UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

GLEISON DE SOUZA

Produção, extração e estabilidade de enzimas lignocelulolíticas para uso em degradação de compostos poluentes

Piracicaba
2012

GLEISON DE SOUZA

Produção, extração e estabilidade de enzimas lignocelulolíticas para uso em degradação em compostos poluentes

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Profa. Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro

Piracicaba
2012

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Souza, Gleison
Produção, extração e estabilidade de enzimas lignocelulolíticas para uso em degradação em compostos poluentes / Gleison de Souza; orientadora Regina Teresa Rosim Monteiro. - - Piracicaba, 2012.
111 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Bagaços 2. Biorremediação 3. Cana-de-açúcar 4. Corante 5. Degradação ambiental 6. Efluentes 7. Fungos 8. Indústria sucro-alcooleira 9. Indústria têxtil 10. Vinhaça I. Título

CDU 577.151 : 579.6

DEDICATÓRIA

A Deus, por estar sempre presente em minha vida e por tornar tudo possível ao seu tempo, principalmente na realização deste trabalho.

Aos meus pais, Nadir Otavio de Souza e Maria Angelina Nardo de Souza por todo esforço em proporcionar meus estudos, pelo amor incondicional, generoso sem limites, sendo presença constante em minha vida, pelos conselhos nos momentos de superação. Amo vocês infinitamente!

Aos meus saudosos avôs Nicolino Nardo e Luiza Bergamim Nardo e Luiz de Souza e Amabili Passarim de Souza (*in memorian*), sempre presentes na minha vida e com a certeza de Deus vivo presente no nosso amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, em especial ao Laboratório de Ecologia Aplicada, por proporcionar excelente condição de pesquisa.

À Comissão de Pós-Graduação na pessoa da Profa. Dra. Elisabete A. N. Fernandes pela dedicação e respeito aos alunos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos e suporte financeiro.

A Profa. Dra. Regina T. R. Monteiro, pela orientação, disposição, paciência, dedicação ao aprendizado, amizade e principalmente, pelo exemplo de profissional competente, dedicada, que realiza tudo com muito amor e respeito.

Aos funcionários do Lab. Ecologia Aplicada Eduardo pelo companheirismo e incentivo no ciclismo, mais que um amigo, um primo e minha querida Rosângela com seu jeitinho delicado de ser cativa a todos, com seu carinho e amizade.

Aos amigos da pós-graduação Georgia, Eduardo Armas & Denise, Luiz, Nadia, Mario, Gabriela, Carlos, Alexandre, Tâmara, Sergio e as queridas estagiárias Ana, Aline, Sabrina, Raquel, Amanda e Natalya por compartilharem conhecimentos e alegrias. Em especial a Silvia Brummer pela ajuda.

Aos amigos do Lab. Biogeoquimica: Profa. Dra. Brigitte J. Feigl e ao Prof. Dr. Carlos C. Cerri, pelos primeiros ensinamentos, as funcionárias Lilian, Dagmar e Sandra e ex-alunos da pós-graduação Edgar, Dinailson, Marilda, Marcos, Conceição, Gabor, Uwe (*in memorian*) e Solismar que contribuíram para meu crescimento profissional e pela amizade e convivência agradável.

Aos amigos do Lab. Isótopos Estáveis, Prof. Dr. José A. Bendassolli pelos ensinamentos anteriores, uma pessoa a ter como exemplo, aos amigos Magda, Bento, Cleuber, Hugo, Miguel, Pingin, Juliana Carlão e Felipe pela convivência agradável.

Ao Dr. Glauco A. Tavares pela dedicação e disposição durante todo meu convívio no LIE e no desenvolvimento deste trabalho, pelo seu exemplo, competência e paciência em ensinar sempre e amizade.

Aos meus abençoados Alberto, Antonio, Vera, Mariana (*in memorian*), Nivaldo, Maria Carmo, Edison, Pedro, Lurdes, Antonio Danelon e Neuza e aos

primos Henrique, Carim, Lorena, Viviane, Fabio, Carolina, Marcelo Cauã e Fabrício os quais eu pude contar em todos os momentos da minha caminhada.

Agradeço Sandra O. Ducatti que está sendo fundamental na minha vida e companheirismo no crescimento profissional.

Agradeço my mother in law Suzete e father in law Nelson “Japão” (*in memorian*), pouco tempo de convivência, deixou saudades entre nós; A convivência agradável e reuniões em família a Rafaela & Ricciéri, Lurdes & Emerson & Carolina.

Aos amigos Diego, Nadia e Graziela e pela sincera amizade e ajuda nos momentos essenciais deste trabalho.

Amigos são irmãos que escolhemos: Alexandre & Viviane & Gabriel, Osmar Juciney, Irandir & Ana, Rafael, Rodrigo & Paula, Claudia e Paula e seus Pais Mara e Bueno, incentivando a olhar pra frente e pela amizade e carinho.

À secretaria de Pós-Graduação: Fábio A. S. Oliveira, Neuda F. Oliveira, Daiane Vieira e Sonia Campos.

À querida Marília R. G. Henyei, pela amizade, atenção e profissionalismo na realização da normatização das referências bibliográficas. Meu muito obrigado a Renata & Julio, Raquel, Adriana, Celsinho e à Silvia pelos momentos vividos de alegria e amizade que permanecera para sempre.

À Bioexx na pessoa do João Batista na confiança depositada neste trabalho.

Ao Gabriel, apesar de argentino é uma pessoa maravilhosa e pela ajuda nas analises estatísticas e a tua esposa Silvana.

Aos professores que se disponibilizaram em participar como titular ou suplente da banca, agradeço antecipadamente.

Ao Santuário Nossa Sra. dos Prazeres, representado pelo Pe. Edivaldo que desde a tua vinda nesta estação, estivemos sintonizados pelas orações, fé e amor.

A todas as pessoas que contribuíram indiretamente para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO.

RESUMO

SOUZA, G. **Produção, extração e estabilidade de enzimas lignocelulolíticas para uso em degradação em compostos poluentes**. 2012. 111 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

Devido à praticidade do uso de enzimas na transformação de produtos, o desenvolvimento de tecnologias dos processos enzimáticos e sua utilização vêm crescendo na indústria devido às inúmeras aplicações em vários setores de importância econômica e saúde. Os fungos do gênero *Pleurotus*, conhecidos por fungos da podridão branca, sintetizam uma variedade de enzimas lignocelulolíticas que tem potencial para degradar/transformar diversos compostos poliméricos, entre eles a vinhaça oriunda da indústria sucroalcooleira. A proposta deste trabalho foi a de avaliar as enzimas lignocelulolíticas como lacase, peroxidase e manganês peroxidase, sintetizadas pelos fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068, cultivados em vinhaça e/ou bagaço de cana-de-açúcar umedecidos com vinhaça. A atividade dessas enzimas extracelulares foram avaliadas, a cada três dias, durante 30 dias, quanto a estabilidade com relação ao tempo, e relacionadas a capacidade de degradação do corante índigo. O cultivo dos fungos foi realizado a 28°C em incubadoras, com agitação para vinhaça *in natura*, e estacionária para o meio sólido. Após o cultivo, o sobrenadante ou a solução enzimática extraída, do meio sólido, com tampão citrato, foram utilizados. A descoloração do corante índigo foi testada em solução à 0,02%, a pH 4,5 e temperatura 35°C. As atividades variaram com o meio de cultivo e com as linhagens. A lacase teve picos de atividades entre 12º e 15º dias com valores variando de 384 a 1.463 UI L^{-1}, no meio líquido e no meio sólido, picos ao 6° dia de cultivo, com valores de 4 a 40 UI L^{-1}. A atividade da peroxidase teve pico aos, 12°, 15° e 21° dia de cultivo, conforme a linhagem do fungo e atividades entre 356 a 975 UI L^{-1}. A atividade de MnP teve pico aos 12° e 18° dia e atividades de pico entre 2,24 a 174 UI L^{-1}. Quanto a atividade específica *P. sajor-caju* produziu lacase e MnP com maior eficiência comparado com as outras linhagens, enquanto que *P. albidus* CCB 068, produziu peroxidases com maior eficiência. O cultivo em vinhaça *in natura* foi mais eficiente que em meio sólido com bagaço. As estabilidades das atividades enzimáticas variaram conforme a linhagem do fungo, tempo de cultivo e com o

tempo de estocagem, de 1, 2 e 24 h na temperatura ambiente. A descoloração do índigo foi relacionada com a atividade enzimática de lacase e MnP para a linhagem do fungo *P. sajor-caju* CCB 020.

Entretanto, como foi mostrado no estudo, os basidiomicetos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus, P. albidus* CCB 068 apresentaram uma descoloração da vinhaça foi possível observar que o fungo *P. sajor-caju* CCB 020 apresentou maior potencial de descoloração da vinhaça de aproximadamente 70%, em relação ao *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 tiveram resultado inferior. A descoloração da vinhaça com relação à absorbância é lida a 680 nm.

Ambos fungos inoculados em meio contendo vinhaça + bagaço teve melhor resultado nos 3º, 6º, 9º, 12º, 21º e 30º dias, exceto aos 15º e 18º dias, onde o meio só com vinhaça teve melhor resultado, em ambos os comprimentos de onda (λ). O *P. sajor-caju* CCB 020 inoculado em meio de vinhaça + bagaço foi melhor aos 9º e 12º dias, na eficiência da descoloração do corante com 83,56% a 77,56% dos resultados, para *P. ostreatus* foi melhor aos 6º e 12º dias, na descoloração do corante com 46,09% a 46,18% respectivamente, já para *P. albidus* CCB 068 resultado foi nos dias 6º e 9º dias (56,23% e 57,42%).

Palavras-chave: vinhaça; bagaço de cana-de-açúcar; enzimas lignocelulolíticas; biodegradação; descoloração

ABSTRACT

SOUZA, G. **Production, extraction and stability of lignocellulolytic enzymes for use in degradation of pollutant compounds.** 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

Due to the convenience of using enzymes in the processing of products, technology development of enzymatic processes and its use are growing in the industry because of numerous applications in various sectors of economic and health importance. The fungi of the genus Pleurotus synthesize a variety of lignocellulolytic enzymes that has the potential to degrade / transform various polymeric compounds, including vinasse originating from the sugar industry.

The proposal is to evaluate lignocellulolytic enzymes such as laccase, peroxidase and MnP, synthesized by the fungi *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus* and *P.albidus* CCB 068 cultivated in vinasse and /or sugarcane bagasse moistened with vinasse. The activity of these extracellular enzymes was evaluated every three days for 30 days with regard to stability in relation to time and related to the degradation ability of the indigo dye.

The cultivation of the fungi was performed at 28°C in incubators, with stirring of vinasse in nature, and the solid medium was stationary. After culturing, the supernatant or the enzyme solution extracted from the solid medium with citrate buffer was used. Decolorization of the indigo dye was tested in solution at 0.02% at pH 4.5 and 35 °C temperature. The activities varied according to the culture medium and the strains.

Laccase had peaks of activity between the 12th and 15th days with values ranging from 384 to 1463 UI L^{-1}, in the liquid and solid medium with peaks at the 6th day of culture, with values ranging from 4 a 40 UI L^{-1}. Peroxidase activity peaked at the 12th, 15th and 21st days of cultivation, according to the strain of the fungus and activities from 356 to 975 UI L^{-1}. The MnP activity peaked at the 12th and 18th days and had peak activities from 2.24 to 174 IU L^{-1}. The specific activity *P. sajor-caju* CCB 020 produced laccase and MnPmore efficiently when compared with the other strains, whereas P. albidus, produced peroxidases more efficiently. Cultivation in vinasse *in nature* was more efficient than cultivation in solid medium with sugar cane bagasse. The stabilities of the enzymaticactivities varied with the strain of the fungus,

cultivation time and the storage time of 1, 2 and 24 h at room temperature. The indigo decolorization was related to the enzymatic activity of laccase and MnP for the strain of the fungus *P. sajor-caju* CCB 020. However, *Pleurotus* showed decolorization of vinasse, and it was noticed that *P. sajor-caju* CCB 020 showed greater potential for vinasse decolorization, about 70%, compared to the others that had lower results. The vinasse decolorization with respect to the absorbance is read at 680 nm.

Both fungi inoculated in medium containing vinasse + bagasse had better results on the 3rd ,6th, 9th, 12th, 21st and 30th days, except on the 15th and 18th days when the medium with vinasse alone had better results in both wavelengths (λ). The *P. sajor-caju* CCB 020 inoculated in the vinasse + bagasse medium was better on the 9thand 12th days, in the efficiency of decolorization of the dye with 83.56% to 77.56% of the results, for *P. ostreatus* it was better on the 6th and 12th days in decolorization of the dye with 46.09% and 46.18% respectively, while for *P. albidus* CCB 068 the result was on the 6th and 9th days (56.23% and 57.42%).

Keywords: vinasse, sugar canebagasse; lignocellulolytic enzymes, biodegradation, decolorization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
2. OBJETIVOS 15
3. REVISÃO DA LITERATURA 16
3.1 Fungos Basidiomicetos 16
3.2 Degradação de corante por fungos basidiomicetos 18
3.3 Vinhaça 21
3.4 Bagaço de cana-de-açúcar 24
3.4.1 Lignina 25
3.4.2 Celulose 25
3.4.3 Hemicelulose 26
3.5 Degradação de material lignocelulósico por basidiomicetos 26
3.6 Lacase 30
3.7 Peroxidases 32
3.8 Manganês Peroxidase 32
3.9 Corantes Têxteis 33
3.10 O processamento têxtil – origem dos efluentes 38
3.11 Processos de tratamento utilizados pela indústria têxtil 39
3.12 Cor 41
4. MATERIAIS E MÉTODOS 43
4.1 Vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar 43
4.2 Micro-organismos 43
4.3 Manutenção das culturas dos fungos em grãos de trigo 44
4.4 Cultivo dos fungos 45
4.4.1 Cultivo dos fungos para produção de enzimas em vinhaça 45
4.4.2 Cultivo dos fungos para produção de enzimas em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar 46
4.5 Determinação da atividade de enzimas lignolíticas 46
4.5.1 Reagentes 47
4.5.2. Atividade enzimática da lacase (EC 1.10.3.2) 47
4.5.3. Atividade enzimática das peroxidases (EC 1.11.1.7) 48
4.5.4. Atividade enzimática da manganês peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13) 48
4.5.5 Cálculo das atividades lignolíticas 49

4.6 Determinação das proteínas totais 49
4.7 Estabilidade das enzimas 50
4.8 Descoloração da vinhaça 50
4.9 Descoloração do corante índigo 51
4.10 Análise estatística 51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 52
5.1 Produção de enzimas lacase, peroxidases e manganês peroxidase 52
5.2 Proteínas totais e Atividade específica das enzimas 58
5.3 Estabilidade da Atividade Enzimática 60
5.3.1 Estabilidade da Atividade Enzimática pelo fungo P. sajor-caju CCB 020 ... 60
5.3.2 Estabilidade da Atividade Enzimática pelo fungo P. ostreatus 64
5.3.3 Estabilidade da Atividade Enzimática pelo fungo P. albidus CCB 068 67
5.4 Descoloração da vinhaça 71
5.5 Descoloração do índigo 73
6. CONCLUSÃO 80
REFERÊNCIAS 81
ANEXOS 94

1. INTRODUÇÃO

A indústria, depois da agricultura, é o setor produtivo que mais utiliza a água para seus mais diversos tipos de processos. Assim, é considerada uma grande consumidora de água e ao mesmo tempo responsável pela mais grave forma de poluição através do lançamento, muitas vezes direto, dos seus efluentes nos cursos d'água.

A contaminação ambiental por compostos tóxicos tornou-se um dos maiores problemas enfrentados pelo mundo industrializados de hoje. Diariamente os noticiários reportam sobre diversas contaminações, a que os organismos inclusive o homem são expostos (NASCIMENTO et al., 2001).

Geralmente a pressão causada pelos efluentes industriais sobre o meio ambiente, como é o caso também dos efluentes industriais têxteis, torna-se ainda mais intensa pela falta de tecnologias adequadas capazes de minimizarem os efeitos tóxicos e poluentes destes efluentes.

Com o advento da agricultura e com a industrialização, a quantidade de resíduos produzida supera a capacidade do ambiente em reciclar, por isso há uma urgência de compreender a gravidade dos danos causados ao ambiente. Dentro desse panorama, os fungos têm um papel de extrema importância, pois normalmente ocupam o papel de degradadores na cadeia alimentar sendo capazes de reciclar eficientemente uma ampla gama de resíduos.

Na cadeia alimentar, os fungos ocupam a posição de decompositores, tendo um papel muito importante na manutenção do equilíbrio ambiental. Esses organismos se nutrem por absorção; são capazes de produzir enzimas extracelulares o que os torna aptos a utilizar como fonte de carbono e energia uma ampla gama de substratos, tanto de altas quanto de baixas massas molares e diferentes graus de toxicidade.

A produção de enzimas lignocelulolíticas como lacase, celulase, manganês peroxidase, carboximetilcelulase, lignina peroxidase e xilanase é de grande interesse econômico devido às inúmeras aplicações destas enzimas nas indústrias de celulose, de alimentos, de ração animal, sucroalcooleiras, têxtil, dentre outras. Fungos do gênero *Pleurotus*, conhecidos por fungos da podridão branca, sintetizam diferentes enzimas hidrolíticas e oxidativas. Este gênero destaca-se ainda pelo fato

de ser o de mais fácil e barato cultivo dentre os cogumelos comestíveis cultivados, pois se desenvolve em qualquer resíduo que contenha celulose, hemicelulose e lignina sem a necessidade de fermentação prévia do substrato.

Devido à praticidade do uso de enzimas na transformação de produtos, o desenvolvimento de tecnologias dos processos enzimáticos e sua utilização vêm crescendo na indústria de alimentos, ambientais e químicas. O avanço que o mercado de enzimas vem alcançando decorre de sua natureza proteica, sua especificidade, o uso em baixas concentrações (BOM et al., 2008). Preparações enzimáticas estão disponíveis no mercado em diferentes graus de pureza e apresentam as mais variadas aplicações. A integração de cadeias produtivas existentes inserindo subprodutos de um tipo de produção em outra, pode baratear o processo com a inserção de novos componentes, diminuindo o resíduo descartado na natureza e gerando sustentabilidade aos sistemas.

A indústria sucroalcooleira é uma excelente representação do processo de desenvolvimento limpo, tendo a vinhaça e o bagaço de cana-de-açúcar como uns dos maiores subprodutos os quais são re-utilizados no mesmo processo.

A proposta deste trabalho é a de produzir enzimas lignocelulolíticas a partir de vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar, que degradam e destoxificam corantes têxteis Para tanto, foram utilizados os fungos *Pleurotus sajor-caju* CCB 020, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus albidus* CCB 068, os quais se desenvolvem em vinhaça pura, produzem e secretam uma grande variedade de enzimas extracelulares, como a lacase, peroxidases e manganês peroxidases. Alem da produção das enzimas foram realizadas a extração e avaliação da estabilidade no tempo e diferentes pH.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal desta pesquisa foi avaliar a descoloração da vinhaça por três linhagens de *Pleurotus* (*P. sajor-caju* CCB 020*, P. ostreatus,* e *P. albidus* CCB 068), através das atividades das enzimas ligninolíticas: lacase, peroxidases e manganês peroxidase, a cada 3 dias, por um período de 30 dias, avaliando, no período de maior atividade enzimática, a efetividade, estabilidade com o tempo e variação do pH, das enzimas, por meio da degradação/descoloração do corante índigo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Fungos Basidiomicetos

Os fungos são organismos eucariotos, com parede celular rígida e podem ser uni ou multicelulares. Não ingerem alimentos, mas absorvem os nutrientes dissolvidos no ambiente. Dentre os fungos terrestres têm-se as leveduras, bolores, orelhas-de-pau, fungos em forma de taça, bufa-de-lobo, cogumelos e outros. Todos se caracterizam pela nutrição através de absorção e, com exceção das leveduras, a maioria produz um micélio bem desenvolvido constituído de hifas septadas (possuem um septo que divide os filamentos em células distintas contendo núcleo) ou cenocíticas (não possuem septo, é uma célula longa, contendo muitos núcleos) (BITTENCOURT, 2007).

Existe mais de 25.000 espécies de basidiomicetos que possuem como estrutura característica o basídio (do grego = pequeno pedestal ou base pequena), uma estrutura reprodutiva microscópica em forma de clava onde ocorre a cariogamia (fusão de núcleos gaméticos) e a meiose. Cada basídio produz quatro basidiósporos haplóides, resultado de uma meiose. Os cogumelos são um basidiocarpo, e as lamelas superficiais sob o chapéu são 30 carregadas de basídios, com os basidiósporos. No substrato um amplo sistema de micélios sustenta o basidiocarpo, fornecendo-lhe nutrientes (PELCZAR et al., 1996).

Os fungos são considerados biodegradadores naturais, pois encontram as substancias necessárias ao seu desenvolvimento na natureza, principalmente macromoléculas insolúveis, as quais precisam degradar primeiramente em unidades monoméricas solúveis antes de as incorporarem (PUTZKE; PUTZKE, 1998).

O carbono é um dos componentes estruturais dos fungos, sendo a glicose a fonte de carbono mais utilizada. Na natureza a glicose é o açúcar mais comum, em função da sua participação na composição da celulose, do amido e de outros açúcares, justificando o seu amplo emprego (WISNIEWSKI, 2009).

Na Figura 1 apresentam-se as principais aplicações (rotas tecnológicas) proporcionadas pelos fungos, entre elas, a produção de enzimas de interesse deste estudo.

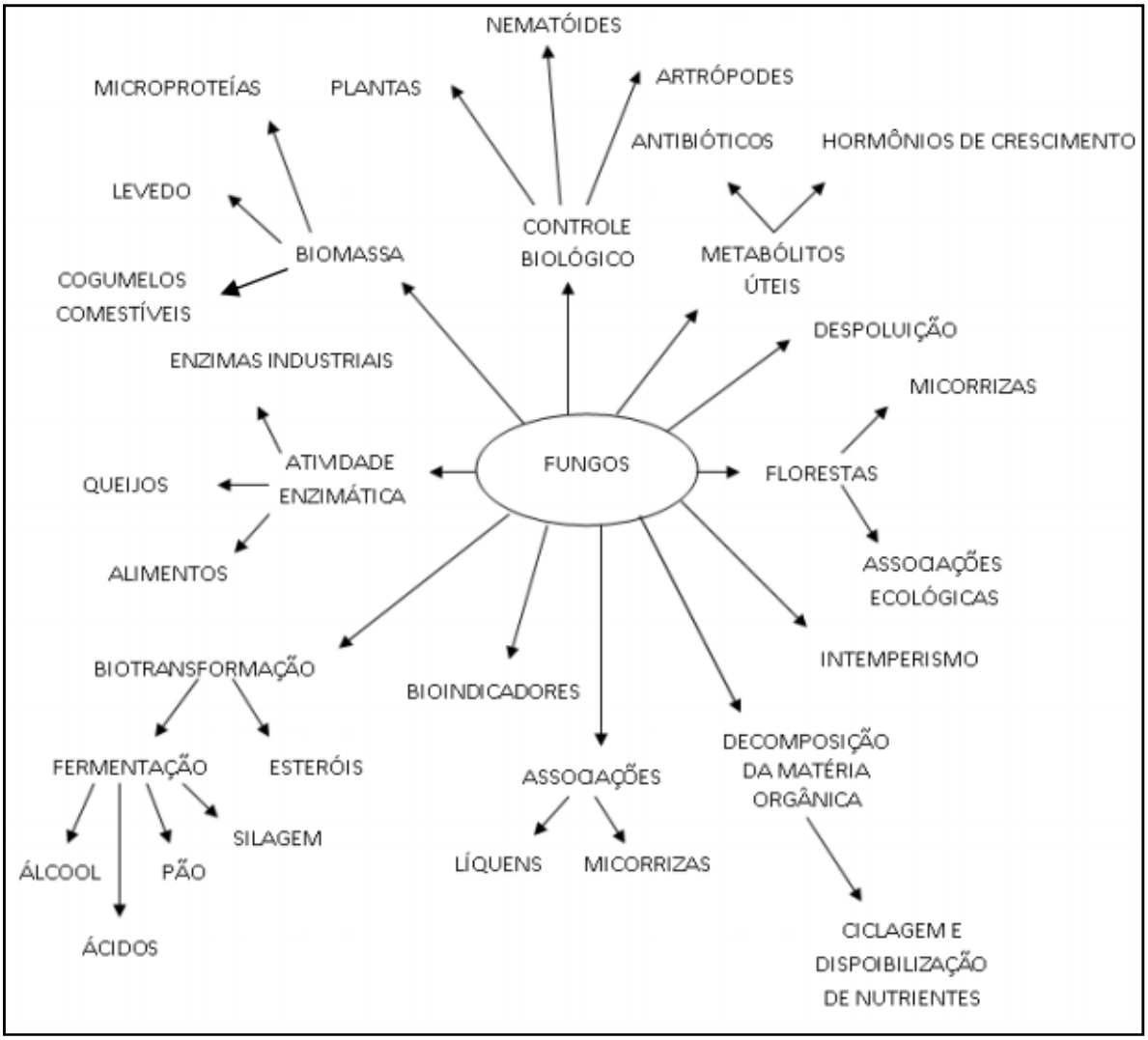

Figura 1 - Rotas tecnológicas que indicam os fungos para fins comerciais
Fonte: Modificado de Putzke e Putzke (2002)

Sendo assim, os fungos constituem um dos grupos de micro-organismos mais importantes na atividade de decomposição da matéria orgânica em função de sua capacidade especializada de degradação. Esta atividade ocorre, sobretudo, através de sua fase vegetativa ou micelial. Nas fases vegetativa e reprodutiva, a formação de biomassa depende da produção de enzimas extracelulares, que são fundamentais na degradação dos componentes dos substratos, principalmente lignocelulose (VELÁZQUEZ-CEDEÑO et al., 2002).

Os fungos filamentosos da classe dos basidiomicetos têm propriedades fisiológicas, enzimáticas e bioquímicas que os permitem se destacar entre os organismos que podem crescer em substratos lignocelulósicos.

Os basidiomicetos, conhecidos como fungos da podridão branca, ou “White-rot”, degradam todas as estruturas das paredes celulares vegetais, diferindo a velocidade com que cada um destes constituintes é degradado, ao contrário dos fungos da podridão castanha ou “Brown-rot”, que degradam seletivamente os carboidratos, com limitada degradação da lignina, que resta em grandes quantidades nos substratos colonizados por estes fungos (PANDEY et al., 2003).

Com base nos caracteres morfológicos e na seqüência DNAr, os basidiomicetos constam de três classes: Hymenomycetes, Ustilaginomicetes e Urediniomycetes. Estes fungos são mais aptos à degradação da lignina, portanto, são capazes de utilizar o carbono da lignocelulose. No entanto, para essa utilização existe certa demanda energética, que pode ser responsável pela ativação do metabolismo secundário nestes fungos, ou seja, produção de enzimas oxidativas em função de um ambiente desfavorável ao crescimento (PAZ et al., 2008).

A degradação da lignina por basidiomicetos envolve enzimas extracelulares que, por abstração de elétrons do substrato, levam à formação de espécies radicais, as quais atuam na despolimerização da lignina e de uma série de compostos tóxicos (FABBRINI et al., 2002).

3.2 Degradação de corante por fungos basidiomicetos

Os fungos basidiomicetos ou fungos de podridão branca são capazes de degradar lignina, celulose e hemicelulose, que são moléculas complexas e, assim, suas enzimas têm sido utilizadas na degradação de outras moléculas recalcitrantes. Tanto as moléculas de lignina como alguns poluentes contem compostos fenólicos, diésteres e bifenilas. Os principais fungos envolvidos são *Phanerochaete. chrysosporium, Coriolus versicolor, P. sajor-caju, P. ostreatus, Trichoderma versicolor* (KIRK, 1986; KLYOSOV, 1990).

As enzimas responsáveis pela degradação dos corantes têxteis são peroxidases e lacases. Estas enzimas são extracelulares e apresentam baixa especificidade para o substrato tornando estes organismos bastante interessantes para o tratamento de resíduos de características variadas como os resíduos têxteis. As principais enzimas envolvidas são lacases, manganês peroxidases e lignina

peroxidase (DELLAMATRICE et al., 2005; DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2006; KAMIDA, 2005; DURAN; ESPOSITO, 1997).

Estes fungos dividem-se em cinco grupos baseados em sua atividade em produzir as três enzimas lacase, manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP). O gênero *Pleurotus* não produz lignina peroxidase (RODRÍGUEZ; PICKARD; VAZQUEZ-DUHALT, 1999) enquanto *P. chrysosporium* é caracterizado por produzir insignificante quantidade de lacase.

Lacase é uma enzima que pertence à família das multicobre-oxidases e oxida principalmente compostos fenólicos. A lignina peroxidase é uma heme-proteína com alto potencial de oxidação para substratos fenólicos e não fenólicos. A manganês peroxidase pode oxidar uma grande faixa de substratos através da oxidação de Mn^{2+} para Mn^{3+}, ligando-se a substancias quelantes excretadas também pelo fungo (PAPINUTTI; FORCHIASSIN, 2004).

Segundo Durán e Esposito (1997) a degradação por fungos basidiomicetos ocorre principalmente a pHs baixos que correspondem ao pH ótimo para a atividade das enzimas atuando na degradação, podendo ocorrer variação entre as espécies. Foi encontrado que a enzima lignina peroxidase de *P. chrysosporium* teve atividade ótima a pH 3,0 e manganês peroxidase a pH 4,5. Para a lacase de *Phellinus noxius* o pH foi 4,6.

Alguns compostos têm capacidade para induzir o sistema ligninolítico, dentre eles o álcool veratril e o silício. O álcool veratril é um metabólito produzido por diversos fungos basidiomicetos que atua como restaurador da enzima LiP após sua ação oxidativa sobre o substrato, protegendo-a da inativação por excesso de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Segundo Heinfling et al., (1998), a atividade da LiP na ausência do álcool veratril foi de 1 a 12% menor que na presença do indutor. Também a adição do surfactante Tween 80 elevou a degradação de uma mistura de corantes azo e antaquinona de 31% para 85% por *Phanerochaete sordida* (HARAZONO; NAKAMURA, 2005).

A contribuição relativa de cada enzima (LiP, MnP ou lacase) para a descoloração de corantes pode ser diferente para cada fungo indicando alguma seletividade na degradação. Dey, Maiti e Bhattacharyya (1994) estudaram a degradação dos corantes Metileno Blue e Congo Red pelos fungos basidiomicetos *P. chrysosporium* e *Polyporus ostreiformes*, e encontraram degradação principalmente por *P. ostreiformes* com aumento na produção das enzimas MnP e LiP, as quais seriam responsáveis pela degradação destes corantes. Ollikka et al. (1993) encontraram que a enzima LiP foi a maior responsável pela degradação de diversos corantes estudados, enquanto a enzima MnP sozinha não foi capaz de promover a degradação. A presença de álcool veratril foi essencial para a degradação e a descoloração variou de 46 a 93%.

O fungo *P. chrysosporium* degradou totalmente os corantes Direct Brown 2, Direct Green 6 e Direct Blue 15 e quase totalmente Direct Red 23 e Direct Orange 26, sendo que a enzima MnP foi a principal enzima produzida (PAZARLIOGLU; UREK; ERGUN, 2005).

Segundo Monteiro et al. (2001) avaliaram 14 espécies de *Pleurotus spp*. na degradação de efluente e lodo têxtil contendo os corantes índigo e preto-enxofre, e encontraram completa descoloração por duas linhagens de *Pleurotus sajor-caju* CCB 020 e *Pleurotus sajor-caju* 94/03.

Os fungos basidiomicetos *Phellinus gilvus*, *Pleurotus sajor-caju* CCB 020 e *Pycnoporus sanguineus* foram testados na degradação do corante índigo em meio liquido. Após quatro dias verificou-se remoção da cor de 100% para *P. gilvus, 94%* para *P. sajor-caju* CCB 020 e 91% para *P. sanguineus,* e redução na toxicidade para *Daphinia similis* de 41%, 96% e 93% respectivamente (BALAN; MONTEIRO, 2001).

Kamida et al. (2005) observaram a descoloração total do efluente têxtil aproximadamente aos 14 dias de incubação, através de análise visual dos frascos contendo os fungos, basidiomicetos *P. sajor-caju* CCB 020 e *P. sajor-caju* 94/03.

3.3 Vinhaça

Todos os liquidos susceptíveis a sofrer uma fermentação são denominados mostos. Uma vez fermentado o mosto de cana-de-açúcar, passa a se chamar vinho ou vinhoto, no qual pode ser destilado possibilitando a recuperação de álcool, restando um resíduo que é a vinhaça.

A vinhaça por sua vez, envolve questões ainda bem menos trabalhadas no contexto da produção de etanol no Brasil. Sua produção é muito grande, na razão de 8 a 18 litros por litro de etanol produzido (FERREIRA et al., 2011). Apresenta características como alta Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) e Demanda Química de Oxigênio (DQO), em média, 42-100 g L^{-1} e 10-210 g L^{-1}, respectivamente, temperatura de aproximadamente 85ºC e pH 4,5, alta turbidez, de odor característico, que vai do adstringente ao nauseabundo (FREIRE; CORTEZ, 2000; FRANCISCO, 2008).

