



Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Biociências

Departamento de Micologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos

NICOLE ESTEFANÍA BARRERA PAREDES

**IMOBILIZAÇÃO DE AGARICOMYCETES PARA DESCOLORAÇÃO DE EFLUENTE DE LAVANDERIA
INDUSTRIAL DE CARUARU-PE.**

Recife

2020

NICOLE ESTEFANÍA BARRERA PAREDES

**IMOBILIZAÇÃO DE AGARICOMYCETES PARA DESCOLORAÇÃO DE EFLUENTE DE LAVANDERIA
INDUSTRIAL DE CARUARU-PE.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia de Fungos da Universidade
Federal de Pernambuco como requisito
parcial para obtenção do título de
Mestre em Biologia de Fungos.

Área de concentração: Fungos de Interesse Biotecnológico.

Orientadora: Dra. Tatiana Baptista Gibertoni (Departamento de Micologia, Centro de
Biociências, UFPE).

Co-Orientadora: Dra. Norma Buarque de Gusmão (Departamento de Antibióticos, Centro de
Biociências, UFPE).

Recife

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Barrera Paredes, Nicole Estefanía

Imobilização de Agaricomycetes para descoloração de efluente de lavanderia industrial de Caruaru-PE / Nicole Estefanía Barrera Paredes – 2020.

123 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Tatiana Baptista Gibertoni

Coorientadora: Norma Buarque de Gusmão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, 2020.

Inclui referências.

1. Agaricomycetes 2. Ecotoxicidade 3. Nanopartículas I. Gibertoni, Tatiana Baptista (orient.) II. Gusmão, Norma Buarque de (coorient.) III. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020-160

NICOLE ESTEFANÍA BARRERA PAREDES

IMOBILIZAÇÃO DE AGARICOMYCETES PARA DESCOLORAÇÃO DE EFLUENTE DE LAVANDERIA INDUSTRIAL DE CARUARU-PE.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Membro titular: Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão (Co-Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco / Departamento de Antibióticos

Membro titular: Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco / Departamento de Biologia

Membro titular: Prof. Dr. Petrus Santa Cruz
Universidade Federal de Pernambuco / Departamento de Química Fundamental

Membro suplente: Profa. Dra. Cristina de Souza Mota
Universidade Federal de Pernambuco / Departamento de Micologia

Membro suplente: Prof. Dr. Marcos Barbosa Lima
Universidade Federal Rural de Pernambuco / Departamento de Biologia

DEDICATORIA

Dedico este trabalho aos meus pais José Eduardo Barrera Cuesta e Jenny Patricia Paredes Caizapanta e ao meu irmão Juan José Barrera Paredes. Graças ao nosso amor de família, eu estou realizando meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar o seu amor, por me dar forças e por me ensinar que com humildade e perseverança, os sonhos podem ser tocados com as mãos.

Agradeço a minha família que sempre demonstram que desistir não é a opção para alcançar o sucesso, não apenas durante a faculdade e o mestrado, se não ao longo da minha vida.

A meus parentes e amigos em Equador e Brasil que estiveram presentes em todos os momentos, que me ajudaram a trilhar um caminho cheio de alegrias e carinho.

O meu agradecimento especial para a professora Dra. Norma Buarque de Gusmão que tem me apoiado desde a primeira vez que cheguei no Brasil e fiz meu trabalho de conclusão de curso junto com a minha amiga Lizeth, e durante todo o meu mestrado, me abrindo as portas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial LAMAI, assim como me abrindo seus braços quando tenho precisado de apoio, de conselho e de ajuda em diferentes momentos marcantes para mim. Ela é uma pesquisadora maravilhosa, que sempre me inspira, me apoia nas minhas ideias e me guia para melhorá-las com sua experiência e sabedoria, ela me incentiva a ser melhor pesquisadora. E como pessoa poderia escrever muitas páginas sobre o maravilhoso ser que ela é, mas não se preciso porque tenho certeza de que todos as pessoas que escutam o nome dela sentem um profundo carinho e respeito assim como eu. Amo a senhora.

Agradeço também a professora Dra. Tatiana Baptista Gibertoni, por ter me apoiado desde o início me acolhendo no seu projeto, sem a senhora eu não teria conseguido desenvolver a minha pesquisa. Muito obrigada.

Ao professor Dr. Petrus Santa Cruz, que abri as portas do Laboratório de Nanodispositivos Fotônicos LANDFOTON e do PONTO QUÂNTICO, que soube confiar, guiar e apoiar na realização primeiramente o TCC desenvolvido com Lizeth, e atualmente no desenvolvimento desta investigação. Admiro muito ao senhor pela sua inteligência, preparação e experiência em inovação, graças ao senhor eu abri minha mente a ideias que nem imaginava que poderiam se fazer realidade, suas aulas assim como trabalhar juntos tem sido uma grande inspiração para mim. Agradeço pela sua amizade e proteção incondicional desde que tenho chegado por primeira vez no Brasil, e por me incentivar para sempre conseguir o que me propôs em fazer.

Ao professor Dr. Eduardo Padrão, a Dra. Raquel Milani, o mestrando Dyego Maia do Departamento de Física e a mestranda Maria Clara Müller do Departamento de Química Fundamental da UFPE, pelo seu apoio na caracterização das nanopartículas com DLS, Potencial Z e MEV.

Para finalizar, quero agradecer especialmente a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco FACEPE, por ser o órgão que promove o desenvolvimento da pesquisa em Pernambuco financiando projetos como este para a melhora do Brasil.

RESUMO

A biorremediação micótica de efluentes provenientes de lavanderias industriais de jeans é um tratamento biotecnológico necessário para evitar a contaminação de corpos de água. Enzimas ligninolíticas imobilizadas tem demonstrado alta eficiência na biorremediação de efluentes da indústria têxtil. Na fase I desta pesquisa, avaliou-se a descoloração do corante índigo carmim e do efluente têxtil por sete espécies de Agaricomycetes da Caatinga (Brasil). O estresse nutricional devido à limitação de nitrogênio foi realizado com três tempos de experimentação, T1 (1 dia), T2 (4 dias) e T3 (7 dias). As porcentagens de descoloração no corante e efluente foram maiores que 55% usando os fungos F1, F2, F5 e F6 por 10 dias sem esterilidade. Na fase II, os microrganismos foram cultivados nos tempos de crescimento inicial, C_i1 (10 dias) e C_i2 (25 dias), sem adição de nutrientes. Seguiu-se a indução de estresse com limitação de nitrogênio em T1 e posteriormente, com testes de descoloração do corante índigo carmim e do efluente têxtil por 28 dias. Os melhores percentuais de descoloração foram encontrados para o efluente em C_i1, e para o corante em C_i2, com F1 e F5. O F5 apresentou melhor atividade enzimática de lacase e de lignina peroxidase. O análise ecotóxico das amostras tratadas biologicamente na fase II, foram testadas frente a cistos de *Artemia* HIGH 5 sem adição de alimento. Os valores obtidos para K_M e V_{max} indicam que os extratos possuem comportamento cinético Michaelis-Menten. A lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase sintetizadas pelos fungos *Phlebiopsis* sp., *Corioloopsis* sp. e *Phanerochaete chrysosporium*, foram imobilizadas em nanopartículas de quitosana (NanoQ), apresentando porcentagens de imobilização acima de 84%. Foi calculada a porcentagem de N-acetilação usando UV-Vis. Caracterizaram-se as NanoQ (com e sem enzimas imobilizadas) por DLS, Potencial Z e MEV. A eficiência da biorremediação após o reuso demonstrou ser maior nas NanoQ com enzimas. A impressão dos dispositivos foi realizada na impressora Dimatix Materials Printer DMP-2831 (FUJIFILM Dimatix Inc.), usando trehalose no fluido de impressão para proteger a conformação estrutural das enzimas. O acetato de celulose (AC) foi o substrato flexível para a impressão. A otimização das formas de onda de impulso elétrico para a formação das gotas do fluido, foram obtidas para a impressão por demanda Drop on Demand (DoD) baseada em propriedades piezoelétricas. Os resultados mostraram que sem condições de esterilidade, o menor tempo de crescimento sem adição de nutrientes (C_i1) e o estresse por limitação de nitrogênio (T1), aumentam a biodegradação do efluente. Porém, o maior tempo de crescimento sem adição de nutrientes C_i2 favoreceu a biodegradação do corante. Todas as amostras de efluente têxtil biorremediadas na fase II, não mostraram toxicidade frente a *Artemia* sp. em 48 horas de experimentação. A quantidade de proteínas totais foi maior após

impressão, devido ao aumento da concentração efetiva das enzimas após imobilização no biopolímero e a impressão. Os dispositivos impresos são uma inovação biotecnológica que usa impressão DoD, que permite adicionar camada sobre camada mais de um princípio ativo, permitindo a liberação do material biodegradável no local alvo de biorremediação.

PALAVRAS CHAVES: Estresse nutricional. Tempo de crescimento inicial. Ecotoxicidade. Imobilização de enzimas ligninolíticas. Biopolímero. Nanopartículas. Dispositivo impresso.

ABSTRACT

Mycotic bioremediation of effluents from industrial jeans laundries is a necessary biotechnological treatment to prevent contamination of water bodies. Immobilized ligninolytic enzymes have demonstrated high efficiency in the bioremediation of effluents from the textile industry. In phase I of this research, the discoloration of the indigo carmine dye and the textile effluent was evaluated by seven species of Agaricomycetes from Caatinga (Brazil). Nutritional stress due to nitrogen limitation was carried out with three experimentation times, T1 (1 day), T2 (4 days) and T3 (7 days). The percentage of discoloration in the dye and effluent was greater than 55% using fungi F1, F2, F5 and F6 for 10 days without sterility. In phase II, the microorganisms were grown in the initial growth times, C_i1 (10 days) and C_i2 (25 days), without adding nutrients. This was followed by stress induction with nitrogen limitation in T1 and later, with discoloration tests of the indigo carmine dye and the textile effluent for 28 days. The best percentages of discoloration were found for the effluent in C_i1, and for the dye in C_i2, with F1 and F5. F5 showed better enzyme activity of laccase and lignin peroxidase. The ecotoxic analysis of the samples biologically treated in phase II, were tested against *Artemia* HIGH 5 cysts without the addition of food. The values obtained for K_M and V_{max} indicate that the extracts have Michaelis-Menten kinetic behavior. Laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase synthesized by the fungi *Phlebiopsis* sp., *Coriolopsis* sp. and *Phanerochaete chrysosporium*, were immobilized on chitosan nanoparticles (NanoQ), with immobilization percentages above 84%. The percentage of N-acetylation was calculated using UV-Vis. NanoQ (with and without immobilized enzymes) was characterized by DLS, Potential Z and SEM. The efficiency of bioremediation after reuse proved to be higher in NanoQ with enzymes. The devices were printed on the Dimatix Materials Printer DMP-2831 (FUJIFILM Dimatix Inc.), using trehalose in the printing fluid to protect the structural conformation of the enzymes. Cellulose acetate (AC) was the flexible substrate for printing. The optimization of the electrical impulse waveforms for the formation of fluid droplets were obtained for Drop on Demand (DoD) printing based on piezoelectric properties. The results showed that without sterility conditions, the shorter growth time without the addition of nutrients (C_i1) and the stress due to nitrogen limitation (T1), increase the biodegradation of the effluent. However, the longer growth time without the addition of C_i2 nutrients favored the biodegradation of the dye. All samples of textile effluent bioremediation in phase II, did not show toxicity against *Artemia* sp. in 48 hours of experimentation. The amount of total proteins was higher after printing, due to the increase in the effective concentration of enzymes after immobilization in the biopolymer and printing. The printed devices are a biotechnological innovation that uses DoD printing, which allows you

to add layer upon layer to more than one active ingredient, allowing the release of biodegradable material in the bioremediation site.

KEY WORDS: Nutritional stress. Initial growth time. Ecotoxicity. Immobilization of ligninolytic enzymes. Biopolymer. Nanoparticles. Printed device.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa geográfico do estado de Pernambuco em destaque para a Mesorregião Agreste.	21
Figura 2 -	Estrutura química do C.I. Vat Yellow.....	25
Figura 3 -	Estrutura química do corante Preto Reativo 5.....	25
Figura 4 -	Estrutura química do corante Orange disperse 30	25
Figura 5 -	Estrutura química do corante vermelho congo	26
Figura 6 -	Estrutura química do corante C.I. Acid Blue 47	26
Figura 7 -	Estrutura química de corantes. Formação de complexo do corante, do grupo hidroxila azo e água.	26
Figura 8 -	Estrutura química do corante Bismark brown (CI basic brown 1)	27
Figura 9 -	Estrutura química de corante sulfúrico.....	27
Figura 10 -	Estrutura molecular: a) corante índigo e do b) corante índigo carmim	28
Figura 11 -	Estrutura química da lignina	32
Figura 12 -	Estrutura ternaria da lacase de <i>T. versicolor</i>	33
Figura 13 -	Ciclo catalítico da lacase	33
Figura 14 -	Transformações redox do ABTS	34
Figura 15 -	Estrutura ternaria da lignina peroxidase de <i>P. chrysosporium</i>	35
Figura 16 -	Ciclo catalítico da lignina peroxidase	35
Figura 17 -	Estrutura ternaria da Manganês Peroxidase de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	36
Figura 18 -	Ciclo catalítico da manganês peroxidase	37
Figura 19 -	Mecanismo de degradação do corante Índigo por <i>Phormidium</i>	38
Figura 20 -	Estrutura química de (A) quitina e (B) quitosana.....	39
Figura 21 -	Escala referencial de tamanho macro, micro e nano	40
Figura 22 -	Complexo de enzimas imobilizadas em nanopartículas de quitosana	41
Figura 23 -	Espectro de luz visível	41
Figura 24 -	Representação gráfica das flutuações de intensidade segundo o tamanho das partículas. (A) partículas grandes, (B) partículas pequenas.....	42
Figura 25 -	Radio hidrodinâmico d(H) determinado por DLS.....	43
Figura 26 -	(A) Camada difusa (atmosfera carregada) rodeando ao coloide, (B) Potencial Zeta contra Potencial Superficial.	43
Figura 27 -	Configuração interna e externa do MEV.....	44
Figura 28 -	<i>Artemia franciscana</i> , (A) nauplio (48 horas); (B) artemia adulta	46
Figura 29 -	Estrutura química do acetato de celulose	47
Figura 30 -	Ilustração esquemática da operação de uma impressora DoD com atuador piezoelétrico.....	48
Figura 31 -	Exemplos de materiais imprimíveis mediante impressoras DoD	49
Figura 32 -	Impressora Dimatix Materials Printer (DMP-2831-FUJIFILM)	50
Figura 33 -	Formação das gotas de fluidos newtonianos na impressora DMP 2831 – Fujifilm	51
Figura 34 -	Representação dos da influencia dos números <i>Re</i> e <i>We</i> na região de impressão	52
Figura 35 -	Formação de gotas satélites	53

Figura 36 -	Aplicativo de Steven Habbott. Fluido imprimível cumpre com os parâmetros e se encontra dentro da região de impressão.....	53
Figura 37 -	Método de coleta do efluente têxtil na estação de tratamento de lavanderia no município de Caruaru-PE.....	55
Figura 38 -	Reativação de 7 espécies de Agaricomycetes coletados entre 2010 – 2014.....	55
Figura 39 -	Fermentação líquida e descoloração do corante índigo carmim e do efluente têxtil (fase I)	56
Figura 40 -	Avaliação da ecotoxicidade em <i>Artemia</i> HIGH 5	58
Figura 41 -	Concentração por precipitação etanólica dos extratos enzimáticos.....	59
Figura 42 -	Método de quantificação de proteínas totais	59
Figura 43 -	Metodologia para determinar a atividade enzimática da lacase.....	60
Figura 44 -	Metodologia para determinar a atividade enzimática da lignina peroxidase	60
Figura 45 -	Metodologia para determinar a atividade enzimática da manganês peroxidase.....	61
Figura 46 -	Esquema da determinação da cinética enzimática dos extratos em placa de Elisa	62
Figura 47 -	Imobilização das enzimas dos extratos em nanopartículas de quitosana	63
Figura 48 -	Primeiro passo - Replace Cartridge	65
Figura 49 -	Segundo passo - (A) Select Pattern, (B) Padrão de impressão.....	65
Figura 50 -	Terceiro passo – Load / Unload Substrate	66
Figura 51 -	Quarto passo - Print Set-Up	66
Figura 52 -	(A) Ferramenta Cartridge Settings, (B) Waveform.....	67
Figura 53 -	Ferramenta Drop Watcher.....	67
Figura 54 -	Esquema geral do uso da impressora Dimatix printer mediante tecnologia DoD.....	68
Figura 55	Leitura da absorbância do efluente da lavanderia têxtil (A) e do corante índigo carmim (B), Coordenadas cromáticas do corante índigo carmim e do efluente têxtil graficadas no software Spectra Lux Trial (C).....	77
Figura 56 -	Cinética de descoloração de (A) efluente têxtil puro e (B) corante índigo carmim por Agaricomycetes.	78
Figura 57 -	Descoloração do (A) efluente têxtil puro e (B) corante índigo carmim na Fase II da pré-seleção com tempo de crescimento inicial Ci1 de 20 dias.	80
Figura 58 -	Descoloração do (A) efluente têxtil puro e (B) corante índigo carmim na Fase II da pré-seleção com tempo de crescimento inicial Ci2 de 45 dias.	82
Figura 59 -	Fase experimental de ecotoxicidade. <i>Artemia</i> sp. em contato com o corante e o efluente têxtil tratados biologicamente na fase II da pré-seleção por descoloração	86
Figura 60 -	% Supervivência de <i>Artemia</i> sp. em Ci1 (A) para o corante índigo carmim e (B) para efluente têxtil puro.	87
Figura 61 -	% Supervivência de <i>Artemia</i> sp. em Ci2 (A) para o corante índigo carmim e (B) para efluente têxtil puro	88
Figura 62 -	Observação de grampos de conexão nos Agaricomycetes (A) F1 e (B) F5	89
Figura 63 -	Resultado visual da quantificação de proteínas totais e da atividade enzimática da lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase.	91

Figura 64 -	Cinética enzimática dos extratos de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (FM), testado em diferentes volumes. O experimento se repete para <i>Phlebiopsis</i> sp (F1) e <i>Corioloopsis</i> sp (F5).	93
Figura 65 -	Comportamento cinético enzimático de Michaelis – Menten dos três fungos em diferentes volumes de extrato enzimático (A) 10 µL, (B) 25 µL, (C) 50 µL e (D) 100 µL.....	93
Figura 66 -	Espectrofotometria UV-Vis da quitosana pura, quitosana em forma de nanopartículas (NanoQ), nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (NanoQ + E-FM), nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo <i>Phlebiopsis</i> sp (NanoQ + E-F1) e nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo <i>Corioloopsis</i> sp (NanoQ + E-F5).....	94
Figura 67 -	Efeito Tyndall na faixa de tamanho nano: (Fig. 67 A) quitosana em forma de nanopartículas (NanoQ), (Fig. 67 B) nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (NanoQ + E-FM), (Fig. 67 C) nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo <i>Phlebiopsis</i> sp (NanoQ + E-F1) e (Fig. 67 Cd) nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo <i>Corioloopsis</i> sp (NanoQ + E-F5).....	94
Figura 68 -	Distribuição do diâmetro hidrodinâmico de (A) NanoQ, (B) NanoQ + E-FM (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>), (C) NanoQ + E-F1 (<i>Phlebiopsis</i> sp) e (D) NanoQ + E-F5 (<i>Corioloopsis</i> sp).	96
Figura 69 -	Representação gráfica da imobilização de enzimas ligninolíticas em nanopartículas de quitosana.....	98
Figura 70 -	Amostras analisadas por MEV. (A) NanoQ, (B) NanoQ + E-FM (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>), (C) NanoQ + E-F1(<i>Phlebiopsis</i> sp) e (D) NanoQ + E-F5 (<i>Corioloopsis</i> sp).	99
Figura 71 -	Histogramas de distribuição dos tamanhos encontrados nas amostras. (A) NanoQ, (B) NanoQ + E-FM, (C) NanoQ + E-F1 e (D) NanoQ + E-F5	100
Figura 72 -	Porcentagens de descoloração do corante índigo carmim antes e após o reuso das (A) nanopartículas de quitosana sem enzima – NanoQ, (B) nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo FM – NanoQ + E-FM (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>), (C) nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo F1 – NanoQ + E-F1 (<i>Phlebiopsis</i> sp) e (D) nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo F5 – NanoQ + E-F5 (<i>Corioloopsis</i> sp).	101
Figura 73 -	Descoloração do corante índigo carmim 50 ppm (A) antes do reuso e (B) após o reuso	101
Figura 74 -	Parâmetros de impressão para o fluido, mostrando que se situa (ponto vermelho) dentro da região imprimível (área verde) em DoD.	104
Figura 75 -	Dispositivos impressos, (A) NanoQ, (B) NanoQ + E-FM (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>), (C) NanoQ + E-F1 (<i>Phlebiopsis</i> sp) e (D) NanoQ + E-F5 (<i>Corioloopsis</i> sp).	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estruturas dos grupos cromóforos dos principais corantes usados na indústria têxtil	24
Tabela 2 -	Características dos corantes utilizados nas operações de tingimento.	27
Tabela 3 -	Efluentes gerados pelas diferentes etapas do processo têxtil.....	29
Tabela 4 -	Taxonomia de <i>Artemia</i> sp.	45
Tabela 5 -	Parâmetros de controle recomendados para impressão DoD de fluidos com atuação piezoelétrica, na impressora DMP 2831 – Fujifilm.	50
Tabela 6 -	Matriz do desenho fatorial (4 ²) descoloração do corante índigo carmim (CIC) e do efluente têxtil puro (ETP) por fungos agaricomycetes crescidos em diferentes tempos iniciais (Ci1 e Ci2), e para Supervivência de <i>Artemia</i> HIGH 5.....	69
Tabela 7 -	Matriz do desenho fatorial (4 ²) para a descoloração do corante índigo carmim 50 ppm por enzimas imobilizadas em nanopartículas de quitosana com e sem o seu reuso.	73
Tabela 8 -	Comparação das caracterização do efluente em estudo com normas brasileiras.	75
Tabela 9 -	Valores percentuais da descoloração alcançada durante 10 dias nos tempos de fermentação T1, T2 y T3.	79
Tabela 10 -	Valores percentuais da descoloração do índigo carmim e do efluente têxtil após o experimento com os tempos de crescimento inicial C _i 1 e C _i 2.	84
Tabela 11 -	Análise estatística ANOVA da descoloração do corante índigo carmim (CIC) e do efluente têxtil puro (ETP), por 4 fungos agaricomycetes submetidos a diferentes tempos de crescimento iniciais (Ci1 e Ci2).	85
Tabela 12 -	Porcentagem de sobrevivência de <i>Artemia</i> HIGH 5 após o contato com o corante índigo carmim e o efluente tratados na fase II de Pré-seleção por descoloração.	86
Tabela 13 -	Análise estatística ANOVA da sobrevivência de <i>Artemia</i> sp.	88
Tabela 14 -	Valores quantificados de proteínas totais e atividade enzimática nos extratos dos fungos <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (FM), <i>Phlebiopsis</i> sp (F1) e <i>Coriolopsis</i> sp (F5).....	92
Tabela 15 -	Valores de KM e Vmax calculados a diferentes volumes de extrato nos três fungos <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (FM), <i>Phlebiopsis</i> sp (F1) e <i>Coriolopsis</i> sp (F5).	92
Tabela 16 -	Grau de N-acetilação para a quitosana pura, nanopartículas de quitosana sem enzimas e nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas dos fungos <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (FM), <i>Phlebiopsis</i> sp (F1) e <i>Coriolopsis</i> sp (F5)....	95
Tabela 17 -	Porcentagem de imobilização enzimática dos fungos <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (FM), <i>Phlebiopsis</i> sp (F1) e <i>Coriolopsis</i> sp (F5) em nanopartículas de quitosana.....	95
Tabela 18 -	Valores do potencial Z encontrados nas amostras NanoQ, NanoQ + E-FM (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>), NanoQ + E-F1 (<i>Phlebiopsis</i> sp) e NanoQ + E-F5 (<i>Coriolopsis</i> sp)	97
Tabela 19 -	Análise estatística ANOVA da descoloração do corante índigo carmim 50 ppm por enzimas imobilizadas em nanopartículas de quitosana sem o seu reuso...	103

Tabela 20 -	Análise estatística ANOVA da descoloração do corante índigo carmim 50 ppm por enzimas imobilizadas em nanopartículas de quitosana com o seu reuso...	103
Tabela 21 -	Quantificação de proteínas totais dos dispositivos impressos e porcentagem de aumento da concentração efetiva das enzimas em solução. FM (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>), F1 (<i>Phlebiopsis</i> sp) e F5 (<i>Coriolopsis</i> sp)	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOGIA

C.I.: Colour Index

CAS: Chemical Abstracts Service

a.C.: antes de Cristo

CI: índigo carmim

DQO: Demanda Química de Oxigênio

DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio

ST: Solidos Totais

SDT: Solidos Dissolvidos Totais

SST: Solidos Suspensos Totais

LiP: Lignino Peroxidase

MnP: Manganês Peroxidase

Lac: Lacase

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico)

K_M: Constante de Michaelis

V_{max}: Velocidade máxima de reação

GlcNAc: N-Acetilglicosamina

GlcN: Glicosamina

TPP: Tripolifosfato de sódio

UV-Vis: Ultravioleta Visível

λ: longitude de onda

DLS: Espectro Dinâmico de Luz / Dynamic Light Scattering

Potencial Z: Potencial Zeta

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

AC: Acetato de Celulose

DoD: Drop on Demand

DMP: Dimatix Material Printer

τ : Tensão de cisalhamento

η : Viscosidade dinâmica

$(dv_x)/dy$: gradiente de velocidade

Re: Número de Reynolds

We: Número de Weber

Oh: Número de Ohnesorge

Z: Região de impressão

v: Velocidade de impressão

a: Diâmetro do bico do cartucho de impressão

ρ : Densidade

σ : Tensão superficial do fluido

ITEP: Instituto de Tecnologia de Pernambuco

T1: Tempo de experimentação de 1 dia

T2: Tempo de experimentação de 4 dias

T3: Tempo de experimentação de 7 dias

C₁: Tempo de crescimento inicial de 20 dias

C₂: tempo de crescimento inicial de 45 dias

F1: *Phlebiopsis* sp.

F5: *Coriolopsis* sp.

FM: *Phanerochaete chrysosporium*

Abs: Absorbância medida por espectrofotometria

BSA: Soro Albumina Bovina

ϵ : Coeficiente de extinção para a catálise de reação

Δ Abs: Diferencial de absorbância

V_T: Volume total de reação

d: Distancia que passa o raio de incidência através da a mostra

Δt : Diferencial do tempo de reação

V_m: Volume de amostra

V: Velocidade de reação em uma concentração específica do corante

[S]: Concentração do corante

V_s: Volume da solução

m: Massa da quitosana

AE: Atividade Enzimática

NanoQ: Nanopartículas de quitosana sem enzimas

NanoQ + E-FM: Nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo *Phanerochaete chrysosporium*

NanoQ + E-F1: Nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo *Phlebiopsis* sp.

NanoQ + E-F5: Nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo *Coriolopsis* sp.

:

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	HIPÓTESE	22
4	REFERENCIAL TEÓRICO	23
4.1	CORANTES TÊXTEIS	23
4.1.1	Classificação dos corantes	25
4.2	EFLUENTE TÊXTIL	29
4.3	TRATAMENTO BIOLÓGICO DO EFLUENTE TÊXTIL	30
4.4	ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS	31
4.4.1	Lacase	32
4.4.2	Lignina peroxidase	34
4.4.3	Manganês peroxidase	36
4.4.4	Enzimas ligninolíticas na biorremediação de efluentes têxteis.	37
4.5	IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	39
4.5.1	Biopolímero quitosana	39
4.6	CARATERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA	41
4.6.1	Espectroscopia Ultravioleta Visível (UV-Vis)	41
4.6.2	Espectro Dinâmico de Luz (DLS)	42
4.6.3	Potencial Zeta	43
4.6.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	44
4.7	MODELO BIOLÓGICO <i>Artemia</i> sp.	44
4.7.1	Análise ecotóxico do substrato de impressão	46
4.8	IMPRESSÃO DE FLUIDOS SOB DEMANDA – <i>Drop-on-Demand</i> (DoD)	48
4.8.1	Impressora de materiais Dimatix Materials Printer (DMP 2831)	50
4.8.2	Fluido de impressão	50
4.9	ATIVIDADE ENZIMÁTICA APÓS IMPRESSÃO	54
5	MATERIAIS E MÉTODOS	55
5.1	CARATERIZAÇÃO DO EFLUENTE TÊXTIL	55
5.2	FERMENTAÇÃO LÍQUIDA	55
5.3	DESCOLORAÇÃO	57
5.4	ECOTOXICIDADE EM <i>Artemia</i> sp. (HIGH 5 - INVE)	57

5.5	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DOS FUNGOS.....	58
5.6	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS E ATIVIDADE DE ENZIMAS DEGRADADORAS DE LIGNINA.....	58
5.7	CINÉTICA ENZIMÁTICA DOS EXTRATOS.....	61
5.8	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS EM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA.....	62
5.9	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COM ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS IMOBILIZADAS.	64
5.10	REUSO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COM ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS IMOBILIZADAS.	64
5.11	FABRICAÇÃO DO DISPOSITIVO IMPRESSO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COM ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS IMOBILIZADAS POR TECNOLOGIA DOD.	64
5.12	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DO DISPOSITIVO IMPRESSO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COM ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS IMOBILIZADAS POR TECNOLOGIA DOD.	68
5.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
5.13.1	Descoloração do corante índigo carmim (CIC) e do efluente têxtil puro (ETP) por fungos agaricomycetes crescidos em diferentes tempos iniciais (C_i1 e C_i2)	69
5.13.2	Supervivência de <i>Artemia</i> HIGH 5	71
5.13.3	Descoloração do corante índigo carmim 50 ppm por enzimas imobilizadas em nanopartículas de quitosana com e sem o seu reuso.	72
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
6.1	CARATERIZAÇÃO DO EFLUENTE TÊXTIL.....	75
6.2	FASE I DE PRÉ-SELEÇÃO POR DESCOLORAÇÃO DO CORANTE ÍNDIGO CARMIM E DO EFLUNTE TÊXTIL, BASEADO OS TEMPOS DE FERMENTAÇÃO T1, T2 E T3.	76
6.3	FASE II DE PRÉ-SELEÇÃO POR DESCOLORAÇÃO DO CORANTE ÍNDIGO CARMIM E DO EFLUENTE TÊXTIL, BASEADO OS TEMPOS DE CRESCIMENTO INICIAL C _i 1 E C _i 2.....	79
6.4	ECOTOXICIDADE EM <i>Artemia</i> sp. (HIGH 5 - INVE).....	85
6.5	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DOS FUNGOS.....	89
6.6	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS E ATIVIDADE DE ENZIMAS DEGRADADORAS DE LIGNINA.....	90
6.7	CINÉTICA ENZIMÁTICA DOS EXTRATOS.....	92
6.8	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS EM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA.....	94
6.9	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS FORMADAS DE QUITOSANA E ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS.....	95
6.10	REUSO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COM ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS IMOBILIZADAS.....	100

6.11	FABRICAÇÃO DO DISPOSITIVO IMPRESSO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COM ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS IMOBILIZADAS POR TECNOLOGIA DoD	103
6.12	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DOS DISPOSITIVOS IMPRESSOS DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COM ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS IMOBILIZADAS, POR TECNOLOGIA DoD.....	104
7	CONCLUSÕES	106
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

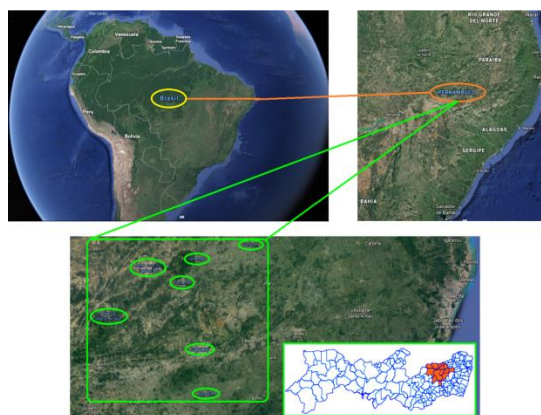
1. INTRODUÇÃO

Ao nível mundial, a indústria têxtil é um setor de grande importância econômica, que desenvolve um movimento comercial muito grande e gera fontes de emprego nas sociedades. Uma das principais características desse tipo de indústria é o grande volume de água, químicos e corantes que são fundamentais na criação de produtos [1]. A contaminação dos corpos hídricos pela indústria têxtil é uma problemática em muitas partes do Brasil. O país é considerado um dos 10 maiores produtores têxteis, por conta da criação de empresas privadas com o objetivo de desenvolver a economia [2]. Entretanto, a fabricação de tecidos gera quantidade de efluente nos processos de limpeza, tingimento e acabamentos, com a utilização aproximadamente dezoito litros de água/peça além do uso de vinte toneladas de corantes. Vinte por cento desses corantes não se fixam as fibras sendo descartados em estações de tratamento, com tratamento ou não são descartados em corpos hídricos [3].

Entre os anos 1990 e 2011, o consumo mundial de fibras têxteis de origem natural e sintético aumento em 3,5%, passando de 44 até 82 milhões de toneladas de produtos têxteis. Também o consumo das fibras sintéticas sobressaiu as fibras naturais de 48% até 66%, considerando o aumento da população mundial de 1.3% [4]. No Brasil a região metropolitana de São Paulo, Campinas – SP, Vale d Itajaí – SC representam o segmento mais importante da indústria têxtil no Brasil, e no Nordeste, o principal centro têxtil se encontra na região metropolitana de Fortaleza, mas também tem alta importância na Mata paraibana – PB, leste potiguar – RN, Agreste pernambucano – PE e a região metropolitana de Salvador – BA [5].

No Agreste pernambucano, o maior desenvolvimento privado de indústria têxtil se encontra nas cidades de Santa Cruz do Capibaribe, Caruaru e Toritama, e em menor nível está presente nos municípios próximos como Surubim, Vertentes, Brejo da Madre de Deus e Agrestina como se indica na Figura 1. Os efluentes das lavandarias têxteis do Agreste são dispensados nos diferentes corpos hídricos como os rios Ipojuca e Capibaribe que abastecem de água aos municípios da região, comprometendo a qualidade [6].

Figura 1 Mapa geográfico do estado de Pernambuco em destaque para a Mesorregião Agreste.



Fonte: [7]

Nesse contexto, a procura de soluções viáveis e ambientalmente sustentável tem estimulados a procura de tecnologias que possam remediar ambientes impactados por corantes, principalmente no Agreste pernambucano. Pois, os municípios de Santa Cruz do Capibaribe, Caruaru e Toritama são responsáveis pela produção de 77% das confecções do estado de Pernambuco, sendo Caruaru responsável pela produção de 24,1%. Para o tingimento dessas peças há necessidade de 18L de água/peça, entretando nesses Municípios há escassez água. A estação de tratamento desse efluente deve ser eficiente para que aumente os percentuais de reuso da água. Contudo, não ocorre e as água com altos teores de metais são descartados nos corpos hídricos [8].

Para as indústrias, o processo de remediar esses efluentes demandam muitos esforços, e representa um custo elevado, portanto precisam de metodologias que abaxiem os custos, e que sejam amigáveis com o meio ambiente [3].

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Criar um dispositivo impresso replicável de enzimas produzidas por Agaricomycetes da Caatinga pernambucana, imobilizadas em nanopartículas de quitosana, sobre um suporte de acetato de celulose com tecnologia Drop-on-Demand (DoD) para tratar o efluente têxtil coletado em lavanderia industrial do município de Caruaru-PE.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar físico-quimicamente o efluente têxtil;
- Pré-selecionar espécies de fungos com capacidade em descolorir o corante índigo carmim e o efluente têxtil;
- Definir o melhor método de limitação nutricional para a estimulação da produção das enzimas de interesse nos fungos;
- Realizar novos ensaios de descoloração do corante e do efluente têxtil usando os parâmetros definidos, para selecionar os fungos a trabalhar nas seguintes etapas;
- Testar ecotoxicidade do produto residual dos fungos pré-selecionados em *Artemia* sp;
- Imobilizar as enzimas do extrato mediante a formação de nanopartículas de quitosana, e caracterizar o nanomaterial formado por UV-Vis, DLS, Potencial Z e MEV;
- Imprimir por DoD as nanopartículas com enzimas imobilizadas sobre acetato de celulose;
- Testar os dispositivos obtidos de forma quantitativa;
- Validar estatisticamente os resultados obtidos.

3. HIPÓTESE

Dispositivos impregnados com mistura de enzimas ligninolíticas imobilizadas em nanopartículas de quitosana remediaram efluente têxtil de lavanderia industrial do município de Caruaru-PE.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. CORANTES TÊXTEIS

Os corantes são os responsáveis pelo tingimento durante a coloração dos tecidos, além de serem moléculas compostas por um grupo cromóforo que é responsável pela cor, caracterizado por absorver a luz do espectro visível no comprimento de onda entre 400 – 700 nm, e um grupo auxocromo que permite a ligação do corante à fibra do tecido [9]. Antigamente, por volta de 3000 a.C., foi registrado o uso dos corantes de origem natural com o índigo carmim, e no século 15 a.C. os Fenícios extraíram o tirian roxo a partir de caracóis marinhos. A partir de 1856 os corantes começaram ser sintetizados pelo químico William H. Perkin, ele gerou o corante malva, também conhecido como anilina, o fúcsia brilhante, e em 1958, os corantes azo foram sintetizados por P. Gries [10].

A partir do desenvolvimento dos corantes de forma sintética para uso na indústria têxtil, se gerou a necessidade de classificá-los baseado na sua fonte, estrutura química, solubilidade e aplicação [11].

A estrutura química dos corantes têxteis está conformada por anéis aromáticos, por grupos cromóforos que são os receptores de elétrons e proporcionam a cor ao tecido, e por grupos ionizáveis auxocromos que são doadores de elétrons e permitem a ligação do corante na fibra têxtil. O conjunto destes dois grupos funcionais é chamado de cromogênio [12], [13], [14], [15], [16], [17], [18]. Os corantes têxteis são classificados relacionados aos grupos cromóforos que estão presentes na estrutura química, em azo, antraquinona, trifenilmetano, indigoide, nitro, nitroso, entre outros. Os corantes do tipo azo, além da indústria têxtil são usados no tingimento de plásticos, couro, alimentos e cosméticos, portanto são muito comuns na contaminação de rios e águas subterrâneas, e sua remoção tem sido de interesse social e ecológico durante os últimos anos (19; 20). Na Tabela 1. se encontram as estruturas dos cromóforos dos principais corantes usados na indústria têxtil.

Tabela 1 Estruturas dos grupos cromóforos dos principais corantes usados na indústria têxtil

Grupos cromóforos	Estruturas	Exemplos de corantes
Azo		 Disperse red 5
Índigoide		 Índigo carmim
Antraquinona		 Reativo azul 4
Nitro		 Amarelo ácido 24
Nitroso		 Verde rápido
Trifenilmetilênico		 Solochrome cyanine R

Fonte: Adaptado de [21], [18].

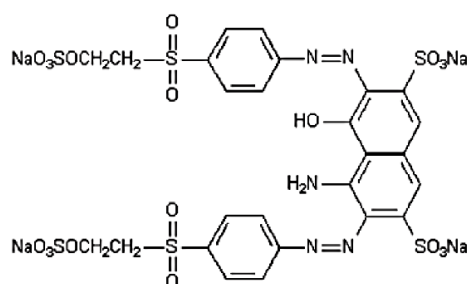
Os corantes sintéticos são usados em quantidades durante o tingimento na indústria têxtil, entretanto, a maior parte destes é desperdiçada, e o seu despejo nos corpos hídricos acarreta um grave desequilíbrio ambiental devido à sua alta concentração e a toxicidade de cada tipo de corante [22].

4.1.1. Classificação dos corantes

O sistema de classificação internacional Colour Index (C.I.) criado e publicado pela *Association of Textile Chemists* na *Colorists* e pela *The Society of Dyers and Colourists*, os corantes industriais são classificados de acordo a sua natureza química e ao método de aplicação em:

Corantes à tinta ou Vat: aqui se encontram os indigoides e os antraquinôninos (Fig. 2). Possuem um grupo acetônico que os torna insolúveis em água, mas se são reduzidos em solução alcalina, o grupo acetônico se reduz e fica solúvel, passando a ter afinidade química por fibras celulósicas.

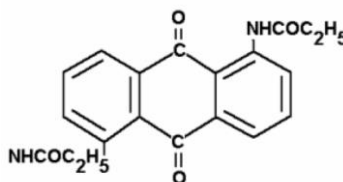
Figura 2 Estrutura química do C.I. Vat Yellow



Fonte: [18]

Corantes reativos: são conhecidos como azoicos, eles possuem um ou mais grupos azo na sua estrutura, podem ser chamados de diazo, triazo, etc (Fig. 3). Tem afinidade por fibras de algodão e celulósicas.

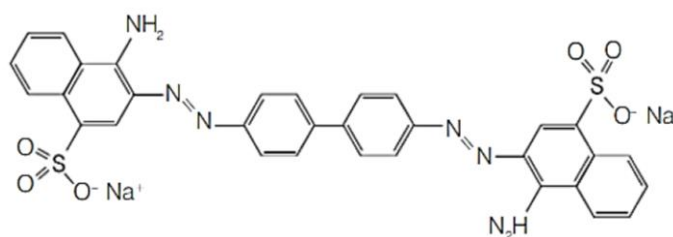
Figura 3 Estrutura química do corante Preto Reativo 5



Fonte: [23]

Corantes dispersos: são insolúveis em água e são aplicados por dispersão (Fig. 4). Tem afinidade por fibras hidrofóbicas como acetato de celulose, náilon, triacetato, acrílicos e poliéster.

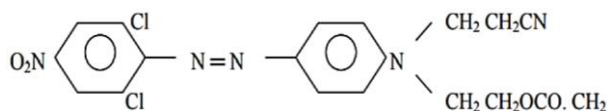
Figura 4 Estrutura química do corante Orange disperse 30



Fonte: [18]

Corantes diretos: O vermelho congo é o representante deste grupo (Fig. 5). São corantes aniônicos para fibras celulósicas, aplicados em banhos aquosos de pH neutro ou levemente alcalino em ebulição.

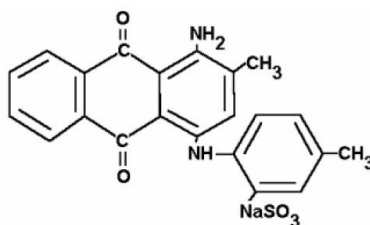
Figura 5 Estrutura química do corante vermelho congo.



Fonte: [24]

Corantes ácidos: alguns precisam ser metalizados para ser bastante mais estáveis e preservar sua estrutura durante o tingimento, possuem um ou mais ions metálicos (Fig. 6) Tem afinidade por lã, seda, couro e algumas fibras acrílicas, são solúveis em água.

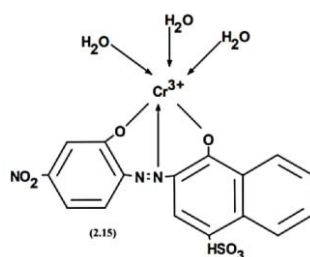
Figura 6 Estrutura química do corante C.I. Acid Blue 47



Fonte: [18]

Corantes mordentes: estes são considerados uma subclasse de corantes ácidos, podem combinar-se ao mesmo tempo com a fibra e com uma substância mordente (que pode ser um complexo metálico de alumínio, cromo, estanho ou ferro) formando uma ligação forte (Fig. 7).

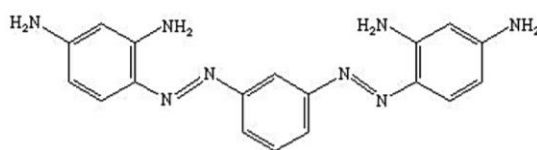
Figura 7 Estrutura química de corantes. Formação de complexo do corante, do grupo hidroxila azo e água.



Fonte: [18]

Corantes básicos: são catiônicos pela presença de grupos amino (Fig. 8). São solúveis em água e tem afinidade por lã, seda, fibras acrílicas e acetato de celulose. Apresentam cores fortes e fosforescentes e a matéria prima da sua síntese é a benzidina CAS-92-87-5 que é carcinogênica. CAS – Chemical Abstracts Service.

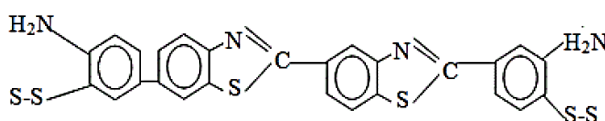
Figura 8 Estrutura química do corante Bismark brown (CI basic brown 1)



Fonte: [25]

Corantes ao enxofre: São insolúveis em água, mas reduzidos se tornam solúveis, adquirindo afinidade com fibras celulósicas (Fig. 9). São resistentes à luz e a lavagem mas não ao cloro.

