 40260 que foram testados com A21 e também apresentaram adsorção do corante. Portanto estes fungos também não foram selecionados.

Posteriormente aos experimentos para os fungos eficientes na descoloração (item 4.1.4.), foi decidido testar a capacidade de outro isolado da Coleção de Microrganismos de Referência, o fungo anamórfico *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211, isolado de sedimento estuarino, por ter sido capaz de degradar hidrocarbonetos aromáticos (da SILVA et al., 2003b). É também justificada a sua utilização por ter outros estudos com outras espécies deste mesmo gênero que demonstraram capacidade de degradar e transformar lignina (RODRÍGUEZ et al., 1994).

Deste modo foram selecionados para os testes de descoloração de todos os corantes isoladamente, incluindo o corante ainda não testado A214, e a mistura dos corantes, MXC, apenas pelo fungo de referência, *L. edodes* INCQS 40220, e *P. simplicissimum* INCQS 40211.

O tempo de incubação foi reduzido para 14 dias com base na capacidade de *L. edodes* INCQS 40220 descolorir 100% neste período (item 4.1.4.). Na Tabela 8 estão apresentados os

percentuais de descoloração obtidos por *L. edodes* INCQS 40220 e *P. simplicissimum* INCQS 40211 ao longo dos 14 dias de incubação na presença dos corantes V198, A21, A214 e MXC.

Tabela 8: Percentual de descoloração dos corantes V198, A21, A214 e MXC por *L. edodes* INCQS 40220 e *P. simplicissimum* INCQS 40211 em 14 dias de incubação.

PERCENTUAL DE DESCOLORAÇÃO (%)										
Isolados	<i>L. edodes</i> INCQS 40220					<i>P. simplicissimum</i> INCQS 40211				
Corantes	Tempo de incubação (dias)					Tempo de incubação (dias)				
	0	2	5	7	14	0	2	5	7	14
V198	0	5,5	68,2	81,1	100	0	89,8	98,4	100	100
A21	0	36,8	100	100	100	0	100	100	100	100
A214	0	5,6	100	100	100	0	81	99	100	100
MXC	0	29,1	94,3	96,7	100	0	96,3	96,7	100	100

P. simplicissimum INCQS 40211 apresentou boa capacidade de descoloração dos diferentes corantes testados (Tabela 8), com característica comum aos outros fungos testados anteriormente, a adsorção. No entanto, foi observada descoloração visível da biomassa após a adsorção do corante no decorrer dos 14 dias de incubação, o que pode significar uma metabolização do corante através do sistema enzimático intracelular.

Na presença do corante V198 foi observada completa descoloração por *P. simplicissimum* INCQS 40211 em 7 dias de incubação e demonstrou grande redução na coloração da biomassa ao longo do período de incubação (Tabela 8, Figura 24). Com base na descoloração da biomassa e na redução do pico característico do corante em 2 e 5 dias, até desaparecer em 7 dias, permanecendo nesta condição até 14 dias, é possível que tenha ocorrido metabolização do corante. Esta observação é confirmada como adsorção do corante seguido de degradação, devido à redução na coloração da biomassa e ao desaparecimento do pico característico do corante (520 nm) (GLENN & GOLD, 1983).

Outro fungo não basidiomiceto, *Cunninghamella elegans*, foi avaliado na presença do mesmo corante V198 e este apresentou, após 7 dias de incubação, 80% de adsorção do corante (AMBRÓSIO & CAMPOS-TAKAKI, 2004).

P. simplicissimum INCQS 40211 na presença do corante A21 foi capaz de descolorir completamente o corante em 2 dias de incubação, apresentando maior rapidez na adsorção do corante quando comparado aos demais corantes testados (Tabela 8). O pico característico do

corante foi reduzido em 2 dias, em 5 dias desapareceu e manteve-se até 14 dias, assim devido à redução na cor da biomassa, e o desaparecimento do pico característico pode-se inferir que ocorreu degradação deste corante (GLENN & GOLD, 1983). A Figura 25 apresenta a biomassa fúngica que demonstrou redução na coloração principalmente entre o 7º e o 14º dia.

Comparando a capacidade de descoloração de *P. simplicissimum* INCQS 40211, com o fungo ligninolítico, *Phanerochaete chrysosporium*, muito estudado em relação à degradação de vários compostos tóxicos, e que foi testado na presença do mesmo corante A21, este apresentou completa descoloração em 7 dias (CONEELY et al., 1999) enquanto *P. simplicissimum* INCQS 40211 apresentou em 2 dias (Tabela 8). Deste modo, a capacidade demonstrada *P. simplicissimum* INCQS 40211, pode ser comparada a este fungo, em relação ao tempo de descoloração.

A capacidade de descoloração dos fungos é também dependente da estrutura do corante (FU & VIRARAGHAVAN, 2001). A21, uma ftalocianina, apresenta em sua estrutura o cobre que pode influenciar na capacidade de descoloração por alguns fungos como foi observado no estudo realizado por Novotný et al. (2004), onde A21 foi considerado o mais tóxico inibindo o crescimento de alguns fungos. Em outro estudo com o mesmo corante foi observada maior resistência na descoloração biológica no tratamento com culturas de bactérias metanogênicas (FONTENOT et al., 2003), Portanto *P. simplicissimum* INCQS 40211, comparado a estes outros organismos apresenta maior resistência e eficiência no tratamento deste tipo de corante.

Na presença do corante A214 em 7 dias foi observado 100% de descoloração, porém visivelmente houve menor redução na coloração da biomassa (Tabela 8, Figura 26). Na análise dos espectros, o pico característico do corante (608 nm) desapareceu em 5 dias e simultaneamente um pico de 540 nm surgiu, este permaneceu em 7 dias e em 14 dias desapareceu. A formação destes novos picos pode ser indicativo de biotransformação do corante (JUNGHANNS et al., 2007).

Quando comparado aos outros corantes testados, *P. simplicissimum* INCQS 40211 apresentou maior dificuldade em reduzir a coloração da biomassa, isso ocorreu provavelmente pela maior complexidade na estrutura deste corante. A capacidade de descoloração dos fungos é também dependente da estrutura do corante (FU & VIRARAGHAVAN, 2001).

P. simplicissimum INCQS 40211 quando testado na presença da mistura dos corantes, MXC, em 5 dias apresentou 100% de descoloração e manteve este percentual até 14 dias (Tabela 8), foi visivelmente observada boa redução na coloração da biomassa entre 7 e 14

dias (Figura 27). O pico característico foi reduzido em 2 dias e em 5 dias o pico característico desapareceu, não reaparecendo em 7 ou 14 dias. Assim o tratamento de MXC por *P. simplicissimum* INCQS 40211 também foi caracterizada como degradação, uma vez que não reapareceu após 5 dias de incubação (GLENN & GOLD, 1983).

Com base nestes experimentos, *P. simplicissimum* INCQS 40211 possui grande capacidade de descolorir a mistura de diferentes tipos de corantes, como monoazo (V198), diazo (A214) e ftalocianina (A21), uma vez que o pico característico do corante testado desapareceu e ainda a coloração da biomassa foi reduzida.

Em estudo realizado por Zheng et al. (1999) demonstraram que a espécie do gênero *Penicillium* sp. apresenta habilidade na remoção de corante por adsorção e subsequente degradação. No entanto, Yang et al. (2003) ao avaliarem outra espécie deste gênero, *Penicillium geastrivorus*, não observaram a presença das enzimas consideradas as maiores responsáveis pela degradação de corantes, como lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase, o que pode representar a variabilidade na capacidade de secreção de enzimas por espécies deste gênero.

Trabalhos relacionados à descoloração de corantes por *P. simplicissimum* não foram encontrados, mas há estudos sobre atividade enzimática deste fungo. Em estudo realizado por Zeng et al. (2006) foi observada a produção de lacase e que a atividade desta enzima aumentou significativamente após o esgotamento da fonte de carbono simples, a celulose, passando a utilizar fonte de carbono mais complexa, a lignina.

Outro estudo demonstrou a produção de enzima intracelular por *P. simplicissimum*, como o álcool vanílico oxidase, que é responsável por catalisar grande variedade de compostos fenólicos (FRAAIJE et al., 1995; FRAAIJE et al., 1997).

Deste modo é possível sugerir que a redução na coloração da biomassa por *P. simplicissimum* neste trabalho ocorreu visivelmente entre o 7º e o 14º dia devido ao fungo já ter consumido a fonte de carbono simples, glicose, e ter começado a utilizar o corante adsorvido como fonte de carbono complexo a partir de enzimas intracelulares ou mesmo extracelulares. Seria necessário confirmar estas possibilidades fazendo análises para detectar a presença e atuação de enzimas neste processo de metabolização.

No tratamento de efluentes têxteis é utilizado o processo tradicional por lodo ativado, onde ocorre adsorção do corante. Esta é uma das desvantagens encontradas neste processo, uma vez que o teor de corantes adsorvidos pela biomassa é elevado.

P. simplicissimum apresentou característica semelhante ao lodo ativado ao adsorver o corante no início da incubação. Porém a descoloração da biomassa ao longo do período de incubação é interessante para uma possível aplicação deste fungo em tratamento de efluentes, pois além de adsorver parte dos corantes também há transformação destes compostos.

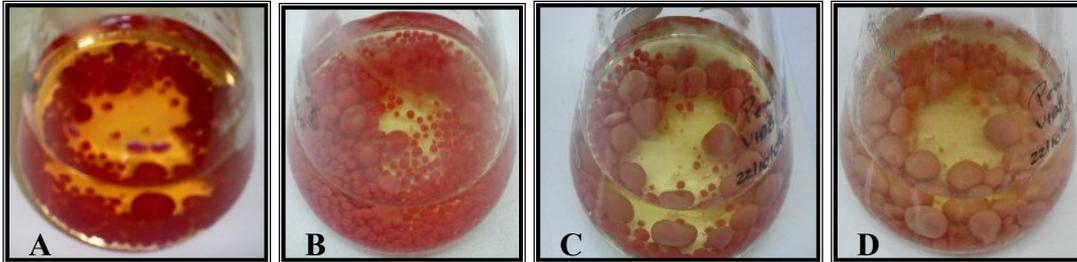


Figura 24: Frascos contendo o corante V198 tratados por *P. simplicissimum* INCQS 40211. A – 2 dias; B - 5 dias; C – 7 dias e D – 14 dias de incubação.

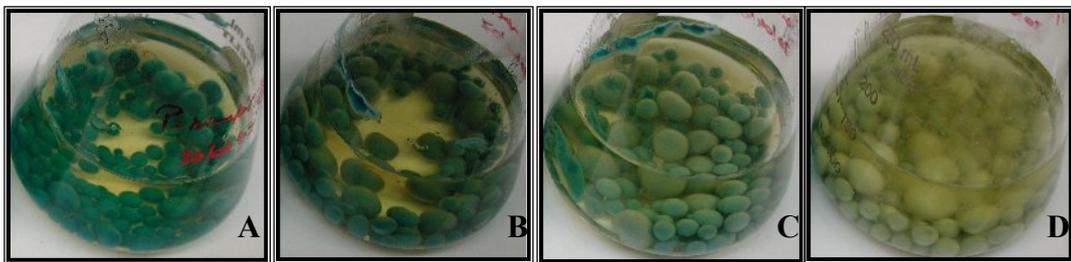


Figura 25: Frascos contendo o corante A21 tratados por *P. simplicissimum* INCQS 40211. A – 2 dias; B - 5 dias; C – 7 dias e D – 14 dias de incubação.

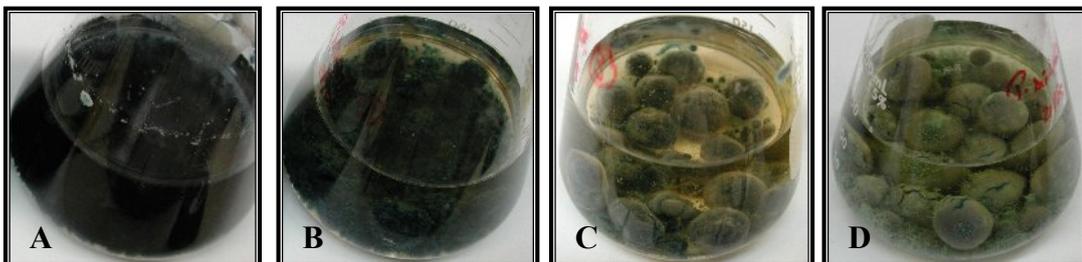


Figura 26: Frascos contendo o corante A214 tratados por *P. simplicissimum* INCQS 40211. A – 2 dias; B - 5 dias; C – 7 dias e D – 14 dias de incubação.

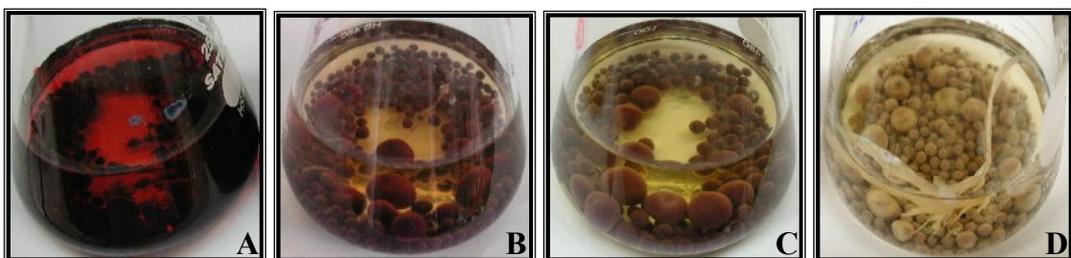


Figura 27: Frascos contendo a mistura dos corantes MXC tratados por *P. simplicissimum* INCQS 40211. A – 2 dias; B - 5 dias; C – 7 dias e D – 14 dias de incubação.

L. edodes INCQS 40220 apresentou completa descoloração na presença de V198 em 14 dias de incubação (Tabela 8, Figura 28), como observado anteriormente (Tabela 5, item 4.1.4.1.8.). O pico característico do corante foi reduzido em 5 e 7 dias, desaparecendo em 14 dias de incubação. Assim pode-se inferir que ocorreu degradação, devido o desaparecimento o pico característico do corante (GLENN & GOLD, 1983).

Na presença de A21 *L. edodes* INCQS 40220 apresentou descoloração rápida alcançando 100% em 5 dias (Tabela 8, Figura 29), anteriormente apresentou 100% em 14 dias (Tabela 6, item 4.1.4.2.3.), no entanto revelou característica não apresentada anteriormente, a adsorção deste corante, assim é justificada a maior agilidade de descoloração devido a adsorção do corante. Neste experimento o pico característico do corante (675 nm) desapareceu completamente em 5 dias e permaneceu ausente até 14 dias, caracterizando a degradação do corante (GLENN & GOLD, 1983).

