



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E
MICROBIOLOGIA

BIODEGRADAÇÃO E DESTOXIFICAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL PRETO
REATIVO 5 PELO BASIDIOMICETO DE ORIGEM MARINHA *Peniophora* sp.
CBMAI 1063

LARA CAVALARI SANTELLO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E
MICROBIOLOGIA

BIODEGRADAÇÃO E DESTOXIFICAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL PRETO
REATIVO 5 PELO BASIDIOMICETO DE ORIGEM MARINHA *Peniophora* sp.
CBMAI 1063

LARA CAVALARI SANTELLO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular, Molecular e Microbiologia.

Discente: Lara Cavalari Santello
Orientadora: Prof^a Dr^a Lara Durães Sette
Coorientadora: Dr^a Milene Ferro

S234b	Santello, Lara Cavalari Biodegradação e destoxificação do corante têxtil preto reativo 5 pelo basidiomiceto de origem marinha <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063 / Lara Cavalari Santello. -- Rio Claro, 2023 83 p. : tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientadora: Lara Durães Sette Coorientadora: Milene Ferro 1. Fungos basidiomicetos. 2. Biotecnologia Ambiental. 3. Degradação. 4. Descoloração. 5. Destoxificação. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

BIORREMEDIAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL PRETO
REATIVO 5 PELO BASIDIOMICETO DE ORIGEM
MARINHA *Peniophora* sp. CBMAI 1063

**AUTORA: LARA CAVALARI
SANTELLO ORIENTADORA: LARA
DURÃES SETTE COORIENTADORA:
MILENE FERRO**

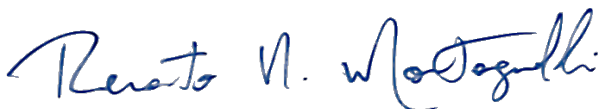
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia), área: Diversidade Biológica e Biologia Ambiental pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro



Profa. Dra. RAFAELLA COSTA BONUGLI SANTOS (Participação Virtual)
Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza / Universidade Federal da Integração Latino-Americana



Prof. Dr. RENATO NALLIN MONTAGNOLLI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação / UFSCar

Rio Claro, 18 de abril de 2023

Título alterado para: "Biodegradação e destoxificação do corante têxtil preto reativo 5 pelo basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063"

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Antonio e Rosali, e à minha irmã Bruna, pelo apoio, incentivo e confiança nas minhas escolhas durante todos esses anos. Eu sei que às vezes não é fácil, muitas vezes pela distância (que eu gostaria que fosse mais pertinho), mas sei que vocês estão sempre ali, torcendo para que tudo dê certo.

As pessoas que encontrei em Rio Claro e continuam até hoje, em especial às Raquéis da minha vida (Carrie e Sheeva), que eu amo os encontros, que é só chegar e ter sempre ali alguma coisa para conversar, desabafar e dar aquela risada que só sai com vocês.

Ao Joacks, meu namorado e parceiro de vida, por ser a pessoa que eu sempre posso contar, por sempre me encorajar, por ter as melhores conversas, achar filmes e comidas para ver e experimentar que eu nunca vi e/ou comi na vida e por estar sempre ali quando eu preciso.

Ao pessoal do LAMAI: Patrícia, Elisa, Igor, Nutella (não é do LAMAI, mas esteve sempre ali junto comigo desde o início também, sempre me ajudando!) e Mini Vaca que estiveram comigo durante esses dois anos e que com certeza, caso não estivessem, a minha experiência no laboratório seria totalmente diferente. Vocês são demais! Mini Vaca, foi uma honra ser sua dupla nesse mestrado e dividir o armário com você.

A Lara Sette, por me orientar, por ter me aceitado no LAMAI e por permitir que durante esses dois anos, o mestrado tenha sido a experiência e desafio que eu precisava. A Milene Ferro, pela orientação em uma parte completamente nova para mim e por estar sempre ali me tranquilizando.

As demais pessoas que contribuíram com o desenvolvimento do meu trabalho, aos colegas, técnicos e servidores do Departamento de Bioquímica e Microbiologia e UNESP - Rio Claro.

Agradeço ao apoio/financiamento do Processo nº 2018/12098-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A indústria têxtil é responsável por grande parte da poluição ambiental devido à quantidade de efluentes têxteis lançados no ambiente aquático. Os corantes reativos, utilizados neste setor, apresentam vantagens no processo industrial por sua cor brilhante, excelente estabilidade e facilidade de aplicação. Entretanto, estes compostos apresentam alta recalcitrância, dificultando os processos de tratamento dos efluentes têxteis. Neste contexto, o uso de fungos basidiomicetos de ambientes marinhos vem demonstrando eficiência na biodegradação destes compostos. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo ampliar o conhecimento do processo de degradação, descoloração e destoxificação do corante têxtil preto reativo 5 (PR5) pelo fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063. O fungo foi cultivado na condição otimizada de descoloração previamente estabelecida (Erlenmeyer contendo 50 mL de meio líquido constituído por 3 g L⁻¹ de extrato de malte, 3 g L⁻¹ de farelo de trigo e 15 mL de água do mar artificial a 1,2% de salinidade e pH 6,25) com a adição de seis indutores (ABTS, álcool veratrílico, cloreto de cálcio, 2,5-Dimethylaniline, seringaldazina e guaiacol) de forma independente para verificação da melhoria na descoloração e destoxificação do PR5. O experimento permaneceu ao abrigo da luz por 7 dias a 28°C e 140 rpm. A análise de descoloração e da atividade das enzimas lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase (Lac) foram realizadas utilizando o método de espectrofotometria UV/Visível. A análise de fitotoxicidade foi realizada utilizando *Cucumis sativus* como bioindicador e a análise de toxicidade aguda foi realizada utilizando o equipamento Microtox®500 e a bactéria *Aliivibrio fischeri*. Os melhores resultados para descoloração (aprox. 94%), foram obtidos no tratamento sem indutor (MOFF) e nos tratamentos com os indutores cloreto de cálcio (CaCl₂) e guaiacol (Guai) (aprox. 90% e 71%, respectivamente). Quanto à toxicidade, o tratamento MOFF apresentou a maior taxa de destoxificação, frente aos outros tratamentos e por isso foi escolhido para as próximas análises. Os resultados das cinéticas de descoloração, destoxificação e degradação, revelaram que no terceiro dia houve resultados significativos para a descoloração (aprox. 80%), atividade da lacase (aprox. 250 U L⁻¹) e manganês peroxidase (aprox. 60 U L⁻¹), e destoxificação (aprox. 47%). Nas análises de GC-MS foram encontrados metabólitos finais indicativos de degradação do corante PR5, como o ácido hexadecanóico, ácido oxálico e o ácido acético. Esses compostos apresentaram menor peso molecular e menor toxicidade, comparado ao composto original. Os dados derivados da análise transcriptômica dos genes diferencialmente expressos na presença do corante PR5, demonstraram a presença de transcritos relacionados às enzimas ligninolíticas (Lac, MnP e DyP), ao complexo citocromo P450, além de aldo-ceto redutases, aldeídos desidrogenases, glutational-S-transferases, alfa/beta hidrolases e epóxido hidrolases, os quais possivelmente estão relacionadas ao processo de degradação e destoxificação do corante PR5. Os resultados obtidos no presente estudo, indicam que o fungo basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 é capaz de descolorir, destoxificar e degradar o azocorante PR5 com e sem a adição de indutores, podendo ser um importante recurso microbiano para a biodegradação de compostos poluentes ambientais.

Palavras-chave: Fungos basidiomicetos; biotecnologia ambiental; degradação, descoloração, destoxificação.

ABSTRACT

The textile industry is responsible for much of the environmental pollution due to the amount of textile effluents released into the aquatic environment. The reactive dyes, used in this sector, have advantages in the industrial process due to their bright color, excellent stability and ease of application. However, these compounds present high recalcitrance, making the treatment processes of textile effluents difficult. In this context, the use of basidiomycete fungi from marine environments has been demonstrating efficiency in the bioremediation of these compounds. In view of this, the present study aims to expand knowledge of the process of degradation, decolorization and detoxification of the textile dye reactive black 5 (RB5) by the marine fungus *Peniophora* sp. CBMAI 1063. The fungus was cultivated in the previously established optimized decolorization condition (Erlenmeyer flask containing 50 mL of liquid medium consisting of 3 g L⁻¹ of malt extract, 3 g L⁻¹ of wheat bran and 15 mL of artificial sea water at 1.2% salinity and pH 6.25) with the addition (independently) of six inducers (ABTS, veratryl alcohol, calcium chloride, 2,5-Dimethylaniline, syringaldazine and guaiacol) to verify the improvement in RB5 decolorization and detoxification. The experiment remained protected from light for 7 days at 28°C and 140 rpm. The analysis of decolorization and activity of lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) and laccase (Lac) enzymes were performed using the UV/Visible spectrophotometry method. The phytotoxicity analysis was performed using *Cucumis sativus* as a bioindicator and the acute toxicity analysis was performed using the Microtox®500 equipment and the bacteria *Aliivibrio fischeri*. The best results for decolorization (approx. 94%) were obtained in the treatment without inducer (MOFF) and in treatments with calcium chloride (CaCl₂) and guaiacol (Guai) inducers (approx. 90% and 71%, respectively). As for toxicity, the MOFF treatment showed the highest detoxification rate compared to the other treatments and, therefore, was chosen for the next analyses. The results of the decolorization, detoxification and degradation kinetics revealed that on the third day there were significant results for decolorization (approx. 80%), laccase (approx. 250 U L⁻¹) and manganese peroxidase (approx. 60 U L⁻¹) activities, and detoxification (approx. 47%). In the GC-MS analyses, final metabolites indicative of degradation of the RB5 dye were found, such as hexadecanoic acid, oxalic acid and acetic acid. These compounds showed lower molecular weight and less toxicity compared to the original compound. The data derived from the transcriptomic analysis of genes differentially expressed in the presence of the RB5 dye, demonstrated the presence of transcripts related to ligninolytic enzymes (Lac, MnP and DyP), to the cytochrome P450 complex, in addition to aldo-keto reductases, aldehyde dehydrogenases, glutathione- S-transferases, alpha/beta hydrolases and epoxide hydrolases, which are possibly related to the RB5 dye degradation and detoxification process. The results obtained in the present study indicate that the marine basidiomycete fungus *Peniophora* sp. CBMAI 1063 is able to decolorize, detoxify and degrade the azo dye RB5 with and without the addition of inducers, and may be an important microbial resource for the bioremediation of environmentally polluting compounds.

Keywords: Basidiomycete fungi; Environmental biotechnology; Degradation, Decolorization, Detoxification.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. Corantes Têxteis.....	11
2.1.1 Azocorantes.....	11
2.1.2. Corante Preto Reativo 5.....	12
2.2. A indústria têxtil e sua problemática ambiental	13
2.3. Tratamentos de efluentes têxteis	14
2.4. Biodegradação de corantes por fungos marinhos	15
2.4.1. Degradação enzimática de corantes têxteis por fungos.....	16
2.5. <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063.....	18
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivos específicos.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Condições de cultivo do <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063	21
4.2. Descoloração do corante têxtil preto reativo 5.....	22
4.2.1. Descoloração por processo enzimático.....	22
4.2.1.1. Quantificação da descoloração	22
4.2.1.2. Quantificação de enzimas ligninolíticas	22
4.2.2. Descoloração por adsorção	23
4.3. Análises de toxicidade	24
4.3.1. Avaliação de fitotoxicidade em <i>Cucumis sativus</i>	24
4.3.2. Avaliação da toxicidade aguda em <i>Aliivibrio fischeri</i>	25
4.4. Quantificação da biomassa	25
4.5. Análise de metabólitos por Cromatografia Gasosa associada a Espectrômetro de Massa (GC-MS).....	26
4.5.1. Extração dos metabólitos da degradação do Preto Reativo 5.....	26
4.5.2. Análise de GC-MS dos metabólitos da degradação do corante Preto Reativo 5.....	26
4.6. Cinética de descoloração, destoxificação, atividade enzimática e metabólitos durante a biodegradação do corante Preto Reativo 5 pelo <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063.	27
4.7. Transcriptômica: Análises comparativas da condição com e sem o azocorante PR5.....	27
4.7.1. Extração de RNA	27
4.7.2 Determinação da concentração e integridade do RNA	28
4.7.3. Sequenciamento e pré-processamentos dos <i>reads</i>	28
4.7.4. Montagem dos <i>contigs</i> e verificação da qualidade da montagem.....	29
4.7.5. Análise da expressão gênica diferencial e anotação funcional	29
5. Análise estatística dos dados	30

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
6.1. Determinação do melhor tratamento para a descoloração e destoxificação do corante PR5.	31
6.1.1. Descoloração em diferentes condições	31
6.1.2. Descoloração com diferentes indutores	32
6.1.3. Atividade Enzimática	34
6.1.4. Biomassa	36
6.1.5. Fitotoxicidade e Toxicidade Aguda	37
6.2. Análise de adsorção do corante PR5 pelo micélio fúngico.....	39
6.3. Cinética de descoloração, destoxificação e atividade enzimática do corante PR5 pelo <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063	41
6.4. Cinética de degradação do corante PR5 pelo <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063 e análise da formação de metabólitos.....	46
6.5. Análise de Transcriptoma do basidiomiceto marinho <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063.....	57
6.5.1. Extração de RNA, quantificação e verificação de integridade.....	57
6.5.2. Pré-processamento dos <i>reads</i>	58
6.5.3. Montagem dos <i>contigs</i> , busca por genes específicos e anotação	60
7. CONCLUSÕES.....	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

1. INTRODUÇÃO

A atividade industrial e seu rápido desenvolvimento, embora sejam importantes do ponto de vista socioeconômico, aumentam o risco de poluição ambiental e danos ao ambiente. Além disso, a poluição ambiental no âmbito industrial é frequente e traz consequências sérias à saúde humana, além de gerar um desequilíbrio ecológico da água (ISSAKHOV et al., 2021; YAO et al., 2021).

Indústrias dos setores papelheiro, farmacêutico, têxtil, petrolífero, entre outros, podem gerar poluentes recalcitrantes, ou seja, que possuem em sua composição moléculas persistentes e que são de difícil degradação após o descarte (MAO et al., 2018). A indústria têxtil é um dos setores industriais mais poluentes, representando cerca de um quinto da poluição da água em todo o mundo (ALDALBAHI et al., 2021). A produção das indústrias têxteis e principalmente a utilização de corantes em roupas, móveis, produtos de higiene, área médica e materiais de construção, leva a descarga de corantes no ambiente aquático. Corantes podem impedir a penetração da luz na água, retardar a fotossíntese, inibir o crescimento da biota aquática, levar à uma visão esteticamente desagradável daquele ambiente, além de muitas vezes, serem mutagênicos e carcinogênicos (CHEQUER et al., 2013; BHATIA et al., 2017).

Devido a essa problemática, a poluição ambiental se tornou um assunto prioritário sendo necessário o desenvolvimento e aplicação de técnicas de remediação que minimizem o impacto de xenobióticos no ambiente (OBEROI e PHILIP, 2017). Nesse contexto, a biodegradação surge como uma vertente promissora para aplicação biotecnológica. Esta técnica é considerada uma solução ecologicamente viável e efetiva de despoluição ambiental e tem como foco o uso do arsenal enzimático (metabólico) de organismos vivos, principalmente microrganismos, para degradar poluentes ambientais (KUMAR et al., 2011).