Figura 9 Estrutura química de corante sulfúrico.



Fonte: [26]

Corantes naturais: eles são sintetizados de forma natural usando pouco ou nenhum produto químico. São encontrados em todas as formas antes descritas, com exceção dos tipos dispersos, azoicos e de enxofre. A utilização destes corantes no tingimento só é possível na presença de metais pesados, e como consequência, o efluente têxtil é rico em íons metálicos. Tanto os corantes sintéticos como os naturais são tóxicos. Na Tabela 2. Estão detalhados dados relacionados aos tipos de corantes e as quais as fibras têm afinidade, também o percentual de fixação às fibras e possíveis poluentes gerados nos processos de tingimento.

Tabela 2 Características dos corantes utilizados nas operações de tingimento.

Classe de corantes	Tipo de fibras	Fixação típica (%)	Poluentes
Cuba (À tina)	Algodão e outras Fibras celulósicas	80-95	Cor, álcalis, agentes oxidantes, agentes redutores, etc.
Reativos	Algodão, Lã e outras fibras celulósicas.	60-90	Cor, sal, álcalis, corantes hidrolisados, surfactantes, antiredutores orgânicos, antiespumantes, etc.
Dispersos	Poliéster, Acetato e outras fibras sintéticas	80-90	Cor, ácidos orgânicos, agentes de igualização, fosfatos, antiespumantes, lubrificantes, dispersantes, etc.
Diretos	Algodão, Raion e Demais fibras celulósicas	70-95	Cor, sal, corante não fixado, fixadores; agentes catiônicos surfactantes, antiespumante, agentes retardantes e igualizantes, etc.

Ácidos	Lã e Poliamida	80-93	Cor, ácidos orgânicos e corantes não fixados.
Básicos	Acrílico e alguns tipos de poliéster	97-98	Fixação quase que total na fibra. Sal, ácidos orgânicos, retardantes, dispersantes, etc.
Enxofre ou sulfurados	Algodão e outras fibras celulósicas	60-70	Cor, sal, álcalis, agentes oxidantes, agentes redutores e corantes não fixados, etc.

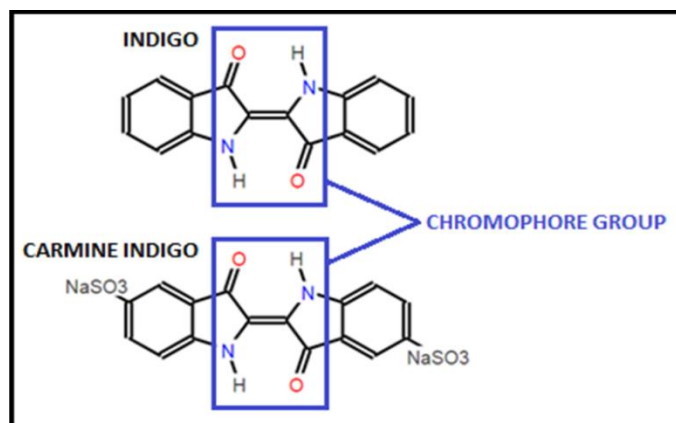
Fonte: [27]

4.1.1.1. Corante índigo carmim

O corante índigo é muito usado na indústria têxtil para colorir tecidos jeans, mas antigamente tem sido usado para o tingimento de têxteis na Índia há 4 mil anos a.C., também tem relatos antigos sobre o seu uso na China, Japão e Egito. O índigo foi sintetizado de forma sintética por primeira vez em 1880 pelo químico alemão Joham F.W.A. Bayere, e foi comercializado pela Badische Aniline Soda Fabrik em 1905 [28].

A cor azul escuro intenso é extraída de forma natural das plantas *Indigofera tinctoria* L., *Indigofera anil* L. e *Isatis tinctoria* como indoxil (3-hidroindol), através de fermentações das folhas frescas e por oxidação, formando um corante insolúvel que após ser sulfonado passa a se denominar índigo carmim, também conhecido comercialmente como Acid Blue 74 (CI) ou sal sódico do ácido 5,5'-índigodisulfônico de fórmula química $C_{16}H_8O_8N_2S_2Na_2$, que é um produto usado como corante de contraste para melhorar a visualização das lesões da mucosa colorretal durante a colonoscopia, também se usa como agente complexante para a análise de cobre por espectrofotometria, mas é principalmente usado para o tingimento de jeans [29], [30]. A cor é dada pelo grupo cromóforo (Fig. 10), que consiste na substituição de uma ligação simples de carbono por dois receptores NH e dois aceptores CO [21].

Figura 10 Estrutura molecular: a) corante índigo e do b) corante índigo carmim.



Fonte: Autoria própria

O corante índigo carmim é altamente tóxico, ao contato com a pele ou olho pode causar irritações, até provocar danos permanentes na córnea e conjuntiva. Se ele for ingerido pode provocar toxicidade reprodutiva, mal desenvolvimento anatômico e problemas neuronais [31].

4.2. EFLUENTE TÊXTIL

O efluente têxtil é a mistura dos efluentes gerados em cada uma das etapas do processo, como alvejamento, tingimento, estampagem dos tecidos por banhos e das lavagens para remoção de corantes e outras substâncias [32]. Durante o tingimento também são usados tensoativos, ácidos, ases, sais, entre outros para melhorar a fixação das moléculas do corante na fibra têxtil, e na etapa da lavagem são usados detergentes, sabões, sequestrantes e neutralizantes [15]. Quando o efluente sai das máquinas pode apresentar elevadas temperaturas e pH desde o ácido até alcalino, assim como diversos outros compostos [27].

Um efluente têxtil também pode estar formado por uma mistura de metais pesados (cádmio, cromo, cobalto, cobre e zinco), hidrocarbonetos, compostos orgânicos halogenados (clorados, pigmentos verdes não tóxicos e fenóis tóxicos) [27]. Muitos corantes e produtos químicos podem ter propriedades tóxicas, carcinogênicas ou teratogênicas [34]. Na Tabela 3. São apresentadas as principais etapas geradoras de efluentes tóxicos fiscalizados no ano 2001 pela Companhia Pernambucana de Recursos Hídricos (CPRH).

Tabela 3 Efluentes gerados pelas diferentes etapas do processo têxtil.

Processo	Descrição	Efluentes gerados
Mercerização	Processo físico-químico, onde é adicionado ao material têxtil soluções alcalina com concentração e temperatura controladas. Esta etapa tem por objetivo melhorar o brilho, absorção de corantes e resistência.	Hidróxido de sódio
Caustificação	Semelhante ao processo de mercerização porém utiliza produto químicos em concentrações menores podendo estarem associados ao hidróxido de potássio.	Hidróxido de potássio e Hidróxido de sódio
Desengomagem	faz a remoção da goma aplicada nas fases de preparação dos fios para tecelagem. Pode ser feita por três métodos: enzimático, por hidrólise ácida e por oxidação.	Resto de goma e produtos gerados de sua decomposição, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio ou clorito de sódio e produtos tensoativos Altas taxas de carga orgânica
Purga Cozinhamento Pré-alvejamento	São utilizados para retirada das impurezas como ceras, óleos, pectinas, cascas do tecido com o objetivo de aumentar a hidrofiliidade das fibras. Através dos mecanismos: emulsificação; saponificação dissolução de materiais solúveis em água quente.. O que diferencia um processo do outro é o grau de limpeza, a purga é um pré-tratamento simples, o cozinhamento já é mais aprofundado e o pré-alvejamento é mais apurado	Peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio, tensoativos e outros, além das impurezas retiradas no processo.

Alvejamento	é a descoloração ou branqueamento de materiais têxteis, e para ter um alto grau de brancura, utilizando-se hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio entre outros.	Peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio, cloro, hipoclorito, bissulfito de sódio, ácido sulfúrico fraco, produtos tensoativos, outros.
Tingimento	Para colorir os tecidos são utilizados corantes e pigmentos. Divide-se em três etapas- 1- migração, 2- absorção e 3- difusão/fixação: 1 – é a migração do corante em meio aquoso até a superfície da fibra; 2- onde ocorre a absorção superficial na fibra; 3- e difusão na qual as moléculas do corante difunde-se no interior da fibra e a ela fixa-se.	Corantes, H ₂ SO ₄ , hipoclorito de sódio, HCl, outros)
Lavagem	Lavagem dos tecidos que passaram pelos processos de alvejamento e tingimento, neste processo é requerido a adição de produtos químicos para auxiliar no processo como detergentes, sequestrantes, neutralizantes e outros.	Corantes, ácido acético, detergentes, sequestrantes e outros

Fonte: [27]

Os parâmetros indicadores de poluição ambiental são a demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sólidos totais (ST), sais, metais pesados, sólidos dissolvidos totais (SDT), sólidos suspensos totais (SST), e cor do efluente têxtil [35].

Quando os efluentes são despejados nos corpos hídricos sem tratamento prévio, causam distúrbios metabólicos nos organismos, interferindo nos ciclos de vida do ecossistema, e também reduzem a penetração de luz o que impede a fotossíntese dos organismos, e por consequência a cadeia trófica é alterada, causando a eliminação de alguns seres vivos [36], [37], [38].

4.3. TRATAMENTO BIOLÓGICO DO EFLUENTE TÊXTEL

Cerca de 20% da poluição de águas no planeta é proveniente de indústrias têxteis. Os métodos físico-químicos não atingem uma remoção completa dos efluentes têxteis, portanto é indispensável um tratamento biológico para complementar e elevar a eficiência do processo de despoluição. O tratamento biológico é feito por bactérias, fungos, plantas e algas, e pode ser feita de forma individual ou por consórcios de organismos [39].

A biorremediação micótica de efluentes provenientes de lavanderias industriais de roupa jeans é um tratamento biotecnológico, que além de ser de baixo custo [40], por produzirem enzimas ligninolíticas apresentam potencial em descolorir e remediar efluentes conformados por xenobióticos, que os degradam até formar água e dióxido de carbono, tornando-os inofensivos para os organismos vivos, evitando contaminação dos corpos hídricos [41].

Entre os fungos produtores destas enzimas oxidativas extracelulares, os basidiomicetos demonstram ser potenciais no tratamento do corante reativo laranja 7 de águas residuais [42], [43], [44]. As espécies de Agaricomycetes como *Coriolus versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Schizophyllum commune*, *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus*, *Grifola frondosa*, *Auricularia delicata*, *Trametes trogii*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Lentinula edodes* são fungos reconhecidos por produzir enzimas ligninolíticas [14]. Estes fungos, conhecidos também como fungos da podridão branca são reconhecidos por

degradar celulose e lignina, e tem sido usados em processos de biodegradação de diferentes compostos como carboidratos, compostos aromáticos, hidrocarbonetos, corantes sintéticos [15], [17]. *Coriolopsis* sp. Tem a capacidade de descolorir corantes trifenilmetano sob condições aeróbicas por reações oxidativas e em condições anaeróbicas por reações redutivas [45].

A degradação da lignina acontece por ocorrer nos fungos um processo multienzimático resultante da ação coordenada de uma série de enzimas intra e extracelulares como as oxidorreduções, assim como outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio e por metabolitos intermediários de baixa massa molecular [46], [47], [48]

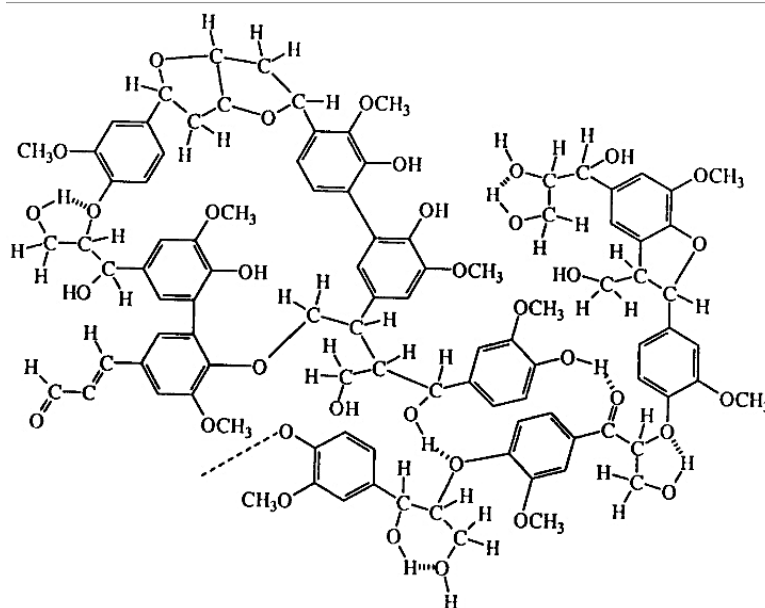
Os fungos são conhecidos por ser resistentes em condições difíceis de sobrevivência, como por exemplo, aqueles encontrados na Caatinga pernambucana do Brasil, local que se encontra entre o agreste e o sertão, onde o ambiente é seco, porém os fungos têm conseguido se desenvolver sem problemas. A facilidade que apresentam esses organismos para se adaptar em ambientes extremos, permite que consigam sobreviver em condições desfavoráveis [49].

Existe uma condição dos efluentes têxteis nas estações de tratamento, que se encontra em um ambiente não estéril, diferente dos efluentes sintéticos preparados em laboratório [50]. Um efluente real sem esterilização, tem uma microbiota própria que se encontra adaptada nessas condições, e pode apresentar processos de biodegradação de corantes maior com influencia da atividade enzimática ligninolítica de fungos, do que um efluente real estéril ou um efluente sintético preparado em laboratório [51].

Quando existe influencia de uma microbiota composta de fungos e bactérias, há um aumento do pH alterando a atividade dos fungos [50], porém também tem acontecido que uma microbiota composta, pode ser muito favorecida pela presença de fungos, na porcentagem de descoloração de efluentes têxteis não estéreis, sem necessidade de regular o pH para ácido [52], o que diminui o custo do processo, porque evita o uso de reagentes químicos para regular o pH. Além da biodegradação dos grupos cromóforos, também tem sido encontrada uma diminuição da toxicidade daquele efluente após o tratamento biológico com fungos quando é conservada a microbiota do efluente real não estéril [52].

4.4. ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

Durante o tratamento biológico, a descoloração é feita por via oxidativa através da atividade de algumas enzimas oxidorreduções que degradam lignina. A lignina (Fig. 11) é um biopolímero que possui uma estrutura altamente complexa, e para ser degradada necessita de um sistema diversificado de enzimas ligninolíticas, enzimas redutoras e produtoras de peróxido de hidrogênio [41]. As enzimas oxidorreduções estão divididas em duas classes, as peroxidases como lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) que usam o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como co-substrato, e as fenoloxidasas como a lacase (Lac), que não depende do H_2O_2 para atuarem porque tem o oxigênio como receptor de elétrons [53].

Figura 11 Estrutura química da lignina

Fonte: [54]

A via pela qual o fungo deverá realizar a biodegradação dos corantes sintéticos presentes nos efluentes têxteis dependerá das estruturas químicas dos corantes e outros compostos, por exemplo, as enzimas Lac, MnP e LiP atacam as aminas aromáticas dos corantes [55], [56].

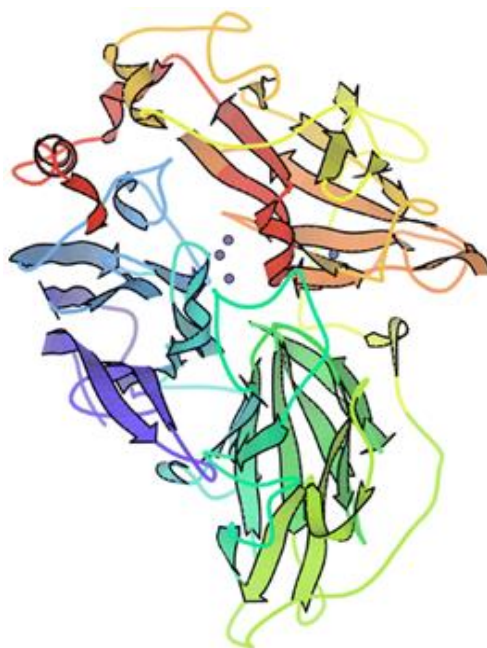
As enzimas ligninolíticas apresentam baixa especificidade pelo substrato, portanto podem ser utilizadas na degradação de diversos poluentes persistentes que possuem estruturas similares à lignina, como é o caso de corantes [57]. Para obter fontes de carbono e energia, os fungos podem remediar o ambiente contaminado produzindo diferentes tipos de enzimas [40]. Porém é indispensável conhecer qual é o tipo de estresse nutricional é o mais adequado para remediar os efluentes, já que a biodegradação oxidativa é um processo complexo não específico, assim que depende estritamente das condições do meio de cultivo do organismo, portanto combinar diferentes tipos de estresse é interessante para fins biotecnológicos [58].

4.4.1. Lacase

As lacases (Fig. 12) são enzimas oxidativas que tem a capacidade de catalisar compostos aromáticos e inorgânicos por redução do oxigênio até formar água. Estes compostos se encontram amplamente usados nas indústrias, portanto a necessidade de biodegradá-las torna às lacases em ferramentas muito importantes para processos de biorremediação. Sua alta estabilidade faz que esta enzima seja altamente atrativa em aplicações biotecnológicas na degradação de poluentes têxteis [59].

Existem vários estudos em que as lacases imobilizadas têm degradado vários compostos recalcitrantes, como feios, clorofenóis, compostos organofosforados e corantes têxteis, como os corantes azo sem clivagem direta das ligações azo através de um mecanismo de radical livre não específico, evitando assim a formação de aminas aromáticas tóxicas [60].

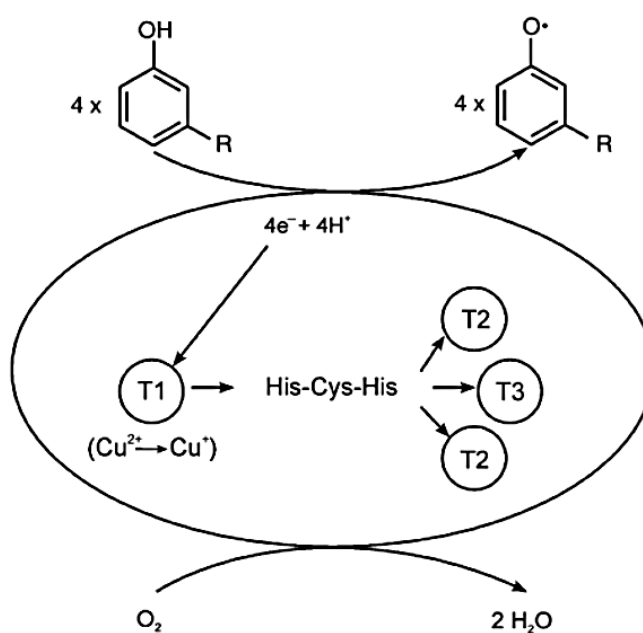
Figura 12 Estrutura ternaria da lacase de *T. versicolor*.



Fonte: Piontek et al., 2002 – TESE AUGUSTO

A catálise do substrato pela lacase acontece graças a presença de quatro sítios de cobre na estrutura molecular, portanto oxidam o composto fenólico, extraíndo um elétron, liberando um radical fenoxila [61]. Nos sítios CuT_1 , CuT_2 acontece a abstração de elétrons por redução de Cu^{2+} a Cu^{1+} (Fig. 13). Estes elétrons são conduzidos pelo tripeptídeo His-Cys-His até os dois sítios CuT_3 onde se faz uma ligação, formando um agrupado trinuclear que permite a redução de O_2 para H_2O retornando para sua forma nativa, esta reação permite que a enzima atue de forma cíclica [62], [63], [64], [65], [66], [67].

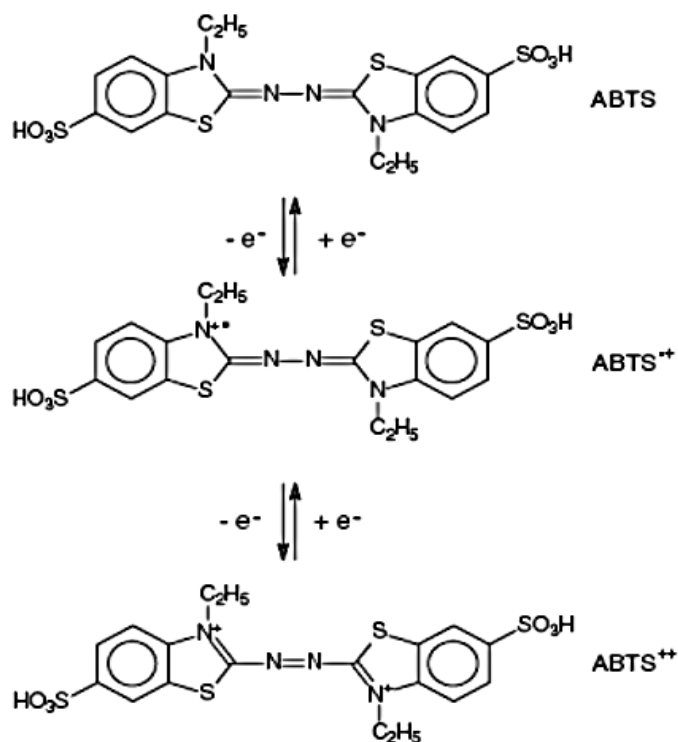
Figura 13 Ciclo catalítico da lacase



Fonte: [67]

A atividade da lacase *in vivo* é determinada geralmente por testes espectrofotométricos, usando produtos de oxidação fenólicos como guaiacol, 2,6-dimetoxifenol, siringaldazina e não-fenólicos ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico) (ABTS). O potencial de oxidação do ABTS (Fig. 14) pode ocorrer em uma faixa de pH de 2 a 11, permitindo a coloração do radical ABTS catiónico, que se mantém estável em solução. É mais vantajoso usar compostos não-fenólicos para determinar a sua atividade, porque substratos fenólicos podem ser oxidados por outros compostos não-enzimáticos [68], [69].

Figura 14 Transformações redox do ABTS.

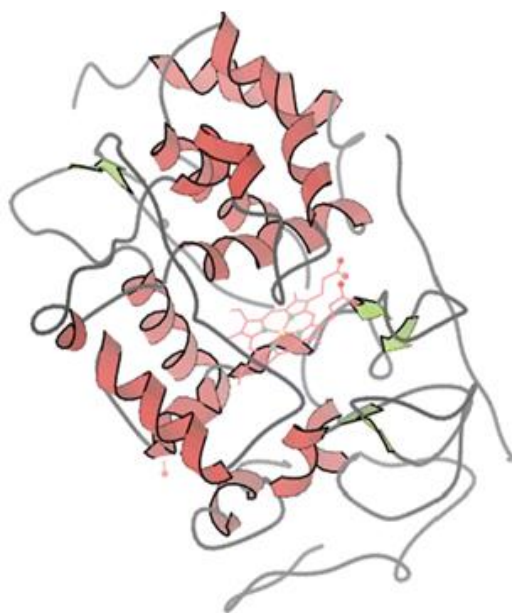


Fonte: [70]

4.4.2. Lignina peroxidase

A lignina peroxidase (Fig. 15) foi descoberta em 1984, em culturas de *Phanerochaete chrysosporium* [72]. Pertence às oxidoredutases catalisam diversos substratos em dependência da presença do peróxido de hidrogênio. Esta glicoproteína contém a protoporfirina (IX) (heme), que é um grupo prostético presente na sua estrutura nativa da enzima, que precisa do peróxido de hidrogênio (aceptor de elétrons) como agente oxidante, para catalisar álcool veratrílico (preferência como doador de elétrons [73] e compostos aromáticos fenólicos e não-fenólicos graças ao seu alto potencial redox [61], [64]. O álcool veratrílico é um metabolito secundário natural nos fungos, e também é o principal redutor (doador de elétrons) que atua como mediador na catálise dos substratos recalcitrantes [74], porque o radical catiónico deste álcool atua oxidando substratos que LiP não poderia interagir diretamente [75].

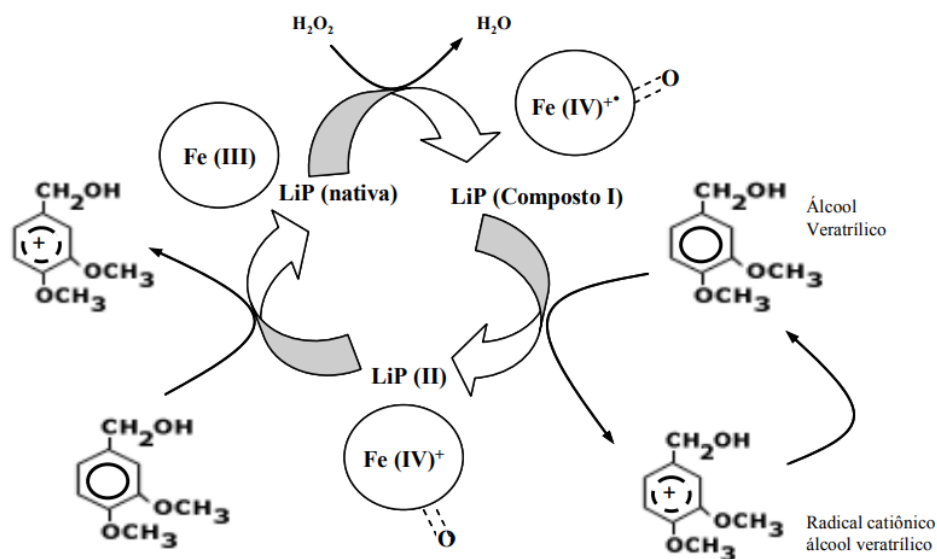
Figura 15 Estrutura ternaria da lignina peroxidase de *P. chrysosporium*



Fonte: [76]

O peróxido de hidrogênio extrai do grupo prostético um elétron do Fe (III) (ferro heme) oxidando-o para o composto I Fe (IV)^+ (radical catiônico deficiente de elétrons) (Fig. 16), este composto I é reduzido pelo álcool veratrílico formando o composto II Fe (IV)^+ e um radical catiônico de álcool veratrílico, depois o composto II é reduzido novamente por outra molécula de álcool veratrílico para reestabelecer o grupo prostético formando Fe(III) e um segundo radical catiônico de álcool veratrílico (os radicais catiônicos viram veratraldeídos) [64], [41]. O álcool veratrílico atua como redutor da enzima e aparentemente a protege da inativação por excesso de H_2O_2 .

Figura 16 Ciclo catalítico da lignina peroxidase



Fonte: [77]

4.4.3. Manganês peroxidase

A manganês peroxidase (Fig. 17) é uma enzima aparentemente limitada a certos fungos basidiomicetos, sem ser evidenciada sua produção em bactérias, leveduras e nenhum basidiomiceto micorrízico. É uma glicoproteína extracelular dependente de peróxido de hidrogênio e de íons manganês para catalisar compostos químicos por oxidação. O ciclo catalítico desta enzima é muito semelhante ao da lignina peroxidase, mas aqui, o Mn^{2+} atua como doador de elétrons.

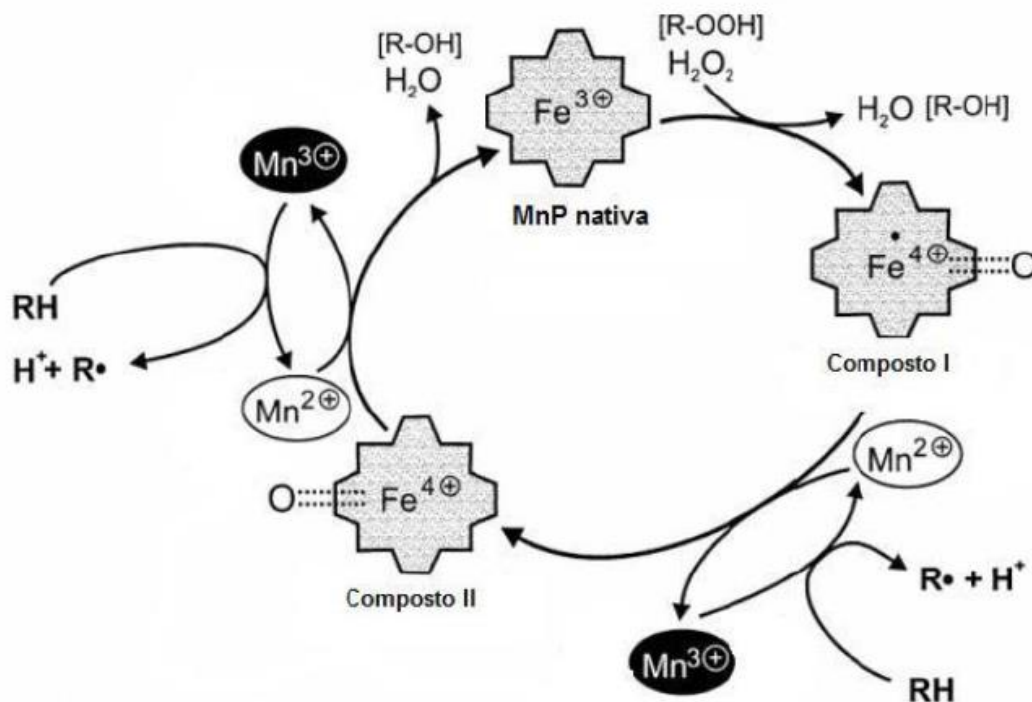
Figura 17 Estrutura ternária da Manganês Peroxidase de *Phanerochaete chrysosporium*



Fonte: [78]

A catálise começa quando dois elétrons do Fe (III) do grupo prostético heme são capturados pelo peróxido de hidrogênio formando o complexo I ($Fe(IV)^+$ -oxo-porfirina radicalar) e água (Fig. 18), sendo o complexo I muito instável, ocorre imediatamente a redução do mesmo com a doação de um elétron de Mn^{2+} se tornando Mn^{3+} e formando o complexo II ($Fe(IV)^+$ -oxo-porfirina não radicalar); nesta fase do ciclo catalítico, a MnP se comporta como LiP, então pode ser reduzida por outros doadores de elétrons. Posteriormente ocorre uma segunda redução com ajuda de um elétron do Mn^{2+} formando Mn^{3+} e transformando o complexo II em Fe (III), levando assim à geração da forma original da enzima; nesta última fase, o complexo II é pouco reduzido por outros substratos, portanto requer exclusivamente dos íons Mn^{2+} para completar o ciclo catalítico [79]. A estabilidade do Mn^{3+} acontece pela intervenção de ácidos orgânicos, como o ácido oxálico que é um agente oxido-redutor difuso que subtrai inespecificamente um elétron de outras moléculas, permitindo que o Mn^{2+} sempre esteja disponível como doador de elétrons para a MnP [80]. Devido à inespecificidade da enzima, tanto na redução eletrônica para a formação do complexo II, como na oxidação de Mn^{2+} para Mn^{3+} por outros ácidos orgânicos, esta enzima oxida seu substrato natural, a lignina, e vários poluentes orgânicos semelhantes em estrutura química, como os corantes têxteis.

Figura 18 Ciclo catalítico da manganês peroxidase



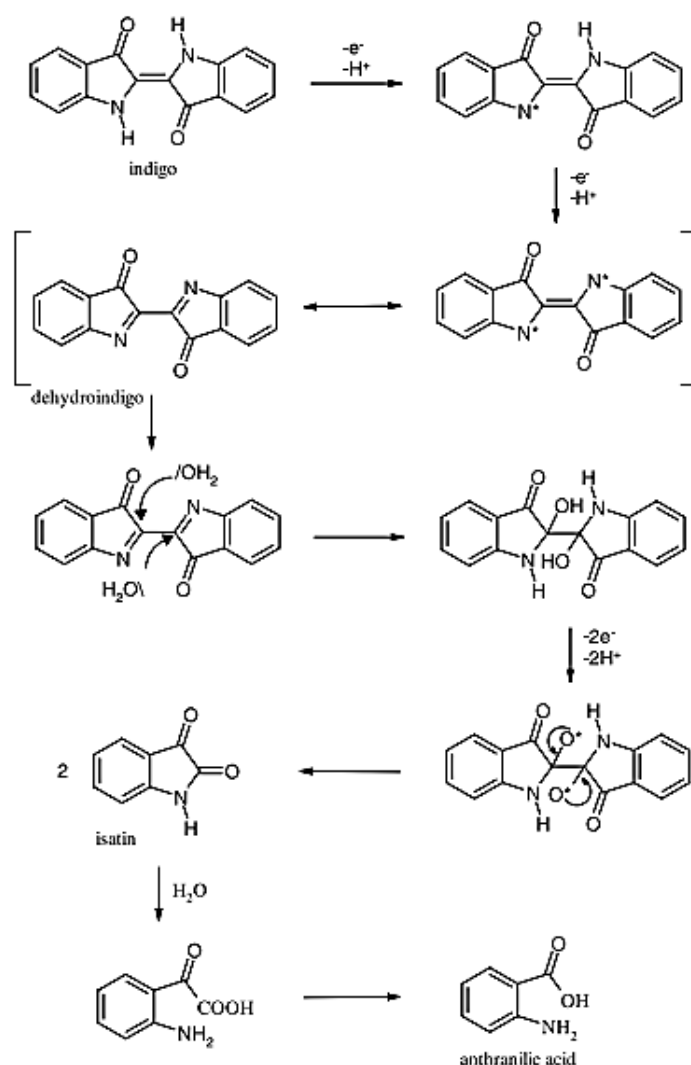
Fonte: [81]

4.4.4. Enzimas ligninolíticas na biorremediação de efluentes têxteis.

Usualmente as enzimas ligninolíticas são usadas nas indústrias de alimentos e têxteis, também durante processos de branqueamento de celulose e no campo da biotecnologia, são utilizadas para a biodegradação e biorremediação de poluentes como efluentes e corantes têxteis [63].

A produção das enzimas ligninolíticas é estimulada nos fungos pela restrição de nitrogênio e a falta de adição de nutrientes no meio de cultura por longo tempo [83]. À medida que o tempo passa, os fungos esgotam os nutrientes presentes no meio de cultura, sintetizando diferentes quantidades de enzimas nos diferentes estágios de vida. Primeiro sintetizam enzimas intermediárias que degradam outros compostos xenobióticos recalcitrantes, embora a produção delas diminua com o consumo nutricional do meio. Por outro lado, a limitação de nitrogênio estimula a produção das enzimas ligninolíticas [84], que degradam grupos cromóforos dos corantes como o índigo carmim (Fig. 10), que é muito usado na indústria têxtil. Essas enzimas transferem elétrons até o corante para obter estatina, e após acontecer a descarboxilação se produz o ácido antranílico, como é mostrado na Figura 19. O ácido antranílico é um aminoácido conhecido também como vitamina L pelo seu desempenho como coenzima na produção do leite materno [82].

Figura 19 Mecanismo de degradação do corante Índigo por *Phormidium*



Fonte: [83].

As enzimas ligninolíticas tem a capacidade de biodegradar compostos cromóforos de corantes.

A cinética enzimática serve para determinar a velocidade que a enzima está transformando certa quantidade de substrato em produto, assim podem ser encontrados parâmetros importantes como a constante de Michaelis K_M e a velocidade máxima de reação V_{max} . A K_M indica a concentração do substrato para qual a velocidade da reação é a metade da velocidade máxima V_{max} . Portanto, o K_M nos permite encontrar a afinidade da enzima pelo seu substrato. A lacase sem purificar do fungo *Scytalidium thermophilum* apresentou uma K_M de 2610 μM para índigo carmim e uma V_{max} de 613 $\mu M/min$ e purificada 7440 μM e 1270 $\mu M/min$ de K_M e V_{max} respectivamente [85]. Outros valores completamente diferentes foram determinados para a cinética da lacase purificada dos fungos *T. hirsuta* e *Sclerotium rolfsii*, K_M de 9.6 μM e V_{max} de 96400 $\mu M/min$ [86]. Os valores dos parâmetros cinéticos da lacase são muito variáveis os fungos ligninolíticos, portanto uma media aproximada (500 μM) de K_M entre estas duas referencias pode ser um valor teórico interessante para avaliar.

4.5. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A imobilização de enzimas em polímeros é uma tendência vanguardista que tem obtido resultados importantes em quanto a biotransformação de xenobióticos e efluentes industriais, a descoloração de corantes, a biorremediação de solos contaminados [13]. a imobilização envolve manter a biomolécula (enzimas ligninolíticas) unida ou sequestrada em um suporte físico, conservando sua atividade catalítica e permitindo o fluxo de substratos e produtos [35]. O maior interesse da imobilização enzimática é usar um material que não altere a atividade nem a estabilidade da enzima durante o processo, em comparação com a forma livre [87]. As enzimas imobilizadas apresentam vantagens sobre enzimas livres [88]. Outras vantagens a ressaltar da imobilização de enzimas são: [89]

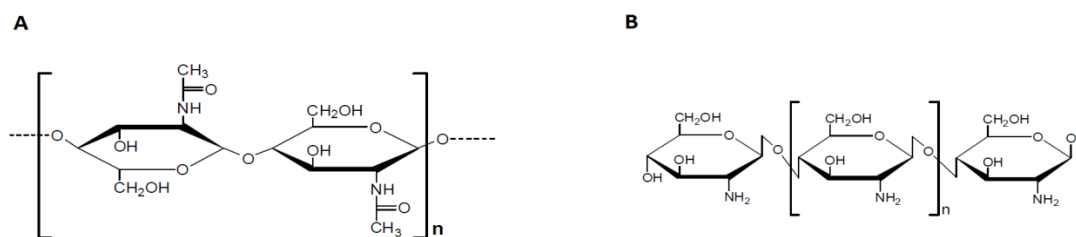
- Pode aumentar o potencial de uma enzima, como catalisador em escala industrial;
- Pode ser utilizada como uma estratégia para estabilizar enzimas, e pode reduzir ou não ter efeito na sua estabilidade;
- O micromedio ao redor de uma enzima imobilizada pode diferir daquele da forma livre;
- Pode alongar a vida útil da enzima.

4.5.1. Biopolímero quitosana

Vários tipos de materiais têm sido estudados para imobilizar enzimas, dentre eles se destaca a quitosana [90]. Este biopolímero é um derivado da quitina, extraído do exoesqueleto de insetos e crustáceos, é biodegradável e não tóxico [91]. É reconhecido como versátil por possuir varias propriedades físicas, químicas e biológicas comparado com a quitina [92]. A quitina (Fig. 20) é o polímero poli(β -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil- β -D-glucosamina, e a quitosana se forma a partir da N-desacetilação da quitina, processo que geralmente é incompleto, portanto para determinar que a quitosana não é mais quitina, precisa se determinar o grau de acetilação [93].

A quitina geralmente apresenta um grau de acetilação entre 70-95% que indica presença do acetilo entre 15-20.7%, no entanto o quitosano apresenta um grau de N-acetilação entre 15-25% fazendo referência a 3.2-5.3% do conteúdo de acetilo [94]. Por tanto o grau de N-acetilação é o parâmetro mais importante para determinar as características funcionais e fisiológicas da quitosana [95], que fazem deste polímero apto para ser usado em diferentes campos como biotecnológico [96], biomédico [97], alimentício [98], [99] e farmacêutico [100], [102]. Este biopolímero por ser um material altamente poroso, tem sido usado na biossorção de corantes em efluentes têxteis [102].

Figura 20 Estrutura química de (A) quitina e (B) quitosana.



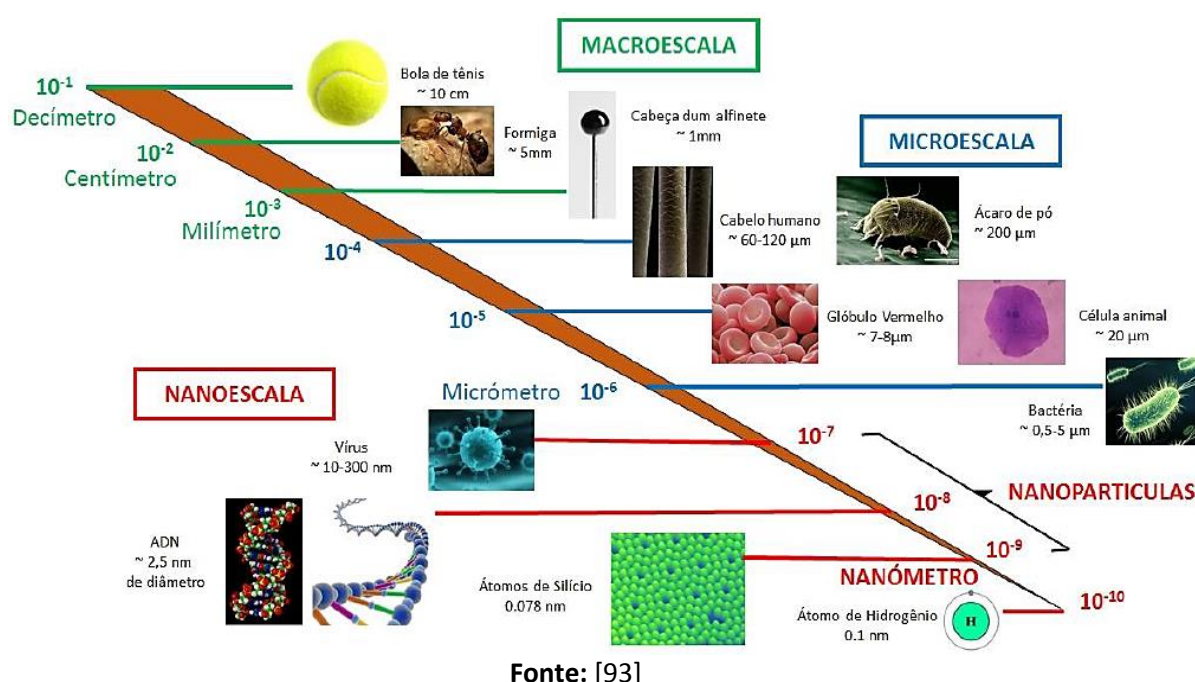
Fonte: [103]

A quitosana está composta de dois grupos cromóforos, N-acetilglicosamina (GlcNAc) e a glicosamina (GlcN), estes dois monómeros não tem interação entre si, portanto é possível determinar a quitosana usando espectrofotometria [104].

4.5.1.1. Nanopartículas de quitosana

Uma das aplicações da nanobiotecnologia envolve a nanopartículas (materiais sintetizados que não são encontrados na escala dos nanômetros) [105], [106] como suportes para realizar a imobilização apresenta vantagens interessantes desde o ponto de vista industrial, entre elas estão a maximização da área superficial de contato, o aumento da quantidade de enzimas por volume, aumento significativo da eficiência de transferência de massa [107]. Na Figura 21. se mostra a escala de tamanho macro, micro e nano de alguns sistemas.

Figura 21 Escala referencial de tamanho macro, micro e nano.



A geração de nanopartículas aumenta a área superficial de contato, isto quer dizer que a menor tamanho de uma partícula, e maior quantidade de estas partículas nesse pequeno tamanho, existe maior contato da área destas partículas com o meio [108].

A formação das nanopartículas é baseada em interações iônicas entre o componente carregado positivamente, como a quitosana que contem grupos amino protonados, e uma espécie carregada negativamente, o tripolifosfato de sódio (TPP) que atua como poliânion [109]. O TPP é agente reticulante que promove a coagulação por interação iônica, formando as nanopartículas (sistemas coloidais estáveis) [109]. Para evitar a aglomeração e posterior precipitação das nanopartículas de quitosana formadas, é necessário trabalhar com pH ácido entre 4 – 5 [110], e considerando que as enzimas ligninolíticas são mantidas estáveis em tampões de pH ácido (Lac – pH 5; LiP – pH 3; MnP – pH 4.5), o complexo enzima-quitosana (Fig. 22) se mantém estável.

Figura 22 Complexo de enzimas imobilizadas em nanopartículas de quitosana



Fonte: Autoria própria

Na imobilização, as enzimas aumentam a concentração efetiva na solução, aumentando a taxa de reação, isto é que por estarem mais juntas entre a rede da nanopartículas, captam os substratos que se encontram dispersos na solução, para os locais de ligação específicos na sua estrutura, mantendo esses componentes próximos um do outro, e essa proximidade é a que gera o aumento da taxa de atividade enzimática na solução [111].

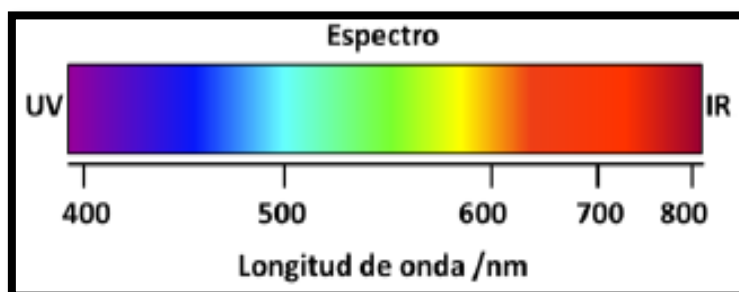
4.6. CARATERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

4.6.1. Espectroscopia Ultravioleta Visível (UV-Vis)

A espectroscopia UV-vis é uma das técnicas mais utilizadas para análises químicas. A medição da faixa de comprimento de onda entre o visível e o ultravioleta permite a caracterização dos materiais, devido às informações qualitativas e quantitativas que refletem sobre várias espécies inorgânicas e orgânicas [112].