Segundo Santos et al. (2004) a estrutura do corante, a composição do meio de cultura, as condições de pH, temperatura e agitação podem influenciar nos resultados. Neste estudo foi identificada apenas uma variável, o volume do meio, anteriormente utilizava-se 50 mL e nesta fase dos testes foi utilizado 150 mL, talvez esta variável tenha influenciado na alteração do potencial de descoloração de *L. edodes*, pois foi o aumentado o volume mas não a rotação utilizada (140 rpm).

Os corantes A214 (Figura 30) e a mistura MXC (Figura 31) tratados por *L. edodes* INCQS 40220 apresentaram 100% de descoloração após 5 e 14 dias, respectivamente (Tabela 8). No entanto, foi observado adsorção do corante pela biomassa no 5º dia de incubação, permanecendo nesta condição até 14 dias.

Em relação ao desempenho de *L. edodes* INCQS 40220 na descoloração do corante A214 foi observado que o meio apresentava coloração avermelhada. Na análise dos espectros foi observado desaparecimento do pico característico do corante (608 nm) em 5 dias e simultaneamente o surgimento do pico de 485 nm, em 7 dias este pico foi reduzido para 470 nm e em 14 dias desapareceu. Segundo Junghanns et al. (2007) a formação de novos picos pode ser um indicativo de biotransformação do corante.

Deste modo, a estrutura deste corante pode ter influenciado na redução da capacidade de descoloração por *L. edodes*. Assim, estudos posteriores com *L. edodes* INCQS 40220 deverão ser realizados, a fim de observar se haverá novas variações quanto a sua capacidade de descoloração.

O pico característico da mistura, MXC (620 nm), desapareceu em 14 dias de incubação e não houve aparecimento de novos picos, deste modo é confirmada a degradação deste corante.

Portanto neste estudo de descoloração *P. simplicissimum* INCQS 40211 apresentou maior agilidade no tempo de descoloração em relação aos corantes V198, A21 e da MXC quando comparado com *L. edodes* INCQS 40220, e mesmo apresentando adsorção do corante, este foi capaz de reduzir esta coloração da biomassa. Em relação ao corante A214 ambos os fungos apresentaram aspectos negativos após a descoloração, tendo *L. edodes* INCQS 40220 apresentado coloração visível no meio e *P. simplicissimum* INCQS 40211 apresentou após adsorção do corante menor capacidade de redução na coloração da biomassa.

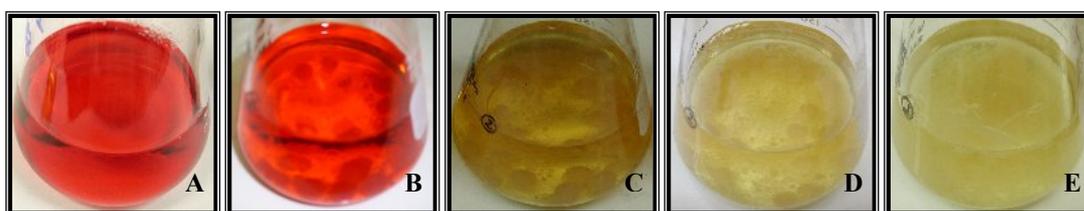


Figura 28: Frascos contendo o corante V198 tratados por *L. edodes*. A – controle V198; B – 2 dias; C- 5 dias; D – 7 dias e E – 14 dias de incubação.

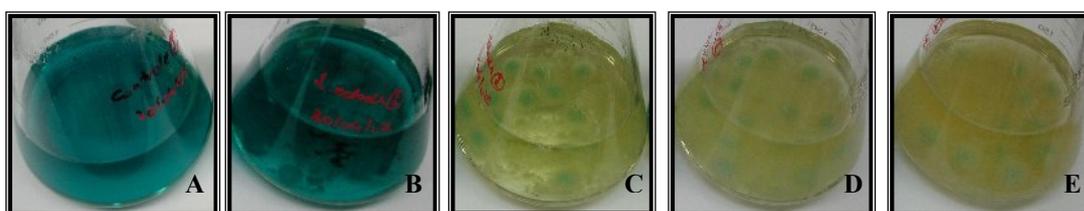


Figura 29: Frascos contendo o corante A21 tratados por *L. edodes*. A – controle A21; B – 2 dias; C- 5 dias; D – 7 dias e E – 14 dias de incubação.

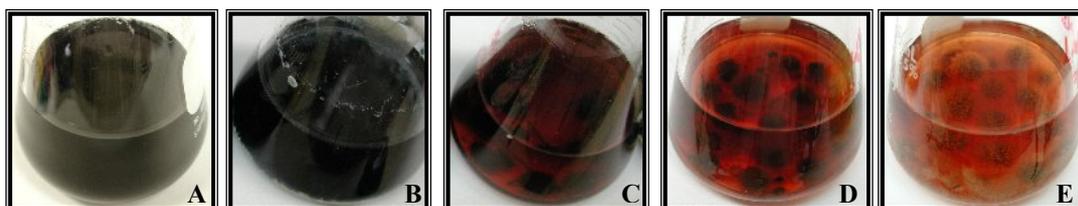


Figura 30: Frascos contendo o corante A214 tratados por *L. edodes*. A – controle A214; B – 2 dias; C- 5 dias; D – 7 dias e E – 14 dias de incubação.



Figura 31: Frascos contendo a mistura dos corantes MXC tratados por *L. edodes*. A – controle MXC; B – 2 dias; C- 5 dias; D – 7 dias e E – 14 dias de incubação.

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

A utilização de microrganismos na biorremediação pode produzir compostos intermediários, que algumas vezes, podem ser tóxicos ou mais tóxicos do que o composto original. Assim existe a necessidade de realização de estudos de descoloração associados à avaliação de toxicidade após o tratamento.

Alguns estudos de descoloração por fungos vêm sendo acompanhados por análises toxicológicas, utilizando testes como: a bactéria *Bacillus cereus* (PALMIERI et al., 2005), a planta *Lemma minor* (EICHLEROVÁ et al., 2007), o cnidário *Hydra attenuatam*, a alga *Selenastrum capricornutum*, sementes de alface *Lactuca sativa* (DELLAMATRICE et al., 2005), Teste de Ames utilizando a bactéria *Salmonella typhimurium* (EL-RAHIM & MOAWAD, 2003), microtox utilizando bactérias luminescentes (RAMSAY & NGUYEN, 2002), entre outros testes.

A fim de verificar a capacidade de alguns fungos deste estudo de reduzirem a toxicidade após a descoloração de corantes têxteis, foi realizada a análise toxicológica utilizando o microcrustáceo *Daphnia pulex*, sangue periférico humano total (Ensaio cometa) e a bactéria *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames).

Inicialmente foram analisados toxicologicamente, utilizando o microcrustáceo *Daphnia pulex*, os meios tratados pelos fungos que apresentaram melhores resultados na descoloração dos corantes V198 e A21 visivelmente e por espectrofotometria após 28 dias de incubação (item 4.1.4.). Assim, foram avaliados os meios de *A. japonicus* DKNA1, que teve melhor desempenho na descoloração dos corantes, apesar da adsorção de parte deles pela biomassa, e o meio do fungo de referência *L. edodes* INCQS 40220 (item 4.1.4).

Posteriormente os meios tratados pelos fungos selecionados no item 4.1.5., *P. simplicissimum* e *L. edodes* foram testados com o microcrustáceo *Daphnia pulex* em relação à redução da toxicidade dos corantes V198, A21, A214 e da mistura MXC. *L. edodes* foi testada

novamente em A21 e V198, por ser o fungo de referência. Como estes fungos foram os que apresentaram os melhores resultados de descoloração (item 4.1.5.), também foram avaliados seus tratamentos quanto à genotoxicidade (Ensaio Cometa), utilizando sangue periférico total humano e ainda quanto ao potencial mutagênico e citotóxico utilizando a bactéria *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames).

4.2.5.1. Avaliação toxicológica, com microcrustáceo *Daphnia pulex*, dos meios tratados por *A. japonicus* e *L. edodes* após 28 dias de incubação na presença dos corantes V198 e A21

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados de toxicidade juntamente com os parâmetros físico-químicos dos isolados com melhores percentuais de descoloração após 28 dias de incubação.

Precedendo a exposição às daphnias, foram analisados os parâmetros físico-químicos das amostras dos corantes A21 e V198 e dos tratamentos por *A. japonicus* e *L. edodes*, pois as daphnias vivem bem em pH entre 7,0 e 8,0 e com Oxigênio dissolvido (OD) superior a 2 mg/mL, valores inferiores a estes podem influenciar na sobrevivência das daphnias.

Assim foi observado que todas as amostras apresentaram pH inferior à 7,0 e precisavam ser ajustadas utilizando solução de NaOH 1N, já o OD em todas as amostras analisadas foram superiores à 2 mg/mL, ou seja, valores em que há possibilidade de sobrevivência das daphnias (Tabela 9).

Após a exposição das daphnias às amostras dos corantes, foi observado que os corantes V198 e A21 apresentaram redução do OD, para 0,07 mg/mL e 0,05 mg/mL, respectivamente, e que o corante V198 apresentou Fator de Toxicidade (FTd) de 125 e A21 apresentou FTd 111 (Tabela 9). Estes valores podem ter sido influenciados pela redução de OD.

Os corantes do tipo azo já são conhecidos quanto a sua toxicidade a diversos organismos. Em relação ao corante A21, ftalocianina de cobre, Bae & Freeman (2007) avaliaram a toxicidade de corantes do tipo azo utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna*, sendo que um dos corantes testados de outro tipo que não azo, o Azul Direto 218, mereceu destaque por ter sido muito tóxico às daphnias. Os autores associaram essa toxicidade à presença de cobre na estrutura deste corante. Deste modo a toxicidade apresentada pelo corante A21 neste estudo pode ser devido à presença de cobre em sua estrutura.

Os meios tratados por *A. japonicus* e *L. edodes*, tanto na presença de V198 quanto de A21, foram redutores do OD (OD < 2 mg/mL), que influencia na sobrevivência das daphnias. *L. edodes* apresentou maior percentual de redução da toxicidade 93,4% (FTd 8,3) do V198 que *A. japonicus* DKNA1, que reduziu 92% (FTd 10). Já o tratamento de corante A21 por *A. japonicus* DKNA1 reduziu 97,4% da toxicidade, enquanto *L. edodes* reduziu 95,5% (Tabela 9).

Abadulla et al. (2000) utilizaram a bactéria *Pseudomonas putida* para avaliar a toxicidade após o tratamento por lacase imobilizada do fungo *Trametes hirsuta* de 2 corantes do tipo azo e outro tipo que apresenta cobre em sua estrutura. Eles observaram através deste teste baixo percentual de redução da toxicidade, sendo 11,4% de redução do corante azo Preto Reativo 5, 39% do azo Azul Direto 71 e 4,1% do corante com presença de cobre na estrutura. Comparando estes resultados com os obtidos neste trabalho, *L. edodes* e *A. japonicus* DKNA1 são mais eficientes na redução da toxicidade de corantes do tipo azo e de corantes tipo ftalocianina de cobre, como o A21.

Apesar destes resultados, *A. japonicus* DKNA1 não foi selecionado para os experimentos posteriores, pois nos experimentos anteriores de descoloração a redução da cor do meio foi resultado principalmente da adsorção dos corantes. Este experimento com as daphnias foi realizado com este fungo visto que era o fungo que mais se sobressaiu em relação aos outros isolados de Manaus.

Tabela 9: Resultados do ensaio toxicológico com microcrustáceo *Daphnia pulex* dos isolados que apresentaram melhor percentual de descoloração dos corantes V198 e A21 após 28 dias de incubação.

Amostras	pH		OD (mg/mL)		FTd 24h	
	Antes 24h	Após 24h	Antes 24h	Após 24h	Valor medido	% de redução
Corante V198	4,87	6,71	4,60	0,07	125	-
<i>A. japonicus</i> em V198	6,90	7,09	6,09	0	10	92
<i>L. edodes</i> em V198	5,87	6,95	6,36	0	8,3	93,4
Corante A21	4,72	7,09	6,44	0,05	111	-
<i>A. japonicus</i> em A21	6,41	6,68	3,88	0,04	4	96,4
<i>L. edodes</i> em A21	6,39	6,61	5,34	0,06	5	95,5

Nota: OD – Oxigênio dissolvido; FTd – Fator de toxicidade.

4.2.5.2. Avaliação toxicológica dos meios tratados pelos fungos selecionados *P. simplicissimum* INCQS 40211 e *L. edodes* INCQS 40220 após 14 dias de incubação na presença dos corantes V198, A21, A214 e da mistura MXC.

Os fungos selecionados no item 4.1.5., *P. simplicissimum* e *L. edodes*, foram testados em relação à redução da toxicidade dos corantes V198, A21, A214 e mistura MXC através de diferentes metodologias, com o microcrustáceo *Daphnia pulex*, com sangue periférico humano quanto à genotoxicidade (Ensaio Cometa) e ainda avaliados quanto ao potencial mutagênico e citotóxico utilizando a bactéria *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames).

4.2.5.2.1. Avaliação de toxicidade com o microcrustáceo *Daphnia pulex*

Inicialmente foram analisados os parâmetros físico-químicos que pudessem influenciar à análise dos resultados. Foi observado que todas as amostras dos corantes V198, A21, A214 e mistura MXC e os tratamentos por *P. simplicissimum* e *L. edodes* apresentavam características ácidas, pH em torno de 4,0 e 5,0 (Tabela 10), assim foi realizado o ajuste do pH para 7,0. O parâmetro de Oxigênio Dissolvido (OD) em todas as amostras apresentaram valores superiores à 2 mg/mL (Tabela 10), não sendo necessária a oxigenação do meio.

Após a exposição das daphnias às amostras de corantes, foi observado que todos os corantes testados apresentaram redução do OD. Em relação à toxicidade os corantes considerados mais tóxicos foram V198 e A21, com fator de toxicidade (FTd) de 125 e 128, respectivamente (Tabela 10). Estes resultados são semelhantes ao observado anteriormente (Tabela 9), o que garante a reprodutibilidade da utilização deste teste na detecção da toxicidade dos corantes. O corante A214 e a mistura MXC apresentaram toxicidade muito baixa quando comparados aos outros 2 corantes, com FTd 14,3 e FTd 2,5, respectivamente (Tabela 10).

O tratamento por *P. simplicissimum* apresentou bom percentual de redução da toxicidade do corante V198, 87,2% (FTd 16), e do corante A21, 93,7% (FTd 8). Já o tratamento dos corantes V198 e A21 por *L. edodes* foram diferentes do apresentado anteriormente (Tabela 9), pois aumentou para ambos os corantes em 107,2% de V198 (FTd 259) e 300,7% de A21 (FTd 513) (Tabela 10).