A degradação de corantes e efluentes têxteis por fungos pode ser realizada por meio das enzimas ligninolíticas e/ou pela via do citocromo P450 auxiliado por monoxigenases e dioxigenases. Entretanto, muitas vezes a degradação é limitada quando se utilizam microrganismos terrestres, devido principalmente ao pH e a alta salinidade dos efluentes têxteis. Assim, os fungos derivados de ambientes marinhos são considerados estrategicamente importantes para os estudos de degradação destes poluentes, visto que, estão adaptados às condições de salinidade e alcalinidade dos mares e oceanos (BONUGLI-SANTOS et al., 2010a; BONUGLI-SANTOS et al., 2015).

O fungo basidiomiceto *Peniophora* sp. CBMAI 1063 isolado pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Lara Sette a partir de amostra da esponja marinha *Amphimedon viridis*, vem apresentando resultados importantes de produção de enzimas ligninolíticas (BONUGLI-SANTOS et al., 2010b; BONUGLI-SANTOS et al., 2012, MAINARDI et al., 2018) e degradação de corantes têxteis (BONUGLI-SANTOS et al., 2012; BONUGLI-SANTOS et al., 2016). Esses resultados têm estimulado a continuidade e o desenvolvimento de novos estudos. Assim, o presente projeto teve como objetivo, ampliar o conhecimento sobre os processos de descoloração, destoxificação e degradação do azocorante preto reativo 5 (PR5) pelo fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063, por meio de abordagem transcriptômica e uso da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Para tanto, primeiramente, foram adicionados indutores à condição otimizada de degradação do corante PR5 (BONUGLI-SANTOS et al., 2016) visando a melhoria dos processos de descoloração e destoxificação. Posteriormente, após definição do melhor tratamento (com ou sem indutores), foram conduzidos bioensaios visando identificar genes relacionados com a degradação e destoxificação do corante por meio da obtenção, sequenciamento e comparação dos transcriptomas do fungo nos bioensaios conduzidos na presença e na ausência do corante. Além disso, foram também realizadas análises dos metabólitos gerados durante os processos de biodegradação do azo corante Preto Reativo 5 (PR5) utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Corantes Têxteis

Os corantes têxteis, amplamente utilizados nas indústrias, são formados basicamente por duas partes fundamentais: o grupo cromóforo e o auxocromo. O grupo cromóforo é a porção da molécula responsável por produzir a cor que conseguimos observar que estão presentes no tecido, enquanto o auxocromo funciona aumentando a cor, proporcionando a solubilidade daquele composto em água e melhorando a afinidade com a fibra, na qual o corante será aplicado. Qualquer outra adição à molécula, está relacionada a matriz celular (SAMSAMI et al., 2020; BENKHAYA, M'RABET & HARFI, 2020). A classificação dos corantes é complexa e pode ser dividida tanto quanto a estrutura do grupo cromóforo como ao método de aplicação. No que diz respeito à estrutura do cromóforo, algumas das classificações possíveis são: nitro ($-\text{NO}_2$), azo ($-\text{N}=\text{N}-$), nitroso ($-\text{N}=\text{O}$), tiocetona ($-\text{C}=\text{S}$), carbonila ($-\text{C}=\text{O}$) e alquenos ($-\text{C}=\text{C}-$). Quanto ao método de aplicação, podemos classificar os corantes como: ácido, básico, disperso, direto, reativo, sulfuroso e vat. O que varia em cada uma dessas classificações é a solubilidade e em quais meios é aplicado. Os corantes costumam ter uma classificação dupla, incluindo o método e a estrutura do cromóforo (VENTURA-CAMARGO e MARIN-MORALES, 2013; SAMSAMI et al., 2020).

2.1.1 Azocorantes

Dentre as diversas classes de corantes, os azocorantes são a maior classe de corantes sintéticos amplamente utilizados em diversos setores, como o têxtil, papelero, de cosméticos, alimentício e farmacêutico. Os corantes azo compreendem até 70% dos corantes usados nas indústrias têxteis e se caracterizam por conter uma ou duas ligações do tipo azo ($-\text{N}=\text{N}-$) com os grupos cromóforos e auxocromos, os quais conferem cor, intensidade, solubilidade e melhoria da afinidade dos corantes com a fibra em que este será aplicado. Tais características diferem dos corantes de outras classes. Essas particularidades oferecem facilidade de fabricação, excelente estabilidade, diversidade de cores e alta recalcitrância aos processos de tratamento de águas residuais (O'MAHONY, T.; GUIBAL, E.; TOBIN, J. M et al., 2002; LANG et al., 2013).

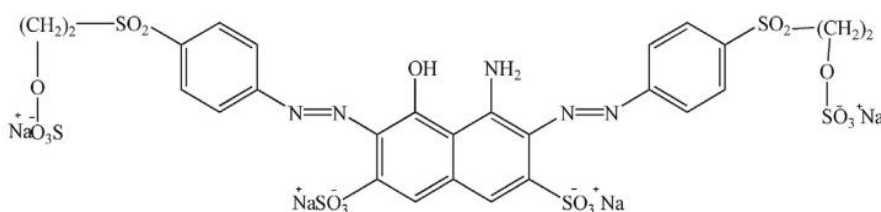
Em razão disso, a sua remoção é um problema socioeconômico e ambiental, pois são permanentes no sistema aquático e os subprodutos de sua degradação são compostos formados principalmente por aminas aromáticas com configurações complexas (ligações azóicas, grupo amino e anéis aromáticos), as quais por serem carcinogênicas e mutagênicas apresentam riscos aos organismos e muitas vezes apresentam maior toxicidade do que a molécula original (GICEVIC et al., 2019; AL-TOHAMY et al., 2020). Em humanos, enzimas produzidas no fígado podem fazer a clivagem das ligações azo, gerando aminas tão perigosas que podem causar danos ao DNA (CHEQUER et al., 2013). Esse problema é tão grave, que em alguns países como Alemanha, Suíça, França e Dinamarca foram elaboradas legislações específicas para lidar com a produção e o consumo destes corantes, principalmente na indústria têxtil (VENTURA-CAMARGO & MARIN-MORALES, 2013).

2.1.2. Corante Preto Reativo 5

O corante Preto Reativo 5 (PR5) (Figura 1) é um azocorante amplamente utilizado para o tingimento de algodão e de outras fibras celulósicas, como o linho. O PR5 também é conhecido como Remazol Black B e seu amplo uso se deve ao custo relativamente baixo, facilidade de aplicação, cor brilhante e alta estabilidade. Tais características estão ligadas às formações de ligações covalentes entre o grupo sulfeto e as fibras celulósicas, que promovem forte fixação e reduzem a quantidade de cor perdida durante o processo de tingimento dos tecidos (SHAH e PATEL, 2014; MOHAMED e WALAA, 2016).

Entretanto, o corante Preto Reativo 5 possui toxicidade comprovada, sendo considerado citotóxico, neurotóxico, mutagênico e carcinogênico e o descarte incorreto deste composto nos corpos d'água pode gerar complicações sérias à saúde humana, pois a exposição contínua e prolongada ao PR5 e aos efluentes que contenham este azocorante pode causar erupções cutâneas, dermatites, problemas cardiovasculares, neurológicos e pulmonares (SEYEDI et al., 2020; RATHI et al., 2022).

Figura 1. Estrutura química do corante Preto Reativo 5. Fonte: (MOHAMED e WALLA, 2016).



2.2. A indústria têxtil e sua problemática ambiental

A indústria têxtil é considerada uma das indústrias mais antigas do mundo, responsável por movimentar e impulsionar a indústria da moda e grandes faturamentos em escala global (MADHAV et al., 2018). Para se ter uma ideia, de acordo com a ABIT (Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção) os dados referentes a 2020 apontam um faturamento da cadeia têxtil e de confecção de aproximadamente R\$161 bilhões, contra R\$ 186 bilhões em 2019, tal diminuição deve-se ao impacto da pandemia no setor, entretanto, no campo das exportações, foi observado um aumento em 2021, com valores aproximados de US\$ 1,06 bilhão em 2021 contra US\$ 801,8 milhões em 2020 (ABIT, 2022).

Em questão de referência global, a indústria têxtil é considerada uma das mais nocivas ao ambiente devido ao elevado volume de água que utilizam. Esse tipo de indústria é caracterizado por ser estritamente dependente de água, necessitando aproximadamente de 50 a 100 litros de água produzir cerca de 1kg de material têxtil, com mais de 80 % desse volume sendo descartado em forma de efluente têxtil (BHATIA et al., 2018; STONE et al., 2020).

Além disso, na fabricação de produtos têxteis estima-se que são empregados mais de 10.000 tipos de corantes e compostos químicos, muitas vezes contendo substâncias orgânicas recalcitrantes, surfactantes, compostos clorados, metais pesados e compostos com cor (KANT, 2012; MADHAV et al., 2018; WANG et al., 2020). Infelizmente, muitas vezes o efluente têxtil é descartado de forma incorreta, levando a aproximadamente 200.000 toneladas de corantes sintéticos descartados no ambiente anualmente. De acordo com o Banco Mundial, estima-se que devido aos processos de tingimento têxtil e tratamento de acabamento, cerca de 17 a 20 % das águas residuais industriais sejam resultantes da atividade da indústria têxtil (AL-MAMUN et al., 2019).

Altos níveis de contaminantes ambientais são produzidos nos processos de tingimento de fábricas têxteis. Estes contaminantes são particularmente persistentes e de difícil degradação, uma vez que são desenvolvidos para manter sua integridade no tecido. O aspecto mais prejudicial do descarte de efluentes têxteis em águas residuais é a alteração de cor da coluna d'água. Isso porque, a cor impede a passagem de luz para as camadas inferiores da água, interferindo na capacidade de fotossíntese de diversos organismos que causa uma limitação na quantidade de oxigênio no fluxo de água (CROCE et al., 2017; AL-ANSARI et al., 2022). Além disso, o despejo de efluentes têxteis afeta consideravelmente parâmetros relacionados à qualidade da água como a demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de

oxigênio (DBO), pH, salinidade, além de quantidades expressivas de metais pesados, altas concentrações de NaCl, surfactantes e presença de sólidos em suspensão (CHEQUER et al., 2013).

2.3. Tratamentos de efluentes têxteis

A expansão industrial de diferentes setores na sociedade resultou em um aumento na complexidade e toxicidade dos resíduos descartados no ambiente (GAVRILESCU et al., 2015). Sendo assim, diferentes métodos de tratamento podem ser aplicados aos efluentes têxteis e estes podem ser de caráter físico, químico ou biológico. Em geral, são aplicados dois ou mais métodos para atender às demandas dos órgãos reguladores (RASHID et al., 2021).

Os métodos físicos mais utilizados são: filtração, adsorção, floculação e precipitação. A adsorção envolve a transferência de massa de uma fase líquida para uma superfície sólida, enquanto a floculação e a precipitação envolvem o processo de coagulação dos compostos em duas fases distintas. Esses métodos são considerados eficientes e de baixo custo operacional para o tratamento de efluentes, entretanto apenas separam os corantes têxteis da fase líquida, não havendo nenhum processo de degradação destes compostos (FOROUTAN et al., 2019; RASHID et al., 2021).

Os métodos químicos utilizam processos oxidativos como método de catálise dos grupos cromóforos. Este método envolve processos como oxidação eletroquímica, oxidação fotoeletroquímica, oxidação de Fenton assistida por UV, ozonização, além de técnicas que podem gerar espécies reativas de oxigênio, como ozônio e peróxidos (AHMAD et al., 2015). Todos esses métodos são considerados eficientes para a remoção da cor do efluente, entretanto, apresentam alto custo de manutenção e formam diversos subprodutos, muitas vezes mais tóxicos do que o composto original (CHEN et al., 2015; SAMSAMI et al., 2020).

Os métodos biológicos, também chamados de biodegradação/biorremediação, envolvem o uso de microrganismos (fungos, bactérias e algas) de forma isolada ou associados em consórcio e/ou suas enzimas para descolorir, transformar e degradar os efluentes têxteis. A biodegradação por meio da modificação da estrutura química dos poluentes orgânicos presentes em solos, sedimentos e água podem levar à degradação parcial ou a mineralização destes compostos, ou seja, a metabolização completa das moléculas gerando CO₂ e H₂O (AZUBUIKE et al., 2016; SIVAPERUMAL et al., 2017). Estes sistemas têm um melhor custo-benefício, ótima eficiência de remoção, bom desempenho em baixas concentrações, além de serem considerados ecologicamente corretos (ALEGBELEYE et al., 2017).

No Brasil, o tratamento dos efluentes industriais são de responsabilidade da empresa geradora. São regulamentados pela resolução 357 de 17 de março de 2005, alterada pela resolução 430 de 13 de maio de 2011, estabelecidas pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente nos corpos receptores após o devido tratamento e desde que obedeçam às condições, padrões e exigências nas duas resoluções. Tais condições estão relacionadas ao pH (entre 5 e 9), temperatura (inferior a 40 °C), materiais sedimentáveis (até 1 mL L⁻¹), óleos minerais (até 20 mg L⁻¹), óleos vegetais e gorduras animais (até 50 mg L⁻¹) e ausência de materiais flutuantes. Além disso, o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor. Os estados e municípios podem estabelecer legislações e parâmetros a serem cumpridos, e no ato de licenciamento a empresa deve informar ao órgão ambiental as substâncias que compõe o efluente gerado (CONAMA, 2011).

2.4. Biodegradação de corantes por fungos marinhos

A biodegradação é um dos métodos biológicos utilizado para remover poluentes ambientais de solos, sedimentos, cursos d'água e efluentes. Envolve a transformação enzimática ou a adsorção dos poluentes pelos micro-organismos e tem demonstrado vantagens na eficiência, geração de subprodutos, segurança e custo do processo (GIOVANELLA et al., 2020; SHARMA; DANGI; SHUKLA, 2018).

A maioria dos estudos sobre a biodegradação de azocorantes têm se concentrado principalmente na utilização de bactérias e fungos, nos quais as bactérias são amplamente utilizadas para a descoloração destes compostos, devido à sua alta atividade, ampla distribuição e grande adaptabilidade. Entretanto, a descoloração de produtos como aminas aromáticas pode inibir a atividade das bactérias (SEN et al., 2016; YAKOP et al., 2019). Por outro lado, os fungos podem degradar compostos orgânicos complexos por meio da quebra desses compostos, devido a ação das suas enzimas ligninolíticas extracelulares, como as lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase, entre outras, podendo mineralizar parcialmente ou até mesmo completamente os azocorantes, além de demonstrar adaptabilidade e eficiência na remoção de diferentes tipos de compostos aromáticos. Além disso, os fungos podem remover os poluentes de forma física, adsorvendo em seu micélio as moléculas desses poluentes ambientais (CHOI et al., 2021; SYAFIUDDIN et al., 2021). De acordo com Li et al., (2020) pellets de *Aspergillus niger* ZJUBE-1 foram capazes tanto de adsorver quanto de degradar corante têxtil vermelho do

congo em tratamentos com alta salinidade e acidez, demonstrando o potencial desta técnica para aplicação da adsorção em processos de biorremediação.

A degradação de poluentes ambientais, como os efluentes têxteis, ocorre em várias etapas, sendo a salinidade considerada como empecilho para a eficiência da biodegradação, visto que a alta concentração de sais geralmente afeta o desempenho dos microrganismos empregados no processo. Neste contexto, os fungos derivados de ambiente marinho podem apresentar uma vantagem biológica por estarem adaptados às condições salinas e valores de pH mais altos, encontrados neste ambiente. A principal vantagem destes micro-organismos é a estabilidade e a atividade de suas enzimas em condição salina quando comparados aos organismos terrestres (IMRAN et al., 2014; GROSSART e ROJAS-JIMENEZ, 2016).