A grande preocupação com a vinhaça é seu elevado potencial poluidor (MACHADO, 1998), pois apresenta alto conteúdo de matéria orgânica, elementos minerais, baixo pH, cor marrom escura devido a presença de polímeros de alto peso molecular chamados melanoidinas, que são formados pela reação de Mailard e compostos fenólicos (ácidos tânico e húmicos). Estas substâncias são tóxicas para os micro-organismos propícios aos biotratamentos de efluentes, permanecendo nos solos e possuindo propriedades antioxidantes (MIGO et al., 1993; PÉREZ et al., 2006; MOHANA et al., 2008; NAIK, 2008).

Com o advento do Proálcool em 1975 a vinhaça era lançada como efluente em rios e lagoas, matando peixes e poluindo as águas, atingindo o lençol freático de alguns municípios. A partir de 1978, normas e legislações especificas no âmbito federal e estadual foram aprimoradas a fim de reduzir o impacto da vinhaça em corpos d'água. Além disso, no estado de São Paulo, normas cada vez mais rigorosas vêm sendo elaboradas, principalmente pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do estado de São Paulo (Cetesb), através da criação da Norma Técnica P4.231 (versão janeiro/2005), que estabelece critérios e procedimentos para aplicação de vinhaça em solos agrícolas no estado de São Paulo (CETESB, 2005) que visa auxiliar os setor sucroalcooleiras a dar um destino ambiental correto e comercialmente interessante ao sub-produto.

A vinhaça das destilarias sucroalcooleiras é aspergida por meio de tubulações de irrigação, num processo chamado de fertirrigação, ou levada em caminhões para aplicação direta na lavoura, viabilizando a técnica da utilização da vinhaça como fonte de nutrientes para própria cana-de-açúcar, melhorando assim as estruturas físicas do solo, pois aumenta a taxa de infiltração, estimula a retenção de água e formação de agregados, diminuindo a probabilidade de erosão (SILVA, 2006).

A riqueza da vinhaça pode promover melhoria na fertilidade do solo, no entanto as quantidades não devem ultrapassar sua capacidade de retenção de íons, as dosagens devem ser de acordo com as características do solo, (VOLL, 2005) com atenção sobretudo em nitrato e potássio (SILVA, 2007).

Segundo Silva (2006), alguns efeitos da vinhaça devem ser vistos como agentes de aumento na população e na atividade microbiana do solo, enquanto a matéria orgânica contida na vinhaça é introduzida no solo, sendo metabolizada por fungos, que assim neutralizam a acidez permitindo a proliferação bacteriana, responsável pela mineralização e imobilização do nitrogênio, nitrificação, desnitrificação e fixação biológica. A neutralização da acidez do solo também proporciona o aumento de outros micro-organismos participantes de ciclos biogeoquímicos de outros elementos (LEITE, 1999; FERREIRA, 2009).

Alguns critérios de preocupação com a vinhaça advêm de sua caracterização físico-química, onde devem ser avaliados os parâmetros, na Tabela 1 (CETESB, 2005).

Tabela 1 - Composição química da vinhaça obtida na Usina Costa Pinto - RAIZEN

Parâmetros	**Vinhaça 100%**
pH (20ºC)	3,95
DQO (mg L^{-1})	42000
DBO(mg L^{-1})	11310
Sólidos Suspensos Totais (mg L^{-1})	5969
Condutividade (µS cm^{-1})	8630
Sólidos Totais Dissolvidos (ppm)	152126
Açúcares Redutores (mg L^{-1})	962
Nitrogênio Total Kjeldahl (mg L^{-1})	70
Potássio (mg L^{-1})	2272
Fosfato (mg L^{-1})	200
Magnésio (mg L^{-1})	290
Sódio (mg L^{-1})	<50
Cálcio (mg L^{-1})	460
Sulfato (mg L^{-1})	1320
Índice de Fenóis (mg L^{-1})	1,1

Fonte: Ferreira, 2009.

Além das características físico-químicas da vinhaça, é necessário fazer a determinação semanal do teor de K_2O (Kg m^3) na vinhaça, e através dos resultados dessa determinação é feito o calculo da dose a ser aplicada ao solo (CETESB, 2005).

Em 2010 foram produzidos 25 bilhões de litros de etanol e consequentemente mais de 250 bilhões de litros de vinhaça resultante da destilação do vinho obtido do processo de fermentação do caldo de cana. O volume sugere alternativas na melhora do processo fermentativo e outros tipos de utilidade além da adubação.

Uma maneira de reaproveitamento da vinhaça que é submetida ao processo de biodegradação é a sua utilização no reuso de água para os processos de lavagem da cana, irrigação da cultura e outras atividades intrínsecas ao processo industrial, bem como para a produção de metabólitos de interesse comercial. Por outro lado, reduz-se a contaminação de solos e corpos hídricos principalmente pelo seu armazenamento em zonas de sacrifício em regiões que apresentam lençol freático próximo a superfície (FREIRE; CORTEZ, 2000).

3.4 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar (resíduo agroindustrial) é obtido em grande quantidade no Brasil, em media 290 kg por tonelada de cana-de-açúcar moída. Estima-se que a cada ano sejam produzidos de 5 – 12 milhões de toneladas desse material, correspondendo a 30% do total moído (SILVA et al., 2007).

O bagaço é constituído por celulose, hemicelulose e lignina (Figura 2), sendo (25 a 40%) de celulose, (20 a 35%) de hemicelulose e lignina (15 a 35%) (COWLING, 1961; KIRK, 1987; BORTOLAZZO, 2011), com pequenas quantidades de outros compostos classificados conjuntamente como componentes estranhos.

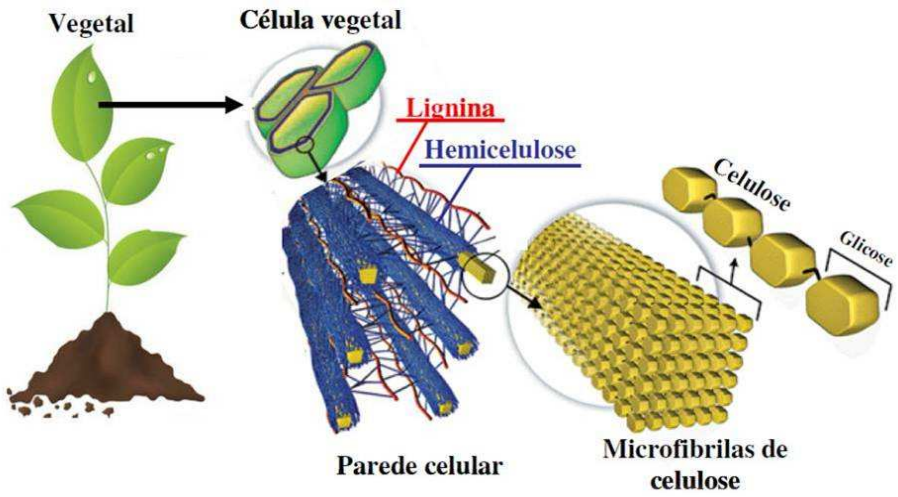

Figura 2 - Composição da fibra do bagaço de cana-de-açúcar
Fonte: RITTER, 2008

Segundo o Departamento de Energia dos Estados Unidos o bagaço de cana-de-açúcar proveniente da variedade *Saccharum* spp., espécie mais utilizada no Brasil, possui 23% de lignina total, 23% de hemicelulose e 38,6% de celulose.

Sendo considerado um subproduto do qual ficam apenas alguns constituintes do material original, no caso da cana-de-açúcar, resta fibra e alguma quantidade de açúcar. O bagaço resultante da sua exploração pode ser queimado para o processo de produção de calor nas caldeiras, mas não substitui 100% da lenha e acaba sobrando de 37 – 50 kg por tonelada de cana-de-açúcar moída. Nas grandes destilarias, o bagaço prensado tem sido comercializado para a fabricação de conglomerados. O bagaço resultante das destilarias de cana-de-açúcar para aguardente pode ser utilizado para queima e para alimentação animal (CARDOSO,

2006). A partir de 2010 o bagaço e palha de cana-de-açúcar tem sido utilizado para produção de energia elétrica, em algumas usinas, criando um alto valor agregado ao sub-produto (CHERUBIN, N. 2012).

3.4.1 Lignina

A lignina é um polímero fenólico, uma macromolécula tridimensional amorfa encontrada em vegetal associada à celulose na parede celular cuja função é de conferir rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais, sendo bastante resistente à decomposição biológica. A taxa de decomposição da lignina é lenta comparada com a celulose e hemiceluloses (WAGNER; WOLF, 1999).

Mesmo presente em quantidades menores em relação à fração celulósica, a lignina confere limitação suficiente para retardar, ou mesmo impedir completamente, a atuação microbiana sobre o material da parede celular (FAN et al., 1987).

3.4.2 Celulose

A celulose é a molécula mais a abundante da natureza, sendo o componente mais importante da parede celular das plantas, composta de cadeias lineares de D-glicose, unidas por ligações β-1,4 com alto grau de polimerização e elevado peso molecular, principalmente, em sua forma cristalina que confere a alta resistência ao rompimento de suas ligações por substancias químicas (GIGER-REVERDIN, 1995).

Suas cadeias podem se unir através de pontes de hidrogênio formando as microfibrilas de celulose. O grau de cristalinidade destas fibrilas ou a presença de outros polímeros associados à matriz celulósica é de grande importância na avaliação, pois esta interação pode influenciar na suscetibilidade da molécula de celulose a hidrolise enzimática microbiana (VAN SOEST, 1994).

Sua estrutura apresenta regiões altamente ordenadas (regiões cristalinas), estabilizadas por inúmeras ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e áreas menos ordenadas chamadas de regiões amorfas (FAN et al., 1987).

3.4.3 Hemicelulose

As hemiceluloses compreendem uma coleção heterogênea de polissacarídeos amorfos com grau de polimerização muito inferior ao da celulose. Emprega grupos distintos de polissacarídeos constituídos por açúcares pentoses (xilose e arabinose) e/ou hexoses (glucose, manose e galactose), ácidos urônicos e grupos acetila (VAN SOEST, 1994).

Estruturalmente são parecidas com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estagio anterior a lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando flexibilidade e estabilidade ao agregado (RAMOS, 2003). Comparada as celuloses, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrolise acida, pois oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos.

A natureza química das hemiceluloses varia, nas plantas, em relação ao tipo de tecido vegetal e ao grupo taxonômico. As madeiras em geral possuem de 20 a 30% de hemicelulose na composição geral, enquanto que nas gramíneas esse valor é de 20 a 40% (SJÖSTRÖM, 1992).

3.5 Degradação de material lignocelulósico por basidiomicetos

As enzimas ligninolíticas fúngicas são produzidas e atuam na oxidação dos substratos em ambientes externos às suas células. Essas enzimas são produzidas durante o metabolismo secundário, visto que a oxidação da lignina, bem como de compostos poluentes, não fornece energia para o fungo (HOFRCHITER, 2002).

Devido aos tipos de ligações e de sua heterogeneidade, a lignina não pode ser "quebrada" por enzimas hidrolíticas como a maior parte de outros polímeros

naturais (celulose, amido, proteínas) (HOFRICHTER, 2002). A lignina é também o polímero natural mais rico em anéis aromáticos, representando cerca de 40% da energia estocada nos vegetais (COELHO, 2007).

No curso da evolução, os Basidiomicetos, tem desenvolvido a habilidade de degradar substancialmente a lignina. Os três maiores grupos de enzimas de modificação da lignina produzidos pelos fungos são lacase, manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LIP). Alguns fungos da podridão branca produzem todas essas enzimas enquanto outros produzem somente uma ou duas delas (HATAKKA, 1994). Bactérias, algas, fungos ascomicetos também produzem essas enzimas.

Por produzirem celulases, ligninases, e hemicelulases estes fungos degradam uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos e resíduos orgânicos desempenhando papel importante no ciclo do carbono (DONINI, 2006).

A maioria dos processos biotecnológicos utilizando fungos basidiomicetos baseia-se nos seus produtos metabólicos como enzimas e polissacarídeos. A importância do complexo enzimático desses fungos esta diretamente relacionada com a degradação de uma ampla variedade de poluentes orgânicos, devido a suas enzimas degradadoras de constituintes da madeira. A completa degradação da lignina é um processo oxidativo e tem sido executado com eficiência pelos basidiomicetos. O material resultante da degradação pode ser utilizado como fertilizante de solo, como forragem para ruminantes. Esses organismos contribuem também na biotransformação de herbicidas, branqueamento de polpa, degradação de explosivos, poluentes orgânicos, etc, devido a seu extrato enzimático que pode atuar em diversos substratos (HOFRICHTER, 2002).

Segundo Ferraz (2004), as enzimas envolvidas na degradação da lignina podem ser agrupadas em, pelo menos duas classes distintas: as fenoloxidases e enzimas que produzem peróxido de hidrogênio. Entre as fenoloxidases, ainda podem ser divididas em dois subgrupos: um contendo as enzimas dependentes de peróxido ou peroxidases, e o outro grupo as lacases, enzimas que não dependem de peróxido para atuar.

A produção de enzimas está especificamente relacionada e dependente da composição do substrato e fatores ambientais, como temperatura e umidade. A utilização dos diversos tipos de substratos pelo fungo depende da sua capacidade de secretar celulases, hemicelulases e ligninases, liberando nutrientes para seu crescimento (BUSWELL et al., 1995).

Dentre as enzimas peroxidases secretadas por alguns basidiomicetos destaca-se a manganês peroxidase (MnP). Na figura 3 é apresentado um esquema da degradação da lignina através da rota metabólica de síntese de enzimas hidrolíticas por basidiomicetos.

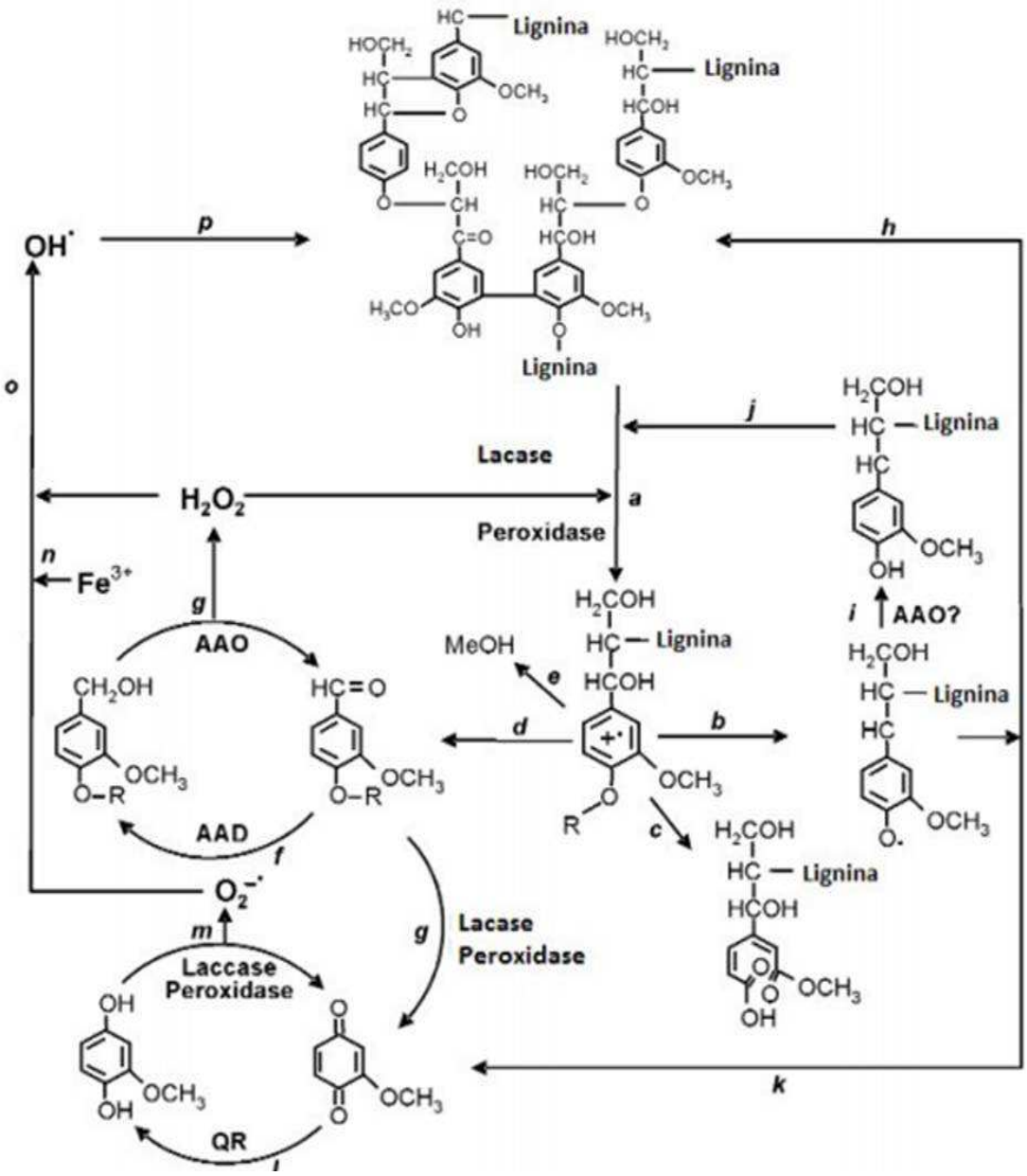

Figura 3 - Esquema para a biodegradação de lignina, incluindo reações enzimáticas e ativação de oxigênio. Fonte: Martinez et al., 2005.

Como demonstrado na figura 3, lacases e peroxidases lignolíticas (lignina peroxidase, versátil peroxidase e manganês peroxidase), produzidas por fungos de podridão branca oxidam o polímero de lignina liberando radicais aromáticos (a) (ERIKSON, 1990). Durante essa ação enzimática estão envolvidas também reações não enzimáticas, onde a quebra do C4-eter (b), clivagem do anel aromático (c), quebra das ligações Cα-Cβ da lignina (d) e desmetoxilação (e). Os aldeídos aromáticos formados da quebra do Cα-Cβ da lignina podem ser novamente sintetizados pelo fungo (f, g), sendo substrato para geração de H_2O_2 por AAO (Aril-álcool oxidase) em uma reação de oxiredução envolvendo também AAD (aril-álcool dehidrogenase) (MARTINEZ et al., 2005).

Os radicais fenólicos resultantes da quebra do C4-eter (b) podem ser repolimerizados em polimero de lignina (h), caso não forem primeiramente reduzidos por oxidases em compostos fenólicos (i) por AAO. Esses compostos fenólicos formados podem ser novamente reoxidados por lacases e peroxidases. Os radicais fenólicos podem ainda sofrer a quebra dos Cα-Cβ (k), produzindo quinonas. Quinonas provenientes de g e/ou k contribuem para ativação do oxigênio nas reações ciclicas de oxiredução envolvendo QR (quinona redutases) lacases e peroxidases (l, m) (GUILLEN et al., 1997). Essas reações resultam na redução do íon ferrico presente na madeira (n), onde ocorre a reoxidação com concomitante redução de H_2O_2 para o radical hidroxila livre (OH·) (o). O resultado é uma forte reação oxidante que pode iniciar novamente o ataque a lignina (p) nos estágios iniciais de decomposição da madeira (MARTINEZ et al., 2005).

3.6 Lacases

As lacases (E.C. 1.10.3.2) são polifenóis oxidases (fenoloxidases) produzidas por fungos, bactérias, algas, como também por plantas. São produzidas pela maioria dos Basidiomicetos e cuja massa molecular varia de 45 a 100 kDa dependendo da espécie e da isoforma (MOREIRA NETO, 2006). Estas enzimas catalisam oxidações por extração de um elétron de substratos fenólicos gerando radicais fenoxilas (LANGH, 1997; AZEVEDO, 2004).

Devido a sua capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, permite que as enzimas sejam usadas em aplicações indústrias como deslignificação, modificação de fibras da madeira, clareamento de corantes em processos têxteis, síntese de produtos químicos/medicinais e remediação de solos e águas contaminadas (SCHNEIDER et al., 1999; DURÁN et al., 2002; MOREIRA NETO, 2006; FERREIRA, 2009).

Segundo Szklarz et al. (1989) essas enzimas são extracelulares, encontrando-se ligadas à membrana celular ou serem intracelulares. A enzima origina-se no citoplasma, mas outros exemplos de secreção têm sido descritos na literatura, pouca atenção tem sido dada a localização sub-celular desta enzima e ao mecanismo de secreção (MAYER; STAPLES, 2002). A produção de lacase é alterada por vários fatores durante o desenvolvimento fúngico, como a composição do meio de cultura (relação C/N), pH, temperatura, taxa de aeração, etc (KAHRAMAN; GURDAL, 2002).

Os fungos ligninolíticos expressam múltiplos genes de lacase, com características físico-químicos diferentes, codificando isoenzimas com elevada similaridade na estrutura primaria (BROWN et al., 2002). As propriedades bioquímicas e físico-químicos de lacase (atividade enzimática, estabilidade, pH e temperatura, e outras) inicialmente fornecem importantes resultados para estudos básicos e para a aplicação das lacases na biotecnologia (MOUGIN et al., 2003, SHLEEV et al., 2004).

Essas enzimas são excepcionalmente versáteis, catalisando reações com diferentes substratos orgânicos e inorgânicos, alguns destes recalcitrantes. Também participam de outros eventos ligninolíticos importante, na oxidação de unidades não-fenólicas de lignina, a geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a formação de

radicais hidroxilas e produção de Mn^{3+} (HÖFER; SCHOLOSSER, 1999; GONZALES et al., 2002; SAPARRAT et al., 2002).

A lacase representa uma alternativa promissora para o tratamento de efluentes têxteis. Corantes reativos, que são os mais comercialmente produzidos, não são adequadamente removidos dos efluentes por processos biológicos convencionais, como o tratamento por lodo ativado, freqüentemente utilizado no Brasil. A eficiência microbiana para a descoloração requer a adaptação de micro-organismos selecionados bem como enzimas capazes de atuar na degradação do corante (FARACO et al., 2009).

A principal limitação da utilização dos fungos ligninoliticos em bioprocessos é a baixa velocidade de reação, o que requer um investimento significativo de tempo. No caso de tratamento de efluentes têxteis, por exemplo, os fungos geralmente apresentam baixa tolerância ao efluente. Já para o pré-tratamento lignocelulosicos visando obtenção de bicombustíveis, os fungos filamentosos e os ligninoliticos necessitam de açúcares para seu metabolismo, consequentemente reduzindo a recuperação do produto final, somada a essa desvantagem, o pré-tratamento com estes fungos também é lentos (FARACO et al., 2009).

As pesquisas atuais visam reduzir esse tempo de tratamento biológico ou bioquímico. No caso de tratamentos de efluente têxteis, destacam-se a busca por linhagens de fungos capazes de produzir um sistema extracelular eficiente para reagir em condições de pH elevado e alta força iônica (ALCALDE et al., 2006; KAUSIK; MALIK, 2009).

As enzimas lacases têm um enorme potencial de aplicação na indústria devido à grande diversidade de substratos que podem oxidar. Podendo salientar a sua utilização na modificação de ligninas químicas-farmaceuticas para a obtenção de produtos de valor agregado na indústria da polpa e do papel para a redução do volume de produtos químicos utilizados e a possibilidade do fechamento do circuito, nas indústrias têxteis e dos detergentes. É particularmente interessante o tratamento de águas residuais, em que os poluentes fenólicos oxidados pela lacases originam polímeros insolúveis em água, de remoção mais fácil. A utilização das lacases em escala industrial é realidade devida essencialmente, à diminuição dos custos de produção obtida por organismos com genes de lacases recombinantes em organismos hospedeiros (ALCALDE et al., 2006).

3.7 Peroxidase

As peroxidases (E.C. 1.11.1.7) são um grupo de enzimas oxi-redutases que catalisam a redução do peróxido e a oxidação de uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos (IKEHATA, 2004). A sua ação enzimática provem da redução cíclica do átomo de ferro no grupo hematina, na presença de H_2O_2, a enzima se combina com esta molécula, formando um complexo que pode oxidar uma variedade de doadores de elétrons formando água no final (DELLAMATRICE, 2005; POMPEU, 2010).

São enzimas extracelulares dependentes de H_2O_2 para atuarem sobre a lignina, desempenhando importante papel durante a degradação do substrato (POMPEU, 2010). A enzima peroxidase é conhecida por sua capacidade de remoção de grupos fenólicos e aminas aromáticas de soluções aquosas e também de descoloração de efluentes de indústria têxtil (DURÁN, 2003).

A importância das peroxidases de origem microbiológica na polimerização de ácidos fenólicos é de transformação de substancias aleloquímicas em substancias húmicas estáveis e não tóxicas (ADLER et al., 1994).

Na indústria de papel e celulose a peroxidase é utilizada na etapa de branqueamento da polpa e no tratamento de seus efluentes. Na indústria têxtil é utilizada para melhorar o branqueamento em lavanderias e inibir a transferência de cor durante a lavagem e para a remoção do excesso de corante da água de lavagem de tecidos tingidos (DURÁN, 2003).

3.8 Manganês Peroxidase

Inicialmente, a manganês peroxidase (E.C.1.11.1.13) foi descoberta no fungo *Phanerochaete chrysosporium*, mas estudos demonstraram que outros fungos de podridão branca também produzem a MnP juntamente com a lacase e que ambos mostraram eficiência no branqueamento da lignina (PAICE et al., 1993). Aguiar et al. (2010) descreve atividade de MnP no fungo celulolítico *Trichoderma reesei*, crescido em bagaço e vinhaça de cana-de-açúcar.

A peroxidase dependente do manganês foi descrita pela primeira vez para *Phanerochaete chrysosporium* por Kuwahara et al. (1984). Esta peroxidase contém o grupo prostético heme, necessita de H_2O_2 como co-substrato e catalisa a oxidação de Mn^{2+} a Mn^{3+}. O Mn^{3+} complexado com um acido orgânico atua como agente primário na clivagem da lignina. Dessa forma, a MnP é considerada uma enzima chave na ligninólise por fungos da podridão branca. No entanto, há relatos de espécies fúngicas em que a MnP não é detectada mesmo sob condições ligninolíticas de cultivo (SAPARRAT et al., 2002).

A enzima possui a capacidade de oxidar um numero grande de compostos, de lignina até aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. A massa molecular das MnP fúngicas extracelulares variam de 40 a 50 KDa e do ponto isoelétrico são geralmente ácidas com pH entre 3 e 5, entretanto enzimas neutras também foram encontradas em algumas espécies. A MnP age principalmente em compostos fenólicos, embora a oxidação de substrato não fenólicos tenha sido verificada durante o processo conhecido como peroxidação lipídica (BAO et al., 1994).

Essa enzima é encontrada em fungos ligninolíticos, atuando conjuntamente com LiP e a lacase na biodegradação da lignina ou de compostos relacionados a mesma (HAWARI et al., 2000). A MnP de fungos causadores da podridão branca vêm sendo empregadas em trabalhos de biodegradação da lignina, (HILDEN et al., 2000) hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (BOGAN; LAMAR, 1995), ácidos húmicos (HOFRICHTER et al., 1998), corantes sintéticos e poluentes clorados (HAAS et al., 2004; BOER et al., 2004; MOHORCIC et al., 2007).

3.9 Corantes Têxteis

A origem dos primeiros corantes utilizados para o tingimento de tecidos é incerta. Porém existem indicações de seu uso pelo homem desde os primórdios das antigas civilizações, sendo que a presença foi detectada em amostras de tecidos de tumbas egípcias e antigos hieróglifos datados de 2.500 a.C. (VAZOLLER, 2001).

Até a metade do século XIX, só existiam pigmentos naturais, provenientes de vegetais, insetos, moluscos e minerais, cujas fórmulas de extração e aplicação eram guardadas secretamente. A grande revolução na história desses compostos ocorreu

quando o químico inglês William H. Perkin (1838-1907) descobriu, em 1856, o primeiro corante sintético (malva), derivado do coque. Este foi o primeiro passo para a produção de corantes orgânicos sintéticos em grande escala (ZANONI; CARNEIRO, 2001).

O Colour Index, catálogo da Society of Dyers and Colourists, registra atualmente mais de 8 mil corantes orgânicos sintéticos que são utilizados somente pela indústria têxtil. Tal diversidade se justifica pelo sucesso comercial dos produtos têxteis que passam por um processo de tintura. Para atender a um mercado cada vez mais exigente, a indústria química tem investido no desenvolvimento de corantes econômicos, com propriedades específicas, para obter boa fixação da coloração nos tecidos, oferecendo alta resistência aos agentes desencadeadores do desbotamento (KUNZ et al., 2002). Estas propriedades específicas caracterizam os corantes têxteis como elementos químicos que apresentam estruturas moleculares complexas.

Geralmente os corantes têxteis apresentam em sua estrutura molecular, um grupo cromóforo que dá cor ao composto de uma parte de energia radiante. O grupo cromóforo também pode ser de diversos grupos, tais como: AZO, antraquinona e nitro; os grupos auxiliares como os auxocromos promovem a afinidade pela fibra têxtil, natural ou sintética. referencia

Normalmente, a fixação do corante à fibra têxtil é feita através de reações químicas ou pela fixação de moléculas de uma substância na superfície de outro corante ou de derivados gerados por reações químicas durante o processo de tintura. Por isso, os corantes costumam ser classificados de acordo com sua maneira de se fixarem à fibra. Eles podem ser reativos, diretos, azóicos, aniônicos (ácidos e básicos), a cuba, de enxofre, dispersivos, pré-metalizados e branqueadores (ZANONI; CARNEIRO, 2001).

Os corantes sintéticos são extensivamente utilizados na indústria têxtil, gráfica, fotográfica e como aditivos em derivados de petróleo. Aproximadamente 10.000 diferentes corantes e pigmentos são usados industrialmente, estima-se que 7_x10^5 toneladas de corantes são produzidas anualmente no mundo (BANAT et al., 1996), e 26.500 toneladas somente no Brasil (GUARATINI et al., 2000).

Os corantes da linha vat são moléculas complexas, também conhecidos como corantes à tina ou corantes à cuba. São aplicados em fibras naturais, celulósicas ou animais. Tem custo elevado, tingimento “vivo”, solidez à lavagem e à luz. São insolúveis em água por sua estrutura cristalina, seus grupos carbônicos são

reduzidos em solução soda / hidrossulfito de sódio e assim exibem afinidade a fibra; fixam-se como sais leuco-solúveis e quando na fibra são reoxidados para a forma ceto-insolúvel. Do índigo cuja formula estrutural é exibidas na Figura 4, derivam vários corantes vat.

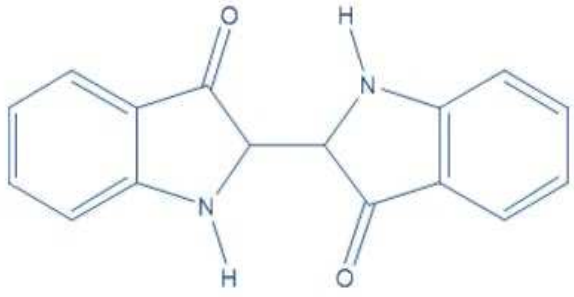

Figura 4 - Estrutura química do Índigo (ASPLAND, 1992a)

O primeiro trabalho sobre a constituição do índigo (*Isatis tintoria* e *Baptista tintoria*) data de 1826-1841, realizado por O. Unverdorben & O. F. Erdmann. O uso intenso da coloração índigo começou nos anos 70, levando o índigo a ser o mais importante dos corantes usados na atualidade. Para a obtenção da tonalidade desejada é feita a lavagem e desbotamento com soda e ficção com pedras pome. Pouco índigo natural é produzido hoje; os sintéticos dão mais consistência à cor e são mais econômicos. A primeira síntese do índigo registrada é de 1897 (ASPLAND, 1992a).

O índigo foi e é ainda hoje o mais importante dos corantes vat. O processo “vatting” permite a solubilidade em água reduzindo à forma leuco os corantes naturais, que requeriam um longo processo de fermentação antes de iniciar a coloração ou tingimento (ASPLAND, 1991). Quimicamente vatting é uma redução, ocorrendo a solubilização. O corante neste estado atinge o substrato e adquire certa coloração. A restauração do índigo é uma oxidação, onde há o desenvolvimento da cor e a fixação ao substrato na forma quimicamente inerte. A oxidação se dá pelo contato com o ar, água, peróxido, dicromato de potássio, ácidos acéticos, etc.; sendo uma dispersão as soluções são límpidas, transparentes e não decantam. A forma insolúvel dos corantes vat tem uma característica química comum: todos contêm um

ou mais pares de oxigênio. Estes átomos são parte de anéis aromáticos e os sistemas químicos que incorporam reações de redução e oxidação, são conhecidos como sistema redox (ASPLAND, 1992a).