A faixa de comprimento de onda (λ) para luz ultravioleta usada na prática varia de 190 a 380 nm e a faixa de comprimento de onda da luz visível está entre 400 e 800 nm (Fig. 23). Portanto, o princípio da espectroscopia UV-visível envolve a absorção da radiação visível no ultravioleta para uma molécula na faixa de λ entre 190 e 800 nm [112].

Figura 23 Espectro de luz visível



Fonte: [112]

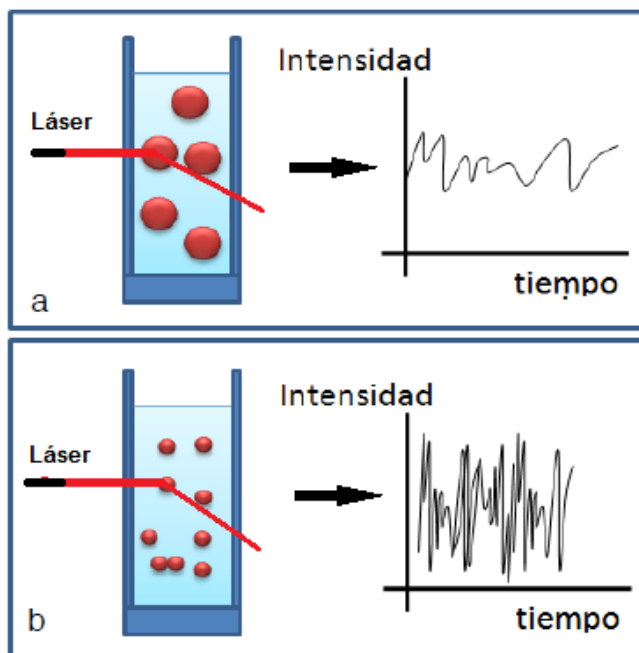
Essa técnica é utilizada para a caracterização de nanomateriais, pois permite saber se o processo de síntese resultou na formação de nanopartículas. A posição e a forma do pico de

absorção dependem de alguns fatores, como o tamanho, a forma e a dispersão dos tamanhos dos PNs, além das substâncias absorvidas na superfície dessas partículas [113].

4.6.2. Espectro Dinâmico de Luz (DLS)

O espalhamento dinâmico de luz é uma técnica físico-química usada para determinar a distribuição de tamanho de partículas em suspensão de acordo com a variação na intensidade da dispersão ao longo de um período de tempo (Fig. 24). Essas flutuações permitem medir os coeficientes de difusão de partículas que se mexem sob um regime browniano. O movimento browniano é o movimento aleatório das partículas dado pela colisão constante com as moléculas de solvente, como consequência desse movimento as posições das partículas diferem constantemente causando variações nas condições de interferência e intensidade de dispersão. As pequenas partículas se movem rapidamente, o que gera uma aceleração na variação da intensidade de dispersão, enquanto as grandes partículas se movem lentamente, causando variações mais lentas [114], [115].

Figura 24 Representação gráfica das flutuações de intensidade segundo o tamanho das partículas. (A) partículas grandes, (B) partículas pequenas.

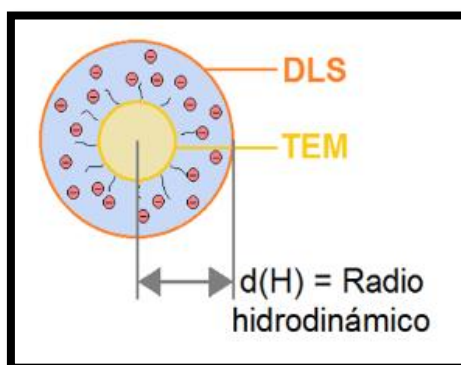


Fonte: [115].

O equipamento DLS calcula o raio hidrodinâmico (Fig. 25) que inclui o diâmetro das partículas junto com todas as estruturas que estão em sua superfície, que geralmente é a cobertura do estabilizador, íons absorvidos na superfície ou algum material imobilizado. O pico de absorção muda para a direita (comprimentos de onda mais longos), à medida que o tamanho dos NPs aumenta [113].

Como o radio hidrodinâmico é determinado por DLS, outras técnicas como o MEV, podem definir o diâmetro da partícula sem elétrons ou estruturas presentes na superfície [115].

Figura 25 Radio hidrodinâmico $d(H)$ determinado por DLS.

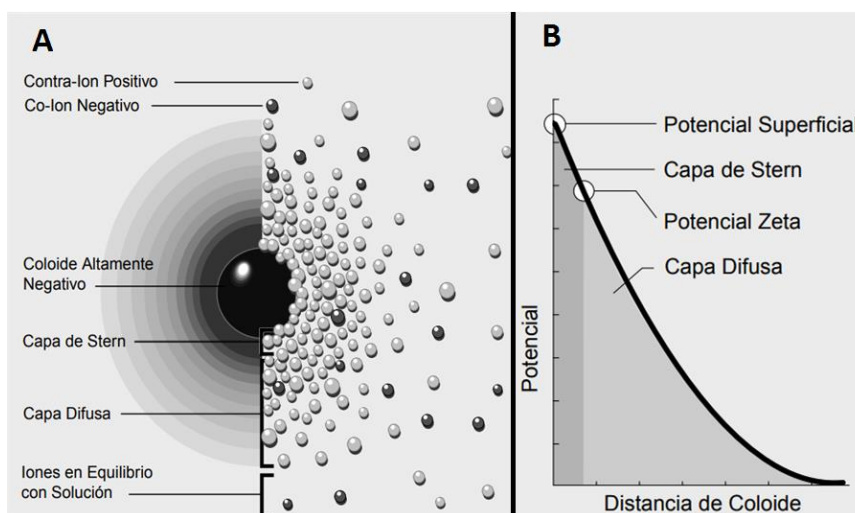


Fonte: [116]

4.6.3. Potencial Zeta

O potencial elétrico de uma solução depende das cargas positiva e negativa do coloide, e da carga positiva ou negativa da atmosfera onde se encontra esse coloide, mas as duas cargas são opostas. O valor do potencial elétrico tem um valor máximo na superfície que diminui gradualmente com a distância (Fig. 26 (B)), se aproximando a zero fora da capa difusa (Fig. 26 (A)). A queda do potencial está em função da distância entre os colóides, essa queda é o indicador da força de repulsão entre os colóides de igual carga e a distância onde estas forças começam interagir (Potencial Z).

Figura 26 (A) Camada difusa (atmosfera carregada) rodeando ao coloide, (B) Potencial Zeta contra Potencial Superficial.



Fonte: [117]

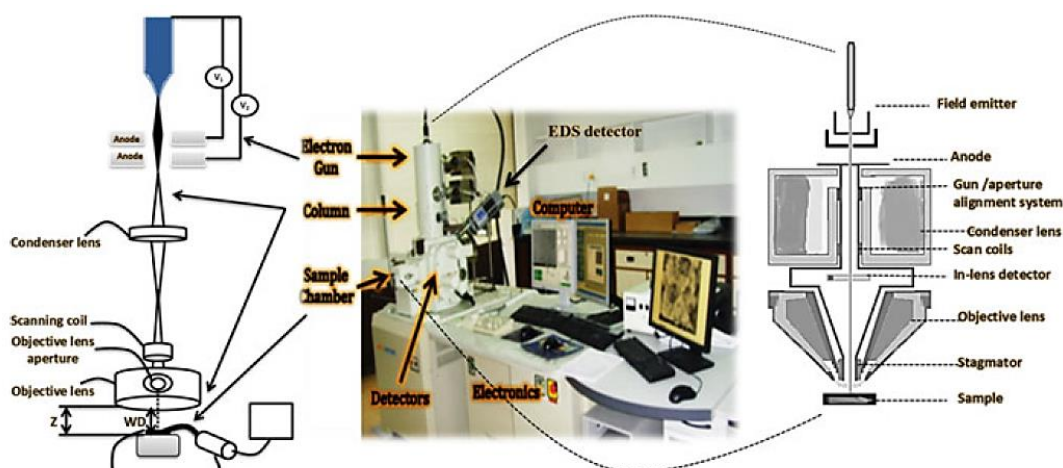
O ponto de união das camadas difusas e de Stern é onde se mede o potencial Z, que é muito importante para determinar a carga das nanopartículas formadas. As nanopartículas de quitosana geralmente têm carga entre +20 e +50 mV. Esta técnica permite controlar de forma efetiva o comportamento do coloide na imobilização enzimática, porque permite detectar câmbios no potencial da superfície e nas forças de repulsão entre os colóides [117].

4.6.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (Fig. 27) é um instrumento multipropósito muito utilizada em diferentes pesquisas, sejam básicas ou aplicadas. É uma técnica que permite a observação e caracterização de materiais de diferente origem, como mineral, vegetal, animal, etc. O funcionamento deste microscópio se baseia na emissão e interação de feixes de elétrons sobre uma amostra, sendo possível mostrar a sua morfologia, organização e composição química [118].

A amostra consegue ser visualizada através dos elétrons que são espalhados que são detetados com uso de citaladores, proporcionando informação sobre a topografia, morfologia, composição, orientação, informação cristalográfica, etc., do material. A morfologia indica a forma e tamanho, e a topografia indica as características da superfície como sua textura, suavidade ou aspereza. A composição mostra os elementos e compostos que formam o material, e a cristalografia permite conhecer a organização dos átomos nos materiais da amostra [89], [119], [120], [121]. MEV não proporciona informação da estrutura interna [122], mas permite determinar se têm acontecido alterações nas estruturas das amostras após experimentos de modificação na superfície com moléculas de diferente natureza [89].

Figura 27 Configuração interna e externa do MEV



Fonte: [123]

O MEV apresenta intervalo bastante abrangente na sua escala de observação, variando da ordem de grandeza do milímetro ao nanômetro [118].

A utilização do MEV como técnica complementar, pois além de possibilitar a obtenção de imagens com alta resolução é também capaz de fornecer informações importantes relativas à composição química das feições analisadas [124].

4.7. MODELO BIOLÓGICO *Artemia* sp.

Artemia sp. é um pequeno crustáceo que vive em ambientes aquáticos de alta salinidade. Eles são um elemento fundamental no grupo do zooplacton, especialmente em ambientes estuarinos, sendo um fator importante dentro da faixa trófica. A *Artemia* sp. é considerada

adequada para água salgada continental e é encontrada na América do Norte, América Central e do Sul [125], sua taxonomia se encontra na Tabela 4.

Tabela 4 Taxonomia de *Artemia* sp.

Taxonomia de <i>Artemia</i> sp.	
Reino	Animalia
Filo	Artrópoda
Classe	Crustacea
Subclasse	Branquiopoda
Ordem	Anostraca
Família	Anostraca
Gênero	Artemia

Fonte: Adaptada de [126].

Diferentes autores conseguiram demonstrar que esse organismo se comporta como um biossensor da poluição aquática em ambientes marinhos e, como resultado, tornou-se um elemento fundamental para estudos de toxicidade *Artemia* sp. [127]. É um organismo que pode ser adquirido como ovo encapsulado, que requer reidratação subsequente em laboratório e, dessa forma, é possível obter populações homogêneas de indivíduos muito capazes de serem utilizados em estudos de toxicidade, além de ser uma alternativa barata, fácil de eclodir, simples e rápido em comparação com os peixes [125].

As artemias são organismos de grande mobilidade, têm uma aparência translúcida e brilhante, sua cor pode variar entre quase transparente e vermelho escuro, dependendo da comida fornecida e do grau de oxigenação da água em onde se encontra. Eles são visíveis e, portanto, fáceis de capturar para testes de toxicidade [128].

Artemia sp. tem sido utilizada em vários testes de toxicidade de drogas [129], contaminantes da água como hidrocarbonetos [130], produtos de limpeza [125], alguns compostos e elementos químicos [131], [132] e até para demonstrar a toxicidade das nanopartículas [133].

A incubação das artemias possui vários parâmetros críticos para obter uma eclosão ideal de seus ovos:

- **Temperatura:** a temperatura deve variar entre 25 e 30 °C, já que a eclosão abaixo de 25 °C é considerada extremamente lenta e acima de 30 °C o metabolismo dos cistos para irreversivelmente [134].
- **Salinidade e pH:** a água do mar é usada para incubação ideal, no entanto a salinidade pode variar de 35 a 170 g/L, dependendo das condições de cada laboratório [129]. Em relação ao pH, é considerado um intervalo recomendado de 8 a 10 para incubação [134].

- **Oxigenação:** oxigenação de 2 mg/L até a saturação de oxigênio ser considerada adequada para a eclosão ideal [134].
- **Iluminação:** a iluminação nas primeiras horas de hidratação dos cistos é essencial para atingir a eclosão máxima; portanto, é aconselhável manter a iluminação entre 1000 e 2000 lux na superfície da água [134].

O ciclo de vida das artemias começa com a eclosão do ovo que foi hidratado em laboratório, o primeiro estado larval é conhecido como nauplii (Fig. 28 (A)), que se desenvolve dentro de 24 a 36 horas após a eclosão e mede 300 a 400 microns. As artemias adultas (Fig. 28 (B)) podem ter entre 1 e 1.5 centímetros de comprimento [130].

Esse microcrustáceo se alimenta por filtração não seletiva do meio onde se encontra, filtrando grandes quantidades de diferentes materiais do ambiente onde se encontra, como corantes e compostos xenobióticos recalcitrantes presentes em efluentes têxteis [135].

A avaliação ecotóxica com *Artemia* sp. consiste em expor nauplii à amostra biorremediada por 24 e/ou 48 horas, e a análise é realizada por meio da quantificação da mortalidade de indivíduos naquele período de exposição [136].

Figura 28 *Artemia franciscana*, (A) nauplio (48 horas); (B) artemia adulta.



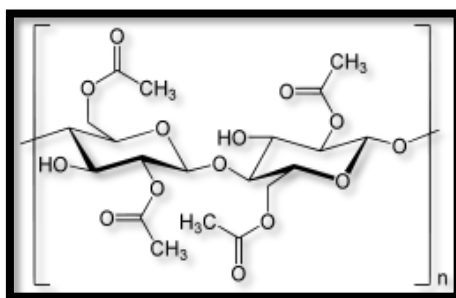
Fonte: [137]

4.7.1. Análise ecotóxica do substrato de impressão

Atualmente, as pesquisas visam fabricar produtos menos agressivos e poluentes com o meio ambiente, de modo que a produção de materiais biodegradáveis é uma tendência atual [138].

A celulose é o polímero mais abundante na natureza, pelo qual seus derivados têm sido investigados como possíveis materiais biodegradáveis. A celulose natural não é facilmente processada, mas modificações químicas em sua estrutura altamente ordenada podem torná-la um material biodegradável; o acetato de celulose (AC) (Fig. 29) é um exemplo de polímero natural modificado que foi estudado como biomaterial [138].

Figura 29 Estrutura química do acetato de celulose



Fonte: [138]

O Ac é geralmente preparado a partir de celulose natural, obtida de fontes de madeira ou de fibras curtas de algodão, uma vez que possuem um alto teor de α -celulose (95% em peso ou mais), por meio de uma reação de acetilação com ácido acético [139].

AC é um éster de ácido acético que possui uma ampla gama de propriedades e aplicações. É comumente usado como base para filmes fotográficos, fabricação de brinquedos, filtros de cigarro, armações de óculos, produção de membranas de separação, cabos de ferramentas, entre outros, dependendo do grau de substituição de grupos hidroxila na unidade de glicose monomérica [139].

Os ésteres de celulose estão sendo reavaliados como fonte natural de termoplásticos biodegradáveis e geram biomateriais com eles, uma vez que, através de estudos, demonstrou que eles podem ser biodegradáveis e gerar produtos ambientalmente seguros [139].

As substâncias químicas que serão usadas em alguma produção para uso posterior, como a AC, devem ser previamente avaliadas por bioensaios para confirmar a possível toxicidade que pode ser gerada em um ecossistema. Os efeitos tóxicos geralmente avaliados são mortalidade, imobilidade, distúrbios comportamentais, entre outros; que permitem observar se o produto químico utilizado gera ou não impactos ambientais [125].

Um dos organismos utilizados como biossensores de toxicidade é o *Artemia* sp., um dos biomodelos mais utilizados em estágios preliminares de pesquisa de novos produtos desde 1982 [137].

4.7.1.1. Análise ecotóxica do corante indigo carmim e do efluente têxtil biorremediado

Após a biorremediação realizada com células livres fúngicas, é de suma importância realizar bioensaios para confirmar uma a possível toxicidade que pode se gerar em um ecossistema [140]. A avaliação também é realizada pelo análise da mortalidade, imobilidade, alteração comportamental da artemia, entre outros. Isso permite observar se o material tratado biologicamente gera impactos ambientais [141]. A *Artemia* sp. é um dos modelos biológicos indicadores mais comuns nos testes de ecotoxicidade [142], [143], e é recomendado pela FAO [126]. Para evitar a influencia de outros fatores na avaliação, após a eclosão dos cistos, os nauplius de *Artemia* sp. devem permanecer em ótimas condições de eclosão, como temperatura, salinidade, pH, oxigenação e iluminação [134].

4.8. IMPRESSÃO DE FLUIDOS SOB DEMANDA – *Drop-on-Demand (DoD)*

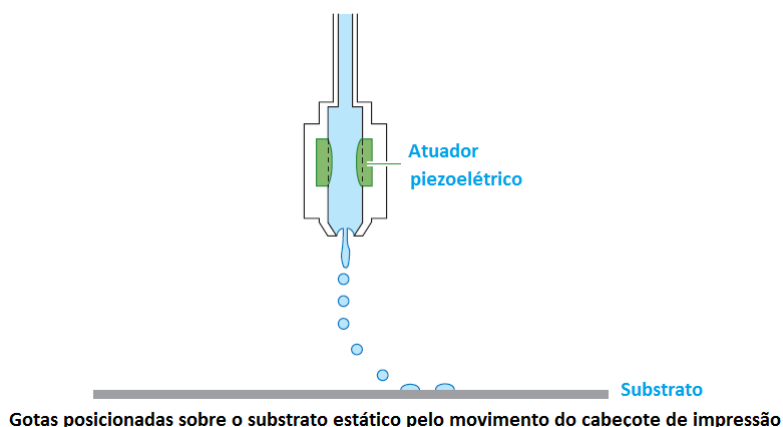
A microfluídica é uma ciência multidisciplinar que estuda sistemas que permitem a manipulação de quantidades muito pequenas de fluido (10^{-9} até 10^{-18} litros), empregando canais de tamanhos de poucos ou centenas de micras [144]. Essa versatilidade contribui à geração de dispositivos nas áreas da Química, Física, Biologia, Ciência dos Materiais, Biotecnologia, Mecânica, entre outras, para melhorar a qualidade de vida dos seres vivos [145].

Desde a década dos 80's tem aumentado o desenvolvimento de novos dispositivos por microfluídica, e atualmente novas tecnologias de impressão de gotas individuais sob demanda (Drop-on-Demand, DoD), especificamente a tecnologia de DMP™, permite o desenvolvimento de produtos inovadores no campo da nanotecnologia por meio da microfluídica, a fim de aproveitar as propriedades dos materiais micro e nanométricos, para fabricar por escalonamento dispositivos com diferentes funções [145].

A série de vantagens que apresenta a microfluídica são a otimização o consumo de amostras e reagentes, permite uma alta resolução de impressão, diminui o tempo de análise o que baixa o custo. Os sistemas microfluídicos têm um melhor controle graças a seu pequeno tamanho e ao fluxo laminar. Os microcanais têm um número de Reynolds muito pequeno, geralmente menor a 100, que evita a turbulência nos fluidos o que favorece sua manipulação [144].

As impressoras DoD podem usar atuadores térmicos ou piezoelétricos para a geração de gotas individuais. No caso dos atuadores piezoelétricos, as gotas são formadas pela propagação de um pulso de pressão originado nos bicos de impressão, mediante a oscilação mecânica controlada de um cristal piezoelétrico em cada bico de impressão. O pulso de pressão é controlado pela diferença de potencial elétrica aplicada (sem aquecimento), e precisa superar a força da tensão superficial que retêm as gotas, porque a formação delas depende da combinação dessa força com o fluxo de retorno do líquido ao reservatório que contem o fluido. As gotas são posicionadas graças à estática do substrato de impressão e ao movimento do cabeçote de impressão (Fig. 30) [146].

Figura 30 Ilustração esquemática da operação de uma impressora DoD com atuador piezoelétrico.



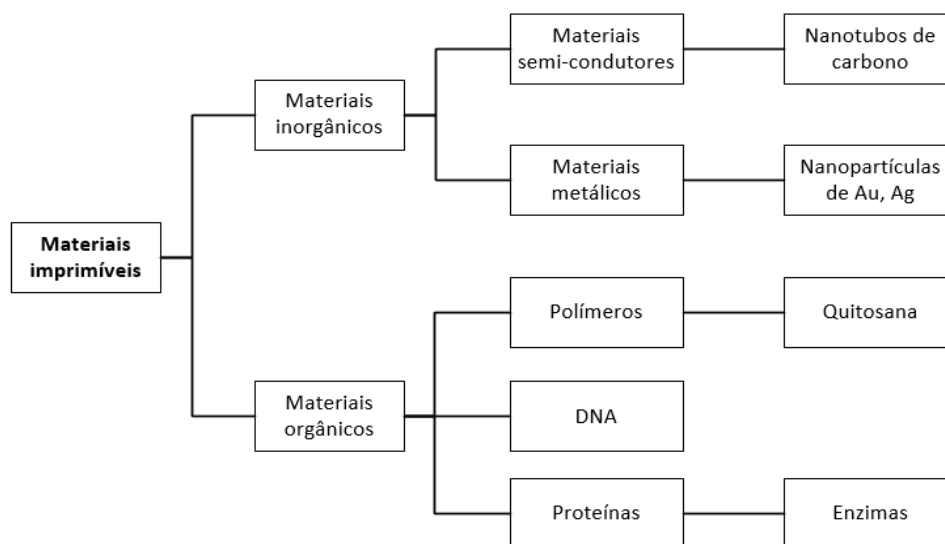
Fonte: [146]

Os volumes nas impressoras DoD podem ser desde 10 pL (picolitro = 10^{-12}) até 0.1 fL (fentolitro = 10^{-16}), gerando gotas de 21 μm até 0.1 μm de diâmetro correspondentes ao diâmetro dos bicos, e podem ser ejetadas a taxas de até 20 kHz. A medida que as gotas são menores, a resolução da impressão aumenta [146].

A ejeção do fluido de impressão pode ser feito camada por camada, gerando uma impressão em 3D, seguindo um padrão de impressão 2D desenhado em preto e branco. Portanto, a técnica DoD permite precisão e reprodutibilidade de impressão, utilizando de diversos fluidos com interesses funcionais sobre diversos substratos [146].

A tecnologia de impressão do DoD teve muitos avanços na ciência, devido à grande variedade de materiais (Fig. 31) que podem ser impressos para gerar dispositivos com uma ampla variedade de aplicações [147].

Figura 31 Exemplos de materiais imprimíveis mediante impressoras DoD.



Fonte: [147]

A bioimpressão é definida como o uso da tecnologia de impressão para gerar estruturas e dispositivos desenhados, mediante a nanomanipulação de componentes biológicos [148], [149]. Nos campos da biologia e a medicina, têm aumentado o interesse de diversas aplicações como biossensores baseados em células, reprodução da função complexa de órgãos por engenharia de tecidos, implantes de dispositivos fabricados de células ou de assistência externa para órgãos, assim como sensores baseados em enzimas [150], [151], [152]. A bioimpressão também tem sido utilizada para sintetizar outros biossensores baseados em oligonucleotídeos [153], [154], DNA e anticorpos [155], [156]. A vantagem mais promissora da bioimpressão usando tecnologia DoD é a diminuição do custo de produção, pela a otimização do fluido devido a eliminação desperdícios usando-o onde é unicamente necessário, e permite uma resolução espacial muito maior, facilitando a fabricação de sensores de menor tamanho [157].

4.8.1. Impressora de materiais Dimatix Materials Printer (DMP 2831)

A impressora DMP (2831) (Fig. 32), utiliza cartuchos descartáveis com 16 bicos de jateamento controlados individualmente pelas curvas de potencial de cada cristal piezoelétrico, permitindo gotas de 5 a 254 μm , dependendo do ângulo de inclinação da cabeça de impressão, e em função da resolução (até 5080 DPI) do padrão a ser impresso, o volume da gota é determinado pelo diâmetro do bico de impressão utilizado. O substrato de impressão (acetato de celulose) pode ser fixado por vácuo, e o jateamento do fluido é controlado pelo software da impressora, acoplado ao hardware que contem câmeras para monitoramento visual do jateamento das gotas com filmagem estroboscópica (Drop Watcher) e câmera de inspeção da qualidade da impressão (Fiducial Camera) [147].

Figura 32 Impressora Dimatix Materials Printer (DMP-2831-FUJIFILM).



Fonte: [158]

4.8.2. Fluido de impressão

A impressão de fluidos exige um método de preparação que permita controlar a geração de materiais em escala nanométrica, graças aos efeitos quânticos associados às interações entre átomos, caso esse controle não seja mantido nos materiais utilizados na impressão assim como os parâmetros recomendados, podem se gerar mudanças nos fluidos de interesse [147]. Para evitar esses danos, são recomendados os parâmetros de impressão que garantem a qualidade e a reprodutibilidade da impressão detalhados na Tabela 5.:

Tabela 5 Parâmetros de controle recomendados para impressão DoD de fluidos com atuação piezoelétrica, na impressora DMP 2831 – Fujifilm.

Parâmetro	Medida
Viscosidade	10 – 12 cP a temperatura de jato
Tensão superficial	$28 - 33 \times 10^{-5}$ N a temperatura de jato
Baixa volatilidade	Pontos de ebulição sobre 100 °C
Densidade	Gravidade específica maior a 1
Gases dissolvidos	Os fluidos não podem ter altas concentrações de gases dissolvidos
Tamanho particular	1/100 do diâmetro do bico
Acidez y alcalinidade	Valores de pH entre 4 – 9

pH	4 – 9
Volume do reservatório	1.5 mL
Volume da gota	1 – 10 pL
Diâmetro do bico	9 – 21 µm
Número de bicos	16
Espaçamento dos bicos	5 µm em cartucho inclinado a 1.1° e 254 µm a 90°

Fonte: Adaptada de [159]

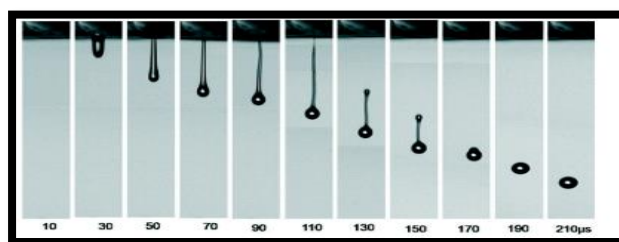
Outros parâmetros importantes para a impressão ideal são a solubilidade, ponto de ebulição dos materiais e solventes de impressão, e a adesão desta ao substrato [147].

Inicialmente o fluido é expulso formando uma coluna líquida que vai ser quebrada pela ação da tensão superficial dos atuadores piezoelétricos, para formar a gota. . O comportamento do fluido (newtoniano e não newtoniano) também pode afetar a formação da gota. Os fluidos newtonianos são aqueles em que sua viscosidade não é afetada pela sua natureza físico-química, portanto são independentes de uma tensão de cisalhamento aplicada. A viscosidade pode variar pela sua pressão e temperatura, assim que pode se considerar como uma constante da lei de Newton da viscosidade [160], equação (1):

$$\tau_{yx} = \eta \frac{dv_x}{dy} = \text{constante} \quad (1)$$

Onde τ é a tensão de cisalhamento, η é a viscosidade dinâmica e $(dv_x)/dy$ é o gradiente de velocidade. Fluidos de comportamento newtoniano geram apenas uma gota como se indica na Figura 33 [147].

Figura 33 Formação das gotas de fluidos newtonianos na impressora DMP 2831 – Fujifilm



Fonte: [147]

Os fatores que influenciam sobre o fluido durante a impressão, podem afetar às moléculas biológicas frágeis, diminuindo a atividade enzimática, porém o dano pode se eliminar adicionando trehalose no fluido de impressão, aumentando sua viscosidade sem passar dos limites dos parâmetros descritos na Tabela 5 [161].

Presume-se que a redução do dano da atividade enzimática é devido a um enlace extenso de hidrogênio entre os açúcares e a enzima, assim a trehalose é um estabilizador excepcional que protege a conformação da proteína cuidando do sitio ativo, amortecendo-a contra a desnaturação induzida pela pressão durante a impressão [161].

A formação das gotas é dependente da natureza e comportamento do fluido, por tanto este pode ser caracterizado por grandezas adimensionais antes da impressão. Os números de Reynolds (Re), Weber (We) e Ohnesorge (Oh) permitem definir se o fluido se encaixa na região de impressão. O inverso de Oh é o valor Z , e um intervalo de Z define uma faixa de impressão. A região de impressão é delimitada por quatro retas no gráfico $We \times Re$ [146].

As equações para definir estes números são:

$$Re = \frac{v \cdot a \cdot \rho}{\eta} \quad (2) \quad ; \quad We = \frac{v^2 \cdot a \cdot \rho}{\sigma} \quad (3)$$

Onde v é a velocidade de impressão, a é o diâmetro do bico do cartucho de impressão, ρ é a densidade, η é a viscosidade dinâmica e σ é a tensão superficial do fluido.

Dividimos a raiz quadrada da equação (3) por (2), e encontramos o número de Ohnesorge (4);

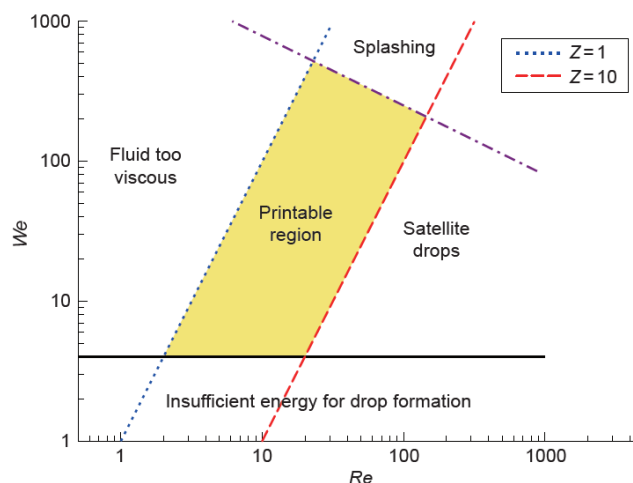
$$Oh = \frac{\sqrt{We}}{Re} \quad (4) \quad ; \quad Oh = \frac{\eta}{\sqrt{a \cdot \rho \cdot \sigma}} \quad (5)$$

A região de impressão Z (6) é definida pelo inverso do número Oh :

$$Z = \frac{1}{Oh} \quad (6) \quad , \quad \text{portanto} \quad Z = \frac{\sqrt{a \cdot \rho \cdot \sigma}}{\eta} \quad (7)$$

Assim sabemos que a avaliação da geração estável das gotas depende dos parâmetros: diâmetro do bico do cartucho de impressão, da densidade, tensão superficial e viscosidade do fluido. Também é importante considerar a velocidade de impressão. O valor adimensional da região de impressão (Fig. 34) deve estar no intervalo $10 > Z > 1$ para obter uma gota estável [162].

Figura 34 Representação dos da influencia dos números Re e We na região de impressão.

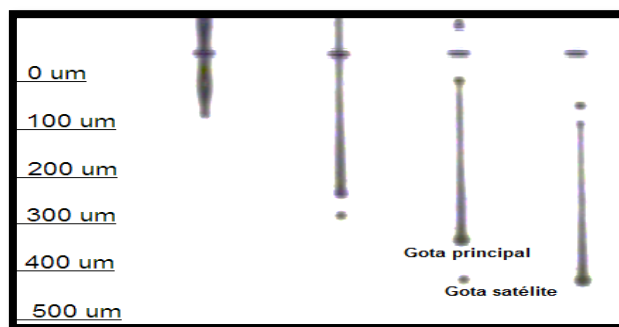


Fonte: [163]

Uma gota satélite (Fig. 35) pode ser formada durante a caída da gota do fluido, a gota satélite tem um volume muito pequeno que se desprende da gota principal de impressão e que pode

comprometer a qualidade da impressão. Uma estratégia para diminuir a formação das gotas satélites é aumentando a viscosidade do fluido (com açúcares por exemplo), para estabilizar a cauda do fluido, embora diminuindo Z. Valores de Z muito baixos evita a ejeção da gota, e valores muito altos aumenta a tendência da formação de um número grande de gotas satélites além da gota principal [163].

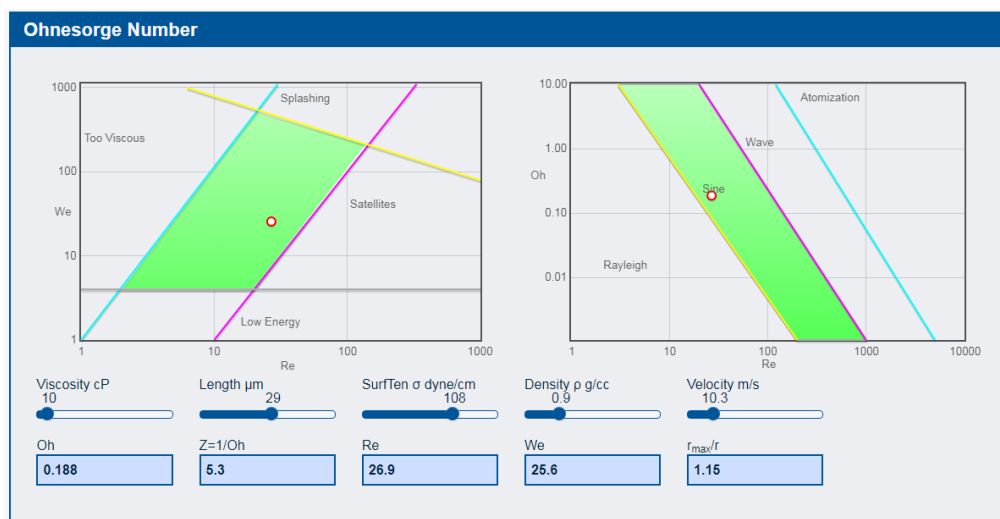
Figura 35 Formação de gotas satélites



Fonte: [147]

A região de impressão pode ser verificada via on-line mediante o aplicativo de Steven Habbott. No aplicativo (Fig. 36) podem ser colocados os parâmetros do fluido imprimível, para poder reajustá-lo se for necessário para garantir que este se encontre dentro da região imprimível.

Figura 36 Aplicativo de Steven Habbott. Fluido imprimível cumpre com os parâmetros e se encontra dentro da região de impressão.



Fonte: [164]

O ponto vermelho mostrado na Figura 36. indica que aquele fluido se encontra na região de impressão (verde), e na parte inferior se observam os parâmetros do fluido. Portanto é possível saber se o fluido será imprimível e reajustar algum ou alguns dos parâmetros de forma específica, para convertê-lo em imprimível.

4.9. ATIVIDADE ENZIMÁTICA APÓS IMPRESSÃO

A atividade enzimática pode ser medida após impressão para saber se existem mecanismos conduzem a sua redução. Entre os mecanismos para detectar essa atividade, se encontra a fluorescência simples. Peroxidases de rábano picante foram marcadas com sal de fluoresceína sódica antes da impressão. Depois da impressão se colocou o substrato para aquela enzima sobre o fluido impresso, e foi medida a fluorescência no espectrofotômetro, a absorbância indicou a presença de atividade enzimática [161]. Em outro experimento com peroxidase de rábano silvestre, a atividade enzimática foi medida usando 5 milhões de gotas impressas (50 µL de amostra) dentro de um copo, e depois se adicionou o substrato ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico). Foi medida a atividade por espectrofotometria ao longo do tempo após um minuto de reação [165].

A desnaturação das proteínas é o produto do desdobramento e da desorganização tridimensional da estruturas secundária e terciária, gerando uma mudança na conformação das proteínas pela perturbação gerada nas interações que as estabilizam, e portanto também são alteradas suas propriedades fisiológicas. Pode existir uma desnaturação reversível, mas em sua maioria ficam permanentemente alteradas (desnaturação irreversível) [166]. A desnaturação pode acontecer por métodos físicos com aquecimento, agitação, vibração, radiações ultravioleta ou visível, raios X, ou agentes químicos como ácidos e bases fortes, solventes orgânicos (etanol ou acetona), detergentes, soluções concentradas de ureia e cloreto de guanidina e metais pesados (chumbo ou mercúrio) [167], [166].

A forma nativa de uma proteína possui ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações de Van der Waals, que se são desestabilizadas, prejudicam a funcionalidade biológica [166]. A desnaturação acontece quando são interrompidas as ligações de hidrogênio da estrutura secundária, e as interações de cadeia lateral da estrutura terciária como pontes salinas, ligações dessulfuro, interações hidrofóbicas não polares e mais ligações de hidrogênio [168], assim diminuem as ligações que mantêm estáveis as estruturas e o tamanho das estruturas enzimáticas também diminui [167].

O método de Bradford para determinar proteínas totais, consiste na ligação do corante Azul brilhante de Coomassie G-250 com a arginina (grupo funcional amino primário), e grupos funcionais básicos (histidina e lisina) ou aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) das cadeias laterais das proteínas de alto peso molecular [169], gerando uma reação de modificação do pH que desloca o equilíbrio do corante para a forma aniônica que absorver o espectro de luz em 595 nm [169]. A ligação ocorre em dois minutos, e pode durar até aproximadamente duas horas [170].

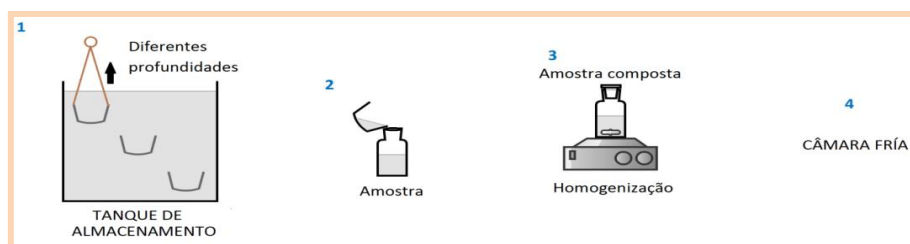
O azul brilhante de Coomassie G-250 não se liga a aminoácidos livres, proteínas de baixa massa molecular e péptidos, ligando-se unicamente a proteínas na forma de macromoléculas [171], portanto como a desnaturação diminui o tamanho das estruturas secundária e terciária das enzimas, o corante não consegue se ligar e não é detectado a 595 nm.

Os açúcares que são muito utilizados para estabilizar enzimas [161], não interferem com o reagente de Bradford [169], portanto pode ser usado para medir a presença das enzimas não desnaturadas após a impressão.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

A coleta do efluente têxtil foi realizada em uma lavanderia no município de Caruaru. Inicialmente se recolheu do tanque 1 amostras em diferentes profundidades, colocou-se num recipiente, sendo a mistura homogeneizada para formar uma amostra composta, e se manteve em câmara fria até seu uso (Fig. 37).

Figura 37 Método de coleta do efluente têxtil na estação de tratamento de lavanderia no município de Caruaru-PE.



Fonte: Autoria própria

5.1. CARATERIZAÇÃO DO EFLUENTE TÊXIL

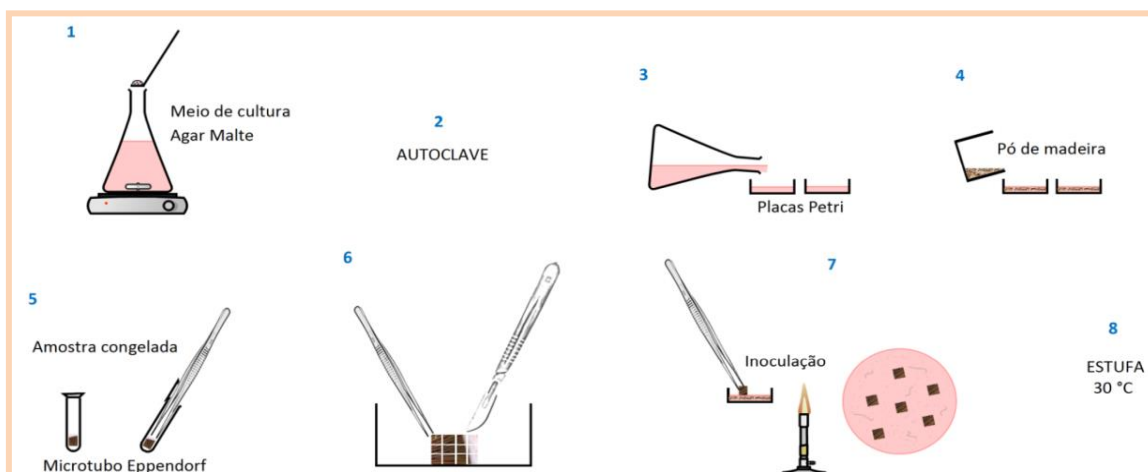
Os parâmetros físico-químicos do efluente da lavanderia de indústria têxtil coletado foram analisados no Instituto de Tecnologia de Pernambuco – ITEP, como se indicado em [172].

A fermentação líquida e a descoloração foram feitas em duas fases I e II, para selecionar os fungos com as melhores porcentagens de descoloração.

5.2. FERMENTAÇÃO LÍQUIDA

Na fase I da pré-seleção os 7 fungos (*Hjortstamia crassa* (BDNA 2221), *Loweporus tephroporus* (BDNA 2923), *Lentinus* (BDNA 2925), *Poroide ressupinado* (BDNA 2926), *Schizophyllum commune* (BDNA 3213), *Lentinus besteroi* (BDNA 3217) e *Polyporus phylipinensis* (BDNA 3236)) foram isolados e reativados a 30 °C em placas Petri com meio de cultura ágar Malte (Extrato de malte 20 g/L; glicose 20 g/L; peptona 1 g/L; ágar 20 g/L; água destilada 1000 mL) enriquecido com pó de madeira da espécie, previamente esterilizado duas vezes em autoclave (Fig. 38).

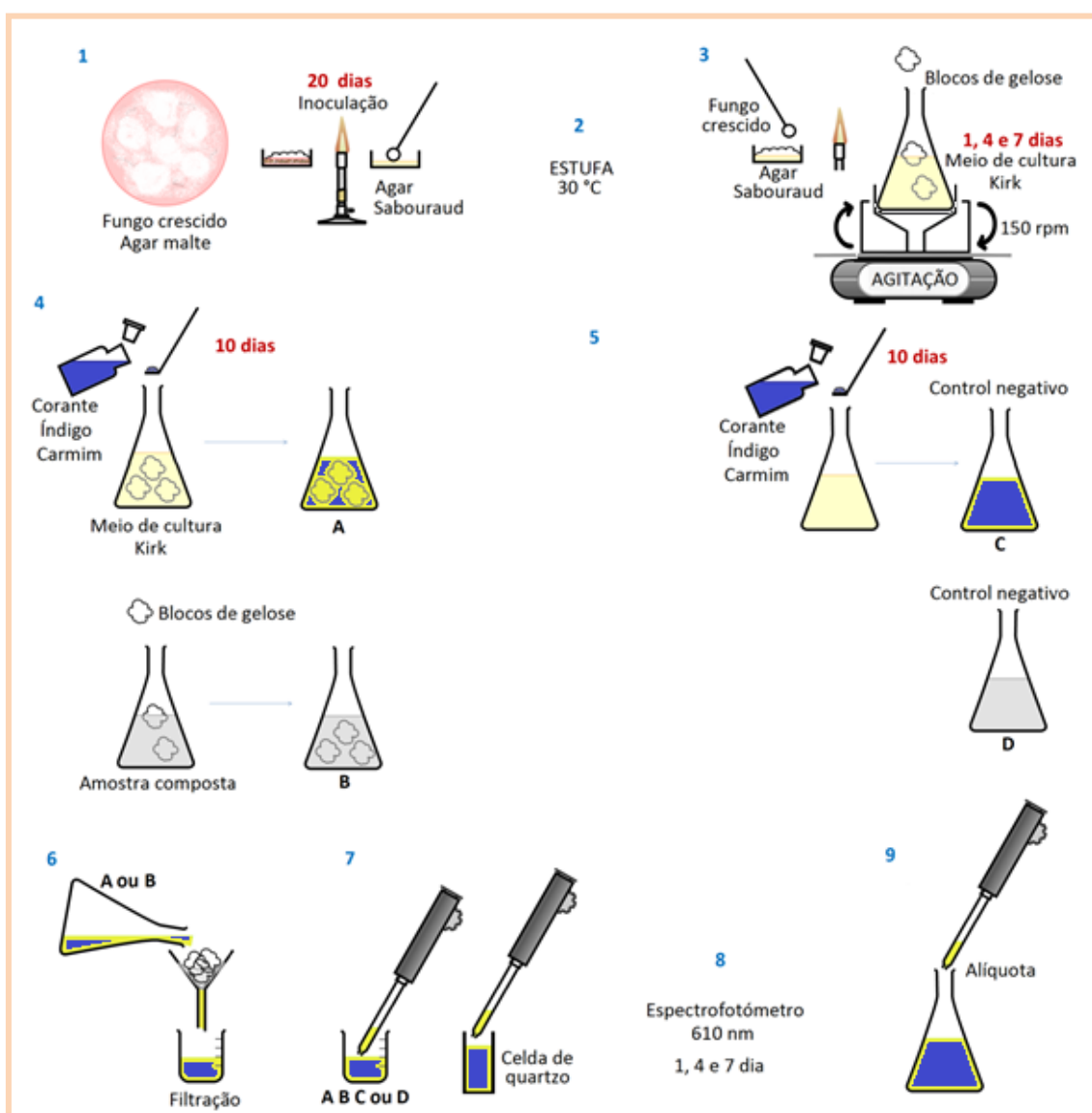
Figura 38 Reativação de 7 espécies de Agaricomycetes coletados entre 2010 – 2014.