Os fungos marinhos são classificados em dois grupos: os marinhos obrigatórios, que crescem e se reproduzem exclusivamente no ambiente marinho, e os facultativos, que são provenientes de água doce, mas que são capazes de crescer em ambientes marinhos. A terminologia “fungos derivados do ambiente marinho” do inglês *marine-derived fungi* abrange ambos os grupos e refere-se a qualquer fungo isolado de amostras marinhas (SINGH et al., 2012; BONUGLI-SANTOS et al., 2015). Assim, estudos realizados pelo grupo de pesquisa sob a liderança da Profa. Dra. Lara Sette vêm demonstrando que a utilização de fungos de origem marinha e suas enzimas pode ser uma forma eficaz para a descoloração, destoxificação e degradação de corantes presentes nos efluentes têxteis (BONUGLI-SANTOS et al., 2010; BONUGLI-SANTOS et al., 2016; BONUGLI-SANTOS et al., 2012; FONTES et al., 2021; VIEIRA et al., 2021).

2.4.1. Degradação enzimática de corantes têxteis por fungos

Dentre os fungos com potencial para degradação de poluentes ambientais o grupo dos basidiomicetos, em especial os considerados de decomposição branca (*white-rot fungi*), se destacam por possuírem um potente arsenal enzimático envolvido com a degradação da lignina. A lignina é um dos constituintes da biomassa vegetal altamente recalcitrante devido a sua composição. É o polímero complexo mais abundante na natureza, tem caráter aromático e é constituído de unidades guaiacil, siringil e hidroxifenil ligadas aleatoriamente por ligações tipo éster e éter (ALI et al., 2021; KUMAR; CHANDRA, 2020).

Os fungos produzem diferentes enzimas que agem na transformação da lignina, incluindo oxidoredutases, ligninases, liases, dehalogenases e hidrolases. Contudo, existem outras enzimas que auxiliam no processo de degradação incluindo a celobiose desidrogenase,

aril álcool oxidase, quinona redutase, glioxal oxidase, xilanases, catecol-2,3,- dioxigenase (KUMAR; CHANDRA, 2020). O citocromo P450 é um complexo enzimático localizado predominantemente na membrana celular de mitocôndrias e retículos. Abrange uma ampla gama de oxidases, as quais apresentam uma versatilidade catalítica, com capacidade de degradar hidrocarbonetos, fármacos, hormônios, corantes, entre outros (SHARIFIAN et al., 2020).

As enzimas ligninolíticas (ligninases), incluindo as lacases (Lac), lignina-peroxidases (LiP), manganês-peroxidases (MnP) e peroxidase versátil, também envolvidas na degradação da lignina e desses poluentes, podem atuar tanto em moléculas aromáticas, quanto as não aromáticas, agindo na transformação/modificação destes compostos (BONUGLI-SANTOS et al., 2010; DESHMUKH et al., 2016). Dentre as enzimas ligninolíticas, as lacases desempenham papel importante no processo degradativo e são as mais bem estudadas até então. O processo pelo qual as enzimas ligninolíticas atuam tem uma grande amplitude de ação: podem promover a hidroxilação, oxidação, redução e metilação na quebra de compostos orgânicos e de alta recalcitrância (DESHMUKH et al., 2016; DUARTE et al., 2018; GIOVANELLA et al., 2020).

Apesar dos mecanismos de degradação por fungos basidiomicetos (acima citados) serem conhecidos, para o detalhamento e ampliação do entendimento das etapas de degradação, estudos de transcriptômica e análises cromatográficas são relevantes. Estas técnicas permitem a identificação de genes transcritos responsáveis pela produção de enzimas envolvidas no processo degradativo e dos metabólitos gerados durante a degradação do poluente (GIOVANELLA et al., 2020; VIEIRA et al., 2021).

É importante destacar que o processo degradativo pode gerar compostos mais tóxicos do que a molécula original (BRÜSCHWEILER e MERLOT, 2017; ROVIRA e DOMINGO, 2019; VIEIRA et al., 2021). Desta forma, é de extrema importância a realização de análises de toxicidade durante o processo degradativo. Para isso, o poluente e os produtos resultantes da degradação são expostos a organismos modelo (bioindicadores). Entre eles se destacam algumas plantas com sensibilidade a poluentes tóxicos (e.g. *Lactuca sativa*, *Eruca sativa*, *Cucumis sativus*) e bactérias bioluminescentes (e.g. *Aliivibrio fischeri*). A partir da exposição aos compostos na amostra são avaliados parâmetros como mortalidade, germinação, alongamento de raiz e, conforme os resultados, pode-se definir uma toxicidade baixa, moderada ou alta (VIEIRA et al., 2018).

2.5. *Peniophora* sp. CBMAI 1063

O gênero *Peniophora* pertence ao filo Basidiomycota, classe Agaricomycetes e ordem Russulales. Representantes desse gênero são classificados como *white-rot fungi*, devido a capacidade de causar podridão branca nos componentes da madeira.

O fungo basidiomiceto *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (Figura 2) foi isolado da esponja marinha *Amphimedon viridis* (coletada na cidade de São Sebastião na costa norte do estado de São Paulo) (MENEZES et al., 2010) e taxonomicamente identificado por Bonugli-Santos et al. (2010b). Este fungo encontra-se depositado na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob o acrônimo CBMAI 1063 e na Central de Recursos Microbianos (CRM-UNESP) do Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) sob o acrônimo CRM 1241.

Figura 2. Imagem do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 cultivado em meio ágar malte 2% (foto do arquivo da coleção de pesquisa do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial - LAMAI, associado a CRM-UNESP).



Estudos prévios do grupo de pesquisa liderado pela Profa. Dra. Lara Sette, evidenciam o potencial para aplicação biotecnológica do *Peniophora* sp. CBMAI 1063. Este fungo é um ótimo produtor de lacases em condições salinas (água do mar artificial) (MAINARDI et al., 2018), apresentando uma nova família gênica de lacases, e capaz de expressar diferentes protoformas dessa enzima (OTERO et al., 2017). Um estudo recente conduzido por um grupo de pesquisadores russos (GLAZUNOVA et al., 2020) reforça a singularidade das lacases produzidas pelo basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063, visto que após

análises de genômica comparativa o fungo marinho apresentou diferenças no número de genes que codificam para essas enzimas, os quais apresentaram distância evolutiva dos genes de lacase produzidos por outras três linhagens de *Peniophora* de origem terrestre (*Peniophora* sp. CONTA, *Peniophora* sp. v1,0 e *Peniophora lycii* LE-BIN 2142). Em adição, o fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi capaz de descolorir o corante remazol azul brilhante em meio sólido (aproximadamente 100%) e líquido (>95%) na ausência de salinidade (BONUGLI-SANTOS et al., 2012) e 94% do corante têxtil PR5 em condição salina, sem a produção de compostos mutagênicos (BONUGLI-SANTOS et al., 2016). De acordo com Fontes et al., (2021) o pool de lacases do *Peniophora* sp. CBMAI 1063, parcialmente purificado, apresentou a mesma taxa de descoloração do corante têxtil azul reativo (acima de 60%) em comparação com a lacase comercial (Sigma) do fungo basidiomiceto *Trametes versicolor*.

3. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi ampliar o conhecimento dos processos de descoloração, destoxificação e degradação do corante preto reativo 5 (PR5) pelo fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 por meio de abordagem transcriptômica e análise de metabólitos.

3.1. Objetivos específicos

- Utilizar indutores na condição otimizada de degradação do corante PR5 visando a redução do tempo e/ou obtenção de melhores taxas de descoloração e destoxificação;
- Estudar os metabólitos gerados durante os processos de descoloração, destoxificação e degradação do corante PR5;
- Indicar a possível via metabólica utilizada pelo fungo na degradação e destoxificação do PR5;
- Analisar a expressão diferencial de genes na presença e na ausência do corante PR5 utilizando dados transcriptômicos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Condições de cultivo do *Peniophora* sp. CBMAI 1063

O fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi cultivado nas condições otimizadas para a descoloração e destoxificação do corante PR5 como reportado por Bonugli-Santos et al. (2016) na presença de diferentes indutores. Para tanto, a partir do fungo previamente cultivado em meio ágar malte 2% (MA2%) por 7 dias a 28 °C foram transferidos 3 cilindros/ *plugs* de ágar + micélio (0,5 cm diâmetro) para um Erlenmeyer contendo 50 mL de meio líquido constituído por 3 g L⁻¹ de extrato de malte, 3 g L⁻¹ de farelo de trigo e 15 mL de água do mar artificial (ASW: MgCl₂ 0,704 %, CaCl₂ 0,098 %, SrCl₂ 0,001 %, NaCl 1,555 %, Na₂SO₄ 0,261 %, KCL 0,044 %, NaHCO₃ 0,013 %, KBr 0,006 % e H₃BO₃ 0,002 %) a 1,2% de salinidade e pH 6,25. Após 72 h de incubação a 28 °C e 140 rpm, 200 mg L⁻¹ do corante PR5 foi adicionado ao meio e o cultivo foi mantido por 7 dias a 28 °C e 140 rpm. Experimentos controle foram conduzidos paralelamente utilizando as mesmas condições de cultivo acima citadas, porém sem a adição do inóculo fúngico. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Aos cultivos acima mencionados, no momento da adição do corante PR5 foram também adicionados os seguintes indutores para avaliação de melhoria dos resultados de descoloração e destoxificação: ABTS na concentração de 1 mM (KANWALL e REDDY, 2010); álcool veratrílico na concentração de 40 mM (BARBOSA et al., 1996); cloreto de cálcio (CaCl₂) na concentração de 1 mM (DAWKAV et al., 2009); 2,5- Dimethylaniline na concentração de 1 mM (JANG et al., 2006), siringaldazina na concentração de 0,1 mM e guaiacol na concentração de 1 mM (BIRHANLI e YESILADA, 2017). Após os 7 dias de incubação os cultivos (bioensaios e controles) foram centrifugados por 30 min a 12.057 xg e a 25 °C para separar o caldo de cultivo (sobrenadante) da biomassa fúngica que foram utilizados para as análises que estão descritas abaixo.

4.2. Descoloração do corante têxtil preto reativo 5

4.2.1. Descoloração por processo enzimático

4.2.1.1. Quantificação da descoloração

A análise de descoloração do corante PR5 foi avaliada conforme Bonugli-Santos et al. (2016) utilizando o método de espectrofotometria UV/Visível. Para isto, após a centrifugação, o sobrenadante obtido foi diluído em água destilada na proporção 1:10 (100 µl de sobrenadante + 900 µl de água destilada) e sua absorvância avaliada em amplo espectro (300 nm a 700 nm).

A absorvância do corante e sua porcentagem de descoloração foram quantificadas no comprimento de onda de 598 nm, pois é onde se encontra o pico de absorvância máxima, e a porcentagem de descoloração foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ descoloração: } \frac{\text{Absorvância inicial} - \text{Absorvância final}}{\text{Absorvância inicial}} \times 100$$

4.2.1.2. Quantificação de enzimas ligninolíticas

A quantificação da produção das enzimas ligninolíticas pelo fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi avaliada utilizando espectrofotometria UV/Visível. Para isto, os sobrenadantes (caldos enzimáticos) obtidos após a centrifugação, foram utilizados para a determinação da atividade das enzimas lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase (Lac), de acordo com os métodos apresentados abaixo.

Lignina peroxidase (LiP): A atividade da LiP foi quantificada a partir da reação de oxidação do álcool veratrílico pela adição do peróxido de hidrogênio, resultando na formação do composto aldeído veratrílico ($\epsilon = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), este produto foi mensurado após 10 min de reação no comprimento de onda de 310 nm. O meio de reação é composto de: 0,5 mL de tampão tartarato de sódio 100 mM (pH 3); 0,1 mL de álcool veratrílico 20 mM; 0,2 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 0,1 mL de caldo enzimático (BONUGLI-SANTOS et al., 2012; KUDO et al., 2017; BIKO, 2019).

Manganês peroxidase (MnP): A atividade da MnP foi quantificada pela formação do complexo Mn^{+3} -malonato ($\epsilon = 11590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), produto resultante da oxidação do sulfato de manganês pela enzima MnP e posterior reação com o malonato de sódio. Para tanto, as análises foram mensuradas após 10 min de reação no comprimento de onda 270 nm. O meio de reação é composto de: 50 μL de peróxido de hidrogênio 2 mM; 0,8 mL de tampão malonato de sódio 50 mM (pH 4,5); 50 μL de sulfato de manganês 20 mM; e 0,1 mL de caldo enzimático (ZHANG et al, 2016; WARIISHI et al., 1992; KUDO et al., 2017).

Lacase: A atividade da Lac foi quantificada a partir da reação da enzima Lac com a 2,2-azino-bis-etilbenthiazolina (ABTS), para isto, a mensuração foi realizada pelo monitoramento da oxidação do ABTS no comprimento de onda de 420 nm, após 10 min de incubação a 37 °C. O meio de reação é composto de: 0,3 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5); 0,1 mL de solução ABTS ($\epsilon=36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) 0,5 mM e 0,6 mL do caldo enzimático (BONUGLI-SANTOS et al., 2016).

A atividade foi expressa em U L^{-1} , onde uma unidade enzimática (U) define a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol do substrato/minuto. Os resultados foram obtidos conforme a seguinte equação:

$$\text{U.L}^{-1} = \Delta A.V.10^6/\epsilon.R.t, \text{ onde:}$$

ΔA : Diferença entre a absorbância final e a inicial;

V: Volume da reação;

10^6 : Converte os mols de ϵ para μmols ;

ϵ : Coeficiente de extinção ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$);

R: Quantidade de caldo enzimático;

t: Tempo de reação (min).

4.2.2. Descoloração por adsorção

Visando avaliar a porcentagem de adsorção do corante PR5 pelo micélio fúngico, primeiramente o fungo foi cultivado na condição otimizada conforme descrito no item 4.1 sem a presença do corante. Ao final de três dias de cultivo do pré-inóculo o fungo foi autoclavado para a sua inativação e de suas enzimas, por 45 min a 121 °C e 1 atm de pressão. Feito isso, 200

mg L⁻¹ do corante foi adicionado ao meio e ao fungo inativado e o sistema foi mantido durante 7 dias a 28 °C e 140 rpm.

Posteriormente, os cultivos foram centrifugados e o sobrenadante obtido foi diluído na proporção 1:10 em água destilada. As absorbâncias foram mensuradas em um espectro de 190 a 1100 nm, a porcentagem de adsorção pela biomassa foi avaliada no comprimento de 598 nm, pico máximo de absorção do corante PR5, e a taxa de adsorção foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ de adsorção: } \frac{\text{Absorbância inicial} - \text{Absorbância final}}{\text{Absorbância inicial}} \times 100$$

4.3. Análises de toxicidade

4.3.1. Avaliação de fitotoxicidade em *Cucumis sativus*

A fitotoxicidade dos bioensaios e controles foi avaliada utilizando sementes de *Cucumis sativus* (pepino), de acordo com Wang et al. (2001), com algumas modificações. As sementes foram expostas diretamente aos sobrenadantes. Para isto, primeiramente, o pH foi ajustado para 7, tanto no controle quanto nos diferentes tratamentos, para que a acidez do sobrenadante não interferisse no crescimento das sementes. Feito isso, 15 sementes livres de agrotóxicos, da marca Topseed, foram colocadas em papel filtro e 5 mL do sobrenadante de cada bioensaio diluído em água (50% de cada amostra) foi adicionado. Após o preparo, as placas foram envoltas individualmente por filme plástico para evitar a evaporação de água, e acondicionadas em BOD a 24 °C ao abrigo de luz, por 5 dias. O controle positivo foi composto por solução de ZnSO₄ (0,05 M) e o controle negativo por água destilada. Ao final do período de exposição foram tomadas as medidas da raiz e do hipocótilo, onde foram consideradas as sementes que apresentaram crescimento maior ou igual a 5 mm e a taxa de inibição do crescimento radicular foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição: } \frac{\text{Média do controle negativo} - \text{Média do bioensaio}}{\text{Média do controle negativo}} \times 100$$

4.3.2. Avaliação da toxicidade aguda em *Aliivibrio fischeri*

Para a avaliação da toxicidade aguda do corante PR5, foram realizados testes utilizando o equipamento Microtox® seguindo a metodologia reportada por Vieira et al. (2021). Esta técnica consiste na análise da redução da bioluminescência emitida naturalmente pela *Aliivibrio fischeri* quando exposta ao agente tóxico. A diminuição da emissão da bioluminescência é então detectada e mensurada pelo equipamento Microtox® e a partir destes dados é determinada a EC50, que é a concentração do agente tóxico que causa a redução de 50% na quantidade de luz emitida pela população da bactéria exposta.