Para que ocorra a solubilização é necessário uma redução química alcalina originando a forma leuco-solúvel; sob condições ácidas são com vertidas para a forma vat-ácida insolúvel ou limitadamente solúvel onde ocorre o desenvolvimento da cor no tingimento. O nitrogênio participa frequentemente da estrutura dos anéis aromáticos dos corantes vat; o oxigênio e o enxofre são menos frequentes. Usualmente, são comercializados na forma de dispersões liquidas com partículas de tamanho em torno de um mícron (ASPLAND, 1992b).

Trabalhos evidenciam a importância da dosagem correta de soda cáustica no processo de redução do índigo. Na tintura à tina o índigo vem reduzido à forma leuco com soda (NaOH) e hidrossulfito de sódio ($Na_2S_2O_4$). O corante desse modo, um sal sódico solúvel em água, opera a pH igual a 12, sendo capaz de entrar na fibra. A oxidação que se sucede retransforma o índigo azul em insolúvel e dá excelente solidez. Uma lavagem do material elimina o índigo mal fixado. Assim, a concentração NaOH tem grande importância na diminuição do tempo de oxidação do leuco-índigo e da perda do índigo na lavagem final do algodão (DIOTALLEVI; BULLIO, 1992).

Os corantes a tina têm grande tradição e uma historia ligada ao desenvolvimento tecnológico dos últimos noventa anos, com uma expectativa de manutenção de sua posição no mercado e até mesmo uma melhora. As fibras naturais, como algodão e linho, são cada vez mais solicitadas (PETER, 1991).

O consumo mundial de corantes para fibras celulósicas é de aproximadamente 300.000 toneladas/ano. Os corantes sulfurosos e diretos representam 49%, os corantes à tina 13%, reativos 15% e o índigo 5% e outros corantes 18% (PETER, 1991).

O tingimento de tecidos de algodão é habitual em todo mundo. Na Europa a preferência é tingir tecidos leves; na Ásia o corante índigo se destina a tecidos pesados para confecção. O processo pad-airing consiste em tecidos de algodão branqueado com aplicação do índigo reduzido, uma passagem pelo ar e depois a oxidação completa.

O processo de tingimento para os corantes vat divide-se em duas fases: o corante esgota rapidamente; e o restante se liga lentamente, está fase é da difusão

de corante no interior da fibra e que influi marcadamente sobre a regularidade da tintura. O poder de compensação ou migração do leuco-derivado depende da constituição química do corante, de sua concentração no banho, da temperatura do tingimento e da quantidade e tipo de insumos auxiliares empregados. O tingimento com índigo utiliza, via de regra, o processo continuo. Podemos afirmar a prioridade que o tingimento não é o de mais baixo custo, contudo há vantagens técnicas que interferem no calculo dos custos; citamos a reprodutividade, tempo relativamente curto (160 metros de tecidos/minutos), pouco consumo de água e bom grau de fixação (PETER, 1991).

Muitas empresas têm optado por sistemas de recuperação do índigo, recorrendo à ultra filtração através de membranas polisulfonadas. Há recuperação de quantidades significativas do excesso de índigo contido nas operações de tingimento e lavagem. O sistema apresenta um custo, que se auto-finacia em menos de dois anos de operação (REIFE; FREEMAN, 1996).

O índigo pode ser considerado como um corante “histórico” e sua importância são notáveis até o presente. Trata-se de um corante que se destaca por sua gama de aplicações. Há um volume produzido de 12.000 toneladas anuais. A utilização do índigo natural remonta a cinco mil anos desde a idade do ferro, passando pela Ásia e Europa. O índigo é um glicosídio extraído de plantas (*Indigofera tintoria*) e foi substituído pela forma sintética a partir de N-fenilglicina e N-ácido fenilglicino-carboxílico (Haas, 1990).

Conforme Kunz et al. (2002), as técnicas de tratamento de efluentes têxteis, fundamentadas em processos de coagulação, seguidos de separação por flotação ou sedimentação, apresentam uma elevada eficiência na remoção de materiais particulados. No entanto, a remoção dos corantes têxteis, e outros compostos orgânicos dissolvidos presentes em efluentes, mostram-se deficientes. A maioria dos tratamentos acima citados gera um passivo ambiental na forma de lodo, que é normalmente classificado como resíduo de classe I, segundo a NBR 10.004 e deve ser descartado num aterro de resíduos industriais perigosos.

Os corantes não pertencem a uma mesma classe de compostos químicos, mas englobam diversas substâncias com grupos funcionais diferenciados, com grande variedade na reatividade, solubilidade, volatilidade, estabilidade que, por sua vez, requerem métodos específicos para identificação, quantificação e degradação (BALAN et al., 2001).

No que se referem à remoção dos corantes têxteis presentes nos efluentes industriais, novas tecnologias têm sido buscadas no sentido de minimizar os danos ambientais que estes podem ocasionar, e entre estas tecnologias destaca-se a biodegradação (BALAN et al., 2001).

3.10 O processamento têxtil – origem dos efluentes

A indústria têxtil é um dos mais significativos consumidores de produtos químicos. Estes são aplicados na fabricação de fibras sintéticas, naturais e como auxiliares no beneficiamento (HORSTMANN, 1995).

O processamento têxtil pode ser basicamente resumido em Fiação, Tecelagem e Acabamento. A transformação da fibra crua em tecido não acabado ou em fios, é essencialmente uma operação mecânica, não gerando efluentes. Os efluentes são formados na engomagem e nos diversos setores de acabamento (HORSTMANN, 1995).

As fibras têxteis são classificadas em naturais e sintéticas. As fibras naturais são de origem animal (seda, lã), vegetal (algodão, juta, cânhamo, linho, rami, sisal) e mineral (amianto). As fibras sintéticas, por sua vez, dividem-se em polímeros naturais (raion viscose, raion acetato) e polimeros sintéticos (acrílico, elastano, poliamida, poliéster) (Sanin, 1997).

Dos 45 milhões de toneladas de fibras consumidas por ano para propósitos têxteis, mas de 50% são de algodão (HORSTMANN, 1995). O Brasil, e principalmente o Nordeste, se destaca pela alta produção de fios de algodão. Isto se deve ao fato de ser esta a matéria-prima mais frequente, ter excelente absorção, ser agradável ao uso e possuir preços acessíveis. A fibra de poliéster ocupa o segundo lugar na produção de tecidos, devido principalmente ao custo e facilidade de mistura

com outras fibras, a fim de se obter produtos com qualidade especificas (AGUIAR; SCHÖNBERGER, 1995a).

3.11 Processos de tratamento utilizados pela indústria têxtil

As estações de Tratamento são construídas com o objetivo de tratar resíduos domiciliares e industriais minimizando o impacto do descarte destes resíduos no ambiente. Os tratamentos visam remover a carga orgânica e também sólida sedimentáveis. Geralmente engloba uma fase de decantação dos sólidos suspensos no efluente e uma fase biológica onde o material biodegradável é convertido por micro-organismos a CO_2, produtos orgânicos e inorgânicos (BRAILE; CAVALCANTI, 1993).

Os seguintes tratamentos dos efluentes são divididos em primários, secundários, terciários e avançados (PERES et al., 1998).

Os tratamentos primários – como a flotação ou sedimentação – removem uma porção de sólidos suspensos e matéria orgânica. Em função disto, ainda deixam no efluente um considerável teor de matéria orgânica e alto DBO. Por isso, em geral são precursores dos tratamentos secundários.

Os tratamentos secundários têm como função principal a remoção de sólidos suspensos e matéria orgânica biodegradável podendo-se adicionar ainda a desinfecção. Normalmente envolvem processos biológicos como o tratamento por lodo ativados, filtros biológicos, reatores de filmes fixos ou sistemas de lagoas.

Os tratamentos terciários e avançados envolvem combinação de operações unitárias e processos para um fim específico. Normalmente são empregados com a finalidade de reciclagem da água e/ou produtos. Como exemplos deste tipo de tratamento têm-se a permuta de íons, osmose reversa, etc.

Tabela 2 - Processos de tratamento de efluentes

Tratamento	Tipo de processo	Operação Unitária
Primário	Físico	Equalização
		Gradeamento
		Clarificação / Sedimentação
		Flotação
	Químico	Neutralização
		Coagulação / Sedimentação
Secundário	Biológico	Lodos ativados
		Filtros biológicos
		Lagoas de Estabilização
	Físico / Químico	Carvão Ativado
Terciário	Químico	Coagulação / Precipitação
		Ozonização
		Cloração
	Físico	Clarificação (carvão ativado)
		Ultrafiltração
Avançado	Físico	Osmose Reversa
		Evaporação

(Fonte: Peres e Abrahão, 1998)

Na indústria têxtil nacional, os processos de tratamento mais utilizados são os primários e secundários, ou seja, os tratamentos físico-químico e biológico por lodo ativado. Os tratamentos terciários e avançados por envolverem normalmente tecnologias mais avançadas e consequentemente um maior custo ainda são pouco utilizados (PERES et al., 1998).

A escolha do processo, ou sequência dos processos depende das características do efluente, qualidade requerida do efluente final, custo, disponibilidade de área e tecnologia adequada.

Lagunas e Lis (1998) apresentam como um dos indicativos na escolha do tipo de tratamento mais adequado a relação DQO/DBO

- DQO/DBO < 2 – podem ser depurados biologicamente (lodos ativados);
- DQO/DBO > 2 e < 8 – também podem ser tratados biologicamente (leito bacteriano);
- DQO/DBO > 10 – não é aconselhável tratamento biológico (físico-químico).

Para tratamentos biológicos, outro indicativo é a presença de qualidades adequadas de C, N e P.

De acordo com um levantamento realizado pelo SENAI/CETIQT em 1990 (AGUIAR; SCHÖNBERGER, 1995b):

- metade das indústrias têxteis que dispõem de tratamento de efluentes utiliza o tratamento físico-químico precedido pelo pré-tratamento;
- ⅓ das indústrias utilizam o pré-tratamento seguido pelos tratamentos físico-químicos e biológicos;
- ¼ das indústrias utilizam o pré-tratamento seguindo do biológico por lodos ativados.

Segundo Dellamatrice, (2005), o interior do estado de São Paulo (Americana, SP), se concentra um numero grande de indústrias têxteis do Brasil, contendo 85% das indústrias do gênero no país. Os resíduos das indústrias têxteis são tratados juntamente com o esgoto de 73% da população da cidade, sendo que cerca de ¾ do volume tratado corresponde a efluente de origem têxtil e ¼ do volume corresponde a águas residuárias.

3.12 Cor

A cor de um efluente pode estar relacionada com sua idade. Efluentes novos ou recentes apresentam geralmente uma cor cinza, cinza acastanhada. Com o tempo, há um aumento da concentração e de condições anaeróbias e a cor se torna cinza, cinza escuro em último estagio preta (METCALF; EDDY, 1991).

No caso de um efluente têxtil, rico em corantes, a cor é variada e intensa. Além da poluição estética, impede a passagem da luz necessária para a realização da fotossíntese, responsável pela produção de parte do oxigênio necessário para a degradação da matéria orgânica via aeróbia (APHA, 1995).

A remoção da cor de um efluente têxtil é o maior problema enfrentado pelo setor. Algumas técnicas foram apresentadas na tabela 3, abaixo e muitas outras existem. Há a necessidade de um tratamento de baixo custo, simples e eficiente (Cooper, 1993).

Tabela 3 - Resumo de técnicas de remoção da cor

Método	Remoção da cor	Capacidade de volume	Velocidade	Custo	Outros fatores
Carvão Ativado	Muito boa	Pequena	Baixa	Alto	Regeneração
Membranas	Boa	Grande	Alta	Alto	Limpeza Problemas de disposição
Ozônio	Boa	Grande	Média	Alto	Produtos tóxicos Reduz DQO
Coagulação / Floculação	Boa	Grande	Média / Alta	Médio	Remoção de lodo Nitrificação Reduz DQO

(Fonte: Cooper, 1993)

Baseando-se nestas informações foi possível realizar esta pesquisa no objetivo de avaliar a descoloração da vinhaça por três linhagens de *Pleurotus* (*P. sajor-caju* CCB 020*, P. ostreatus,* e *P. albidus* CCB 068), através das atividades das enzimas ligninolíticas: lacase, peroxidases e manganês peroxidase, a cada 3 dias, por um período de 30 dias, avaliando, no período de maior atividade enzimática, a efetividade, estabilidade com o tempo e variação do pH das enzimas, por meio da degradação/descoloração do corante índigo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Ecologia Aplicada pertencente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo (CENA-USP).

Todo o experimento de desenvolvimento dos fungos, extração e análises enzimáticas foi realizado com três repetições.

4.1 Vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar

A vinhaça e o bagaço foram fornecidos pela Usina Costa Pinto, pertencente ao grupo RAIZEN, localizada em Piracicaba, (22°38’11.38” S e 47°41’03.80” O), no estado de São Paulo, safra 2010/2011.

4.2 Micro-organismos

As linhagens dos fungos utilizados na realização deste projeto foram os basidiomicetos, *Pleurotus sajor-caju* CCB 020, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus albidus* CCB 068 (Figura 5) que fazem parte do estoque de culturas do Laboratório de Ecologia Aplicada do CENA-USP, Piracicaba, SP.

Figura 5 – (A) *P. sajor-caju* CCB 020, (B) *P. ostreatus* e (C) *P. albidus* CCB 068 em meio MEA, com 7 dias de incubação a 28±2ºC

4.3 Manutenção das culturas dos fungos em grãos de trigo

Para a manutenção das culturas dos fungos utilizou-se a metodologia descrita por Rosolen (2004). Os fungos foram mantidos em grãos de trigo previamente cozidos com água por 30 minutos em autoclave somente tampada, na proporção de 1:2 (peso/volume). Após o cozimento, os grãos foram escorridos e acrescentou-se 0,2% de carbonato de cálcio e 0,8% de sulfato de cálcio na proporção do peso dos grãos, para ajustar o pH. Amostras de 75 g foram separadas em saquinhos de polietileno (10 x 15 cm) fechados com espuma e barbante e autoclavadas por 30 minutos, a 121ºC. Após a esterilização, os saquinhos contendo as amostras foram colocados em câmara de fluxo, sob luz ultravioleta, até esfriarem. Em seguida, foi realizada a inoculação com o fungo desejado. Os saquinhos inoculados foram incubados em estufa por 20 dias, na temperatura de 28ºC. Uma vez crescidos os micélios e/ou esporos, os saquinhos foram armazenados sob refrigeração a 4ºC e renovados a cada 6 meses. Esta metodologia é utilizada tanto para a manutenção quanto para ativação das culturas dos micro-organismos.

4.4 Cultivo dos fungos

As culturas crescidas em grãos de trigo foram utilizadas para inocular placas de Petri contendo meio sólido de extrato de malte (MEA) previamente esterilizado. Um grão colonizado foi inoculado em placa e estas foram incubadas por sete dias em estufa, na temperatura de 28ºC, conforme metodologia descrita por Mandels e Weber (1969) e Kirk et al. (1986). O meio sólido de extrato de malte utilizado foi "Malt Extract Agar, EMD Chemicals Inc." (Alemanha), cuja composição, por litro, é de 30 g de extrato de malte, 3 g de peptona e 15 g de agar-agar. Foram utilizados 48 g deste composto para cada litro de água destilada. Este material foi autoclavado por 10 minutos, a 121ºC, conforme recomendação do fabricante. O pH final deste meio é de 5,6±0,2 a 25ºC em seguida foram inoculadas com as linhagens de fungos citados no item 4.2 e incubadas por sete dias em estufa, na temperatura de 28°C. Estas culturas serviram de estoques e de inoculo para os meios utilizados nos experimentos.

4.4.1 Cultivo dos fungos para produção de enzimas em vinhaça

Em frascos Erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 100 mL de vinhaça, com o pH 4,7. Em seguida, estes materiais foram autoclavados por 20 minutos, a 121°C. Depois de atingirem a temperatura ambiente, em câmara de fluxo, os frascos foram inoculados com três discos (1,0 cm ϕ) de meio de cultura contendo o micélio dos fungos. O controle consistiu em material sem a inoculação dos micro-organismos. Os frascos foram incubados por até 30 dias em incubadora Tecnal modelo TE-420 com agitação orbital de 180 rpm, a 28°C (± 2ºC), sob condição de escuro.

4.4.2 Cultivo dos fungos para produção de enzimas em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar

Em frascos Erlenmeyers de 125 mL foram colocados 3 g de bagaço de cana-de-açúcar e adicionados 15 mL de vinhaça com o pH 4,7 ou 10 mL de água destilada juntamente com 0,5% de extrato de levedura, como fonte de nitrogênio. Em seguida, estes materiais foram autoclavados por 20 minutos, a 121°C. Depois de atingirem a temperatura ambiente, em câmara de fluxo, os frascos foram inoculados com três discos (1,0 cm ϕ) de meio com as linhagens dos fungos crescidos por sete dias. O controle consistiu em material sem a inoculação dos micro-organismos, a 28°C ($\pm$ 2ºC), sob condição de escuro. Após um período de 3 a 30 dias, a 28°C, tempo e temperatura necessários para os fungos colonizarem o bagaço de cana-de-açúcar.

4.5 Determinação da atividade de enzimas lignolíticas

As amostras foram analisadas a cada três dias durante o período de 30 dias, quanto as atividades enzimáticas. Um frasco de cada micro-organismo foi retirado após 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 30 dias de incubação e filtrado a vácuo em papel de filtro Whatman nº 1 (85 mm ϕ). O sobrenadante foi transferido para tubos Falcon de 50 mL. As atividades das enzimas ligninoliticas foram determinadas logo em seguida e para realização da estabilidade foi testada novamente a eficiência da degradação do corante índigo, sendo as reações realizadas em três repetições e as leituras de absorbância efetuadas com auxilio de espectrofotômetro FEMTO 432.

4.5.1 Reagentes

- **Tampão Citrato-Fosfato:** em 50 mL de H_2O destilada, adicionou-se 0,48 g de acido cítrico e 0,67 g de fosfato de sódio dibasico e o pH foi ajustado para 5,0;
- **Siringaldazina:** foram adicionados 0,05 g Siringaldazina (SIGMA) em 50 mL de etanol;
- **Peróxido de hidrogênio:** em 50 mL de H_2O destilada, adicionou-se 33µL de H_2O_2;
- **Lactato de sódio:** em 50 mL de H_2O destilada, adicionou-se 1,2 mL de lactato de sódio;
- **Albumina bovina:** em 50 mL de H_2O destilada, adicionou-se 0,25 g de albumina bovina (Albumin Bovine Fraction V, MP Biomecals);
- **Peróxido de hidrogênio em tampão succinato de sódio:** em 50 mL de H_2O destilada, adicionou-se 2,7 g de succinato de sódio, então o pH foi ajustado para 4,5 e acrescentou-se 33µL de H_2O_2;
- **Sulfato de Manganês:** em 50 mL de H_2O destilada, adicionou-se 0,017 g de $MnSO_4$;
- **Vermelho de fenol:** em 50 mL de H_2O destilada, adicionou-se 0,05 g de vermelho de fenol;
- **Hidróxido de sódio:** em 50 mL de H_2O destilada, adicionou-se 4,0 g de NaOH.

Todos os reagentes foram estocados em refrigerador a 4ºC.

4.5.2 Atividade enzimática da lacase (EC 1.10.3.2)

A atividade da enzima lacase foi determinada segundo a metodologia de Szklarz et al. (1989), utilizando a siringaldazina como substrato enzimático, oxidando até formação de quinona. Em tubos de ensaio foram colocados 0,6 mL de sobrenadante, 0,3 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 Molar (pH 5,0) e 0,1 mL de solução de siringaldazina 0,1% (em etanol), considerada o iniciador da reação. As

leituras foram realizadas em espectrofotômetro, com absorbância de 525 nm, no início da reação (chamado de T0) e após 10 minutos (T10). Para o branco, o sobrenadante foi fervido a 100°C, por 20 minutos e em seguida foi realizada a leitura. A atividade enzimática é determinada em µmol min litro^{-1} (UI L^{-1}), através da equação descrita em 4.5.5. considerando o valor do coeficiente de absorção molar (ε) de 65000 L.M^{-1} .cm^{-1}.

4.5.3. Atividade enzimática das peroxidases (EC 1.11.1.7)

A atividade das peroxidases foi determinada segundo a metodologia de Szklarz et al. (1989), utilizando a siringaldazina como substrato enzimático, oxidando até formação de quinona, na presença de H_2O_2 exógeno no meio de reação. Adicionou-se 0,6 mL de sobrenadante, 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 Molar (pH 5,0), 0,1 mL de solução de H_2O_2 0,002 Molar (em água destilada) e 0,1 mL de solução de siringaldazina 0,1% (em etanol), considerada o iniciador da reação.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, com absorbância de 460 nm, no início da reação (T0) e após 10 minutos (T10). Para o branco, o sobrenadante foi fervido a 100°C, por 20 minutos e em seguida foi realizada a leitura. A atividade enzimática é determinada em µmol min litro^{-1} (UI L^{-1}), através da equação descrita em 4.5.5 considerando o valor do coeficiente de absorção molar (ε) de 29.400 L.M^{-1}.cm^{-1}.

4.5.4. Atividade enzimática da manganês peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13)

A atividade da enzima MnP foi determinada segundo a metodologia de Kuwahara et al. (1984), quantificada através da oxidação do vermelho de fenol na presença de Mn^{+2} e H_2O_2.

Para esta reação, foram adicionados em 0,6 mL de sobrenadante, 0,1 mL de solução de lactato de sódio 0,25 Molar; 0,1 mL de solução de albumina bovina 0,5% (em água destilada), 0,1 mL de tampão succinato de sódio 0,2 Molar (pH 4,5), 0,05

mL de solução de $MnSO_4$ 0,002 Molar, 0,05 mL de H_2O_2 0,002 Molar e 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1% (em água destilada), considerado o iniciador da reação. Para o branco, o sobrenadante foi fervido a 100°C, por 20 minutos e em seguida foi realizada a leitura como descrito anteriormente. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, com absorbância de 610 nm, no início da reação (T0) e após 10 minutos a reação é interrompida pela adição de 0,04 mL da solução de NaOH 2,0 N, sendo realizada nova leitura (T10). A atividade enzimática é determinada em $\mu mol.min^{-1}.litro^{-1}$ (UI L^{-1}), através da equação descrita em 4. 5. 5. considerando o valor do coeficiente de absorção molar (ε) de 4.460 $L.M^{-1}.cm^{-1}$.

4.5.5 Cálculo das atividades lignolíticas

$$\text{Atividade Enzimática } (UI.L^{-1}) = \left(\frac{\frac{(\Delta\ Abs)}{\varepsilon}}{R \times T} \right) \times 10^6$$

$$\text{Atividade Especifica } (\mu mol.min^{-1}\ .\ mg\ de\ proteína^{-1}) = \left(\frac{\frac{(\Delta\ Abs)}{\varepsilon\ /\ 1000}}{R \times T \times P} \right)$$

Onde:

Δ Abs. = absorbância [Abs. $_{final}$ (T10) – Abs. $_{inicial}$ (T0)]

ε = coeficiente de absorção molar ($L.M^{-1}.cm^{-1}$)

R = volume do caldo enzimático (mL)

T = tempo da reação (minutos)

P = concentração de proteína ($mg.L^{-1}$)

- Coeficiente de absorção molar:

  $\varepsilon_{525\ nm}$ 65000 $L.M^{-1}.cm^{-1}$

  $\varepsilon_{460\ nm}$ 29400 $L.M^{-1}.cm^{-1}$

  $\varepsilon_{610\ nm}$ 4460 $L.M^{-1}.cm^{-1}$

4.6 Determinação das proteínas totais

A determinação de proteínas totais foi baseada no método de Bradford (1976). Foram utilizados 20 µL do sobrenadante para 1 mL de reagente. A quantificação protéica foi realizada em espectrofotômetro (Femto 432) na absorbância de 595 nm. Para o branco, 20 µL de água destilada foram utilizados no lugar da amostra.

4.7 Estabilidade das enzimas

Em frascos Erlenmeyers de 125 mL foram colocados 3 g de bagaço de cana-de-açúcar e adicionados 15 mL de vinhaça com o pH 4,7 como fonte de nitrogênio. Em seguida, estes materiais foram autoclavados por 20 minutos, a 121°C. Depois de atingirem a temperatura ambiente, em câmara de fluxo, os frascos foram inoculados com três discos (1,0 cm ϕ) de meio de cultura contendo o micélio dos fungos e incubados a 28°C (± 2ºC), sob condição de escuro. O controle consistiu em material sem a inoculação dos micro-organismos.

Após um período de 3 a 30 dias, a 28°C, tempo e temperatura necessários para os fungos colonizarem o bagaço de cana-de-açúcar, as enzimas foram extraídas sendo adicionados 30 mL de água destilada, homogeneizando o substrato por 30 minutos em mesa agitadora. Na seqüência este material foi filtrado á vácuo e o sobrenadante recolhido e utilizado para a avaliação das atividades enzimáticas imediatamente e armazenado a 4°C para estudo da estabilidade das enzimas. Os ensaios de atividade enzimática e degradação do corante foram realizados em intervalos: no momento da filtragem, 1 hora, 2 horas e 24 horas após a filtragem). As amostras foram analisadas a cada 3 dias durante o período de 30 dias.

4.8 Descoloração da vinhaça

Em frascos Erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 100 mL de vinhaça, com o pH corrigido para 6,0. Em seguida, estes materiais foram autoclavados por 20 minutos, a 121°C. Depois de atingirem a temperatura ambiente, em câmara de fluxo, os frascos foram inoculados com três discos (1,0 cm ϕ) de meio de cultura contendo o micélio dos fungos. O controle consistiu em material sem a inoculação. Os frascos foram incubados por 30 dias em incubadora Tecnal modelo TE-420 com agitação orbital de 180 rpm, a 28°C (± 2ºC), sob condição de escuro.

As amostras foram analisadas a cada três dias em um período de 30 dias como descrito no item 4.5 para determinação das atividades enzimáticas. A descoloração da vinhaça foi determinada através da leitura da absorbância em espectrofotômetro FEMTO 432, no comprimento de onda (λ) 680 nm.

4.9 Descoloração do corante índigo

Foram adicionados em tubos de ensaio de 10 x 100 mm um volume de 800 µL, 600 µL e 400 µL de corante índigo 0,02% v/v com o pH corrigido para 4,5. Em seguida, que as amostras foram mantidas a 35ºC, quando foi adicionado uma proporção para completar um mL, de 200 µL, 400 µL e 600 µL de extrato enzimático (meio de cultura, filtrado). As descolorações foram determinadas, logo em seguida a homogeneização, em agitador de tubos, sendo as reações realizadas em triplicada e procederam-se as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro FEMTO 432, nos comprimentos de onda (λ) 580 e 680 nm (λ de máxima absorbância do índigo).

A medida em dois comprimentos de onda é recomendada por Glenn e Gold (1983) para verificar a razão de descoloração.

A quantidade da remoção do corante foi calculada em termos de porcentagem de descoloração, utilizando uma curva padrão da absorbância versus diferentes concentrações do corante.

4.10 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados, com 3 repetições onde foram analisados 4 fatores (fungos, tratamentos, tempo (dias), e concentrações), com arranjo de tratamentos em esquema fatorial. Para adequar as pressuposições do modelo de Gauss e Markov os dados foram transformados utilizando $\sqrt{x + 0{,}5}$ para analise de variância univariadas, os testes de comparações múltiplos foram realizados através do Teste de Comparações Múltiplos de Tukey, com 95% e 99% de confiança (5% ou 1% de significância, erro tipo I respectivamente), utilizando o programa SANEST – Sistema de Analise Estatística desenvolvido pela Universidade Federal de Pelotas em parceria com o Departamento de Matemática e Estatística da Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, Piracicaba. Os detalhes dos cálculos realizados podem ser encontrados nos anexos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de enzimas lacase, peroxidase e manganês peroxidase

A atividade de lacase no cultivo de *P. sajor-caju* CCB 020*, P. ostreatus e P. albidus* CCB 068 em vinhaça com pH 4,7 teve inicio aos nove dias, e apresentou pico de atividade ao décimo segundo ou décimo quinto dia de incubação, (681 UI L^{-1}), (1259 – 1463 UI L^{-1}) e (384 UI L^{-1}) respectivamente, como mostra a Figura 6.

Para Ferreira (2009), o cultivo de *P. sajor-caju* CCB 020 sobre a vinhaça teve pico de atividade (400 – 450 UI L^{-1}) para lacase aos nove dias de incubação, fato este pode ser explicado por ter usado a vinhaça com pH corrido para 6,0, embora a linhagem do fungo seja a mesma.

Segundo Sartori (2011), os maiores valores de atividade enzimática encontrados para a lacase em meio de vinhaça líquida medidos no sexto dia foram obtidos pelo fungo *Pleurotus* sp. CCB 068 (14,24 UI L^{-1}) e *P. flabellatus* CCB 396 (6,35 U L^{-1}). Para os demais fungos cultivados, *P. sajor-caju* CCB 020 e *P. shimeji*, não foi observado crescimento e tão pouco atividades enzimáticas. Por outro lado, após o 15º dia de incubação, *sajor-caju* CCB 020 (25,01 UI L^{-1}) apresentou a maior atividade, seguido pelo fungo *Pleurotus* sp. CCB 068 (12,91 UI L^{-1}) e *P. shimeji* (8,23 UI L^{-1}) enquanto que *P. flabellatus* CCB 396 não apresentou atividade da enzima. Além da produção da enzima aos 15 dias de cultivo *P. sajor-caju* CCB 020 e *P. shimeji* tiveram um aumento significativo da biomassa e foram mais eficazes no processo de descoloração da vinhaça em relação aos outros fungos

Estes valores são conflitantes com os encontrados por Ferreira (2009) que encontrou atividade de lacase acima de 350 UI L-1 ao sexto dia de cultivo, em meio com 100% de vinhaça, para P. sajor-caju CCB 020 e ao 15º dia valores menores de atividade, próximo à 50 UI L-1. Isso se deve, provavelmente a variação na composição da vinhaça nas diferentes safras (Sartori, 2011).

Por outro lado, os valores de atividade enzimática de lacase dos fungos cultivados em meio com vinhaça sólida se mostraram significativamente maiores que em vinhaça líquida. Os maiores valores encontrados foram para *P. sajor-caju* CCB

020 (1257,43 UI g^{-1} MS), *P. shimeji* (938,46 UI g^{-1} MS), *Pleurotus* sp. CCB 068 (397,43 UI g^{-1} MS) aos 12 dias de incubação e para *P. flabellatus* CCB 396 o maior valor foi de 16,92 UI g^{-1} MS ao terceiro dia de incubação (Sartori, 2011).

Os basidiomicetos do gênero *Pleurotus* não produzem lignina peroxidase (LiP), mas tem atividade de lacase, manganês peroxidase e peroxidases não dependente de Mn e outras oxidases. As características genéticas das espécies e linhagens, como os parâmetros físico–químicos como: pH, N, temperatura, oxigenação, presença de minerais interferem na produção e ação das enzimas (VYAS et al., 1994; TUOR et al., 1992; KAMIDA et al., 2005; ZHAO et al., 2008). A atividade desses fungos ocorre no metabolismo secundário e o pré-crescimento em materiais lignocelulósicos ativa o sistema de enzimas (MASAPHY; LEVANON, 1992).

A grande vantagem da enzima lacase está em não requerer a adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como co-fator, e em muitos trabalhos tem sido correlacionada a sua atividade com a degradação de compostos tóxicos e com a descoloração. De acordo com a literatura existem diferenças quanto ao perfil enzimático variando com o tempo, organismo empregado, meio e condições de cultivo (RODRIGUEZ et al., 2003).

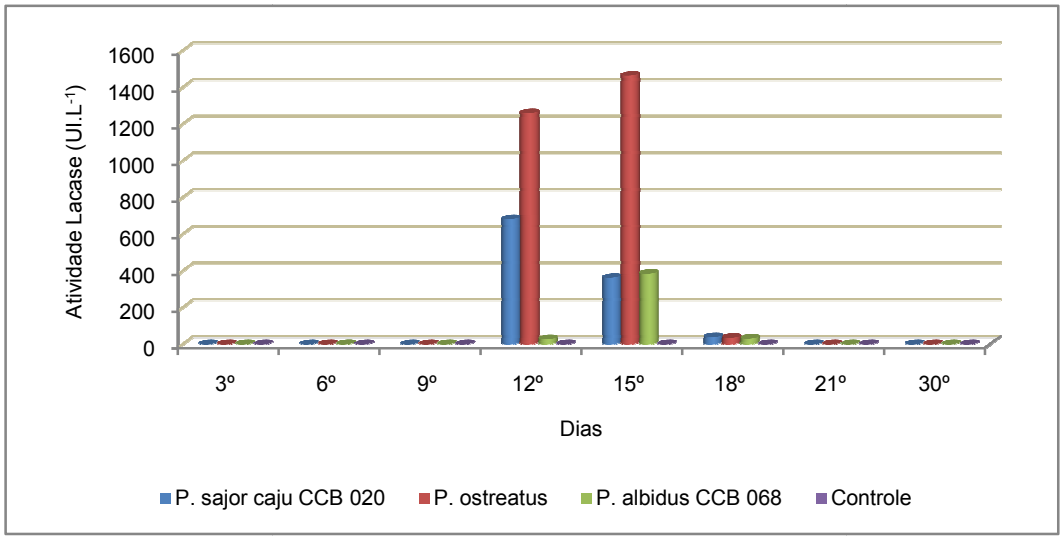

Figura 6 - Atividade de Lacase por *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 em vinhaça entre os 30º dias de cultivo, pH 4,7 a 28ºC±2

Por outro lado, os valores de atividade enzimática de lacase dos fungos cultivados em meio com vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar se mostraram significativamente menores que a vinhaça pura.