Como discutido anteriormente (item 4.1.5.), a alteração na capacidade de *L. edodes* de reduzir a toxicidade, assim como em relação a sua capacidade de descoloração, pode também estar sendo influenciada pela alteração do volume de meio. Contudo, em relação à toxicidade, outro aspecto pode estar influenciando o aumento da toxicidade, o tempo de incubação. No experimento anterior a capacidade de *L. edodes* reduzir a toxicidade foi testada após 28 dias

de incubação, neste teste a avaliação foi realizada após 14 dias. Assim, metabólitos produzidos a partir da degradação dos corantes por *L. edodes* em 14 dias de incubação podem ter influenciado nesta resposta tóxica, enquanto que em 28 dias de incubação o próprio fungo pode ter tido mais tempo para eliminar os compostos tóxicos as daphnias.

Em estudo realizado por Nascimento (2008) foi observado que o tratamento por *L. edodes* dos corantes V198 e A214 aumentaram a toxicidade em aproximadamente 20000% e 4900%, respectivamente. Assim, estes resultados demonstram que há reprodutibilidade deste ensaio, pois em ambos os estudos *L. edodes* apresentou o mesmo perfil de toxicidade.

Os meios tratados por *P. simplicissimum* e *L. edodes* apresentaram aumento na toxicidade quando comparados ao composto original, o corante A214 (FTd 14,3). *P. simplicissimum* aumentou a toxicidade em 39,9% (FTd 20) e *L. edodes* foi ainda mais tóxico aumentando em 599,3% (FTd 100) (Tabela 10).

L. edodes e *P. simplicissimum* podem ter transformado parte do corante em metabólitos mais tóxicos do que o próprio corante, que possui estrutura mais complexa. No entanto, mesmo *P. simplicissimum* tendo demonstrado aumento da toxicidade, ainda foi bem inferior ao apresentado pelo fungo de referência *L. edodes* (Tabela 10).

Como discutido anteriormente (item 4.1.5.), *P. simplicissimum* e *L. edodes* apresentaram maior dificuldade em descolorir o corante A214 (Figura 26 e Figura 30), mas mesmo assim parte do corante pode ter sido transformado e resultado em metabólitos tóxicos. *P. simplicissimum*, apesar de ter aumentado a toxicidade do meio, este ainda estava menos tóxico do que o meio após o tratamento com o fungo de referência *L. edodes*.

Em relação à mistura MXC houve um aumento na toxicidade do corante após o tratamento pelos 2 fungos testados. *P. simplicissimum* aumentou a toxicidade em 3900% e *L. edodes* aumentou em 40000%, quando comparados ao controle da mistura, MXC. Assim como observado no tratamento do corante A214, *P. simplicissimum* apresentou toxicidade menor que *L. edodes* (Tabela 10).

P. simplicissimum demonstrou capacidade de reduzir a toxicidade de corantes como V198 (monoazo) e A21 (ftalocianina), porém aumentou a toxicidade de corantes mais complexos como A214 (diazó) e a mistura, MXC. Deste modo, a capacidade deste fungo deve ser avaliada quanto a detoxificação para posterior aplicação em biorremediação, pois mesmo tendo apresentado bom percentual de descoloração anteriormente (item 4.1.5.), não foi capaz de reduzir a toxicidade de todos os corantes testados.

Já *L. edodes* apresentou variações nos resultados de descoloração e detoxificação, sendo assim é necessária melhor avaliação da capacidade deste fungo, pois sabe-se que este possui a capacidade de descolorir eficientemente alguns corantes (item 4.1.5), e anteriormente apresentou bom percentual na detoxificação de V198 e A21 (Tabela 9).

Portanto, através deste ensaio de toxicidade foi demonstrada a grande importância e necessidade de avaliação toxicológica associada aos estudos de descoloração, uma vez que a descoloração eficiente nem sempre está associada à redução da toxicidade, inviabilizando o uso de fungos eficientes na degradação e deficientes na redução de toxicidade dos corantes em processos de biorremediação.

Tabela 10: Resultados do ensaio toxicológico com microcrustáceo *Daphnia pulex* dos fungos selecionados testados em V198, A21, A214 e na mistura, MXC após 14 dias de incubação.

Amostras	pH		OD (mg/mL)		FTd 24h	
	Antes 24h	Após 24h	Antes 24h	Após 24h	Valor medido	% de redução
Corante V198	4,90	7,02	6,1	0	125	-
<i>P. simplicissimum</i> em V198	4,59	6,68	6,0	4,6	16	87,2
<i>L. edodes</i> em V198	5,04	6,87	6,3	2,5	259	+107,2*
Corante A21	4,87	6,71	6,08	0	128	-
<i>P. simplicissimum</i> em A21	4,82	6,74	6,1	2,7	8	93,7
<i>L. edodes</i> em A21	5,03	6,92	6,2	5,5	513	+300,7*
Corante A214	4,79	7,11	5,73	0,05	14,3	-
<i>P. simplicissimum</i> em A214	4,40	7,24	5,34	5,38	20	+39,9*
<i>L. edodes</i> em A214	5,03	7,05	5,41	0,78	100	+599,3*
Corante MXC	4,87	6,15	4,88	0,02	2,5	-
<i>P. simplicissimum</i> em MXC	4,89	7,38	4,97	4,75	100	+3900*
<i>L. edodes</i> em MXC	4,94	7,54	4,65	5,50	1000	+40000*

Nota: OD – Oxigênio dissolvido; FTd – Fator de toxicidade; * aumento da toxicidade

4.2.5.2.2. Avaliação de genotoxicidade utilizando sangue periférico humano (Ensaio Cometa).

Testes de genotoxicidade utilizando células de mamíferos são considerados apropriados para identificação do potencial risco de grande quantidade de compostos químicos à saúde humana. Atualmente o Ensaio Cometa tem atraído muita atenção como um teste indicador de genotoxicidade (PARK & CHOI, 2007).

Assim foi realizada avaliação da genotoxicidade dos corantes têxteis V198, A21, A214 e da mistura MXC e dos tratamentos destes corantes pelos fungos selecionados anteriormente *L. edodes* e *P. simplicissimum* (item 4.1.5.).

Na Tabela 11 estão apresentados os grupos que foram estabelecidos com o objetivo de comparar os resultados obtidos no Ensaio Cometa com seus respectivos controles.

Assim, foram feitas as seguintes comparações em relação as Unidades Arbitrárias Totais (UAT):

- grupo A: os valores dos solventes H₂O, PBS e PDB foram comparados ao controle celular;
- grupo B: os valores de PDB+V198, PDB+A21, PDB+A214 e PDB+MXC foram comparados ao controle de meio de cultura PDB;
- grupo C: os valores de H₂O+V198, H₂O+A21, H₂O+A214 e H₂O+MXC foram comparados ao controle negativo H₂O;
- grupo D: o valor do controle positivo MMS foi comparado ao solvente PBS
- grupo E: os valores de PDB+V198+Le e PDB+V198+Pen foram comparados ao controle PDB+V198;
- grupo F: os valores de PDB+A21+Le e PDB+A21+Pen comparados ao controle PDB+A21;
- grupo G: os valores de PDB+A214+Le e PDB+A214+Pen comparados ao controle PDB+A214;
- grupo H: os valores de PDB+MXC+Le e PDB+MXC+Pen comparados ao controle PDB+MXC;

Tabela 11: Relação dos grupos de controle comparados com as respectivas amostras testadas após a realização do Ensaio Cometa utilizando células sanguíneas.

Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E	Grupo F	Grupo G	Grupo H
Controle celular (sangue)	Controle PDB	Controle H ₂ O	controle PBS	Controle PDB+V198	Controle PDB+A21	Controle PDB+A214	Controle PDB+MXC
H ₂ O	PDB+V198	H ₂ O+V198	MMS	PDB+V198+Le	PDB+A21+Le	PDB+A214+Le	PDB+MXC+Le
PDB	PDB+A21	H ₂ O+A21	-	PDB+V198+Pen	PDB+A21+Pen	PDB+A214+Pen	PDB+MXC+Pen
PBS	PDB+A214	H ₂ O+A214	-	-	-	-	-
-	PDB+MXC	H ₂ O+MXC	-	-	-	-	-

Nota: PDB – Meio de cultura caldo de batata; MMS – metil metano sulfonato; Le – *L. edodes*; Pen – *P. simplicissimum*.

Os resultados obtidos no teste de citotoxicidade e de genotoxicidade utilizando células sanguíneas estão apresentados na Tabela 12.

Em relação à citotoxicidade não foi observado em nenhuma das amostras testadas resposta tóxica, pois os percentuais de viabilidade celular em todas as amostras testadas foram superiores a 98% (Tabela 12).

No ensaio de genotoxicidade os solventes PDB, PBS e H₂O não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparados com controle celular, ou seja, nenhum dos solventes utilizados foi genotóxico. O controle positivo MMS apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao seu controle, PBS, confirmando a resposta positiva à genotoxicidade (Tabela 12).

Neste estudo os corantes do tipo azo ou que contêm esta classe de corante, H₂O+V198, H₂O+A214, H₂O+MXC e PDB+MXC, apresentaram características genotóxicas significativas ($p < 0,05$). Tsuboy et al. (2007) avaliaram o potencial genotóxico de um azo corante, Azul dispersivo 291, através do Ensaio Cometa e também observaram significativo dano ao DNA. Outro estudo observou genotoxicidade em 17 dos 24 corantes do tipo azo testados (TSUDA et al., 2000). Sendo assim, este teste é sensível para detecção de genotoxicidade destes tipos de compostos.

Entretanto, os azo corantes V198 e A214 quando diluídos em PDB não apresentaram genotoxicidade significativa, o que pode caracterizar interferência do meio PDB reduzindo a genotoxicidade destes corantes, uma vez que foram genotóxicos quando diluídos em água (H₂O). Assim, esta característica deve ser melhor avaliada uma vez que pode ser interferente em resultados positivos à genotoxicidade.

A mistura MXC foi considerada a mais tóxica, pois apresentou característica genotóxica significativa ($p < 0,05$) tanto do corante em PDB (PDB+MXC), 132 UAT, quanto do diluído em H₂O (H₂O+MXC), 54 UAT quando comparados aos seus respectivos controles. Portanto, a mistura MXC pode estar potencializando a toxicidade dos corantes testados individualmente, como ocorre nos efluentes têxteis, no qual há mistura de corantes. Através da exposição de amostras de efluentes têxteis às células sanguíneas de peixes, foi detectado genotoxicidade através do Ensaio Cometa (SUMATHI et al., 2001).

O único corante testado que não apresentou em nenhuma das condições avaliadas característica genotóxica foi a ftalocianina A21, tanto na diluição em H₂O quanto em PDB. No entanto, quando foram testados os tratamentos deste corante pelos fungos foi observado que o tratamento deste corante por *L. edodes* apresentou característica genotóxica significativa ($p < 0,05$), assim os produtos da degradação deste corante por *L. edodes* podem ter influenciado para o surgimento desta característica (Tabela 12).

O tratamento do corante V198 por *P. simplicissimum* e por *L. edodes* não apresentaram características genotóxicas quando comparados ao controle de solvente PDB. Assim, estes fungos foram eficientes na descoloração de V198 (item 4.1.5.) e não apresentaram potencial genotóxico após o tratamento deste corante.

Os demais tratamentos realizados por *P. simplicissimum* não apresentaram genotoxicidade, deste modo o produto final obtido após o tratamento por este fungo não foi tóxico às células, tornando este fungo atraente para aplicação na descoloração, pois apresentou bom percentual de descoloração anteriormente (Tabela 8) e neste experimento não causou dano ao DNA das células sanguíneas.

O tratamento de MXC por *P. simplicissimum* (PDB+MXC+Pen) apresentou redução na genotoxicidade (82 UAT) quando comparado ao controle PDB+MXC (132 UAT), porém não foi significativa, pois $p = 0,05$. Já para o tratamento realizado por *L. edodes* apresentou redução da genotoxicidade (52 UAT) que foi considerada altamente significativa, pois $p < 0,01$.

Assim, *P. simplicissimum* não apresentou características genotóxicas após o tratamento de todos os corantes e conseguiu reduzir a toxicidade da mistura MXC. *L. edodes* reduziu significativamente a genotoxicidade da mistura MXC, o mais tóxico de todos, porém apresentou aumento da toxicidade da ftalocianina, A21. Ambos os fungos não apresentam potencial genotóxico da maioria dos corantes testados e ainda são capazes de reduzir o potencial genotóxico da mistura, MXC. Portanto, estes resultados sugerem que estes fungos apresentam potencial para serem aplicados em biorremediação, pois além destes resultados positivos em relação à genotoxicidade, eles descolorem eficientemente os corantes e a mistura deles.

Neste estudo foi realizado apenas um experimento e não dois experimentos independentes como recomendado para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos (HARTMANN & SPEIT, 1987). Mas futuramente deverão ser realizados, inclusive para a publicação deste trabalho em revista científica.

Foi observada ainda a necessidade de teste com ativação metabólica, pois em estudo realizado por Sharma & Sobti (2000) constatou-se que os corantes testados na ausência de ativação metabólica apresentaram baixo potencial genotóxico, sendo este potencial aumentado na presença da fração S9, enzimas microssomais. Assim, outros estudos com os corantes e os tratamentos fúngicos também deverão ser realizados a fim de serem observados a potencialização da genotoxicidade em células sanguíneas ou redução desta característica na presença de fração S9.

Tabela 12: Resultados do Ensaio Cometa e do ensaio de citotoxicidade em células sanguíneas humana.

Controles	Amostras	Classes de Dano ao DNA (%)				UAT	Células viáveis (%)
		0	1	2	3		
A	controle-celular	85,5	9,5	1,0	4,0	47 (±2,8)	100
B	PDB	91,5	4,5	3	1	27 (±0,7)	100
C	PBS	90,5	5,5	1,5	2,5	32 (±1,4)	NT
D	H ₂ O	94,5	4	0,5	1	16 (±1,4)	NT
	MMS	0	3	23,5	73,5	547** (±6,4)	98,5
	H ₂ O+V198	94	4	0	2	99* (±1,4)	NT
E	PDB+V198	74,5	14	4,5	7	20 (±19,8)	98
	PDB+V198+Le	89,5	5	3,5	2	36 (±4,2)	NT
	PDB+V198+ Pen	92	6,5	0,5	1	21 (±7,8)	98,5
	H ₂ O+A214	90,5	6	0,5	3	32* (±2,8)	NT
F	PDB+A214	72	13	8,5	6,5	99 (±21,9)	98,5
	PDB+A214+ Pen	86,5	9,5	2	2	39 (±4,9)	100
	PDB+A214+ Le	92	4	2,5	1,5	27 (±2,1)	99,5
	H ₂ O+A21	92	5	5,5	1	1,5 (±5,7)	NT
G	PDB+A21	97,5	2	0	0,5	7 (±0,7)	100
	PDB+A21+ Pen	87	11	2	0	30 (±14,1)	100
	PDB+A21+ Le	85	11,5	3	0,5	38 (±4,2)	99,5
	H ₂ O+MXC	81,5	12,5	3,5	2,5	54* (±1,4)	NT
H	PDB+MXC	52,5	33	10,5	4	132** (±1,4)	100
	PDB+MXC+ Pen	69,5	22	6,5	2	82 (±12,7)	99,5
	PDB+MXC+Le	76	22,5	1	0,5	52* (±4,2)	100

Nota: PDB – Meio de cultura caldo de batata; MMS – metil metanosulfonato; Le – *L. edodes*; Pen – *P. simplicissimum*; Classes de dano: 0- sem dano, 1 –dano leve, 2 –dano moderado, 3 – dano severo; NT- não testado; UAT – Unidades Arbitrárias Totais; (±valor) – desvio padrão; * p<0,05; ** p<0,01;

4.2.5.2.2. Ensaio de mutagenicidade utilizando a bactéria *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames)

Dados da literatura demonstram o potencial mutagênico de diferentes tipos de corantes através do Teste de Ames (KNASMÜLLER et al., 1993; JÄGER et al., 2004), que é uma metodologia de triagem validada para detecção de substâncias mutagênicas (MARON & AMES, 1983).