Para isto, primeiramente, o pH foi ajustado para 7, para que a acidez do sobrenadante não interferisse na viabilidade das *A. fischeri*. Feito isso, foi realizada a recuperação e reativação da *A. fischeri* através de uma suspensão inicial da bactéria liofilizada (10^8 células mL⁻¹) no tampão de reativação. Posteriormente, foi feita uma primeira diluição da bactéria, onde 150 µL foi transferido para tubos contendo 1.500 µL da solução NaCl 2%. A partir dessa diluição, 100 µL foram transferidos para cubetas e verificados a luminescência da bactéria (T0). Um volume de 2.500 µL da amostra em diferentes concentrações foi misturada com 250 µL de NaCl 2%, e a mistura foi utilizada para a confecção de diluições seriadas (1:1). Para o controle foi utilizado NaCl 2%. As diluições (900 µL) foram transferidas para as cubetas contendo 100 µL de bactéria. A leitura em luminômetro foi realizada em tempos de 5 e 15 min. Os resultados da leitura da luminescência da bactéria *A. fischeri* foram avaliados em programa específico do equipamento Microtox®, onde foram gerados dados de dose-resposta e determinado o EC50.

4.4. Quantificação da biomassa

Para a quantificação da biomassa fúngica nos bioensaios, os tubos do tipo Falcon que foram utilizados no trabalho tiveram primeiramente as suas massas mensuradas, após o processo de secagem em estufa a 105 °C por 24 h. Os cultivos foram centrifugados nestes tubos por 30 min a 12.057 xg e a 25 °C. O sobrenadante obtido foi utilizado para as análises descritas nos itens 5.2 e 5.3. O micélio foi seco em estufa a 105 °C por 24 h e passado este tempo a massa do tubo foi novamente mensurada. A biomassa foi determinada pelo peso do tubo com micélio menos a massa do tubo vazio.

4.5. Análise de metabólitos por Cromatografia Gasosa associada a Espectrômetro de Massa (GC-MS)

4.5.1. Extração dos metabólitos da degradação do Preto Reativo 5

Para a extração dos metabólitos dos diferentes dias de tratamento (Dia 1, Dia 3, Dia 5 e Dia 7) foi utilizado o acetato de etila (Pureza: > 99.5%, Sigma-Aldrich). Uma alíquota de 30 mL do sobrenadante do ensaio de descoloração do corante Preto Reativo 5 foi adicionada a 30 mL de acetato de etila. Essa mistura foi agitada em vórtex por 5 min para a total obtenção dos metabólitos. Após essa etapa, o conteúdo do tubo foi transferido para um funil de separação, onde permaneceu por 5 min, até a formação completa da interface entre o solvente e o sobrenadante do ensaio. O sobrenadante foi então retirado e passou novamente pelo processo de extração com mais 30 mL de acetato de etila. Essa mistura voltou para o funil de separação, junto com os 30 mL de acetato de etila da primeira extração. Novamente houve o tempo de espera de 5 min para separação das fases e, por fim, os 60 mL totais de acetato de etila foram retirados e armazenados em tubos tipo Falcon.

Ao acetato de etila contendo os metabólitos foi acrescido 1,5 g de sulfato de sódio (Na_2SO_4) para absorver qualquer resquício de solução aquosa. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 3 min a 25 °C e 4.472 xg, o solvente foi filtrado em filtros de seringa de Nylon com diâmetro de 25 mm e poros de 0,20 μm (Analítica) e transferido para tubos de 50 mL e 15 mL. Por fim, as amostras foram concentradas em um concentrador de amostras a 30 °C até a evaporação total do solvente. Os metabólitos presentes no fundo do tubo foram suspensos em 1 mL de acetato de etila e armazenados a -20 °C em frascos de vidro apropriados para a injeção e posterior análise no GC-MS.

4.5.2. Análise de GC-MS dos metabólitos da degradação do corante Preto Reativo 5

Os metabólitos foram avaliados no GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Japão). A metodologia utilizada foi de Li et al. (2015) com modificações. A separação foi realizada em coluna Rtx-5MS (0.25mm, 30m – Restek, Estados Unidos), sendo 2 μL de amostra injetados a 275 °C, com temperatura na coluna a 100 °C aumentando linearmente 9,5 °C por minuto até 280 °C. O hélio foi empregado como gás de arraste com vazão de 2 mL por min. Os dados de espectrometria de massa foram adquiridos no modo de ionização de elétrons (70 eV), com

análise a partir dos 3 min até 18,8 min. A temperatura de interface para MS foi fixada em 280 °C. A identificação dos compostos foi realizada usando o banco de dados da biblioteca do equipamento.

4.6. Cinética de descoloração, destoxificação, atividade enzimática e metabólitos durante a biodegradação do corante Preto Reativo 5 pelo *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

Para verificar o processo de biodegradação do corante PR5 nos tratamentos com condição otimizada na presença do corante PR5 ao longo do tempo, o experimento na concentração de 200 mg L⁻¹ (descrito no item 4.1) foi repetido. Foram feitas triplicatas para cada um dos 7 dias de experimento (repetições destrutivas), as quais foram retiradas a cada 48 h para a análise de degradação utilizando a metodologia conforme os itens 4.2.1.1, 4.2.1.2, 4.3 e 4.5.

4.7. Transcriptômica: Análises comparativas da condição com e sem o azocorante PR5

4.7.1. Extração de RNA

Para as análises de transcriptoma, o RNA das biomassas provenientes dos bioensaios e dos controles (triplicatas) do terceiro dia de tratamento (Dia 3) foram extraídos com o auxílio do kit *RNeasy® Plant Mini kit* (Qiagen), de acordo com protocolo do fabricante. Para tanto, após a centrifugação dos tratamentos e dos controles por 10 min à 17.888 xg e 4°C, as respectivas biomassas foram lavadas com água DEPEC e centrifugadas duas vezes, para que houvesse a remoção do meio de cultivo, no qual estavam anteriormente. Feito isso, as biomassas foram inseridas em nitrogênio líquido. Com o auxílio de pistilos para extração, previamente banhados com SDS, água DEPC e autoclavados, as biomassas foram maceradas. O tampão de extração (Buffer RLT) foi adicionado e a amostra foi vortexizada vigorosamente. Após isso, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos à 35.060 xg. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e transferido para um novo microtubo livre de RNase. Na sequência foi adicionado o mesmo volume (500 µL) de etanol 70% em cada microtubo e a agitação se deu por meio de pipetagem. O volume de 650 µL foi transferido para a coluna “RNeasy Mini Spin” e centrifugado por 15 segundos à 17.888 xg. Todas as etapas subsequentes foram centrifugadas por 1 minuto à 17.888 xg e o “flow-through” descartado, além disso, em todas as etapas de

centrifugação a temperatura foi de 25°C. Dessa forma, foi adicionado 700 µL do tampão de lavagem (Buffer RW 1) à coluna “RNeasy Mini Spin” e submetida a centrifugação. Duas sessões de lavagens de 500 µL do tampão RPE foram executadas, no entanto, a última lavagem ocorreu por 2 minutos em centrífuga. Por fim, a coluna “RNeasy Mini Spin” foi alocada em um novo tubo de coleta e foram adicionados 40 µL de RNase-Free water e centrifugados por 1 min a 17.888 xg. Desta vez o “flow-through” contendo o RNA total foi coletado e armazenado em tubos criogênicos. O RNA total foi tratado com DNase (*Thermo Scientific*), para a retirada de DNA interferente. Após essa etapa, foi retirada uma alíquota para determinar a concentração e integridade do RNA e as amostras foram imediatamente precipitadas em álcool (0,1 volume de 3M de acetato de sódio mais a adição de 2 volumes de etanol 100%) e armazenadas em freezer -20°C.

4.7.2 Determinação da concentração e integridade do RNA

Para determinar a concentração e a pureza do RNA extraído, foi utilizado um espectrofotômetro de ácidos nucleicos Thermo Scientific NanoDrop 2000. A partir de cada amostra, foram removidos 1 µL e imediatamente submetidos ao NanoDrop. Para determinar a integridade das amostras de RNA, a eletroforese foi feita em gel de agarose 1% (0,6 g de agarose para 60 mL de tampão TBE 1x) à 100V por 45 min. Foi utilizado o corante GelRed (Biotium). O gel de agarose foi revelado em um fotodocumentador e após constatar que as amostras de RNA estavam íntegras e com uma concentração adequada de RNA, foi efetuado o envio para a MacroGen.

4.7.3. Sequenciamento e pré-processamentos dos reads

Na MacroGen as amostras passaram por um controle de qualidade para avaliar a concentração, quantidade total de RNA e o RIN, para verificar a pureza e integridade das amostras de RNA enviadas. O sequenciamento foi realizado na plataforma de Illumina NovaSeq 2000. As análises de Bioinformática dos transcriptomas foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Evolução Molecular (LEM) na UNESP de Rio Claro, sob a orientação da Dra. Milene Ferro.

Foi realizado o *download* dos *reads* no formato FASTQ (FASTA com qualidade) e com o auxílio da ferramenta FASTQC (versão 0.11.3) (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) avaliou-se inicialmente a

qualidade dos *reads* gerados. Essa ferramenta realiza um controle de qualidade dos *reads* através das análises estatísticas e apresenta resultados como qualidade das sequências por base, conteúdo e N por bases e presença de sequências super-representadas, presença de adaptadores ou *primers*.

4.7.4. Montagem dos *reads* e verificação da qualidade da montagem

Foi realizada a montagem *de novo* usando o programa Trinity (versão 2.14.0). Ao término da montagem de novo, foi avaliada a qualidade da montagem por meio do programa BUSCO (versão 5) (SEPPEY et al., 2019). Isso foi feito usando um banco de dados sequências de ortólogos (OrthoDB v.10 database) de fungos (fungi_odb10) e os genes foram categorizados em completos (de cópia única ou duplicados), fragmentados e faltantes.

4.7.5. Análise da expressão gênica diferencial e anotação funcional

Para a análise de expressão gênica diferencial foram analisados os genes presentes no transcriptoma do fungo após cultivo na condição otimizada com a adição do corante comparativamente com os genes presentes no transcriptoma do fungo cultivado na condição otimizada sem a adição do corante. Para isso, as leituras de cada condição foram mapeadas no transcriptoma de referência usando o programa Bowtie2 (versão 2.4.4) (LANGMEAD e SALZBERG, 2012) e a quantificação em nível gênico foi realizada no OmicsBox usando a ferramenta RSEM (versão 1.3.3) (LI e DEWEY, 2011). A análise de expressão diferencial foi realizada utilizando NoiSeq-sim versão 2.30.0 (TARAZONA et al., 2015) que simula réplicas sendo que foi feito usando número simulado de 5 réplicas. Foi usado o método *default* de normalização TMM (Trimmed Mean of M-values) e para cada gene o teste de expressão diferencial foi realizado por meio do teste exato GLM (Likelihood Ratio Test) (ROBINSON e SMYTH, 2008).

E por fim, a anotação funcional do transcriptoma de referência foi feita com a plataforma OmicsBox (BioBam, Valencia, Spain) que integra a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), mapeamento de termos de Ontologia Gênica (GO) e identificação de domínios de proteínas com InterProScan, além da identificação dos números enzimáticos (EC number). Com essa anotação completa foi possível identificar genes específicos relacionados com a expressão de enzimas envolvidas na degradação, destoxificação e descoloração do corante PR5 pelo fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

5. Análise estatística dos dados

Os resultados foram analisados por métodos estatísticos. Foram realizados testes de normalidade e os testes de Tukey para comparações múltiplas com o software SigmaPlot 10.0. O valor de p considerado foi de $p < 0.05$. Para todas as análises estatísticas, três réplicas biológicas foram realizadas para cada tratamento e grupo de controle.

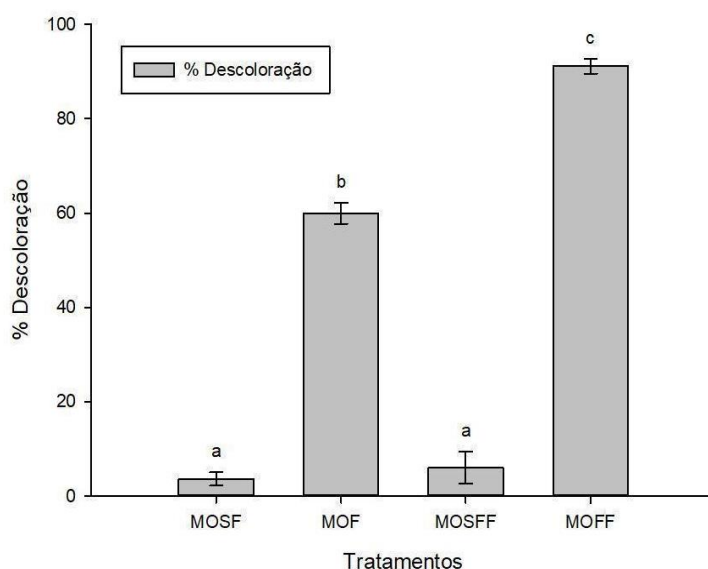
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Determinação do melhor tratamento para a descoloração e destoxificação do corante PR5.

6.1.1. Descoloração em diferentes condições

De acordo com os resultados obtidos, foi possível verificar a variação das taxas de descoloração de acordo com o tratamento realizado (Figura 3). O meio otimizado com farelo de trigo e inóculo fúngico (MOFF) foi o que apresentou maior taxa de descoloração (aproximadamente 94%), validando os resultados obtidos por Bonugli-Santos et al. (2016). Contudo, o meio otimizado com farelo de trigo, mas sem inóculo fúngico (MOF) apresentou uma descoloração expressiva de cerca de 60%, em comparação com o controle (MOSF), indicando uma provável adsorção do corante pelo farelo de trigo. Tal resultado foi observado também por Vieira et al. (2021), onde parte do corante RBBR foi adsorvida pelo farelo de trigo presente no meio de cultivo. Desta forma, a associação do farelo de trigo, com o inóculo fúngico foi fundamental para obtenção de uma alta taxa de descoloração.

Figura 3. Descoloração (%) do corante PR5 obtido em diferentes condições de cultivo. MOSF: Meio otimizado sem farelo de trigo e sem inóculo; MOF: Meio otimizado com farelo de trigo e sem inóculo; MOSFF: Meio otimizado sem farelo de trigo e com inóculo; MOFF: meio otimizado com farelo de trigo e com inóculo, após 7 dias de incubação à temperatura de 28 °C e 140 rpm. Os valores indicados por letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). As linhas verticais representam o desvio padrão.