Fonte: Autoria própria

Posteriormente o crescimento experimental inicial foi feito em placa com ágar Sabouraud por 20 dias na mesma temperatura. Após disso, os fungos foram sometidos a estresse nutricional por limitação de nitrogênio, passando discos (6 mm de diâmetro) de gelose de cada fungo por separado, colocando três discos para cada 50 mL de meio Kirk (Extrato de levedura 0.1 g/L; KH_2PO_4 0.2 g/L; MgSO_4 0.05 g/L; MnSO_4 0.016 g/L; CuSO_4 0.049 g/L; água destilada 1000 mL) em frascos Erlenmeyer de 250 mL sem condições de esterilidade. Usaram-se três tempos de experimentação, T1, T2 e T3 de 1, 4 e 7 dias respectivamente, a 30 °C em ausência de luz e com 150 rpm de agitação constante (Fig. 39).

Figura 39 Fermentação líquida e descoloração do corante índigo carmim e do efluente têxtil (fase I)



Fonte: Autoria própria

Na fase II, foram usados dois tempos de crescimento inicial (C_{i1} e C_{i2}) em ágar Sabouraud, de 20 e 45 dias respectivamente, a 30 °C e sem adição de nutrientes. Para a limitação de nitrogênio se mantiveram os mesmos parâmetros experimentais durante 24 horas.

5.3. DESCOLORAÇÃO

Inicialmente foi definido o comprimento de onda para o corante índigo carmim e para o efluente, mediante a construção das curvas de calibração com dados obtidos de uma varredura feita por espectrofotometria.

Durante a experimentação, a coloração foi medida no espectrofotômetro considerando como coloração máxima (100%) o valor da absorbância encontrado no corante diluído em água e no efluente sem tratamento (controle inicial), e subtraindo deste os valores de absorbância determinados ao longo do tratamento (controle no tempo e demais amostras). Depois os valores encontrados foram expressos em porcentagens. Finalmente, a porcentagem de descoloração foi determinada usando o valor oposto da coloração dentro da faixa de 100%.

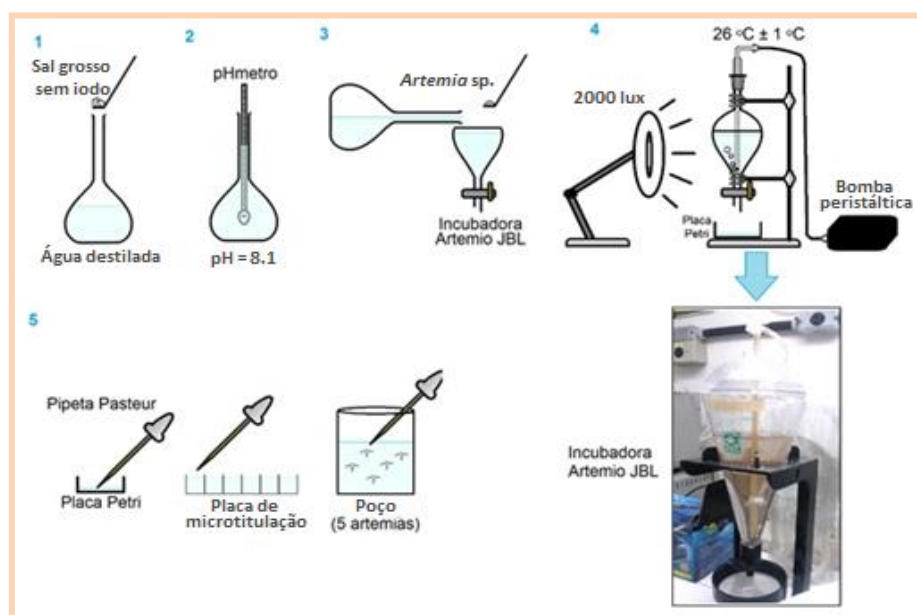
Na fase I da pré-seleção, após a fermentação nos tempos T1, T2 e T3, os discos de gelose de cada fungo foram separados dos extratos enzimáticos por filtração a vácuo com uso da bomba de vácuo EXIPUMP e papel filtro qualitativo UNIFIL, e foram colocados três discos por cada frasco Erlenmeyer (250 mL) com 50 mL do corante índigo carmim 50 ppm (50mg/L), ou com 50 mL do efluente industrial puro por 10 dias, mantendo as condições experimentais de temperatura, luz e agitação, sem esterilidade. Durante esse tempo, foi quantificada a descoloração mediante o registro da absorbância por espectrofotometria a cada três dias em 665nm. No final da fase I, foram escolhidos quatro fungos pelas melhores porcentagens de descoloração apresentadas no tempo analisado.

Na fase II da pré-seleção, após a fermentação de 24 h, foi replicada a metodologia de descoloração da fase I, mas o crescimento fúngico foi de 28 dias para os quatro fungos escolhidos. Ao finalizar a fase II foram escolhidos dois fungos segundo as porcentagens de descoloração apresentadas em cada tempo analisado, e seguindo o utilizado no ensaio de crescimento inicial (C_{i1} e C_{i2}). Os controles negativos foram o corante índigo carmim 50 ppm ou efluente têxtil sem fungo, e os controles iniciais foram os controles abióticos medidos no começo do ensaio.

5.4. ECOTOXICIDADE EM *Artemia sp.* (HIGH 5 - INVE)

O corante 50 ppm e o efluente tratados biologicamente pelos fungos durante a fase II da pré-seleção por descoloração, foram testados em *Artemia* HIGH 5 – INVE para verificar se o produto biotratado pode ser tóxico nos ecossistemas aquáticos. A eclosão dos cistos foi realizada no incubador Artemio JBL. Foi colocado 500 mL de água salina 3% (p/v), usando sal grosso sem iodo, preparada a pH 8.1 e acrescentando 1 g de cistos do microcrustáceo, mantendo temperatura constante de 27 °C e 2000 lux de luminescência por 48 h, monitorado com o luxômetro SMARTER LUXMETER 1.0.1 VERSION DE SMART TOOLS®. Após a eclosão, as artemias foram colocadas em uma placa de microtitulação de 24 poços, 5 indivíduos por poço, e se adicionou 1 mL da amostra. Como controle branco foi usada a solução salina com o mesmo pH, o controle inicial foi corante 50 ppm recém preparado ou o efluente puro, e o controle no tempo foi o corante 50 ppm ou o efluente que foram usados como controles negativos nas fases I e II. A sobrevivência de *Artemia sp.* foi avaliada durante 5 dias [173]. O ensaio foi monitorado por lupas para poder observar os indivíduos sem movimento (mortos). (Fig. 40).

Figura 40 Avaliação da ecotoxicidade em Artemia HIGH 5



Fonte: Autoria própria

O suporte onde foram impressas as enzimas imobilizadas em nanopartículas de quitosana, foi o acetato de celulose. Para descartar que o suporte seja tóxico, em uma pesquisa anterior testamos discos de 6 mm de diâmetro nas artemias como foi descrito em [174].

5.5. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DOS FUNGOS

Todos os fungos usados nessa pesquisa foram coletados e identificados morfolologicamente em campo entre os anos 2010- 2014. O fungo F1 foi coletado por Lima-Junior, N.C. no ano 2013, e o fungo F5 foi coletado por Lira, C.R.S. em 2015.

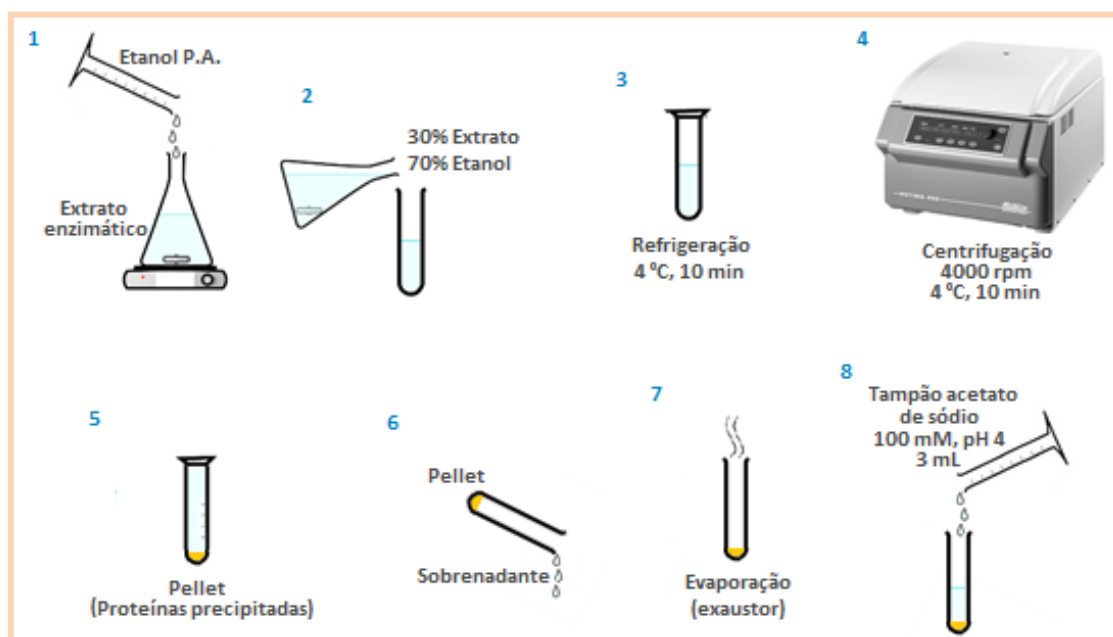
Com o uso do microscópio ótico (OPTON) se encontrou grampos de conexão nas hifas dos fungos selecionados (F1 e F5) na fase II da pré-seleção por descoloração. Para os análises enzimáticos foram identificados molecularmente os gêneros dos fungos, e foi adicionado à pesquisa um terceiro fungo padrão para descoloração, o *Phanerochaete chrysosporium*, que também foi identificado pela metodologia descrita em [175].

5.6. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS E ATIVIDADE DE ENZIMAS DEGRADADORAS DE LIGNINA

Depois da seleção dos dois fungos, ao ensaio foi acrescentado *Phanerochaete chrysosporium* que foi definido como FM (Fungo Modelo) tendo em vista a produção enzimas fenoloxidasas. As enzimas presentes nos extratos obtidos por fermentação líquida foram concentradas por precipitação etanólica de proteínas (Fig. 41). Usou-se 70 mL de etanol absoluto previamente refrigerado, e foi adicionado lenta e pausadamente em 30 mL do extrato enzimático sob agitação constante. Em seguida, as amostras foram colocadas na geladeira a 4°C por 15 minutos, para depois ser centrifugadas a 4000 rpm por 10 min a 4°C , na centrífuga THERMO SCIENTIFIC – JOUAN BR4i MULTIFUNCTION – KEY WRITE-D. Logo foi descartado o sobrenadante, e o etanol restante no pellet foi evaporado dentro do exaustor por 20 minutos

a temperatura ambiente, para posteriormente resuspender as proteínas em 3 mL (em relação 10 para 1 com os 30 mL do extrato enzimático) de tampão acetato de sódio 100 mM com pH 4.

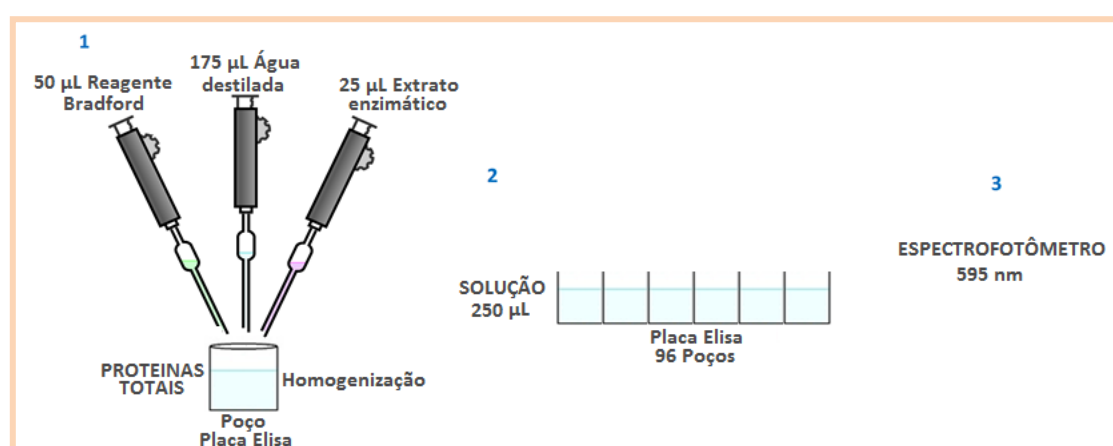
Figura 41 Concentração por precipitação etanólica dos extratos enzimáticos



Fonte: Autoria própria

A determinação da concentração de proteínas totais foi realizada em placa de Elisa de 96 poços (300 µL). Para a reação se usou 50 µL de reagente de Bradford, 175 µL de água destilada e 25 µL do extrato enzimático, e o no branco foram usados 25 µL do tampão acetato de sódio 100 mM pH 4. As reações foram medidas em triplicata a 595 nm [170] no espectrofotômetro de Elisa BIOTEK – EPOCH – GEN5 (Fig. 42).

Figura 42 Método de quantificação de proteínas totais



Fonte: Autoria própria

A absorbância de cada ensaio foi determinada pela subtração do valor encontrado no controle, nos valores das absorbâncias quantificadas das amostras. A concentração de proteínas totais será calculada com base equação (8) da curva padrão obtida com Soro Albumina Bovina (BSA) com $R^2 = 0.98$:

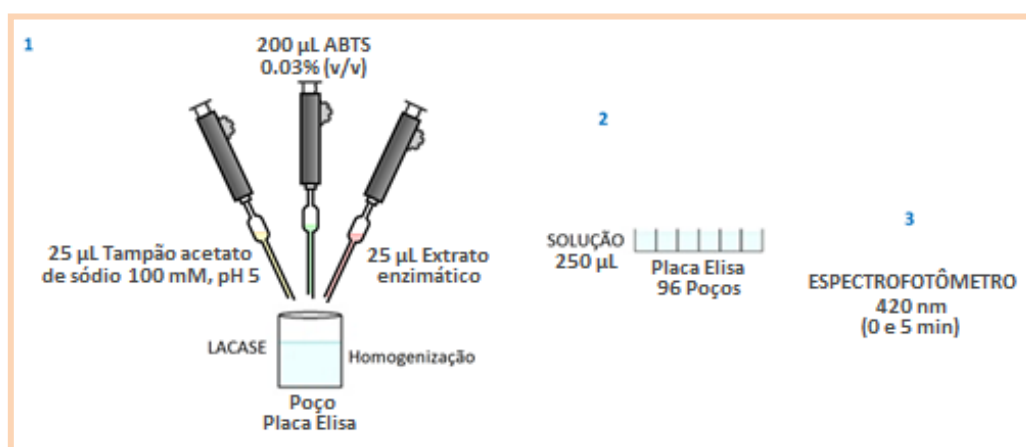
$$Y = 0.007X + 0.0412$$

$$X = \left(\frac{y - 0.0412}{0.007} \right)$$

$$\text{Concentração de proteínas} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \left(\frac{\text{Abs} - 0.0412}{0.007} \right) \quad (8)$$

A atividade da lacase foi determinada a 420 nm nos tempos 0 e 5 minutos, em placa de Elisa de 96 poços por triplicata. Na reação se usou 25 μL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5; 200 μL de ABTS 0,03% (p/v); 25 μL de extrato enzimático [84]. O coeficiente de extinção para a oxidação do ABTS é $\epsilon_{420} = 36000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [176] (Fig. 43).

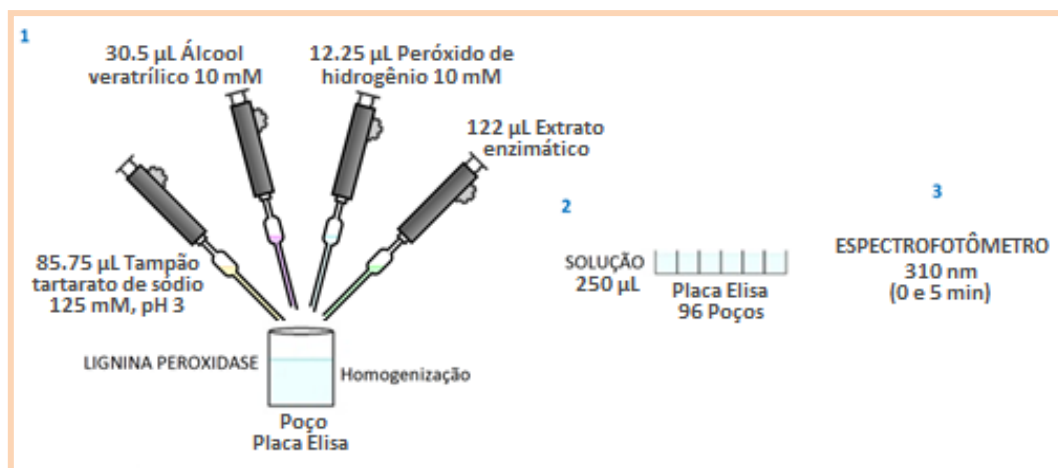
Figura 43 Metodologia para determinar a atividade enzimática da lacase



Fonte: Autoria própria

Para a enzima lignina peroxidase a atividade foi determinada a 310 nm nos tempos 0 e 5 minutos. A reação foi feita com 85.75 μL de tampão tartarato de sódio 125 mM, pH 3; 30.50 μL de álcool veratrílico 10mM; 12.25 μL de peróxido de hidrogênio 10 mM; 122 μL de extrato enzimático [84]. O coeficiente de extinção para a oxidação do álcool veratrílico pelo H_2O_2 é $\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ([176] (Fig. 44).

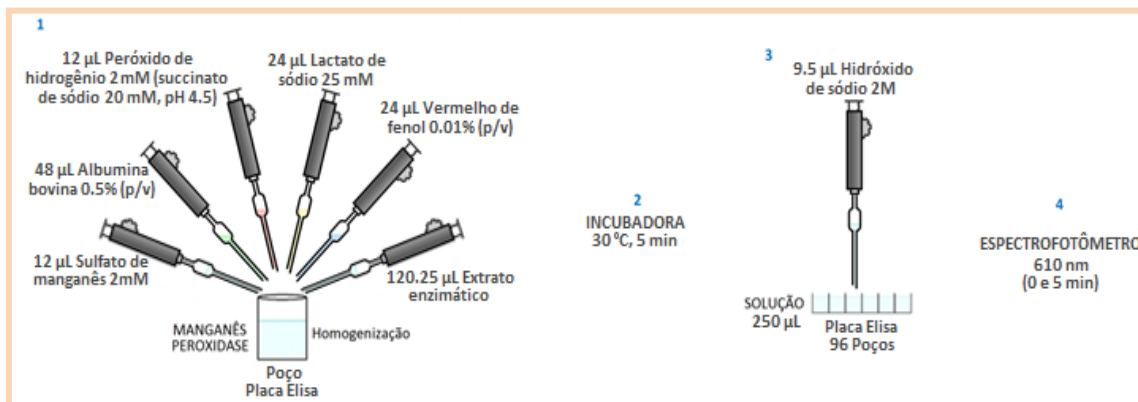
Figura 44 Metodologia para determinar a atividade enzimática da lignina peroxidase



Fonte: Autoria própria

A atividade da manganês peroxidase foi determinada a 610 nm nos tempos 0 e 5 minutos. Na reação se usou 12 µL de sulfato de manganês 2 mM; 48 µL de albumina bovina 0.5 % (p/v); 12 µL de peróxido de hidrogênio 2 mM preparado em succinato de sódio 20 mM, pH 4.5; 24 µL de lactato de sódio 25 mM; 24 µL de vermelho de fenol 0.01% (p/v); 120.25 µL de extrato enzimático; a reação foi incubada por 5 minutos a 30 °C e posteriormente foi paralisada com 9.5 µL de hidróxido de sódio 2 M [177]. O coeficiente de extinção para a oxidação do vermelho fenol é $\epsilon_{610}=4460 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ [178] (Fig. 45).

Figura 45 Metodologia para determinar a atividade enzimática da manganês peroxidase



Fonte: Autoria própria

Uma unidade (U) de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima (L) que oxida 1 mol de substrato por minuto de reação. A atividade enzimática das três enzimas foi determinada pela equação (9) modificada de [179].

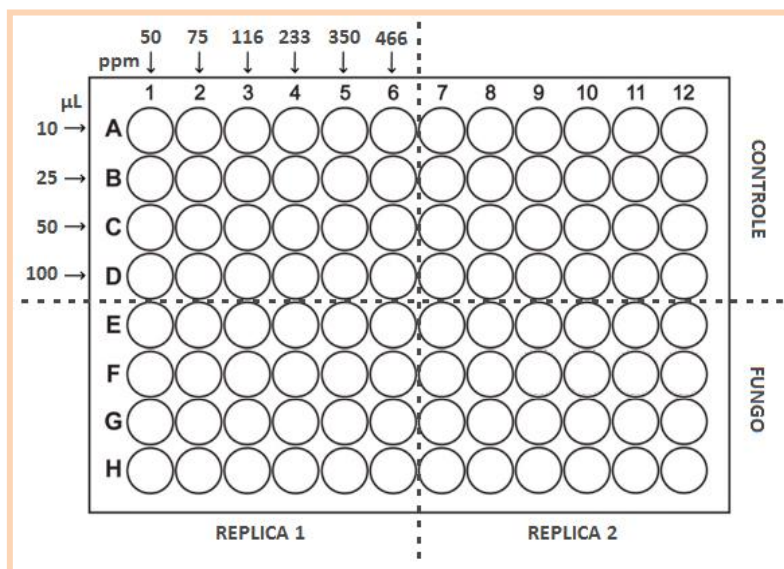
$$\frac{U}{L_{min}} = \frac{\Delta Abs * V_T}{\epsilon * d * \Delta t * V_m} \quad (9)$$

Em que ΔAbs é o diferencial de absorbância ($Abs_f - Abs_o$); $V_T (\mu L)$ é o volume total de reação; $\epsilon (\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1})$ é o coeficiente de extinção para a catálise da reação; $d (\text{cm})$ é a distância que passa o raio de incidência de luz através da amostra; $\Delta t (\text{min})$ é o diferencial de tempo de reação ($t_f - t_o$); $V_m (\mu L)$ é o volume da amostra na reação.

5.7. CINÉTICA ENZIMÁTICA DOS EXTRATOS

Após a concentração das enzimas presentes nos extratos obtidos dos fungos, se determinou a cinética enzimática, para isso foi considerada a constante de Michaelis K_M teórica da lacase para o índigo carmim de 500 µM ou 233 ppm (valor determinado como média aproximada da faixa de valores encontrados na literatura). Assim que na placa de Elisa se colocaram 50 µL de diferentes concentrações do corante índigo carmim: 50 ppm, 75 ppm, 117 ppm, 233 ppm, 350 ppm e 466 ppm. Posteriormente se adicionaram as enzimas concentradas de cada fungo em diferentes volumes 10 µL, 25 µL, 50 µL e 100 µL e se mediu no espectrofotômetro a 665 nm, por 309 horas (Fig. 46). No caso do efluente, se repetiu o procedimento, mas com ele puro.

Figura 46 Esquema da determinação da cinética enzimática dos extratos em placa de Elisa.



Fonte: Autoria própria

A velocidade de reação foi obtida pela inclinação da curva na função linear (10), criada entre as absorbâncias medidas no tempo.

$$y = ax + b \quad (10)$$

Onde y é a absorbância medida no espectrofotômetro, a é a velocidade de reação e x é o tempo em que foram medidas aquelas absorbâncias.

A K_M *real* do extrato enzimático foi definida pela equação (11) de Michaelis – Menten:

$$v = \frac{v_{max} * [S]}{K_M + [S]} \quad (11)$$

A equação (12) de Linearidade de Lineweaver-Burk é:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{max}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (12)$$

Onde V é a velocidade de reação em uma concentração específica do corante, V_{max} é a velocidade máxima da reação e $[S]$ é a concentração do corante.

Por tanto, a V_{max} é definida pelo termo independente $1/V_{max}$ e K_M *real* do extrato é definida pelo termo dependente K_M/V_{max} da equação (12).

5.8. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS EM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

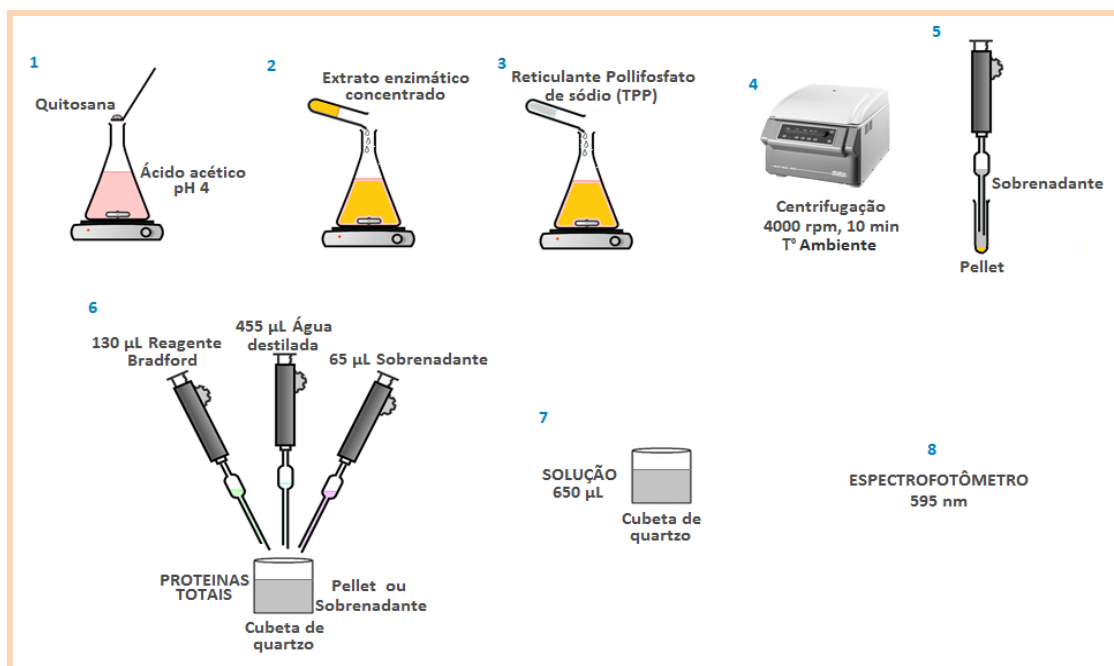
As enzimas concentradas foram imobilizadas em nanopartículas quitosana. Para a formação das nanopartículas, primeiro se dissolveu o biopolímero em 50 mL de ácido acético 0.1 M e pH 4, em concentração (1 mg/mL) sob agitação constante (agitação sem gerar espuma). A quitosana não dissolvida foi filtrada a vácuo. Posteriormente no biopolímero filtrado se adicionou 7 mL do extrato enzimático concentrado (1.924 µg/mL para F1, 20.019 µg/mL para

F5 e 15.162 µg/mL para FM) na quitosana dissolvida, e se acrescentou pausadamente 20 mL do reticulador tripolifosfato de sódio (TPP) previamente preparado em água deionizada (1 mg/mL). A proporção usada foi 5:2 (quitosana-TPP) e o volume de extrato enzimático não sobrepassou 10% da solução. Deixou-se misturar a solução até completar o total de 30 minutos em agitação constante e a temperatura ambiente. As amostras foram analisadas por espectrofotometria UV para determinar maior pico de absorbância, e assim calcular a porcentagem de N-acetilação da quitosana usada com a seguinte equação (13):

$$\% \text{ Grau de acetilação} = \frac{161.1 * Abs * V_s - 0.0218 * m}{3.3615 * m - 42.1 * Abs * V_s} * 100 \quad (13)$$

Em que **Abs** é a absorbância no maior pico registrado, **V_s (L)** é o volume da solução e **m (mg)** é a massa da quitosana [104]. O Aparelho de UV utilizado foi um espectrotômetro (THERMO SCIENTIFIC – EVOLUTION 60), em um intervalo de 190 – 500 nm, com cubeta de quartzo de 1 mL de amostra (Fig. 47).

Figura 47 Imobilização das enzimas dos extratos em nanopartículas de quitosana.



Fonte: Autoria própria

Para saber a porcentagem de enzimas que foram imobilizadas, primeiro foi medida a atividade de proteínas totais das amostras, e posteriormente foram centrifugadas a 4000 rpm por 60 minutos em 2 °C de temperatura, para poder medir a atividade de proteínas totais do sobrenadante [110]. Com a equação 13, se determinou o valor porcentual de enzimas imobilizadas a partir da subtração de **AE amostra**, que é a atividade enzimática pré-centrifugação menos a **AE sobrenadante**, que indica a atividade enzimática do sobrenadante pós-centrifugação. O branco comparativo foi composto de todos os elementos, incluindo nanopartículas de quitosana sem as enzimas (Fig. 47). O material imobilizado foi conservado em refrigeração até seu posterior uso na impressão DoD [88].

$$\% \text{ Enzimas Imobilizadas} = \frac{AE \text{ amostra total} - AE \text{ sobrenadante}}{AE \text{ amostra total}} * 100 \quad (13)$$

5.9. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COM ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS IMOBILIZADAS.

Para analisar o tamanho e a morfologia das nanopartículas de quitosana que contem na sua estrutura as enzimas ligninolíticas, foram filtradas a amostras (filtro de 0.2 µm), para quantificar o Espectro Dinâmico de Luz (DLS) e o Potencial Zeta, e para determinar o seu diâmetro e forma no microscópio eletrônico de varredura – MEV (TESCAN MIRA3).

5.10. REUSO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COM ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS IMOBILIZADAS.

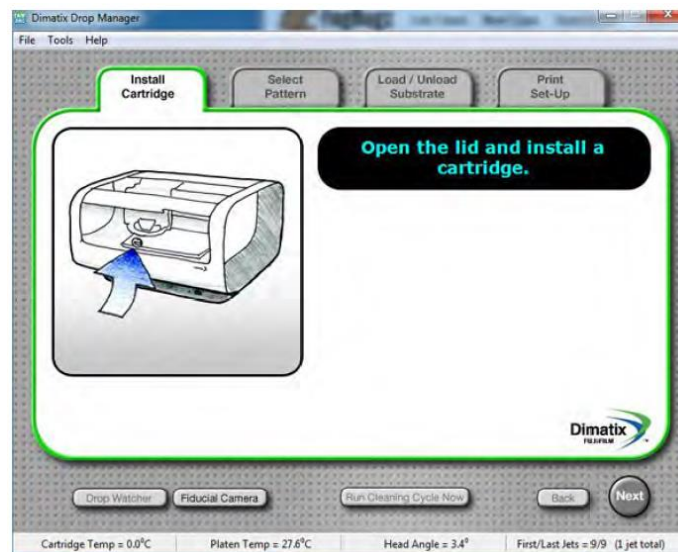
As enzimas concentradas que foram imobilizadas em nanopartículas quitosana e as nanopartículas sem enzimas, se colocaram em contato com 50 mL do corante índigo carmim 50 ppm em volumes de 500 µL e 5 mL por triplicata, em frascos Erlenmeyer de 250 mL de volume, a 30 °C e 150 rpm por 9 dias, e foi quantificada a descoloração por espectrofotometria (610 nm) a cada 3 dias. Posteriormente foram filtradas todas as amostras a vácuo e o filtrado foi centrifugado por 1h, a 4000 RPM a 2 °C, a continuação foi retirado o sobrenadante, o pellet (contendo o material nanoparticulado) foi resuspendido de novo em 50 mL do corante índigo carmim, que depois foi trasvasado para Erlenmeyer de 250 mL. Os frascos Erlenmeyer se colocaram a 30 °C e 150 rpm por 15 dias, quantificando a descoloração por espectrofotometria também a cada 3 dias. Os controles negativos foram o corante índigo carmim 50 ppm onde foram substituídos os volumes das nanopartículas por água deionizada, e os controles iniciais foram os mesmos controles negativos medidos no começo do ensaio.

5.11. FABRICAÇÃO DO DISPOSITIVO IMPRESSO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COM ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS IMOBILIZADAS POR TECNOLOGIA DOD.

Os dispositivos impressos com fluidos de enzimas ligninolíticas imobilizadas em nanopartículas de quitosana foram produzidos na impressora Dimatix Materials Printer DMP-2831 (FUJIFILM Dimatix Inc.), usando o cartucho DMC-11610-195628.0312-2015 (10 picolitros, 16 bicos) descartável. O formato das gotas se baseia na viscosidade, tensão superficial, e densidade do fluido, assim como da velocidade de impressão e do diâmetro do bico ejetor, mas como o material a imprimir é de origem biológica, foi necessário adicionar 14% (v/v) de trehalose (42,6 mM) para proteger a conformação estrutural das enzimas e, portanto a viscosidade do fluido de impressão aumentou.

A utilização da impressora foi guiada passo a passo pelo software acoplado ao hardware. O primeiro passo se realiza na opção Replace Cartridge (Fig. 48), aqui se colocou o cartucho preenchido com 1.5 mL do fluido de impressão (inicialmente água deionizada e depois o fluido de interesse por cada fungo), e se ajustou a inclinação do cartucho para 4.5° devido ao espaçamento fixo dos bicos de 22.5 µm.

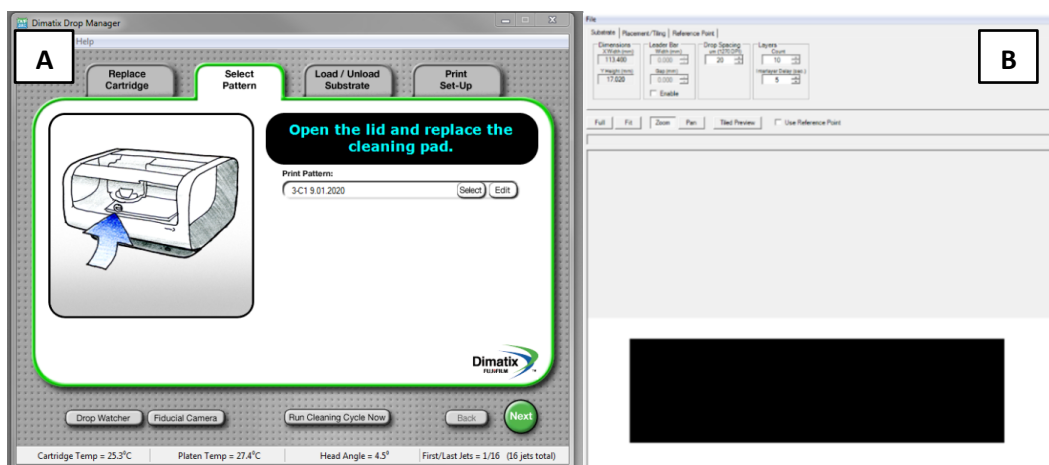
Figura 48 Primeiro passo - Replace Cartridge



Fonte: [158]

O segundo passo foi realizado na opção Select Pattern (Fig. 49 (A)), aqui foi selecionado o padrão de impressão previamente desenhado (1 cm de largura e 5 cm de comprimento) (Fig. 49 (B)) na opção Print Pattern. Nesta opção foi escolhido o número de camadas (10) para ser impresso o fluido (14255 gotas = 0.14 μ L no total de 10 camadas), e se determinou o tempo de secado do fluido (2 segundos) entre as camadas.

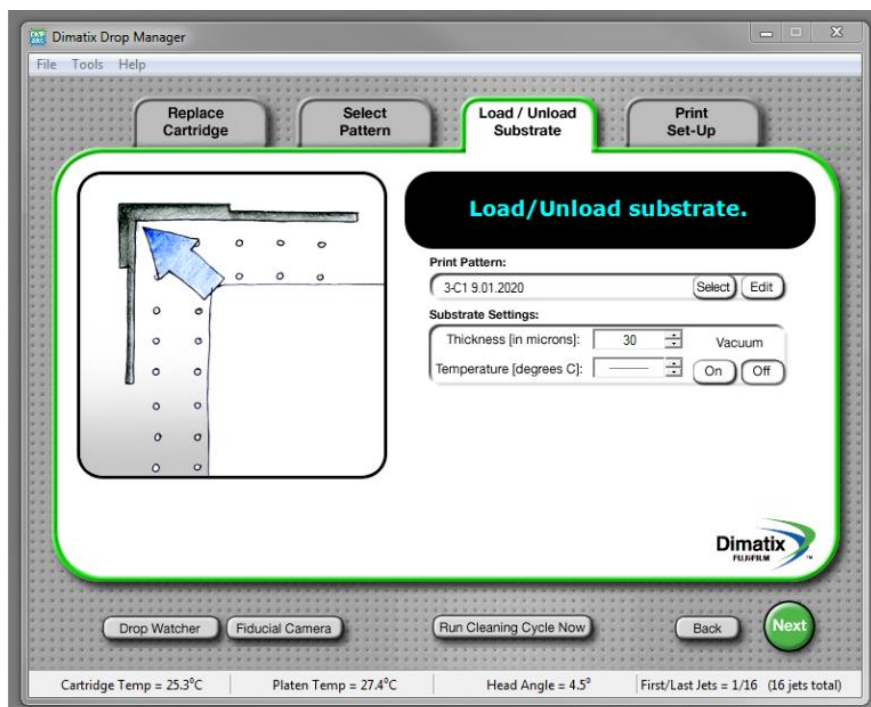
Figura 49 Segundo passo - (A) Select Pattern, (B) Padrão de impressão



Fonte: [158]

O terceiro passo se realizou na opção Load / Unload Substrate (Fig. 50), neste passo se fixou a vácuo o substrato de impressão (acetato de celulose - AC), e se colocou a distancia em micrometros (30 μ m), desde a base onde se encontra o substrato (20 μ m de espessura) e a altura da base do cartucho onde se encontram os bicos de impressão.

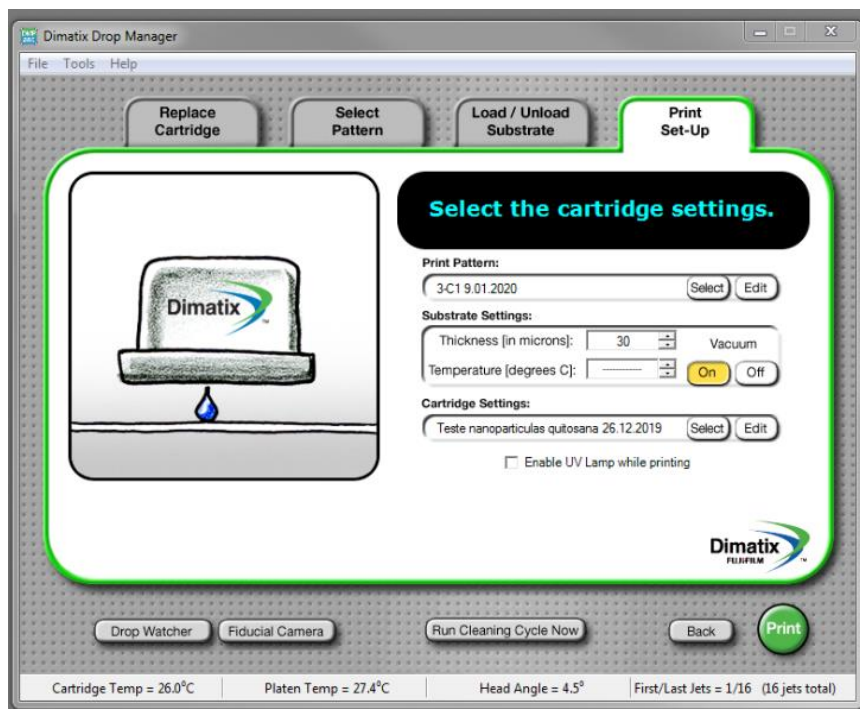
Figura 50 Terceiro passo – Load / Unload Substrate



Fonte: [158]

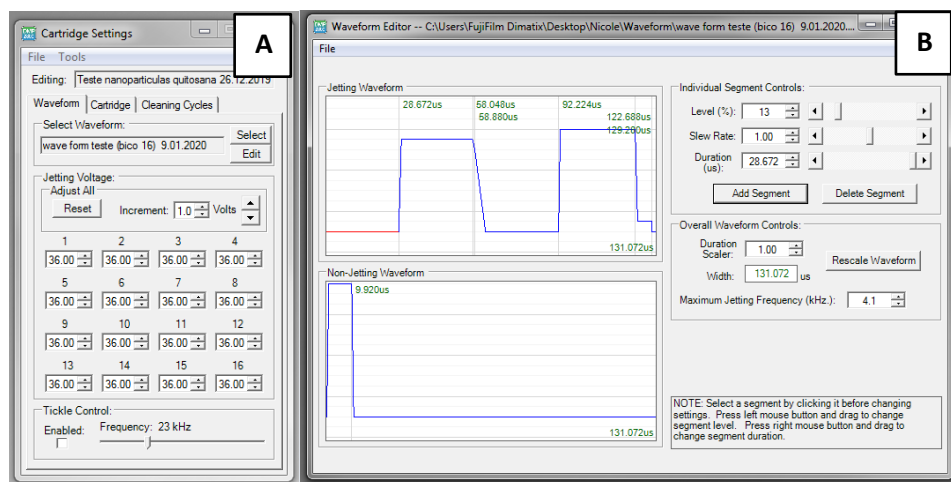
O quarto passo foi realizado na opção Print Set-Up (Fig. 51), aqui foi selecionado aperfeiçoada a formação das gotas variando a forma de onda (Fig. 52 (B)) de pulso elétrico dos atuadores piezoelétricos na ferramenta Cartridge Settings na opção Waveform (Fig. 52 (A)).

Figura 51 Quarto passo - Print Set-Up



Fonte: [158]

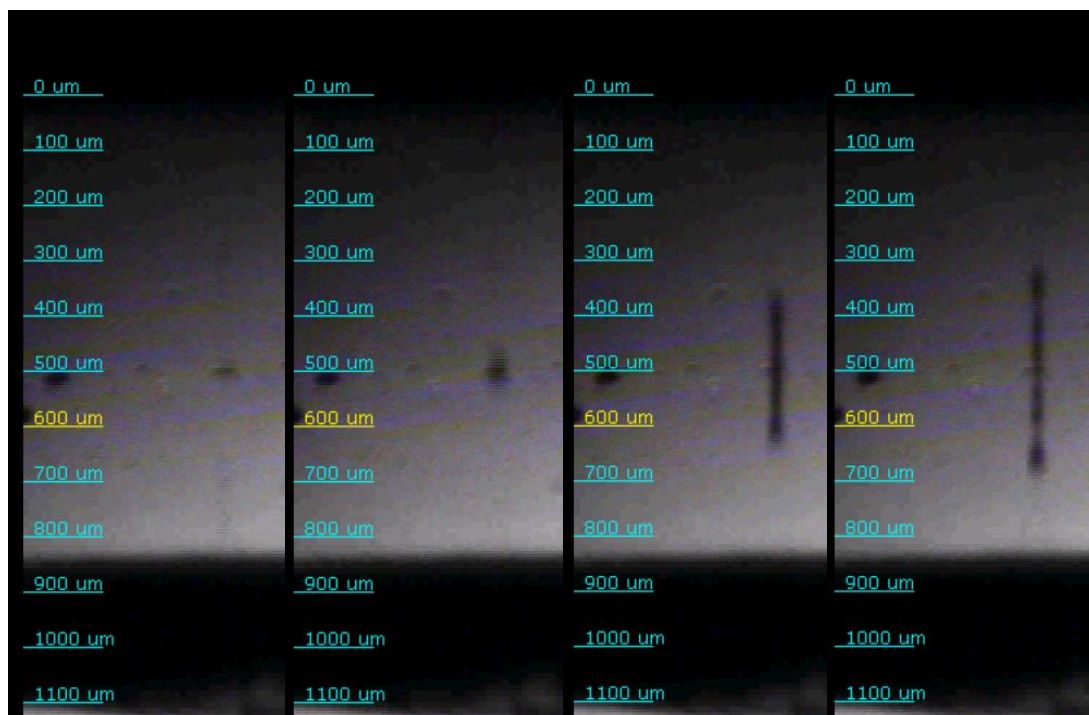
Figura 52 (A) Ferramenta Cartridge Settings, (B) Waveform



Fonte: [158]

Dentro da opção Print Set-Up existe a ferramenta Drop Watcher (Fig. 53), onde foi observado o jateamento do fluido saindo dos bicos de impressão com ajuda de uma câmera estroboscópica. Aqui se monitorou o aperfeiçoamento da formação das gotas variando a forma da onda, assim como a velocidade e a frequência máxima de jateamento em cada bico de impressão.