A atividade de lacase no cultivo de *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068, em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar com pH 4,7 teve inicio aos terceiro dia e apresentou pico de atividade a partir do sexto dia de incubação, (41,44 - 30,00 – UI L^{-1}), (4,26 – 4,49 UI L^{-1}) e (6,90 – 7,87 UI L^{-1}) respectivamente, como mostra a Figura 7.

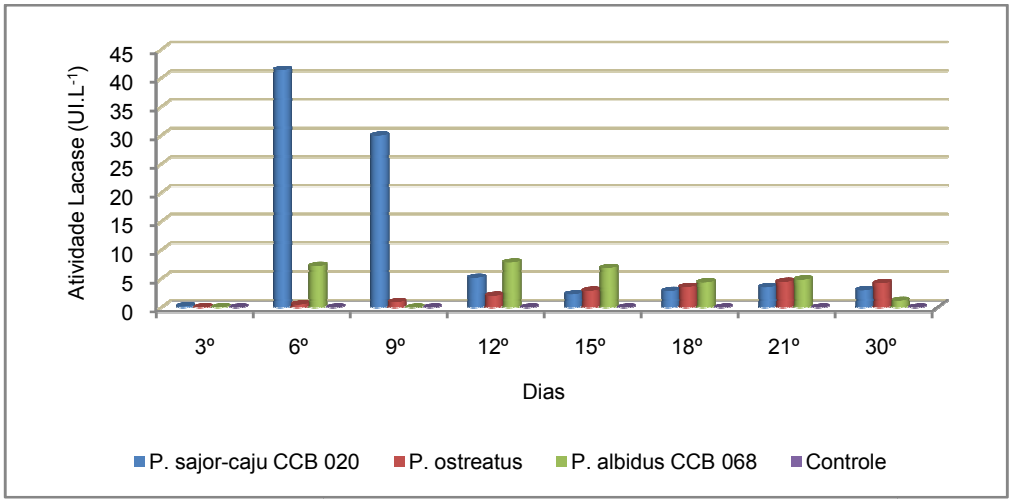

Figura 7 - Atividade da Lacase produzida pelo fungo *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar entre os 30º dias de cultivo, pH 4,7 a 28ºC ± 2

Para Aguiar Filho (2008) os fungos *P. sajor-caju* CCB 020 e *P. ostreatus* foram cultivados em meio de bagaço cana-de-açúcar moído, suplementado com vinhaça obtendo maiores valores de atividade enzimática no sexto dia para *P. sajor-caju* CCB 020 (± 10 UI L^{-1}) e no 15º dia para *P. ostreatus* (300 UI L^{-1}). Pompeu (2010) comparou a atividade de lacase produzida por *P. sajor-caju* CCB 020 em meio de vinhaça, meio de vinhaça com glicose, meio de bagaço e palha de cana com vinhaça em relação ao meio de bagaço contento extrato de levedura, encontrando valores até 100 vezes maiores de atividade enzimática no meio suprido com extrato de levedura comparado aos outros.

Estudos com de enzimas ligninocelulolíticas em bagaço de cana-de-açúcar feita por Menezes et al. (2009) revelou a presença da enzima lacase, destacando-se o *P. albidus* CCB 068 com as atividades no décimo quinto e vigésimo dia de incubação (6,23 UI L^{-1} – 4,68 UI L^{-1}). As demais linhagens não obtiveram valores expressivos, tendo o fungo *P. sajor-caju* CCB 020 e o *Pleurotus tailandia* obtido a atividade máxima no décimo dia (3,52 - 1,63 UI mL^{-1}), respectivamente. Kumaran et al. (1997), observaram para o fungo *P. sajor-caju* CCB 020 (10,6 UI L^{-1}) de atividade de lacase, em substrato lignocelulósico.

A atividade de Peroxidase do cultivo de *P. sajor-caju* CCB 020, na vinhaça teve inicio aos nove dias, e apresentou pico de atividade aos décimo segundo dia de incubação, (527 UI L^{-1}), já *P. ostreatus* iniciou no décimo segundo dia e apresentou pico de atividade ao décimo quinto dia (356 – 442 UI L^{-1}) e *P.albidus* CCB 068 teve um pico de atividade ao vigésimo primeiro dia (975 UI L^{-1}) e caiu próximo a zero ao trigésimo dia, como observado na Figura 8.

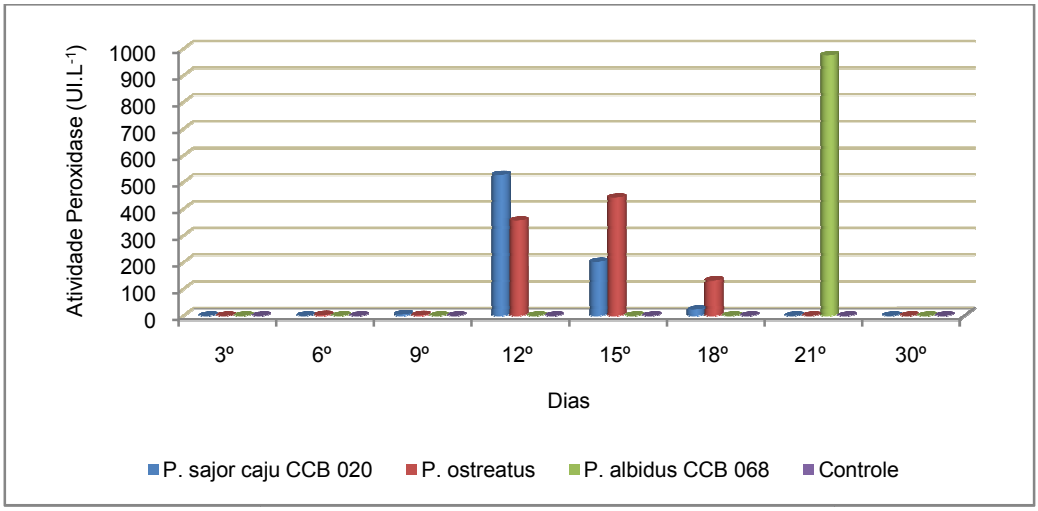

Figura 8 - Atividade de Peroxidase por *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 em vinhaça entre os 30º dias de cultivo, pH 4,7 a 28ºC±2

Os valores da atividade enzimática da peroxidase cultivados em meio com vinhaça mais e bagaço se mostraram significativamente menores que a vinhaça sem bagaço de cana-de-açúcar.

A atividade de peroxidase no cultivo de *P. sajor-caju* CCB 020 e *P. albidus* CCB 068 em vinhaça mais e bagaço de cana-de-açúcar com pH 4,7 teve inicio e pico de atividades no sexto dia de incubação, (18,48 UI L^{-1}), (12,24 – 16,78 UI L^{-1}) respectivamente e para *P. ostreatus* um inicio aos décimo quinto dia e pico no trigésimo dia (10,03 UI L^{-1}), como mostra a Figura 9.

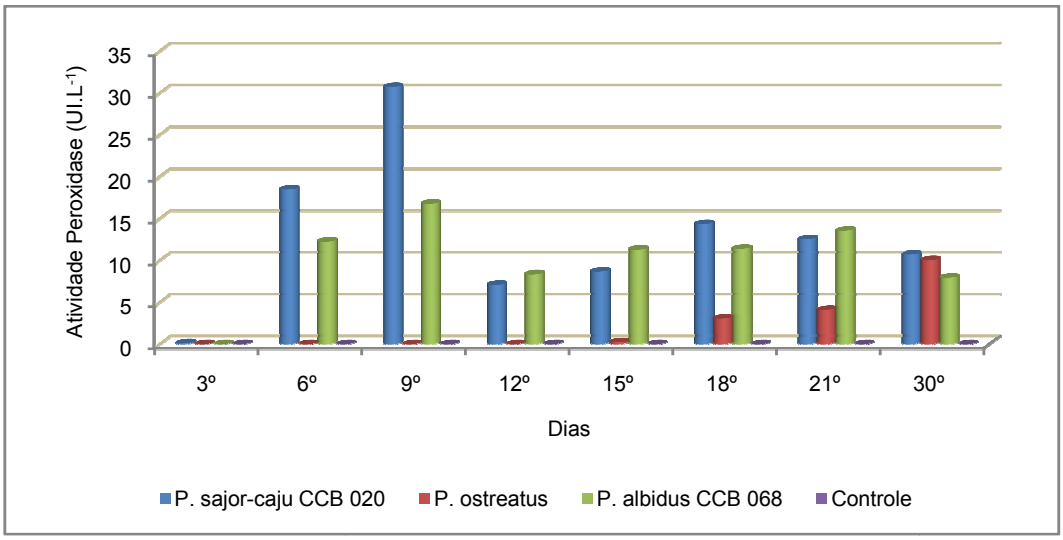

Figura 9 - Atividade da Peroxidase produzida pelo fungo *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar entre os 30º dias de cultivo, pH 4,7 a 28ºC ± 2

Estudos anteriores demonstraram valores inferiores de atividade de peroxidase em relação ao trabalho presente. Aguiar Filho (2008), testando a atividade enzimática em vinhaça com bagaço de cana-de-açúcar (com e sem pré-tratamento de H_2SO_4, NaOH e H_2O_2), obteve valores máximos com o fungo *P. sajor-caju* CCB 020 no meio sem tratamento (7,50 UI L^{-1}) e no bagaço tratado com H_2O_2 (2,17 UI L^{-1}). Por outro lado não foi observada atividade de peroxidases em *P. sajor-caju* CCB 020 cultivado em vinhaça, por Ferreira (2009). Pompeu (2010), acrescentando 0,5% de extrato de levedura ao bagaço, obteve valores de 150 a 355 vezes maior de atividade da peroxidases, comparado ao crescimento no mesmo meio sem extrato de levedura. Para MnP, o máximo de atividade foi atingido no 12º dia (174 UI L^{-1}) para *P. sajor-caju* CCB 020 e picos menores para *P. ostreatus* (2,61 UI L^{-1}) no 12º dia e *P. albidus* CCB 068 no 15º (2,24 UI $L^{-1)}$, demonstrado na Figura 10.

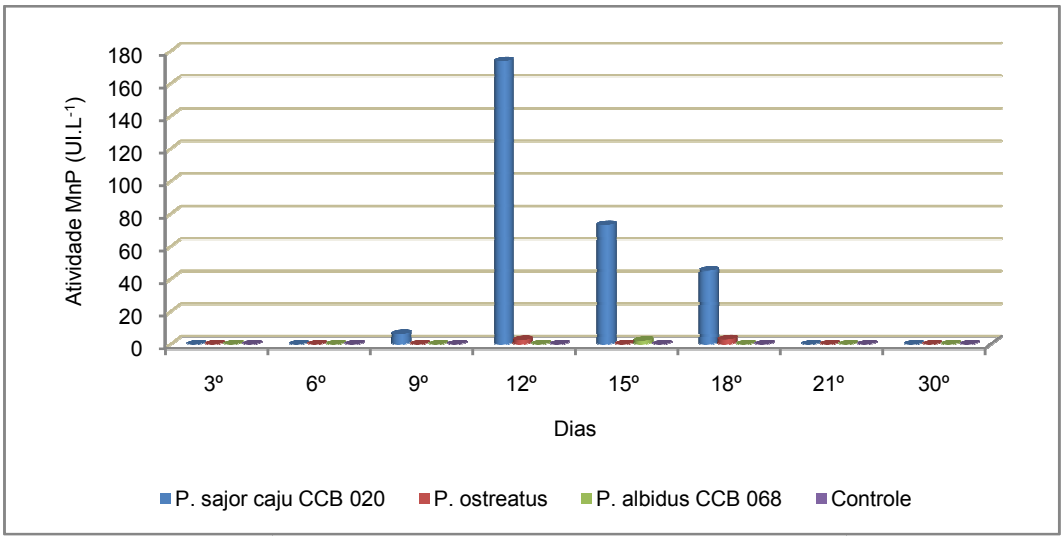

Figura 10 - Atividade de MnP de *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 em vinhaça entre os 30º dias de cultivo, pH 4,7 a 28ºC±2

Ao contrário do que ocorreu com as atividades enzimáticas da lacase e peroxidase entre os e tratamentos vinhaça e vinhaça com bagaço de cana-de-açúcar. A atividade de MnP no cultivo de, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 em vinhaça e bagaço com pH 4,7 apresentou atividade ao terceiro dia e nos demais dias não foi observado atividade significativa, por outro lado, para o fungo *P. sajor-caju* CCB 020 o inicio foi ao sexto dia de incubação, (6,70 UI L^{-1}), e um pico de 69,5 UI L^{-1}, ao décimo segundo dia como mostra a Figura 11.

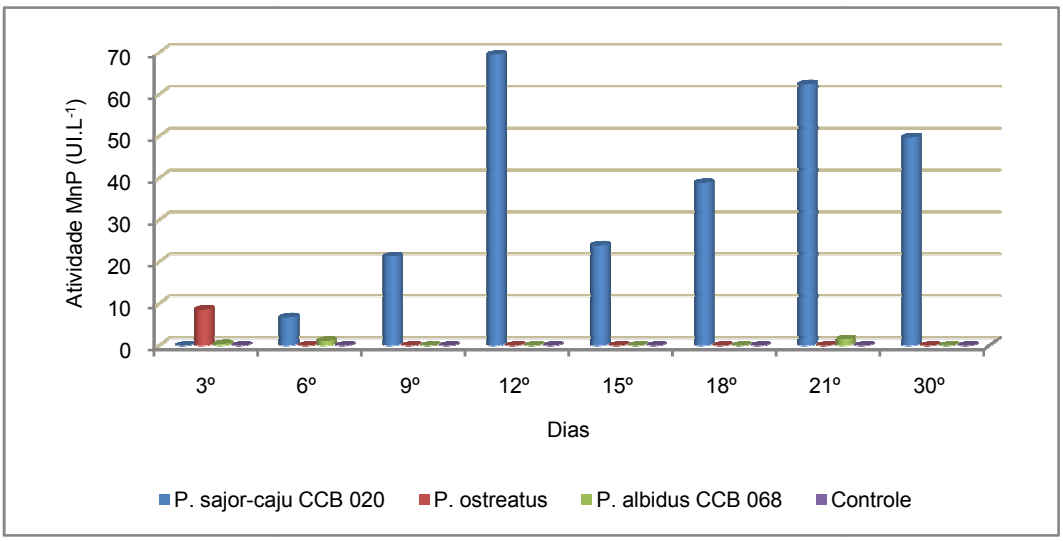

Figura 11 - Atividade da MnP produzida pelo fungo *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar entre os 30º dias de cultivo, pH 4,7 a 28ºC ± 2

Para Ferreira (2009), o cultivo de *P. sajor-caju* CCB 020 nos tratamentos (vinhaça in natura, vinhaça com meio sintético para fungos e vinhaça com glicose) teve máxima atividade no décimo segundo dia (60 – 80 UI L^{-1}). Utilizando este mesmo fungo, Aguiar Filho (2008) observou valores inferiores para MnP (18 UI L^{-1}) ao décimo segundo dia de cultivo em meio de bagaço de cana-de-açúcar com vinhaça. Pompeu (2010) conseguiu uma atividade máxima de MnP por *P. sajor-caju* CCB 020 (47,1 UI L^{-1}) quando a incubação deste fungo foi feita em bagaço e palha de cana-de-açúcar com a adição de 0,5% de extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Dellamatrice (2005), constatou a produção de atividade enzimática de MnP por *P. sajor-caju* CCB 020 (2,36 UI L^{-1}) e *P. ostreatus* (3,72 UI L^{-1}) em lodo resultante do tratamento de efluente da industria têxtil, proporcionando o clareamento deste resíduo.

5.2 Proteínas totais e Atividade específica das enzimas

A eficiência da atividade enzimática é calculada em relação entre a atividade de enzimas e a quantidade de proteína total presente no meio após o cultivo do fungo (sobrenadante). Quanto maior a atividade enzimática e menor a quantidade de proteínas totais, melhor é a eficiência da enzima. Outra vantagem é que para purificação das enzimas,quanto menor a quantidade de proteínas, menores serão o número de etapas para sua purificação, sendo menor as perdas no processo (FERNANDES et al., 2007). Foi observado valores maior que 1 para os fungos *P. sajor-caju* CCB 020 e *P. ostreatus*, para lacase Tabela 3, para *P. albidus* CCB 068 para peroxidase (Tabela 4) e para Manganês peroxidase *P. sajor-caju* CCB 020 foi o que apresentou maior valor para atividade enzimática especifica, tanto na vinhaça sem correção do pH, como no bagaço umedecido com vinhaça (Tabela 5).

Tabela 4 - Valores máximos obtidos da atividade enzimáticas de Lacase, em µmol.min^{-1}. mg proteína $^{-1}$ e UI L^{-1}, produzidas pelos fungos crescidos em vinhaça e vinhaça com bagaço de cana-de-açúcar por 30 dias, a 28±2ºC

Fungos	Tratamentos	Dias	Lacase (UI L^{-1})	Lacase (µmol .min^{-1}. mg proteína^{-1})
P. sajor-caju CCB 020	Vinhaça	12	681	1,062
P. ostreatus	Vinhaça	15	1463	2,186
P. albidus CCB 068	Vinhaça	15	384	0,571
P. sajor-caju CCB 020	Vinhaça + Bagaço	15	51,95	0,519
P. ostreatus	Vinhaça + Bagaço	21	9,64	0,013
P. albidus CCB 068	Vinhaça + Bagaço	12	46,26	0,290
Controle	Vinhaça / Vinhaça + Bagaço	3	0	0

Tabela 5 - Valores máximos obtidos da atividade enzimáticas de Peroxidase, em µmol.min^{-1}. mg proteína^{-1} e UI L^{-1}, produzidas pelos fungos crescidos em vinhaça e vinhaça com bagaço de cana-de-açúcar por 30 dias, a 28±2ºC

Fungos	Tratamentos	Dias	Peroxidase (UI L^{-1})	Peroxidase (µmol .min^{-1}. mg proteína^{-1})
P. sajor-caju CCB 020	Vinhaça	12	527	0,822
P. ostreatus	Vinhaça	15	442	0,660
P. albidus CCB 068	Vinhaça	21	975	1,450
P. sajor-caju CCB 020	Vinhaça + Bagaço	15	32,26	0,049
P. ostreatus	Vinhaça + Bagaço	18	5,90	0,008
P. albidus CCB 068	Vinhaça + Bagaço	9	18,92	0,023
Controle	Vinhaça / Vinhaça + Bagaço	3	0	0

Tabela 6 - Valores máximos obtidos da atividade enzimáticas de MnP, em µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}e UI L^{-1}, produzidas pelos fungos crescidos em vinhaça e vinhaça com bagaço de cana-de-açúcar por 30 dias, a 28±2ºC

Fungos	Tratamentos	Dias	MnP (UI L^{-1})	MnP (µmol .min^{-1}. mg proteína^{-1})
P. sajor-caju CCB 020	Vinhaça	12	174	0,271
P. ostreatus	Vinhaça	12	2,61	0,004
P. albidus CCB 068	Vinhaça	15	2,24	0,003
P. sajor-caju CCB 020	Vinhaça + Bagaço	12	16,15	0,161
P. ostreatus	Vinhaça + Bagaço	3	0	0
P. albidus CCB 068	Vinhaça + Bagaço	6	1,12	0,001
Controle	Vinhaça / Vinhaça + Bagaço	3	0	0

Para Pompeu (2010) as máximas atividades enzimáticas de lacase e peroxidase foram observadas em *P. sajor-caju* CCB 020, na concentração de 1% de extrato de levedura, (2,2 – 1,5 µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}) no 13º e 12º dias de incubação, respectivamente, seguido por *T. reesei*, 4º e 5º dias (0,182 – 0,183 µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}), *A. níger*, 4º e 5º dias (0,046 – 0,081 µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}). Com relação a MnP, a maior atividade

enzimática foi observada em *T. reesei*, 4º dia (0,172 μmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}), *A. níger*, 10º dia (0,070 μmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}), e *P. chrysosporium*, 9% dia (0,014 μmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}).

Segundo Ferreira et al. (2010), existem diferenças com relação ao perfil enzimático quanto ao organismo, substrato utilizado e período de incubação. As características físico-químicas do meio de cultivo são de fundamental importância, não apenas para o crescimento celular como também para a produtividade enzimática. Por que as células são capazes de responder aos estímulos químicos e físicos do meio externo através de mecanismos bioquímicos que regulam a expressão gênica e a fisiologia do microrganismo e por extensão, seu desempenho na formação do produto desejado dentre outros fatores, indutores, ativadores, inibidores e repressores (BOM et al., 2008).

5.3 Estabilidade da Atividade Enzimática

5.3.1 Estabilidade da Atividade Enzimática pelo fungo *P. sajor-caju* CCB 020

A atividade lacase no cultivo de *P. sajor-caju* CCB 020 em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar com pH 4,7 teve inicio ao terceiro dia (16,67 UI L^{-1}), após o período de 24 horas houve uma perda de 42,77% de sua atividade enzimática inicial. Houve perda da atividade aos 6º, 9º, 12º, 15º, 18º, 21º e ao 30º dias de incubação, mostrando a instabilidade enzimática da lacase, em velocidade diferente para cada período. Aos décimo quinto dia de incubação, apresentou o maior pico de atividade (51,95 UI L^{-1}), e depois de 24 horas uma perda de 85,78% da atividade inicial, como mostrando na Figura (12). Os demais resultados para as perdas em porcentagens são mostradas no Anexo A. A perda ou não da atividade enzimática pode estar relacionada com as formas de isoenzimas presentes, nos diferentes estágios de cultivo dos fungos, ou nas substâncias presentes que mantém a forma e/ou a estabilidade das enzimas.

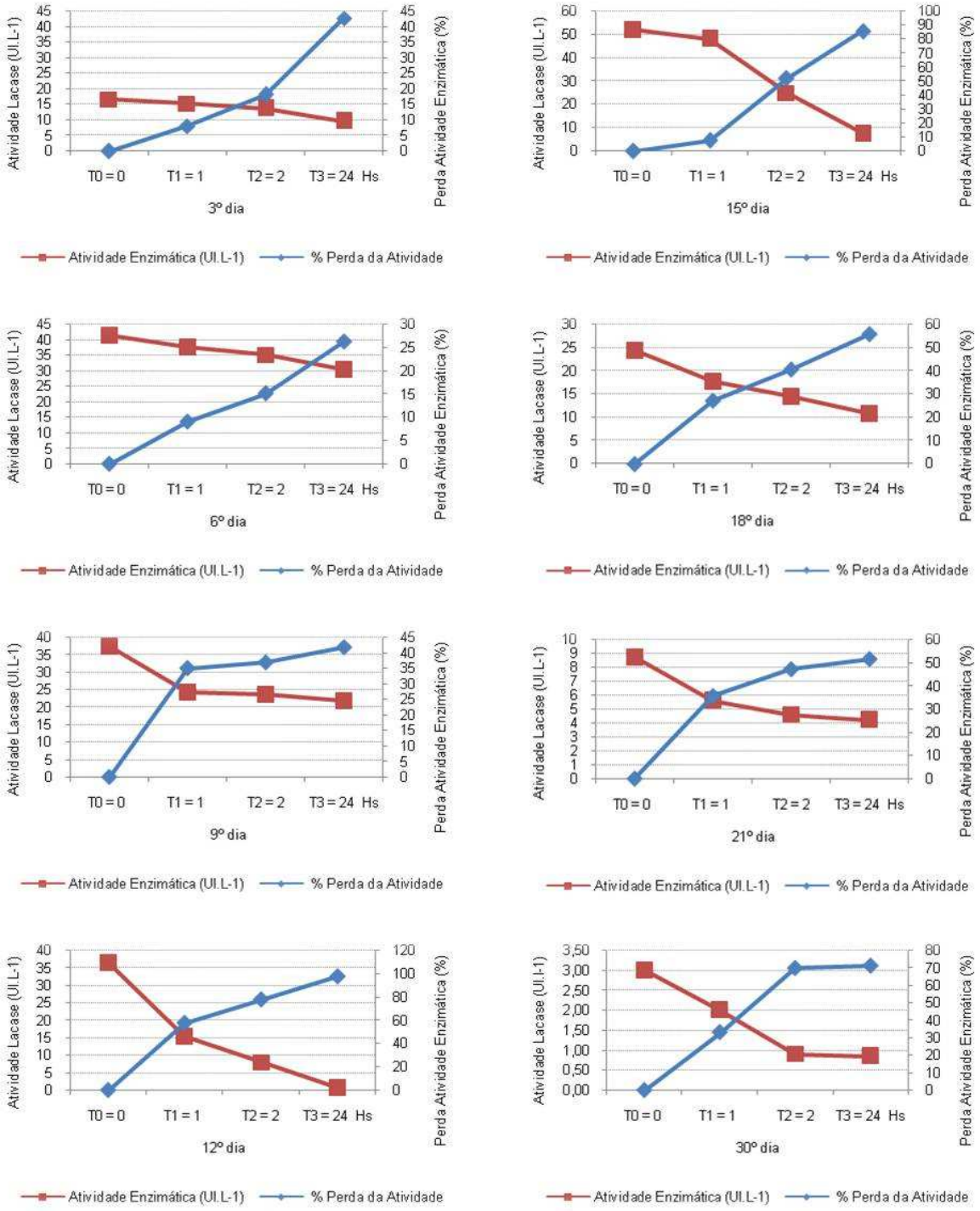

Figura 12 - Estabilidade da atividade da lacase produzida pelo fungo *P. sajor-caju* CCB 020, do 3º ao 30º dias de cultivo, correlacionados com as porcentagens de perda da atividade enzimática com o passar do tempo, pH 4,7 a 28ºC ± 2

A atividade peroxidase no cultivo de *P. sajor-caju* CCB 020 em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar com pH 4,7 teve inicio ao terceiro dia (6,59 UI L^{-1}), após o período de 24 horas houve uma perda de 93,39% de sua atividade enzimática inicial. Houve perda da atividade aos 6º, 9º, 12º, 15º, 18º, 21º e ao 30º dias de incubação, mostrando a instabilidade enzimática da peroxidases em velocidade diferente para cada período. Aos 15º dia de incubação apresentou o pico de atividade (32,26 UI L^{-1}), e depois de 24 horas uma perda de 92,29% da atividade inicial como mostrado na Figura (13) e os demais resultados das perdas em porcentagens são apresentados em tabela nos anexos B.

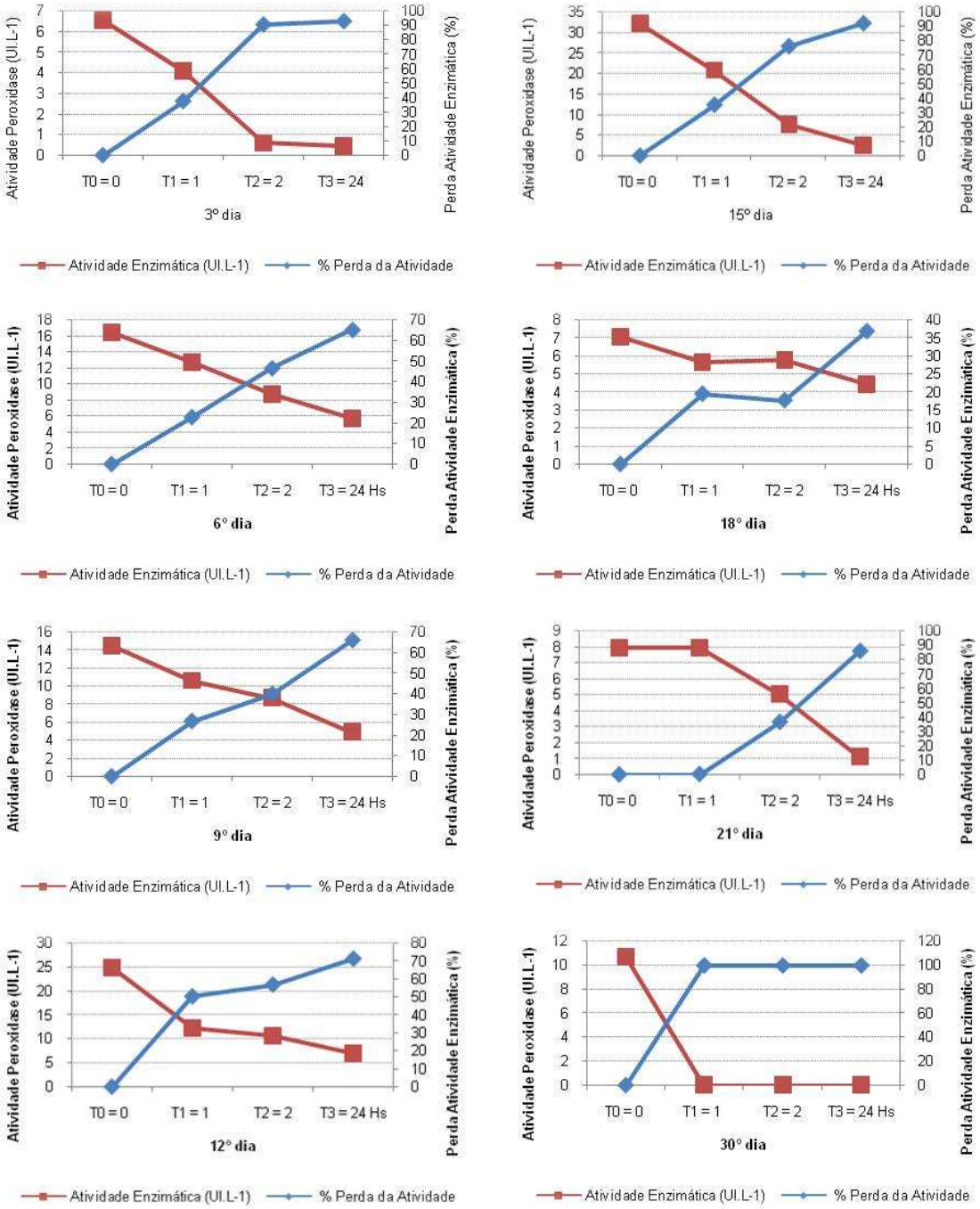

Figura 13 - Estabilidade da atividade da peroxidase produzida pelo fungo *P. sajor-caju* CCB 020, do 3º ao 30º dias de cultivo, correlacionados com as porcentagens de perda da atividade enzimática com o passar do tempo, pH 4,7 a 28ºC ± 2

A atividade MnP no cultivo de *P. sajor-caju* CCB 020 em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar com pH 4,7 teve inicio ao sexto dia (10,77 UI L^{-1}), após o período de 24 horas houve uma perda de 31,19% de sua atividade enzimática inicial. Houve perda da atividade aos 6º, 9º, 12º, 15º, 18º, 21º e ao 30º dias de incubação, mostrando a instabilidade enzimática da MnP em velocidade diferente para cada período. Aos 12º dia de incubação apresentou pico de atividade (16,15 UI L^{-1}), e depois de 24 horas uma perda de 57,94% da atividade inicial como mostrado na Figura (14) e os demais resultados das perdas em porcentagens são apresentados em tabela nos anexos C.