6.1.2. Descoloração com diferentes indutores

Os indutores são compostos que pertencem a diversas classes e que podem ser substratos ou compostos análogos aos substratos utilizados pelas enzimas ligninolíticas durante sua atividade, como compostos aromáticos e fenólicos (xilidina; 2,5-dimetilanilina; guaiacol; 2-metoxifenol; álcool veratrílico), substratos naturais (ex.: folhas de eucalipto trituradas, serragem, casca de amendoim e palha de arroz), além de alguns íons minerais ou metálicos, como sulfato de cobre (CuSO_4). Esses compostos podem estimular a produção das enzimas ligninolíticas dependendo da sua concentração, além de aumentar a quantidade de oxigênio disponível para os micélios e a permeabilidade da membrana celular, podendo resultar em um aumento na taxa de descoloração do corante naquela condição (GIANFREDA et al., 1999; TEKERE et al., 2001; STRONG e CLAUS, 2011). Consequentemente, os indutores utilizados neste trabalho foram selecionados após uma busca na literatura e terem sido reportados como bons indutores para a descoloração de corantes têxteis (KOLLMANN et al., 2005; LEVIN et al., 2010; SI et al., 2013).

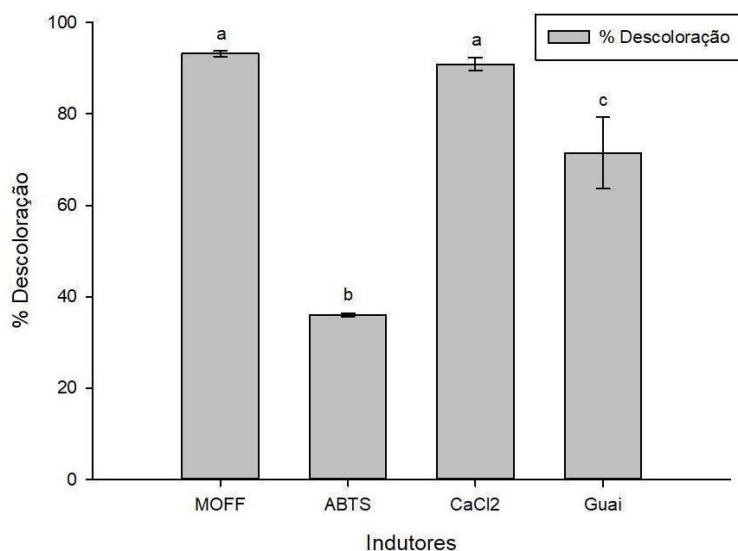
Após a realização da primeira análise de descoloração, descrita no item 6.1.1, ensaios utilizando a condição sem a adição de nenhum indutor (MOFF) e com a adição dos indutores ABTS (1 mM), álcool veratrílico (40 mM), cloreto de cálcio (1mM), 2,5 - Dimethylaniline (1mM), siringaldazina (0,1 mM) e guaiacol (1 mM) foram realizados. Dentre as condições testadas, três apresentaram as melhores taxas de descoloração do corante PR5, com percentuais acima de 70%. A condição MOFF, como acima mencionado (aprox. 94%), seguida pelas condições com a adição de cloreto de cálcio (CaCl_2) e guaiacol (Guai), com taxas de aproximadamente 90% e 71%, respectivamente. A condição com o indutor ABTS também apresentou uma pequena descoloração durante os 7 dias de incubação, mas a porcentagem ficou por volta de 37% (Figura 4).

Tais resultados corroboram com a literatura, pois diversos estudos têm relatado o cloreto de cálcio e o guaiacol como bons indutores para a descoloração de corantes têxteis (CROWE e OLSSON, 2001; DAWKAR et al., 2009; BIRHANLI et al., 2017). Em um estudo conduzido por Dawkar e colaboradores, foi observada uma descoloração de 94% do azul marinho 2GL por *Bacillus* sp. em apenas 18 h após a adição de cloreto de cálcio (1 mM) como indutor no meio de cultura (DAWKAR et al., 2009). Ademais, Gomma et al. (2003) também relatou que adição de CaCl_2 (1M) no meio de cultivo, foi importante para que o fungo filamentoso *Aspergillus niger* fosse capaz de atingir uma taxa de descoloração de 82% do corante verde malaquita (50 mg/L), em um cultivo de 24 h. No caso do guaiacol, estudos relacionados a este composto como

indutor da descoloração de azocorantes por fungos são mais escassos. Entretanto, um estudo realizado por Afreen et al. (2017) avaliou a descoloração do corante antraquinona RBBR (100 mg/ L) pela cianobactéria *Spirulina platensis* CFTRI, a partir da adição de guaiacol na concentração de 1 mM, a mesma utilizada neste trabalho. Os autores observaram uma taxa de descoloração de aproximadamente 46% em 48 h.

Para os outros três indutores, álcool veratrílico (AV), Seringaldazina (Seri) e 2,5-Dimethylaniline (2,5-Dimet), a descoloração não pôde ser quantificada, pois o caldo enzimático apresentou absorvância maior do que o controle (meio otimizado sem inóculo fúngico), o que pode indicar uma modificação na estrutura química do corante, e por isso não estão apresentados no gráfico abaixo. Sendo assim, os três tratamentos que apresentaram a melhor taxa de descoloração, foram selecionados para os próximos experimentos.

Figura 4. Descoloração (%) do corante PR5 obtido em condição otimizada na presença e ausência de indutores. MOFF: Sem adição de nenhum indutor. ABTS: Adição de ABTS. CaCl_2 : Adição de cloreto de cálcio. Guai: Adição de guaiacol, após 7 dias de incubação à temperatura de 28°C e 140 rpm. Os valores indicados por letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). As linhas verticais representam o desvio padrão.



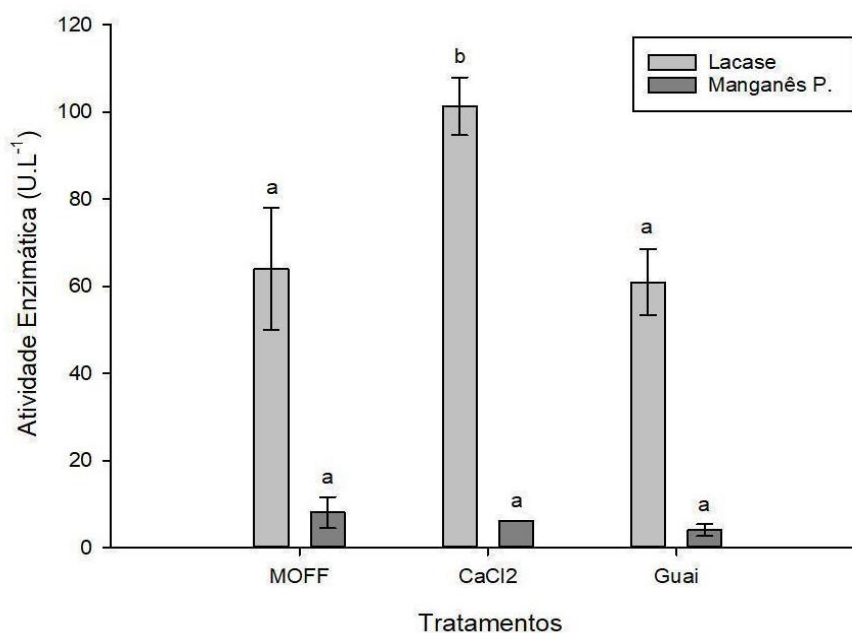
6.1.3. Atividade Enzimática

Para avaliar a influência do metabolismo fúngico no processo de descoloração, a atividade enzimática das enzimas ligninolíticas Lac, MnP e LiP foi avaliada após 7 dias de cultivo nos três tratamentos que apresentaram as melhores taxas de descoloração (MOFF, CaCl_2 e Guai) (Figura 5). Dentre eles, CaCl_2 foi o que apresentou a maior atividade enzimática para lacase (100 U L^{-1}), seguido pelo tratamento MOFF (63 U L^{-1}) e Guai (60 U L^{-1}). Somado a isso, a manganês peroxidase (MnP) também foi detectada, porém em menor quantidade, sendo o tratamento MOFF o que apresentou a maior atividade (7 U L^{-1}), seguida pelo CaCl_2 (6 U L^{-1}) e Guai ($3,6 \text{ U L}^{-1}$). A enzima lignina peroxidase (LiP) não foi detectada em nenhum dos tratamentos (Figura 5).

Os resultados das atividades enzimáticas apresentados já eram esperados, pois no estudo realizado por Bonugli-Santos et al. (2016) com o meio de cultivo MOFF as enzimas MnP e Lac foram produzidas. Além disso, em relação aos outros indutores, estudos relataram o CaCl_2 como um bom indutor para a descoloração de azocorantes e indutor de atividade enzimática, principalmente de lacase (DAWKAR et al., 2009; CROWE e OLSSON, 2001). Em um estudo realizado por Crowe e Olsson (2001), foi relatado que a adição de cloreto de cálcio ao meio de cultivo levou a um aumento da produção de lacase pelo fungo *Cryphonectria parasitica* (Ascomycota). Isso deve-se, possivelmente, ao fato de o cálcio ser um mensageiro secundário em fungos e estar diretamente ligado à indução da lacase. Quando presente no meio o cálcio pode ser particularmente significativo, visto que nos estudos de Crowe e Olson (2001) e Dawkar e col. (2009), o cálcio foi altamente potente e não foi associado a efeitos de estresse ou alterações na morfologia micelial (CROWE e OLSSON, 2001; GOMMA et al., 2003). O guaiacol também foi relatado como um indutor de descoloração de efluentes têxteis, e eficaz para a produção de enzimas ligninolíticas, principalmente lacase (BIRHANLI et al., 2017). A mesma concentração de guaiacol utilizada no presente estudo foi utilizada em outros estudos e mostrou efeito indutivo de lacase no fungo basidiomiceto marinho NIOCC # 2^a (D' SOUZA et al., 2006) e nos fungos de podridão branca *Trametes pubescens* MB 89 (GALHAUP e HALTRICH et al., 2001) e *Pleorutos ostreatus* 32 (HOU et al., 2004). Somado a isso, Ryan et al. (2007) apontou este composto como o indutor mais eficaz no aumento da atividade enzimática, uma vez que, por ser um monômero de lignina, se assemelha muito aos substratos naturais do sistema enzimático ligninolítico, podendo ser facilmente reconhecido pelo fungo.

Entretanto, conforme resultados apresentados anteriormente, a adição destes indutores não incrementou a taxa de descoloração pelo fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 obtida com o tratamento MOFF (Figura 4). Si et al. (2013) reportaram que a adição de cloreto de cálcio não melhorou a descoloração do azocorante Vermelho Congo, além de que este composto pode ter agido como um inibidor competitivo de doadores de elétrons, bloqueando o acesso de substratos ao sítio ativo da enzima, e, portanto, algo parecido pode ter acontecido com o *Peniophora* sp. CBMAI 1063 nessa condição.

Figura 5. Atividade das enzimas Lacase (Lac) e Manganês Peroxidase (MnP) obtida em condição otimizada na presença e ausência de indutores. MOFF: Sem adição de indutor. CaCl_2 : Adição de cloreto de cálcio. Guai: Adição de guaiacol, após 7 dias de incubação à temperatura de 28 °C e 140 rpm. Os valores indicados por letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). As linhas verticais representam o desvio padrão.



6.1.4. Biomassa

A produção de biomassa fúngica também foi avaliada nos três tratamentos que apresentaram as melhores taxas de descoloração (MOFF, CaCl_2 e Guai). De acordo com o gráfico (Figura 6), a biomassa do tratamento MOFF (0,23 gramas) não apresentou diferença significativa em comparação com o controle (0,21 g) (sem adição de corante), enquanto para os outros dois bioensaios, com a presença dos indutores CaCl_2 e Guai, houve uma diferença significativa em comparação com o controle, sendo que nesses tratamentos a produção de biomassa foi menor (0,19 e 0,18 g, respectivamente). Diante disso, no caso do tratamento com cloreto de cálcio (CaCl_2), este composto pode ter interferido em alguma atividade metabólica durante o crescimento do *Peniophora* sp. CBMAI 1063, visto que mesmo sendo o tratamento que apresentou a maior produção de lacase (Figura 5), não houve aumento na taxa de descoloração (Figura 4).

No estudo de Bonugli-Santos et al. (2012) a produção de biomassa do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 não foi afetada pelo corante RBBR adicionado ao meio, apresentando resultados semelhantes aos controles (meio livre de RBBR). Em adição, estudos realizados com consórcios constituídos de fungos filamentosos de origem marinha e bactérias associadas a degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes, apresentaram indícios de que a presença do corante RBBR no meio líquido não interferiu no crescimento microbiano (VIEIRA et al., 2021).

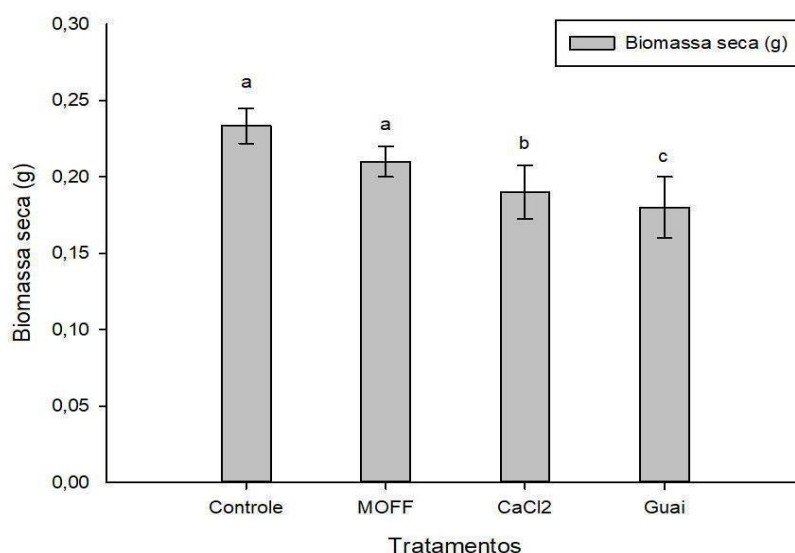
Dados reportados na literatura relacionados aos indutores, mostraram que mesmo com a indução da produção de enzimas ligninolíticas, estes podem interferir no crescimento do micélio fúngico, resultando em uma biomassa significativamente menor em comparação com o controle. Em estudos com a adição indutor guaiacol (1mM), por exemplo, o crescimento do micélio do ascomiceto *Alternaria alternata* foi reduzido, o que pode ser devido às mudanças em alguma atividade do metabolismo durante o seu crescimento (KAUR et al., 2018; THAKKAR e BHATTA, 2020).

Em contrapartida, um estudo realizado por Ryan et al. (2007), na avaliação da biodegradação de compostos fenólicos pelo fungo de podridão branca *Trametes versicolor*, demonstrou que a adição do guaiacol (1 mM), aumentou a produção de lacase em aproximadamente 780%, sem inibir o crescimento fúngico. Fonseca et al. (2014) relataram que a adição de guaiacol (0,3 mM) no meio de cultivo do basidiomiceto *Phlebia brevispora* BAFC 633, apresentou um efeito positivo no crescimento fúngico, enquanto a adição do cloreto de

cálcio na mesma concentração não alterou o crescimento e, conseqüentemente, a produção de biomassa desse fungo.

Portanto, com base nos resultados obtidos no presente estudo e em estudos realizados por outros grupos de pesquisa reportados em literatura, podemos inferir que os indutores podem interferir no crescimento fúngico e na descoloração do corante PR5.

Figura 6. Medida de biomassa seca obtida na condição otimizada com ou sem a presença de indutores. Controle: Meio otimizado sem corante. MOFF: Sem adição de nenhum indutor. CaCl_2 : Adição de cloreto de cálcio. Guai: Adição de guaiacol, após 7 dias de incubação à temperatura de 28°C e 140 rpm. Os valores indicados por letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). As linhas verticais representam o erro padrão.