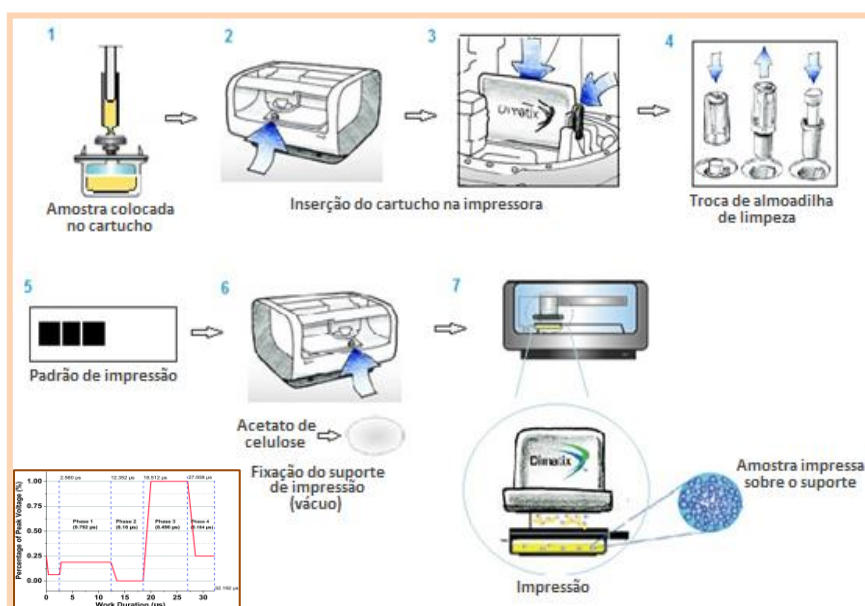
Figura 53 Ferramenta Drop Watcher



Fonte: [158]

O resumo do uso da impressora Dimatix printer mediante tecnologia DoD se encontra na Figura 54.

Figura 54 Esquema geral do uso da impressora Dimatix printer mediante tecnologia DoD



Fonte: [158]

5.12. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DO DISPOSITIVO IMPRESSO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COM ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS IMOBILIZADAS POR TECNOLOGIA DOD.

A quantificação de proteínas totais presentes nos dispositivos impressos foi realizada pelo método de Bradford. Os dispositivos (1 cm x 5 cm) foram divididos para obter dois tamanhos iguais de 1 cm de largura por 2.2 cm de comprimento, com a finalidade de cobrir toda a parede lateral de dois poços da placa de Elisa de diâmetro 0.7 cm (perímetro 2.2 cm) e largura de 1 cm cada um. Para esse tamanho de dispositivo o volume de amostra impressa se reduz a 0.07 µL, equivalente a 7602 gotas. O volume de amostra impresso de 0.07 µL foi redondeado a 0.1 µL, e seguindo a metodologia de Bradford detalhada na quantificação de proteínas totais dos extratos enzimáticos concentrados, foi necessário adicionar 0.25 µL do reagente de Bradford e 0.65 µL de água deionizada, mas como os volumes são muito baixos e a amostra está distribuída na parede do poço de Elisa de 300 uL, foi adicionado esse mesmo volume em água deionizada para permitir a ligação do azul brilhante de Coomassie BG-250 no volume total da amostra. Os valores de absorbância encontrados foram multiplicados pelo fator de diluição de 30 (0.1 µL de amostra x 300 uL de água deionizada), para determinar o valor real aproximado de absorbância medida. Também foi determinada a porcentagem do aumento da concentração efetiva das enzimas em solução graças à imobilização em nanopartículas de quitosana.

5.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As duas análises apresentadas a continuação, foram realizadas após a fase II da pré-seleção dos fungos agaricomycetes por descoloração do corante índigo carmim e do efluente têxtil puro.

5.13.1. Descoloração do corante índigo carmim (CIC) e do efluente têxtil puro (ETP) por fungos agaricomycetes crescidos em diferentes tempos iniciais (C_i1 e C_i2)

5.13.1.1. Desenho experimental

O desenho experimental que vai se aplicou foi um desenho fatorial (4^2) para avaliar a combinação de dois níveis: 4 espécies de Agaricomycetes e 4 condições experimentais. Avaliaram-se 4 fatores de tipo qualitativo: 4 espécies de fungos, frente a quatro fatores quantitativos baseados na taxa de descoloração medida em comprimentos de onda e expressada em percentual para quatro condições experimentais:

1. Corante índigo carmim 50 ppm testado em fungos com tempo de crescimento inicial de 20 dias (CIC - C_i1);
2. Efluente têxtil puro testado em fungos com tempo de crescimento inicial de 20 dias (ETP - C_i1);
3. Corante índigo carmim 50 ppm testado em fungos com tempo de crescimento inicial de 45 dias (CIC - C_i2);
4. Efluente têxtil puro testado em fungos com tempo de crescimento inicial de 45 dias (ETP - C_i2).

5.13.1.2. Tratamentos

Realizaram-se 16 tratamentos (4^2) baseados na combinação dos níveis: Espécie de Agaricomycete e Condição experimental

Tabela 6 Matriz do desenho fatorial (4^2) descoloração do corante índigo carmim (CIC) e do efluente têxtil puro (ETP) por fungos agaricomycetes crescidos em diferentes tempos iniciais (C_i1 e C_i2), e para Supervivência de Artemia HIGH 5.

Tratamento	Fungo agaricomycete	Condição experimental
T1	F1	CIC - C _i 1
T2	F2	CIC - C _i 1
T3	F5	CIC - C _i 1
T4	F6	CIC - C _i 1
T5	F1	ETP - C _i 1
T6	F2	ETP - C _i 1
T7	F5	ETP - C _i 1
T8	F6	ETP - C _i 1
T9	F1	CIC - C _i 2
T10	F2	CIC - C _i 2

T11	F5	CIC - C _i 2
T12	F6	CIC - C _i 2
T13	F1	ETP - C _i 2
T14	F2	ETP - C _i 2
T15	F5	ETP - C _i 2
T16	F6	ETP - C _i 2

Fonte: Autoria própria

5.13.1.3. Repetições

Para a fase de descoloração vão realizar-se 3 réplicas para cada tratamento com três controles negativos (os fluidos sem os fungos) e três controles iniciais (fluidos sem fungos medidos no começo do ensaio).

5.13.1.4. Variável de resposta

A variável de resposta foi a percentagem de descoloração gerada pelos fungos nos quatro tipos de condições experimentais.

5.13.1.5. Modelo estatístico

Para o modelo com AxB tratamentos que vai ser replicado n vezes, o desenho está indicado pela equação (14):

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (14)$$

$$i = 1, 2, \dots, a; j = 1, 2, \dots, b; k = 1, 2, \dots, n$$

Onde μ é a média geral, α_i é o efeito gerado pelo i -ésimo nível do fator A, β_j é o efeito do j -ésimo nível do fator B, $(\alpha\beta)_{ij}$ representa o efeito da interação na combinação ij , e ε_{ijk} é o erro aleatório que por suposição segue uma distribuição normal com média zero e variação constante $\sigma^2(N(0, \sigma^2))$ e são independentes entre si [180].

Para as variáveis descritas, a avaliação foi realizada durante 28 dias em que os fungos estavam em contato com os dois tipos de fluido durante a descoloração na fase II da pré-seleção. A análise estatística foi feita por análise de variação (ANOVA).

5.13.1.6. Erro aleatório e experimental

Foi estimado como erro aleatório à variabilidade gerada pelas condições experimentais. O erro experimental foi considerado no momento da realização dos protocolos pela pesquisadora.

5.13.1.7. Análise

A análise dos resultados foi realizada no programa estatístico Excel 2010.

5.13.1.8. Interpretação

Os resultados foram interpretados com a finalidade de determinar que as condições experimentais e tipo de fungo têm influencia significativa (95% de confiança) na descoloração do efluente têxtil puro após a fase II de pré-seleção por descoloração.

5.13.1.9. Hipótese estatística

Ho (Hipótese nula): Não há influencia significativa das condições experimentais e tipo de fungo Agaricomycete na descoloração do efluente têxtil puro de lavanderia industrial do município de Caruaru-PE

Hi (Hipótese alternativa): Há influencia significativa das condições experimentais e tipo de fungo Agaricomycete na descoloração do efluente têxtil puro de lavanderia industrial do município de Caruaru-PE

5.13.2. Supervivência de *Artemia* HIGH 5

5.13.2.1. Desenho experimental

Foi aplicado o mesmo desenho experimental ⁴², já descrito para a descoloração do corante índigo carmim (CIC) e do efluente têxtil puro (ETP), por 4 fungos agaricomycetes submetidos a diferentes tempos de crescimento iniciais (Ci1 e Ci2). Avaliaram-se 4 fatores de tipo qualitativo: 4 espécies de fungos, frente a 4 fatores quantitativos baseados na taxa de sobrevivência de *Artemia* sp. expressada em percentual, após 48 horas de experimento baixo as quatro condições já descritas.

5.13.2.2. Tratamentos

De igual forma se realizaram 16 tratamentos (4²) baseados na combinação dos níveis: Espécie de Agaricomycete e Condição experimental (Tabela 6)

5.13.2.3. Repetições

O ensaio foi realizado por triplicata para cada tratamento assim como nos controles

5.13.2.4. Variável de resposta

A variável de resposta foi a porcentagem de sobrevivência que apresentaram as artemias após 48 horas de contato com as amostras geradas após a fase II da pré-seleção dos fungos agaricomycetes por descoloração do corante índigo carmim e do efluente têxtil puro.

5.13.2.5. Modelo estatístico

Foi o mesmo aplicado para descoloração do corante índigo carmim (CIC) e do efluente têxtil puro (ETP), por quatro fungos agaricomycetes submetidos a diferentes tempos de crescimento iniciais (Ci1 e Ci2).

Para as variáveis descritas, a avaliação foi realizada durante 4 dias em que as artemias estiveram em contato com os fluidos biodegradados pelos fungos na fase II de pré-seleção por descoloração, mas para o análise estatístico, só se considerou 48 horas de experimentação devido morte do controle branco no segundo dia. A análise estatística foi feita por análise de variação (ANOVA).

5.13.2.6. Erro aleatório e experimental e análise

Foram os mesmos aplicados para a descoloração do corante índigo carmim (CIC) e do efluente têxtil puro (ETP), por quatro fungos agaricomycetes submetidos a diferentes tempos de crescimento inicial (Ci1 e Ci2).

5.13.2.7. Interpretação

Os resultados foram interpretados para determinar se a biorremediação feita pelos quatro fungos nas condições experimentais já descritas, têm influencia significativa na taxa de sobrevivência de *Artemia* sp.

5.13.2.8. Hipótese estatística

Ho (Hipótese nula): São tóxicas as amostras tratadas biologicamente pelos fungos agaricomycetes submetidos a diferentes tempos de crescimento inicial.

Hi (Hipótese alternativa): Não são tóxicas as amostras tratadas biologicamente pelos fungos agaricomycetes submetidos a diferentes tempos de crescimento inicial.

5.13.3. Descoloração do corante índigo carmim 50 ppm por enzimas imobilizadas em nanopartículas de quitosana com e sem o seu reuso.

5.13.3.1. Desenho experimental

Novamente foi aplicado o mesmo desenho fatorial (4^2) porque foram avaliados dois níveis: 4 tipos de amostra nanoparticulada e 4 condições experimentais. Avaliaram-se 4 fatores de tipo qualitativo: 4 amostras nanoparticuladas com e sem enzimas imobilizadas, frente a 4 fatores quantitativos baseados na taxa de descoloração do corante índigo carmim 50 ppm, medida em comprimentos de onda e expressada em percentual em 4 condições experimentais:

1. Descoloração do índigo carmim por 500 μ L da amostra nanoparticulada sem reutilização (SR-500 μ L);
2. Descoloração do índigo carmim por 500 μ L da amostra nanoparticulada com reutilização (CR-500 μ L);
3. Descoloração do índigo carmim por 5 mL da amostra nanoparticulada sem reutilização (SR-500 μ L);
4. Descoloração do índigo carmim por 5 mL da amostra nanoparticulada com reutilização (CR-500 μ L).

5.13.3.2. Tratamentos

Realizaram-se 16 tratamentos (4^2) baseados na combinação dos níveis: tipo de amostra nanoparticulada e condição experimental. Na tabela 7. se mostram os tratamentos.

Tabela 7 Matriz do desenho fatorial (42) para a descoloração do corante índigo carmim 50 ppm por enzimas imobilizadas em nanopartículas de quitosana com e sem o seu reuso.

Tratamento	Amostra nanoparticulada	Condição experimental
T1	NanoQ	SR-500 µL
T2	NanoQ + E-FM	SR-500 µL
T3	NanoQ + E-F1	SR-500 µL
T4	NanoQ + E-F5	SR-500 µL
T5	NanoQ	CR-500 µL
T6	NanoQ + E-FM	CR-500 µL
T7	NanoQ + E-F1	CR-500 µL
T8	NanoQ + E-F5	CR-500 µL
T9	NanoQ	SR-5 mL
T10	NanoQ + E-FM	SR-5 mL
T11	NanoQ + E-F1	SR-5 mL
T12	NanoQ + E-F5	SR-5 mL
T13	NanoQ	CR-5 mL
T14	NanoQ + E-FM	CR-5 mL
T15	NanoQ + E-F1	CR-5 mL
T16	NanoQ + E-F5	CR-5 mL

Fonte: Autoria própria

5.13.3.3. Repetições

O ensaio foi realizado por triplicata para cada tratamento assim como nos controles.

5.13.3.4. Variável de resposta

A variável de resposta foi a porcentagem de descoloração do corante índigo carmim 50 ppm por 500 µL ou 5 mL de amostra nanoparticulada, com e sem o seu reuso.

5.13.3.5. Modelo estatístico

Foi aplicado o mesmo modelo estatístico apresentado nos dois casos já descritos. A análise estatística foi feita por análise de variação (ANOVA).

5.13.3.6. Erro aleatório e experimental e análise

Foram os mesmos aplicados nas avaliações anteriores.

5.13.3.7. Interpretação

Os resultados foram interpretados para determinar se as amostras nanoparticuladas têm influencia significativa (95% de significância) na descoloração do corante índigo carmim 50 ppm, baixo as condições experimentais antes descritas.

5.13.3.8. Hipótese estatística

Ho: Não existe influencia significativa na descoloração do corante índigo carmim, com ou sem o reuso diferentes volumes de amostras nanoparticuladas (com e sem enzimas imobilizadas).

Hi: Existe influencia significativa na descoloração do corante índigo carmim, com ou sem o reuso diferentes volumes de amostras nanoparticuladas (com e sem enzimas imobilizadas).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. CARATERIZAÇÃO DO EFLUENTE TÊXTIL

Os parâmetros físico-químicos do efluente da lavanderia industrial têxtil se apresentam na Tabela 8. esses parâmetros são utilizados como indicadores de poluição e da eficiência dos tratamentos utilizados [27]. Os resultados mostram que o efluente é potencialmente prejudicial se for depositado nos corpos hídricos sem um tratamento adequado [181], [182]. Os valores destes indicadores fazem relação com substâncias como surfactantes, solventes e detergentes usados durante o tingimento dos tecidos [183].

Tabela 8 Comparação das caracterização do efluente em estudo com normas brasileiras.

PARÂMETROS	RESULTADOS	VALORES DE REFERÊNCIA				
		FEDERAL	ESTADUAL			
		CONAMA (No. 430/2011)	CPRH/PE (Art. 29 Dec. No 7.269)	RJ (DZ-205)	SP (Art. 18 Dec. No 8.468)	SC (Art. 19 Dec. No 14.250)
<i>Temperatura</i>	28 °C	<40	<40	-	<40	<40
<i>pH</i>	6,5	5,0 -9,0	5,0 -9,0	-	5,0 -9,0	6,0 -9,0
<i>Condutividade Elétrica a 25° C</i>	2.830 µS/cm	-	-	-	-	-
<i>Cor aparente</i>	>500 µH	75	-	-	-	-
<i>DQO</i>	1.000 mg O ₂ /L	-	-	200	-	-
<i>DBO</i>	208 mg O ₂ /L	-	-	-	60%	60%
<i>Carga Orgânica DBO</i>	0,83 kgDBO/m ³	-	-	-	-	-
<i>Dureza Total</i>	135,7 Mg CaCO ₃ /L	-	-	-	-	-
<i>Fenóis Totais</i>	0,09 mg/L	0,5	-	-	0,5	0,2
<i>Nitrogênio Total</i>	8,2 mg/L	-	-	-	-	-
<i>Sólidos Dissolvidos Totais</i>	2.121 mg/L	-	-	-	-	-
<i>Sólidos Suspensos Totais</i>	2.028 mg/L	-	-	-	-	-
<i>Óleos e Graxas Totais</i>	113 mg/L	-	-	-	-	-
<i>Cromo Total</i>	<0,03 mg /L Cr	-	-	-	-	-
<i>Fósforo Total</i>	4,79 mg/L P	-	-	-	-	-

(-) Não citado na legislação – RJ – Rio de Janeiro | SP – São Paulo | SC – Santa Catarina | PE - Pernambuco | DQO – Demanda Química de Oxigênio | DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio

Fonte: [172]

O efluente têxtil caracterizado por [184] foi evidenciada uma DBO₅ de 328 mg/L e DQO de 629 mg/L, e comparado com o efluente de estúdio, o valor de DBO foi maior e DQO menor como

se indica na Tabela 8, o que mostra que são incompatíveis com a legislação. Tem autores que indicam que altos níveis de DBO pode ser indicador da presença de detergentes e outros compostos orgânicos, que estão presentes geralmente no processo de lavagem dos tecidos, mas também podem estar presentes os corantes que consomem oxigênio graças as moléculas de Fe^{+2} , Mg^{+2} e NH_4^+ e altos níveis de cloretos presentes nas moléculas [185].

Nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro exigem na legislação, que as indústrias reduzam as taxas de DBO em 60% [186], [35]. A legislação no Paraná exige que as taxas de DBO e DQO não aumentem de 50 mg/L e 200 mg/L respectivamente [187]. A DQO e a DBO são indicadores de poluição que estão diretamente correlacionados com a toxicidade dos efluentes. Foi detectado que águas residuais de indústrias farmacêuticas tóxicas apresentam taxas de DQO e de nitrogênio e fósforo total fora dos parâmetros permitidos [193], e tem sido comprovado que o aumento nas taxas de DBO e DQO interferem na reprodução e crescimento de espécies [194].

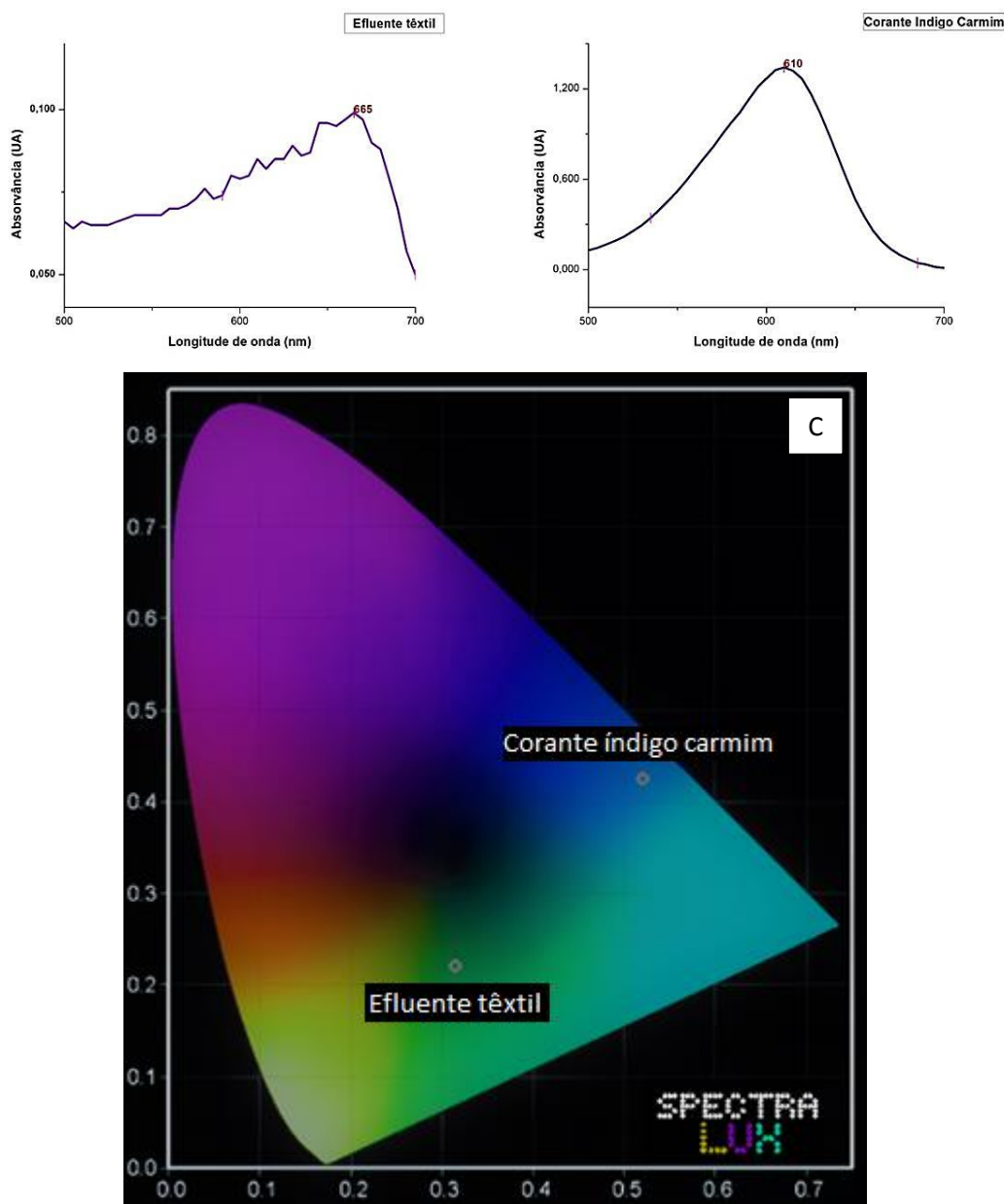
Outro valor que chama a atenção é a cor aparente do efluente, porque se encontra acima de 500 mg Pt/L, e a legislação federal indica que a coloração permitida que deve ter a água descartada no meio ambiente pode chegar até 75 mg Pt/L. Esse valor tão alto, além de comprometer a estética da transparência da água dos corpos hídricos, também está correlacionado com a poluição por corantes e outros agentes antes mencionados, que termina afetando não somente a vida aquática, porque estes compostos são bioacumulados nos peixes e demais organismos aquáticos que, finalmente são consumidos como alimento pelos seres humanos [190].

Entre os parâmetros do efluente de estúdio que se encontram dentro dos padrões determinados pela legislação federal CONAMA, e nas legislações estaduais de São Paulo, Rio de Janeiro e Pernambuco, estão o pH de 6.5 e a temperatura de 28 °C que favorecem o crescimento e ação fúngica [191].

6.2. FASE I DE PRÉ-SELEÇÃO POR DESCOLORAÇÃO DO CORANTE ÍNDIGO CARMIM E DO EFLUENTE TÊXTIL, BASEADO OS TEMPOS DE FERMENTAÇÃO T1, T2 E T3.

A varredura realizada do índigo carmim (Fig. 55 (A)) mostrou que o comprimento de onda de absorção máxima encontra-se em 610 nm, e para o efluente têxtil foi de 665 nm (Fig. 55 (B)), confirmando que no efluente existem outros corantes além do índigo carmim e que este não é o predominante. Após usar o software Spectra Lux Trial, se corroborou a diferença de pigmentação (Fig. 55 (C)), mostrando que existem mais corantes além do índigo carmim, porque as coordenadas de cromáticas para o corante foram $X=0,517420708279995$; $Y=0,422617617551636$; $Z = 0,0599616741683693$, no entanto para o efluente foram $X = 0,314177428991389$; $Y = 0,218757389720786$; $Z = 0,467065181827824$. Partindo dessa informação, os experimentos de descoloração na presença de fungos foram analisados na absorbância encontrada no efluente têxtil.

Figura 55 Leitura da absorvância do efluente da lavanderia têxtil (A) e do corante índigo carmim (B). Análise de coordenadas cromáticas no software Spectra Lux Trial (C).

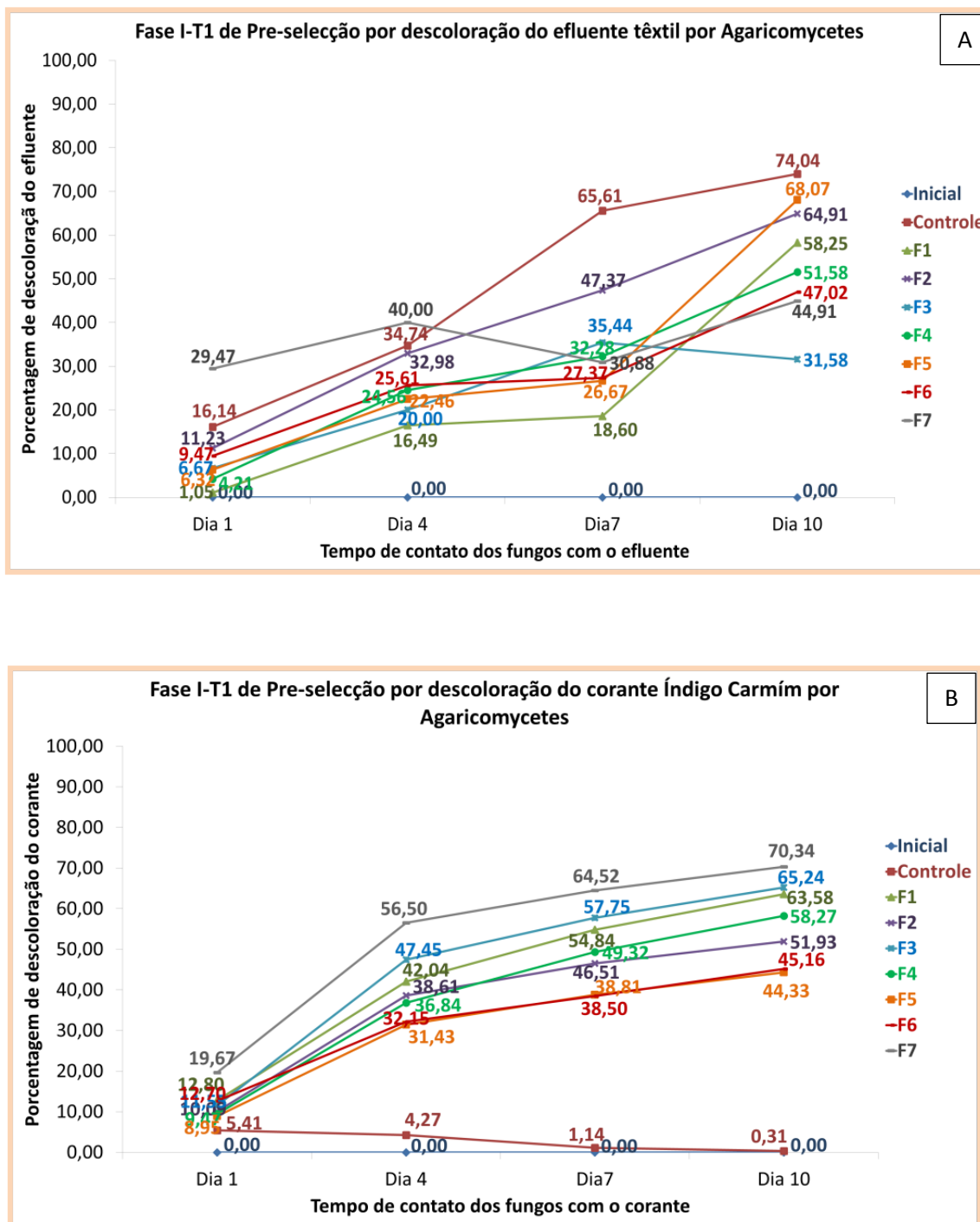


Fonte: Autoria própria (A, B) / [211] (C)

Após a fase I da Pré-seleção por descoloração foram selecionados os fungos que superaram 55% de descoloração, em pelo menos um dos três tempos de experimentação (Fig. 56). No tempo T1, as porcentagens de descoloração do efluente têxtil puro (Fig. 56 (A)) foram 68.07% para *F5*, 64.92% para *F2*, 58.25% para *F1* e 47.02% para *F6*. Os valores percentuais do índigo carmim (Fig. 56 (B)) dos quatro fungos foram 44.33%, 51.93%, 63.58% e 45.16% respectivamente, como indica a Tabela 9. A restrição de nitrogênio para a estimulação de enzimas ligninolíticas, e a presença de outros microrganismos no meio não estéril, influíram diminuindo a síntese de enzimas em tempos mais prolongados de estresse (T2 e T3), com a exceção do fungo *F6* que atingiu 60.35% de descoloração do efluente em T3 [50]. Portanto

baixo essas condições experimentais, o tempo de experimentação T1 foi o escolhido para passar a fase de Pré-seleção II.

Figura 56 Cinética de descoloração de (A) efluente têxtil puro e (B) corante índigo carmim por Agaricomycetes.



Fonte: Autoria própria

Tabela 9 Valores percentuais da descoloração alcançada durante 10 dias nos tempos de fermentação T1, T2 y T3.

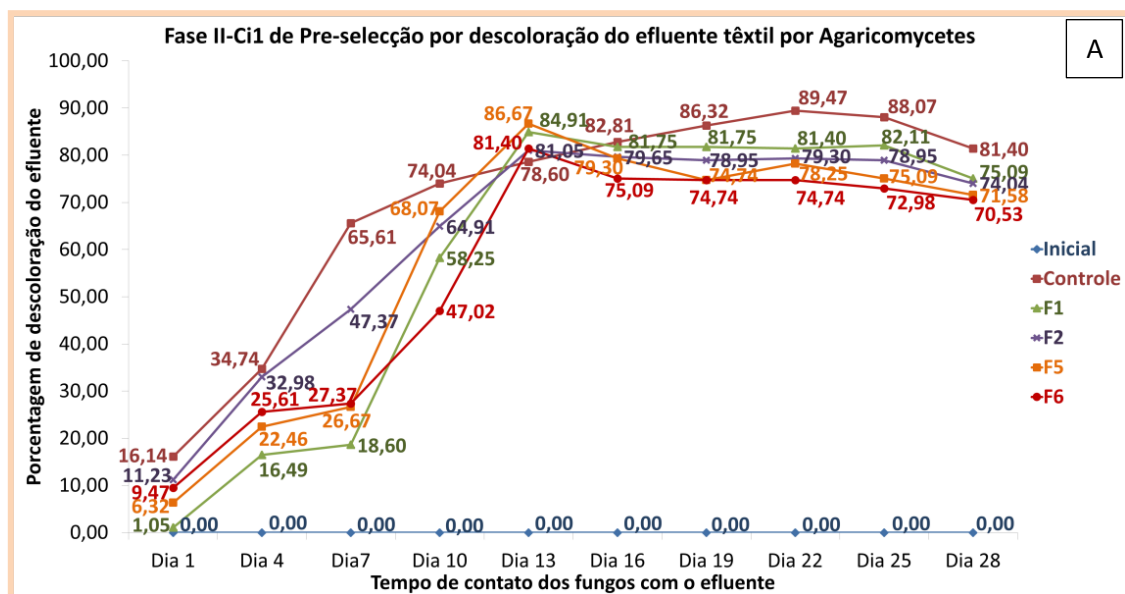
CÓDIGO	EFLUENTE			CORANTE		
	FUNGO	% DESCOLORAÇÃO	DIA	FUNGO	% DESCOLORAÇÃO	DIA
T1	F5	68,07	10	F7	70,34	10
	F2	64,92	10	F3	65,25	10
	F1	58,25	10	F1	63,58	10
	F4	51,58	10	F4	58,27	10
	F6	47,02	10	F2	51,93	10
	F7	44,91	10	F6	45,16	10
	F3	35,44	7	F5	44,33	10
T2	F5	63,16	4	F1	78,98	10
	F2	59,65	7	F4	65,14	10
	F6	58,25	7	F5	64,31	10
	F4	54,04	7	F6	63,97	10
	F1	45,61	7	F7	55,15	10
	F3	45,61	4	F2	47,45	10
	F7	38,6	7	F3	42,25	10
T3	F2	62,46	4	F6	96,15	10
	F5	60,35	4	F3	95,63	10
	F6	60,35	4	F7	95,53	10
	F1	56,14	4	F5	95,11	10
	F7	54,04	10	F4	95,11	10
	F4	51,58	10	F2	92,82	10
	F3	40,7	10	F1	92,51	10

Fonte: Autoria própria

6.3. FASE II DE PRÉ-SELEÇÃO POR DESCOLORAÇÃO DO CORANTE ÍNDIGO CARMIM E DO EFLUENTE TÊXTIL, BASEADO OS TEMPOS DE CRESCIMENTO INICIAL C_i1 E C_i2.

No tempo de crescimento inicial C_i1 as porcentagens de descoloração do efluente foram 86.67% para F5, 84.91% para F1, 81.40% para F6 e 81.05% para F2 (Fig. 57 (A)), e no índigo carmim 47.76%, 84.08%, 48.60% e 64.31% respectivamente (Fig. 57 (B)).

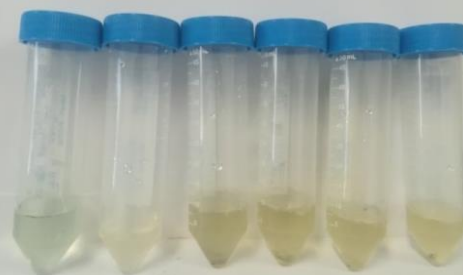
Figura 57 Descoloração do (A) efluente têxtil puro e (B) corante índigo carmim na Fase II da pré-seleção com tempo de crescimento inicial Ci1 de 20 dias.

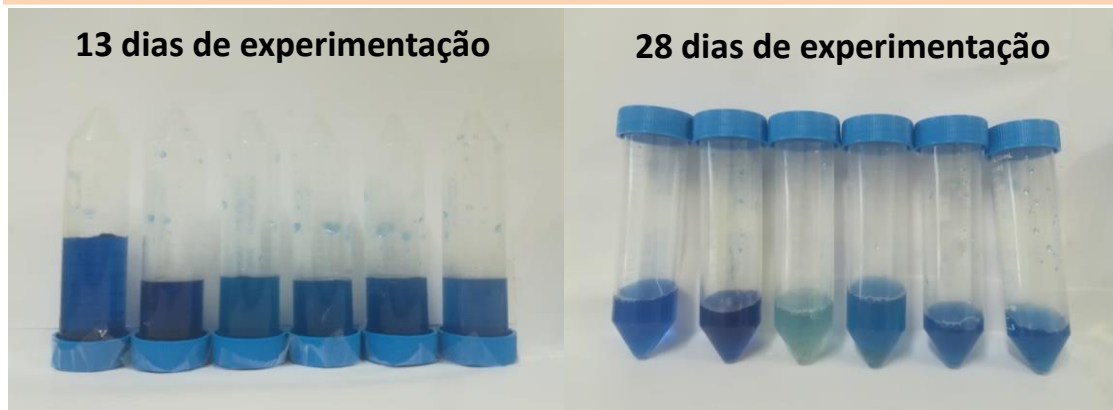
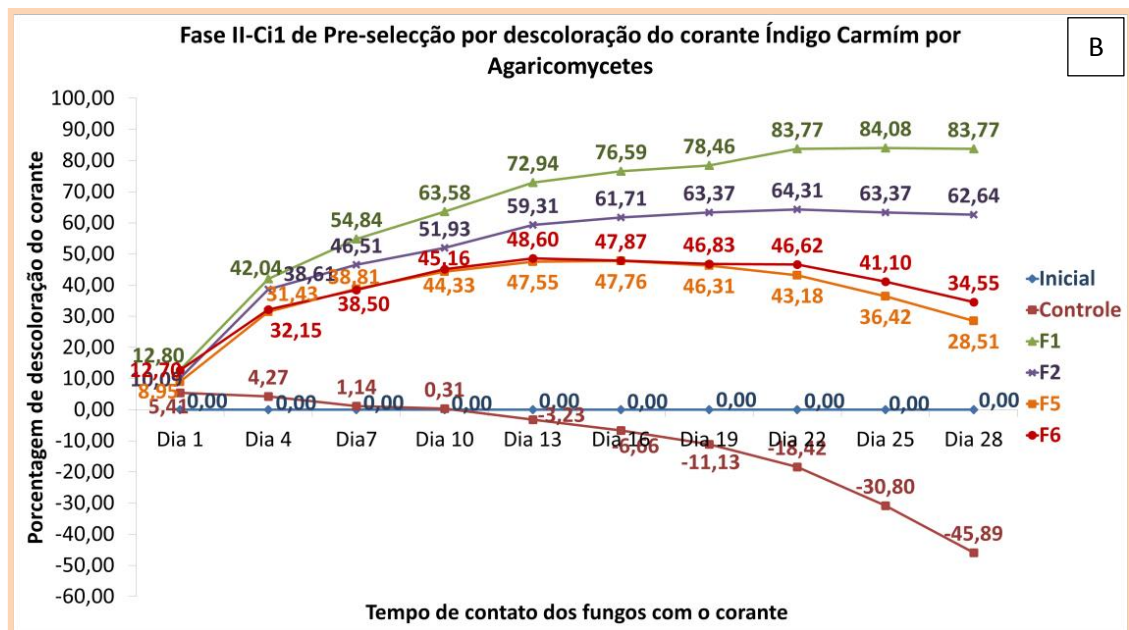


13 dias de experimentação



28 dias de experimentação

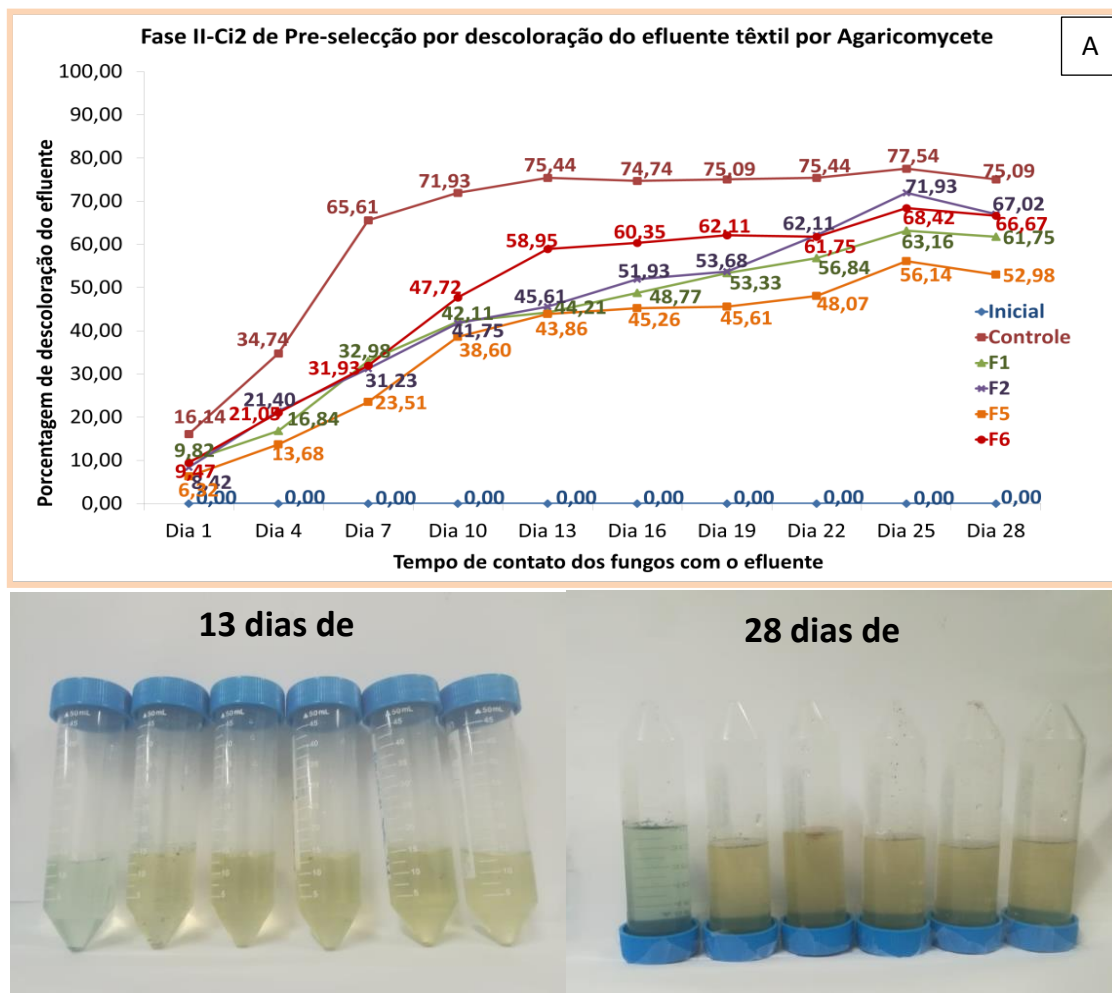


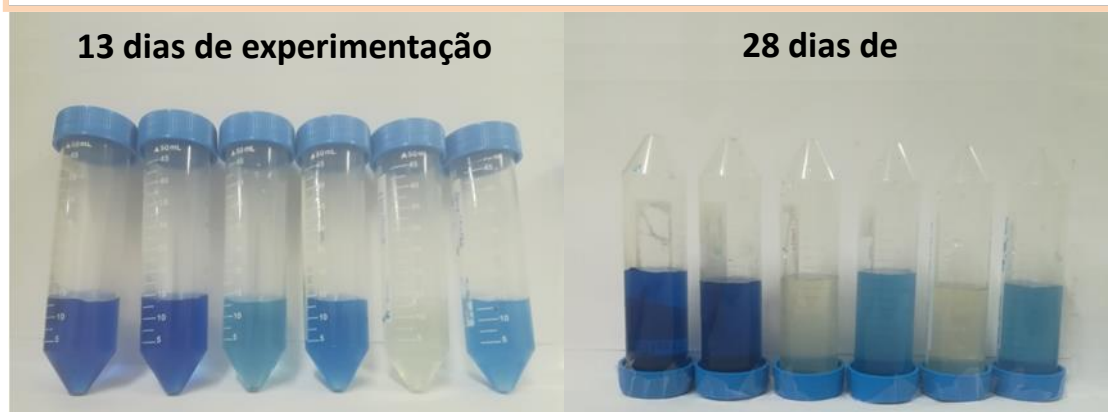
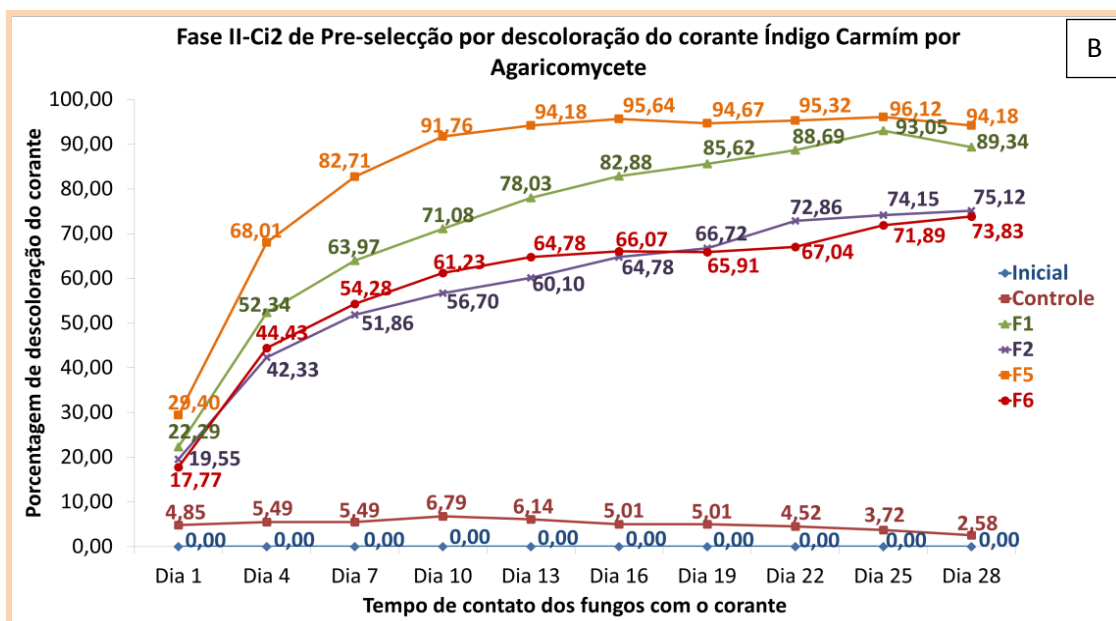


Fonte: Autoria própria

Em C₂, as porcentagens de descoloração para o efluente (Fig. 58 (A)) foram 56.14%, 63.16%, 68.42% e 71.93%, e na descoloração do corante (Fig. 58 (B)) 96.12%, 93.05%, 73.83% e 75.12% respectivamente, valores encontrados na Tabela 10.