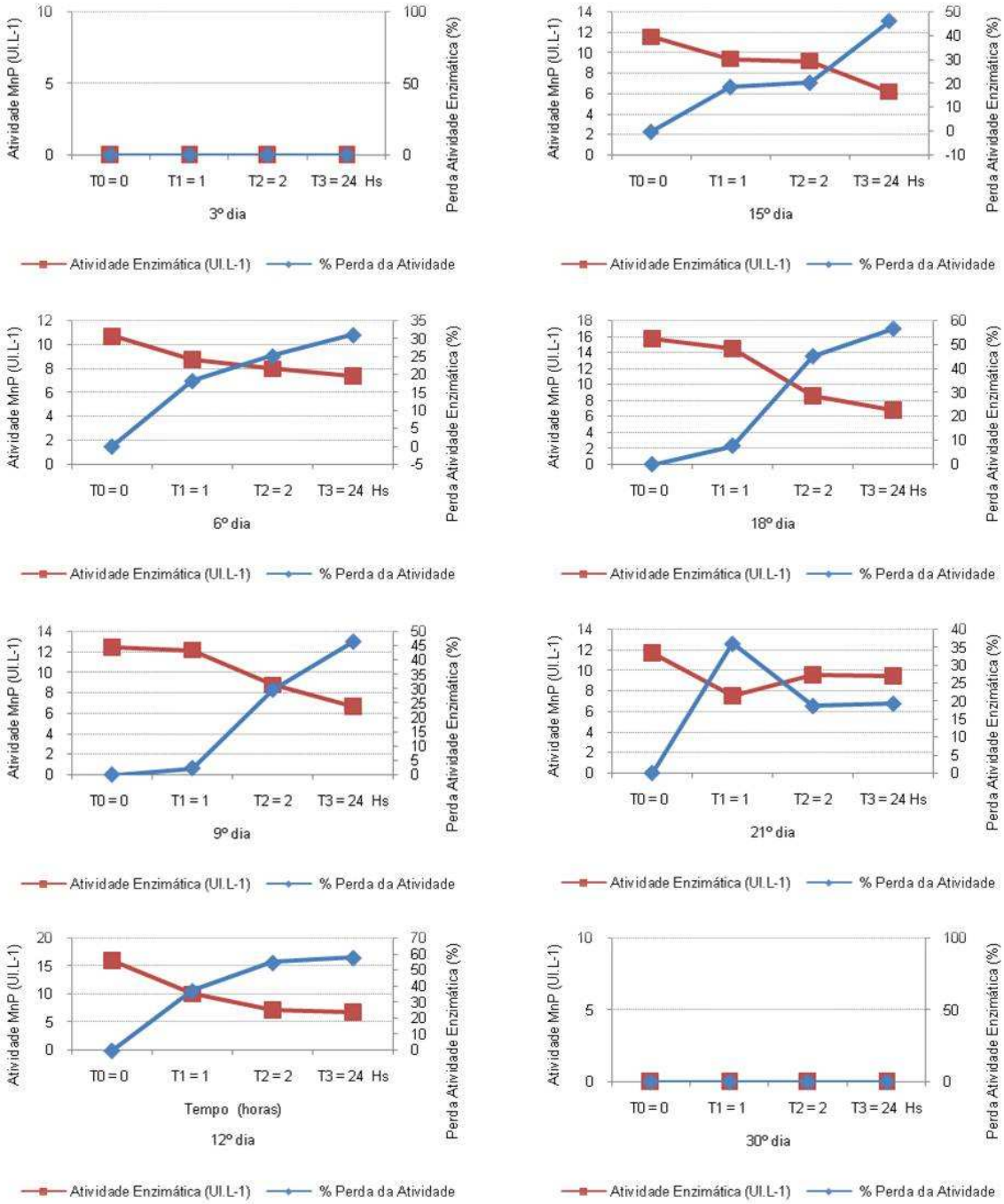

Figura 14 - Estabilidade da atividade da MnP produzida pelo fungo *P. sajor-caju* CCB 020, do 3º ao 30º dias de cultivo, correlacionados com as porcentagens de perda da atividade enzimática com o passar do tempo, pH 4,7 a 28ºC ± 2

5.3.2 Estabilidade da Atividade Enzimática pelo fungo *P. ostreatus*

A atividade lacase no cultivo de *P. ostreatus* em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar com pH 4,7 teve discreto inicio ao terceiro dia (0,50 UI L^{-1}), após o período de 24 horas houve uma perda de 100% de sua atividade enzimática inicial. Houve perda da atividade aos 6º, 9º, 12º, 15º, 18º, 21º e ao 30º dias de incubação, mostrando a instabilidade enzimática da lacase em velocidade diferente para cada período. Aos 21º dia de incubação apresentou pico de atividade (9,64 UI L^{-1}), e depois de 24 horas uma perda de 78,20% da atividade inicial como mostrado na Figura (15) e os demais resultados das perdas em porcentagens são apresentados em tabela nos anexos D.

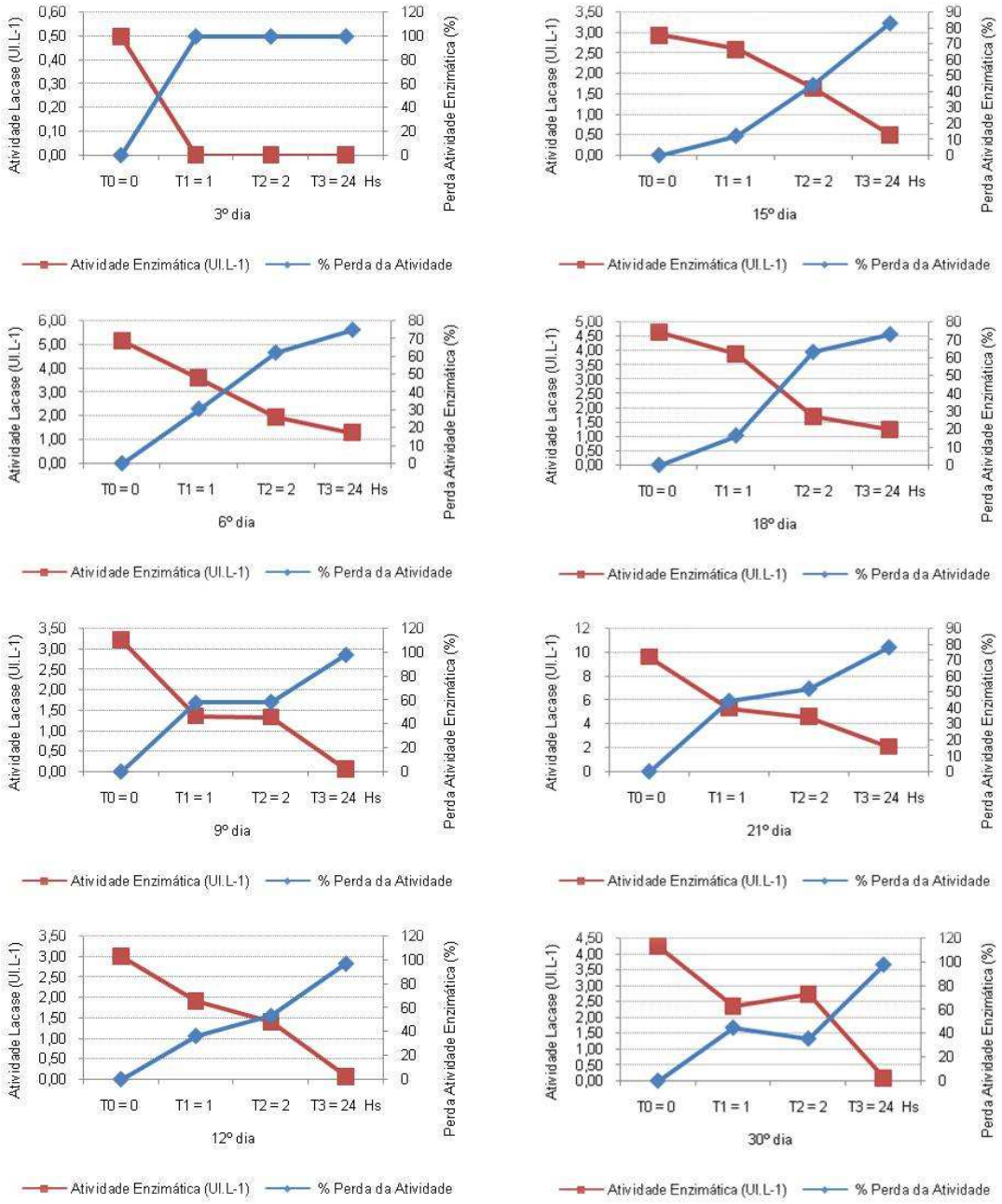

Figura 15 - Estabilidade da atividade da lacase produzida pelo fungo *P. ostreatus*, do 3º ao 30º dias de cultivo, correlacionados com as porcentagens de perda da atividade enzimática com o passar do tempo, pH 4,7 a 28ºC ± 2.

A atividade peroxidase no cultivo *de P. ostreatus* em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar com pH 4,7 teve inicio ao nono dia (1,60 UI L^{-1}), após o período de 2 horas houve uma perda de 89,38% de sua atividade enzimática inicial. Houve perda da atividade aos 6º, 9º, 12º, 15º, 18º, 21º e ao 30º dias de incubação, mostrando a instabilidade enzimática da peroxidase em velocidade diferente para cada período. Aos 30º dia de incubação e apresentou o pico de atividade (10,03 UI L^{-1}), e depois de 24 horas uma perda de 29,81% da atividade inicial como mostrado na Figura (16) e os demais resultados das perdas em porcentagens são apresentados em tabela nos anexos E.

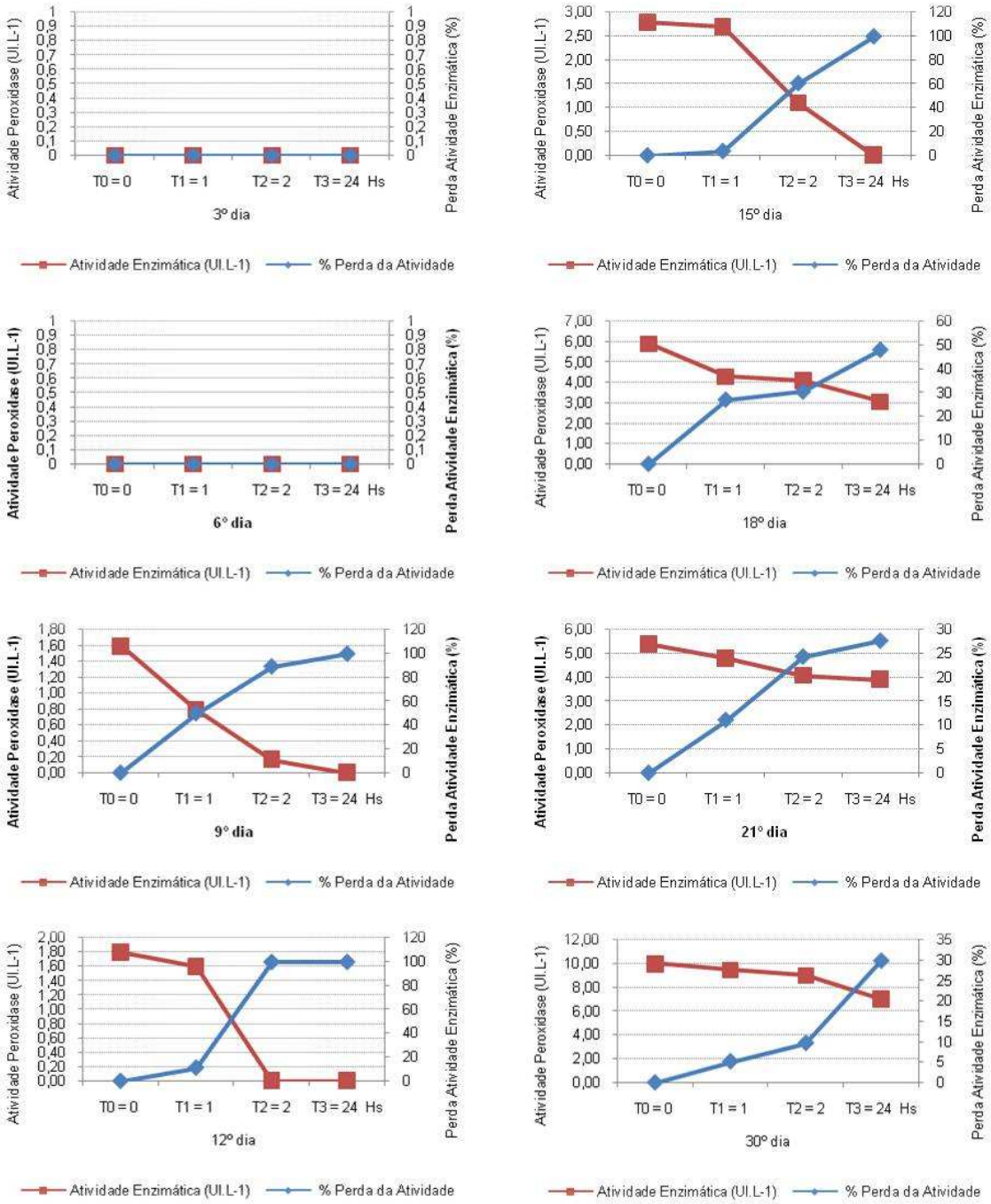

Figura 16 - Estabilidade da atividade da peroxidase produzida pelo fungo *P. ostreatus*, do 3º ao 30º dias de cultivo, correlacionados com as porcentagens de perda da atividade enzimática com o passar do tempo, pH 4,7 a 28ºC ± 2.

A atividade MnP no cultivo *de P. ostreatus* em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar com pH 4,7 teve inicio ao vigésimo primeiro dia (16,67 $UI.L^{-1}$), após o período de 1 hora houve uma perda de 100% de sua atividade enzimática inicial como mostrado na Figura (17) e os demais resultados das perdas em porcentagens são apresentados em tabela nos anexos F.

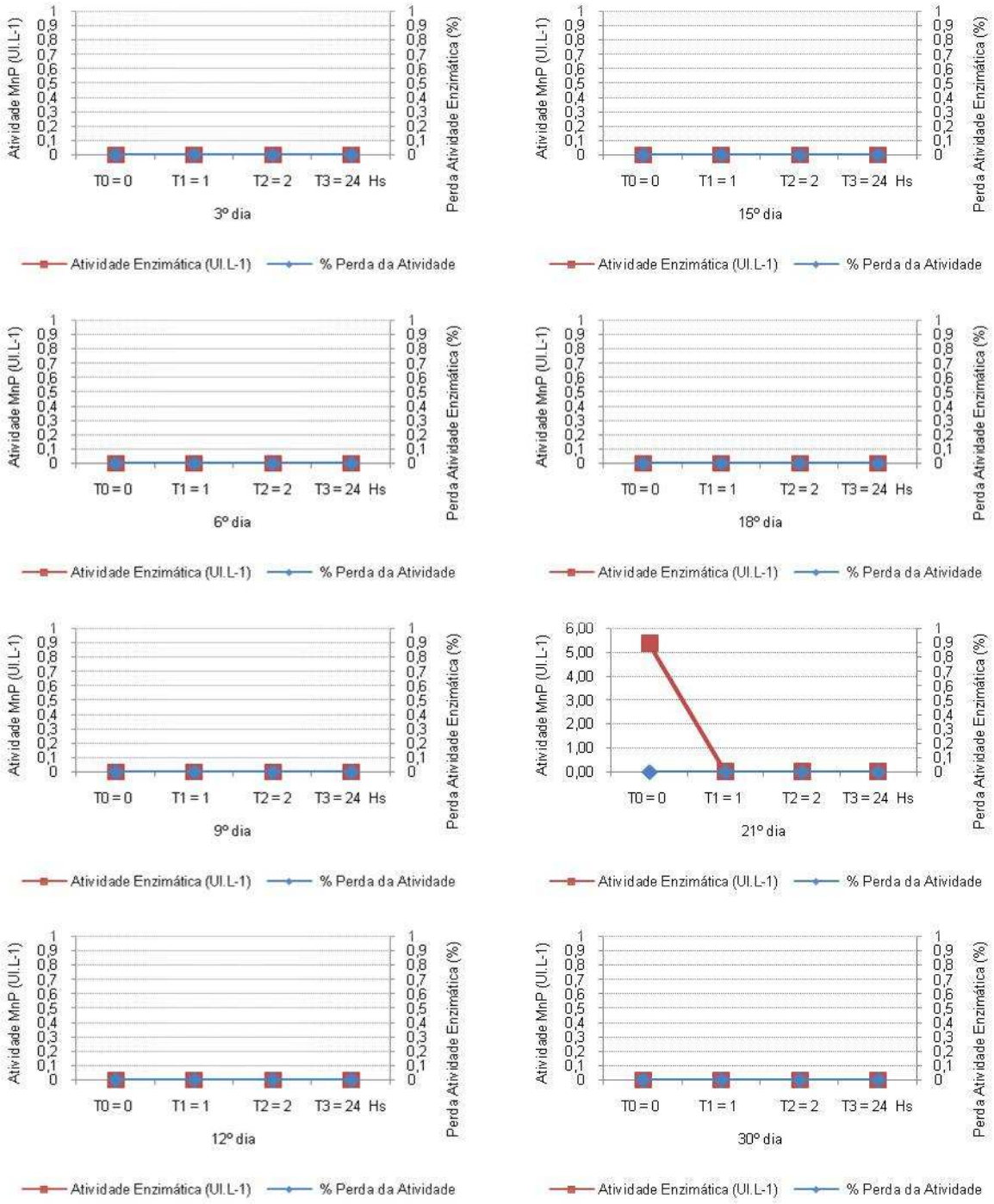

Figura 17 - Estabilidade da atividade da MnP produzida pelo fungo *P. ostreatus*, do 3º ao 30º dias de cultivo, correlacionados com as porcentagens de perda da atividade enzimática com o passar do tempo, pH 4,7 a 28ºC ± 2.

5.3.3 Estabilidade da Atividade Enzimática pelos fungos *P. albidus* CCB 068

A atividade lacase no cultivo de *P. albidus* CCB 068 em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar com pH 4,7 teve inicio ao terceiro dia (1,44 UI L^{-1}), após o período de 24 horas houve uma perda de 96,45% de sua atividade enzimática inicial. Houve perda da atividade aos 6º, 9º, 12º, 15º, 18º, 21º e ao 30º dias de incubação, mostrando a instabilidade enzimática da lacase em velocidade diferente para cada período. Aos 12º dia de incubação apresentou o pico de atividade de 46,26 UI L^{-1}, e depois de 24 horas uma perda de 82,99% da atividade inicial como mostrado na Figura (18) e os demais resultados das perdas em porcentagens são apresentados em tabela nos anexos G.

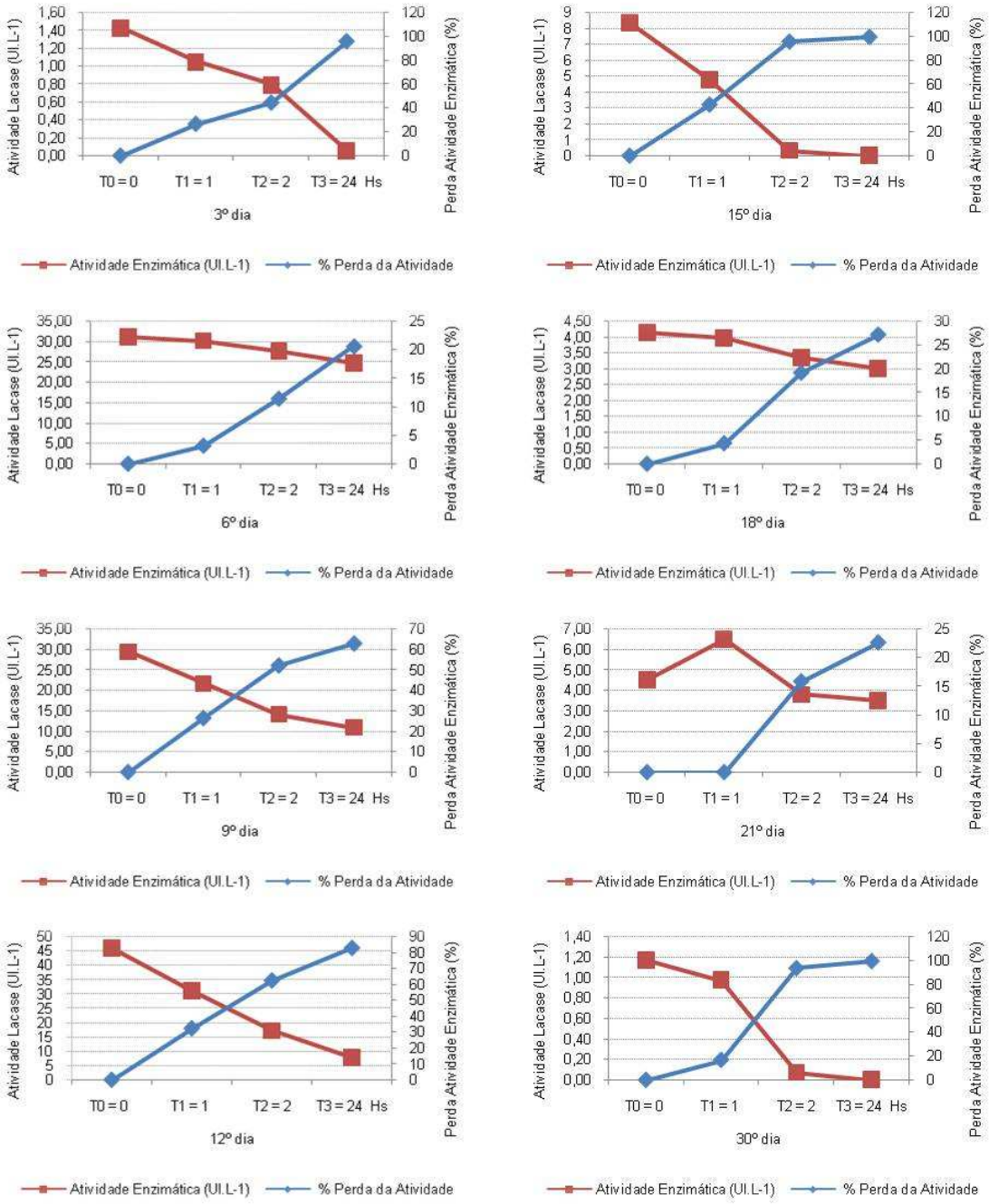

Figura 18 - Estabilidade da atividade da lacase produzida pelo fungo *P. albidus* CCB 068, do 3º ao 30º dias de cultivo, correlacionados com as porcentagens de perda da atividade enzimática com o passar do tempo, pH 4,7 a 28ºC ± 2.

A atividade peroxidase no cultivo *de P. albidus* CCB 068 em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar com pH 4,7 teve inicio ao sexto dia (18,84 UI L^{-1}), após o período de 24 horas houve uma perda de 36,31% de sua atividade enzimática inicial. Apresentou pico de atividade ao nono dia de incubação, (18,92 UI L^{-1}), e depois de 24 horas uma perda de 27,37% da atividade inicial como mostrado na Figura (19) e os demais resultados em porcentagens são apresentados em tabela nos anexos H.

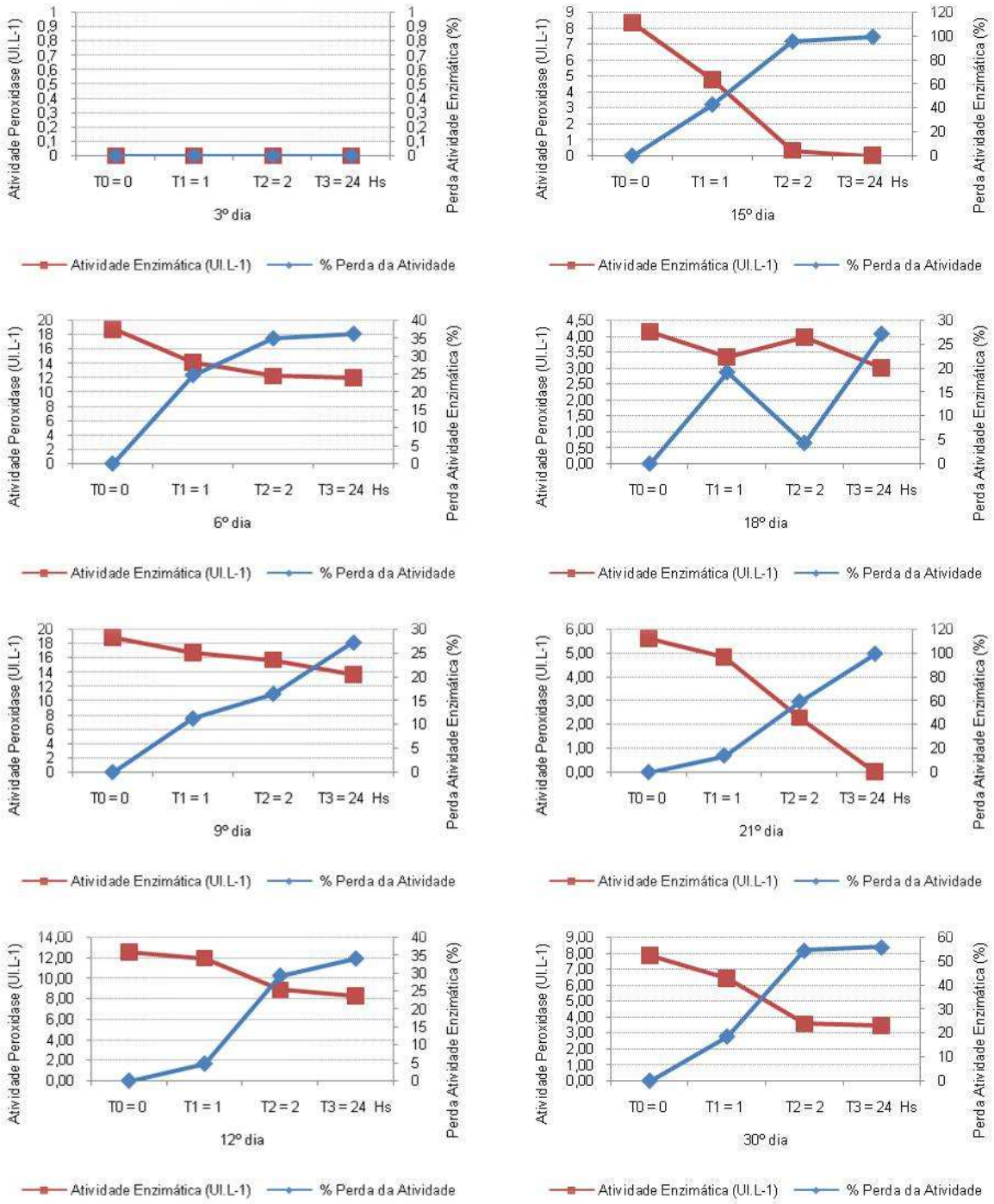

Figura 19 - Estabilidade da atividade da peroxidase produzida pelo fungo *P. albidus* CCB 068, do 3º ao 30º dias de cultivo, correlacionados com as porcentagens de perda da atividade enzimática com o passar do tempo, pH 4,7 a 28ºC ± 2.

A atividade MnP no cultivo *de P. albidus* CCB 068 em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar com pH 4,7 teve inicio ao terceiro dia (0,37 UI L^{-1}), após o período de 24 horas houve uma perda de 42,77% de sua atividade enzimática inicial e apresentou pico de atividade ao sexto dia de incubação, (1,12 UI L^{-1}), e depois de 1 hora uma perda de 100% da atividade inicial demonstrado na Figura (20) e demais resultados em porcentagens são apresentados em tabela nos anexos I.

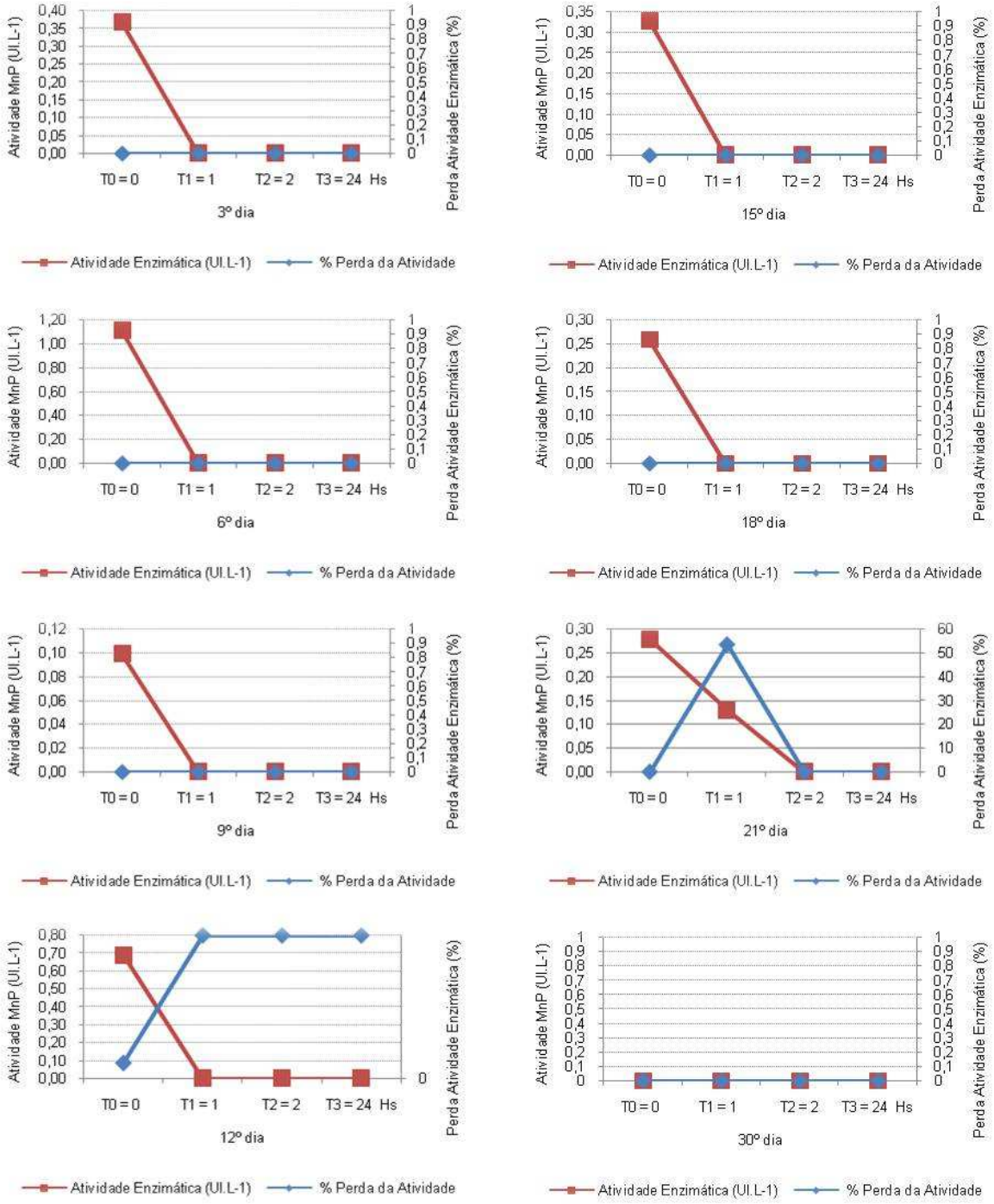

Figura 20 - Estabilidade da atividade da MnP produzida pelo fungo *P. albidus* CCB 068, do 3º ao 30º dias de cultivo, correlacionados com as porcentagens de perda da atividade enzimática com o passar do tempo, pH 4,7 a 28ºC ± 2.

As enzimas ligninoliticas podem ser inativadas por processos bióticos e/ou abióticos como adsorção a matriz orgânica do substrato fungico, elevada acidez ou alcalinidade, pela biodegradação por enzimas como as proteases, pelo excesso de matéria orgânica, entre outros (CHEFETZ et al., 1998; LI et al., 1999; PALMIERI et al., 2000; AHN et al., 2002; KEUM; LI, 2004). Durante a degradação do bagaço de cana-de-açúcar, a reação da enzima Lacase com compostos fenólicos podem gerar substancias húmicas, resultando na perda da atividade e estabilidade das enzimas ligninoliticas (GIANFREDA; 1994). Segundo Machado (1998), a temperatura e o tempo de incubação do organismo interferem na atividade enzimática. Elevadas temperaturas podem estimular a produção de enzimas, porem também podem provocar a desnaturação protéica, resultando na perda da atividade. Quando as condições do meio se tornam limitantes para o crescimento do fungo, outras enzimas são produzidas como peroxidases ou mecanismos com a finalidade de degradar compostos complexos (FERREIRA, 2009).

A vantagem da enzima lacase está em não requerer a adição de H_2O_2 como co-fator, e em muitos estudos tem sido correlacionada a sua atividade com a degradação de compostos tóxicos e com a descoloração. De acordo com a literatura existem diferenças quanto ao perfil enzimático variando com o tempo, organismo empregado, meio e condições de cultivo (RODRIGUEZ et al., 2003). A grande variação de atividade enzimática de lacase demonstra que um mesmo fungo, quando submetido a diferentes condições e fontes de nutrientes, pode apresentar uma produção enzimática variável além de estar diretamente relacionada com a quantidade de biomassa produzida como é o caso de espécies de *Pleurotus* (DAS et al., 1997). A lacase promove a desestabilidade das moléculas fenólicas por meio da retirada seqüencial de dois elétrons permitindo a ocorrência da hidrólise (KANDELBAUER; GUBITZ, 2001). Pode também promover a demetilação da molécula e posterior rompimento de anéis aromáticos e ligações entre carbonos em estruturas fenólicas (KUNZ; PERALTA-ZAMORA, 2002). A detecção de altos valores de atividade de lacase em meios compostos por vinhaça e a permanência desta atividade durante o crescimento do fungo permite valorizar a obtenção desta enzima em um meio não convencional para seu emprego de forma imobilizada (RODRIGUEZ et al., 2003; AGUIAR et al., 2010).