6.1.5. Fitotoxicidade e Toxicidade Aguda

Para as análises de toxicidade, foram realizados dois testes, um de toxicidade aguda, utilizando a bactéria de origem marinha *A. fischeri*, e outro de fitotoxicidade utilizando sementes de *C. sativus* (pepino) como bioindicadores. Esses dois ensaios atingem diferentes níveis tróficos, contemplando tanto o meio aquático, quanto o terrestre, tendo assim uma melhor visão da destoxificação apresentada pelos biotratamentos. A análise de toxicidade é relevante, pois os intermediários do processo de degradação de um poluente podem ser mais tóxicos do que o composto original (GIOVANELLA et al., 2020; OBEROI e PHILIP, 2017; SILVA et al., 2013).

Para todos os bioensaios realizados, a toxicidade nos tratamentos com o fungo basidiomiceto *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi menor do que a obtida no experimento controle (meio de cultivo e corante, sem adição do inóculo fúngico) (Tabela 2).

Tabela 2. Ensaio de toxicidade aguda obtido com *Aliivibrio fischeri* e fitotoxicidade em *Cucumis sativus* dos tratamentos após o período de incubação na condição otimizada com ou sem a presença de indutores. Controle: Meio otimizado, com corante e sem inóculo fúngico; MOFF: Sem adição de nenhum indutor. CaCl₂: Adição de cloreto de cálcio. Guai: Adição de guaiacol, após 7 dias de incubação à temperatura de 28°C e 140 rpm. Os valores indicados por letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tratamento	<i>C. sativus</i>		<i>A. fischeri</i>
	Fitotoxicidade (%)	Destoxificação (%)	EC ₅₀ (%)
Controle	46,49 ± 0,74 a	-----	26,37 ± 3,8 a
MOFF	24,50 ± 1,80 b	47,3	47,9 ± 2,0 b
CaCl ₂	27,43 ± 2,7 c	41	29,59 ± 2,7 a
Guai	35,39 ± 2,7 d	23,8	43,71 ± 9,7

No que diz respeito a fitotoxicidade, o melhor resultado obtido foi com o tratamento MOFF (24,50%), o qual foi capaz de reduzir a toxicidade do controle em aproximadamente 50%, indicando a capacidade do *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em destoxificar o corante PR5. Os tratamentos com os indutores CaCl₂ e Guai também apresentaram redução da toxicidade em comparação com o controle (27,43% e 35,39%, respectivamente), porém com uma maior inibição do crescimento de *C. sativus*.

Com relação aos experimentos de toxicidade aguda, temos que quanto maior o resultado (EC₅₀) obtido neste teste, menor é a toxicidade e letalidade do composto testado para as bactérias. Posto isto, o tratamento MOFF também apresentou o melhor resultado, com EC₅₀ de 47,9%, enquanto a do controle foi de 26,37%. Para os outros dois bioensaios, o tratamento na presença de Guai apresentou resultado de menor toxicidade (43,71%) em relação ao controle (26,37%). Contudo, analisando esses dados, percebe-se que a toxicidade dos tratamentos na presença dos indutores varia entre os dois ensaios, indicando que os indutores mostraram-se mais ou menos tóxicos para um bioindicador do que para outro.

A taxa de destoxificação das condições na presença dos dois indutores, apesar de ser menor que o tratamento MOFF, apresentaram resultados de fitotoxicidade menor do que o controle. Diferentes estudos demonstraram que tanto o cloreto de cálcio quanto o guaiacol, quando adicionados ao meio de cultivo, não aumentaram a toxicidade do meio. Isso se deve possivelmente, a baixa toxicidade destes compostos quando utilizados na concentração de 1 mM (utilizada no presente estudo).

Estudos realizados por Gomma et al. (2013) e Santana et al. (2018), utilizaram o cloreto de cálcio e o guaiacol na concentração de 1 mM nos meios de cultivo dos fungos *Aspergillus niger* e *Lentinus crinitus*, com o objetivo de biodegradar azocorantes. Foi demonstrado que não houve efeito tóxico desses indutores, para nenhum dos dois fungos nas condições utilizadas. Além disso, resultados similares foram reportados por outros autores, como é o caso do estudo publicado por Enayatizamir et al. (2011), onde foi observado que não houve geração de compostos tóxicos após a biodegradação do corante PR5 pelo fungo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*, utilizando o *A. fischeri* como bioindicador. De acordo com Freitas et al. (2009), o fungo basidiomiceto *Pleurotus sajor-caju* foi capaz de realizar o tratamento biológico do efluente proveniente de uma fábrica de branqueamento de papel kraft sem promover um aumento na toxicidade, a qual foi avaliada utilizando também o *A. fischeri* como bioindicador em ensaio com o Microtox®.

Os resultados obtidos no presente estudo colaboram com os resultados do teste de AMES realizado por Bonugli-Santos et al. (2016), os quais mostraram que o corante PR5 e seus metabólitos não apresentaram mutagenicidade após o tratamento.

A partir dos resultados acima expostos, o tratamento MOFF foi o que apresentou a melhor capacidade de descoloração e destoxificação nas condições estudadas. Portanto, o tratamento MOFF foi selecionado para as próximas etapas do projeto cujo objetivo foi ampliar o conhecimento dos processos biológicos envolvidos na biodegradação do corante PR5 pelo *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

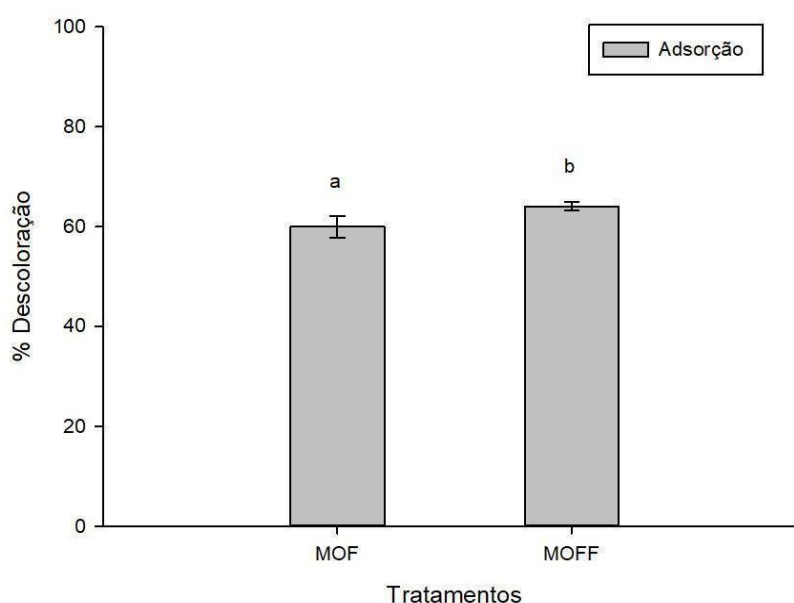
6.2. Análise de adsorção do corante PR5 pelo micélio fúngico

Foi realizada a análise de adsorção do micélio fúngico inativo tanto no controle como no tratamento MOFF. Os resultados apresentados na Figura 7 indicam que houve uma baixa adsorção do corante pelo micélio fúngico. O tratamento MOFF com o micélio fúngico inativado apresentou 63,57% de descoloração enquanto o controle apresentou 59,96%. Embora tenha uma diferença significativa, esta foi pequena representando menos de 5%.

A adsorção é reportada como uma das principais formas de remoção de poluentes, sendo um método simples e com bom custo-benefício. De acordo com Ambrósio et al. (2012), o fungo *Cunninghamella elegans* UCP542 removeu 85% do corante PR5 por adsorção. Entretanto, um estudo realizado por Levin et al. (2019) o papel da adsorção pelo micélio fúngico na descoloração do corante PR5 foi mínimo, responsável por menos de 5% da remoção do corante azo pelos fungos *Trametes versicolor* LE130 e LA1. Resultado similar foi encontrado por Mazmanci et al. (2005), no qual o basidiomiceto *Funalia trogii* não apresentou resultados significativos para a adsorção do azocorante PR5.

Os resultados do presente estudo demonstram que a descoloração do corante PR5 pode estar vinculada a diversos fatores. Embora, uma grande parte do corante tenha sido adsorvida pelo farelo de trigo presente no meio de cultivo (Figura 3), a análise da biomassa seca sugere que o *Peniophora* sp. CBMAI 1063 consumiu o farelo de trigo e o corante têxtil como nutrientes para o crescimento (Figura 6). Portanto, esses resultados indicam que a adsorção pela biomassa microbiana do corante combinada com o farelo de trigo e ação das enzimas ligninolíticas e outras enzimas (metabolismo fúngico), tiveram papel importante na remoção de cor e destoxificação do PR5.

Figura 7. Porcentagem (%) da descoloração do micélio inativo obtida na condição otimizada sem a presença de indutores. MOF: Meio otimizado com farelo de trigo e sem inóculo. MOFF: Sem adição de nenhum indutor, com o inóculo fúngico, crescidos por 3 dias de incubação à temperatura de 28 °C e 140 rpm. Os valores indicados por letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). As linhas verticais representam o erro padrão.



6.3. Cinética de descoloração, destoxificação e atividade enzimática do corante PR5 pelo *Peniophora* sp. CBMAI 1063

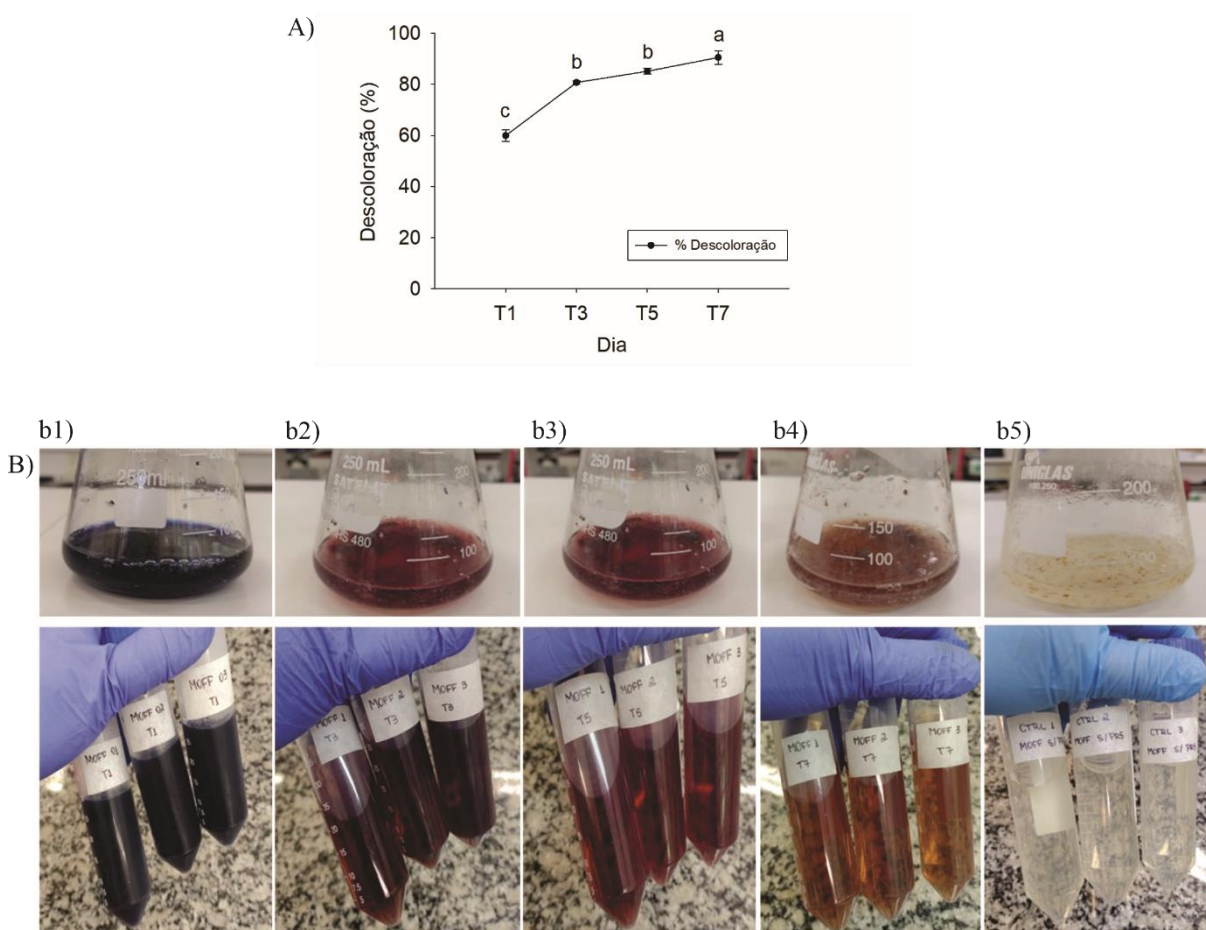
Para um maior entendimento do processo de descoloração e destoxificação do corante PR5 pelo fungo basidiomiceto marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063 análises cinéticas relacionadas à descoloração, fitotoxicidade (*Cucumis sativus*) e atividade enzimática (lacase e manganês peroxidase) foram realizadas em diferentes tempos de incubação (1 dia, 3 dias, 5 dias e 7 dias). Ao analisar os resultados obtidos (Figura 8, 9 e 10), nota-se que os dados referentes ao terceiro dia de tratamento (T3) foram os que apresentaram os melhores e mais significativos resultados, diante das análises realizadas.

Os resultados referentes à análise de descoloração (Figura 8a), realizada com acompanhamento de 48 h de intervalo, revelaram que o fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 atingiu o máximo de descoloração de aproximadamente 94% no sétimo (T7), último dia de tratamento. Entretanto, a partir do terceiro dia (T3) já foi possível visualizar uma taxa de descoloração de aproximadamente 80% do corante PR5 naquela condição, a qual só foi aumentando de maneira mais lenta e gradual até atingir o pico máximo de descoloração observada no sétimo dia. Resultado semelhante foi obtido no estudo realizado por Bonugli-Santos et al. (2016), onde o processo de descoloração ocorreu em duas etapas. Na primeira etapa (24 h) a concentração do corante diminuiu rapidamente e a cor da solução tornou-se roxa, enquanto na segunda etapa (144 h), a concentração do corante diminuiu lentamente até alcançar uma coloração bem mais clara em comparação com a condição inicial. De acordo com Ip et al. (2010), a descoloração completa envolve duas etapas, sendo a primeira, a redução da ligação azo, resultando em um intermediário roxo que ainda possui uma ligação azo remanescente (composto intermediário) e na segunda etapa, ocorre a redução adicional da ligação azo do composto intermediário formado.

A primeira etapa acontece de maneira bem mais rápida que a segunda, confirmando assim o perfil encontrado neste trabalho. A descoloração em duas etapas do azocorante PR5 é atribuída à diferença de reatividade entre os grupos hidroxila (-OH) e os grupo amino (-NH₂), que são os grupos ativadores de compostos aromáticos, referente à substituição eletrofílica na posição orto, relacionada às ligações azo (ENAYATIZAMIR et al., 2011). Em um outro estudo, utilizando fungos basidiomicetos, em especial o *Ceriporia lacerata*, realizado por Wang et al. (2017), no processo de descoloração do azocorante Vermelho Congo, foi registrado um percentual de aproximadamente 80% de descoloração após um período de incubação de apenas

48 h. Além disso, Enayatizamir et al. (2011) reportaram uma taxa de 90% de descoloração do corante PR5 pelo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* após 4 dias de tratamento, utilizando uma concentração 50% menor do corante PR5 (100 mg L^{-1}) do que a utilizada neste estudo e sem condição salina. Assim, os resultados obtidos no presente estudo demonstram o potencial do fungo do ambiente marinho para a aplicação em processos salinos, como a degradação de corantes têxteis.