Figura 58 Descoloração do (A) efluente têxtil puro e (B) corante índigo carmim na Fase II da pré-seleção com tempo de crescimento inicial Ci2 de 45 dias.





Fonte: Autoria própria

O estresse nutricional menor em C₁ aumentou a atividade biodegradativa registrada no efluente, por conta de uma maior produção de enzimas intermediárias que facilitou a degradação dos componentes xenobióticos, mas foram sintetizadas menos enzimas ligninolíticas para degradar corantes, esse comportamento foi evidenciado na descoloração do índigo carmim, com exceção do fungo *F1* que atingiu um valor porcentual próximo ao registrado na degradação do efluente [50]. Pelo contrário em C₂ houve maior estresse nutricional por conta do tempo prolongado de crescimento inicial sem adição de novos nutrientes, gerando maiores porcentagens de descoloração por ação ligninolítica no corante, mas no efluente as enzimas degradaram os corantes e outros poucos compostos xenobióticos recalcitrantes presentes. A degradação por ação ligninolítica acontece devido à produção de metabolitos secundários nos fungos pela falta de adição de nutrientes [77].

O tempo de crescimento inicial influenciou sobre a descoloração do efluente, mostrando que C₂ é mais eficiente para biodegradar corantes e C₁ é mais eficiente para biodegradar outros compostos recalcitrantes. A limitação de nitrogênio induz a excreção de enzimas ligninolíticas que não são alteradas pela presença destes poluentes, portanto em períodos de crescimento prolongados sem adição de nutrientes (C₂), as enzimas ligninolíticas se encontram em maior proporção por longos períodos (45 dias) [192].

Em tempos mais curtos de crescimento sem adição de nutrientes (C_i1, 20 dias), além da produção de enzimas ligninolíticas por falta de nitrogênio, a quantidade de carbono presente estimula o fungo na produção de enzimas intermediárias que degradam outros compostos xenobióticos recalcitrantes, como outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio e de compostos metabólitos intermediários de baixa massa molecular [193], [194], [46], [195], [196]. Portanto uma fonte de carbono misturada com a limitação de nitrogênio, acelera a biorremediação dos efluentes [197], [198], [199]. Mas é necessário realizar a caracterização destas águas para garantir a segurança do residual biodegradado por essas enzimas, e avaliar sua toxicidade [192].

Os fungos selecionados para as seguintes fases experimentais foram *F1* e *F5* por apresentar as melhores porcentagens de descoloração do efluente no menor tempo de 13 dias de experimentação como é mostrado na Tabela 10.

Tabela 10 Valores percentuais da descoloração do índigo carmim e do efluente têxtil após o experimento com os tempos de crescimento inicial C_i1 e C_i2.

FUNGO	Ci1				Ci2			
	CORANTE	DIA	EFLUENTE	DIA	CORANTE	DIA	EFLUENTE	DIA
F1	84,08	25	84,91	13	93,05	25	63,16	25
F2	64,31	22	81,05	13	75,12	28	71,93	25
F5	47,76	16	86,67	13	96,12	25	56,14	25
F6	48,60	13	81,40	13	73,83	28	68,42	25

Fonte: Autoria própria

Em quanto ao desenho experimental estatístico fatorial (4²) aplicado, para avaliar a combinação de dois níveis: 4 espécies de fungos Agaricomycetes (fatores qualitativos) e 4 as condições experimentais (fatores quantitativos):

1. Corante índigo carmim 50 ppm testado em fungos com tempo de crescimento inicial de 20 dias (CIC - C_i1);
2. Efluente têxtil puro testado em fungos com tempo de crescimento inicial de 20 dias (ETP - C_i1);
3. Corante índigo carmim 50 ppm testado em fungos com tempo de crescimento inicial de 45 dias (CIC - C_i2);
4. Efluente têxtil puro testado em fungos com tempo de crescimento inicial de 45 dias (ETP - C_i2).

As condições se basearam na taxa de descoloração medida em comprimentos de onda e expressada em percentual. Os resultados da análise estatística ANOVA se encontram na Tabela 11.

Tabela 11 Análise estatística ANOVA da descoloração do corante índigo carmim (CIC) e do efluente têxtil puro (ETP), por 4 fungos agaricomycetes submetidos a diferentes tempos de crescimento iniciais (Ci1 e Ci2).

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1788,596	3	596,1987	4,945856	0,018387	3,490295
Dentro dos grupos	1446,541	12	120,5451			
Total	3235,137	15				

Fonte: Autoria própria

Considerando-se que as hipóteses estatísticas analisadas foram:

Ho (Hipótese nula): Não há influencia significativa das condições experimentais e tipo de fungo Agaricomycete na descoloração do efluente têxtil puro de lavanderia industrial do município de Caruaru-PE.

Hi (Hipótese alternativa): Há influencia significativa das condições experimentais e tipo de fungo Agaricomycete na descoloração do efluente têxtil puro de lavanderia industrial do município de Caruaru-PE.

Rejeitou-se a hipótese nula, aceitando-se a hipótese alternativa que indica que há influencia significativa das condições experimentais e tipo de fungo Agaricomycete na descoloração do efluente têxtil puro de lavanderia industrial do município de Caruaru-PE. Esse resultado pode se corroborar pelos valores F e p_valor da Tabela 11, devido a que o valor F é usado para calcular o p_valor.

O valor F do modelo estatístico foi de 4.946 que é maior do que o valor F crítico de 3.490, isto indica que o modelo aplicado é significativo. O p_valor de 0.018 é menor do que o nível de significância de 0.05, isto indica que os dois níveis analisados (quantitativos e qualitativos), tem influencia significativa (95 % de confiabilidade) sobre o estudo estatístico realizado. Quando o valor F estatístico é maior do que o valor F crítico, e o p_valor é menor do que o nível de significância, se aceita a hipótese alternativa do modelo proposto.

6.4. ECOTOXICIDADE EM *Artemia* sp. (HIGH 5 - INVE)

As porcentagens de sobrevivência de *Artemia* HIGH 5 quando estiveram em contato (Fig. 59) com o efluente e o corante tratados pelos quatro fungos em Ci1 e Ci2, se podem observar na Tabela 12.

Tabela 12 Porcentagem de sobrevivência de *Artemia* HIGH 5 após o contato com o corante índigo carmim e o efluente tratados na fase II de Pré-seleção por descoloração.

C ₁ (20 DIAS)	% SUPERVIVENCIA NO CORANTE ÍNDIGO CARMIM				% SUPERVIVENCIA EFLUENTE TÊXTIL			
FUNGO	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4
F1	83.33	0.00	0.00	0.00	100.00	100.00	50.00	0.00
F2	83.33	16.67	16.67	0.00	100.00	100.00	33.33	0.00
F5	83.33	0.00	0.00	0.00	100.00	100.00	66.67	0.00
F6	100.00	0.00	0.00	0.00	100.00	100.00	50.00	0.00
Controle no tempo	66.67	0.00	0.00	0.00	100.00	50.00	16.67	0.00
Controle inicial	33.33	0.00	0.00	0.00	100.00	50.00	0.00	0.00
Controle branco	100.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00
C ₂ (45 DIAS)	% SUPERVIVENCIA NO CORANTE ÍNDIGO CARMIM				% SUPERVIVENCIA EFLUENTE TÊXTIL			
FUNGO	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4
F1	100.00	16.67	16.67	0.00	100.00	100.00	50.00	16.67
F2	100.00	0.00	0.00	0.00	100.00	100.00	50.00	0.00
F5	83.33	0.00	0.00	0.00	100.00	100.00	50.00	0.00
F6	83.33	0.00	0.00	0.00	100.00	100.00	66.67	0.00
Controle no tempo	66.67	0.00	0.00	0.00	100.00	50.00	16.67	0.00
Controle inicial	33.33	0.00	0.00	0.00	100.00	50.00	0.00	0.00
Controle branco	100.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00

Fonte: Autoria própria

Figura 59 Fase experimental de ecotoxicidade. *Artemia* sp. em contato com o corante e o efluente têxtil tratados biologicamente na fase II da pré-seleção por descoloração

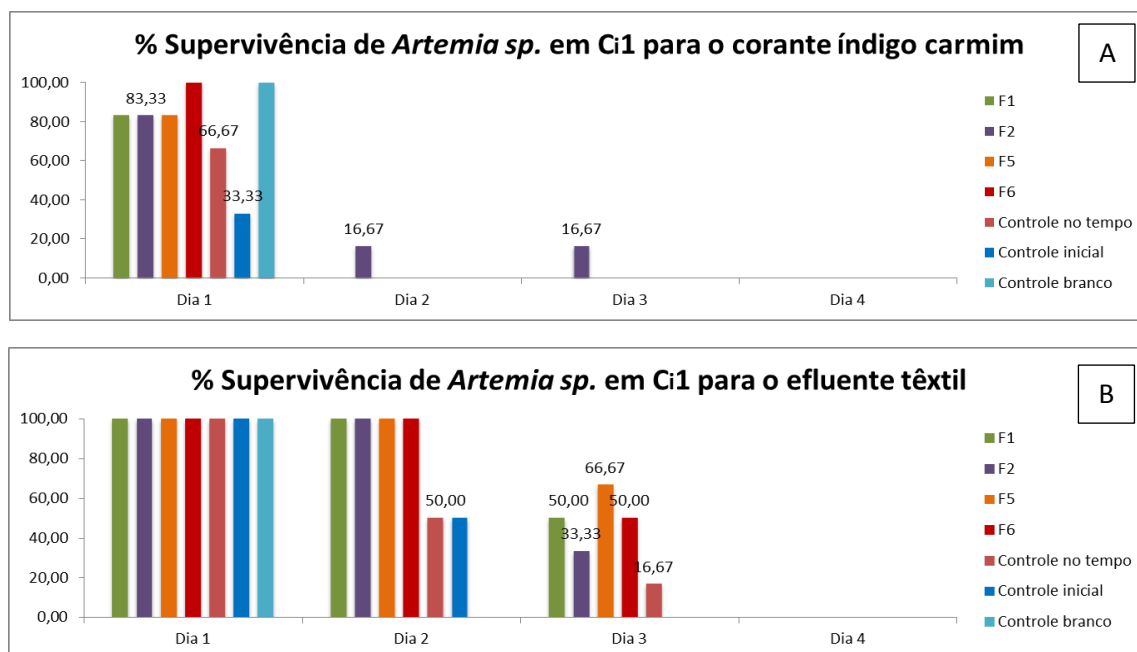


Fonte: Autoria própria

Na Figura 60 (A) se observa que em C₁ a sobrevivência atingiu 100% após o primeiro dia de exposição das artemias com o corante tratado pelo fungo F6, 83.33% para o corante tratado

por F1, F2 e F3. Para o controle no tempo, o controle inicial e o controle branco, as porcentagens registradas foram 66.67%, 33.33% e 100% respectivamente. Do segundo e terceiro dia de exposição se registrou unicamente a porcentagem de 16.67% de sobrevivência no corante tratado por F2. Nos dias 4 e 5 foi 0%. Na Figura 60 (B) se observa que no primeiro dia as porcentagens atingiram 100% para todas as amostras, no segundo dia se registrou 100% para as amostras tratadas pelos 4 fungos e se observou uma diminuição de 50% de artemias vivas nos controles inicial e no tempo, e 0% no controle branco. No terceiro dia foram registradas 50% para F1, 33.33% para F2, 66.67% para F5 e 50% para F6, o controle no tempo atingiu 16,67% e os outros controles registraram 0%. Nos dias 4 e 5 foi 0%.

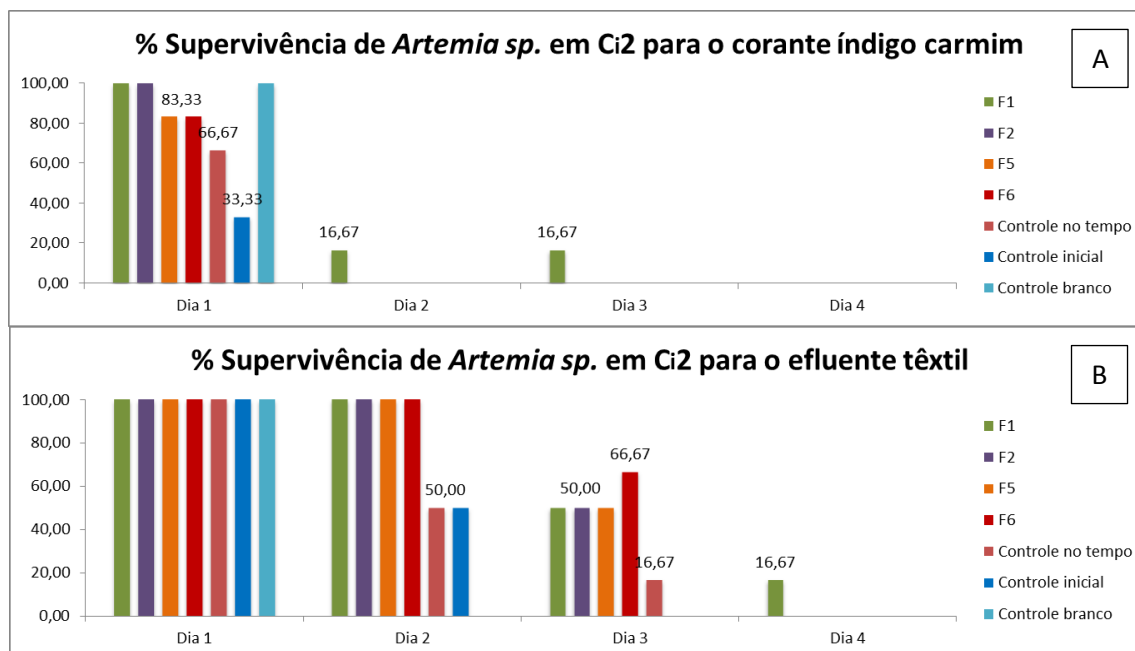
Figura 60 % Supervivência de *Artemia* sp. em C_i1 (A) para o corante índigo carmim e (B) para efluente têxtil puro.



Fonte: Autoria própria

Na Figura 61 (A) pode se reparar que em C_i2 a sobrevivência após o primeiro dia foi de 100% no corante tratado pelos F1, F2 e no controle branco, para F5 e F6 se registrou 83.33%, para o controle no tempo foi 66.67% e para o controle inicial foi 33.33%. No segundo e terceiro dia foi registrado 16.67% de sobrevivência unicamente para o corante tratado pelo fungo F1. Nos dias 4 e 5 foi 0%. Na Figura 61 (B) no primeiro dia se registra 100% de sobrevivência para todas as amostras, no segundo dia se registrou 100% para as amostras tratadas pelos 4 fungos e se observou uma diminuição de 50% de artemias vivas nos controles no tempo e inicial e 0% no controle branco. No terceiro dia as amostras tratadas pelos fungos F1, F2 e F5 chegaram em 50% e controle no tempo foi de 16,67%, os outros controles se quantificaram com 0%. No quarto dia se registrou unicamente 16,67% de sobrevivência no efluente tratado por F1, e no quinto dia todas as amostras registraram 0%.

Figura 61 % Supervivência de *Artemia* sp. em Ci2 (A) para o corante índigo carmim e (B) para efluente têxtil puro



Fonte: Autoria própria

De acordo com o desenho experimental estatístico fatorial (4^2) aplicado, para avaliar toxicidade da combinação de dois mesmos dois níveis propostos para a descoloração do corante índigo carmim (CIC) e do efluente têxtil puro (ETP), por 4 fungos agaricomycetes submetidos a diferentes tempos de crescimento inicial (Ci1 e Ci2), mas com a diferença de que a análise foi baseada na taxa de sobrevivência de *Artemia* sp. expressada em percentual, após 48 horas de experimento baixo as quatro condições já descritas. Os resultados da análise estatística ANOVA se encontram na Tabela 13.

Tabela 13 Análise estatística ANOVA da sobrevivência de *Artemia* sp.

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	33373,02	3	11124,34	14,01667	1,73984E-05	3,008787
Dentro dos grupos	19047,62	24	793,6508			
Total	52420,63	27				

Fonte: Autoria própria

Considerando-se que as hipóteses estatísticas analisadas foram:

Ho (Hipótese nula): São tóxicas as amostras tratadas biologicamente pelos fungos agaricomycetes submetidos a diferentes tempos de crescimento inicial.

Hi (Hipótese alternativa): Não são tóxicas as amostras tratadas biologicamente pelos fungos agaricomycetes submetidos a diferentes tempos de crescimento inicial.

Aceitou-se a hipótese alternativa que indica que as amostras tratadas biologicamente pelos fungos agaricomycetes submetidos a diferentes tempos de crescimento inicial não são tóxicas. Esse resultado pode se corroborar pelo p_valor e valor F da Tabela 13.

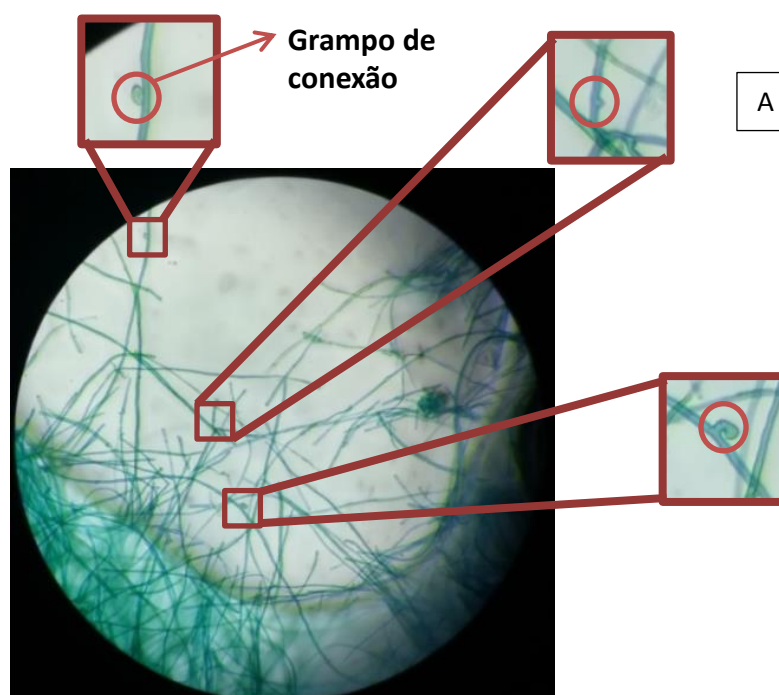
O valor F do modelo estatístico foi de 14.017 que é maior do que o valor F crítico de 3.009, isto indica que o modelo aplicado é significativo. O p_valor de 0.0174×10^{-3} é muito menor do que o nível de significância de 0.05, isto indica que os dois níveis qualitativos e quantitativos analisados, tem influencia significativa (95 %) sobre o estudo estatístico realizado.

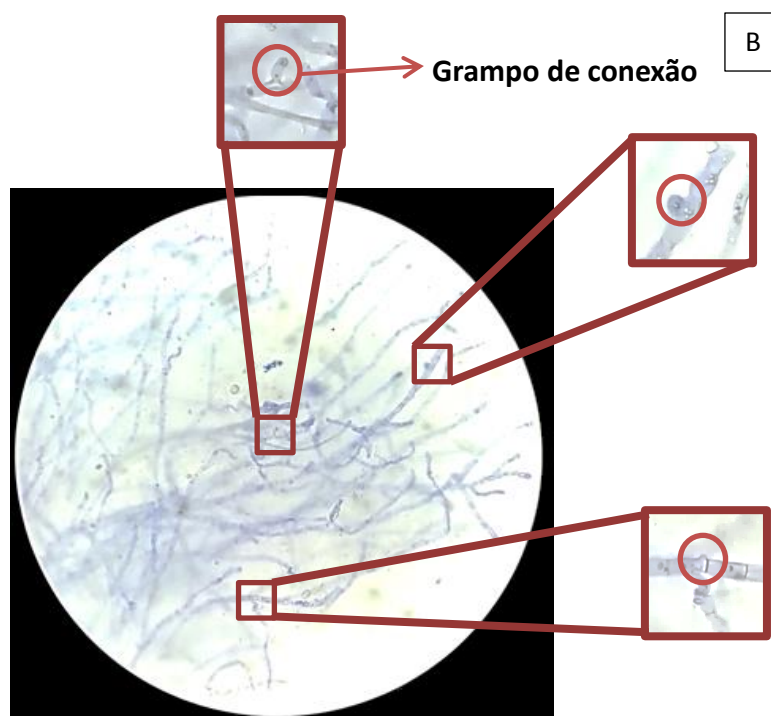
Como se observou nas Figuras 60 e 61, nas amostras do efluente tratado pelos fungos F1, F2, F5 e F6, *Artemia* sp. teve supervivência até quarto dia em alguns casos e nas amostras do corante até o terceiro dia, portanto a degradação dos poluentes realizada pelas enzimas dos fungos, gerou cadeias curtas de carbono que foi utilizada pelas artemias para se alimentar. A supervivência não foi igual no controle branco (artemias em solução salina sem alimento), onde se evidenciou supervivência de 0% após 24 horas de experimentação.

6.5. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DOS FUNGOS

Na coleta dos sete fungos realizada na Caatinga pernambucana entre 2012-2015, os fungos chamados de F1, F2, F3, F4, F5, F6 e F7 pela pesquisadora, inicialmente foram nomeados com um código BDNA e o nome da espécie identificada morfologicamente pelos pesquisadores do laboratório de Basidiomycota do Departamento de Micologia da UFPE. Após a reativação dos fungos, realizou-se uma microscopia ótica para ter certeza que pertenciam a Basidiomycota, e se corroborou a presença de grampos de conexão em todas as amostras. A partir desta etapa os fungos *Hjortstamia crassa* (BDNA 2221) e *Schizophyllum commun* (BDNA 3213) foram chamados de F1 (Fig.62 A) e F5 (Fig.62 B), respectivamente.

Figura 62 Observação de grampos de conexão nos Agaricomycetes sem identificação molecular (A) *Hjortstamia crassa* (F1) e (B) *Schizophyllum commun* (F5).





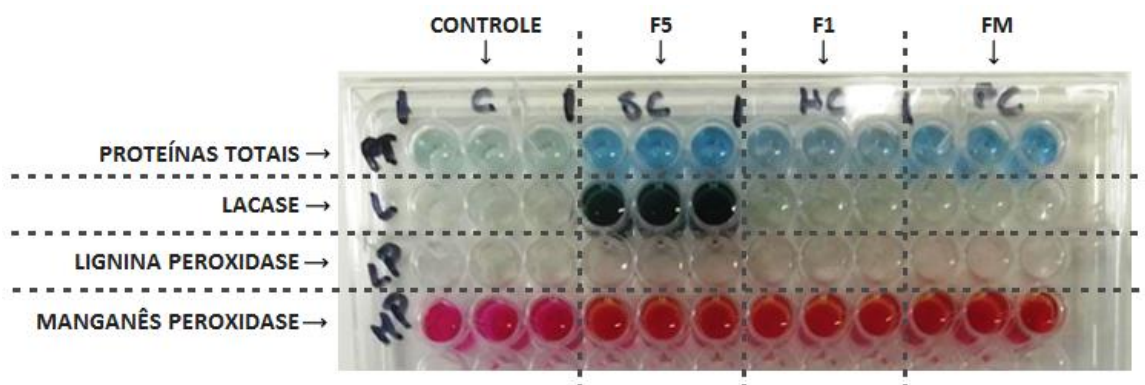
Fonte: Autoria própria

Entretanto, com a identificação molecular pelas sequências *lsu* e *its* no blast, o fungo F1 foi determinado como *Phlebiopsis* sp. com 99.32% de certeza, o fungo F5 como *Corioloopsis* sp. com 98.54% de certeza, e o fungo FM (fungo modelo adicionado para as análises enzimáticas) é *Phanerochaete chrysosporium* com 100% de certeza. A metodologia utilizada é específica para Basidiomycota foi modificada da original para os nossos requerimentos [175].

6.6. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS E ATIVIDADE DE ENZIMAS DEGRADADORAS DE LIGNINA

A concentração de proteínas totais no extrato do fungo F1 foi 1.924 µg/mL, no fungo F5 foi 20.019 µg/mL, e para o fungo modelo FM foi 15.162 µg/mL, como se indica na Tabela 14. A atividade enzimática por minuto de reação da lacase para fungo F1 foi 1.481×10^{-8} U/L, para o fungo F5 foi 5.674×10^{-6} U/L e para o fungo FM foi 4.444×10^{-7} U/L. A atividade da lignina peroxidase por minuto de reação para F1 foi 1.763×10^{-7} U/L, para o fungo F5 foi 2.233×10^{-7} U/L e para o fungo FM foi 2.115×10^{-7} U/L. Não se evidenciou atividade da Manganês peroxidase como é mostrado na Tabela 14. Na Figura 63. se observa o resultado visual destes análises.

Figura 63 Resultado visual da quantificação de proteínas totais e da atividade enzimática da lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* (FM), *Phlebiopsis* sp (F1) e *Corioloopsis* sp (F5).



Fonte: Autoria própria

A atividade da lacase do basídio *Grammothele subargentea* foi de 170.000 U/L após 21 dias de incubação em meio Czapek Dox, no entanto a enzima lignina peroxidase não foi encontrada nesse trabalho [205]. No extrato enzimático de *P. tricholoma* a atividade enzimática da lacase foi 2.650×10^{-2} U/L, após 6 dias de incubação em meio mínimo de com sais e peptona [201]. Em outra pesquisa os valores da lignina peroxidase e a lacase do fungo *Penicillium commune* atingiu 2.500 U/L e 1.930 U/L respectivamente após 5 dias de incubação em meio Sabouraud [202].

Os valores da atividade da lacase e lignina peroxidase dos extratos enzimáticos desta pesquisa são baixos comparados com a literatura, mas é muito importante considerar as equações empregadas para calcular esses valores. De todos os artigos, dissertações e teses procurados, a melhor equação encontrada na literatura [179] tem praticamente todos os parâmetros necessários para calcular a atividade enzimática em qualquer enzima. Para o trabalho desenvolvido foi necessário fazer uma única modificação da equação de [179], para obter a equação (9) e assim calcular os valores encontrados na Tabela 14. Portanto se existem parâmetros desconsiderados no momento de calcular a atividade enzimática, os valores resultantes podem ter uma grande variação. As porcentagens de descoloração alcançadas em 13 dias (Tabela 10) pelos fungos F1 e F5 na fase II da pré-seleção, são o indicativo de que tem altas capacidades de descolorir o efluente dentro do tempo normal encontrado em outras pesquisas, portanto os valores de atividade enzimática determinados neste trabalho, são correspondentes com as porcentagens de descoloração alcançadas.

Em quanto a manganês peroxidase não foi evidenciada atividade, demonstrando a ausência desta enzima nos estratos enzimáticos. Os fungos necessitam vários metais como cobre, ferro, manganês, molibdênio, zinco e níquel que são essenciais para o seu crescimento, e que também atuam como co-fatores enzimáticos induzindo a atividade ligninolítica [67], porem a manganês peroxidase é sensível a esses metais quando se encontram em altas quantidades por serem tóxicos [208], [209], por exemplo o ferro que inibe a atividade ou produção desta enzima em *P. castanella* [77].

Tabela 14 Valores quantificados de proteínas totais e atividade enzimática nos extratos dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* (FM), *Phlebiopsis* sp (F1) e *Coriolopsis* sp (F5).

FUNGO	QUANTIDADE DE PROTEÍNAS TOTAIS	LACASE	LIGNINA PEROXIDASE
FM	15.162 µg/mL	4.444×10^{-7} U/L	2.115×10^{-7} U/L
F1	1.924 µg/mL	1.481×10^{-8} U/L	1.763×10^{-7} U/L
F5	20.019 µg/mL	5.674×10^{-6} U/L	2.233×10^{-7} U/L

Fonte: Autoria própria

6.7. CINÉTICA ENZIMÁTICA DOS EXTRATOS

Os extratos enzimáticos dos três fungos que foram testados em diferentes volumes (Fig. 64), tiveram comportamento correspondente à cinética de Michaelis-Menten (Fig. 65) quando os dados foram linearizados por Lineweaver-Burk, com a finalidade de encontrar os parâmetros cinéticos K_M e V_{max} . Os valores de K_M registrados (Tabela 15) dos três fungos, estão dentro da ordem de grandeza de 233 ppm (500 µM K_M teórica) para o corante índigo carmim. Também pode se observar que nos fungos FM e F5 o K_M baixou a medida que o volume de extrato foi aumentando, mas no caso do fungo F1, o menor K_M registrado foi com 50 µL de extrato, este valor corresponde ao menor K_M registrado dos três fungos. Os valores de V_{max} se mantiveram quase constantes nos volumes de 10 e 25 µL de extrato, e diminuíram a medida que foi aumentando o volume de extrato colocado no corante índigo carmim 50 ppm que se encontrava a volume constante, isso indica que quando aumentou o volume do extrato (aumentando o volume de enzimas), também aumentou a taxa de biodegradação do corante.

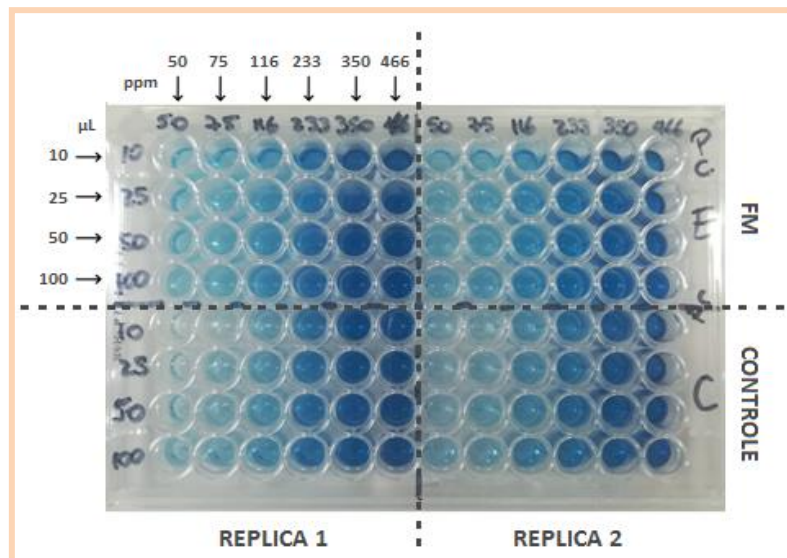
Normalmente o K_M não deveria variar muito se fosse uma enzima pura, mas por se tratar de um complexo enzimático, existiu um sinergismo entre as enzimas intra e extracelulares presentes. Esse sinergismo permitiu a potencialização do complexo [46], [47], [48], obtendo uma degradação do corante quase completa (acima de 90%) na concentração de 50 ppm em 25 dias de experimentação no C₂ e acima de 80% em C₁ (Tabela 10).

Tabela 15 Valores de K_M e V_{max} calculados a diferentes volumes de extrato nos três fungos *Phanerochaete chrysosporium* (FM), *Phlebiopsis* sp (F1) e *Coriolopsis* sp (F5).

FUNGO	10 µL EXTRATO		25 µL EXTRATO		50 µL EXTRATO		100 µL EXTRATO	
	V_{max} (ppm/h)	K_M (ppm)	V_{max} (ppm/h)	K_M (ppm)	V_{max} (ppm/h)	K_M (ppm)	V_{max} (ppm/h)	K_M (ppm)
FM	0.0039	117.3300	0.0043	135.6460	0.0020	58.9935	0.0008	23.2455
F1	0.0055	432.0836	0.0058	266.5848	0.0015	15.7337	0.0021	68.7245
F5	0.0075	577.8996	0.0060	213.5867	0.0021	37.2611	0.0028	32.5247

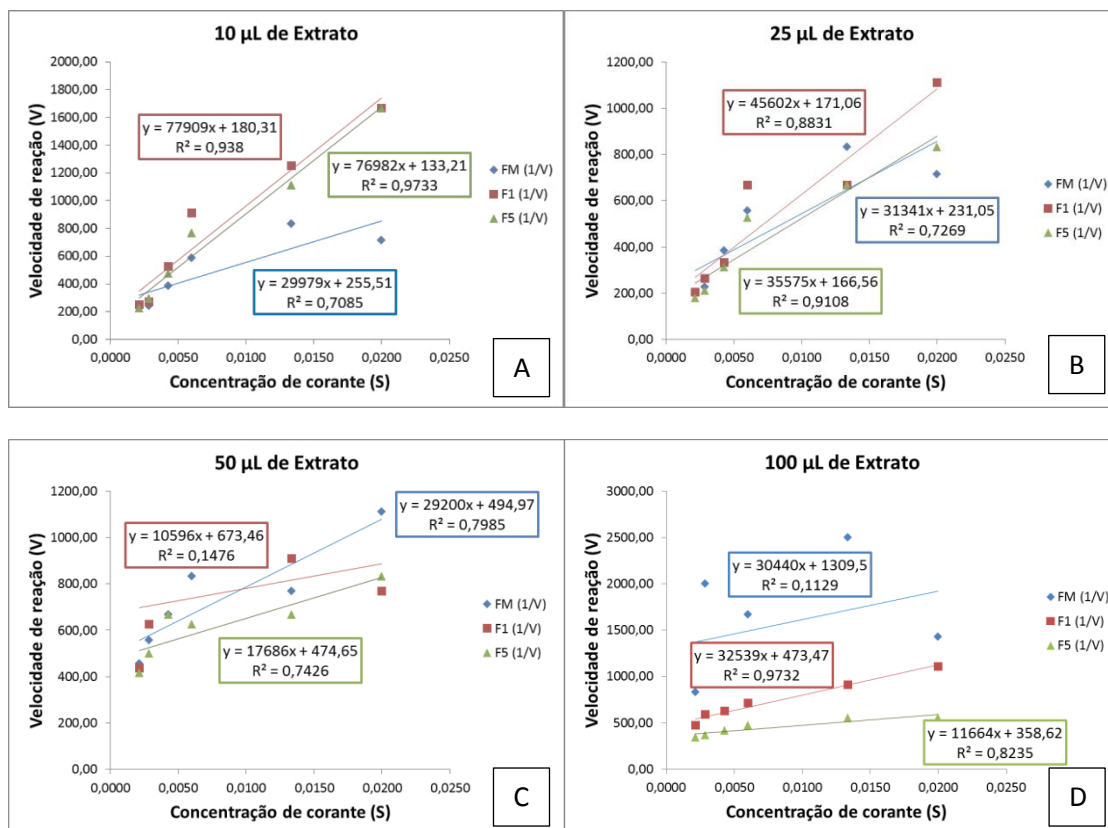
Fonte: Autoria própria

Figura 64 Cinética enzimática dos extratos de *Phanerochaete chrysosporium* (FM), testado em diferentes volumes. O experimento se repete para *Phlebiopsis* sp (F1) e *Corioloropsis* sp (F5).



Fonte: Autoria própria

Figura 65 Comportamento cinético enzimático de Michaelis – Menten dos três fungos em diferentes volumes de extrato enzimático (A) 10 µL, (B) 25 µL, (C) 50 µL e (D) 100 µL.

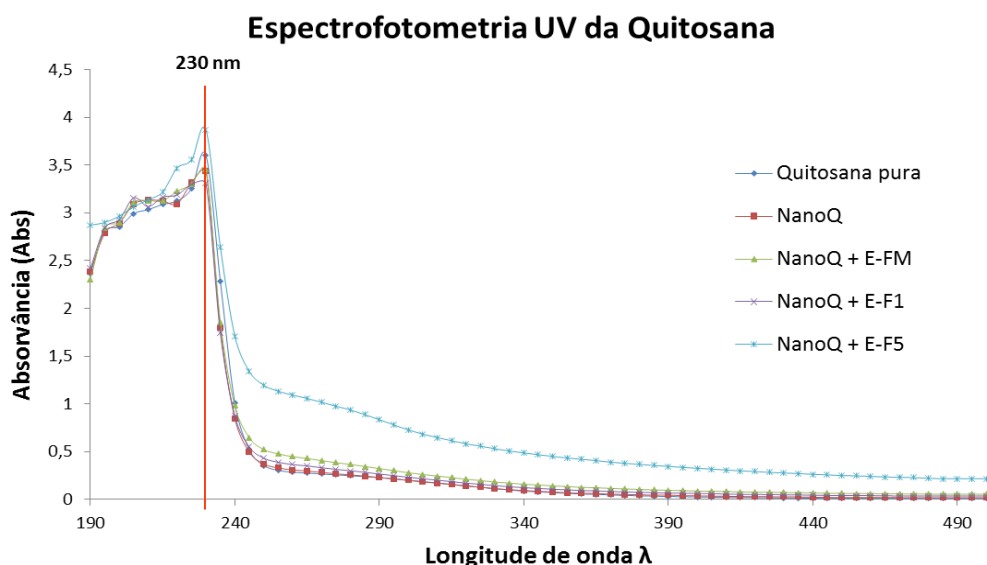


Fonte: Autoria própria

6.8. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS EM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

O grau de N-acetilação da quitosana foi analisado por espectrofotometria das nanopartículas preparadas com enzimas, sem enzimas e também da quitosana pura. Na Figura 66 se observa que para todas as amostras, o maior pico de absorção foi de 230 nm.

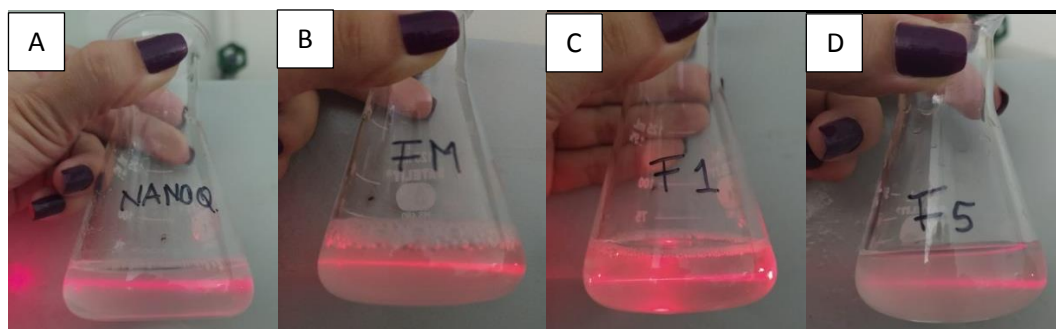
Figura 66 Espectrofotometria UV-Vis da quitosana pura, quitosana em forma de nanopartículas (NanoQ), nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo *Phanerochaete chrysosporium* (NanoQ + E-FM), nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo *Phlebiopsis* sp (NanoQ + E-F1) e nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo *Corioloopsis* sp (NanoQ + E-F5)



Fonte: **Autoria própria**

Na Figura 67, se observa como o raio de luz laser atravessa as amostras de NanoQ (Fig. 67 (A)), NanoQ + E-FM (Fig. 67 (B)), NanoQ + E-F1 (Fig. 67 (C)) e NanoQ + E-F5 (Fig. 67 (D)), mostrando o efeito Tyndall de dispersão de luz pelas partículas que se encontram em estado coloidal.

Figura 67 Efeito Tyndall na faixa de tamanho nano: (Fig. 67 A) quitosana em forma de nanopartículas (NanoQ), (Fig. 67 B) nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo *Phanerochaete chrysosporium* (NanoQ + E-FM), (Fig. 67 C) nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo *Phlebiopsis* sp (NanoQ + E-F1) e (Fig. 67 D) nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo *Corioloopsis* sp (NanoQ + E-F5).



Fonte: **Autoria própria**

Na Tabela 16 está detalhado o grau de desacetilação da quitosana em cada uma das amostras. Todas as porcentagens obtidas são superiores a 80%, esse resultado indica que a pureza da quitosana usada é muito boa [94], por tanto a eficiência de remoção por absorção de metais pesados e corantes é alta [102]. A diferença do grau de desacetilação entre as amostras é pela interferência das enzimas durante a medição do espectrofotômetro.

Tabela 16 Grau de N-acetilação para a quitosana pura, nanopartículas de quitosana sem enzimas e nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* (FM), *Phlebiopsis* sp (F1) e *Coriolopsis* sp (F5)

GRAU DE N-ACETILAÇÃO PARA A QUITOSANA			
Amostra	Absorbância em 230 nm	Grau de N-acetilação	Grau de Desacetilação
Quitosana pura	3.602	17.40	82.60
NanoQ	3.436	16.53	83.47
NanoQ + E-FM	3.458	16.64	83.36
NanoQ + E-F1	3.306	15.85	84.15
NanoQ + E-F5	3.868	18.80	81.20

Fonte: Autoria própria

As porcentagens de imobilização quantificadas estão correlacionadas com as concentrações de proteínas totais encontradas na quantificação com Bradford, portanto F5 mostrou 88.50% de imobilização, seguido de FM com 85.95% e finalmente F1 com 84.11%. Em F5 houve maior imobilização justamente por existir mais enzimas no extrato concentrado como se indica na Tabela 17.

Tabela 17 Porcentagem de imobilização enzimática dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* (FM), *Phlebiopsis* sp (F1) e *Coriolopsis* sp (F5) em nanopartículas de quitosana.

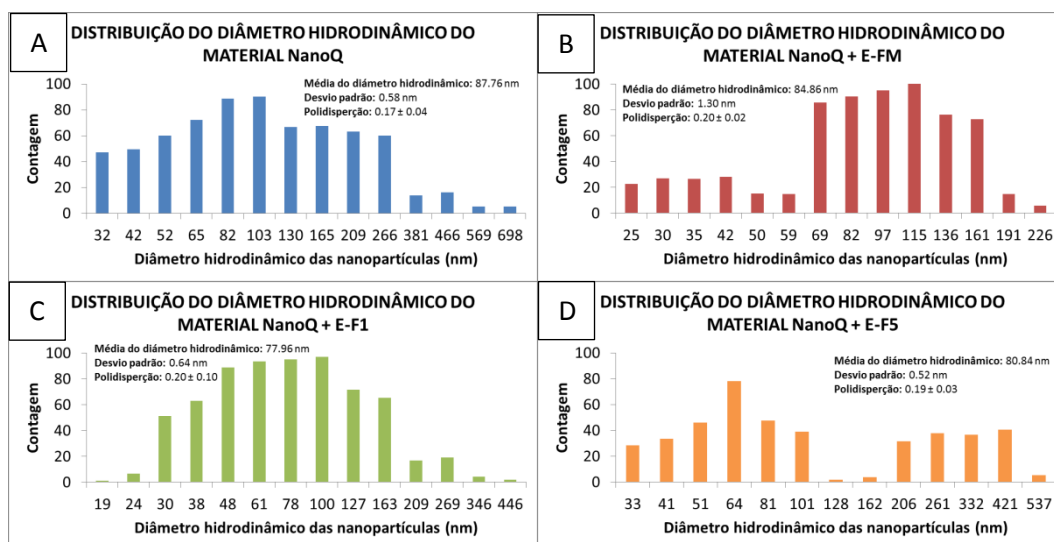
FUNGO	QUANTIDADE DE PROTEÍNAS TOTAIS	ENZIMAS IMOBILIZADAS
FM	15.162 µg/mL	85.95%
F1	1.924 µg/mL	84.11%
F5	20.019 µg/mL	88.50%

Fonte: Autoria própria

6.9. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS FORMADAS DE QUITOSANA E ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

Mediante a utilização do DLS NanoBrook Omni – BROOK HAVEN, foram determinados os diferentes raios hidrodinâmicos das nanopartículas sintetizadas usando os diferentes extratos dos fungos FM, F1 e F5, e também as nanopartículas sintetizadas sem enzimas. A polidispersão (diferentes tamanhos) das nanopartículas formadas se encontra registrada através dos histogramas de distribuição com se observa na Figura 68.

Figura 68 Distribuição do diâmetro hidrodinâmico de (A) NanoQ, (B) NanoQ + E-FM (*Phanerochaete chrysosporium*), (C) NanoQ + E-F1 (*Phlebiopsis* sp) e (D) NanoQ + E-F5 (*Corioloopsis* sp).