Simultaneamente ao Teste de Ames devem ser realizados os testes de toxicidade, a fim de observar o crescimento das linhagens bacterianas, em meio rico (LB). Quando o crescimento bacteriano for inferior a 70% em relação ao controle, então a amostra é considerada tóxica e esta toxicidade pode influenciar na detecção de mutagenicidade.

Deste modo, a fim de verificar o potencial mutagênico e a toxicidade antes e após o tratamento por *P. simplicissimum* e *L. edodes* dos corantes monoazo V198, da ftalocianina de

cobre A21, do diazo A214 e da mistura MXC foram realizados experimentos quantitativos, utilizando diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium*, TA97, TA98, TA100 e TA102, que permitem avaliar a mutagênese por deslocamento do quadro de leitura por adição de bases, deslocamento do quadro de leitura por adição e deleção de bases, substituição de pares de bases e danos oxidativos, respectivamente.

Foi incluído ao teste, como controle negativo, além da H₂O, o meio de cultura PDB, uma vez que estava presente em todas as amostras de tratamento dos corantes, deste modo seria importante avaliar se este não estaria interferindo na promoção da mutação espontânea, favorecendo “falsos positivos” ou influenciando nos resultados de toxicidade dos tratamentos.

PDB sem corante na presença de *L. edodes* e de *P. simplicissimum* também foram incluídos ao experimento para observação da toxicidade e do potencial mutagênico de metabólitos produzidos pelo próprio metabolismo fúngico na ausência do corante. E ainda os corantes dissolvidos em H₂O para serem observadas possíveis interferências da mistura de PDB com o corante teste (V198, A21, A214 e a mistura MXC).

Na tabela 13 estão descritos os grupos que foram criados a fim de serem comparados com os resultados obtidos no Teste de Ames e de toxicidade com seus respectivos controles.

Para obter os valores médios referentes ao índice de mutagenicidade (I.M.) e às sobrevivências (%) foram realizadas as seguintes comparações:

- grupo A: os valores de PDB, H₂O+V198, H₂O+A21, H₂O+A214 e H₂O+MXC foram comparados ao controle negativo H₂O;
- grupo B: os valores de PDB+Le, PDB+Pen, PDB+V198, PDB+A21, PDB+A214 e PDB+MXC foram comparados ao controle de meio de cultura PDB;
- grupo C: os valores de PDB+V198+Le e PDB+V198+Pen foram comparados ao controle PDB+V198;
- grupo D: os valores de PDB+A21+Le e PDB+A21+Pen comparados ao controle PDB+A21;
- grupo E: os valores de PDB+A214+Le e PDB+A214+Pen comparados ao controle PDB+A214 e;
- grupo F: os valores de PDB+MXC+Le e PDB+MXC+Pen comparados ao controle PDB+MXC.

Tabela 13: Relação dos grupos controle comparados com as respectivas amostras testadas após a realização do Teste de Ames e citotoxicidade utilizando a bactéria *Salmonella typhimurium*.

Grupo A Controle H ₂ O	Grupo B Controle PDB	Grupo C Controle PDB+V198	Grupo D Controle PDB+A21	Grupo E Controle PDB+A214	Grupo F Controle PDB+MXC
PDB	PDB+Le	PDB+V198+Le	PDB+A21+Le	PDB+A214+Le	PDB+MXC+Le
H ₂ O+V198	PDB+Pen	PDB+V198+Pen	PDB+A21+Pen	PDB+A214+Pen	PDB+MXC+Pen
H ₂ O+A21	PDB+V198	-	-	-	-
H ₂ O+A214	PDB+A21	-	-	-	-
H ₂ O+MXC	PDB+A214	-	-	-	-
-	PDB+MXC	-	-	-	-

Nota: PDB – Meio de cultura caldo de batata; Le – *L. edodes*; Pen – *P. simplicissimum*.

4.2.5.2.2.1. Resposta tóxica e mutagênica utilizando a Linhagem TA97.

Não foi observado mutagenicidade em nenhuma das condições testadas com a linhagem TA97, pois o Índice de Mutagenicidade (I.M.) foi menor que 2,0, tanto na ausência (-S9), quanto na presença (+S9) de metabolização (Tabela 14). Sendo assim, não foram detectadas mutações por adição de pares de base.

Nenhuma das amostras testadas apresentaram toxicidade à linhagem TA97 na ausência de metabolização (-S9). No entanto, após a metabolização (+S9) foi observado toxicidade em várias amostras (Tabela 14). Por esta razão, foi importante avaliar através da adição de enzimas microssomais (+S9) se há indução ou inibição das atividades dos compostos presentes nas amostras testadas.

Todas as amostras em que *L. edodes* esteve presente foram tóxicas, após a metabolização (+S9), exceto na presença do corante A214 (Tabela 14). Provavelmente produtos do próprio metabolismo deste fungo foram tóxicos para esta linhagem bacteriana, impedindo que a mesma fosse capaz de se desenvolver. Esta afirmação pode ser comprovada, pois na ausência de corante *L. edodes* apresentou toxicidade, estes resultados positivos à toxicidade podem ter mascarado resultados positivos de mutagenicidade.

A redução da toxicidade do corante A214 por *L. edodes* pode estar relacionada à transformação deste corante pelo fungo (Tabela 8), que produziu compostos menos tóxico ao metabolismo das bactérias.

O corante V198, em H₂O e PDB, não apresentou resposta tóxica, deste modo pode-se inferir que os produtos da degradação deste corante ou metabólitos produzidos pelo metabolismo de *L. edodes* foram ativados pelas enzimas microsossomais (+S9) tornando-os tóxicos a esta linhagem bacteriana (TA97).

Conneely et al. (1999) detectaram cobre livre no sobrenadante após o tratamento do mesmo corante utilizado neste estudo, A21, pelo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* e em outro estudo o mesmo corante foi classificado como o mais tóxico dentre os corantes avaliados por ter inibido o crescimento fúngico (NOVOTNÝ et al., 2004). Também foi observada a toxicidade de outros corantes com presença de metais em relação à bactéria *Pseudomonas putida* e segundo os autores desta investigação, a presença de metais após a descoloração pode ter gerado produtos mais tóxicos devido à precipitação ou floculação dos metais (BOSCHKE et al., 2007). Assim, a toxicidade observada nos tratamentos por ambos os fungos na presença de A21 pode ter sido resultado da presença do cobre no meio que inibiu o desenvolvimento desta linhagem bacteriana.

O corante A214 e a mistura MXC foram muito tóxicos após a metabolização (Tabela 14). Este resultado pode indicar alta sensibilidade da linhagem bacteriana aos produtos da metabolização (+S9) de corantes do tipo diazo ou de componentes da estrutura deste corante. Assim, este resultado tóxico pode indicar potencial mutagênico por adição de pares de base destes corantes, uma vez que não permitiu o bom desenvolvimento desta linhagem e consequentemente a detecção de resposta mutagênica.

Vale ressaltar que o corante A214 e a mistura MXC diluídos em água apresentaram maior resposta tóxica do que em meio de cultura PDB, o que pode significar certa interferência do meio.

A mistura dos corantes MXC na presença de metabolização (+S9) foi considerada a mais tóxica, apresentando toxicidade antes e após o tratamento pelos fungos. O tratamento por *L. edodes* aumentou a toxicidade em 26,6% e o tratamento por *P. simplicissimum* reduziu 2,2% da toxicidade da mistura MXC (Tabela 14).

Vanhulle et al. (2008) observaram apenas 30% de redução da toxicidade, após a degradação de amostra de efluente têxtil, que é composto por uma mistura de corantes, pelo basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus*. Assim, apesar Vanhulle et al. (2008) terem observado maior percentual de redução da toxicidade do que neste estudo, foi concluído que a misturas de corantes, por serem mais complexas, são difíceis de serem detoxificadas.

Portanto, o tratamento com *P. simplicissimum* não foi tóxico após o tratamento de V198, reduziu a toxicidade de V198, de A214 e da mistura MXC, mas por outro lado aumentou a toxicidade do corante A21. Já o tratamento com *L. edodes* foi tóxico após o tratamento de V198, aumentou a toxicidade de A21 e da mistura MXC, mas reduziu a toxicidade de A214.

Tabela 14: Teste de mutagenicidade e de toxicidade utilizando a linhagem TA97.

Amostras	Linhagem TA97					
	-S9			+ S9		
	I.M.	Sobrevivência		I.M.	Sobrevivência	
		Média	%		Média	%
H ₂ O	1,0	236	100	1,0	357	100
PDB	1,0	284	100	0,9	384	100
PDB + Le	1,4	589	100	0,6	189	49,2
PDB + Pen	0,4	319	100	1,2	329	85,7
H ₂ O + V198	0,8	240	100	1,0	387	100
PDB + V198	1,3	328	100	0,8	583	100
PDB + V198 + Le	0,9	412	100	1,1	398	68,3
PDB + V198 + Pen	0,9	230	70,2	0,9	474	81,2
H ₂ O + A21	0,7	191	80,9	0,9	340	95,4
PDB + A21	1,2	315	100	1,0	500	100
PDB + A21 + Le	0,9	370	100	0,9	323	64,7
PDB + A21 + Pen	0,7	682	100	0,7	179	35,8
H ₂ O + A214	0,8	249	100	0,8	122	34,2
PDB + A214	1,2	376	100	1,0	238	61,8
PDB + A214 + Le	0,8	395	100	0,7	273	100
PDB + A214 + Pen	0,7	368	98	0,7	257	100
H ₂ O + MXC	1,0	178	75,4	0,7	25	7
PDB + MXC	1,2	487	100	0,7	213	55,5
PDB + MXC + Le	0,9	571	100	1,4	61	28,6
PDB + MXC + Pen	0,8	395	81,2	1,4	123	57,7

Nota: Respostas positivas à mutagenicidade ou à toxicidade estão em **negrito (tóxico <70% e mutagênico >2,0)**; PDB – Meio de cultura caldo de batata; Le – *L. edodes*; Pen – *P. simplicissimum*; I. M. – índice de mutagenicidade; Controle positivo: 4-Nitroquinolona 1- Óxido (4NQO), I.M (-S9)= 2,3 e I.M. (+S9)= 4,6.

4.2.5.2.2.2. Resposta tóxica e mutagênica utilizando a linhagem TA98.

Não foi observada mutagenicidade das amostras testadas com a linhagem TA98 tanto na ausência (-S9) quanto na presença (+S9) de ativação metabólica, ou seja, não foram evidenciadas mutações por adição ou deleção de pares de base.

No entanto, foi observada resposta tóxica dos corantes V198, A21 e da mistura MXC após a metabolização (+S9), indicando a necessidade de bioativação (+S9) destes corantes para a geração de compostos tóxicos (Tabela 15). Já o corante A214 não foi tóxico a esta linhagem tanto na ausência (-S9) quanto na presença (+S9) de metabolização.

Moawad et al. (2003) observaram toxicidade à linhagem TA98 com todos os corantes do tipo azo testados. No presente estudo foi observada toxicidade do corante azo V198 e da

mistura MXC, mas não foi observada toxicidade do corante azo A214. Sendo assim, a estrutura do corante pode ter influenciado na resposta tóxica, portanto esta linhagem bacteriana seria mais sensível aos corantes do tipo monoazo, como o corante V198, do que aos corantes do tipo diazo, como o corante A214.

A amostra com corante V198 tratada por *L. edodes* apresentou toxicidade na ausência (-S9) de metabolização, mas a metabolização (+S9) tornou os produtos tóxicos produzidos pela degradação deste corante e/ou metabólitos do próprio metabolismo deste fungo em compostos inócuos a esta linhagem bacteriana.

O corante A21, a ftalocianina de cobre, apresentou toxicidade após a metabolização (34,5% de sobrevivência). Osugi et al. (2006) observaram que outro corante tipo ftalocianina de cobre apresentou efeito tóxico a esta mesma linhagem TA98 após o tratamento por oxidação fotoeletrocatalítico. Ao contrário do resultado obtido por Osugi et al. (2006), as amostras deste corante tratadas por *L. edodes*, na ausência (-S9) e na presença (+S9) de ativação metabólica, e por *P. simplicissimum*, após a ativação metabólica (+S9), não promoveram aumento da toxicidade deste corante a esta linhagem, mas sim a redução.

O corante A214 após o tratamento por *L. edodes* apresentou toxicidade antes e após a metabolização (Tabela 15). Assim, possíveis produtos da degradação deste corante por *L. edodes*, que anteriormente foram visivelmente transformados de azul para uma coloração avermelhada (Figura 30) influenciaram na resposta tóxica à esta linhagem bacteriana.

Anteriormente a mistura MXC já havia apresentado característica tóxica para a linhagem TA97 (Tabela 14), deste modo a toxicidade apresentada para TA97 e TA98 pode estar mascarando resultados positivos a mutagenicidade do tipo deslocamento no quadro de leitura por adição de pares de base que é o tipo de mutação detectada por ambas as linhagens.

A amostra com a mistura MXC tratada por *L. edodes* apresentou o mesmo percentual de toxicidade deste corante em PDB, após a metabolização (+S9) (Tabela 15), assim a toxicidade do corante foi ativada após a adição da fração S9 e o tratamento com este fungo não foi capaz de reduzir a resposta tóxica.

Todas as amostras testadas na presença de *P. simplicissimum* na ausência de metabolização (-S9), apresentaram toxicidade, no entanto foi observado que na ausência do corante (PDB+Pen) foi detectada toxicidade (Tabela 15), ou seja, compostos produzidos naturalmente pelo próprio metabolismo deste fungo, podem estar sendo tóxicos a esta

linhagem bacteriana. Após a ativação metabólica (+S9) a toxicidade de todas as amostras tratadas por este fungo foram reduzidas, exceto a amostra do fungo sem corante.