Figura 8. Cinética de descoloração do corante PR5 obtida no tratamento em condição otimizada na presença do corante PR5 após 7 dias de incubação à temperatura de 28°C e 140 rpm. A). T1: 1 dia de incubação; T3: 3 dias de incubação; T5: 5 dias de incubação e T7: 7 dias de incubação. B) Imagem da descoloração nos diferentes tempos de incubação. b1) 1 dia de incubação; b2) 3 dias de incubação; b3) 5 dias de incubação, b4) 7 dias de incubação e b5) controle. Os valores indicados por letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). As linhas verticais representam o erro padrão.



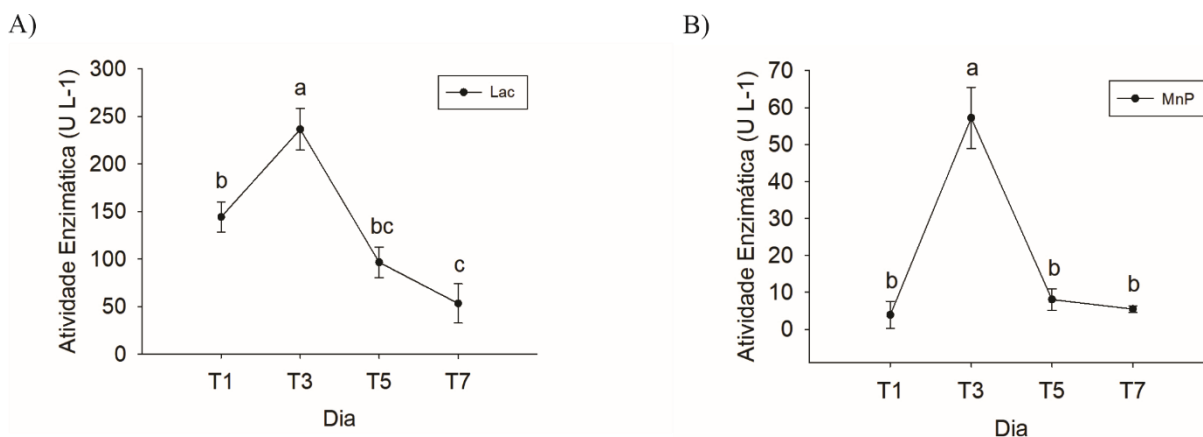
Com relação à cinética da atividade enzimática, os resultados das enzimas lacase (Lac) e manganês peroxidase (MnP) estão apresentadas na figura 9. Essas duas enzimas atingiram o pico de atividade no terceiro dia de tratamento (T3), onde a lacase apresentou uma atividade

enzimática de aproximadamente 250 U L⁻¹, e a manganês peroxidase de 60 U L⁻¹, após este período de incubação a atividade dessas duas enzimas diminuíram de modo expressivo. Resultado semelhante foi observado por Bonugli-Santos et al. (2016), onde foi detectado a produção e a presença dos genes de lacase e manganês peroxidase durante todo processo de descoloração/degradação. Assim como no presente estudo, Bonugli-Santos e colaboradores, observaram que houve um pico de expressão de ambas as enzimas entre os dias 2 e 5, que é quando a taxa de descoloração máxima é atingida (aprox. 94%) e após isso, as atividades diminuem. Uma condição parecida foi reportada por SI et al. (2013), em estudo com o fungo *Trametes pubescens* Cui 7571, o qual apresentou um pico de atividade de Lac e MnP, no terceiro dia de tratamento do azocorante Vermelho Congo, detendo uma porcentagem de descoloração de aproximadamente 98% ao final do sétimo dia tratamento.

Estudos realizados por Vilalobos et al. (2020), mostraram uma taxa de 84% na remoção da cor do azocorante Orange II (25 mg L⁻¹), em aproximadamente 24 h, através da ação do extrato bruto de lacase (120 U L⁻¹) do fungo de podridão branca *Trametes versicolor*. No presente estudo, a atividade enzimática da lacase alcançou cerca de 250 U L⁻¹ em um intervalo de 72 h e uma porcentagem de descoloração por volta de 80%. Isso pode indicar que dentre as enzimas mensuradas, a lacase teve papel de destaque na degradação do corante nas condições estudadas.

Além disso, em alguns trabalhos da literatura, a manganês peroxidase também é reportada como sendo a principal enzima associada a degradação de corantes azo por basidiomicetos. Estas enzimas pertencem à família de glicoproteínas contendo heme e ao grupo das oxidoredutases, enzimas que participam dos processos de biodegradação, como a descoloração de corantes presentes em efluentes têxteis e oxidação de diversos tipos de compostos aromáticos (CHOWDHARY et al., 2018; REKIK et al., 2019). Um estudo realizado por Rao et al. (2019) registrou que dentre os 30 fungos basidiomicetos analisados, aproximadamente 70% produziram MnP de maneira expressiva. Também foi registrada uma queda na produção de lacase assim que a síntese de manganês peroxidase entrou em fase exponencial. Em adição, Xiaobin et al. (2007) reportaram que o extrato bruto do fungo de podridão branca *Schizophyllum* sp. F17 continha a enzima MnP, e o mesmo foi capaz de descolorir 30% do azocorante Orange IV, após 60 min de tratamento.

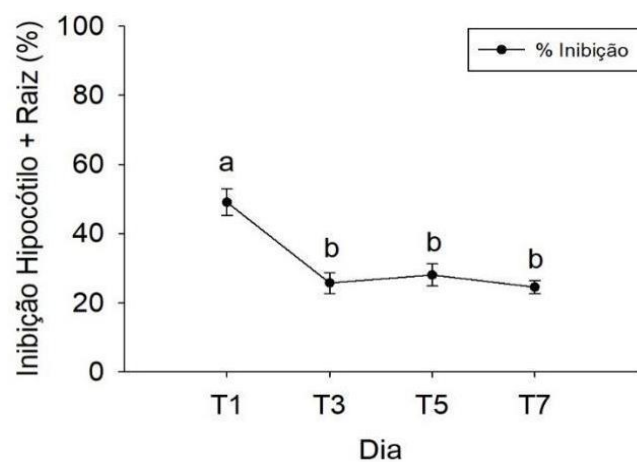
Figura 9. Cinética de atividade enzimática obtidas do tratamento em condição otimizada do do corante PR5 após 7 dias de incubação à temperatura de 28°C e 140 rpm. A) Cinética da enzima lacase (Lac), sendo T1: 1 dia de incubação; T3: 3 dias de incubação; T5: 5 dias de incubação e T7: 7 dias de incubação. B) Cinética da enzima manganês peroxidase (MnP), sendo T1: 1 dia de incubação; T3: 3 dias de incubação; T5: 5 dias de incubação e T7: 7 dias de incubação. Os valores indicados por letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). As linhas verticais representam o erro padrão.



Observando a figura 10 é possível observar que a inibição do hipocótilo + raiz da espécie vegetativa *Cucumis sativus* foi maior no primeiro dia (T1), a qual apresentou uma taxa de inibição de aproximadamente 60% frente ao composto inicial do PR5. Entretanto, com o decorrer do experimento a taxa de inibição diminuiu, permanecendo em aproximadamente 25% nos dias 3, 5 e 7 (T3, T5 e T7, respectivamente). A diminuição na taxa de inibição do hipocótilo e da radícula da plântula de pepino (*Cucumis sativus*), a partir do terceiro dia de tratamento, se mostrou semelhante aos resultados encontrados nos experimentos de cinética de descoloração e atividade enzimática, uma vez que os resultados encontrados no terceiro dia de tratamento foram muito mais abruptos e significativos, em comparação com os outros dias, em que o tratamento se deu de maneira mais lenta e gradual.

Resultados similares foram encontrados ao final da cinética de degradação no trabalho de Si et al. (2013), o qual indicou que os metabólitos resultantes do processo de descoloração e degradação do azocorante Vermelho Congo pelo fungo de podridão branca *T. pubescens*, tiveram um efeito quase insignificante sobre a germinação e comprimento do hipocótilo e radículas das sementes de plantas *Phaseolus mungo* (feijão-comum), *Sorghum vulgare* (sorgo) e *Triticum aestivum* (trigo-mole) em comparação com a condição vista no primeiro dia de tratamento. Somado a isso, um estudo de toxicidade realizado por Enayatizmir et al. (2011), com amostras de diferentes estágios de degradação (4, 10 24 e 48 h), indicou que *P. chrysosporium* converteu o corante tóxico RB5 em um metabólito não tóxico ao final do tratamento.

Figura 10. Cinética de destoxificação avaliada com *Cucumis sativus* obtidas do tratamento em condição otimizada do corante PR5 após 7 dias de incubação à temperatura de 28°C e 140 rpm. T1: 1 dia de incubação; T3: 3 dias de incubação; T5: 5 dias de incubação e T7: 7 dias de incubação. Os valores indicados por letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). As linhas verticais representam o erro padrão.



6.4. Cinética de degradação do corante PR5 pelo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 e análise da formação de metabólitos.

Com o intuito de pesquisar os metabólitos formados durante o processo de degradação do azocorante preto reativo 5 (PR5) pelo fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063, foram efetuadas análises em GC-MS. Os resultados demonstraram que diferentes compostos foram formados em diferentes tempos de incubação. (T1, T3, T5 e T7), além da formação de diversos metabólitos diferentes daqueles encontrados nos controles, possivelmente resultantes da degradação do corante.

Frente a isso, uma primeira análise foi realizada sobre os compostos metabólitos encontrados nos cromatogramas nos três diferentes tempos de análise (T1, T3, T5 e T7). Para isso, foi utilizado o padrão composto por 20 tipos diferentes de aminas carcinogênicas da marca AccuStandard (AE-00049-R1 - Carcinogenic Aryl Amine Mix in Ethyl Ac.). Nessa primeira análise, foi constatado que não houve a formação de aminas carcinogênicas durante o processo de degradação do azocorante PR5, em nenhum dos períodos analisados. Essa análise é importante pois nos mostra a capacidade de degradação dos fungos sem a produção de aminas aromáticas com base em suas propriedades extracelulares (AL-TOHAMY et al., 2020).

Os espectros obtidos após análises de GC-MS dos bioensaios com o fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 utilizando 200 mg L⁻¹ do corante Preto Reativo 5 estão apresentados nas Figuras 11, 12, 13 e 14, respectivamente.

Figura 11 – Compostos identificados por GC-MS nos extratos do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 após incubação por 1 dia a 28 ° C e 140 rpm na presença do corante Preto Reativo 5 (concentração de 200 mg L⁻¹). A: Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl); B: Octadecane; C: Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl); D: Sulfurous acid, 2-propyl tetradecyl ester; E: Tetradecanoic acid; F: Phthalic acid, bis(7-methyloctyl) ester; G: n-Hexadecanoic acid; H: Octadecanoic acid; I: Acetic acid, 3,7,11,15-tetramethyl-hexadecyl ester. Em azul os compostos de degradação e em verde os compostos naturais de basidiomicetos. Linha azul representa o bioensaio, linha preta o controle.

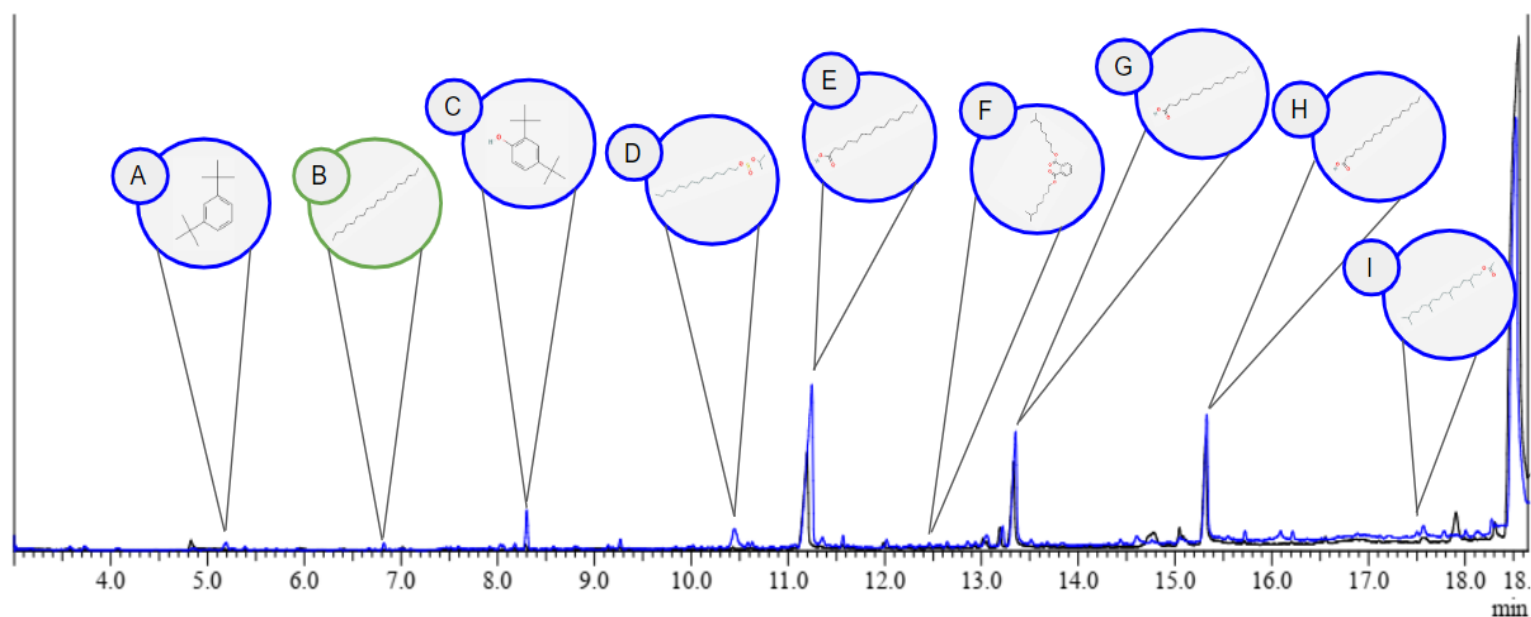


Figura 12 – Compostos identificados por GC-MS nos extratos do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 após incubação por 3 dias a 28 °C e 140 rpm na presença do corante Preto Reativo 5 (concentração de 200 mg L⁻¹). A: Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl); B: Octadecane; C: Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl); D: Sulfurous acid, 2-propyl tetradecyl ester; E: Tetradecanoic acid; F: Phthalic acid, bis(7-methyloctyl) ester; G: n-Hexadecanoic acid; H: Octadecanoic acid; I: Acetic acid, 3,7,11,15-tetramethyl-hexadecyl ester; J: Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl); K: Oxalic acid, pentadecyl propyl ester; L: Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester. Em azul os compostos de degradação e em verde os compostos naturais de basidiomicetos. Linha azul representa o bioensaio, linha preta o controle.