Fonte: Autoria própria

Estabeleceu-se o diâmetro médio e o desvio padrão de todas as amostras. Para NanoQ foi $87.76 \text{ nm} \pm 0.58 \text{ nm}$ (Fig. 68 A), para NanoQ + E-FM foi $84.86 \text{ nm} \pm 1.30 \text{ nm}$ (Fig. 68 B), para NanoQ + E-F1 foi $77.96 \text{ nm} \pm 0.64 \text{ nm}$ (Fig. 68 C) e para NanoQ + E-F5 foi $80.84 \text{ nm} \pm 0.52 \text{ nm}$ (Fig. 68 D). Nos quatro histogramas se observa que as nanopartículas são menores de 100 nm, apresentando uma polidispersão de 0.17 ± 0.04 para NanoQ, 0.20 ± 0.02 para NanoQ + E-FM, 0.20 ± 0.10 para NanoQ + E-F1 e 0.19 ± 0.03 para NanoQ + E-F5.

Os diâmetros hidrodinâmicos permitem conhecer um valor aparente do diâmetro das nanopartículas, porque com o DLS também se mede as estruturas que se encontrem na superfície, como o estabilizador, íons ou o material imobilizado [205]. Os valores baixos de polidispersão estão correlacionados à pouca diferença no tamanho das nanopartículas entre as quatro amostras.

O potencial Z é um bom mecanismo de verificação quanto a estabilidade físico-química de uma suspensão coloidal (suspensão de nanopartículas), assim como a interação eletrostática (se existir) entre as nanopartículas de quitosana e as enzimas [109]. A média dos valores do potencial Z e o seu desvio padrão das amostras foram: $9.29 \text{ mV} \pm 1.71 \text{ mV}$ para NanoQ, $7.65 \text{ mV} \pm 4.45 \text{ mV}$ para NanoQ + E-FM, $13.03 \text{ mV} \pm 1.29 \text{ mV}$ para NanoQ + E-F1 e foi $11.58 \text{ mV} \pm 2.16 \text{ mV}$ para NanoQ + E-F5 (Tabela 18).

Tabela 18 Valores do potencial Z encontrados nas amostras NanoQ, NanoQ + E-FM (*Phanerochaete chrysosporium*), NanoQ + E-F1 (*Phlebiopsis* sp) e NanoQ + E-F5 (*Coriolopsis* sp)

AMOSTRA	POTENCIAL ZETA (mV)
NanoQ	9.29 ± 1.71
NanoQ + E-FM	7.65 ± 4.45
NanoQ + E-F1	13.03 ± 1.29
NanoQ + E-F5	11.58 ± 2.16

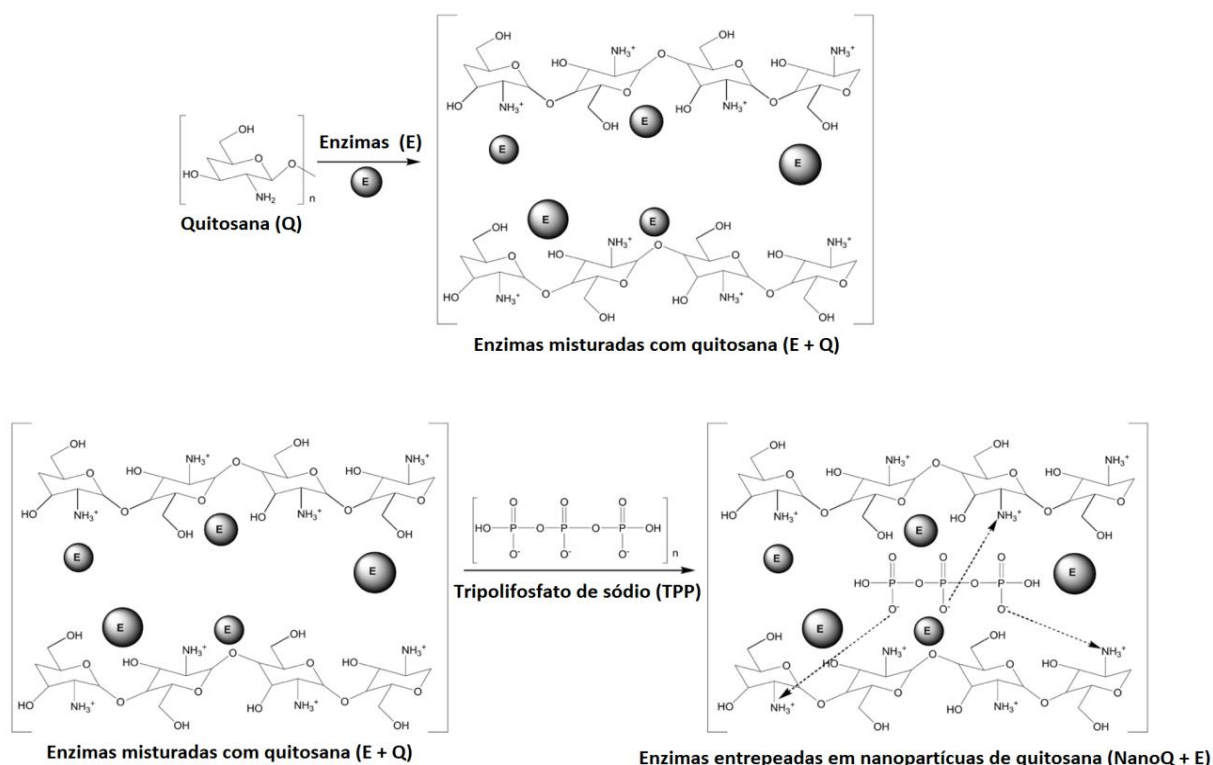
Fonte: Autoria própria

Os valores de potencial Z próximos entre todas as amostras se deve a dois motivos, o primeiro é a concentração da solução polimérica usada durante a preparação das nanopartículas nas quatro amostras (1 mg/mL, pH = 4), que no caso das NanoQ (referencia sem enzimas) o valor do potencial Z foi de 9.29 mV ± 1.71 mV, essa informação é corroborada por [109], onde o valor do potencial Z de nanopartículas de quitosana formadas a partir de uma solução polimérica de 1mg/mL M foi de 9.4 mV ± 1.70 mV.

O segundo motivo dos valores similares se deve ao ponto isoelétrico das enzimas ligninolíticas. Quando uma enzima é sometida a um pH diferente ao pH do seu ponto isoelétrico, elas modificam a sua carga para negativa se o pH do meio fosse inferior, ou positiva si o pH fosse superior, mas quando se mantem o pH do ponto isoelétrico elas se mantem com carga 0 e não interagem com as cargas eletrostáticas do meio onde se encontram [206].

O ponto isoelétrico da lacase se encontra no pH = 4 [207], na manganês peroxidase se encontra na faixa do pH de 3.2 - 4.4 e o ponto isoelétrico da lignina peroxidase está na faixa do pH de 3.2 – 4 [213]. Lembrando que nas etapas de imobilização deste trabalho foi usado o pH = 4, as enzimas praticamente continuaram com a sua carga 0, portanto não interagiram eletrostaticamente com as cargas negativas dos oxigênios do TPP ($P_3O_{10}^{-5}$), nem com as cargas positivas dos grupos amino da quitosana (NH_3^+), mas estes dois interagiram entre si formando ligações eletrostáticas, deixando entrapadas as enzimas na estrutura reticulada das nanopartículas formadas (Fig. 69) [206].

Figura 69 Representação gráfica da imobilização de enzimas ligninolíticas em nanopartículas de quitosana



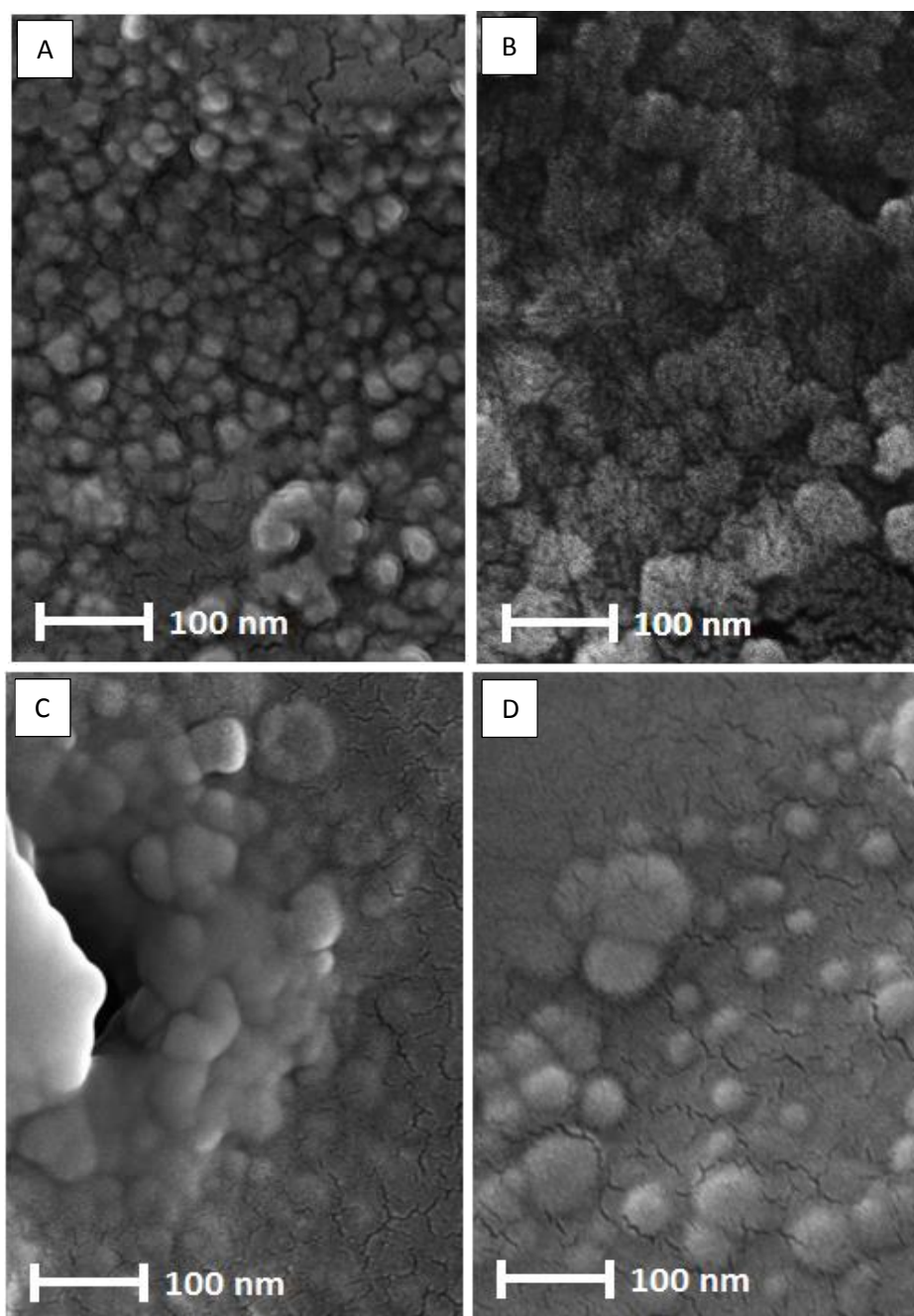
Fonte: Modificado de [206]

Segundo [205] a caracterização com o DLS não é suficiente para determinar o tamanho das nanopartículas devido a as estruturas que podem se encontrar na superfície, portanto para determinar o tamanho mais aproximado, foi usada a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Nas figuras 70 e 71 se encontram as amostras observadas por MEV a escala de 100 nm e os histogramas dos tamanhos das nanopartículas de quitosana com e sem enzimas. As NanoQ formadas (Fig. 70 A) apresentaram um diâmetro médio de $44.85 \text{ nm} \pm 12.12 \text{ nm}$ (Fig. 71 A), as NanoQ + E-FM (Fig. 70 B) medem $79.63 \text{ nm} \pm 19.72 \text{ nm}$ de diâmetro (Fig. 71 B), as NanoQ + E-F1 (Fig. 70 C) $75.23 \text{ nm} \pm 15.01 \text{ nm}$ (Fig. 71 C) e as NanoQ + E-F5 (Fig. 70 D) $78.36 \text{ nm} \pm 18.61 \text{ nm}$ (Fig. 71 D)

A morfologia das nanopartículas de quitosana menores e estáveis são esféricas [208], mas dependendo do tipo de quitosana (% de desacetilação), o aumento do pH e o aumento das proporções usadas do reticulante e do biopolímero (em favor do reticulante), as nanopartículas podem aumentar de tamanho por agregação [209] e perder sua forma esférica. Na Figura 70 pode se observar que as nanopartículas formadas são esféricas, o que indica que em pH 4, com pureza (maior a 80%) da quitosana e sua proporção usada com a proporção do reticulante TPP (5:2), permite a formação de nanopartículas estáveis e de tamanhos ótimos para ser considerados dentro da escala nano.

Figura 70 Amostras analisadas por MEV. (A) NanoQ, (B) NanoQ + E-FM (*Phanerochaete chrysosporium*), (C) NanoQ + E-F1(*Phlebiopsis* sp) e (D) NanoQ + E-F5 (*Corioloopsis* sp).

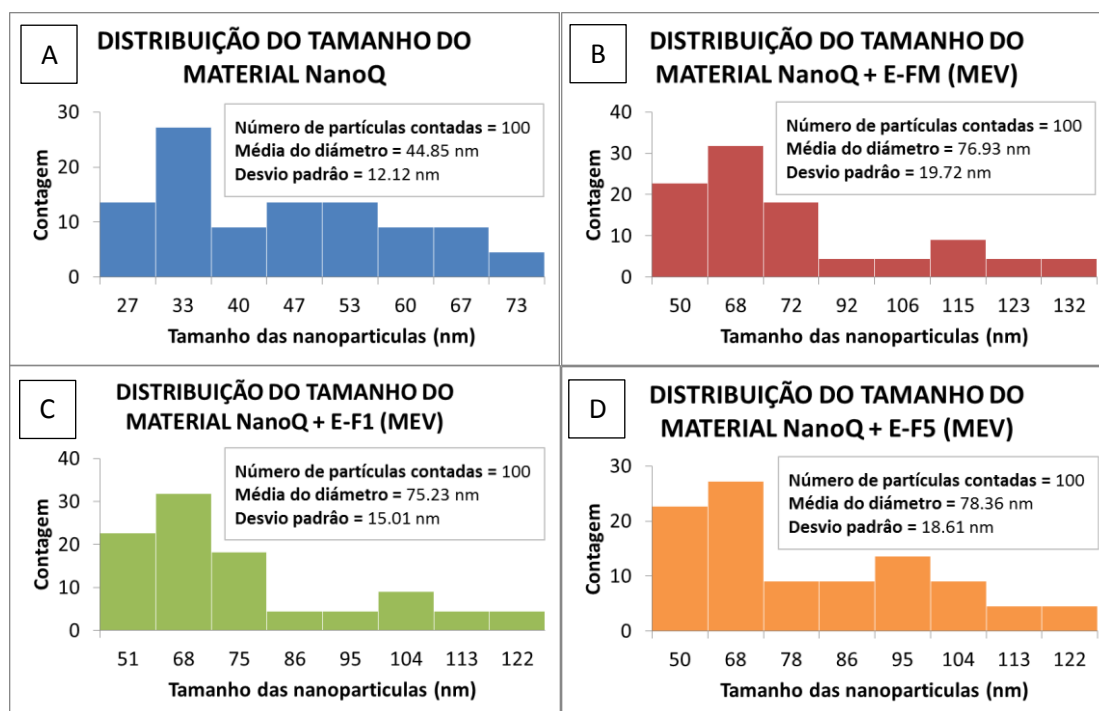


Fonte: Autoria própria

Como pode se observar para NanoQ (Fig. 71 A) existe uma maior quantidade de nanopartículas de 33 nm, para NanoQ + E-FM (Fig. 71 B) a maior quantidade se concentra no tamanho de 68 nm, mas tem predominância entre 50 e 70 nm. Para NanoQ + E-F1 (Fig. 71 C) o tamanho maior se encontra em 68 nm também, mas existe predominância entre 51 e 75 nm, e para NanoQ +

E-F5 (Fig. 71 D) também predomina 68 nm porém a sua predominância se encontra entre 50 e 70 nm.

Figura 71 Histogramas de distribuição dos tamanhos encontrados nas amostras. (A) NanoQ, (B) NanoQ + E-FM (*Phanerochaete chrysosporium*), (C) NanoQ + E-F1 (*Phlebiopsis* sp) e (D) NanoQ + E-F5 (*Corioloopsis* sp).

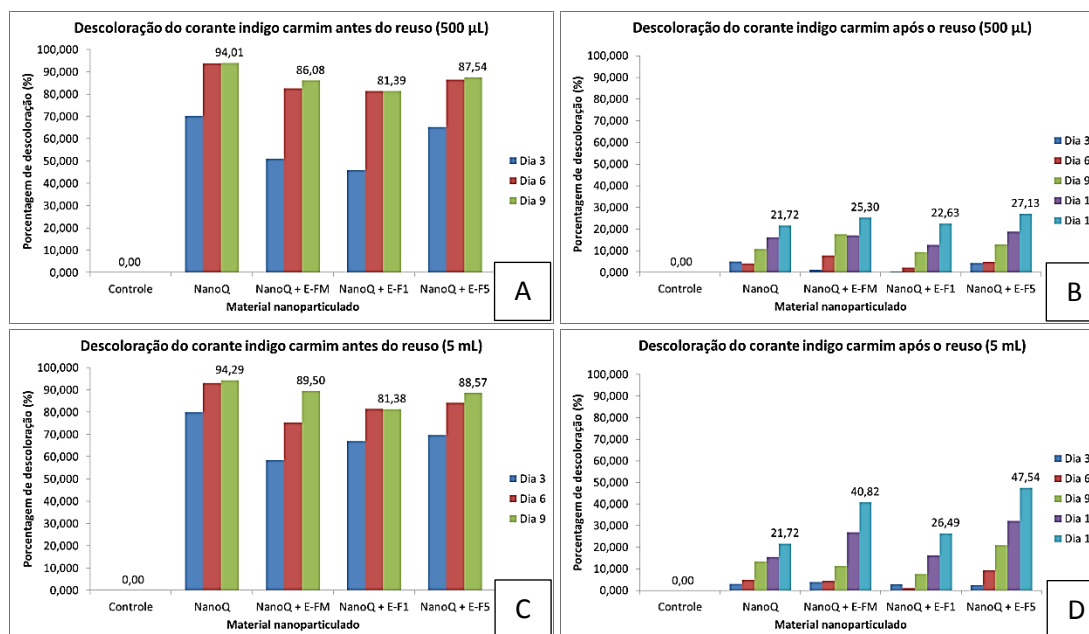


Fonte: Autoria própria

6.10. REUSO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COM ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS IMOBILIZADAS

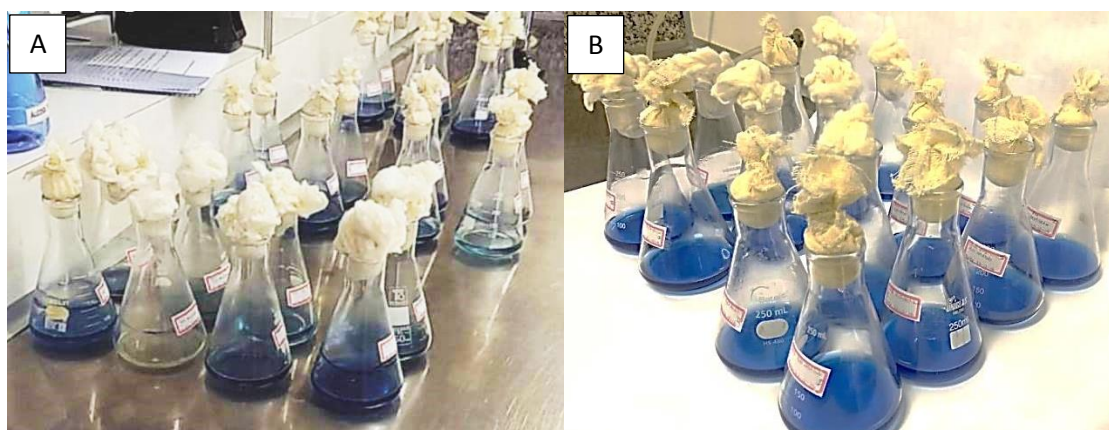
Comparando as porcentagens de descoloração das amostras antes e após do reuso, podemos observar na Figura 72. que 500 μ L de NanoQ apresentou uma maior porcentagem (94.01%) de descoloração do que 500 μ L de NanoQ + E-FM (86.08%), NanoQ + E-F1 (81.39%) e NanoQ + E-F2 (87.54%) no nono dia de experimentação antes do reuso da amostra (Fig. 72 A), e após o reuso se observa que NanoQ obteve a menor porcentagem (21.72%) de descoloração do que NanoQ + E-FM (25.30%), NanoQ + E-F1 (22.63%) e NanoQ + E-F5 (27.13%), no decimo quinto dia de experimentação (Fig. 72 B). Na Figura 73. se observa a descoloração do corante índigo carmim 50 ppm usando as amostras antes do reuso (Fig. 73 A), e depois do reuso (Fig. 73 B).

Figura 72 Porcentagens de descoloração do corante índigo carmim antes e após o reuso das (A) nanopartículas de quitosana sem enzima – NanoQ, (B) nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo FM – NanoQ + E-FM (*Phanerochaete chrysosporium*), (C) nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo F1 – NanoQ + E-F1 (*Phlebiopsis* sp) e (D) nanopartículas de quitosana com enzimas imobilizadas do fungo F5 – NanoQ + E-F5 (*Coriopsis* sp).



Fonte: Autoria própria

Figura 73 Descoloração do corante índigo carmim 50 ppm (A) antes do reuso e (B) após o reuso



Fonte: Autoria própria

A mesma tendência de descoloração aconteceu usando 5 mL de amostra. Para NanoQ a porcentagem foi maior (94.29%) do que NanoQ + E-FM (89.50%), NanoQ + E-F1 (81.38%) e NanoQ + E-F2 (88.57%) no nono dia de experimentação antes do reuso (Fig. 72 (C)), e após o reuso a porcentagem para NanoQ foi menor (21.72) do que NanoQ + E-FM (40.82%), NanoQ + E-F1 (26.49%) e NanoQ + E-F5 (47.54%) no decimo quinto dia de experimentação (Fig. 72 (D)).

Mesmo que as porcentagens usando os dois volumes de amostra antes do reuso não sejam muito distantes, a porcentagem maior usando NanoQ é devido a sua porosidade. Quando acontece a imobilização, as enzimas ficam entrapadas na rede das nanopartículas de quitosana [206], ocupando os espaços porosos do biopolímero, diminuindo a sua capacidade de adsorção. Como na amostra de NanoQ as nanopartículas se formam sem enzimas, então tem uma porosidade maior que permite o corante seja adsorvido em maior quantidade [102].

Pelo contrário após o reuso se observa que a porcentagem de descoloração usando NanoQ é menor do que nas outras amostras, isso acontece porque a porosidade das nanopartículas foi se saturando durante a adsorção, diminuindo sua capacidade de descolorir o corante índigo carmim [102], e as enzimas que estão presentes na rede das nanopartículas, continuam biodegradando tanto o corante adsorvido pela quitosana (deixando livre novamente a porosidade para continuar adsorvendo), como o corante do meio onde se encontram, permitindo uma maior porcentagem de remoção do corante durante o tempo. A porcentagem de remoção após o reuso foi maior usando o volume inicial (antes do reuso) de 5 mL, do que usando o volume de 500 µL devido a que tem mais nanopartículas em um volume maior de amostra.

Em quanto à análise estatística do desenho fatorial (4^2) aplicado, para avaliar a combinação de dois níveis: 4 tipos de amostra nanoparticulada (fatores qualitativos) e 4 condições experimentais (fatores quantitativos):

1. Descoloração do índigo carmim por 500 µL da amostra nanoparticulada sem reutilização (SR-500 µL);
2. Descoloração do índigo carmim por 500 µL da amostra nanoparticulada com reutilização (CR-500 µL);
3. Descoloração do índigo carmim por 5 mL da amostra nanoparticulada sem reutilização (SR-500 µL);
4. Descoloração do índigo carmim por 5 mL da amostra nanoparticulada com reutilização (CR-500 µL).

As condições se basearam na taxa de descoloração do corante índigo carmim 50 ppm, medida em comprimentos de onda e expressada em percentual. Os resultados da análise estatística ANOVA se encontram na tabela 19 (sem reuso) e tabela 20 (com reuso).

Considerando-se que as hipóteses estatísticas analisadas foram:

Ho (Hipótese nula): Não existe influencia significativa na descoloração do corante índigo carmim, com ou sem o reuso diferentes volumes de amostras nanoparticuladas (com e sem enzimas imobilizadas).

Hi (Hipótese alternativa): Existe influencia significativa na descoloração do corante índigo carmim, com ou sem o reuso diferentes volumes de amostras nanoparticuladas (com e sem enzimas imobilizadas).

Rejeitou-se a hipótese nula, aceitando-se a hipótese alternativa que indica que Existe influencia significativa na descoloração do corante índigo carmim, com ou sem o reuso

diferentes volumes de amostras nanoparticuladas (com e sem enzimas imobilizadas). Esse resultado pode se corroborar pelos valores F e p_valor da tabela 19 e tabela 20.

O valor F do modelo estatístico sem reuso foi de 2431,266 que é muito maior do que o valor F crítico de 5.192, e F do modelo com reuso foi 6.241 que é maior que o F crítico 5.192, isto indica que o modelo aplicado sem reuso é muito significativo e o modelo com reuso é significativo.

O p_valor de 0.021×10^{-6} é muito menor do que o nível de significância de 0.05 para o modelo sem reuso, e para o modelo com reuso o p_valor foi 0,035, também menor do que o nível de significância, isto indica que os dois níveis analisados (quantitativos e qualitativos), tem influencia significativa (95 % de confiabilidade) sobre os estudos estatísticos realizados dos modelos com e sem reuso.

Tabela 19 Análise estatística ANOVA da descoloração do corante índigo carmim 50 ppm por enzimas imobilizadas em nanopartículas de quitosana sem o seu reuso.

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	12509,5	4	3127,376	2431,266	2,09E-08	5,192168
Dentro dos grupos	6,43158	5	1,286316			
Total	12515,94	9				

Fonte: Autoria própria

Tabela 20 Análise estatística ANOVA da descoloração do corante índigo carmim 50 ppm por enzimas imobilizadas em nanopartículas de quitosana com o seu reuso.

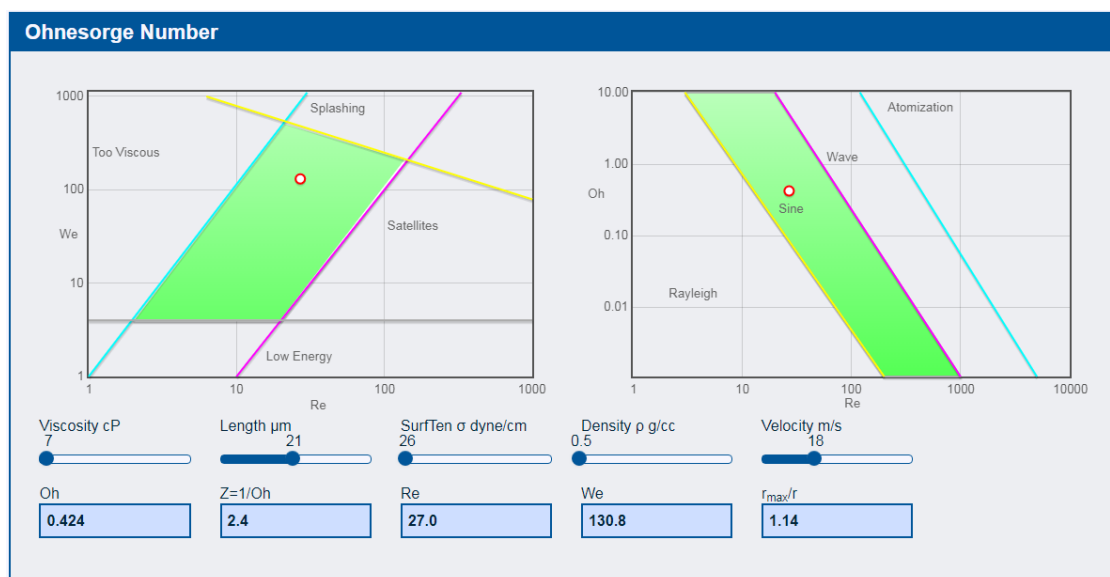
ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1678,289	4	419,5723	6,241446	0,03506	5,192168
Dentro dos grupos	336,1179	5	67,22358			
Total	2014,407	9				

Fonte: Autoria própria

6.11. FABRICAÇÃO DO DISPOSITIVO IMPRESSO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COM ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS IMOBILIZADAS POR TECNOLOGIA DoD

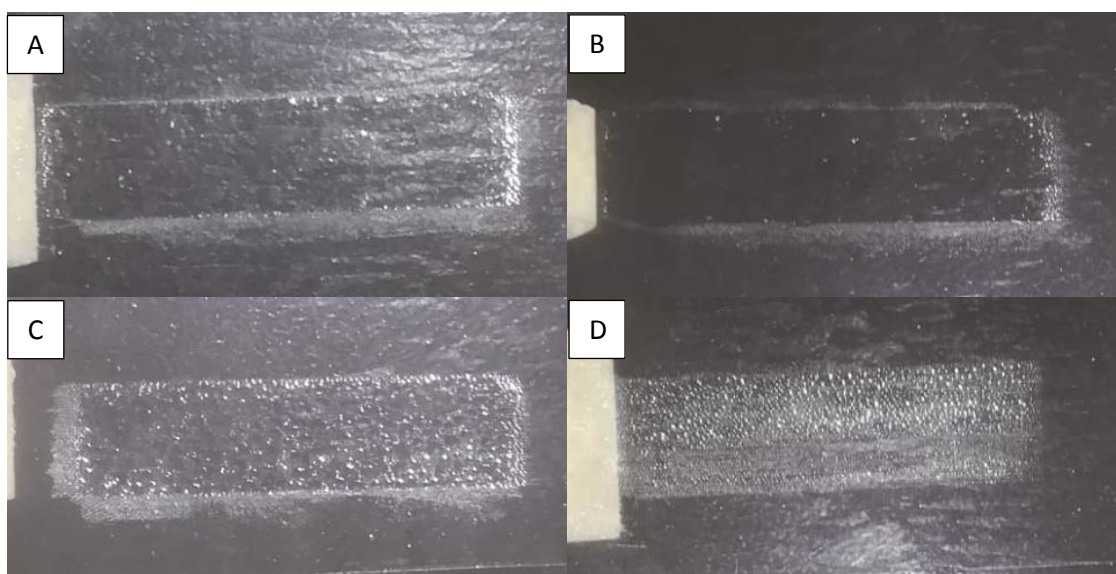
As características físico-químicas do fluido de impressão viscosidade (7 cP), tensão superficial (26 dina/cm), densidade (0.5 g/mL), assim como o diâmetro do bico do cartucho de impressão (21 µm) e a velocidade de jateamento (18.18 m/s), permitiram que o fluido se encontre dentro da região imprimível, na Figura 74. se observa o ponto vermelho que representa o valor de Z dentro da região de impressão ($1 < Z < 10$) em cor verde. Portanto os dispositivos (Fig. 75 foram impressos dentro da região imprimível em DoD.

Figura 74 Parâmetros de impressão para o fluido, mostrando que se situa (ponto vermelho) dentro da região imprimível (área verde) em DoD.



Fonte: Autoria própria

Figura 75 Dispositivos impressos, (A) NanoQ, (B) NanoQ + E-FM (*Phanerochaete chrysosporium*), (C) NanoQ + E-F1 (*Phlebiopsis* sp) e (D) NanoQ + E-F5 (*Corioloopsis* sp).



Fonte: Autoria própria

6.12. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DOS DISPOSITIVOS IMPRESSOS DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COM ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS IMOBILIZADAS, POR TECNOLOGIA DoD

Os dispositivos impressos apresentaram maior quantidade de proteínas totais após a impressão, como se indica na Tabela 21. Esse fato está diretamente relacionado com o aumento da concentração efetiva das enzimas, ocorrido pela imobilização em nanopartículas de quitosana [111].

Tabela 21 Quantificação de proteínas totais dos dispositivos impressos e porcentagem de aumento da concentração efetiva das enzimas em solução. FM (*Phanerochaete chrysosporium*), F1 (*Phlebiopsis* sp) e F5 (*Corioloopsis* sp)

FUNGO	QUANTIDADE DE PROTEÍNAS TOTAIS (ANTES DA IMPRESSÃO)	QUANTIDADE DE PROTEÍNAS TOTAIS (DEPOIS DA IMPRESSÃO)	AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA DAS ENZIMAS EM SOLUÇÃO POR IMOBILIZAÇÃO
FM	15.162 µg/mL	90.543 µg/mL	597.17%
F1	1.924 µg/mL	14.114 µg/mL	733.57%
F5	20.019 µg/mL	146.257 µg/mL	730.59%

Fonte: Autoria própria

A criação deste dispositivo impresso apresenta diferentes vantagens. Primeiro, a imobilização aumenta a concentração efetiva enzimática no fluido de impressão, e por ser feita em escala nanométrica aumenta a área de ação pela produção de quantidades importantes de produto final, em relação com aumento de área superficial em 1×10^9 vezes (escala nano) [210]. Segundo, otimiza o consumo do fluido de impressão, neste caso composto de material biológico sensível (enzimas) e demais componentes biodegradáveis. Terceiro, a impressora Dimatix Materials Printer DMP-2831 (FUJIFILM Dimatix Inc.), permite uma alta resolução devido aos volumes muito baixos que usa, neste caso 10 picolitros por gota. Quarto, facilita o transporte do material imobilizado em embalagens pequenas e de pouco peso. Quinto, todas essas vantagens indicadas abaixam o custo do produto final que pode ser replicável as vezes seja requerido [159].

7. CONCLUSÕES

O estudo referente à atividade de enzimas ligninolíticas extraídas de fungos agaricomycetes provenientes da Caatinga pernambucana, demonstrou que estes organismos têm a capacidade de biorremediar o efluente têxtil da lavanderia industrial do Município de Caruaru.

O efluente têxtil puro remediado pelos fungos *Phanerochaete chrysosporium* (Fungo Modelo – FM), *Phlebiopsis* sp. (Fungo 1 – F1) e *Coriolopsis* sp. (Fungo 5 – F5), demonstraram não ser tóxicos a contato com *Artemia* sp. (HIGH 5 - INVE).

A imobilização enzimática em nanopartículas de quitosana tem vantagem sobre as nanopartículas preparadas unicamente com o biopolímero, devido a que a quitosana se satura evitando o reuso ao longo do tempo, e as enzimas imobilizadas tem a possibilidade de ser reutilizadas para continuar com a biodegradação ao longo do tempo.

Outra vantagem da imobilização é o aumento da concentração efetiva enzimática, e por ser feita em estruturas nanométricas, a área de ação aumenta graças ao aumento da área superficial em 1×10^9 vezes, o que eleva a produção de quantidades importantes de produto final.

É possível criar um dispositivo impresso de enzimas imobilizadas completamente biodegradável, mediante tecnologia DoD, sem perder a estrutura proteica das enzimas, fato que incentiva realizar mais testes posteriores sobre seu uso para biodegradar efluentes têxteis.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Chatha, S. A. S., Asgher, M., & Iqbal, H. M. (2017). Enzyme-based solutions for textile processing and dye contaminant biodegradation—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(16), 14005-14018. Doi: 10.1007 / s11356-017-8998-1.
- [2] Zhang, Y., Wang, T. 2010. Profitability and Productivity of the Chinese Textile industry. *China & World Economy*. 1 – 21, Vol. 18, No. 5. Doi: 10.1111/j.1749-124X.2010.01209.x
- [3] Honorato, A. C.; Machado, J. M.; Celante, G.; Borges, W. G. P.; Dragunski, D. C.; Caetano, J. 2015. Biosorption of methylene blue using agro-industrial residues. *Rev. bras. eng. agríc. ambient.* vol.19 no.7; 705-710. DOI: 10.1590 / 1807-1929 / agriambi.v19n7p705-710.
- [4] IEMI. 2013. Relatório Setorial da Indústria Têxtil Brasileira. Disponível em <http://www.iemi.com.br/press-release-iemi-lanca-relatorio-setorial-da-industria-textil-brasileira/>
- [5] MTE. Ministério do Trabalho e Emprego. Banco de dados Rais/Caged. Disponível em: <http://portal.mte.gov.br/portal-pdet>
- [6] Viana, M. A., de Souza Lira, E. B., Coelho, C. D. P. G., de Gondra Bezerra, A. P. X., Lorena, E. M. G., & de Holanda, R. M. (2018). Pegada hídrica em indústria de beneficiamento de jeans no Agreste Pernambucano. *Journal of Environmental Analysis and Progress*, 3(1), 061-068. Doi: 10.24221/jeap.3.1.2018.1723.061-068
- [7] PEDESENVOLVIMENTO. Disponível em: <http://pedesenvolvimento.com/2010/10/10/polo-de-confeccoes-entra-na-web/>
- [8] Oliveira, G. A. R., Lapuente, J.; Teixido, C. P. E.; Borrás, M.; Oliveira, D. P. 2016 Textile dyes induce toxicity on zebrafish early life stages. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 35, No. 2, pp. 429–434. Doi: 10.1002 / etc.3202
- [9] Waring, D. R., & Hallas, G. (Eds.). (2013). *The chemistry and application of dyes*. Springer Science & Business Media. Doi: 10.1007 / 978-1-4684-7715-3
- [10] Gaboriaud-Kolar N., Nam S., Skaltsounis A.L. 2014. A colorful history: the evolution of indigoids. *Progress in the chemistry of organic natural products* Atenas, v. 99, p. 69-145. Doi: 10.1007 / 978-3-319-04900-7
- [11] Yagub, M. T., Sen, T. K., Afroze, S., Ang, H. M. 2014. Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: a review. *Adv Colloid Interfac.* 209:172–184. Doi: 10.1016/j.cis.2014.04.002
- [12] Christie, R. 2015. *Colour Chemistry*. second ed. Heriot-Watt: The Royal Society of Chemistry, 360 p. ISBN-13: 9781849733281. Disponível em: <https://www.rsc.org/globalassets/05-journals-books-databases/booksellers/product-list-catalogues/rsc-books-textbooks-and-course-materials-catalogue.pdf>.
- [13] Zucca, P., Cocco, G. Sollai, F. Sanjust, E. 2015. Fungal laccases as tools for biodegradation of industrial dyes. *Biocatalysis* v.1, p.82–108. Doi: 10.1515/boca-2015-0007.
- [14] Shertate, R.S., Thorat, P. 2014. Biotransformation of textile dyes: a bioremedial aspect of marine environment. *American Journal of Environmental Sciences*. Dist.-Solapur, v.10 (5), p.489-499, set. 2014. Doi: 10.3844 / ajessp.2014.489.499

- [15] Zaharia, C., Suteu, D. 2012. Textile Organic Dyes - Characteristics, Polluting Effects and Separation/Elimination Procedures from Industrial Effluents - A Critical Overview. doi: 10.5772/32373
- [16] Baumann, H.P.; Fletcher, J.M. 1951. Textile Dyeing: Theory of Dyeing. 1ª edição. Grã-Betânia: International Textbook Company, 57 p.
- [17] Welham, A. 2000. *The theory of dyeing and the secret of life*. J. - Soc. Dye. Colour. v.116, p.140-143.
- [18] Gomes, J.I.N.R. 2000. *Química da cor e dos corantes* - Curso de Química da Qualidade-Ramo Materiais Têxteis. Braga, 43 p.
- [19] Rauf, M. A., Meetani, M. A., Hisaindee, S. 2011. An overview on the photocatalytic degradation of azo dyes in the presence of TiO₂ doped with selective transition metals. *Desalination*. 276. 13-27. Doi: 10.1016/j.desal.2011.03.071
- [20] Zhang, H., et al. 2016. Characterization of a manganese peroxidase from white-rot fungus *Trametes* sp.48424 with strong ability of degrading different types of dyes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*. (320). 265–277. Doi: 10.1016 / j.jhazmat.2016.07.065
- [21] Quintero, L.; Cardona, S. 2010. Tecnologías para la decoloración de tintes índigo e índigo carmín. *Dyna rev.fac.nac.minas* vol.77 no.162 Medellín. 371-386 p. ISSN electrónico 2346-2183. ISSN impreso 0012-7353.
- [22] Bedoui, A.; Tigini, V.; Ghedira, K.; Varese, G. C.; Ghedira, L. C. 2015. Evaluación de una eventual ecotoxicidad inducida por efluentes textiles utilizando una batería de biotests. *Environ Sci Pollut Res*. 22 (21): 16700-16708. Doi: 10.1007/s11356-015-4862-3
- [23] Souza, C.R.L.; Peralta-Zamora, P. 2005. Degradação de corantes reativos pelo sistema ferro metálico/peróxido de hidrogênio. *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 2, 226-228. Doi: 10.1590/S0100-40422005000200011.
- [24] Rodrigues, K.; Vidal, C. B.; Barbosa, B., C., A., Pessoa-Wanderley, C., R; Marinho, G. 2010. Viability of the synthetic textile wastewater treatment in a fixed-bed aerobic reactor. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*. 15. 99-106. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/262616562_Viability_of_the_synthetic_textile_wastewater_treatment_in_a_fixed-bed_aerobic_reactor.
- [25] Desenvolvimento de Quimioresistor Baseado em Filme Polimérico de Bismarck Brown Y para Monitoramento de Oxigênio Mitocondrial. São José do Rio Preto, SP. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/180972/oliveira_ao_me_sjrp.pdf?sequence=5&isAllowed=y
- [26] Kiron, M., I. 2011. Introduction of Sulfur Dye | Properties, Classification, Application and Aftertreatment of Sulfur Dye. Disponível em: https://textilelearner.blogspot.com/2011/03/defination-classification-application_4761.html.
- [27] Companhia pernambucana do meio ambiente (CPRH). Roteiro Complementar de Licenciamento e Fiscalização para a Tipologia Têxtil. Recife: CPRH/GTZ. 2001. 125 p. ISBN: 85-86592-09-9. Disponível em: <http://www.cprh.pe.gov.br/downloads/roteiro-textil.pdf>.
- [28] Kiron, M., I. 2011. Introduction of Sulfur Dye | Properties, Classification, Application

and Aftertreatment of Sulfur Dye. Disponível em: https://textilelearner.blogspot.com/2011/03/defination-classification-application_4761.html.