Portanto, *L. edodes* aumentou a toxicidade de V198 e A214, reduziu a toxicidade de A21 e não apresentou toxicidade após o tratamento da mistura MXC, na ausência de metabolização (-S9). Após a metabolização (+S9) reduziu a toxicidade de V198 e A21, aumentou a toxicidade de A214 e apresentou a mesma toxicidade da mistura MXC, ou seja, não reduziu a toxicidade. Já *P. simplicissimum* na ausência de ativação metabólica (-S9) foi tóxico em todas as amostras em que estava presente, mas após a adição da fração S9 reduziu o potencial tóxico apresentado pelos corantes V198, A21 e da mistura MXC e o tratamento do corante A214 não foi tóxico.

Ramsay & Nguyen (2002) associaram a toxicidade apresentada pela descoloração de corantes do tipo azo pelo basidiomiceto *Trametes versicolor* à produção de possíveis produtos da descoloração e/ou outros metabólitos excretados pelo fungo ao longo do período de incubação como ácidos orgânicos. Deste modo, deve-se levar em consideração as respostas tóxicas apresentadas por *P. simplicissimum* e *L. edodes*, uma vez que os fungos produzem naturalmente compostos tóxicos às bactérias.

Tabela 15: Teste de mutagenicidade e de toxicidade utilizando a linhagem TA98.

Amostras	Linhagem TA98					
	-S9			+ S9		
	I.M.	Sobrevivência		I.M.	Sobrevivência	
		Média	%		Média	%
H ₂ O	1,0	43	100	1,0	101	100
PDB	1,5	55	100	1,2	176	100
PDB + Le	1,1	332	100	0,4	134	76,4
PDB + Pen	1,2	32	58,2	0,7	90	51
H ₂ O + V198	1,3	41	94,2	0,6	309	100
PDB + V198	0,8	66	100	1,1	49	27,6
PDB + V198 + Le	0,9	27	40,2	1,2	129	100
PDB + V198 + Pen	1,2	20	29,5	0,3	63	100
H ₂ O + A21	1,4	35	81,4	1,7	95	100
PDB + A21	0,9	313	100	1,0	61	34,5
PDB + A21 + Le	1,0	286	91,2	1,4	92	100
PDB + A21 + Pen	1,4	57	18,1	1,3	180	100
H ₂ O + A214	1,3	57	100	0,9	164	100
PDB + A214	1,4	220	100	1,4	214	100
PDB + A214 + Le	0,9	99	44,9	0,8	113	52,7
PDB + A214 + Pen	1,3	82	37,1	1,8	156	72,8
H ₂ O + MXC	1,6	274	100	1,0	99	100
PDB + MXC	1,1	129	100	0,9	56	31,9
PDB + MXC + Le	1,2	246	100	0,9	56	31,9
PDB + MXC + Pen	1,0	21	15,9	0,8	197	100

Nota: Respostas positivas a mutagenicidade ou a toxicidade estão em **negrito (tóxico <70% e mutagênico >2,0)**; PDB – Meio de cultura caldo de batata; Le – *L. edodes*; Pen – *P. simplicissimum*; I. M. – índice de mutagenicidade; Controle positivo: 4-Nitroquinolona 1- Óxido (4NQO), I.M. (-S9)= 5,8 e I.M. (+S9)= 3,0.

4.2.5.2.2.3. Resposta tóxica e mutagênica à Linhagem TA100 de *Salmonella typhimurium*.

Em nenhuma das análises realizadas com a linhagem TA100 foi observada mutagenicidade, no entanto as amostras H₂O+V198 e H₂O+A21 apresentaram toxicidade, na ausência de ativação metabólica, e esta característica foi reduzida após a metabolização (+S9) (Tabela 16).

Mathur et al. (2005) observaram que 6 dos 7 corantes azo testados foram mutagênicos na ausência de ativação metabólica em relação à linhagem TA100. Em outro estudo, Novótny et al. (2006) encontraram resposta mutagênica positiva para TA98 e TA100 na presença do corante azo Laranja Reativo 16 (LR16), tanto na ausência quanto na presença de ativação metabólica. Ao contrário destes estudos, no presente estudo não foi observado mutagenicidade dos corantes azo testados na presença de TA98 e TA100, o que possivelmente pode ser resultado da influência da toxicidade, ou ainda devido a estrutura dos corantes (KNASMÜLLER et al., 1993; WANG et al., 2008).

O tratamento dos corantes V198, A21 e da mistura MXC pelos fungos não apresentou toxicidade à esta linhagem bacteriana em nenhuma das condições testadas.

Já o tratamento do corante A214 por *L. edodes* e *P. simplicissimum* apresentou toxicidade, na ausência de ativação metabólica (Tabela 16), ou seja, compostos produzidos pela descoloração deste corante foram tóxicos às bactérias e podem ter ocultado possíveis mutações por substituição de pares de base que são detectadas por TA100. Após a ativação metabólica (+S9) a toxicidade apresentada no tratamento por ambos os fungos foi reduzida, o que pode indicar transformação destes metabólitos a compostos inócuos.

Tabela 16: Teste de mutagenicidade e de toxicidade utilizando a linhagem TA100.

Amostras	Linhagem TA100					
	-S9			+ S9		
	I.M.	Sobrevivência		I.M.	Sobrevivência	
		Média	%	Média	%	
H ₂ O	1,0	86	100	1,0	114	100
PDB	0,9	34	100	0,7	108	94,3
PDB + Le	1,0	71	100	1,4	107	93,9
PDB + Pen	1,6	120	100	0,8	109	95,2
H ₂ O + V198	0,8	53	61,6	0,8	98	86
PDB + V198	1,1	35	100	0,9	140	100
PDB + V198 + Le	0,8	45	100	1,6	115	81,8
PDB + V198 + Pen	1,4	54	100	1,4	170	100
H ₂ O + A21	0,7	58	67,4	0,5	130	100
PDB + A21	0,8	38	100	1,1	163	100
PDB + A21 + Le	1,1	57	100	0,9	123	75,2
PDB + A21 + Pen	1,4	68	100	1,0	138	84,4
H ₂ O + A214	0,7	131	100	0,7	96	84,2
PDB + A214	0,9	122	100	1,2	107	93,9
PDB + A214 + Le	1,4	56	45,5	1,1	139	100
PDB + A214 + Pen	1,7	84	68,9	1,0	209	100
H ₂ O + MXC	0,5	91	100	0,7	81	71,1
PDB + MXC	0,9	59	100	1,1	149	100
PDB + MXC + Le	1,2	73	100	0,9	105	70,7
PDB + MXC + Pen	1,6	65	100	1,0	210	100

Nota: Respostas positivas à mutagenicidade ou à toxicidade estão em **negrito (tóxico <70% e mutagênico >2,0)**; PDB – Meio de cultura caldo de batata; Le – *L. edodes*; Pen – *P. simplicissimum*; I. M. – índice de mutagenicidade; Controle positivo: Azida Sódica (AS), I.M. (-S9) = 10,6 e I.M. (+S9) = 8,4.

4.2.5.2.2.4. Resposta tóxica e mutagênica à Linhagem TA102.

Na presença da linhagem TA102 os corantes diluídos em H₂O, na ausência de metabolização, apresentaram toxicidade, exceto A21, mas todos apresentaram redução da toxicidade após a metabolização (+S9) (Tabela 17). Como observado com a linhagem TA100 (Tabela 16), somente os corantes diluídos em H₂O apresentaram resposta tóxica, o que pode caracterizar influência do meio de cultura PDB na redução da toxicidade dos corantes para estas linhagens. Dos tratamentos fúngicos somente a amostra PDB+A214 tratado por *P. simplicissimum* apresentou toxicidade após metabolização (Tabela 17).

Os tratamentos dos corantes V198 e MXC por *P. simplicissimum* INCQS 40211, sem ativação metabólica (-S9), exibiram efeito mutagênico significativo, I.M. 2,1 e I.M. 5,6 respectivamente (Tabela 17), o que indica que ocorreram danos oxidativos ao DNA. Provavelmente estes danos foram induzidos por produtos da degradação destes corantes por *P. simplicissimum* INCQS 40211, uma vez que foi observado anteriormente redução na coloração da biomassa adsorvida por este fungo e ainda desaparecimento do pico característico do corante (item 4.1.5.). Após ativação metabólica, a mutagenicidade do corante V198 e da mistura MXC foi reduzida, porém a mistura MXC tratada por este fungo permaneceu com características mutagênicas (I.M. 2,3), ou seja, as enzimas presentes na

fração S9 atuaram na redução desta característica, mas não eliminaram a mutagenicidade apresentada no tratamento da mistura MXC por *P. simplicissimum* INCQS 40211 (Tabela 17).

El-Rahim & Moawad (2003) testaram a capacidade de descoloração de dois corantes do tipo azo, Direto Marrom e Polar Vermelho, por duas espécies de *Aspergillus* e observaram mutagenicidade após o tratamento fúngico por adsorção. Assim, fungos que atuam como adsorventes também podem exibir mutagenicidade, o que evidencia a grande importância da realização de ensaios toxicológicos após a descoloração, mesmo por processos de biosorção.

Tabela 17: Teste de mutagenicidade e de toxicidade utilizando a linhagem TA102.

Amostras	Linhagem TA102					
	-S9			+ S9		
	I.M.	Sobrevivência		I.M.	Sobrevivência	
		Média	%		Média	%
H ₂ O	1,0	1386	100	1,0	1118	100
PDB	0,8	1046	75,5	0,7	1256	100
PDB + Le	1,2	1110	100	1,6	992	79
PDB + Pen	1,0	1154	100	1,1	1095	87,2
H ₂ O + V198	1,0	943	68,1	1,2	786	70,3
PDB + V198	0,3	871	83,3	1,5	1055	84
PDB + V198 + Le	1,0	907	86,7	0,5	1009	80,3
PDB + V198 + Pen	2,1*	1106	100	1,0	751	71,2
H ₂ O + A21	1,2	1125	81,2	1,3	1317	100
PDB + A21	1,3	1046	100	1,4	965	76,8
PDB + A21 + Le	0,3	936	89,5	0,9	956	99,1
PDB + A21 + Pen	0,5	1098	100	0,7	1152	100
H ₂ O + A214	0,8	856	61,8	0,9	975	87,2
PDB + A214	1,2	937	89,5	1,5	1048	83,4
PDB + A214 + Le	1,3	1017	100	0,8	932	89
PDB + A214 + Pen	0,3	1676	100	0,0	688	65,6
H ₂ O + MXC	0,7	750	54,1	1,0	973	87
PDB + MXC	0,3	790	75,5	1,0	950	75,6
PDB + MXC + Le	1,0	1296	100	0,9	840	88,4
PDB + MXC + Pen	5,6**	1045	100	2,3**	1153	100

Nota: Respostas positivas a mutagenicidade ou a toxicidade estão em **negrito (tóxico <70% e mutagênico >2,0)**; PDB – Meio de cultura caldo de batata; Le – *L. edodes*; Pen – *P. simplicissimum*; I. M. – índice de mutagenicidade; Controle positivo: 4-Nitroquinolona 1- Óxido (4NQO) I.M. (-S9) = 3,5 e I.M. (+S9) = 7,0.

Estudos posteriores deverão ser realizados para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos no Teste de Ames, pois segundo Maron & Ames (1983) é necessário a realização de dois experimentos independentes para garantia da confiabilidade dos resultados obtidos, porém neste estudo não foi possível a realização destes 2 experimentos devido a quantidade de amostras a serem testadas em curto período de tempo.

4.3.5. Resumo de todos os ensaios toxicológicos realizados após o tratamento dos corantes V198, A21, A214 e da mistura MXC pelos fungos selecionados.

Tabela 18: Resumo dos resultados positivos em relação à toxicidade e mutagenicidade no Teste de Ames, à genotoxicidade no Ensaio Cometa e à toxicidade com o microcrustáceo *Daphnia pulex*.

Testes Amostras	Teste de Ames								Ensaio Cometa	<i>Daphnia pulex</i>
	TA97		TA98		TA100		TA102			
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)		
PDB + Le	-	TOX	-	-	-	-	-	-	NT	NT
PDB + Pen	-	-	TOX	TOX	-	-	-	-	NT	NT
H ₂ O + V198	-	-	-	-	TOX	-	TOX	-	GEN	NT
PDB + V198	-	-	-	TOX	-	-	-	-	-	TOX
PDB + V198 + Le	-	TOX	TOX	-	-	-	-	-	-	TOX
PDB + V198 + Pen	-	-	TOX	-	-	-	MUT	-	-	-
H ₂ O + A21	-	-	-	-	TOX	-	-	-	-	NT
PDB + A21	-	-	-	TOX	-	-	-	-	-	TOX
PDB + A21 + Le	-	TOX	-	-	-	-	-	-	GEN	TOX
PDB + A21 + Pen	-	TOX	TOX	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ O + A214	-	TOX	-	-	-	-	TOX	-	GEN	NT
PDB + A214	-	TOX	-	-	-	-	-	-	-	TOX
PDB + A214 + Le	-	-	TOX	TOX	TOX	-	-	-	-	TOX
PDB + A214 + Pen	-	-	TOX	-	TOX	-	-	TOX	-	TOX
H ₂ O + MXC	-	TOX	-	-	-	-	TOX	-	GEN	NT
PDB + MXC	-	TOX	-	TOX	-	-	-	-	GEN	TOX
PDB + MXC + Le	-	TOX	-	TOX	-	-	-	-	-	TOX
PDB + MXC + Pen	-	TOX	TOX	-	-	-	MUT	MUT	-	TOX

Nota: Le – *Lentinula edodes*; Pen – *Penicillium simplicissimum*; TOX – tóxico; MUT – mutagênico; GEN – genotóxico; NT – não testado; - resposta tóxica não detectada;

A Tabela 18 apresenta os resultados de toxicidade dos corantes e seus tratamentos nos três testes toxicológicos realizados: com o microcrustáceo *Daphnia pulex*, com sangue periférico humano (Ensaio Cometa) e com bactérias *S. typhimurium* (Teste de Ames).

As amostras com os produtos obtidos pelo metabolismo fúngico na ausência de corante (PDB+Le e PDB+Pen) foram testados apenas na presença das bactérias *S. typhimurium* e apresentaram toxicidade às linhagens TA97 (Tabela 14 e 18) e TA98 (Tabelas 15 e 18). Deste modo, a partir deste resultado foi observada a necessidade de testar estas amostras também nos outros ensaios toxicológicos a fim de observar o potencial tóxico dos compostos naturalmente produzidos pelos fungos na ausência do corante na tentativa de evitar que este fator seja confundido com os produtos da degradação dos corantes.

Através da análise do Índice de Mutagenicidade (I.M.) com as linhagens TA97 (Tabela 14), TA98 (Tabela 15) e TA100 (Tabela 16) não foram observados efeitos mutagênicos, tanto na ausência (-S9) quanto na presença (+S9) de ativação metabólica, em nenhuma das amostras testadas, uma vez que os valores foram menores que 2 (I.M. <2). No entanto, foi observada maior sensibilidade das linhagens TA97 e TA98 na detecção de toxicidade (Tabela 18).