5.4 Descoloração da vinhaça

A cor na vinhaça é devido à presença de melanoidinas, caramelo, produtos de degradação alcalina e polifenóis formados durante o processo industrial de produção de álcool. As substancias responsáveis pela cor no processamento de cana-de-açúcar são normalmente materiais coloidais biopoliméricos carregados negativamente (GOKARN et al., 1998; GOKARN; MAYADEVI, 2000; MIGO et al., 1993). Todos estes compostos, com exceção do caramelo contendo grupos fenólicos em sua estrutura (SMITH; GREGORY, 1971) e os compostos fenólicos, contribuem para a formação destes colorantes (GROSS; COOMBS, 1976).

Segundo (MANE et al., 2006; MOHANA et al., 2009), métodos biológicos, físicos e químicos são usados para a remoção de cor da vinhaça, tais métodos envolve a descoloração por atividade enzimática microbiana provocando a quebra de melanoidina e floculação por substancias secretadas por micro-organismos. Os métodos mais modernos envolvem a oxidação destes compostos presentes no resíduo com ozônio e floculação usando coagulantes inorgânicos tais como sais de ferro ou alumínio, mas não são eficientes na remoção da cor do resíduo.

Entre o gênero *Pleurotus* existem duas vias de degradação de lignina e compostos semelhantes a ela: (a) ocorre desmetilação anterior à abertura do anel aromático, (b) abertura do anel aromático já em primeira instancia (RAJARATHANAN; BANO, 1989). *P. flabellatus* produz reação colorida com os compostos fenólicos e descoloração em corantes poliméricos, essa atividade está relacionada ao sistema de enzimas oxidativas, do tipo lacase. Entretanto, como foi mostrado no presente estudo, os basidiomicetos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus, P. albidus* CCB 068 apresentaram uma descoloração de aproximadamente 70% da vinhaça como pode ser visto nas Figuras 21 e 22.

Figura 21 - Descoloração de vinhaça após 30 dias de incubação com *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus*, *P. albidus* CCB 068, sob agitação a 25 °C ± 2, no escuro

Comparativamente, foi possível observar que o fungo *P. sajor-caju* CCB 020 apresentou maior potencial de descoloração da vinhaça (Figura 20) em relação ao *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068. Resultado semelhante ao verificado por Ferreira (2009). A Figura 22 mostra a descoloração da vinhaça com relação à absorbância lida a 680 nanômetros.

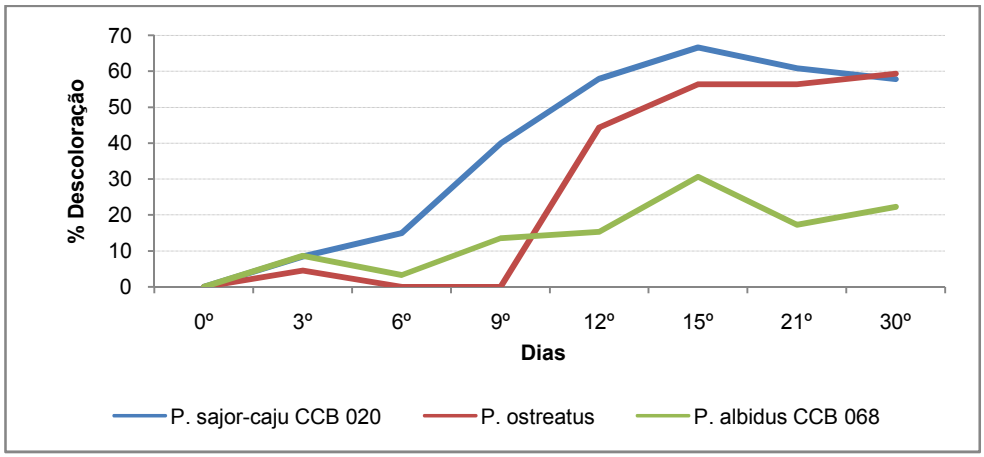

Figura 22 - Porcentagem de descoloração da vinhaça por fungos, durante 30 dias de incubação, com agitação, avaliada por absorbância a 680 nm.

A redução da cor e da turbidez da vinhaça ocorrem a partir do terceiro dia e foi máxima ao 12º dia correlacionando com os períodos de atividades das enzimas conforme foi demonstrado no item 5.1. Estes resultados estão de acordo com o observado em outros estudos (FERREIRA et al., 2009; KEREM et al., 1992;

RAJARATHNAM et al., 1992; AKMEDOVA, 1994; LANG et al., 1996). Segundo Kerem et al. (1992), a lacase pode atuar na destoxificação de compostos do substrato como oxidar grupos fenólicos, agindo como enzima inicial na clivagem de cadeias e anéis aromáticos das porções fenólicas da lignina.

5.5 Descoloração do índigo

Na analise da variância do experimento, ANOVA, todas as interações de (1ª, 2ª, 3ª e 4ª ordem) foram altamente significativas, o que determinou o desdobramento de todos os fatores dentro de cada combinação dos demais.

Os fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 crescidos em vinhaça e vinhaça com bagaço de cana-de-açúcar, demonstram capacidade de descoloração do corante índigo quando se utilizou o sobrenadante das culturas (solução enzimática), nas absorbâncias 580 e 680 nm.

A taxa de descoloração nos comprimentos de onda selecionados para a avaliação espectrofotométrica do sobrenadante das culturas (680 nm / 580 nm) permitiu a percepção de significativas mudanças espectrais. Esses dados revelam que a descoloração foi devida a adsorção e a degradação do corante. Estas observações são concordantes com as realizadas em trabalhos clássicos de descoloração como o de Glenn e Gold (1983) e Knapp et al. (1995).

Glenn e Gold (1983) em trabalhos sobre descoloração de vários corantes poliméricos por *Phanerochaete chrysosporium* (basidiomicetos), constataram que em meio liquido a descoloração é um processo do metabolismo secundário e que o sistema de degradação de lignina ou parte dele, é responsável pela descoloração. Como a adsorção ao micélio do fungo e as transformações por ele causadas, reduzem a quantidade do corante em solução, foram realizadas medidas de absorbância em dois comprimentos de onda. O decréscimo proporcional dos valores de absorbância indica a adsorção. Quando há grandes mudanças na razão de absorbância nos dois comprimentos de onda escolhidos, os corantes estão sendo degradados. A adição de inibidores da degradação de lignina também inibiu a descoloração. Afirmaram ainda que, a natureza polimérica dos corantes assegura que ao menos as etapas iniciais da descoloração são extracelulares.

Os resultados de Balan (1999) mostraram que boa remoção da coloração ocorreu no 1º dia: contudo as medidas feitas no 4º dia com a máxima descoloração apresentada por os fungos *Phellinus gilvus, Picnoporus sanguineus, e P. sajor*-caju são de extrema praticidade, por ser este o tempo de retenção do efluente têxtil nas estações de tratamento biológico convencionais.

Young e Yu (1997) relatam a dificuldade em remover o corante adsorvido ao micélio. Desse, modo afirma que a descoloração é devida a adsorção e degradação. No 9º dia *Trametes versicolor* removeu 92,8% do índigo carmine e *P. chrysosporium,* apenas 29,8% em meio liquido.

No presente estudo a descoloração foi estudada em três diferentes concentrações de corante índigo e em dois tratamentos, um com os fungos cultivados na vinhaça e outro cultivado na vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar, portanto uma solução enzimática produzida em meio liquido e outra solução extraída do sólido. Foi possível observar que nas diferentes concentrações do corante (400, 600 e 800µL), os fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 em relação à porcentagem de descoloração tiveram melhor aproveitamento no tratamento bagaço umedecido com vinhaça, embora a vinhaça sobressaiu-se entre o 15º e 18º dias, demonstrados nas Tabelas 6,7 e 8.

Tabela 6 – Médias dos tratamentos com o fungo *P. sajor-caju* CCB 020, em relação à porcentagem de descoloração nos comprimentos de onda 580 e 680nm.

580 nm	**Tempos**							
400µL Corante / 600µL Enzimas	**3º dia**	**6º dia**	**9º dia**	**12º dia**	**15º dia**	**18º dia**	**21º dia**	**30º dia**
Bagaço umedecido com vinhaça	19,34 a A	62,31 a A	83,55 a A	82,09 a A	68,84 b B	72,42 b B	70,20 a A	72,88 a A
Vinhaça	0,00 b B	9,42 b B	44,59 b B	52,25 b B	83,29 a A	39,69 a A	63,09 b B	0,00 b B
600µL Corante / 400µL Enzimas								
Bagaço umedecido com vinhaça	14,26 a A	54,64 a A	81,33 a A	82,91 a A	54,48 b B	31,77 b B	48,76 b B	63,95 a A
Vinhaça	0,00 b B	10,40 b B	33,74 b B	37,84 b B	70,46 a A	47,29 a A	74,76 a A	0,00 b B
800µL Corante / 200µL Enzimas								
Bagaço umedecido com vinhaça	15,81 a A	41,93 a A	55,31 a A	77,56 a A	35,69 b B	26,71 a A	32,69 a A	38,09 a A
Vinhaça	0,00 b B	13,45 b B	23,28 b B	23,65 b B	40,15 a A	24,49 b B	29,37 b B	0,00 b B

680 nm	**Tempos**							
400µL Corante / 600µL Enzimas	**3º dia**	**6º dia**	**9º dia**	**12º dia**	**15º dia**	**18º dia**	**21º dia**	**30º dia**
Bagaço umedecido com vinhaça	0,00 a A	47,23 a A	74,37 a A	68,09 a A	49,38 b B	0,00 b B	65,35 a A	55,40 a A
Vinhaça	0,00 a A	0,00 b B	46,50 b B	55,14 b B	74,50 a A	87,51 a A	49,29 b B	0,00 b B
600µL Corante / 400µL Enzimas								
Bagaço umedecido com vinhaça	0,00 a A	41,89 a A	71,25 a A	72,79 a A	41,72 b B	0,00 b B	38,69 b B	43,51 a A
Vinhaça	0,00 a A	0,00 b B	35,59 b B	40,62 b B	50,72 a A	66,20 a A	50,69 a A	0,00 b B
800µL Corante / 200µL Enzimas								
Bagaço umedecido com vinhaça	0,00 a A	35,51 a A	39,57 a A	67,42 a A	29,68 a A	5,98 b B	31,13 a A	29,84 a A
Vinhaça	0,00 a A	0,00 b B	29,61 b B	32,29 b B	33,15 b B	39,84 a A	3,72 b B	0,00 b B

Letras em comum na vertical implica que não existe diferença estatisticamente significativa pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey ao nível de significâncias indicada (5% ou 1%).

Tabela 7 – Médias dos tratamentos com o fungo *P. ostreatus*, em relação à porcentagem de descoloração nos comprimentos de onda 580 e 680nm.

580 nm	Tempos							
400µL Corante / 600µL Enzimas	**3º dia**	**6º dia**	**9º dia**	**12º dia**	**15º dia**	**18º dia**	**21º dia**	**30º dia**
Bagaço umedecido com vinhaça	39,30 a A	46,08 a A	40,17 a A	46,18 a A	42,52 b B	24,52 b B	43,61 a A	41,46 a A
Vinhaça	0,00 b B	0,00 b B	39,82 b B	0,00 b B	66,06 a A	51,38 a A	0,00 b B	0,00 b B
600µL Corante / 400µL Enzimas								
Bagaço umedecido com vinhaça	29,98 a A	34,63 a A	31,35 a A	34,14 a A	31,41 b B	19,34 b B	32,83 a A	33,70 a A
Vinhaça	0,00 b B	0,00 b B	29,94 b B	1,06 b B	51,42 a A	36,15 a A	0,00 b B	0,00 b B
800µL Corante / 200µL Enzimas								
Bagaço umedecido com vinhaça	20,09 a A	22,05 a A	21,26 a A	21,06 a A	17,80 b B	12,42 b B	18,32 a A	23,01 a A
Vinhaça	0,00 b B	0,00 b B	20,59 b B	6,63 b B	33,48 a A	21,03 a A	0,00 b B	0,00 b B

680 nm	Tempos							
400µL Corante / 600µL Enzimas	**3º dia**	**6º dia**	**9º dia**	**12º dia**	**15º dia**	**18º dia**	**21º dia**	**30º dia**
Bagaço umedecido com vinhaça	0,00 a A	19,73 a A	21,54 a A	27,60 a A	28,58 b B	0,00 b B	25,92 a A	22,30 a A
Vinhaça	0,00 a A	0,00 b B	0,00 b B	0,00 b B	59,16 a A	59,76 a A	0,00 b B	0,00 b B
600µL Corante / 400µL Enzimas								
Bagaço umedecido com vinhaça	1,93 a A	18,69 a A	5,40 b B	21,39 a A	23,29 b B	0,00 b B	23,00 a A	21,50 a A
Vinhaça	0,00 b B	0,00 b B	15,62 a A	0,00 b B	42,06 a A	44,91 a A	0,00 b B	0,00 b B
800µL Corante / 200µL Enzimas								
Bagaço umedecido com vinhaça	8,79 a A	16,58 a A	8,16 b B	16,05 a A	15,21 b B	0,00 b B	15,56 a A	21,98 b B
Vinhaça	0,00 b B	0,00 b B	14,55 a A	0,00 b B	30,22 a A	35,62 a A	0,00 b B	0,00 a A

Letras em comum na vertical implica que não existe diferença estatisticamente significativa pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey ao nível de significâncias indicada (5% ou 1%).

Tabela 8 – Médias dos tratamentos com o fungo *P. albidus*, em relação à porcentagem de descoloração nos comprimentos de onda 580 e 680nm.

580 nm	Tempos							
400µL Corante / 600µL Enzimas	**3º dia**	**6º dia**	**9º dia**	**12º dia**	**15º dia**	**18º dia**	**21º dia**	**30º dia**
Bagaço umedecido com vinhaça	40,54 a A	56,22 a A	57,41 a A	29,59 a A	27,47 b B	0,00 b B	37,12 a A	22,11 a A
Vinhaça	0,00 b B	0,00 b B	1,57 b B	15,34 b B	36,26 a A	33,96 a A	17,29 b B	0,00 b B
600µL Corante / 400µL Enzimas								
Bagaço umedecido com vinhaça	30,57 a A	41,70 a A	42,82 a A	24,98 a A	21,37 b B	0,00 b B	29,10 a A	17,48 a A
Vinhaça	0,00 b B	0,97 b B	4,28 b B	12,74 b B	25,71 a A	24,02 a A	15,63 b B	0,00 b B
800µL Corante / 200µL Enzimas								
Bagaço umedecido com vinhaça	19,60 a A	23,18 a A	22,94 a A	14,32 a A	13,76 b B	0,00 b B	17,51 a A	11,66 a A
Vinhaça	0,00 b B	6,64 b B	5,77 b B	9,19 b B	16,67 a A	15,25 a A	13,40 b B	0,00 b B

680 nm	Tempos							
400µL Corante / 600µL Enzimas	**3º dia**	**6º dia**	**9º dia**	**12º dia**	**15º dia**	**18º dia**	**21º dia**	**30º dia**
Bagaço umedecido com vinhaça	1,69 a A	49,29 a A	48,78 a A	0,00 a A	0,00 b B	0,00 b B	10,74 a A	60,93 a A
Vinhaça	0,00 b B	0,00 b B	0,00 b B	0,00 a A	48,50 a A	40,41 a A	0,00 b B	0,00 b B
600µL Corante / 400µL Enzimas								
Bagaço umedecido com vinhaça	6,92 a A	40,46 a A	39,38 a A	0,00 a A	0,00 b B	0,00 b B	14,96 a A	63,71 a A
Vinhaça	0,00 b B	0,00 b B	0,00 b B	0,00 a A	24,74 a A	31,79 a A	2,99 b B	0,00 b B
800µL Corante / 200µL Enzimas								
Bagaço umedecido com vinhaça	9,98 a A	25,52 a A	22,29 a A	2,59 a	5,19 b B	0,00 b B	13,21 a A	67,74 a A
Vinhaça	0,00 b B	0,00 b B	2,60 b B	2,60 a	18,51 a A	21,96 a A	8,07 b B	0,00 b B

Letras em comum na vertical implica que não existe diferença estatisticamente significativa pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey ao nível de significâncias indicada (5% ou 1%).

A Figura 23 apresenta degradação do corante índigo pela adição da solução enzimática, em meio liquido, oriunda do cultivo de *P. sajor-caju* CCB 020 em vinhaça, que teve inicio a partir do 6º dia de cultivo, apresentou maior porcentagem de descoloração no 15º e 18º dias, os quais estão relacionados com as soluções enzimáticas dos fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068, conforme é demonstrado nas Tabelas 9 e 10.

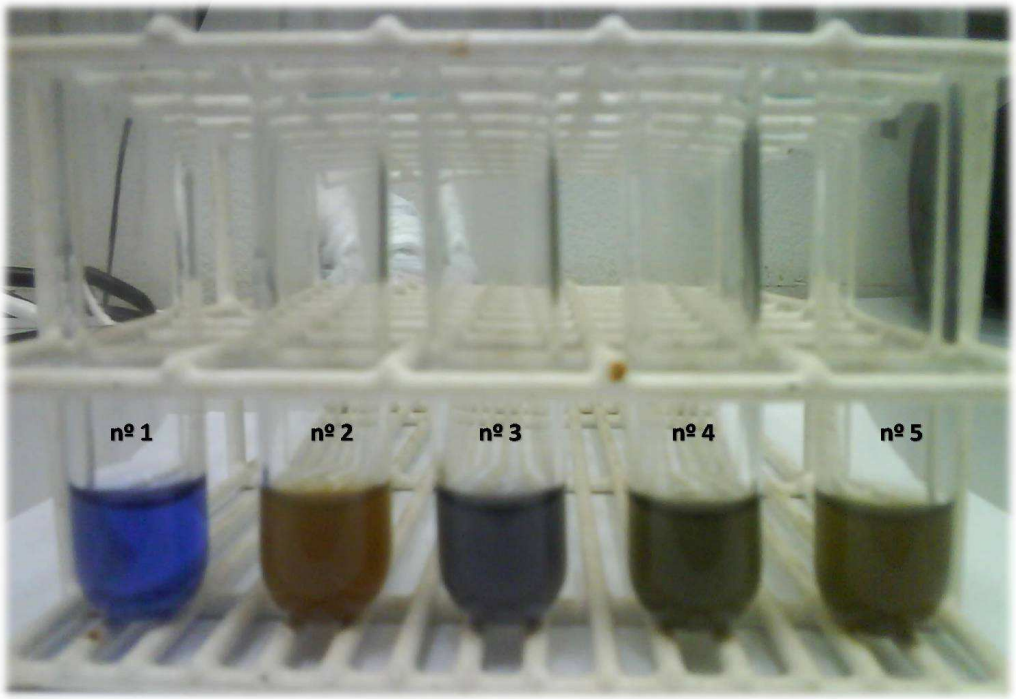

Figura 23 - nº 1 Corante Índigo; nº 2 Vinhaça; nº 3 Concentração 800μL de Corante por 200 μL Solução Enzimática; nº 4 Concentração 600 μL de Corante por 400μL Solução Enzimática; nº 5 Concentração 400 μL de Corante por 600 μL Solução Enzimática

No tratamento com bagaço de cana-de-açúcar umedecido com vinhaça a porcentagem de descoloração do corante índigo teve inicio a partir do 3º dia de cultivo de *P. sajor-caju* CCB 020 e apresentou maior porcentagem de descoloração no 9º e 12º dias, resultado em aproximadamente 70% na descoloração do índigo. Entretanto o mesmo não foi observado, na eficiência de descoloração pelos fungos *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 tendo assim baixa porcentagem de descoloração nas diversas concentrações e tempo de cultivo dos fungos, como mostrado nas Figuras 24 e Tabelas 9 e 10.

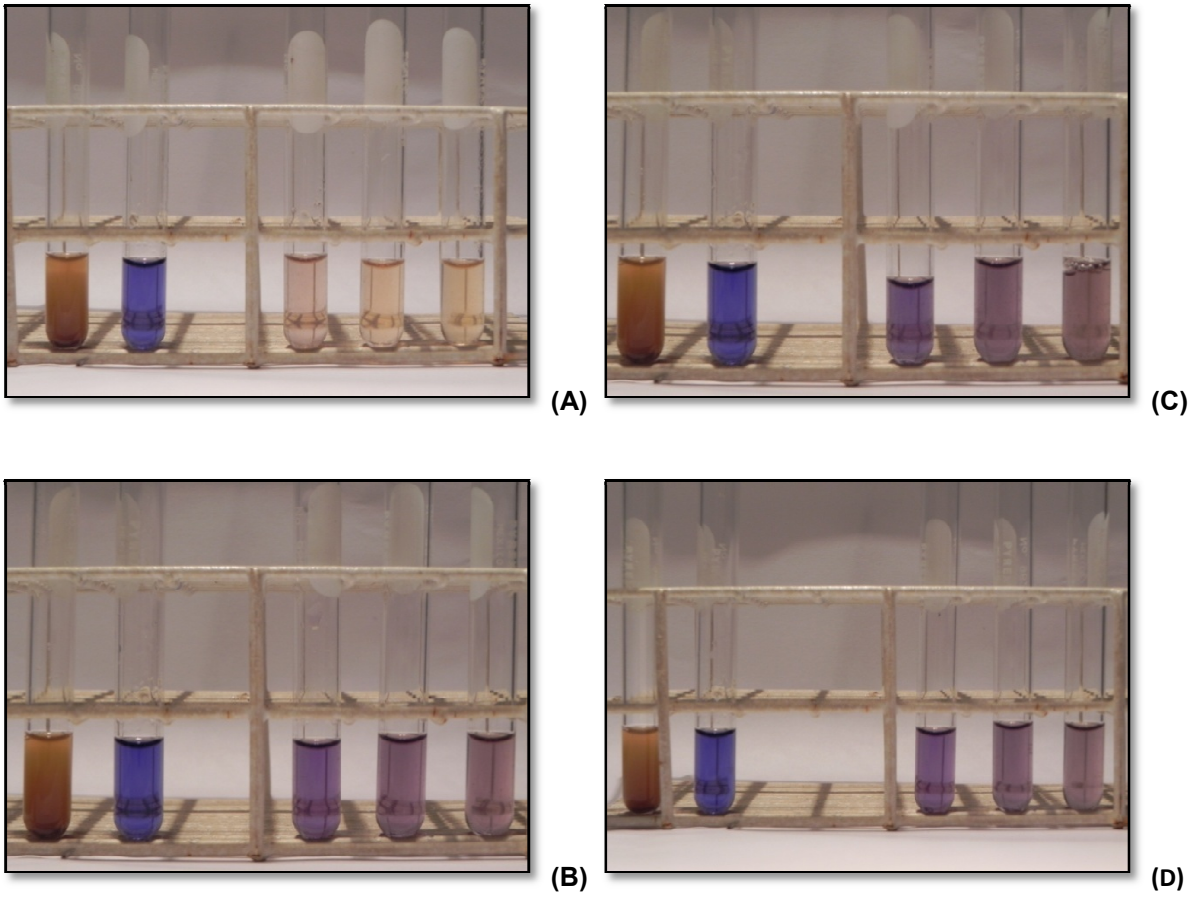

Figura 24 - Soluções Enzimática (UI L^{-1}), produzidas pelos fungos (A) *P. sajor caju* CCB 020, (B) *P. ostreatus*, (C) *P. albidus* CCB 068, crescidos em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar e (D) controle, por 12º dias, a 28±2ºC

Tabela 9 - Porcentagem de descoloração do corante índigo promovida pelas soluções enzimáticas dos fungos *P.albidus* CCB 068, *P. ostreatus* e *P. sajor-caju* CCB 020, e cultivados em vinhaça e vinhaça com bagaço de cana-de-açúcar, no comprimento de onda 580 nm.

Fungos	Tratamentos	Corante Índigo (µL)	Tempo (dias) 3º		6º		9º		12º		15º		18º		21º		30º	
			Descolorações %															
P. albidus CCB 068	Vinhaça	400	0,00 f	± 0,00	0,00 f	± 0,00	1,57 e	± 0,01	15,34 d	± 0,00	36,27 a	± 0,01	33,96 b	± 0,07	17,29 c	± 0,02	0,00 f	± 0,00
		600	0,00 e	± 0,00	0,97 e	± 0,06	4,28 d	± 0,02	12,75 c	± 0,01	25,72 a	± 0,01	24,03 a	± 0,06	15,63 b	± 0,04	0,00 e	± 0,00
		800	0,00 g	± 0,00	6,64 e	± 0,03	5,77 f	± 0,02	9,20 d	± 0,03	16,68 a	± 0,01	15,26 b	± 0,65	13,40 c	± 0,01	0,00 g	± 0,00
	Vinhaça + Bagaço	400	40,54 c	± 0,01	56,23 b	± 0,02	57,42 a	± 0,01	29,60 e	± 0,01	27,47 f	± 0,01	0,00 h	± 0,00	37,12 d	± 0,03	22,12 g	± 0,03
		600	30,58 b	± 0,01	41,70 a	± 0,01	42,82 a	± 0,01	24,98 c	± 0,01	21,38 d	± 0,01	0,00 f	± 0,00	29,10 b	± 0,01	17,49 e	± 0,02
		800	19,61 b	± 0,01	23,19 a	± 0,01	22,94 a	± 0,05	14,33 d	± 0,02	13,77 e	± 0,01	0,00 g	± 0,00	17,51 c	± 0,02	11,66 f	± 0,09
P. ostreatus	Vinhaça	400	0,00 d	± 0,00	0,00 d	± 0,00	39,83 c	± 0,01	0,00 d	± 0,00	66,06 a	± 0,01	51,38 b	± 0,00	0,00 d	± 0,00	0,00 d	± 0,00
		600	0,00 d	± 0,00	0,00 d	± 0,00	29,94 c	± 0,00	1,06 d	± 0,01	51,43 a	± 0,01	36,15 b	± 0,01	0,00 d	± 0,00	0,00 d	± 0,00
		800	0,00 e	± 0,00	0,00 e	± 0,00	20,59 c	± 0,01	6,63 d	± 0,01	33,48 a	± 0,01	21,03 b	± 0,03	0,00 e	± 0,00	0,00 e	± 0,00
	Vinhaça + Bagaço	400	39,31 g	± 0,01	46,09 b	± 0,03	40,17 f	± 0,01	46,18 a	± 0,01	42,52 d	± 0,01	24,53 h	± 0,02	43,61 c	± 0,02	41,47 e	± 0,01
		600	29,99 c	± 0,03	34,63 a	± 0,01	31,35 bc	± 0,00	34,15 a	± 0,01	31,41 bc	± 0,01	19,34 d	± 0,01	32,83 ab	± 0,03	33,71 a	± 0,01
		800	20,10 d	± 0,10	22,05 b	± 0,04	21,26 c	± 0,00	21,06 c	± 0,00	17,80 f	± 0,02	12,43 g	± 0,01	18,33 e	± 0,02	23,02 a	± 0,02
P. sajor-caju CCB 020	Vinhaça	400	0,00 g	± 0,00	9,42 f	± 0,02	44,60 e	± 0,01	52,26 d	± 0,07	83,29 a	± 0,03	72,42 b	± 0,03	63,10 c	± 0,03	0,00 g	± 0,00
		600	0,00 g	± 0,00	10,40 f	± 0,01	33,74 e	± 0,03	37,85 d	± 0,02	70,46 b	± 0,02	47,30 c	± 0,01	74,31 a	± 0,01	0,00 g	± 0,00
		800	0,00 g	± 0,00	13,45 f	± 0,02	23,29 e	± 0,01	23,65 d	± 0,01	40,15 a	± 0,03	24,50 c	± 0,02	29,37 b	± 0,01	0,00 g	± 0,00
	Vinhaça + Bagaço	400	19,34 h	± 0,02	62,32 f	± 0,03	83,56 a	± 0,02	82,10 b	± 0,01	68,85 e	± 0,02	39,70 g	± 0,01	70,20 d	± 0,01	72,88 c	± 0,03
		600	14,27 f	± 5,76	54,65 c	± 0,02	81,33 a	± 0,02	82,92 a	± 0,01	54,48 c	± 0,03	31,78 e	± 0,12	48,77 d	± 0,05	63,95 b	± 0,02
		800	15,81 h	± 0,02	41,93 c	± 0,03	55,31 b	± 0,02	77,56 a	± 0,01	35,69 e	± 0,02	26,72 g	± 0,05	32,69 f	± 0,02	38,10 d	± 0,01
Controle	Vinhaça	400	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00
		600	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00
		800	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00
	Vinhaça + Bagaço	400	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00
		600	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00
		800	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00

Letras em comum na horizontal implicam que não existe diferença estatisticamente significativa pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey ao nível de significâncias indicada (5% ou 1%)

Tabela 10 - Porcentagem de descoloração do corante índigo promovida pelas soluções enzimáticas dos fungos *P.albidus* CCB 068, *P. ostreatus e P. sajor-caju* CCB 020 e cultivados em vinhaça e vinhaça com bagaço de cana-de-açúcar, no comprimento de onda 680 nm

Fungos	Tratamentos	Corante Índigo (µL)	Tempo (dias) 3º		6º		9º		12º		15º		18º		21º		30º	
			Descolorações %															
P. albidus CCB 068	Vinhaça	400	0,00 c	± 0,00	0,00 c	± 0,00	0,00 c	± 0,00	0,00 c	± 0,00	48,51 a	± 0,01	40,41 b	± 0,02	0,00 c	± 0,00	0,00 c	± 0,00
		600	0,00 d	± 0,00	0,00 d	± 0,00	0,00 d	± 0,00	0,00 d	± 0,00	24,74 b	± 0,01	31,80 a	± 0,01	3,00 c	± 0,03	0,00 d	± 0,00
		800	0,00 e	± 0,00	0,00 e	± 0,00	2,60 d	± 0,02	2,61 d	± 0,01	18,52 b	± 0,03	21,96 a	± 0,06	8,07 c	± 0,06	0,00 e	± 0,00
	Vinhaça + Bagaço	400	1,70 e	± 0,01	49,30 b	± 0,02	48,79 c	± 0,04	0,00 f	± 0,00	0,00 f	± 0,00	0,00 f	± 0,00	10,74 d	± 0,25	60,94 a	± 0,13
		600	6,93 e	± 0,14	40,46 b	± 0,02	39,39 c	± 0,01	0,00 f	± 0,00	0,00 f	± 0,00	0,00 f	± 0,00	15,00 d	± 0,12	63,71 a	± 0,02
		800	9,99 e	± 0,04	25,53 b	± 0,08	22,30 c	± 0,01	2,59 g	± 0,02	5,20 f	± 0,01	0,00 h	± 0,00	13,21 d	± 0,02	67,75 a	± 0,26
P. ostreatus	Vinhaça	400	0,00 d	± 0,00	0,00 d	± 0,00	21,55 c	± 0,04	0,00 d	± 0,00	59,16 b	± 0,07	59,76 a	± 0,06	0,00 d	± 0,00	0,00 d	± 0,00
		600	0,00 d	± 0,00	0,00 d	± 0,00	15,62 c	± 0,07	0,00 d	± 0,00	42,06 b	± 0,05	44,92 a	± 0,10	0,00 d	± 0,00	0,00 d	± 0,00
		800	0,00 d	± 0,00	0,00 d	± 0,00	14,55 c	± 0,05	0,00 d	± 0,00	30,23 b	± 0,03	35,62 a	± 0,02	0,00 d	± 0,00	0,00 d	± 0,00
	Vinhaça + Bagaço	400	0,00 f	± 0,00	19,74 e	± 0,06	0,00 f	± 0,00	27,61 b	± 0,10	28,59 a	± 0,05	0,00 f	± 0,00	25,92 c	± 0,07	22,30 d	± 0,02
		600	1,93 g	± 0,09	18,70 e	± 0,01	5,41 f	± 0,01	21,40 d	± 0,02	23,29 a	± 0,10	0,00 h	± 0,00	23,00 b	± 0,01	21,50 c	± 0,03
		800	8,80 e	± 0,27	16,59 b	± 1,81	8,17 e	± 0,04	16,05 bc	± 0,05	15,22 d	± 0,06	0,00 f	± 0,02	15,56 cd	± 0,42	21,99 a	± 0,11
P. sajor-caju CCB 020	Vinhaça	400	0,00 f	± 0,00	0,00 f	± 0,00	46,50 e	± 0,01	55,15 d	± 0,13	74,50 b	± 0,02	87,51 a	± 0,44	65,36 c	± 0,02	0,00 f	± 0,00
		600	0,00 e	± 0,00	0,00 e	± 0,00	35,60 d	± 0,02	40,62 c	± 0,01	50,73 b	± 0,04	66,21 a	± 0,02	50,70 b	± 0,01	0,00 e	± 0,00
		800	0,00 f	± 0,00	0,00 f	± 0,00	29,62 d	± 0,00	32,29 c	± 0,00	33,16 b	± 0,00	39,84 a	± 0,00	3,72 e	± 0,07	0,00 f	± 0,00
	Vinhaça + Bagaço	400	0,00 f	± 0,00	47,23 e	± 0,00	74,37 a	± 0,01	68,09 b	± 0,02	49,39 d	± 0,04	0,00 f	± 0,00	49,30 d	± 0,01	55,40 c	± 0,02
		600	0,00 g	± 0,00	41,90 d	± 0,01	71,25 b	± 0,00	72,80 a	± 0,02	41,72 e	± 0,02	0,00 g	± 0,00	38,70 f	± 0,03	43,52 c	± 0,03
		800	0,00 g	± 0,00	35,51 c	± 0,01	39,57 b	± 0,01	67,43 a	± 0,03	29,69 e	± 0,11	5,98 f	± 0,06	31,14 d	± 0,03	29,84 e	± 0,02
Controle	Vinhaça	400	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00
		600	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00
		800	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00
	Vinhaça + Bagaço	400	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00
		600	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00
		800	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00	0,00 a	± 0,00

Letras em comum na horizontal implicam que não existe diferença estatisticamente significativa pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey ao nível de significâncias indicada (5% ou 1%)

6. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que a descoloração da vinhaça foi diretamente relacionada a atividades enzimáticas. Sendo ainda a produção das atividades enzimáticas responsáveis pela descoloração em ± 70% foram concomitantemente com os aumentos das biomassas dos fungos.