- [29] Lopes, R. P. 2008. *Estudo de processos alternativos para a degradação de compostos de relevância ambiental com monitoramento dos produtos formados por Espectrometria de Massas com Fonte de Ionização Electrospray (ESI-MS)*. 125f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Estudo-de-processos-alternativos-para-a-degrada%C3%A7%C3%A3o-Lopes/bf5d56f4d0c35d157a0215f23cf56493c826fe08>
- [30] Chandel, S.; Akhtar, R.; Sarota, p.; Medhi, B. 2015. Status of Colorectal Cancer Devices: Present Scenario. *J. Gastrointest Canc.* 46: 91-103. Doi: 10.1007 / s12029-015-9686-3
- [31] Naciri, N., et al. 2016. Effective photocatalytic decolorization of indigo carmine dye in Moroccan natural phosphate-TiO₂ aqueous suspensions. *Optical Materials*. 38-43. Doi: 10.1016 / j.optmat.2015.12.011
- [32] Hasanbeigi, A., Price, L. 2015. A technical review of emerging technologies for energy and water efficiency and pollution reduction in the textile industry. *Journal of Cleaner Production*. Berkeley, v.95, p.30-44. Doi: 10.1016/j.jclepro.2015.02.079.
- [33] APHA, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC.
- [34] Scott, A. 2015. Cutting out textile pollution. *American Chemical Society* v.93, p.18–19. Disponível em: <http://cen.acs.org/articles/93/i41/Cutting-Textile-Pollution.html>.
- [35] BRASIL, Ministério do Meio Ambiente (MMA), 2005. *Resolução CONAMA 357*. Dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais. Brasília: 2005.
- [36] Raman, Devi; Kanmani S. 2016. Textile dye degradation using nano zero valent iron: A review. *Journal of Environmental Management*. Tamil Nadu, v.177, p.341-355. Doi: 10.1016/j.jenvman.2016.04.034.
- [37] Chhabra, M., Mishra, S., Sreekrishnan, T.R. 2015. Combination of chemical and enzymatic treatment for eficiente decolorization/degradation of textile effluent: High operational stability of the continuous process. *Biochemical Engineering Journal Rajasthan*, v.93, p.17–24. Doi: 10.1016/j.bej.2014.09.007
- [38] Zaharia, C., Suteut, D., Muresan, A., Muresan, R., Popescu, Alina. 2009. Textile wastewater treatment by homogeneous oxidation with hydrogen peroxide. *Environ. Eng. Manag. J. Lasi*, v.8, n.06, p.1359–1369. Doi: 10.30638 / eemj.2009.199
- [39] Chen, B. Y., et al. 2006. Exploring bioaugmentation strategies for azo-dyes decolorization using a mixed consortium of *Pseudomonas luteola* and *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*. 1574-1581. Doi: 10.1016 / j.procbio.2006.03.004
- [40] Bilal, M., Asgher, M., Parra-Saldivar, R., Hu, H., Wang, W., Zhang, X., Iqbal, H.M.N., 2017. Immobilized ligninolytic enzymes: an innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants—a review. *Sci. Total Environ.* 576, 646–659. Doi: 10.1016 / j.scitotenv.2016.10.137
- [41] Esposito, E.; Azevedo, J. L. 2004. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Ed. EDUCS, 520p. ISBN: 978-85-7061-562-6. Disponível em:

<https://repositorio.usp.br/item/001458671>

- [42] Rezaei, S., Tahmasbi, H., Mogharabi, M., Firuzyar, S., Ameri, A., Khoshayand, M.R., Faramarzi, Ali, M. 2015. Efficient decolorization and detoxification of reactive orange 7 using laccase isolated from *Paraconiothyrium variabile*, kinetics and energetics. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. Tehran, v.000, p.1–9. Doi: 10.1016/j.jtice.2015.04.008.
- [43] Kues, U. 2015. Fungal enzymes for environmental management. *Current Opinion in Biotechnology* Gottinga, v.33, p.268–278. Doi: 10.1016/j.copbio.2015.03.006.
- [44] Machado, Kátia M.G., Compart, Luciana C.A., Morais, Rúbio O., Rosa, Luiz H., Santos, Mércia H. 2006. Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from brazilian ecosystems. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.37, p.481-487. Doi: 10.1590/S1517-83822006000400015.
- [45] Shen, N.; Huo, Y. C.; Chen, J. J. ; Zhang, F., Zheng, H., Zeng, R. J. 2015. Decolorization by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* with dissolved hydrogen under extreme thermophilic conditions. *Chem. Eng. J.* 262, 847-853. Doi: 10.1016/j.cej.2014.10.053.
- [46] Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N.S., Hofrichter, M. & Rogalski, J. 1999. Biodegradation of lignin by white-rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 27: 175-185. Doi: 10.1006/fgbi.1999.1150
- [47] Shan, V. & Nerud, F. 2002. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. *Can. J. Microbiol.* 48: 857-870. Doi: 10.1139 / w02-090
- [48] Cantarella, G., Galli, C. & Gentili, P. 2003. Free radical *versus* electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems: Catalytic or stoichiometric procedures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 22: 135-144. Doi: 10.1016/S1381-1177(03)00014-6
- [49] Saroj, S., et al. 2015. Evaluation of the efficacy of a fungal consortium for degradation of azo dyes and simulated textile dye effluents. *Sustain Water Resour Manag.* 233-243. Doi: 10.1007/s40899-015-0027-2
- [50] Osorio, J.; Vidal, I.; Quintero, D. 2011. Decolorization of textile wastewater using the white rot fungi anamorph R1 of *Bjerkandera* sp. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia* N.º 57 pp. 85-93. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/262752809_Decolorization_of_textile_wastewater_using_the_white_rot_fungi_anamorph_R1_of_Bjerkandera_sp
- [51] Bergsten, T. L. R.; Giese, E. C.; Da Silva, M. 2018. Descoloração de efluente têxtil por fungo em condições não estéreis. Doi: 10.5151/cobeq2018-PT.0425
- [52] He, X. L.; Song, C.; Li, Y. Y.; Wang, N., Xu, I.; Han, E.; Wei, D. S. 2018. Efficient degradation of Azo dyes by a newly isolated fungus *Trichoderma Tomentosum* under non-sterile conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 150, 232 – 239. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.12.043
- [53] Enzyme Nomenclature. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). In consultation with the IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Disponível em: <http://www.sbc.sqmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
- [54] Chávez-Sifontes, M.; Domine, M. E. 2013. Lignina, estructura y aplicaciones: métodos

de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en ciencias e ingeniería*, - ISSN: 0718-8706. v. 4, 15–46. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/3236/323629266003.pdf>

- [55] Babu, S. Satheesh; Mohandass, C.; Vijayaraj, A.S.; Dhale, Mohan A. 2015. Detoxification and color removal of Congo red by a novel *Dietzia* sp. (DTS26) – A microcosm approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Dona Paula, v.114, p.52–60. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.01.002.
- [56] Lu, R., Ma, L., He, F., Yu, D. Fan, R., Zhang, Y., Long, Z., Zhang, X., Yang, Y. 2016. White-rot fungus *Ganoderma* sp.En3 had a strong ability to decolorize and tolerate the anthraquinone, indigo and triphenylmethane dye with high concentrations. *Bioprocess Biosyst Eng*. Heidelberg, v.39, p.381–390. Doi: 10.1007 / s00449-015-1521-5
- [57] Niebisch, C. H., et al. 2010. Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract. *Journal of Hazardous Materials*. 316-322. Doi: 10.1016 / j.jhazmat.2010.04.033
- [58] Dashtban, M., et al. 2010. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int J Biochem Mol Biol*. 36-50. PMID: 21968746
- [59] Rivera-Hoyos, C.; Morales-Álvarez, E.; Poutou-Piñales, R.; Pedroza-Rodríguez, A.; Rodríguez Vazquez, R.; Delgad-Boada, J. 2013. Fungal Laccases. *Fungal Biology Reviews*. 27. 67–82. Doi: 10.1016/j.fbr.2013.07.001.
- [60] Kalme, S.; Jadhav, S.; Jadhav-Chakankar, M.; Govindwar, S. 2009. Textile dye degrading laccase from *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112. *Enzyme and Microbial Technology*. 65-71. Doi: 10.1016/j.enzmtec.2008.10.005.
- [61] Wong, D. W. 2009. Structure and action mechanism of Ligninolytic enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*. 174-209. Doi: 10.1007 / s12010-008-8279-z
- [62] Gianfreda, D., XU, F., Bollag, J-M. 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* v.3 (1), p. 1-25. Doi: 10.1080/10889869991219163
- [63] Carvalho, M.A. 2011. Atividades de ligninases e celulases de linhagens de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler em diferentes meios de cultivo, MG. 74p: dissertação (mestrado), Universidade Federal de Lavras. Disponível em: http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/1654/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_A%20atividade%20de%20ligninases%20e%20celulases%20de%20linhagens%20de%20Lentinula%20edodes%20%28Berk.%29%20Pegler%20em%20diferentes%20meios%20de%20cultivo.pdf
- [64] Faria, R.A. 2010. Estudos da produção de enzimas lignolíticas por *Ceriporiopsis subvermispota*, Dissertação (mestrado) Escola de engenharia de Lorena Da Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97132/tde-25102012-133856/publico/BID10007.pdf>
- [65] Shah, Vishal & Nerud, Frantisek. (2002). Lignin degrading system of white rot fungi and its exploitation of dye decolorization. *Canadian journal of microbiology*. 48. 857-70. Doi: 10.1139/w02-090.
- [66] Coelho, G.D. 2007. Purificação parcial do sistema enzimático produzido por *Psilocybe castanella* CCB444 durante crescimento em solo. Tese (doutorado), instituto de

- botânica da secretaria do meio ambiente, São Paulo. Disponível em: http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/teses/2007/Pdf/Glauciane_Danusa_Coelho_DR.pdf
- [67] Baldrian, P.; Valášková, V., Merhautová, V. & Gabriel, J. 2005. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Research in Microbiology*. 156 (5-6): 670-676. Doi: 10.1016/j.resmic.2005.03.007
- [68] Hofer, C.; Schlosser, D. 1999. Novel enzymatic oxidation of Mn^{2+} to Mn^{3+} catalyzed by a fungal laccase. *FEBS Letters*. 451: 186-190. Doi: 10.1016 / s0014-5793 (99) 00566-9
- [69] Johannes, C.; Majcherczyk, A. 2000. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology*. 78: 193-199. Doi: 10.1016 / s0168-1656 (00) 00208-x
- [70] Solís-Oba, M.; Ugalde-Saldivar, V.M.; Gonzalez, I.; Viniegra-Gonzalez, G. 2005. An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 579: 59-66. Doi: 10.1016 / j.jelechem.2005.01.025
- [72] Tien, M. & Kirk, T.K. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H_2O_2 -requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Science*. 81: 2280-2284. Doi: 10.1073 / pnas.81.8.2280
- [73] Rothschild, N.; Novotný, C.; Šašek, V.; Dosoretz, C.G. 2002. Ligninolytic enzymes of the fungus *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*): isolation and characterization of lignin peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology*. 31: 627-633. Doi: 10.1016/S0141-0229(02)00171-0
- [74] Teunissen, P. J. M., Field, J. A. 1998. 2-Chloro-1,4-dimethoxybenzene as a mediator of lignin peroxidase catalyzed oxidations. *FEBS Letters*, 439(3), 219-223. Doi: 10.1016/S0014-5793(98)01386-6
- [75] Johjima, T., Itoh, N., Kabuto, M., Tokimura, F., Nakagawa, T., Wariishi, H. & Tanaka, H. 1999. Direct interaction of lignin and lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry*. 96(5): 1989-1994. Doi: 10.1073/pnas.96.5.1989
- [76] Poulos, T. L., et al. 1993. Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. *The Journal of Biological Chemistry*. 4429-4440. Doi: 10.2210 / pdb1lga / pdb
- [77] Moreira, N. S. L. 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno / Sérgio Luiz Moreira Neto -- São Paulo, 2006. 110 p. il. Disponível em: http://arquivos.ambiente.sp.gov.br/pgibt/2013/10/Sergio_Luiz_Moreira_Neto_MS.pdf
- [78] Sundaramoorthy, M., et al. 2005. High-resolution crystal structure of manganese peroxidase: Substrate and inhibitor complexes. *Biochemistry*. 6463-6470. Doi: 10.1021 / bi047318e
- [79] Hofrichter M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 454-466. Doi: 10.1016/S0141-0229(01)00528-2
- [80] Gold, M.H. & Alic, M. 1993. Molecular Biology of the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological Reviews*. 57 (3) 605-622. PMID: 8246842. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372928/>

- [81] Almeida, R. 2010. Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por *Ceriporiopsis subvermispora*. Universidade de São Paulo. Brasil. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97132/tde-25102012-133856/publico/BID10007.pdf>
- [82] Rio, G. F.; Silva, B. V.; Martinez, S. T.; Pinto, A. C. 2015. Anthranilic acids from isatin: an efficient, versatile and environmentally friendly method. *An. Acad. Bras. Ciênc.* vol.87 no.3. doi: 10.1590/0001-3765201520140289
- [83] Campos, R., Kandelbauer, A., Robra, K.H.A., Cavaco-Paulo, A., Gübitz, G.M. 2001. Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *J Biotechnol.* Guimaraes, v.89, p.131–139. Doi: 10.1016/S0168-1656(01)00303-0.
- [84] Buswell, J. A., Cai, Y., Chang, S. T. 1995. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula* (*Lentinus*) *edodes*. *FEMS microbiology letters*, 128(1), 81-87. Doi: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07504.x
- [85] Ben Younes, S., & Sayadi, S. (2013). *Detoxification of Indigo carmine using a combined treatment via a novel trimeric thermostable laccase and microbial consortium. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 87, 62–68. Doi:10.1016/j.molcatb.2012.10.007
- [86] Singh, G., Capalash, N., Goel, R., & Sharma, P. (2007). *A pH-stable laccase from alkali-tolerant γ -proteobacterium JB: Purification, characterization and indigo carmine degradation. Enzyme and Microbial Technology*, 41(6-7), 794–799. Doi:10.1016/j.enzmictec.2007.07.001
- [87] Sánchez, R. J.; Martínez, H. J. L.; Segura, C. E. P.; Contreras, E. J. C.; Medina, M. M. A.; Aguilar, C. N.; Iliná, A. 2014. Immobilization of lignocellulolytic enzymes in magnetic nanoparticles. *Quim. Nova*, Vol. 37, No. 3, 504-512. Doi: 10.5935/0100-4042.20140085
- [88] Pacheco, S. M. V.; Soares, C., H., L. 2014. Immobilization and characterization of laccase and its use in the biodegradation of paper mill effluent. *Quim. Nova*, Vol. 37, No. 2, 209-214. Doi: 10.5935/0100-4042.20140036
- [89] Comerlato, M.H. 1995. Imobilização de enzimas no suporte crisotila, Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/250465/1/Comerlato_MariaHelena_D.pdf
- [90] Mendes A. A.; Oliveira, P.C.; Castro, H. F.; Giordano, R. L. C. 2011. Application of chitosan as support for immobilization of enzymes of industrial interest. *Quim. Nova* 34, 831. Doi: 10.1590/S0100-40422011000500019
- [91] Salazar-Leyva, J. A.; Lizardi-Mendoza, J.; Ramírez-Suarez, J. C.; García-Sánchez, G.; Ezquerra-Brauer, J. M.; Valenzuela-Soto, E. M.; Carvallo-Ruiz, M. G.; Lugo-Sánchez, M. E.; Pacheco-Aguilar, R. 2014. Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en su estabilización y aplicaciones. *Rev. Mex. Ing. Quím* vol.13 no.1 129-150. Disponível em: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382014000100011&lng=es&nrm=iso
- [92] Tharanathan, R. N; Kittur, F. S. Chitin--the undisputed biomolecule of great potential. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2003, 43 (1): 61-87. Doi: 10.1080/10408690390826455

- [93] Salazar, M. J. C. Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana-gelatina e quitosana-colágeno visando a liberação de fármacos. Tese (doutorado) Instituto de Química de São Carlos, SP, Brasil. Doi: 10.11606/D.75.2015.tde-22052015-092217
- [94] Escobar, S. D. M.; Castro, R., A., M.; Vergara, C., N., A. 2014. Determining the Relation between the Proportion of the Amino Group and the Degree of Deacetylation of Chitosan. *rev. cienc.*, vol.18, n.1, pp.73-88. ISSN 0121-1935. Disponível em: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0121-19352014000100006
- [95] Hernández-Cocoletzi, H.; Aguila, E.; Agustin, O.; Nava, E.L.; Cassellis, E. 2009. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y vacío*. 22. 57-60. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/260992204_Obtencion_y_caracterizacion_de_quitosano_a_partir_de_exoesqueletos_de_camaron/citation/download
- [96] Hirano, S. (1999). Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International*, 48, 732-734. Doi: 10.1002/(SICI)1097-0126(199908)48:8<732::AID-PI211>3.0.CO;2-U
- [97] Vongchan, P., Sajomsang, W., Subyen, D. y Kongtawelert, P. (2003). Anticouagulant activities of the chitosan polysulfate synthesized from marine crab by semi heterogeneous conditions. *Science Asia*, 29, 115-120. Doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2003.29.115
- [98] Shahidi, F., Kamil, J. y Jeon, Y. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 37-51. Doi: 10.1016/S0924-2244(99)00017-5
- [99] Khor, E. (2001). Chitin: fulfilling a biomaterials promise. Elsevier, p. 136. Hardcover ISBN: 9780080440187, eBook ISBN: 9780080529127. Disponível em: <https://www.elsevier.com/books/chitin-fulfilling-a-biomaterials-promise/khor/978-0-08-044018-7>
- [100] Torrado, S., Prada, P. y De la Torre, P. (2004). Chitosan-poly(acrylic) acid polyionic complex: in vivo study to demonstrate prolonged gastric retention. *Biomaterials*, 25, 917-923. Doi: 10.1016 / s0142-9612 (03) 00579-9
- [101] Kato, Y., Onishi, H. y Machida, Y. (2004). N-succinyl-chitosan as a drug carrier: water-insoluble and water-soluble conjugates. *Biomaterials*, 25, 907-915. Doi: 10.1016 / s0142-9612 (03) 00598-2
- [102] Lucena, G., L.; Da Silva, A., G.; Castro, L., M., H.; Dias, V., S. 2014. Remoção de corantes têxteis a partir de soluções aquosas por quitosana modificada com tioacetamida. *Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*: v. 8, n.1, 2013. Doi:10.4136/1980-993x
- [103] Ramirez, C.; Delgado, E.; Andrade, A. 2016. Determinación del grado de desacetilación de quitosana mediante titulación potenciométrica, FTIR y Raman. *Journal CIM*. Vol. 4. Num. 1. pp. 769-776. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/309493340_Determinacion_del_grado_de_desacetilacion_de_quitosana_mediante_titulacion_potenciometrica_FTIR_y_Raman
- [104] Horn, M. M. 2008. Obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno aniônico. Universidade de São Paulo. Instituto de química de São Carlos, SP, Brasil. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde-18042008->

164504/publico/MariliaMHornR.pdf

- [105] Santacruz, V. V.; Santacruz, C. V.; Laguna, J. O. C. 2013. Diseño de un jugo mínimamente procesado adicionado con micro y nanocápsulas de ácido fólico y su uso como vehículo para la ingesta en ratas wistar. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12, 177-191. Disponible em: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382013000200001
- [106] Hornyak, G. L.; Tibbals, H. F.; Dutta, J.; Moore, J. J. 2009. *Introduction to Nanoscience & Nanotechnology*. New York: CRC, 1593 p. ISBN 9781420047790 - CAT # 47795. Disponible em: <https://www.crcpress.com/Introduction-to-Nanoscience-and-Nanotechnology/Hornyak-Tibbals-Dutta-Moore/p/book/9781420047790>
- [107] Ansari, S. A.; Husain, Q. 2012. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology Advances*, 30:512-523. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.005
- [108] Kimura, I.; Gonçalves, A. C.; Stolberg, J.; Laranjeira, M. C. M.; de Fávère, V. T. 1999. Efeito do pH e do Tempo de Contato na Adsorção de Corantes Reativos por Microesferas de Quitosana. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* - Jul/Set – 99. Disponible em: <http://www.scielo.br/pdf/po/v9n3/6170.pdf>
- [109] Araújo, L. L. 2013. Nanopartículas de quitosana/tripolifosfato de sódio obtidas via gelatinização iônica para a nanoencapsulação de quercetina. *Dissertação (mestrado)* Brasília, DF, Brasil. Disponible em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/17210>
- [110] Calvo, P.; Remuñán, C.C.; Vila, J. L. J.; Alonso, M. J. Novel Hydrophilic Chitosan–Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63:125–132, 1997. Doi: 10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4
- [111] Garrett, R. H.; Grisham, C. M. 2010. *Biochemistry*. Belmont, CA: Brooks/Cole, Cengage Learning. Sexta edição. Disponible em: [https://gtu.ge/Agro-Lib/Reginald%20H.%20Garrett,%20Charles%20M.%20Grisham%20-%20Biochemistry%20\(4th%20ed.\)%20-%202010.pdf](https://gtu.ge/Agro-Lib/Reginald%20H.%20Garrett,%20Charles%20M.%20Grisham%20-%20Biochemistry%20(4th%20ed.)%20-%202010.pdf)
- [112] Flores, C. 2014. Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina. Tese (Doutorado) Doi: 10.35537/10915/34946
- [113] Aguilar, M. 2009. Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre *Colletotrichum gloesporioides*. Instituto Politécnico Nacional. Tese (Doutorado) Instituto Politécnico Nacional. México. Disponible em: https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/10801/1/PTA_D_20090630_001.PDF
- [114] Cuadros-Moreno, A., Casañas, R., San Martín, E., Fernández, J. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Lat. Am. J. Phys. Educ.* Vol. 8, No. 4. Disponible em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5195884>
- [115] Guzmán, C. (2015). Nanopartículas de plata para su uso como agente antibacteriano. Instituto de Química Biológica. Universidad de la República (Uruguay). Disponible em: <https://hdl.handle.net/20.500.12008/8416>

- [116] Barrera, N.; Guerrero, L. 2017. Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata y de nanocompuestos poliméricos, para la creación de un dispositivo antibacterial obtenido mediante printrónica, evaluado en *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Ecuador. Disponible em: <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/13405/T-ESPE-057359.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [117] Zeta-Meter Inc. 2012. Potencial Zeta: Un Curso Completo en 5 Minutos. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Disponible em: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/PotencialZeta_1246.pdf
- [118] Cordeiro, S. L. J.; Barrier, J.; Grimaldi, M., de Castro, S. S. 2003. The use scanning electron microscopy (sem) to recognition of clay coatings. Boletim Paranaense de Geociências, n. 53, p. 35-43. Editora UFPR. Doi: 10.1016 / j.carres.2010.05.005
- [119] Goldstein, J. K.; Yakowitz, H. 1975. Practical scanning electron microscopy: Electron and ion microprobe analysis (p. 582). New York: Plenum Press. Doi: 10.1007/978-1-4613-4422-3
- [120] Goldstein, J. I.; Newbury, D. E.; Echlin, P.; Joy, D. C. 1992. Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis (2nd ed.). New York: Plenum Press. Doi: 10.1007/978-1-4613-0491-3
- [121] Brabazon, D.; Raffer, A. 2010. Advanced characterization techniques for nanostructures. In W. Ahmed & M. J. Jackson (Eds.), Emerging nanotechnologies for manufacturing (pp. 59–91). Boston: William Andrew Publishing. Hardcover ISBN: 9780323289900, eBook ISBN: 9780323296434. Disponible em: <https://www.elsevier.com/books/emerging-nanotechnologies-for-manufacturing/ahmed/978-0-323-28990-0>
- [122] McMahon, G. 2007. Analytical instrumentation: A guide to laboratory, portable and miniaturized instruments (1st ed.p. 296). Chichester: Wiley. ISBN: 978-0-470-02795-0. Disponible em: <https://www.wiley.com/en-br/Analytical+Instrumentation:+A+Guide+to+Laboratory,+Portable+and+Miniaturized+Instruments-p-9780470027950>
- [123] Akhtar, K.; Khan, S.; Khan, S.; Asiri, A. M. 2019. Scanning Electron Microscopy: Principle and Applications in Nanomaterials Characterization. Doi: 10.1007/978-3-319-92955-2_4.
- [124] Sullivan, L. A. 1997. Recognition of depositional clay coatings using scanning electron microscopy. In: International working meeting on soil micromorphology, 10., 1997, Moscow–Wageningen. p.155-166.
- [125] Bartolomé-Camacho, M.; Sánchez-Fortún, S. 2007. Valoración de la toxicidad aguda de biocidas utilizados en ambientes de la vida privada y la salud pública sobre *Artemia franciscana*. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales, 3 (1): 90-97 2007. Disponible em: <https://pdfs.semanticscholar.org/c016/456ebe1feac4ce45508aa6d8384bbdf77914.pdf>
- [126] FAO. Genetic resources for microorganisms of current and potential use in aquaculture. Ninth Session. 2017. Disponible em: <http://www.fao.org/fishery/static/aqgenres/TBSAqGRMicroorganisms.pdf>
- [127] Persoone, G.; Van de Vell A.; Van Steetegem, M.; Nayer, B. 1989: Predictive value for laboratory tests with aquatic invertebrates: Influence of experimental condition.

- Aquatic Toxicology, 14: 149 – 166. Doi: 10.1016/0166-445X(89)90025-8
- [128] López, P. (1997). Artemia, Alimento de Peces... y Humanos. Ciencia y Mar. Pág. 49-51.
- [129] Castro, J.; Castro, T.; Arredondo, J.; Hernández, L.; Castro, G.; De Lara, R.; Monroy, M. 2009. La salinidad y su efecto en la reproducción del crustáceo Artemia sp. *Contacts*, 73: 5-15. Disponible en: <http://www2.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n73ne/artemia.pdf>
- [130] Rojo, N.; Smith, K.; Perales, J.; Mayer, P. 2012. Recreating the seawater mixture composition of HOCs in toxicity tests with Artemia franciscana by passive dosing. *Aquat Toxicol.* 15;120-121:27-34. Doi: 10.1016 / j.aquatox.2012.04.006
- [131] Hadjispyrou, S., Kungolos, A., Anagnostopoulos, A. (2001). Toxicity, bioaccumulation, and interactive effects of organotin, cadmium, and chromium on Artemia franciscana. *Ecotoxicol Environ Saf.* 49(2):179-86. Doi: 10.1006 / eesa.2001.2059
- [132] Blust, R.; Fontaine, A.; Decler, W. (1991). Effect of hydrogen ions and inorganic complexing on the uptake of copper by the brine shrimp Artemia franciscana. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 76: 273-282. Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/24825587?seq=1>
- [133] Bergami, E., Bocci, E., Vannuccini, L., Monopoli, M., Salvati, A., Dawson, K. y Coris, I. (2016). Nano-sized polystyrene affects feeding, behavior and physiology of brine shrimp Artemia franciscana larvae. *Ecotoxicol Environ Saf.* Vol. 123. Pág. 18-25. Doi: 10.1016 / j.ecoenv.2015.09.021
- [134] Naser, M. N.; Hasan, R.; Nipa, S.A.; Rashid, H. 2016. The Prospect and Feasibility Assessment of Brine Shrimp (*Artemia franciscana*) Culture in Bangladesh. *Journal of Environmental Science and Engineering.* 5; 261-267. Doi:10.17265/2162-5263/2016.05.007
- [135] Velasco, S. J.; Retana, O.; Castro, M. J.; Castro, M. G.; Monroy, M.; Ocampo, C.; Cruz, C.; Becerril, C. 2016. Salinity effect on reproductive potential of four Artemia franciscana (Kellogg, 1906) Mexican populations grown in laboratory. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies.* 4 (3); 247-352. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/303114960_Salinity_effect_on_reproductive_potential_of_four_Artemia_franciscana_Kellogg_1906_Mexican_populations_grown_in_laboratory
- [136] Pimentel, M.; Silva, F.; Santaella, S.; Lotufo, L. 2010. O Uso de Artemia sp. como Organismo-Teste para Avaliação da Toxicidade das Águas Residuárias do Beneficiamento da Castanha de Caju Antes e Após Tratamento em Reator Biológico Experimental. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol*, Vol. 6, No. 1. Pág. 15-22. Doi: 10.5132/jbse.2011.01.003
- [137] Sánchez, L.; Neira, A. 2005. Bioensayo general de letalidad en Artemia salina, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava*. L y *Psidium guineense*. *Sw. Cultura Científica.* Pág. 240-45. Disponible en: https://www.jdc.edu.co/revistas/index.php/Cult_cient/article/view/469
- [138] Armelin, E. 2002. Síntesis y Caracterización de nuevas poliesteramidas: Estudio de sus propiedades, Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona, España. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10803/6425>
- [139] Pérez, A. 2014. Sugarcane bagasse cellulose acetate: plasticizing and evaluation of

- properties. *Ciencias Holguín*, Vol. 20, No. 1. Disponível em: <http://www.ciencias.holguin.cu/index.php/cienciasholguin/article/view/818/858>
- [140] Hadjispyrou, S.; Kungolos, A.; Anagnostopoulos, A. 2001. Toxicity, bioaccumulation, and interactive effects of organotin, cadmium, and chromium on *Artemia franciscana*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2001; 49 (2); 179± 186. Doi: 10.1006/eesa.2001.2059
- [141] Bergami, E.; Bocci, E.; Vannuccini, L.; Monopoli, M.; Salvati, A.; Dawson, K.; Coris, I. 2016. Nano-sized polystyrene affects feeding, behavior and physiology of brine shrimp *Artemia franciscana* larvae. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2016; 123; 18±25. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.09.021
- [142] Rajabi, S.; Ramazani, A.; Hamidi, M.; Naji, T. 2015. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences.* 23 (20). Doi: 10.1186 / s40199-015-0105-x
- [143] Bergami, E.; Pugnali, S.; Vannuccini, M. L.; Manfra, L.; Faleri, C.; Savorelli, F. 2017. Long-term toxicity of surface- charged polystyrene nanoplastics to marine planktonic species *Dunaliella tertiolecta* and *Artemia franciscana*. *Aquatic Toxicology.* 189; 159±169. Doi: 10.1016/j.aquatox.2017.06.008
- [144] Lapizco, B. 2008. Aplicaciones de microfluídica en bioseparaciones / Microfluidics applications in bioseparations. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol. 7, No. 3. Pág. 205-214. Disponível em: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382008000300004
- [145] Fernández, D. 2011. Microfluidos: nuevas fronteras. *Revista Cubana de Física*, Vol. 28, No. 1. Pág. 61-68. Disponível em: <https://research.utwente.nl/en/publications/microfluidos-nuevas-fronteras>
- [146] Derby, B. 2010. Inkjet Printing of Functional and Structural Materials: Fluid Property Requirements, Feature Stability, and Resolution. *Annual Review of Materials Research*, v. 40, p. 395-414. Doi: 10.1146/annurev-matsci-070909-104502
- [147] Souza, F. 2015. Dispositivos imprimíveis por tecnologia “drop-on-demand” de materiais fluidos funcionais: de nanotubos de carbono a complexos para dosímetros uv pessoais. Monografia de conclusão de curso. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.
- [148] Alper, J. 2004. Bioengineering. Biology and the inkjets. *Science*, 305, 1895–1895. Doi: 10.1126/science.305.5692.1895
- [149] Calvert, P. 2007. Materials science. Printing cells. *Science*, 318, 208–209. Doi: 10.1126/science.1144212
- [150] Mironov, V.; Reis, N.; Derby, B. 2006. Review: bioprinting: a beginning. *Tissue Eng.*, 12, 631–634. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16674278>
- [151] Setti, L.; Fraleoni-Morgera, A.; Ballarin, B.; Filippini, A.; Frascaro, D.; Piana C. 2005. An amperometric glucose biosensor prototype fabricated by thermal inkjet printing. *Biosens. Bioelectron.*, 20, 2019–2026. Doi: 10.1016/j.bios.2004.09.022.
- [152] De Gans, B. J.; Duineveld, P. C.; Schubert, U. S. 2004. Inkjet printing of polymers : state of the art and future developments. *Adv. Mater.* 16, 203–213. Doi: 10.1002/adma.200300385

- [153] Blanchard, A. P.; Kaiser, R. J.; Hood, L. E. 1996. High-density oligonucleotide arrays. *Biosens. Bioelectron.* 11, 687. Doi: 10.1016/0956-5663(96)83302-1
- [154] Okamoto, T.; Suzuki, T.; Yamamoto, N. 2000. Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using bubble jet technology. *Nat. Biotechnol.* 18, 438. Doi: 10.1038/74507
- [155] Goldmann, T.; Gonzalez, J. S. 2000. DNA-printing: utilization of a standard inkjet printer for the transfer of nucleic acids to solid supports. *Biochem. Biophys. Methods* 2000, 42. 105-110. Doi: 10.1016/S0165-022X(99)00049-4
- [156] Allain, L. R.; Askari, M.; Stokes, D. L.; Vo-Dinh, T. 2001. Microarray sampling-platform fabrication using bubble-jet technology for a biochip system. *Anal. Chem.* 371, 146. Doi: 10.1007/s002160100962
- [157] Derby, B. 2008. Bioprinting: Inkjet Printing Proteins and Hybrid Cell-Containing Materials and Structures. *Journal of Materials Chemistry.* 18. 5717-5721. Doi: 10.1039/B807560C
- [158] Dimatix Materials Printer. 2010. FUJIFILM Dimatix Materials Printer, DMP-2800 Series, User Manual. Doc. # PM000040 Rev. 05 Disponível em: <https://www.manualslib.com/manual/1238531/Dimatix-Dmp-2800-Series.html>
- [159] Souza, E. S. 2019. Desenvolvimento de filmes compósitos para aplicação antibacteriana bioinspirados na superfície super-hidrofóbica de plantas. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Pernambuco. Recife. Brasil. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/35473>
- [160] Martín, I.; Salcedo, R.; Font, R. (2011). Mecánica de fluidos, Tema1. Flujo interno de fluidos incompresibles y compresibles. Universidad de Alicante, Alicante, España. Disponível em: https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/20299/1/tema1_Flujo%20interno.pdf
- [161] Nishioka, G. M.; Markey, A. A.; Holloway, C. K. 2004. Protein damage in drop-on-demand printers. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 16320–16321. Doi: 10.1021/ja044539z
- [162] Reis, N.; Derby, B. 2000. Ink jet deposition of ceramic suspensions: modelling and experiments of droplet formation. *MRS Symp. Proc.* 624:65–70. Disponível em: <https://www.tib.eu/de/suchen/id/BLCP%3ACN038408574/Ink-Jet-Deposition-of-Ceramic-Suspensions-Modeling/>
- [163] Derby, B. 2015. Additive Manufacture of Ceramics Components by Inkjet Printing. *Engineering*, volume 1, Issue 1, March, Pages 113-123. Doi: 10.15302/J-ENG-2015014
- [164] Habbott, S. 2019. Practical Formulation Science for Particle-Based Inks. *Colloids Interfaces* 2019, 3, 23; Doi: 10.3390/colloids3010023
- [165] Di Risio, S.; Yan, N. 2007. Piezoelectric Ink-Jet Printing of Horseradish Peroxidase: Effect of Ink Viscosity Modifiers on Activity. *Macromol. Rapid Commun.* 28, 1934–1940. Doi: 10.1002/marc.200700226
- [166] Moraes, C. S.; Oliveira, F. O.; Masson, G.; Rebello, K. M.; Santos, L. O.; Bastos, N. F.; Faria, R. C. 2013. Métodos experimentais no estudo de proteínas (Série em biologia celular e molecular). Rio de Janeiro: IOC, 84 p. Disponível em: http://www.fiocruz.br/ioc/media/apostila_volume_1.pdf
- [167] Viera, D. M. 2008. Estudos cinéticos em reacções de hidrólise enzimática de proteínas

- acelerada por ultrasons. Dissertação (mestrado). Universidade Nova de Lisboa. Brasil Disponível em: https://run.unl.pt/bitstream/10362/13884/1/Vieira_2008.pdf
- [168] Boudehane, N. 2015. Adopting a Student-centered Approach through Cooperative Learning to Enhance Students' Writing Skill: The Case of Second Year Students. Dissertação (mestrado). University Des Frères Mentouri. Constantine. Disponível em: <https://bu.umc.edu.dz/theses/anglais/BOU1396.pdf>
- [169] Compton, S. J.; Jones, C. G. 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, 151(2), 369–374. Doi: 10.1016/0003-2697(85)90190-3
- [170] Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248. Doi: 10.1006/abio.1976.9999
- [171] Poli, M. A. C.; Bortoleitto, F, P.; Do Carmo, C. M. 2008. Evaluation of spectrophotometric methods for protein determination in waste stabilization ponds sample. *Eng. sanit. Ambient.* Vol.13 - Nº 2 - 236-242. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/esa/v13n2/a14v13n2.pdf>
- [172] Clesceri, L. S.; Greenberg, A. E.; Eaton, A. D. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater / prepared and published jointly by American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation; joint editorial board, 20th ed, joint editorial board. Disponível em: <https://trove.nla.gov.au/version/38126605>
- [173] Borroto J, Trujillo R, de la Torre C, Waksman N, Hernaández M, Salazar-Aranda, R. 2011. Antimicrobial action and toxicity against *Artemia salina* of the dichlormethane extract from *Morinda royoc* L. roots. *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 16(1); 34±42. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/288116452_Antimicrobial_action_and_toxicity_against_artemia_salina_of_the_dichlormethane_extract_from_Morinda_royoc_L_roots
- [174] Barrera, N.; Guerrero, L.; Debut, A.; Santa-Cruz, P. 2018. Printable nanocomposites of polymers and silver nanoparticles for antibacterial devices produced by DoD technology. *PLoS ONE* 13(7): e0200918. Doi: 10.1371/journal.pone.0200918
- [175] Góes-Neto, A.; Loguerio-Leite, C.; Guerrero, R.T. 2005. DNA Extraction from frozen field-collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas* 18(2): 19-32. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/26409839_DNA_extraction_from_frozen_field-collected_and_dehydrated_herbarium_fungal_basidiomata_Performance_of_SDS_and_CTAB-based_methods
- [176] Almeida, A. 2015. Estudo da imobilização da lacase em nanopartículas magnéticas e sua aplicação. Dissertação (mestrado). Universidade de Aveiro. Portugal. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/32244714.pdf>
- [177] Kuwahara, M.; Glenn, J. K.; Morgan, M. A.; Gold, M. H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169, 247-250. Doi: 10.1016/0014-5793(84)80327-0
- [178] Lordêlo, C. S. M.; Brito, S. V.; Silva, S. V.; Mitoshi, K. H.; De Vasconcellos-Neto, T. J. R.; Góes-Neto, A.; Bellos, K. M. G. 2014. Production of Manganese Peroxidase by

- Trametes villosa on Unexpensive Substrate and Its Application in the Removal of Lignin from Agricultural Wastes. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2014, 5, 1067-1077. Doi: 10.4236/abb.2014.514122.
- [179] Orozco, K.; Quesada, S. 1995. Determinación de la actividad de la fructosa 1,6 difosfatasa en leucocitos. *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica)*, San José, v. 30, n. 1-2, p. 9-18. Disponível em: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461995000100002&lng=en&nrm=iso.
- [180] Sahagún-Castellanos, J.; Martínez-Garza, A.; Rodríguez-Pérez, J. E. 2008. Problemas y métodos comunes del análisis de experimentos factoriales. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(2): 213-222. Doi: 10.5154/r.rchsh.2007.12.055
- [181] Lotito, A.M., Fratino, U., Bergna, G., Di laconi, C., 2012. Integrated biological and ozone treatment of printing textile wastewater. *Chem. Eng. J.* 195, 261–269. Doi: 10.1016/j.cej.2012.05.006
- [182] Li, Y.C., Chu, C.Y., Wu, S.Y., Tsai, C.Y., Wang, C.C., Hung, C.H., Lin, C.Y., 2012. Feasible pretreatment of textile wastewater for dark fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrog. Energy* 37, 15511–15517. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2012.03.131
- [183] Liang, J., Ning, X., Sun, J., Song, J., Lu, J., Cai, H., Hong, Y. 2018. Toxicity evaluation of textile dyeing effluent and its possible relationship with chemical oxygen demand. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 166, 56–62. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.08.106
- [184] Pizato, E., Lopes, A.C., Rocha, R.D.C., Barbosa, A.M., Cunha, M.A.A., 2016. Caracterização de efluente têxtil e avaliação da capacidade de remoção de cor utilizando o fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. *Eng. Sanit. Ambient*, vol.22, n.5, pp.1027-1035. Doi: 10.1590/S1413-41522017121743.
- [185] Fenzl, N. 1988. Processos Geoquímicos que determinam a composição química das águas naturais. In: Fenzl, N.; Ramos, J. F. (Org.). *Introdução à Hidrogeoquímica*. 1. ed. Belém: Universidade Federal do Pará, 1988. cap. 02. p. 33-46.
- [186] CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. (2009) *Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo - Série de relatórios*. São Paulo: Governo do Estado de São Paulo/Secretaria do Meio Ambiente. 44p.
- [187] CEMA – Concelho Estadual do Meio Ambiente, Paraná (2009). Resolução nº 070/2009. Disponível em: http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/Legislacao_ambiental/Legislacao_estadual/RESOLUCOES/resolucao_cema_70_2009.pdf.
- [188] Ma, K.; Qin, Z.; Zhao, Z.; Zhao, C.; Liang, S. 2016. Toxicity evaluation of wastewater collected at different treatment stages from a pharmaceutical industrial park Wastewater treatment plant. *Chemosphere* 158, 163–170. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.05.052
- [189] Raptis, C. E.; Juraske, R.; Hellweg, S. 2014. Investigating the relationship between toxicity and organic sum-parameters in kraft mill effluents. *Water Res.* 66, 180–189. Doi: 10.1016 / j.watres.2014.08.023
- [190] Zhang, W.; Liu, W.; Zhang, J.; Zhao, H.; Zhang, Y.; Quan, X.; Jin, Y. 2012. Characterisation of acute toxicity, genotoxicity and oxidative stress posed by textile effluent on zebrafish. *Journal of Environmental Sciences*, 24(11) 2019–2027. Doi: 10.1016/s1001-0742(11)61030-9

- [191] Paz, A., Carballo, J., Perez, M.J., Domínguez, J.M. 2017. Biological treatment of model dyes and textile wastewaters. *Chemosphere* 181, 168 e 177. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.04.046
- [192] Kaushik, P.; Malik, A. 2009. Fungal dye decolorization: Recent advances and future potential. *Environment International* 35, 127–141. Doi: 10.1016/j.envint.2008.05.010
- [193] Kirk, T. K.; Farrel, R. L. 1987. Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*. 41: 465-505. Doi: 10.1146 / annurev.mi.41.100187.002341
- [194] Vares, T.; Kalsi, M. ; Hatakka, A. 1995. Lignin peroxidase, manganese peroxidase, and others ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (10): 3515-3520. PMID: 16535139. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1388701/>
- [195] Mayer, A. M.; Staples, R. C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. 60 (6): 551-565. Doi: 10.1016/s0031-9422(02)00171-1
- [196] Sugiura, M.; Hirai, H.; Nishida, T. 2003. Purification and characterization of a novel lignin peroxidase from white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *FEMS Microbiology Letters*. 224: 285-290. Doi: 10.1016/S0378-1097(03)00447-6
- [197] Parshetti, G. K.; Kalme, S. D.; Gomare, S. S. 2007. Biodegradation of reactive blue-25 by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. *J Biotechnol*; 98:3638–42. Doi: 10.1016 / j.biortech.2006.11.017
- [198] Ambrosio, S. T.; Campos-Takaki, G. M. 2004. Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. *Bioresour Technol*; 91:69–75. Doi: 10.1016 / s0960-8524 (03) 00153-6
- [199] Zheng, Z.X.; Levin, R. E.; Pinkham, J. L.; Shetty, K. 1999. Decolorization of polymeric dyes by a novel *Penicillium* isolate. *Process Biochem*; 34:31–7. Doi: 10.1016/S0032-9592(98)00061-2
- [200] Separrat, M.; Martínez, M.; Cabello, M.; Arambarri, A. 2002. Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Rev Iberoam Micol*; 19: 181-185. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/10691464_Screening_for_ligninolytic_enzymes_in_autochthonous_fungal_strains_from_Argentina_isolated_from_different_substrata
- [201] Camacho-Morales, R. L.; Gerardo-Gerardo, J. L.; Guillén, N. K.; Sánchez, J. E. 2017. Producción de enzimas ligninolíticas durante la degradación del herbicida paraquat por hongos de la pudrición blanca. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(2), 189–196. Doi: 10.1016/j.ram.2016.11.004
- [202] Baptista, N. M. Q.; Santos, A. C.; Arruda, F. V. F.; Gusmão, N. B. 2012. Production of Enzymes by Lignin Peroxidase and Laccase Filamentous Fungi. *Scientia Plena*, vol. 8, num. 1. Doi: 10.5897/AJB2014.14283
- [203] Baldrian, P. 2003. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 32 (1): 78-91. Doi: 10.1016/S0141-0229(02)00245-4
- [204] Hatvani, N.; Mécs, I. 2003. Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of *Lentinula edodes*. *Ecotoxicology and*

- Environmental Safety. 55 (2): 199-203. Doi: 10.1016/s0147-6513(02)00133-1
- [205] Ávalos, A.; Haza, A.; Morales, P. 2013. Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. Doi: 10.5209/rev_RCCV.2013.v7.n2.43408
- [206] Welter, I.; Fatibello-Filho, O.; Cadorin, F.; Cruz, I. 2009. Immobilization of laccase in microparticles of chitosan obtained by spray drying and used in the biosensors construction. Quim. Nova, Vol. 32, No. 5, 1195-1201. Doi: 10.1590/S0100-40422009000500021
- [207] Román, R.; Torres-Duarte, C.; Ayala, M.; Vásquez-Duhalt, R. (2010). Production of laccase from *Coriopsis gallica* at pilot plant scale. Revista Mexicana de Micología 32: 19-27. Disponible em: https://www.researchgate.net/publication/317446148_Production_of_laccase_from_Coriopsis_gallica_at_pilot_plant_scale
- [208] Cruz, T.; Aquiles, G. 2019. Influencia del pH y de la relación quitosano/tripolifosfato en la morfología y polidispersidad de las nanopartículas de quitosano de grado farmacéutico. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. Disponible em: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/11433>
- [209] Sotelo-Boyás, M. E.; Valverde-Aguilar, G.; Plascencia-Jatomea, M.; Correa-Pacheco, Z. N.; Jiménez-Aparicio, A.; Solorza-Feria, J.; Barrera-Necha, L.; Bautista-Baños, S. 2015. Characterization of chitosan nanoparticles added with essential oils. In vitro effect on *Pectobacterium carotovorum*. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol. 14, No. 3; 589-599. Disponible em: <https://www.redalyc.org/pdf/620/62043088003.pdf>
- [210] Šileikaitė, A., Puišo, J., Prosyčėvas, I., y Tamulevičiu, S. 2009. Investigation of Silver Nanoparticles Formation Kinetics During Reduction of Silver Nitrate with Sodium Citrate. Materials Science (Medžiagotyra). Vol. 15, No. 1. Disponible em: https://www.academia.edu/25108472/Investigation_of_Silver_Nanoparticles_Formation_Kinetics_during_Reduction_of_Silver_Nitrate_with_Sodium_Citrate
- [211] Spectra Lux Software v.2.0, Ponto Quântico Nanodispositivos / RENAMI, 2003, P.A. Santa-Cruz, F.S. Teles.