O corante V198 diluído em H₂O apresentou toxicidade para as linhagens TA100 (Tabela 15) e TA102 na ausência de metabolização (Tabela 16), coincidindo com resultado positivo à genotoxicidade observado no Ensaio Cometa (Tabela 12). Portanto, a toxicidade apresentada pode estar mascarando resultados positivos à mutagenicidade do tipo substituição de pares de base identificado pela linhagem TA100 ou por danos oxidativos identificado pela linhagem TA102. Este mesmo corante em meio de cultura PDB, foi tóxico somente para a linhagem TA98 (Tabela 15), que identifica danos por adição ou deleção de pares de base (Tabela 18).

Alguns corantes do tipo azo são conhecidos por apresentar potencial mutagênico, entretanto os corantes utilizados neste trabalho não apresentaram mutagenicidade provavelmente pela toxicidade apresentada em algumas linhagens que poderiam identificar o tipo de mutação e/ou devido à estrutura dos corantes utilizados, uma vez que a posição das hidroxilas (GOTTLIEB et al., 2003), a presença de grupos sulfônicos (NOVÓTNY et al., 2006), nitroaromáticos (UMBUZEIRO et al., 2005) ou aminas influenciam na detecção de mutagenicidade.

O tratamento de V198 por *L. edodes* foi tóxico para as linhagens TA97 após a metabolização (+S9) (Tabela 14 e 18) e para TA98 na ausência de metabolização (-S9) (Tabela 15 e 18). A toxicidade deste corante foi reduzida por este fungo com a TA 100 (Tabela 16 e 18), TA102 (Tabela 17 e 18) e após a metabolização com a TA98. No entanto, apresentou toxicidade superior ao corante no teste com as daphnias (Tabela 10 e 18). O tratamento de V198 por *P. simplicissimum* foi tóxico somente para a linhagem TA98 na ausência de metabolização, no entanto foi observado mutagenicidade por danos oxidativos, na ausência de metabolização (-S9), com a linhagem TA102 (Tabela 17 e 18).

O tratamento do corante A21 por *L. edodes* teve redução de toxicidade na presença da linhagem TA98, mas foi tóxico para a linhagem TA97, para o microcrustáceo e no Ensaio Cometa foi genotóxico para as células sanguíneas (Tabela 12 e 18). O tratamento do mesmo corante por *P. simplicissimum* apresentou resposta tóxica após a metabolização (+S9) junto à

linhagem TA97 (Tabela 14 e 18) e sem metabolização (-S9) junto à linhagem TA98 (Tabela 15 e 18), mas não apresentou resposta tóxica às daphnias (Tabela 10 e 18).

Segundo Sponza et al. (2006), a variação nos testes de toxicidade pode ser justificada pela diferença na sensibilidade e resistência dos organismos, e no caso do corante A21, a presença de cobre pode ter influenciado na redução do número de algumas linhagens bacterianas e das daphnias após ambos os tratamentos fúngicos.

O corante A214 diluído em H₂O apresentou toxicidade à linhagem TA97, que identifica mutação por adição de pares de bases, após a metabolização (+S9) (Tabela 14 e 18) e à linhagem TA102, que identifica danos oxidativos ao DNA, na ausência de metabolização (-S9) (Tabela 17 e 18). No Ensaio Cometa, este corante apresentou genotoxicidade (Tabela 12 e 18), ou seja, este corante apresenta potencial para exibição de mutagenicidade através de mutação por adição de pares de base ou por danos oxidativos, na entanto podem não ter sido detectados no Teste de Ames devido à toxicidade deste corante a estas linhagens.

O tratamento de A214 por *L. edodes* foi tóxico para TA98 na ausência e na presença de metabolização (Tabela 15 e 18) e para TA100 apenas na ausência de metabolização (Tabela 16 e 18), esta toxicidade também foi observada com as daphnias (Tabela 10 e 18). Já o tratamento deste corante por *P. simplicissimum* INCQS 40211 foi tóxico para as linhagens TA98 e TA100, na ausência de metabolização (-S9), para TA102 na presença de metabolização (+S9) e para as daphnias.

Assim, estes fungos foram capazes de reduzir a toxicidade quando testado com a linhagem TA97 (Tabela 14 e 18), mas apresentaram compostos potencialmente tóxicos às linhagens TA98 (Tabela 15 e 18), TA100 (Tabela 16 e 18), TA102 (Tabela 17 e 18) e as daphnias (Tabela 10 e 18).

A mistura MXC diluída em H₂O foi tóxica para TA97 (Tabela 14 e 18), TA102 (Tabela 17 e 18) e ainda apresentou genotoxicidade no Ensaio Cometa (Tabela 12 e 18). A mistura MXC em PDB também foi tóxica para TA97 (Tabela 14) e TA98 (Tabela 15), sendo também confirmado como positiva a genotoxicidade no Ensaio Cometa (Tabela 12 e 18). Ou seja, os resultados tóxicos as linhagens podem ter mascarado resultados positivos a mutação do tipo adição de pares de base, identificada TA97 e TA98, ou ainda mutação por danos oxidativos, identificado pela TA102.

O tratamento da mistura MXC por *L. edodes* aumentou a toxicidade em relação à TA97 após a metabolização (+S9) (Tabela 14 e 18), não resultou em alteração de sua

toxicidade em relação à TA98 (Tabela 15 e 18), reduziu a genotoxicidade (Tabela 12 e 18) e aumentou a toxicidade no teste com o microcrustáceo *Daphnia pulex* (Tabela 10 e 18). A variabilidade nos resultados de toxicidade pode indicar diferença na sensibilidade dos organismos, quanto à genotoxicidade o tratamento por *L. edodes* parece ter sido efetivo na redução do potencial genotóxico, no entanto a nível ecotoxicológico apresentou efeito negativo aos microcrustáceos.

O tratamento da mistura MXC por *P. simplicissimum* INCQS 40211 não reduziu a toxicidade em relação às linhagens TA97 (Tabela 14 e 18), foi tóxico na ausência de metabolização (-S9) e reduziu a toxicidade do corante após a metabolização (+S9) em relação à linhagem TA98 (Tabela 15 e 18), reduziu a genotoxicidade, mas não foi considerado significativo (Tabela 12 e 18), apresentou ainda mutagenicidade na presença de TA102 (Tabela 17 e 18) e aumento da toxicidade no teste com o microcrustáceo *Daphnia pulex* (Tabela 10 e 18). Assim, os produtos da degradação deste corante por este fungo, que foi confirmada anteriormente como degradação através da análise do pico característico do corante (item 4.1.5.), foram transformados em produtos mais tóxicos que o composto original e ainda mutagênico.

Após extensa pesquisa bibliográfica foi possível constatar que são poucos os trabalhos que avaliam a toxicidade após os tratamentos de descoloração realizados por fungos. Pode-se destacar alguns trabalhos como o realizado por Heinfling et al. (1997), onde avaliaram a toxicidade utilizando o teste com *Vibrio fischeri* após o tratamento de corantes azo e ftalocianina pelo fungo *Trametes versicolor*, Abadulla et al. (2000) utilizaram a bactéria *Pseudomonas putida* para avaliar a toxicidade após a descoloração pelo fungo *Trametes hirsuta*, já El-Rahim & Moawad (2003) testaram o potencial mutagênico após a descoloração de corantes azo por espécies de *Aspergillus*.

Podem ser destacados ainda Rosolen et al. (2004) que avaliaram a capacidade de descoloração, por espécies de *Pleurotus*, e de detoxificação através do teste com alface *Lactuca sativa*, com a alga *Selenastrum capricornutum* e do cnidário *Hydra attenuata*. Ainda em 2004 foi avaliado o potencial de descoloração de corantes do tipo azo pelo fungo *Cunninghamella elegans*, a toxicidade após o tratamento foi medida através do teste com a bactéria *Escherichia coli* (AMBRÓSIO & CAMPOS-TAKAKI, 2004). Finalmente Eichelerová et al. (2007) avaliaram a toxicidade com a planta *Lemma minor* após a descoloração de corantes azo pelo fungo *Dichomitus squalens*.

No entanto, em relação ao basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*, muito estudado devido seu grande potencial de descoloração de corantes, não foram encontrados em muitos estudos com ensaios toxicológicos associados aos testes de descoloração. Cripps et al (1990), Spadaro et al (1992), Tatarko & Bumpus (1997), Balan & Monteiro (2001) estudaram o potencial deste fungo em descolorir diversos tipos de corantes e apresentaram resultados promissores para aplicação em biorremediação, entretanto não avaliaram a toxicidade após o tratamento.

Assim, o presente estudo demonstra a grande importância dos testes de ecotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade realizados após a descoloração dos corantes pelos fungos para o ambiente e à saúde humana. Pois, a aplicação destes tratamentos de descoloração sem o monitoramento toxicológico pode resultar em um elevado risco à saúde ambiental e conseqüentemente à saúde da população que estará exposta aos diversos tipos de compostos resultantes dos tratamentos que podem ser mais tóxicos que os compostos originais.

5. Considerações finais

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesta dissertação demonstram o potencial de *L. edodes* INCQS 40220 na descoloração de diferentes corantes têxteis, porém deve ser melhor avaliado, uma vez que apresentou variações nos resultados de descoloração nas diferentes etapas dos experimentos. Após a descoloração dos corantes V198 e A21 a toxicidade, avaliada pelo teste com as *daphnias*, inicialmente foi reduzida e posteriormente aumentou devido as variáveis da metodologia, já o tratamento do corante A214 e da mistura MXC resultaram em aumento da toxicidade. A variação nos resultados de toxicidade com as *daphnias* demonstraram a necessidade de padronização deste teste. Já no ensaio com células sanguíneas, *L. edodes* foi capaz de reduzir a genotoxicidade da mistura MXC e no teste com as linhagens bacterianas de *Salmonella typhimurium* foi observado resposta tóxica para algumas linhagens, principalmente TA97, e não apresentou potencial mutagênico com nenhuma das linhagens. Portanto, com base nestes resultados de toxicidade este fungo tornou-se menos atraente para aplicação em biorremediação após a realização dos ensaios toxicológicos.

P. simplicissimum INCQS 40211 foi eficiente na descoloração por adsorção e subsequente descoloração da biomassa, porém estudos posteriores deverão ser realizados a fim de identificar os metabólitos produzidos após a descoloração do corante V198 e da mistura dos corantes MXC uma vez que estes apresentaram resposta positiva à mutagenicidade na presença da linhagem TA102 que identifica danos oxidativos ao DNA. Outras análises deverão ser realizadas quanto à detoxificação dos corantes, pois os compostos produzidos por *P. simplicissimum* e/ou outros interferentes da metodologia podem ter influenciado na resposta tóxica no teste com as *daphnias* e para algumas linhagens de bactérias de *Salmonella typhimurium*, principalmente para a linhagem TA98 onde apresentou alto grau de toxicidade. Assim, este fungo foi eficiente na descoloração e na detoxificação de alguns corantes, porém pelas características apresentadas quanto à mutagenicidade até o momento não é recomendado para aplicação em biorremediação.

Há necessidade de investimento em novos métodos para o tratamento de efluentes, para prevenir possíveis efeitos deletérios de compostos como os azo corantes aos humanos e aos organismos aquáticos (TSUBOY et al., 2007). O tratamento de efluentes por fungos pode ser uma alternativa interessante, no entanto, como demonstrado no presente estudo, os resultados obtidos com o microcrustáceo *Daphnia pulex*, o Teste de Ames e o Ensaio Cometa, confirmam a grande necessidade da realização das análises toxicológicas após o tratamento fúngico de corantes.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

As amostras de sedimento do Igarapé Ramal Água Branca (IR), Igarapé Reserva Ducke ponto N (IDN) e Reserva Ducke ponto Bo (IDB) demonstraram bom percentual de descoloração. Dessas amostras foram isolados 5 fungos filamentosos, nos quais *Aspergillus japonicus* DKNA1 e *Acremonium* sp. DKBV1 foram os mais eficientes na descoloração do corante V198, porém ocorreu através de adsorção do corante pela biomassa. *Fusarium* sp. RV1 apresentou a mesma característica das amostras de sedimento (IR), transformação do corante, mas a coloração escura do meio não permitiu a seleção deste fungo;

Aspergillus japonicus DKNA1 também foi eficiente na descoloração do corante A21 e ainda reduziu a toxicidade de ambos os corantes no teste com *daphnias*, no entanto, por não apresentar capacidade superior a nossa referência não foi testado na presença de outros corantes. Após os vários testes de descoloração apenas *L. edodes* INCQS 40220, fungo referência, e *P. simplicissimum* INCQS 40211 foram selecionados para os demais ensaios de descoloração e toxicológicos. Estes fungos foram capazes de descolorir eficientemente todos os corantes testados, V198, A21, A214 e a mistura MXC. *P. simplicissimum* inicialmente adsorveu os corantes testados, mas posteriormente foi capaz descolorir inclusive da biomassa;

Nos ensaios toxicológicos foi demonstrada variação no potencial de redução da toxicidade pelos fungos selecionados. *L. edodes* reduziu a toxicidade dos corantes na presença de algumas linhagens de bactéria *Salmonella typhimurium* e reduziu a genotoxicidade da mistura MXC significativamente, mas aumentou a toxicidade dos corantes no segundo teste realizado com as *daphnias*.

P. simplicissimum reduziu a toxicidade dos corantes V198 e A21 com as *daphnias*, mas aumentou a toxicidade dos corantes A214 e da mistura MXC. No Ensaio Cometa houve redução no potencial genotóxico da mistura MXC, mas não foi estatisticamente significativo, já no Teste de Ames foi observado mutagenicidade por dano oxidativo após o tratamento do corante azo V198 e da mistura MXC. Portanto, os fungos *L. edodes* e *P. simplicissimum* podem ser aplicados na descoloração e detoxificação apenas de alguns corantes.

Assim neste estudo foi demonstrada a importância da avaliação da capacidade dos fungos em detoxificar os corantes e não somente descolorir. Foi observado que a literatura é escassa em relação à avaliação da toxicidade após os estudos de descoloração utilizando fungos, sendo necessário padronizar metodologias toxicológicas para garantir a confiabilidade nos testes de toxicidade após os tratamentos fúngicos.