A vinhaça mostrou–se adequada para produção de enzimas de interesse biotecnológico ambiental, viabilizando a produção a partir de um resíduo de fácil acesso, baixo custo e esterilizado pelo processo de formação.

O uso sistema vinhaça e *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus e P. albidus* CCB 068 podem ser aplicado em processos de remoção de cor e na degradação de compostos como da vinhaça, ocorrendo destoxificação e melhora na sua qualidade podendo ser indicada como água de reuso.

A ação de enzimas lacase, peroxidase e MnP produzidas pelo sistema vinhaça e bagaço umedecido com vinhaça, inoculados *P. sajor-caju* CCB 020 demonstrou ser eficiente na descoloração do Corante Índigo. *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 tiveram uma eficiência abaixo das expectativas.

Sendo um fungo de espécie comestível, a biomassa pode ser aproveitada em manufaturas de rações ou alimentação ou extração de produtos de interesse comercial.

REFERÊNCIAS

ADLER, P.R.; ARORA, R.; EL-GHAOUTH, A.; GLENN, D.M.; SOLAR, J.M. Bioremediation of phenolic compound from water with plant root surface peroxidases. **Journal Environmental Quality**, Madison, v. 23, p. 1113-1117, 1994.

AGUIAR FILHO, J. M. M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. 2008. 79 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

AGUIAR FILHO, J.M.M.; FERREIRA, L.F.R.; MONTEIRO, R.T.R. Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. **Brazilian Archieves of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, p. 1245-1254, 2010.

AGUIAR, A. L. C; SCHÖNBERGER, H. (a) Aspectos do tratamento de efluentes líquidos têxteis no Brasil e na Alemanha – uma comparação. *Revista Têxtil*, São Paulo: R. da Silva Haydu e Cia Ltda, (1), 94-104, 1995

AGUIAR, A. L. C; SCHÖNBERGER, H. (b) Aspectos do tratamento de efluentes líquidos têxteis no Brasil e na Alemanha – uma comparação. *Revista Têxtil*, São Paulo: R. da Silva Haydu e Cia Ltda, (3), 100-114, 1995.

AHN, M.Y.; DEC, J.; KIM, J.K.; BOLLAG, J.M. Treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 31, p. 1509-1515, 2002.

AKHMEDOVA, Z. R. Cellulolytic, xilanolytic, and lignolytic enzymes of the fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 30, n. 1, p. 32-37, 1994.

ALCALDE, M.; FERRER, M.; PLOU, F.J.; BALLESTEROS, A. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to móvel Green processes. **TRENDS in Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 281-287, 2006.

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 16.ed., Washington: American Public Health association, 1995.

ASPLAND, J. R. Chapter 2/Part 2: Direct dye structure. **Textile Chemist and Colorist**, v. 23, n. 12, p. 30-32, Dec. 1991.

ASPLAND, J. R. Chapter 3/Part 2: practical Application of vat dyes. **Textile Chemist and Colorist**, v. 24, n. 2, p. 27-31, Febr. 1992 b.

ASPLAND, J. R. Chapter 3: Vat dyes and their application. **Textile Chemist and Colorist**, v. 24, n. 1, p. 22-24, Jan. 1992 a.

AZEVEDO, J.L. Genética de fungos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. cap. 5, p. 173-214.

BALAN, D. S. L. Biodegradabilidade e toxicidade de efluentes têxteis. **Química Têxtil**, São Paulo, v. 54, p. 26-31, 1999

BALAN, D. S. L; MONTEIRO, R. T. R. Decolorization of textile indigo dye by lignolytic fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 141-145, 2001.

BALAN, D.S.L.; MONTEIRO, R.T.R. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. **Journal of Biotechnology**, Amsterdan, 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.

BAO, W., FUKUSHIMA, Y. & JENSEN, K.A.. Oxidative degradation of non phenolic lignin durin lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. **Federation of European Biochemical Societies**. p. 297-300, 1994.

BITTENCOURT, C. N. V. **Cultivo axênico de shiitake (*Lentinula edodoes*) em resíduos do processamento da palmeira-real-da-austrália (*Archontophoeniz alexandrae*)**. 2007. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2007.

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.

BOGAN, B. W.; LAMAR, R. T. One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysospori*um. **Applied and Environmental Microbiology**. v.61, p.2631–5, 1995.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. C. **Enzimas em Biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BORTOLAZZO, N. G. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. 2011. 76 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

BRADFORD, M.M. A raspid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, New York, v. 72, p. 248-259, 1976.

BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E. W. A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**, São Paulo; CETESB, 1993. 764 p.

BROWN, M.A.; ZHAO, Z.; MAUK, A. G. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. **Inorganica Chimica Acta**, New York, v. 331, p. 232-238, 2002.

BUSWELL, J.A.; CAI, Y.; CHANG, S. T. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and lactase production by Lentinula (Lentinus) edodes. **FEMS** Microbiology Letters. V. 128, p. 81-88, 1995.

CARDOSO, M.G. Produção de aguardente de qualidade. Lavras: UFLA. 2006. 263 p.

CETESB. **Norma Técnica Cetesb** – P4.231/05. São Paulo, jan. 2005.

CHEFETZ, B.; CHEN, Y.; HADAR, T. Purification and Characterization of Laccase from Chaetomium thermophilium and Its Role in Humification. Applied and Environmental Microbiology, v. 64, n. 9, p. 3175–3179, 1998.

CHERUBIN, N. Palha da cana começa a ganhar seu espaço na co geração. **IDEA News**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 140, p. 26-33, 2012.

COELHO, G. D. **Purificação parcial do sistema enzimático produzido por *Psilocybe castanella* CCB444 durante crescimento em solo**. 2007. Monografia (Tese) 2007.

COOPER, P. Removing color from dyehouse waste Waters – a critical review of technology available. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, MPG Information Divísion, 109 (March), 97-100, 1993.

COWLING, E.B. **Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by white-rot and brown-rot fungi**. Washington: USDA, 1961. 79 p. (Technical bulletin, 1258).

DAS, N.; SENGUPTA, S.; MUKHERJEE, M. Importance of laccase in vegetative growth of Pleurotus florida. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 4120-4122, 1997.

DELLAMATRICE, P. M. **Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Americana, SP**. 2005. 137p. Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Toxicidade de resíduos têxteis tratados por microrganismos. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, Rio Grande, v. 1, n. 1, p. 63-66, 2006.

DEY, S.; MAITI, T.K.; BHATTACHARYYA, B.C. Production of some extracellular enzymes by a lignin peroxidase-producing brown rot fungus, *Plyporus ostreiformes*, and its comparative abilities for lignin degradation and dye decolorization. **Applied and Environmental Microbiology,** Baltimore, v. 60, n. 11, p. 4216-4218, 1994.

DIOTALLEVI, G.; BULLIO, P. G. L'Influenza della soda caustic nella tintura denim. Necessaria, ma non troppa...! **Chimica Tessile**, n. 1-2, p. 150-156, jan/fev. 1992.

DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J. S. DO. Colonização do substrato capim-elefante suplemento com farelos *Pleurotus ostreatus*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. V. 6, n. 2, 2006.

DURÁN, N. Applications of oxidative enzymes in waste treatment. Wastewater Treatment Using Enzymes 2, Trivandrum, v. 11, p. 41-51, 2003.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolitícos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. De. (Ed.). **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA, CNPMA, 1997. p. 269-292.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. In: MELO, I.S. DE; AZEVEDO, J. L. de (Ed.). **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA, CNPMA, 1997. 440 p.

DURÁN, N.; ROSA, M.A.; D´ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of Laccases and Tyrosinases (Phenoloxidases) Immobilized on Different Supports: **A Review. Enzyme and Microbial Technology**, Surrey , v. 31, n. 7, p. 907-931, 2002.

ERIKSSON, K. E. Biotechnology in the pulp and paper industry. **Wood Science and Technology**, New York, v. 24, p. 79-101, 1990.

FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediator of Laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Lausanne, v. 16, p. 231-240, 2002.

FAN, L. T.; GHARPURAY, M.M.; LEE, Y. H. Cellulose hydrolysis. Berlin, v. 38, p. 22-27, 1987.

FERNANDES, P. F.; ULHO, C.J.; ASQUIERI, E. R.; VALDIRENE, N. M. Produção de amilases pelo fungo *macrophjomina phaseolina,* Revista Eletrônica de Farmácia, v. IV (1), p. 43-51, 2007.

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

FERRAZ, A. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul. EDUCS., cap. 6, p. 215-242. 2004.

FERREIRA, L. F. R. **Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungos**. 2009. 134 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FERREIRA, L.F.R.; AGUIAR FILHO, J.M.M.; MESSIAS, T.G.; POMPEU, G.B.; QUEIJEIRO LOPEZ, A.M.; SILVA, D.P.; MONTEIRO, R.T.R. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as

toxicological indicators. Ecotoxicology and Environmental Safety, New York, v. 74, p. 132-137, 2011.

FRANCISCO, G. A., **Biodegradação da vinhaça resíduo da produção de etanol**, 2008, p. 47. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Ecólogo, 2008.

FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A.B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livraria e Editora Agropecuária, 2000. (Série Engenharia Agrícola, 1).

GIANFREDA, L. e RAO, M. A. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. Enzyme and Microbial Technology, v. 25, p. 339-354, 2004.
GIGER-REVERDIN, S. Review of the main methods of cell wall estimation: interest and limits for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 55, n. 4, p. 295-334, 1995.

GLENN, J. K.; GOLD, M. H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete phanerechaete chrysosporium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 45, p. 1741–1747, 1983.

GOKARN, A. N.; MAYADEVI, S. Active charcoal from agro-waste for colour removal of treated spent-wash. In: ANNUAL CONVENTION OF DEFENCE SCIENCE & TECHNOLOGY AGENCY - DSTA, 2000, Pune. **Proceedings…** Pune: DSTA, 2000. Part 1, p. B1-B10.

GOKARN, A. N.; SAPKAL, N. V.; JOSHI, A. P.; DONGARE, M. K. Towards customer friendly process for the treatment of distillery effluent. In: ANNUAL CONVENTION OF DEFENCE SCIENCE & TECHNOLOGY AGENCY - DSTA, 1998. Pune. **Proceedings…** Pune: DSTA, 1998. Part 1, p. B4-B5.

GONZALES, L.; GONZALES, L.; HERNÁNDEZ, J.R.; PERESTELO, F.; CARNICERO, A.; FALCÓN, M.A. Relationship between mineralization of synthetic lignins and the generation of hydroxyl radicals by lacase and a low molecular weight substance produced by Petriellidium fusoideum. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 30, p. 474-481, 2002.

GROSS, D.; COOMBS, J. Enzymic colour formation in beet and cane juices. **International Sugar Journal**, London, v. 928, p. 69-106, 1976.
GUARATINI, C. C. I. e ZANONI, M.V.B. Corantes têxteis. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p.71-78, 2000.

GUILLEN, F.; MARTINEZ, M.J.; MUNOZ, C.; MARTINEX, A. T. Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus Pleurotus enyngii leading to extracellular production of superoxide anion radical. **Arch Biochem Biophys**. V. 339, p. 190-199, 1997.

HAAS, L. Tintura com indigo soluciones a los procesos de aplicacion y a La técnica mecânica. International Textile bulletin, v. 36, n. 2, p. 45-50, 1990.

HAAS, R.; TSIVUNCHYK, O.; STEINBACH, K.; LÖW, E. V.; SCHEIBNER, M. Conversion of adamsite (phenarsarzin chloride) by fungal manganese peroxidase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 564–566, 2004.
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**, Oxford, v. 59, p. 63-68, 2005.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Reviews**. V. 13, p. 125-135, 1994.

HAWARI, J.; BEAUDET, S.; HALASZ, A.; THIBOUTOT, S.; AMPLEMAN, G. Microbial degradation versus mineralization. **Applied Microbiology Biotechnology**. v.54, p. 605-618, 2000.

HEINFLING, A.; MARTINEZ, M.J.; MARTINEZ, A.T.;BERGBAUER, M.; SZEWZYK, U. Trasnsformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus erymgii* in a manganese-independent reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, n. 8, p. 2788-2793, 1998.

HILDEN, L.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G.; LI, J.; LJUNGQUIST, P. HERIKSSON, G. Do the extracellular enzyme cellobiose dehydrogenase form a pathway in lignin biodegradation. **Federation of European Biochemical Societies**. v.477, p. 78-83, 2000.

HÖFER, C.; SCHLOSSER, D. Novel enzymatic oxidation of Mn2+ to Mn3+ catalyzed by a fungal laccase. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 451, p. 186-190, 1999.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). Enzyme and **Microbial Technology**, v. 30, p. 454-466, 2002.

HOFRICHTER, M.; ZIEGENHAGE, D.; VARES, T.; FRIEDRICH, M.; JÄGER, M.G.; FRITSCHE,W. Oxidative decomposition of malonic acid as basis for the action of manganese peroxidases in the absence of hydrogen peroxide. **FEBS Lett**. v.434, p. 362-6, 1998.

HORSTMANN, G. Dyeing as a new environmental challenge. *Journal of the Society of Dyers and Colouristis*, MPG Information Division, 111 (June), 182-184, 1995.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I.D.; SMITH, D.W. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. **Journal Environmental Engineering Science**, v. 3, p. 1-19, 2004.

KAHRAMAN, S.S.; GURDAL, I.H. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. **Bioresource Technology**, Essex, v. 82, p. 215-217, 2002.

KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R.; MONTEIRO, R. T. R.; ARMAS, E. D. Biodegradação de efluentes têxteis por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005.

KANDELBAUER, A.; GUBITZ, G.M. Current strategies for enzymatic and microbial treatments of textile effluents. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE APLICAÇÃO DA BIOTECNOLOGIA NA INDÚSTRIA TÊXTIL, 2001, Blumenau. **Anais…** Blumenau: Universidade Regional de Blumenau, Departamento de Química, 2001. p. 83-99.

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

KEREM, Z.; FRIESEM, D.; HADAR, Y. Lignocellulose degradation during solid state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanarochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 58, n. 4, p. 1121-1127, 1992.

KEUM, Y.S.; LI, Q.X. Copper dissociation as a mechanism of fungal laccase denaturation by humic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, p. 588-592, 2004.

KIRK, T. K.; CROAN, S.; TIEN, M. Production of multiple ligninases by Phanerochaete chrysosporium: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 8, p. 27-32, 1986.

KIRK, T.K.; FARELL, R.L. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v. 41, p. 465-505, 1987.

KLYOSOV, A. A. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation, **Biochemistry**, Washington, DC, v. 29, p. 10577-10585, 1990.

KNAPP, J. S.; NEWBY, P. S.; REECE, L. P. Descolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 17, p. 664–668, 1995.

KUMARAN, S.; SASTRY, C. A.; VIKINESWARY, S. Laccase, cellulose and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago *hampas*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 13, p. 43-49, 1997.

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

KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H_2O_2 dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 169, p. 247-250, 1984.

LAGUNAS, F.G.; LIS, M.J. Tratamento de efluentes na industria têxtil algodoeira. **Química Têxtil**, p. 6-13, mar. 1998.

LANG, E.; NERUD, F.; NOVOTNÁ, E.; ZADRAZIL, F.; MARTENS, R. Production of lignolytic exoenzymes and C^{14} – pyrene mineralization by Pleurotus sp. in lignocelluloses. **Folia Microbiologica**, Praga, v. 41, n. 6, p. 489-493, 1996.

LANGH, E.; ELLER, G.; ZADRAZIL, F. Lignocellulose decomposition and production of ligninolytic enzymes during interaction of white rot fungi with soil microorganisms. **Microbial Ecology**, New York, v. 34, p. 1-10, 1997.

LEITE, G. F. Avaliação econômica da adubação com vinhaça e da adubação mineral de soqueiras de cana-de-açúcar na Usina Monte Alegre Ltda. – Monte Belo – MG. **Revista Universidade de Alfenas**, Alfenas, v. 5, p. 189-191, 1999.

LI, K.; XU, F.; ERIKSSON, K.E.L. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, n. 6, p. 2654-2660, 1999.

MACHADO, K.M.G. **Biodegradação de pentaclorofenol por fungos basideomicetos lignocelulolíticos em solos contaminados com resíduos industriais**. 1998. 172 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Rio Claro, 1998.

MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, Washington, DC, v. 95, p. 391-414, 1969.

MANE, J. D.; MODI, S.; NAGAWADE, S.; PHADNIS, S. P.; BHANDARI, V. M. Treatment of spentwash using chemically modified bagasse and colour removal studies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, p. 1752-1755, 2006.

MARTÍNEZ, A.T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUEÑAS, F.J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, M.J.; GUITIERREZ, A.; DEL RÍO, J. C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **Int. Microbiol**. v. 8. 2005.

MASAPHY, S.; LEVANON, D. The effect of lignocellulose on lignolellulolytic activity of *Pleurotus pulmonaris* in submonaris in submerged culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 36, p. 828-832, 1992.

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, New York, v. 60, n. 6, p. 551-565, 2002.

MENEZES, C.R.; SILVA, I.S.; DURRANT, L.R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas lignocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos**, São Leopoldo, v. 5, n. 1, p. 68-78, 2009.

METCALF & EDDY, Inc. Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse. 3. Ed., New York: McGraw Hill Inc., 1991. Cap. 1 e 3.

MIGO, V. P.; MATSUMURA, M.; ERNESTO, J. D. R. Decolourization of molasses waste water using an inorganic flocculent. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Amsterdam, v. 75, n. 6, p. 438-442, 1993.

MOHANA, S.; ACHARYA, B. K.; MADAMWAR, D. Distillery spent wash: treatment technologies and potential applications. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 163, n. 1, p. 12-25, 2008. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.06.079.

MOHORCIC, M.; FRIEDRICH, J.; RENIMEL, I.; ANDRÉ, P.; MANDIN, D.; CHAUMONT, J. Production of melanin bleaching enzyme of fungal origin and its application in cosmetics. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. v. 12, p. 200-206, 2007.

MONTEIRO, R.T.R.; RANZANI, M.R.T.C.; KAMIDA, H.M.; DURRANT, L.R. Mutagenecity and decolorization of textile industry sludge treated with *Pleurotus spp*. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON TOXICITY ASSESSMENT, 10., Quebec: Environment Canada, 2001. p.36.

MOREIRA NETO, S.L.M. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella CCB 444* em solo contaminado com hexaclorobenzeno. 2006. 124 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.

MOUGIN, C.; JOLIVALT, C.; BRIOZZO, P.; MADZAK, C. 2003. Fungal laccase: from structure-activity studies to environmental applications. **Environmental Chemistry Letters**, Heidelberg, v. 1, p. 145-148, 2003.

NAIK, N.M.; JAGADEESH, K.S.; ALAGAWADI, A.R. Microbial decolorization of spentwash: a review. **Indian Journal of Microbiology**, Nova Delhi, v. 48, p. 41-48, 2008.

NASCIMENTO, A. C.; SOUZA D. O.; CHINCHIO, S. R. O que fazer com o aumento da produção de resíduos sólidos. **Caderno de Cultura e Educação**, Mauá, v. 3, n. 9, p. 20-25, 2001.

OLLIKKA, P.; ALHONMAKI, K.; LEPPANEN, V.; GLUMOFF, T.; RAIJOLA, T.; SUOMINEN, I. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 59, n. 12, p. 4010-4016, 1993.

PAICE, M. G.; REID, I. D.; BOURBONNAIS, R.; ARCHIBALD, F. S.; JURASEK, L. Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies Kraft pulp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 59, p. 260-265, 1993.

PALMIERI, G.; GIARDINA, P., BIANCO, C., FONTANELLA, B.; SANNIA, G. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus Pleurotus ostreatus. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 920-924, 2000.

PANDEY, A. Solid – state fermentation. **Biochemistry Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, p. 81–84, 2003.

PAPINUTTI, V.L.; FORCHIASSIN, F. Modification of Malachite Green by Fomes sclerodermeus and reduction of toxicity to *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 231, p. 205-209, 2004.

PAZ JÚNIOR, F. B.; SANTOS, E. L. P.; QUEIROZ, M. A. C. Isolamento, identificação e avaliação da atividade fenoloxidase de fungos aphyllophorales. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 3., 2008, Fortaleza – CE. 1 CD-ROM.

PAZARLIOGLU, N.K.; UREK, R.O.; ERGUN, F. biodecolourization of Direct Blue 15 by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 1923-1929, 2005.

PELCZAR JUNIOR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia** – conceitos e aplicações. 2. ed: São Paulo: Makron Books, 1996. v. 1, 524 p.

PERES, C. S.; ABRAHÃO, A. J. Características e sistemas de tratamento de águas residuais das indústrias têxteis – uma primeira abordagem. ***Química Têxtil***, São Paulo: ABQCT, (52), 22-39, 1998.

PÉREZ, S.R.; SAVÓN, R.C.B.; DIAZ, M.S.; KOUROUMA, A. Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para La decoloración de efluentes industriales. **Revista Mexicana de Micologia**, México, v. 23, p. 9-15, 2006.

PETER, E. Pasado, presente y futuro de los colorantes tina. **Técnica Textil Internacional**, v. 35, n. 4, p. 55-66, jul/ago. 1991.

POMPEU, G. B. **Comportamento enzimático de quatro fungos lignocelulolíticos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar e expostos a duas concentrações de nitrogênio, visando à produção de etanol.** 2010. 96 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. 2. ed. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2002. v. 2.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 1998. v. 1-2.

RAJARATHANAM, S.; SHASHIREKA, M. N.; BANO, Z. biopotentialities of the basidiomacromycetes. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 37, p. 233-361, 1992.

RAJARATHANAN, S.; BANO, Z. *Pleurotus mushrooms*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 28, n. 1, p. 31-113, 1989.

RAMOS, L.P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

REIFE, A.; FREEMAN, H. S. **Environmental Chemistry of dyes and pigments**. New York: Wiley – Interscience Publication, 1996. 329p.

RODRÍGUEZ, E.; PICKARD, M.A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. **Current Microbiology**, New Tork, v. 38, p. 27-32, 1999.

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

ROSOLEN, L. A. **Biodegradação de efluentes têxtil e corantes utilizando fungos basideomicetos.** 2004. 53 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
SANIN, L. B. B. A industria têxtil e o meio ambiente. ***Química Têxtil***, São Paulo: ABQCT, (46), 13-34, 1997.

SAPARRAT, M.; GUILLÉN, F.; ARAMBARRI, A.M.; MARTINEZ, A.T.; MARTINEZ, M.J. Induction, Isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete coriolopsis rigida. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, n. 4, p. 1534-1540, 2002.

SARTORI, S. B. **Atividade enzimática e valores nutricionais de Pleurotus spp. cultivados em vinhaça**. 2011. 134 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SCHNEIDER, P.; CASPERSEN, M.B.; MONDORF, K.; HALKIER, T.; SKOV, L.K.; OSTERGAARD, P. R. Characterization of a Coprinus cinereus laccase. **Enzyme and Microbial Technology**, surrey, v. 25, n. 6, p. 502-508, 1999.

SHLEEV, S.V.; MOROZOVA, O.V.; NIKITINA, O.V.; GORSHINA, E.S.; RUSINOVA, T.V.; SEREZHENKOV, V.A.; BURBAEV, D.S.; GAZARYAN, I.; YAROPOLOV, A. Comparison of physic-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. **Biochimie**, Paris, v. 86, p. 693-703, 2004.

SILVA, R.R.; COELHO, G.D. Fungos: principais grupos e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, 2006. 20 p.

SILVA, V.L.M.M.; GOMES, W.C.; ALSINA, O.L.S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 2, p. 27-32, 2007.
SJÖSTROM, E. **Wood chemistry**: fundamentals and applications. 2nd ed. Boca Raton: Academic Press, 1992. 269 p.

SMITH, P.; GREGORY, P. E. Analytical techniques for colour studies. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 14., 1971, New Orleans. **Proceedings…** New Orleans: ISSCT, 1971. p. 1415.

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

TUOR, U.; WARIISHI, H.; SHOEMAKER, H. E.; GOLD, M. H. Oxidation of phenolic arylglycerol b-aryleither lignin model compounds by manganese peroxidase from phanerochaete chrysosporium; oxidative cleavage of an a-carbonyl model compound. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 31, p. 4986-4995, 1992.
v. 29, n. 174, p. 61-64, 2001.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Ithaca: New York: Cornell University Press, 1994. 476 p.

VAZOLLER, R.F. Diversidade microbiana e desenvolvimento sustentável – Microbiologia e saneamento ambiental. In: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Microbiologia ambiental**. São Paulo: CETESB, 2001. 168 p.

VELAZQUEZ-CEDEÑO, M. A.; MATA, G.; SAVOIE, J. M. Waste reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffe pulpe changes in the production of some lignocellulolytics enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 18, n. 3, p. 201-207, 2002.

VOLL, C.E., **Aplicação de vinhaça e do extrato de palhiço de cana-de-açúcar no controle de plantas daninhas**. Tese (Mestre em Agronomia, na área de concentração: Fitotecnia) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

VYAS, B. R. M.; VOLC, J.; SASEK, V. Effects of temperature on the production of manganese peroxidase and lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. **Folia Microbiologica**, Praga, v. 39, n. 1, p. 19-22, 1994.

WAGNER, G.H.; WOLF, D.C. Carbon transformations and soil organic matter formation. In: SYLVIA, D.M.; FUHRMANN, J.J.; HARTEL, P.G.; ZUBERER, D.A. **Principles and applications of soil microbiology**. New Jersey: Prentice Hall, 1999. p. 218-256.

WISNIEWSKI, A. C. **Produção de alfa-amilase e glucoamilase por Macrocybe titans cultivado em resíduos sólidos agroindustriais**. 2009. 122 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2009.

YOUNG, L.; YU, J. Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes. **Water Research**, New York, v. 31, n. 5, p. 1187-1193, 1997.

ZANONI, M. V. B.; CARNEIRO, P. A. O descarte dos corantes têxteis. **Ciência Hoje**,
ZHAO, L. H.; ZHOU, J. T.; LV, H.; ZHENG, C. L.; YANG, Y. S.; SUN, H. J.; ZHANG, X. H. Decolorization of Cotton Pulp Black Liquor by *Pleurotus ostreatus* in a Bubble-column Reactor. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 80, p. 44-48, 2008.

ANEXOS

Anexo A – Estabilidade da Atividade Enzimática da Lacase produzida pelo fungo *P. sajor caju* CCB 020, a cada 3 em 3 dias, num período de 30 dias de inoculação com vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar

Dias	Tempo (horas)	Atividade Enzimática ($UI.L^{-1}$)	Atividade Enzimática (%)	Perda Atividade Enzimática (%)
3º	$T_0 = 0$	16,67	100	0
	$T_1 = 1$	15,33	91,96	8,04
	$T_2 = 2$	13,64	81,82	18,18
	$T_3 = 24$	9,54	57,23	42,77
6º	$T_0 = 0$	41,44	100	0
	$T_1 = 1$	37,67	90,90	9,10
	$T_2 = 2$	35,13	84,77	15,23
	$T_3 = 24$	30,51	73,62	26,38
9º	$T_0 = 0$	37,64	100	0
	$T_1 = 1$	24,38	64,77	35,23
	$T_2 = 2$	23,67	62,89	37,11
	$T_3 = 24$	21,82	57,97	42,03
12º	$T_0 = 0$	36,56	100	0
	$T_1 = 1$	15,44	42,22	57,78
	$T_2 = 2$	8,05	22,02	77,98
	$T_3 = 24$	0,82	2,24	97,76
15º	$T_0 = 0$	51,95	100	0
	$T_1 = 1$	48,10	92,60	7,40
	$T_2 = 2$	24,92	47,98	52,02
	$T_3 = 24$	7,38	14,22	85,78
18º	$T_0 = 0$	24,41	100	0
	$T_1 = 1$	17,74	72,69	27,31
	$T_2 = 2$	14,46	59,24	40,76
	$T_3 = 24$	10,74	44,01	55,99
21º	$T_0 = 0$	8,77	100	0
	$T_1 = 1$	5,64	64,33	35,67
	$T_2 = 2$	4,62	52,63	47,37
	$T_3 = 24$	4,23	48,25	51,75
30º	$T_0 = 0$	3,03	100	0
	$T_1 = 1$	2,02	66,62	33,38
	$T_2 = 2$	0,90	29,72	70,28
	$T_3 = 24$	0,86	28,34	71,66

Anexo B – Estabilidade da Atividade Enzimática da Peroxidase produzida pelo fungo *P. sajor caju* CCB 020, a cada 3 em 3 dias, num período de 30 dias de inoculação com vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar

Dias	Tempo (horas)	Atividade Enzimática (UI.L^{-1})	Atividade Enzimática (%)	Perda Atividade Enzimática (%)
3º	T_0 = 0	6,59	100	0
	T_1 = 1	4,10	62,26	37,74
	T_2 = 2	0,59	8,95	91,05
	T_3 = 24	0,44	6,61	93,39
6º	T_0 = 0	16,46	100	0
	T_1 = 1	12,69	77,10	22,90
	T_2 = 2	8,77	53,27	46,73
	T_3 = 24	5,69	34,58	65,42
9º	T_0 = 0	14,51	100	0
	T_1 = 1	10,62	73,14	26,86
	T_2 = 2	8,69	59,89	40,11
	T_3 = 24	4,90	33,74	66,26
12º	T_0 = 0	25,00	100	0
	T_1 = 1	12,36	49,44	50,56
	T_2 = 2	10,72	42,87	57,13
	T_3 = 24	7,09	28,34	71,66
15º	T_0 = 0	32,26	100	0
	T_1 = 1	20,82	64,55	35,45
	T_2 = 2	7,65	23,73	76,27
	T_3 = 24	2,49	7,71	92,29
18º	T_0 = 0	7,08	100	0
	T_1 = 1	5,69	80,43	19,57
	T_2 = 2	5,82	82,25	17,75
	T_3 = 24	4,46	63,04	36,96
21º	T_0 = 0	7,97	100	0
	T_1 = 1	7,95	99,68	0,32
	T_2 = 2	5,05	63,34	36,66
	T_3 = 24	1,10	13,83	86,17
30º	T_0 = 0	10,71	100	0
	T_1 = 1	0	0	100
	T_2 = 2	0	0	100
	T_3 = 24	0	0	100

Anexo C – Estabilidade da Atividade Enzimática da MnP produzida pelo fungo *P. sajor caju* CCB 020, a cada 3 em 3 dias, num período de 30 dias de inoculação com vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar

Dias	Tempo (horas)	Atividade Enzimática ($UI.L^{-1}$)	Atividade Enzimática (%)	Perda Atividade Enzimática (%)
3º	$T_0 = 0$	0	0	100
	$T_1 = 1$	0	0	100
	$T_2 = 2$	0	0	100
	$T_3 = 24$	0	0	100
6º	$T_0 = 0$	10,77	100	0
	$T_1 = 1$	8,79	81,67	18,33
	$T_2 = 2$	8,05	74,76	25,24
	$T_3 = 24$	7,41	68,81	31,19
9º	$T_0 = 0$	12,49	100	0
	$T_1 = 1$	12,21	97,74	2,26
	$T_2 = 2$	8,77	70,23	29,77
	$T_3 = 24$	6,67	53,39	46,61
12º	$T_0 = 0$	16,15	100	0
	$T_1 = 1$	10,13	62,70	37,30
	$T_2 = 2$	7,28	45,08	54,92
	$T_3 = 24$	6,80	42,06	57,94
15º	$T_0 = 0$	11,58	100	0
	$T_1 = 1$	9,41	81,23	18,77
	$T_2 = 2$	9,21	79,46	20,54
	$T_3 = 24$	6,21	53,56	46,44
18º	$T_0 = 0$	15,77	100	0
	$T_1 = 1$	14,54	92,19	7,81
	$T_2 = 2$	8,62	54,63	45,37
	$T_3 = 24$	6,80	43,09	56,91
21º	$T_0 = 0$	11,77	100	0
	$T_1 = 1$	7,51	63,84	36,16
	$T_2 = 2$	9,56	81,26	18,74
	$T_3 = 24$	9,49	80,61	19,39
30º	$T_0 = 0$	0	0	100
	$T_1 = 1$	0	0	100
	$T_2 = 2$	0	0	100
	$T_3 = 24$	0	0	100

Anexo D – Estabilidade da Atividade Enzimática da Lacase produzida pelo fungo *P. ostreatus*, a cada 3 em 3 dias, num período de 30 dias de inoculação com vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar

Dias	Tempo (horas)	Atividade Enzimática ($UI.L^{-1}$)	Atividade Enzimática (%)	Perda Atividade Enzimática (%)
3º	$T_0 = 0$	0,50	100	0
	$T_1 = 1$	0	0	100
	$T_2 = 2$	0	0	100
	$T_3 = 24$	0	0	100
6º	$T_0 = 0$	5,18	100	0
	$T_1 = 1$	3,59	69,31	30,69
	$T_2 = 2$	1,95	37,62	62,38
	$T_3 = 24$	1,28	24,75	75,25
9º	$T_0 = 0$	3,23	100	0
	$T_1 = 1$	1,36	42,06	57,94
	$T_2 = 2$	1,33	41,26	58,74
	$T_3 = 24$	0,05	1,58	98,42
12º	$T_0 = 0$	3,03	100	0
	$T_1 = 1$	1,92	63,47	36,53
	$T_2 = 2$	1,41	46,61	53,39
	$T_3 = 24$	0,08	2,51	97,49
15º	$T_0 = 0$	2,95	100	0
	$T_1 = 1$	2,59	87,80	12,20
	$T_2 = 2$	1,64	55,63	44,37
	$T_3 = 24$	0,49	16,51	83,49
18º	$T_0 = 0$	4,67	100	0
	$T_1 = 1$	3,90	83,50	27,12
	$T_2 = 2$	1,72	36,81	30,51
	$T_3 = 24$	1,26	26,91	48,14
21º	$T_0 = 0$	9,64	100	0
	$T_1 = 1$	5,36	55,58	44,42
	$T_2 = 2$	4,62	47,87	52,13
	$T_3 = 24$	2,10	21,80	78,20
30º	$T_0 = 0$	4,26	100	0
	$T_1 = 1$	2,35	55,19	44,81
	$T_2 = 2$	2,74	64,39	35,61
	$T_3 = 24$	0,08	1,95	98,05

Anexo E – Estabilidade da Atividade Enzimática da Peroxidase produzida pelo fungo *P. ostreatus*, a cada 3 em 3 dias, num período de 30 dias de inoculação com vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar

Dias	Tempo (horas)	Atividade Enzimática (UI.L^{-1})	Atividade Enzimática (%)	Perda Atividade Enzimática (%)
3º	$T_0 = 0$	0	100	0
	$T_1 = 1$	0	100	100
	$T_2 = 2$	0	100	100
	$T_3 = 24$	0	100	100
6º	$T_0 = 0$	0	100	100
	$T_1 = 1$	0	0	100
	$T_2 = 2$	0	0	100
	$T_3 = 24$	0	0	100
9º	$T_0 = 0$	1,60	100	0
	$T_1 = 1$	0,80	50,00	50,00
	$T_2 = 2$	0,17	10,63	89,38
	$T_3 = 24$	0	0	100
12º	$T_0 = 0$	1,80	100	0
	$T_1 = 1$	1,60	88,89	11,11
	$T_2 = 2$	0	0	100
	$T_3 = 24$	0	0	100
15º	$T_0 = 0$	2,80	100	0
	$T_1 = 1$	2,70	96,43	3,57
	$T_2 = 2$	1,10	39,29	60,71
	$T_3 = 24$	0	0	100
18º	$T_0 = 0$	5,90	100	0
	$T_1 = 1$	4,30	72,88	27,12
	$T_2 = 2$	4,10	69,49	30,51
	$T_3 = 24$	3,06	51,86	48,14
21º	$T_0 = 0$	5,40	100	0
	$T_1 = 1$	4,80	88,89	11,11
	$T_2 = 2$	4,08	75,56	24,44
	$T_3 = 24$	3,90	72,22	27,78
30º	$T_0 = 0$	10,03	100	0
	$T_1 = 1$	9,51	94,82	5,18
	$T_2 = 2$	9,06	90,33	9,67
	$T_3 = 24$	7,04	70,19	29,81

Anexo F – Estabilidade da Atividade Enzimática da MnP produzida pelo fungo *P. ostreatus*, a cada 3 em 3 dias, num período de 30 dias de inoculação com vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar

Dias	Tempo (horas)	Atividade Enzimática (UI.L^{-1})	Atividade Enzimática (%)	Perda Atividade Enzimática (%)
3º	$T_0 = 0$	0	0	0
	$T_1 = 1$	0	0	0
	$T_2 = 2$	0	0	0
	$T_3 = 24$	0	0	0
6º	$T_0 = 0$	0	0	0
	$T_1 = 1$	0	0	0
	$T_2 = 2$	0	0	0
	$T_3 = 24$	0	0	0
9º	$T_0 = 0$	0	0	0
	$T_1 = 1$	0	0	0
	$T_2 = 2$	0	0	0
	$T_3 = 24$	0	0	0
12º	$T_0 = 0$	0	0	0
	$T_1 = 1$	0	0	0
	$T_2 = 2$	0	0	0
	$T_3 = 24$	0	0	0
15º	$T_0 = 0$	0	0	0
	$T_1 = 1$	0	0	0
	$T_2 = 2$	0	0	0
	$T_3 = 24$	0	0	0
18º	$T_0 = 0$	0	0	0
	$T_1 = 1$	0	0	0
	$T_2 = 2$	0	0	0
	$T_3 = 24$	0	0	0
21º	$T_0 = 0$	5,40	100	0
	$T_1 = 1$	0	0	0
	$T_2 = 2$	0	0	0
	$T_3 = 24$	0	0	0
30º	$T_0 = 0$	0	0	0
	$T_1 = 1$	0	0	0
	$T_2 = 2$	0	0	0
	$T_3 = 24$	0	0	0

Anexo G – Estabilidade da Atividade Enzimática da Lacase produzida pelo fungo *P. albidus* CCB 068, a cada 3 em 3 dias, num período de 30 dias de inoculação com vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar

Dias	Tempo (horas)	Atividade Enzimática ($UI.L^{-1}$)	Atividade Enzimática (%)	Perda Atividade Enzimática (%)
3º	$T_0 = 0$	1,44	100	0
	$T_1 = 1$	1,05	73,24	26,76
	$T_2 = 2$	0,79	55,33	44,67
	$T_3 = 24$	0,05	3,55	96,45
6º	$T_0 = 0$	31,23	100	0
	$T_1 = 1$	30,23	96,80	3,20
	$T_2 = 2$	27,64	88,50	11,50
	$T_3 = 24$	24,76	79,28	20,72
9º	$T_0 = 0$	29,54	100	0
	$T_1 = 1$	21,74	73,61	26,39
	$T_2 = 2$	14,15	47,92	52,08
	$T_3 = 24$	10,97	37,15	62,85
12º	$T_0 = 0$	46,26	100	0
	$T_1 = 1$	31,26	67,57	32,43
	$T_2 = 2$	17,33	37,47	62,53
	$T_3 = 24$	7,87	17,01	82,99
15º	$T_0 = 0$	8,36	100	0
	$T_1 = 1$	4,77	57,06	42,94
	$T_2 = 2$	0,33	3,99	96,01
	$T_3 = 24$	0	0	100
18º	$T_0 = 0$	4,15	100	0
	$T_1 = 1$	3,97	95,68	4,32
	$T_2 = 2$	3,36	80,86	19,14
	$T_3 = 24$	3,03	72,84	27,16
21º	$T_0 = 0$	4,51	100	0
	$T_1 = 1$	6,51	144,32	-44,32
	$T_2 = 2$	3,79	84,09	15,91
	$T_3 = 24$	3,49	77,27	100
30º	$T_0 = 0$	1,18	100	0
	$T_1 = 1$	0,98	83,12	16,88
	$T_2 = 2$	0,07	5,94	94,06
	$T_3 = 24$	0	0	100

Anexo H – Estabilidade da Atividade Enzimática da Peroxidase produzida pelo fungo *P. albidus* CCB 068, a cada 3 em 3 dias, num período de 30 dias de inoculação com vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar

Dias	Tempo (horas)	Atividade Enzimática (UI.L^{-1})	Atividade Enzimática (%)	Perda Atividade Enzimática (%)
3º	T_0 = 0	0	100	0
	T_1 = 1	0	100	0
	T_2 = 2	0	100	0
	T_3 = 24	0	100	0
6º	T_0 = 0	18,84	100	0
	T_1 = 1	14,17	75,21	24,79
	T_2 = 2	12,24	64,97	35,03
	T_3 = 24	12,00	63,69	36,31
9º	T_0 = 0	18,92	100	0
	T_1 = 1	16,78	88,67	11,33
	T_2 = 2	15,79	83,47	16,53
	T_3 = 24	13,74	72,63	27,37
12º	T_0 = 0	12,60	100	0
	T_1 = 1	12,00	95,24	4,76
	T_2 = 2	8,90	70,63	29,37
	T_3 = 24	8,30	65,87	34,13
15º	T_0 = 0	8,36	100	0
	T_1 = 1	4,77	57,06	42,94
	T_2 = 2	0,33	3,95	96,05
	T_3 = 24	0	0	100
18º	T_0 = 0	4,15	100	0
	T_1 = 1	3,36	80,86	19,14
	T_2 = 2	3,97	95,68	4,32
	T_3 = 24	3,03	72,84	27,16
21º	T_0 = 0	5,64	100	0
	T_1 = 1	4,85	85,91	14,09
	T_2 = 2	2,28	40,45	59,55
	T_3 = 24	0	0	100
30º	T_0 = 0	7,90	100	0
	T_1 = 1	6,43	81,39	18,61
	T_2 = 2	3,58	45,32	54,68
	T_3 = 24	3,47	43,92	56,08

Anexo I – Estabilidade da Atividade Enzimática da MnP produzida pelo fungo *P. albidus* CCB 068, a cada 3 em 3 dias, num período de 30 dias de inoculação com vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar

Dias	Tempo (horas)	Atividade Enzimática (UI.L^{-1})	Atividade Enzimática (%)	Perda Atividade Enzimática (%)
3º	$T_0 = 0$	0,37	100	0
	$T_1 = 1$	0	0	100
	$T_2 = 2$	0	0	100
	$T_3 = 24$	0	0	100
6º	$T_0 = 0$	1,12	100	0
	$T_1 = 1$	0	0	100
	$T_2 = 2$	0	0	100
	$T_3 = 24$	0	0	100
9º	$T_0 = 0$	0,10	100	0
	$T_1 = 1$	0	0	100
	$T_2 = 2$	0	0	100
	$T_3 = 24$	0	0	100
12º	$T_0 = 0$	0,69	100	0
	$T_1 = 1$	0	0	100
	$T_2 = 2$	0	0	100
	$T_3 = 24$	0	0	100
15º	$T_0 = 0$	0,33	100	0
	$T_1 = 1$	0	0	100
	$T_2 = 2$	0	0	100
	$T_3 = 24$	0	0	100
18º	$T_0 = 0$	0,26	0	0
	$T_1 = 1$	0	100	100
	$T_2 = 2$	0	100	100
	$T_3 = 24$	0	100	100
21º	$T_0 = 0$	0,28	100	0
	$T_1 = 1$	0,13	46,43	53,57
	$T_2 = 2$	0	0	100
	$T_3 = 24$	0	0	100
30º	$T_0 = 0$	0	100	0
	$T_1 = 1$	0	100	0
	$T_2 = 2$	0	100	0
	$T_3 = 24$	0	100	0

Anexo J – Analise de variância com fungos, tratamentos e tempo (dias), dos dados provenientes das analises fixado no nível 400 µL de corante índigo, no comprimento de onda 580nm (SANEST – Sistema de Analise Estatística, desenvolvido pela Universidade Federal de Pelotas em parceria com o Departamento de Matemática e Estatística da Escola de Agricultura "Luiz de Queiroz" – USP).

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fungos	2	20657.7688961	10328.8844481	22854963.6565*
Tratamentos	1	16035.7859280	16035.7859280	35482757.7393*
Tempo (dias)	7	18092.2008705	2584.6001244	5719005.0103*
Fungos x Tratamentos	2	7.1001557	3.5500778	7855.3401*
Fungos x Tempo (dias)	14	11536.4666432	824.0333317	1823357.7829*
Tratamentos x Tempo (dias)	7	26799.1696101	3828.4528014	8471306.8558*
Fungos x Tratamentos x Tempo (dias)	14	6899.3613242	492.8115232	1090455.5577*
Resíduos	96	0.0433855	0.0004519	
Total	143	100027.8968132		

*1% de significância; Coeficiente de Variação 0,061%

Anexo K – Analise de variância com fungos, tratamentos e tempo (dias), dos dados provenientes das analises fixado no nível 600 µL de corante índigo, no comprimento de onda 580nm (SANEST – Sistema de Analise Estatística, desenvolvido pela Universidade Federal de Pelotas em parceria com o Departamento de Matemática e Estatística da Escola de Agricultura "Luiz de Queiroz" – USP)

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fungos	2	18333.4960855	9166.7480428	13226.9268*
Tratamentos	1	10588.0673008	10588.0673008	15277.7834*
Tempo (dias)	7	12260.8071902	1751.5438843	2527.3459*
Fungos x Tratamentos	2	124.3021707	62.1510853	89.6793*
Fungos x Tempo (dias)	14	9360.1471185	668.5819370	964.7134*
Tratamentos x Tempo (dias)	7	16529.7418745	2361.3916964	3407.3103*
Fungos x Tratamentos x Tempo (dias)	14	7410.7128715	529.3366337	763.7929*
Resíduos	96	66.5315401	0.6930369	
Total	143	74673.8061516		

*1% de significância; Coeficiente de Variação 2,930%

Anexo L – Analise de variância com fungos, tratamentos e tempo (dias), dos dados provenientes das analises fixado no nível 800 µL de corante índigo, no comprimento de onda 580nm (SANEST – Sistema de Analise Estatística, desenvolvido pela Universidade Federal de Pelotas em parceria com o Departamento de Matemática e Estatística da Escola de Agricultura "Luiz de Queiroz" – USP).

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fungos	2	8950.9397115	4475.4698557	468670.3859*
Tratamentos	1	5616.1287567	5616.1287567	588119.9776*
Tempo (dias)	7	4989.6932297	712.8133185	74645.6805*
Fungos x Tratamentos	2	1388.7427683	694.3713841	72714.4445*
Fungos x Tempo (dias)	14	4280.8856170	305.7775441	32020.9686*
Tratamentos x Tempo (dias)	7	5595.8700285	799.4100041	83714.0696*
Fungos x Tratamentos x Tempo (dias)	14	2605.7361569	186.1240112	19490.8725*
Resíduos	96	0.9167319	0.0095493	
Total	143	33428.9130005		

*1% de significância; Coeficiente de Variação 0,518%

Anexo M – Analise de variância com fungos, tratamentos e tempo (dias), dos dados provenientes das analises fixado no nível 400 μL de corante índigo, no comprimento de onda 680nm (SANEST – Sistema de Analise Estatística, desenvolvido pela Universidade Federal de Pelotas em parceria com o Departamento de Matemática e Estatística da Escola de Agricultura "Luiz de Queiroz" – USP).

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fungos	2	21043.5842101	10521.7921050	1533641.6487*
Tratamentos	1	409.9270129	409.9270129	59750.3860*
Tempo (dias)	7	19256.4835823	2750.9262260	400971.1455*
Fungos x Tratamentos	2	958.3529379	479.1764689	69844.0895*
Fungos x Tempo (dias)	14	16931.5765019	1209.3983216	176280.2018*
Tratamentos x Tempo (dias)	7	41555.9493518	5936.5641931	865305.2641*
Fungos x Tratamentos x Tempo (dias)	14	9143.2212125	653.0872295	95193.0779*
Resíduos	96	0.6586232	0.0068607	
Total	143	109299.7534326		

*1% de significância; Coeficiente de Variação 0,332%

Anexo N – Analise de variância com fungos, tratamentos e tempo (dias), dos dados provenientes das analises fixado no nível 600 μL de corante índigo, no comprimento de onda 680nm (SANEST – Sistema de Analise Estatística, desenvolvido pela Universidade Federal de Pelotas em parceria com o Departamento de Matemática e Estatística da Escola de Agricultura "Luiz de Queiroz" – USP).

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fungos	2	13808.5911075	6904.2955538	4409985.4548*
Tratamentos	1	2129.9750336	2129.9750336	1360480.4204*
Tempo (dias)	7	9808.6659808	1401.2379973	895013.7112*
Fungos x Tratamentos	2	822.2242960	411.1121480	262589.9455*
Fungos x Tempo (dias)	14	14249.9919019	1017.8565644	650136.2245*
Tratamentos x Tempo (dias)	7	26694.7949334	3813.5421333	2435826.3936*
Fungos x Tratamentos x Tempo (dias)	14	6209.2099053	443.5149932	283286.6371*
Resíduos	96	0.1502981	0.0015656	
Total	143	73723.6034566		

*1% de significância; Coeficiente de Variação 0,191%

Anexo O – Analise de variância com fungos, tratamentos e tempo (dias), dos dados provenientes das analises fixado no nível 800 μL de corante índigo, no comprimento de onda 680nm (SANEST – Sistema de Analise Estatística, desenvolvido pela Universidade Federal de Pelotas em parceria com o Departamento de Matemática e Estatística da Escola de Agricultura "Luiz de Queiroz" – USP).

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fungos	2	4364.4209019	2182.2104510	28356.3587*
Tratamentos	1	2896.8620785	2896.8620785	37642.7765*
Tempo (dias)	7	4923.7283654	703.3897665	9140.0775*
Fungos x Tratamentos	2	703.0289864	351.5144932	4567.6947*
Fungos x Tempo (dias)	14	9755.6546019	696.8324716	9054.8698*
Tratamentos x Tempo (dias)	7	14866.5867731	2123.7981104	27597.3296*
Fungos x Tratamentos x Tempo (dias)	14	3555.9509993	253.9964999	3300.5139*
Resíduos	96	7.3878387	0.0769567	
Total	143	41073.6205452		

*1% de significância; Coeficiente de Variação 1,750%

Anexo P – Analise de variância com 3 fatores (concentrações, fungos e tratamentos), dos dados provenientes das analises do 3º dia de inoculação com vinhaça e vinhaça + bagaço de cana-de-açúcar, no comprimento de onde 580 nm.

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Concentrações	2	4.2392336	2.1196168	57.8878*
Fungos	2	5.7137586	2.8568793	78.0228*
Tratamentos	1	250.2414622	250.2414622	6834.2229*
Concentrações x Fungos	4	1.2534021	0.3133505	8.5578*
Concentrações x Tratamentos	2	4.2392316	2.1196158	57.8878*
Fungos x Tratamentos	2	5.7137566	2.8568783	78.0228*
Concentrações x Fungos x Tratamentos	4	1.2534041	0.3133510	8.5578*
Resíduos	36	1.3181737	0.0366159	
Total	53	273.9724225		

* 1% de significância; Coeficiente de Variação 6.691%

Anexo Q – Analise de variância com 3 fatores (concentrações, fungos e tratamentos), dos dados provenientes das analises do 6º dia de inoculação com vinhaça e vinhaça + bagaço de cana-de-açúcar, no comprimento de onde 580 nm.

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Concentrações	2	3.2435707	1.6217853	39667.1282*
Fungos	2	40.4663578	20.2331789	494881.8314*
Tratamentos	1	285.1525409	285.1525409	6974524.9730*
Concentrações x Fungos	4	0.9253378	0.2313344	5658.1922*
Concentrações x Tratamentos	2	19.4719326	9.7359663	238131.2817*
Fungos x Tratamentos	2	3.6254732	1.8127366	44337.5903*
Concentrações x Fungos x Tratamentos	4	3.5722544	0.8930636	21843.3770*
Resíduos	36	0.0014719	0.0000409	
Total	53	356.4589393		

* 1% de significância; Coeficiente de Variação 0,153%

Anexo R – Analise de variância com 3 fatores (concentrações, fungos e tratamentos), dos dados provenientes das analises do 9º dia de inoculação com vinhaça e vinhaça + bagaço de cana-de-açúcar, no comprimento de onde 580 nm.

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Concentrações	2	19.7371013	9.8685506	2010329.1766*
Fungos	2	81.0172583	40.5086292	8252040.4515*
Tratamentos	1	76.1073470	76.1073470	15503879.5292*
Concentrações x Fungos	4	1.8151227	0.4537807	92439.9687*
Concentrações x Tratamentos	2	3.5901602	1.7950801	365676.9887*
Fungos x Tratamentos	2	41.1194087	20.5597044	4188231.3869*
Concentrações x Fungos x Tratamentos	4	7.9230788	1.9807697	403503.9468*
Resíduos	36	0.0001767	0.0000049	
Total	53	231.3096538		

* 1% de significância; Coeficiente de Variação 0.039%

Anexo S – Analise de variância com 3 fatores (concentrações, fungos e tratamentos), dos dados provenientes das analises do 12º dia de inoculação com vinhaça e vinhaça + bagaço de cana-de-açúcar, no comprimento de onde 580 nm.

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Concentrações	2	7.1673293	3.5836647	815855.8692*
Fungos	2	161.9193027	80.9596513	18431246.5001*
Tratamentos	1	104.7677278	104.7677278	23851385.0361*
Concentrações x Fungos	4	3.0217497	0.7554374	171982.6257*
Concentrações x Tratamentos	2	2.2926752	1.1463376	260974.8262*
Fungos x Tratamentos	2	20.7034032	10.3517016	2356664.8395*
Concentrações x Fungos x Tratamentos	4	14.8124300	3.7031075	843048.1854*
Resíduos	36	0.0001581	0.0000044	
Total	53	314.6847760		

* 1% de significância; Coeficiente de Variação 0.041%

Anexo T – Analise de variância com 3 fatores (concentrações, fungos e tratamentos), dos dados provenientes das analises do 15º dia de inoculação com vinhaça e vinhaça + bagaço de cana-de-açúcar, no comprimento de onde 580 nm.

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Concentrações	2	43.8546481	21.9273240	12523572.9936*
Fungos	2	69.2523976	34.6261988	19776408.9818*
Tratamentos	1	12.0061879	12.0061879	6857214.8035*
Concentrações x Fungos	4	1.3725659	0.3431415	195981.8377*
Concentrações x Tratamentos	2	0.2365668	0.1182834	67556.3823*
Fungos x Tratamentos	2	2.7392981	1.3696491	782261.4337*
Concentrações x Fungos x Tratamentos	4	0.2422941	0.0605735	34595.9649*
Resíduos	36	0.0000630	0.0000018	
Total	53	129.7040215		

* 1% de significância; Coeficiente de Variação 0.021%

Anexo U – Analise de variância com 3 fatores (concentrações, fungos e tratamentos), dos dados provenientes das analises do 18º dia de inoculação com vinhaça e vinhaça + bagaço de cana-de-açúcar, no comprimento de onde 580 nm.

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Concentrações	2	27.7905594	13.8952797	36202.8205*
Fungos	2	112.3589563	56.1794781	146370.2496*
Tratamentos	1	71.6164810	71.6164810	186589.8819*
Concentrações x Fungos	4	3.1369466	0.7842366	2043.2535*
Concentrações x Tratamentos	2	7.5103097	3.7551548	9783.6963*
Fungos x Tratamentos	2	25.5575054	12.7787527	33293.8163*
Concentrações x Fungos x Tratamentos	4	0.6420983	0.1605246	418.2314*
Resíduos	36	0.0138174	0.0003838	
Total	53	248.6266741		

* 1% de significância; Coeficiente de Variação 0.412%

Anexo V – Analise de variância com 3 fatores (concentrações, fungos e tratamentos), dos dados provenientes das analises do 21º dia de inoculação com vinhaça e vinhaça + bagaço de cana-de-açúcar, no comprimento de onde 580 nm.

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Concentrações	2	26.1863094	13.0931547	2986973.1303*
Fungos	2	152.5055570	76.2527785	17395731.2890*
Tratamentos	1	51.5527706	51.5527706	11760858.5787*
Concentrações x Fungos	4	5.6177359	1.4044340	320396.9268*
Concentrações x Tratamentos	2	4.4413043	2.2206521	506602.7574*
Fungos x Tratamentos	2	63.3424249	31.6712125	7225230.5091*
Concentrações x Fungos x Tratamentos	4	5.1226350	1.2806587	292159.7844*
Resíduos	36	0.0001578	0.0000044	
Total	53	308.7688948		

* 1% de significância; Coeficiente de Variação 0,042%

Anexo W – Analise de variância com 3 fatores (concentrações, fungos e tratamentos), dos dados provenientes das analises do 30º dia de inoculação com vinhaça e vinhaça + bagaço de cana-de-açúcar, no comprimento de onde 580 nm.

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Concentrações	2	7.1899628	3.5949814	327284.4025*
Fungos	2	26.7156596	13.3578298	1216086.7856*
Tratamentos	1	354.2558234	354.2558234	32251183.8681*
Concentrações x Fungos	4	0.6179968	0.1544992	14065.4901*
Concentrações x Tratamentos	2	7.1899885	3.5949942	327285.5730*
Fungos x Tratamentos	2	26.7156854	13.3578427	1216087.9561*
Concentrações x Fungos x Tratamentos	4	0.6179710	0.1544928	14064.9048*
Resíduos	36	0.0003954	0.0000110	
Total	53	423.3034829		

* 1% de significância; Coeficiente de Variação 0,101%

Anexo X – Analise de variância com 3 fatores (concentrações, fungos e tratamentos), dos dados provenientes das analises do 3º dia de inoculação com vinhaça e vinhaça + bagaço de cana-de-açúcar, no comprimento de onde 680 nm.

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Concentrações	2	4.1989658	2.0994829	11423.9173*
Fungos	2	7.1812575	3.5906287	19537.6900*
Tratamentos	1	12.0944124	12.0944124	65809.3325*
Concentrações x Fungos	4	2.4613809	0.6153452	3348.2783*
Concentrações x Tratamentos	2	4.1989705	2.0994853	11423.9303*
Fungos x Tratamentos	2	7.1812623	3.5906311	19537.7030*
Concentrações x Fungos x Tratamentos	4	2.4613761	0.6153440	3348.2718*
Resíduos	36	0.0066161	0.0001838	
Total	53	39.7842415		

* 1% de significância; Coeficiente de Variação 1.149%

Anexo Y – Analise de variância com 3 fatores (concentrações, fungos e tratamentos), dos dados provenientes das analises do 6º dia de inoculação com vinhaça e vinhaça + bagaço de cana-de-açúcar, no comprimento de onde 680 nm.

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Concentrações	2	2.6766772	1.3383386	484.8582*
Fungos	2	12.1073271	6.0536635	2193.1432*
Tratamentos	1	331.9013408	331.9013408	120242.4235*
Concentrações x Fungos	4	1.0206466	0.2551616	92.4409*
Concentrações x Tratamentos	2	2.6766536	1.3383268	484.8539*
Fungos x Tratamentos	2	12.1073035	6.0536518	2193.1390*
Concentrações x Fungos x Tratamentos	4	1.0206701	0.2551675	92.4430*
Resíduos	36	0.0993697	0.0027603	
Total	53	363.6099886		

* 1% de significância; Coeficiente de Variação 1.649%

Anexo Z – Analise de variância com 3 fatores (concentrações, fungos e tratamentos), dos dados provenientes das analises do 9º dia de inoculação com vinhaça e vinhaça + bagaço de cana-de-açúcar, no comprimento de onde 680 nm.

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Concentrações	2	3.3546862	1.6773431	136405.9797*
Fungos	2	160.5045644	80.2522822	6526327.9553*
Tratamentos	1	30.5038900	30.5038900	2480657.0572*
Concentrações x Fungos	4	10.2271255	2.5567814	207924.2276*
Concentrações x Tratamentos	2	3.2926557	1.6463278	133883.7365*
Fungos x Tratamentos	2	115.2182834	57.6091417	4684927.8491*
Concentrações x Fungos x Tratamentos	4	15.5204548	3.8801137	315541.1142*
Resíduos	36	0.0004427	0.0000123	
Total	53	338.6221027		

* 1% de significância; Coeficiente de Variação 0,077%

Anexo AA – Analise de variância com 3 fatores (concentrações, fungos e tratamentos), dos dados provenientes das analises do 12º dia de inoculação com vinhaça e vinhaça + bagaço de cana-de-açúcar, no comprimento de onde 680 nm.

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Concentrações	2	0.4967514	0.2483757	19183.2240*
Fungos	2	396.4872875	198.2436437	15311288.2165*
Tratamentos	1	50.5224739	50.5224739	3902088.0786*
Concentrações x Fungos	4	7.4568747	1.8642187	143982.3681*
Concentrações x Tratamentos	2	0.1275858	0.0637929	4927.0244*
Fungos x Tratamentos	2	35.6686333	17.8343166	1377428.0837*
Concentrações x Fungos x Tratamentos	4	3.3931612	0.8482903	65517.4464*
Resíduos	36	0.0004661	0.0000129	
Total	53	494.1532338		

* 1% de significância; Coeficiente de Variação 0.096%

Anexo AB – Analise de variância com 3 fatores (concentrações, fungos e tratamentos), dos dados provenientes das analises do 15º dia de inoculação com vinhaça e vinhaça + bagaço de cana-de-açúcar, no comprimento de onde 680 nm.

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Concentrações	2	20.7671080	10.3835540	208589.9205*
Fungos	2	109.2458398	54.6229199	1097291.9811*
Tratamentos	1	71.4495249	71.4495249	1435313.0682*
Concentrações x Fungos	4	6.6671443	1.6667861	33483.2154*
Concentrações x Tratamentos	2	10.1735489	5.0867744	102185.6173*
Fungos x Tratamentos	2	26.4597757	13.2298878	265768.4698*
Concentrações x Fungos x Tratamentos	4	5.7027114	1.4256779	28639.7155*
Resíduos	36	0.0017921	0.0000498	
Total	53	250.4674450		

* 1% de significância; Coeficiente de Variação 0,134%

Anexo AC – Analise de variância com 3 fatores (concentrações, fungos e tratamentos), dos dados provenientes das analises do 18º dia de inoculação com vinhaça e vinhaça + bagaço de cana-de-açúcar, no comprimento de onde 680 nm.

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Concentrações	2	5.4331979	2.7165989	58075.2656*
Fungos	2	20.0857750	10.0428875	214696.1601*
Tratamentos	1	468.6840402	468.6840402	10019495.2851*
Concentrações x Fungos	4	0.4112747	0.1028187	2198.0506*
Concentrações x Tratamentos	2	17.6015681	8.8007841	188142.5583*
Fungos x Tratamentos	2	7.2549905	3.6274953	77548.3451*
Concentrações x Fungos x Tratamentos	4	6.0612618	1.5153155	32394.3100*
Resíduos	36	0.0016840	0.0000468	
Total	53	525.5337921		

* 1% de significância; Coeficiente de Variação 0,177%

Anexo AD – Analise de variância com 3 fatores (concentrações, fungos e tratamentos), dos dados provenientes das analises do 21º dia de inoculação com vinhaça e vinhaça + bagaço de cana-de-açúcar, no comprimento de onde 680 nm.

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Concentrações	2	11.6419742	5.8209871	21359.5118*
Fungos	2	132.8365855	66.4182927	243715.0751*
Tratamentos	1	60.0303288	60.0303288	220275.1005*
Concentrações x Fungos	4	40.6426814	10.1606704	37283.5320*
Concentrações x Tratamentos	2	1.4309508	0.7154754	2625.3632*
Fungos x Tratamentos	2	26.8311883	13.4155942	49227.1392*
Concentrações x Fungos x Tratamentos	4	23.0542580	5.7635645	21148.8055*
Resíduos	36	0.0098109	0.0002725	
Total	53	296.4777779		

* 1% de significância; Coeficiente de Variação 0,431%

Anexo AE – Analise de variância com 3 fatores (concentrações, fungos e tratamentos), dos dados provenientes das analises do 30º dia de inoculação com vinhaça e vinhaça + bagaço de cana-de-açúcar, no comprimento de onde 680 nm.

Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Concentrações	2	0.6234931	0.3117466	11366.9360*
Fungos	2	24.5983034	12.2991517	448452.9585*
Tratamentos	1	443.3547374	443.3547374	16165646.9268*
Concentrações x Fungos	4	2.4428144	0.6107036	22267.5387*
Concentrações x Tratamentos	2	0.6235212	0.3117606	11367.4484*
Fungos x Tratamentos	2	24.5983315	12.2991657	448453.4709*
Concentrações x Fungos x Tratamentos	4	2.4427863	0.6106966	22267.2825*
Resíduos	36	0.0009873	0.0000274	
Total	53	498.6849747		

* 1% de significância; Coeficiente de Variação 0,147%