7. Perspectivas

7. PERSPECTIVAS

- Realizar análise das enzimas envolvidas na descoloração dos corantes por *P. simplicissimum* e *L. edodes*;
- Caracterizar os metabólitos produzidos a partir da transformação dos corantes e avaliar a toxicidade destes metabólitos;
- Padronizar os ensaios toxicológicos com o microcrustáceo *Daphnia pulex*, com as células sanguíneas (Ensaio Cometa) e com as bactérias (Teste de Ames) reduzindo as possíveis variáveis;
- Realizar as repetições sugeridas pela literatura do Ensaio Cometa e do teste de Ames;
- Testar outras concentrações dos corantes que apresentarem toxicidade, para detectar possíveis efeitos mutagênicos;

8. Referências bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADULLA, E.; TZANOV, T.; COSTA, S.; ROBRA, K.-H.; CAVACO-PAULO, A.; GÜBITZ, G.M. Deolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, n. 8, p. 3357-3362, 2000.
- AKSU, Z.; DÖNMEZ, G.A. comparative study on the biosorption characteristics of some yeasts for remazol blue reactive dye. **Chemosphere**. v. 50, p. 1075-1083, 2003.
- ALEXANDER, M. Biodegradation and Biorremediation. **Academic Press**, 2º ed., San Diego, EUA, 239p. 1999.
- AMBRÓSIO, S.T.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. **Bioresource Technology**. v.91, p. 69-75, 2004.
- AMES, B.N.; LEE, F.D.; DURSTON, W.E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. **Proceedings of National Academy Sciences**. v. 70, n. 3, p. 782-786, 1973.
- ASHGER, M.; BHATTI, H.N.; SHAH, S.A.H.; ASAD, M.J.; LEGGE, L.R. Decolorization potential of mixed microbial consortia for reactive and disperse textile dyestuffs. **Biodegradation**. v.18, p. 311-316, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Clodocera, Crustacea)**. Rio de Janeiro: 2004. (NBR 12713).
- ARORA, D.S.; CHANDER, M. Decolourisation of diverse industrial dyes by some *Phlebia* spp. and their comparison with *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Basic Microbiology**. v.44, p. 331-338, 2004.
- ATLAS, R.M.; CERNIGLIA, C.E. Bioremediation of petroleum pollutants. Diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. **BioScience**. v. 45, p. 332-338, 1995.
- AUGUSTO, L.G.S. Teoria e prática na ação do sanitarista: a questão da saúde e do ambiente. **Cadernos Saúde Coletiva**. v.13, p. 9-26, 2005.
- BAE, J-K.; FREEMAN, H.S. Aquatic toxicity evaluation of new direct dyes to the *Daphnia magna*. **Dyes and Pigments**. v. 73, p. 81-85, 2007.

-
- BALAN, D.S.L.; MONTEIRO, R.T.R. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. **Journal of Biotechnology**. v. 89, p. 141-145, 2001.
- BANAT, I.M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. **Bioresource Technology**. v. 58, p. 217-227. 1996.
- BENNET, J.W.; WUNCH, K.G.; FAISON, B.D. Use of fungi biodegradation. **Manual of Environmental Microbiology**. ASM Press Washington, D. C., 960-971. 2002
- BERGSTEN, L.R.; MACHADO, M.E.S.; GATTI, M.J.; NISHIKAWA, M.M.; BAPTISTA, D.F.; da SILVA, M. Estudo de fungos isolados de sedimento contaminado por compostos tóxicos. **REVISA**. v. 1, n. 3, p. 185-191, 2005.
- BHATT, M.; ZHAO, J-S.; HALASZ, A.; HAWARI, J. Biodegradation of hexahydro-1,3,5,-trinitro-1,3,5-triazine by novel fungi isolated from unexplored ordnance contaminated marine sediment. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 33, p. 850-858, 2006.
- BOER, C.G.; OBICI, L.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. **Bioresource Technology**. v. 94, p. 107-112, 2004.
- BOSCHKE, E.; BÖHMER, U.; LANGE, J.; CONSTAPEL, M.; SCHELLENTRÄGER, M. ; BLEY, T. The use of respirometric measurements to determine the toxicity of textile dyes in aqueous solution and after oxidative decolourisation processes. **Chemosphere**. v. 67, p. 2163-2168, 2007.
- BRASIL. Lei nº 8080, de 19/09/1990. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=16619&word=>>>. Acesso em: 11 out. 2006.
- BRASIL. Constituição (1988). **Constituição da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF: Senado, 1988. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Constituicao/Constitui%C3%A7ao.htm>. Acesso em: 11 abr. 2008.
- BRASIL. Lei nº 9782, de 26/01/1999, que define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial**

-
- da União, Brasília, DF. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=182>> Acesso em: 13 out. 2006.
- CHA, C.-J.; DOERGE, D.R.; CERNIGLIA, C.E. Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans*. **Applied Environmental Microbiology**. v. 67, p. 4358-4360, 2001.
- CHUNG, K.-T.; CERNIGLIA, C.E. Mutagenicity of azo dyes: Structure-activity relationships. **Mutation Research**. v. 277, p. 201-220. 1992.
- _____.; STEVENS JR., S.E. Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 12, p. 2121-2132. 1993.
- _____.; CHEN, S-C.; CLAXTON, L.D. Review of the *Salmonella typhimurium* mutagenicity of benzidine analogues, and benzidine-based dyes. **Mutation Research**. v. 612, p. 58-76. 2006.
- COMPART, L.C.A.; MACHADO, K.M.G.; MATHEUS, T.H.; CARDOSO, A.V. Immobilizations of *Psilocybe castanella* on ceramis (slate) supports and its potential for soil bioremediation. **World of Journal Microbiology and Biotechnology**. v. 23; p. 1479-1483. 2007.
- CONAMA, Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução 357, de 17/03/2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Ministério do Meio Ambiente (MMA)**. Brasília, DF. 2005.
- CONNELLY, A.; SMYTH, W.F.; MCMULLAN, G. Metabolism of the phthlocyanine textile dye remazol turquoise blue by *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 179, p. 333-337, 1999.
- COOKSON, L.J. Reability of Poly B-411, a polymeric Anthraquinone-Based Dye, in Determining the Rot Type Caused by Wood-Inhabiting Fungi. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, n. 2, p. 801-803. 1995.
- COSTA, E.A. Políticas de Vigilância Sanitária: Balanço e Perspectivas. Em: Conferência Nacional de Vigilância Sanitária: Caderno de Textos: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, 2001, 183p.

- COULIBALY, L.; GOURENE, G.; SPIROS, A.N. Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. **African Journal of Biotechnology**. p. 620-630, 2003.
- CRIPPS, C.; BUMPUS, J.A.; AUST, S.D. Biodegradation of azo and heterocycle dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Environmental Microbiology**. v. 56, p. 1114-1118, 1990.
- da SILVA, M.; UMBUZEIRO, G.A; PFENNING, L.H.; CANHOS, V.P. & ESPOSITO, E. Filamentous fungi isolated from estuarine sediments contaminated with industrial discharges. **Soil and Sediment Contamination**. v. 12, n. 3, p. 345-356, 2003a.
- _____, CERNIGLIA, C.E.; POTHULURI, J.V.; CANHOS, V.P.; ESPOSITO, E. Screening filamentous fungi isolated from estuarine sediments for the ability to oxidize PAHs. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 19, p. 399-405, 2003b.
- _____; ESPOSITO, E. Utilização de fungos na recuperação ambiental. Em: ESPÓSITO, E.; de AZEVEDO J.L., eds. **Fungos: Uma Introdução a Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, p. 337-378. 2004.
- DELLAMATRICE, P.M.; MONTEIRO, R.T.R.; KAMIDA, H.M.; NOGUEIRA, N.L.; ROSSI, M.L.; BLAISE, C. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 21, p. 1363-1369. 2005.
- DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON T.-H. **Compendium of Soil Fungi**. Academic Press, London. 1980. 860p.
- DURÁN, N. Enzimas ligninolíticas. Em: E. ESPOSITO E J.L. DE AZEVEDO (Eds.), **Fungos: Uma Introdução a Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, pp. 337-378, 2004.
- EDUARDO, M.B.P.; MIRANDA, I.C.S. 2006. Vigilância Sanitária. In: **Saúde & Cidadania**. Santa Catarina, SC. Disponível em: <http://www.saude.sc.gov.br/gestores/sala_de_leitura/saude_e_cidadania/ed_08/index.html>. Acesso em: 22 set. 2006.
- EICHLEROVÁ, I.; HOMOLKA, L.; BENADA, O.; KOFRONŮVÁ, O.; HUBÁLEK, T.; NERUD, F. Decolorization of Orange G and Remazol Brilliant Blue R by the white rot fungus *Dichomitus squalens*: Toxicological evaluation and morphological study. **Chemosphere**. v. 69, p. 795-802, 2007.

- EL-RAHIM, W.M.A.; MOAWAD, H. Enhancing bioremoval of textile dyes by eight fungal strains from media supplemented with gelatine wastes and sucrose. **Journal of Basic Microbiology**. v. 43, n. 5, p. 367-375. 2003.
- ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Commonwealth Mycological Institute, Kew. 1971. 608p.
- ENSAIO COMETA. Rev 02. In: **Manual da Qualidade**. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz. Seção 10. 61p. (POP. 65.3330-011). 2007.
- FANG, HE.; WENRONG, HU.; YUEZHONG, LI. Biodegradation mechanisms and kinetics of azo dye 4BS by a microbial consortium. **Chemosphere**. v. 57, p. 293-301, 2004.
- FESSARD V.; GODARD, T.; HUET, S.; MOUROT, A.; POUL, J.M. Mutagenicity of malachite green and leucomalachile green in *in vitro* tests. **Journal of applied toxicology**. v. 19, p. 421-430. 1999.
- FONTENOT, E.J.; LEE, Y.H.; MATTHEWS, R.D.; ZHU, G.; PAVLOSTATHIS, S.G. Reductive decolorization of textile reactive dye bath under methanogenic conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 109, p. 207-224. 2003.
- FORGACS, E.; CSERHÁTI, T.; OROS, G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. **Environment International** v. 30, p. 1-19. 2004.
- FRAAIJE, M.W.; VEEGER, C.; BERKEL, W.J.H.V. Substrate specificity of flavi-dependent vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum*. **European Journal of Biochemistry**. v. 234, p. 271-277, 1995.
- _____.; MATTEVI, A.; BERKEL, W.J.H.V. Mercuration of vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum* generates inactive dimers. **FEBS Letters**. v. 402, p. 33-35, 1997.
- FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. **Bioresource Technology** v. 79, p. 251-262. 2001.
- GALEANO, E. **As veias abertas da América Latina**. Paz e Terra. p. 139, 1976, 307p.
- GLENN, J.K.; GOLD, M.H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 45, p. 1741-1747, 1983.

-
- GOTTLIEB, A.; SHAW, C.; SMITH, A.; WHEATLEY, A.; FORSYTHE, S. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. **Journal of Biotechnology**, v.101, p. 49-56, 2003
- GRAMSS, G.; KIRSCH, B.; VOIGT, K.-D.; GÜNTHER, Th.; FRITSCH, W. Conversion rates of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid cultures of fifty-eight fungi and the concomitant production of oxidative enzymes. **Mycological Research**. v. 103, p. 1009-1018, 1999.
- GRAVESEN, S., FRISVAD, J.; SAMSON, R.A. **Microfungi**. Copenhagen: Munksgaard. 1994. p. 168.
- GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Corantes têxteis. **Química Nova**. v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000.
- GUARRO, J.; GENÉ, J. *Fusarium* infections. Criteria for the identification of responsible species. **Mycoses**. v. 35, p. 109-114. 1992.
- HARAZONO, K.; NAKAMURA, K. Decolorization of mixtures of different reactive textile dyes by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete sordida* and inhibitory effect of polyvinyl alcohol. **Chemosphere**. v. 59, p. 63-68. 2005.
- HASSEMER, M.E.N.; SENS, M.L. Tratamento de Efluente de uma Indústria Têxtil. Processo Físico-Químico com Ozônio e Coagulação/Floculação. **Engenharia Sanitária e ambiental**. v. 7, n. 1-2, p. 30-36. 2002.
- HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA – effects in the single cell gel test (Comet Assay). **Toxicology Letters**. v. 90, p. 183-188. 1997.
- HAVATNI, N.; MÉCS, I. Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of *Lentinula edodes*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 55, p. 199-203. 2003.
- HEINFLING, A., BERGBAUER, M.; SZEWZYK, U. Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 48, p. 261-266. 1997.
- HEINFLING-WEIDTMANN, A.; REEMTSMA, T.; STORM, T.; SZEWZYK, U. Sulfophthalimide as major metabolite formed from sulfonated phthalocyanine dyes by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 203, p. 179-183. 2001.

-
- HILDENBRAND, S.; SCHMAHL F.W.; WODARZ, R.; KIMMEL, R.; DARTSCH, P. C. Azo dyes and carcinogenic aromatic in cell cultures. **International Archives of Occupational and Environment Health**. v. 72, n. 3, p. M52-M56. 1999.
- HUNGER, K. **Industrial dyes: Chemistry, Properties, Applications**. Weinheim: John Wiley and Sons Inc. 2003. p. 660.
- JÄGER, I.; HAFNER, C.; SCHNEIDER, K. Mutagenicity of different textile dye products in *Salmonella typhimurium* and mouse lymphoma cells. **Mutation Research**. v. 561, p. 35-44, 2004.
- JIN, X-C.; LIU, G-Q.; XU, Z-H; TAO, W-Y. Decolorization of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 74, n.1, 239-243. 2007
- JUNGHANNS, C.; KRAUSS, G.; SCHLOSSER, D. Potential of aquatic fungi derived from diverse freshwater environments to decolourise synthetic azo and anthraquinone dyes. **Bioresource Technology**. doi:10.1016/j.biotech.2007.02015. 2007
- KIM, S.J.; ISHIKAWA, K.; HIRAI, M.; SHODA, M. Characteristics of a newly isolated fungus, *Geotrichum candidum* Dec 1, which decolorizes various dyes. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 79, p. 601-607, 1995.
- _____.; SHODA, M. Decolorization of molasses and a dye by a newly isolated strain of the fungus *Geotrichum candidum* Dec 1. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 62, p. 114-119, 1999.
- KIRBY, N.; MARCHANT, R.; MCMULLAN, G. Decolourisation of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 188, p. 93-96, 2000.
- KLICH, M.A. **Identification of common *Aspergillus* species**. The Netherlands: Centralalbureau voor Schimmelcultures. 2002. p.116.
- KLICH M.A.; PITT J.I. **A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* Species and their Teleomorphs**. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, New South Wales, 1988. 116p.
- KNASMÜLLER, S.; ZÖHRER, E.; KAINZBAUER, E.; KIENZL, H.; COLBERT, B.; LAMPRECHT, G.; SCHULTE-HERMANN, R. Detection of mutagenic activity in textiles with *Salmonella typhimurium*. **Mutation Research**. v. 299, p.45-53, 1993.

- KUMARI, K.; ABRAHAM, E. Biosorption of anionic textile dyes by nonviable biomass of fungi and yeast. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1704-1710, 2007.
- KUNZ, A., PERALTA-ZAMORA, P., MORAES, S.G.; DÚRAN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**. v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.
- LEVIN, L., PAPINUTTI, L. & FORCHIASSIN, F. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. **Bioresource Technology**, v.94, p. 169-176, 2004.
- LIMA, A. L. **Degradação de corantes têxteis por bactérias**. Monografia (Graduação em Ciências biológicas). São João da Boa Vista (SP): Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos – UNIFEOB. Disponível em: <<http://www.feob.br>> Acesso em: 23 out. 2004.
- LUCCHESI, G. A **Vigilância Sanitária no Sistema Único de Saúde**. Em: Conferência Nacional de Vigilância Sanitária: Caderno de Textos: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, p. 183, 2001a.
- _____. **Globalização e regulação sanitária: os rumos da vigilância sanitária no Brasil**. Tese [Doutorado]. Rio de Janeiro (RJ): Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública – ENSP. p. 329, 2001b.
- MACHADO, K.M.G., COMPART, L.C.A., MORAIS, R.O., ROSA, L.H.; SANTOS, M.H. Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from Brazilian ecosystems. **Brasilian Journal of Microbiology**. v. 37, p. 481-487, 2006.
- MANU, B.; CHAUDHARI, S. Anaerobic decolorisation of simulated textile wastewater containing azo dyes. **Bioresource Technology**. v. 82, p. 225-231, 2002.
- MARON, R. M. & AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**. v. 113, n. 3-4, p. 173-215, 1983.
- MARTINS, M.A.M., QUEIROZ, M.J., SILVESTRE, A.J.D.; LIMA, N. Relationship of chemical structures of textile dyes on the pre-adaptation medium and the potentialities of their biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. **Research in Microbiology**. v. 153, p. 361-368, 2002.
- MATHUR, N.; BHATNAGAR, P.; BAKRE, P. Assessing mutagenicity of textile dyes from Pali (Rajasthan) using Ames Biossay. **Applied Ecology and Environmental Research**. v. 4, n. 1, p. 111-118, 2005.

- MÁXIMO, C., AMORIM, M.T.P. & COSTA-FERREIRA, M. Biotransformation of industrial reactive azo dyes by *Geotrichum* sp. CCMI 1019. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 145-151. 2003.
- MELO, A.R. **Otimização do reúso de água em lavadores contínuos da indústria têxtil**. Santa Catarina: UFSC, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. 2005. 219p.
- MINUSSI, R.C., DE MORAES, S.G., PASTORE, G.M.; DURÁN, N. Biodegradation screening of synthetic dyes by four White-rot fungi in a solid medium: possible role of siderophores. **Letters in Applied Microbiology**. v 33, p. 21-25, 2001.
- MIRSHRA, G.; TRIPATHY, M. A critical review of the treatment for decolorization of textile effluent. **Colourage**. v. 40, p. 35-38, 1993.
- MOAWAD, H.; EL-RAHIM, W.M.A.; KHALAFALLAH, M. Evaluation of biotoxicity of textile dyes using two bioassays. **Journal of Basic Microbiology**. v. 43, p. 218-229, 2003.
- NAGAI, M., SATO, T., WATANABE, H., SAITO, K., KAWATA, M.; ENEI, H. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 60, p. 327-335, 2002.
- NASCIMENTO, C.R.S. **Avaliação do potencial de descoloração e detoxificação de corantes utilizados em indústria têxtil por fungos isolados de sedimento do Parque Nacional Serra da Capivara (PI)**. Dissertação [Mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS. 75p. 2008.
- NELSON, P.E., DIGNANI, M.C.; ANAISSIE, E.J. Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* species. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 7, n. 4 , p. 479-504, 1994.
- NIGAM, P., BANAT, I.M., SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. **Process Biochemistry**. v. 31, n. 5, p. 435-442. 1996.
- NOVOTNÝ, C., RAWAL, B., BHATT, M., PATEL, M., ŠAŠEK, V.; MOLITORIS, H.P. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. **Journal of Biotechnology**. v. 89 , p. 113-122, 2001.

-
- _____. SVOBODOVÁ, K., KASINATH, A.; ERBANOVÁ, P. Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 54, p. 215-223. 2004.
- _____, DIAS, N., KAPANEN, A., MALACHOVÁ, K., VÁNDROVCOVÁ, M., ITÄVAARA, M.; LIMA, N. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo and anthraquinone dyes. **Chemosphere**. v. 63, p. 1436-1442. 2006.
- OSUGI, M.E.; UMBUZEIRO, G.A.; DE CASTRO, F.J.V.; ZANONI, M.V.B. Photoelectrocatalytic oxidation of remazol turquoise blue and toxicological assessment of its oxidation products. **Journal of Hazardous Materials**. v. 137, p. 871-877, 2006.
- ÖZSOY, H.D., ÜNYAYAR, A.; MAZMANCI, M.A. Decolourisation of reactive textile dyes Drimarene Blue X3LR and Remazol Brilliant Blue R by *Funalia trogii* ATCC 200800. **Biodegradation**. v. 16, p. 195-204. 2005.
- ÖZTÜRK, A.; ABDULLAH, M.I. Toxicological effect of indole and its azo dye derivatives on some microorganisms under aerobic conditions. **Science of the Total Environment**. v. 358, p. 137-142. 2006.
- PALMIERI, G.; CENNAMO, G.; SANNIA, G. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 36, p. 17-24, 2005.
- PARK, S.Y; CHOI, J. Citotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. **Environmental International**. v. 33, p. 817-822, 2007.
- PARSHETTI, G.K., KALME, S.S., GOMARE, S.P.; GOVINDWAR, S.P. Biodegradation of Reactive Blue 25 by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 3635-3642. 2007.
- PASCHOAL, F.M.M.; TREMILIOSI-FILHO, G.T. Aplicação de tecnologia de eletrofloculação na recuperação do corante índigo blue a partir de efluentes industriais. **Química Nova**. v. 28, n. 5, p. 766-772. 2005.
- PASCOE, I.G. Fusarium morphology I: Identification and characterization of a third conidial type, the mesoconidium. **Mycotaxon**. v. 37, p. 121-160. 1990a.
- _____. Fusarium morphology II: Experiments of growing conditions and dispersal of mesoconidia. **Mycotaxon**. v. 37, p. 161-172. 1990b.

- RAMSAY, J.A.; NGUYEN, T. Decoloration of textile dyes by *Trametes versicolor* and its effect on dye toxicity. **Biotechnology Letters**. v. 24, p. 1757-1761. 2002.
- RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Editora Ulbra, 2003. 355p.
- RINDE, E.; TROLL, W. Metabolic reduction of benzidine azo dyes to benzidine in the reshus monkey. **Journal of the National Cancer Institute**. v.55, p. 181-182. 1975.
- ROBINSON, T., MCMULLAN, G., MARCHANT, R. ; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**. v. 77, p. 247-255. 2001a.
- _____, Chandran, B.; Nigam, P. Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolourisation of textile dyes. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 29, p. 575-579. 2001b.
- RODRIGUEZ, A.; FALCÓN, M.A., CARNICERO, A., PERESTELO, F., DE LA FUENTE, G.; TROJANOWSKI, J. Laccase activities of *Penicillium chrysogenum* in relation to lignin degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 45, p. 399-403. 1994.
- _____, PERESTELO, F.; CARNICERO, A.; REGALADO, V.; PEREZ, R.; DE LA FUENTE, G.; FALCÓN, M.A. Degradation of natural lignins and lignocellulosic substrates by soil-inhabiting fungi imperfecti. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 21, p. 213-219. 1996.
- ROSOLEN, L. A., MONTEIRO, R. T. R., DELLAMATRICE, P. M. & KAMIDA, H. M. Biodegradação de efluente têxtil e nove corantes técnicos utilizando fungos basidiomicetos. **Química Têxtil**. v. 76, p. 44-52, 2004.
- RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 6ª ed. Roca, São Paulo, Brasil, 1996. 1029p.
- RYBERG. K., ISAKSSON, M., GRUVBERGER, B., HINDSÉN, M., ZIMERSON, E. & BRUZE, M. Contact allergy to textile dyes in southern Sweden. **Contact Dermatitis**. v. 54, p. 313-321. 2006.
- SALEM, V. Corantes na indústria têxtil: uma abordagem ecológica. **Química têxtil**. v. 18, n. 38, p. 6-15. 1995.

- SAMSON, R.M., HOEKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to Food and Airborne Fungi**. 6th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht. 2002. 387p.
- SANTOS, A.Z., NETO, J.M.C., TAVARES, C.R.G.; DA COSTA, M.G. Screening of filamentous fungi for the decolorization of a commercial reactive dye. **Journal of Basic Microbiology**. v. 44, p. 288-295. 2004.
- SCHNEIDER, K., HAFNER, C.; JÄGER, I. Mutagenicity of textile dye products. **Journal of Applied Toxicology**. v. 24, p. 83-91. 2004.
- SELCUK, H. Decolorization and detoxification of textile wastewater by ozonation and coagulation processes. **Dyes and Pigments**. v. 64, p. 217-222. 2005.
- SHARMA, M.K.; SOBTI, R.C. Rec effect certain textile dyes in *Bacillus subtilis*. **Mutation Research**. v. 465, p. 27-38, 2000.
- SHORE, J. **Colorants and Auxiliaries: Organic Chemistry and Application Properties: Society of Dyers and Colourists**. Vol. 1 – Colorants. England: Society of Dyers and Colourists. 1990. 372p.
- SINGH, H. **Mycoremediation: fungal remediation**. New Jersey: Wiley-Interscience, 2006. 592p.
- SOUZA, C.L.; PERALTA-ZAMORA, P. Degradação redutiva de azo-corantes utilizando-se ferro metálico. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v. 11, p. 16-20. 2006.
- SPADARO, J.T.; GOLD, M.H.; RENGANATHAN, V. Degradation of azo dyes by lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Environmental Microbiology**. v. 58, p. 2397-2401, 1992.
- SPONZA, D.T. Toxicity studies in a chemical dye production industry in Turkey. **Journal of Hazardous Materials**. v. 138, p. 438-447, 2006.
- SUMATHI, M.; KALAISELVI, M.; PALANAVIEL, M. RAJAGURU, P. Genotoxicity of textile dye effluent on fish (*Cyprinus carpio*) measured using the comet assay. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 66, p. 407-414, 2001.
- SUTTON, B.C. **The Coelomycetes**. Commonwealth Mycological Institute England, Kew. 1980. 696p.

- TAMARO, M.; MONTI-BRAGADIN, C.; BANFI, E. Mutagenic activity of anthraquinone derivatives used as dyes in a textile factory. **Bollettino dell Istituto Sieroterapico Milanese**. v.26, 105-107. 1975.
- TAMBELLINI, A.T.; CÂMARA, V.M. Vigilância Ambiental em Saúde: conceitos, caminhos e interfaces com outros tipos de vigilância. **Caderno Saúde Coletiva**. v. 10, p. 77-93. 2002.
- TATARKO, M.; BUMPUS, J.A. Biodegradation of congo red by *Phanerochaete chrysosporium*. **Water Research**. v. 32, p. 1713-1717, 1998.
- TOH, Y-C.; YEN, J.J.L.; OBBARD, J.P.; TING, Y-P. Decolourisation of azo dyes by white-rot fungi (WRF) isolated in Singapore. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 33, p. 569-575. 2003.
- TSUBOY, M.S.; ANGELI, J.P.F.; MANTOVANI, M.S.; KNASMÜLLER, S.; UMBUZEIRO, G.A.; RIBEIRO, L.R. Genotoxicity, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in Vitro**. v. 21, p. 1650-1655, 2007.
- TSUDA, S.; MATSUSAKA, N.; MADARAME, H.; UENO, S.; SUSA, N.; ISHIDA, K.; KAWAMURA, N.; SEKIHASHI, K.; SASAKI, Y.F. The comet assay in eight mouse organs: results with 24 azo compounds. **Mutation Research**. v. 465, p. 11-26, 2000.
- UMBUZEIRO, G.A.; FREEMAN, H.S.; WARREN, S.H.; OLIVEIRA, D.P.; TERAQ, Y.; WATANABE, T.; CLAXTON, L.D. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cricetus River. **Chemosphere**. v. , p. 2005.
- WAINWRIGHT, M. The impact of fungi on environmental biogeochemistry. In: **The fungal community: its organization and role in the ecosystem** (ed. G.C. Carroll & D.T. Wicklow), New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 601-618, 1992.
- WANG, L.; PAN, X.; WANG, F.; YANG, L.; LIU, L. Structure-properties relationships investigation on the azo dyes derived from benzene sulfonamide intermediates. **Dyes and Pigments**. v. 76, p. 636-645, 2008.
- WATANABE, T.; TOMIYAMA, T.; NISHIJIMA, S.; KANDA, Y.; MURAHASHI, T.; HIRAYAMA, T. Evaluation of genotoxicity of 3-amino-3-acetylamino- and 3-nitrobenzothrone using the Ames/Salmonella Assay and the Comet Assay. **Journal of Health Science**. v.51, n. 5, p. 569-575, 2005.

-
- WEISBURGER, J.H. Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. **Mutation Research**. v. 506-507, p. 9-20. 2002.
- VANDEVIVERE, P.D.; BIANCHI, R.; VERSTRAETE, W. Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 72, p. 289-302. 1998.
- VANHULLE, S.; TROVASLET, M.; ENAUD, E.; LUCAS, M.; TAGHAVI, S.; LELIE, D.V.D.; AKEN, B.V.; FORET, M.; ONDERWATER, R.C.A.; WESENBERG, D.; AGATHOS, S.N.; SCHNEIDER, Y.J.; CORBISIER, A.M. Decolorization, Cytotoxicity and genotoxicity reduction during a combined ozonation/fungal treatment of dye-combinated wastewater. **Environmental Science & Technology**. v. 42, p. 584-589, 2008.
- VIEIRA, D. P. 1995. **Facilitadores no processo de inovação tecnológica**. Tese (Doutorado). Santa Catarina (RS): Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Disponível em: <<http://www.eps.ufsc.br>> Acesso em: 23 out. 2006.
- VITALI, V.M.V. 2005. **Biodegradação de Hexacolorobenzeno por *Eupenicillium spp.* e *Psilocybes castanella* em solos contaminados com organoclorados**. Tese [doutorado]. São Paulo (SP): Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP.
- YANG, Q.; YANG, M.; PRITSCH, K.; YEDILER, A.; HAGN, A.; SCHLOTTER, M.; KETTRUP, A. Decolorization of synthetic dyes and production of manganese-dependent peroxidase by new fungal isolates. **Biotechnology Letters** v. 25, p. 709-713. 2003.
- YU, M.C.; SKIPPER, P.L.; TONNEBAUM, S.R.; CHAN, K.K.; ROSS, R.K. Arylamine exposures and bladder cancer risk. **Mutation Research**. v. 506-507, p. 21-28. 2002.
- ZANONI, M.V.B.; CARNEIRO, P.A. O descarte dos corantes têxteis. **Ciência hoje**. v. 08, p. 61-64. 2001.
- ZENG, G.M.; YU, H.Y.; HUANG, H.L.; HUANG, D.L.; CHEN, Y.N.; HUANG, G.H.; LI, J.B. Laccase activities of a soil fungus *Penicillium simplicissimum* in relation to lignin degradation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 22, n.4, p. 317-324, 2006.
- ZHENG, Z.; LEVIN, R.E.; PINKHAM, J.L.; SHETTY, K. Decolorization of polymeric dyes by a novel *Penicillium* isolate. **Process Biochemistry**. v. 34, p. 31–37. 1999.