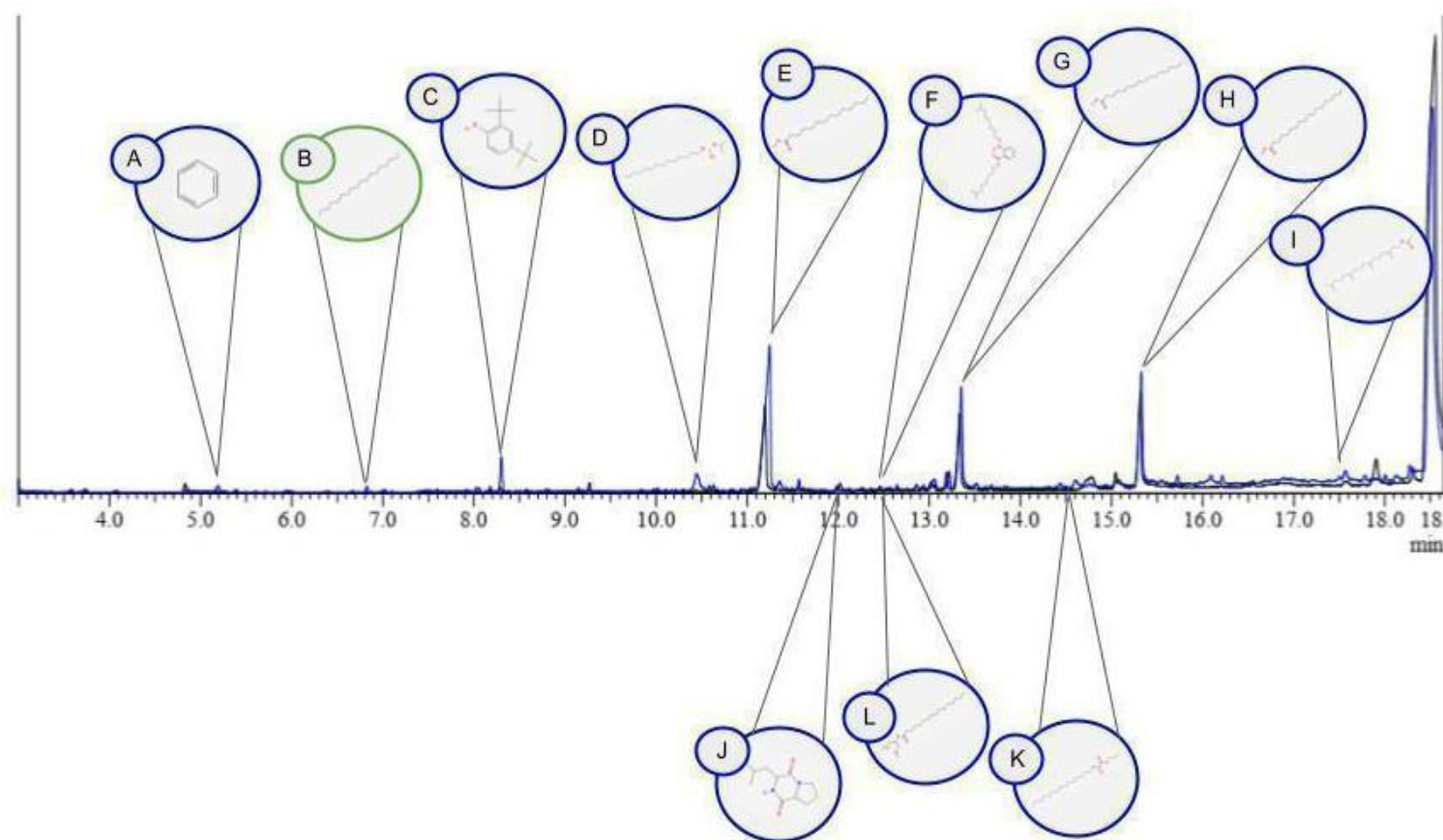


Figura 13 – Compostos identificados por GC-MS do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 após incubação por 5 dias a 28 ° C e 140 rpm na presença do corante Preto Reativo 5 (concentração de 200 mg L⁻¹). A: Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl); B: Octadecane; C: Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl); D: Sulfurous acid, 2-propyl tetradecyl ester; E: Tetradecanoic acid; G: n-Hexadecanoic acid; H: Octadecanoic acid; I: Acetic acid, 3,7,11,15-tetramethyl-hexadecyl ester; J: Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl); K: Oxalic acid, pentadecyl propyl ester; L: Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester. Em azul os compostos de degradação e em verde os compostos naturais de basidiomicetos. Linha azul representa o bioensaio, linha preta o controle.

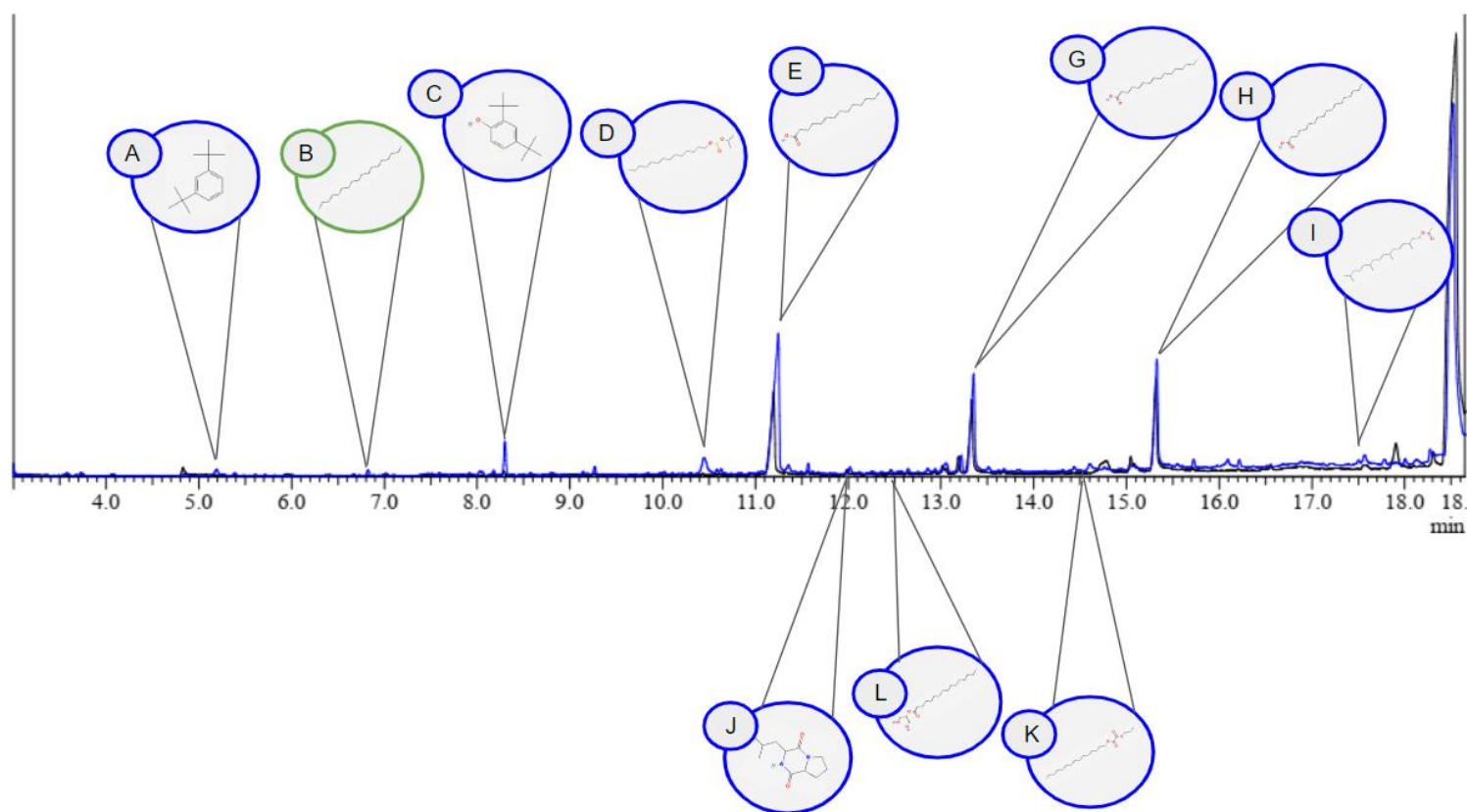
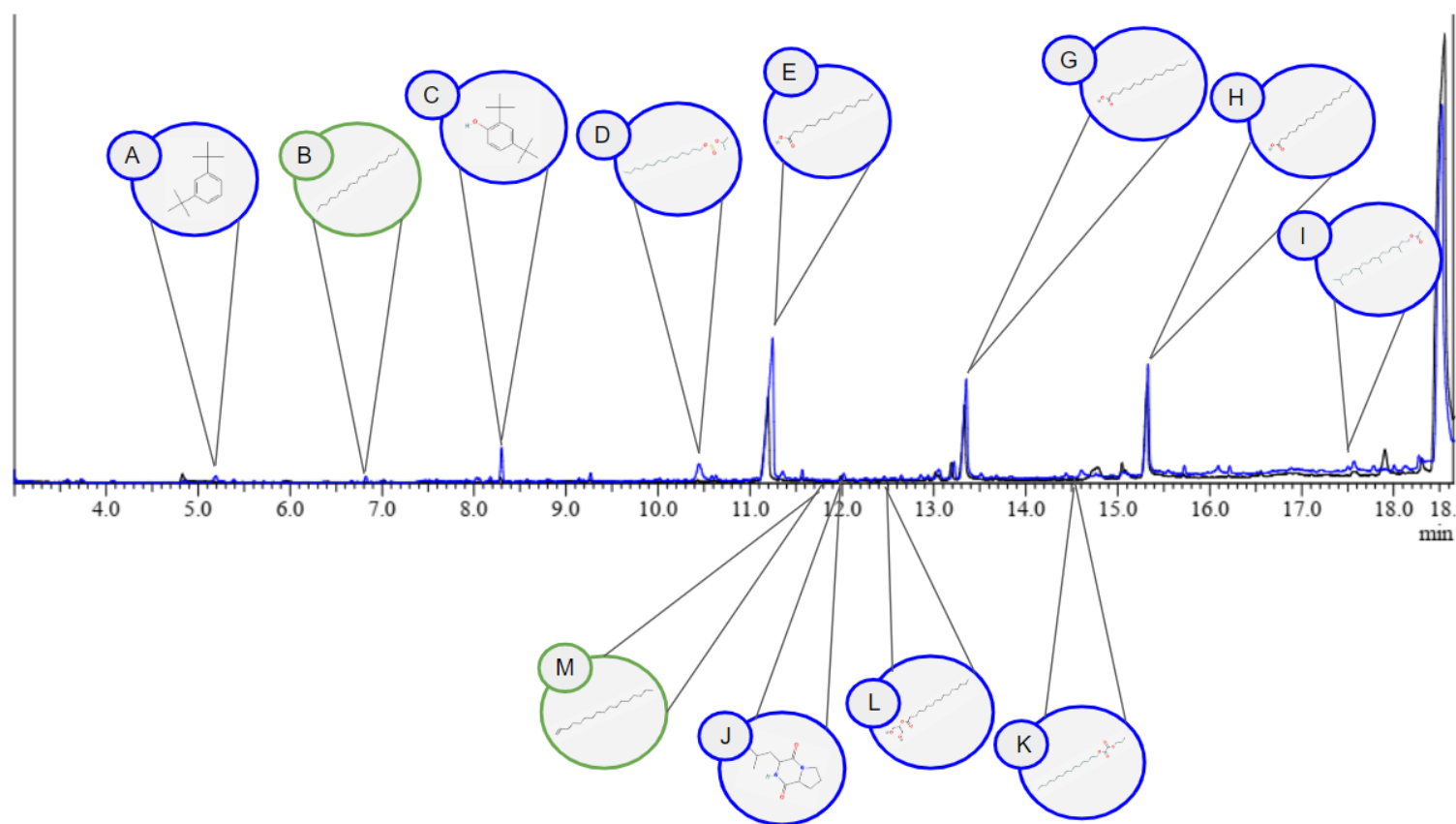


Figura 14 – Compostos identificados por GC-MS do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 após incubação por 7 dias a 28 ° C e 140 rpm na presença do corante Preto Reativo 5 (concentração de 200 mg L⁻¹). A: Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)-; B: Octadecane; C: Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-; D: Sulfurous acid, 2-propyl tetradecyl ester; E: Tetradecanoic acid; G: n-Hexadecanoic acid; H: Octadecanoic acid; I: Acetic acid, 3,7,11,15-tetramethyl-hexadecyl ester; J: Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl); K: Oxalic acid, pentadecyl propyl ester; L: Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester; M: 1-Heptadecene. Em azul os compostos de degradação e em verde os compostos naturais de basidiomicetos. Linha azul representa o bioensaio, linha preta o controle.



O primeiro composto alvo encontrado nas análises a partir do ensaio com o fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi uma variação da molécula de benzeno (Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)), um hidrocarboneto aromático, que foi detectado no tempo de retenção (TR) 5.19 min, em todos os períodos analisados (Figuras 11A, 12A, 13A e 14A). A mesma molécula já foi apontada como sendo um dos principais produtos de degradação do azocorante Vermelho Metil, com conformação semelhante à do Preto Reativo 5 (EL-RAHIM et al., 2021). Essa molécula é classificada como um terpenóide e pode ter ação alelopática, interferindo na síntese de proteínas, lipídeos, aminoácidos, respiração e fotossíntese em plantas, levando a um menor desenvolvimento (KAIIRA et al., 2021). Algumas outras variações da molécula de benzeno, incluindo a molécula simples sem ramificações, também foram reportadas como sendo possíveis compostos intermediários da degradação de corantes azo, como o Preto Mordente 11 e Preto Reativo 5 (AL-TOHAMIN et al., 2021; TAHIR & YASMIN, 2021).

No TR 8,3 min, em todos os períodos analisados (11C, 12C, 13C e 14C) foi registrada uma molécula ramificada de fenol (Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)). Diversas moléculas que possuem o grupo fenol em sua composição, podem ser compostos resultantes do processo de dessulfanização e desnitrificação enzimática de corantes azo, como Vermelho Congo, Mordant Black 11, Vermelho de Metila, Rodamina-B, moléculas com conformação semelhante à da molécula do Preto Reativo 5 (KISHOR et al., 2021; EL-RAHIM et al., 2021; SARAVANAN et al., 2022; TAHIR & YASMIN, 2021). A sua presença no bioensaio e a diminuição da concentração nos dois últimos períodos analisados (T5 e T7), pode ser mais um indicativo para a fitotoxicidade observada e a sua diminuição ao longo dos dias (Figura 8b). Além disso, a presença do phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) é também um indicativo de rota de degradação do corante, por ser um dos precursores do ácido acético. O éster de ácido acético (Acetic acid, 3,7,11,15-tetramethyl-hexadecyl ester), um derivado do ácido carboxílico de cadeia curta, foi detectado em todos os períodos analisados no TR 17,5 min (Figuras 11I, 12I, 13I e 14I). Este composto foi reportado como um produto intermediário da quebra de compostos aromáticos, na degradação do Mordant Black 11 (TAHIR & YASMIN, 2021).

Um éster derivado do ácido sulfúrico (Sulfurous acid, 2-propyl tetradecyl ester) foi detectado no TR 10,4 min, em todos os períodos analisados (Figuras 11D, 12D, 13D e 14D). A presença de ésteres provenientes do ácido sulfúrico, já foi reportada como sendo relacionada a degradação do azocorante Acid Blue 113 (SHANMUGAN et al., 2017). Além disso, a presença de ácido sulfúrico é também um indicativo de rota de biodegradação do azocorante, visto que pode ser um dos precursores do ácido oxálico e de duas diferentes moléculas relacionadas ao ácido hexadecanóico (Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester e n-

Hexadecanoic acid), presentes nas análises de GC-MS do bioensaio com PR5. Uma das primeiras moléculas resultantes da degradação do éster de ácido sulfúrico é um éster do ácido hexadecanóico (Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester), o qual aparece no TR 12,39 min, presente também em todos os 4 períodos analisados (Figuras 11L, 12L, 13L e 14L). Este éster é um produto da dessulfonação do éster do ácido sulfúrico e um indicativo de degradação do corante PR5, o qual pode ser rapidamente metabolizado/transformado pelo metabolismo fúngico em ácido oxálico e ácido hexadecanóico (ácido palmítico).

O ácido oxálico (Oxalic acid, pentadecyl propyl ester) presente neste estudo nos últimos três períodos analisados (Figuras 12K, 13K e 14K), no TR 14,4 min é conhecido por ser o principal ácido carboxílico de cadeia curta gerado como produto oxidativo do processo de degradação de alguns azocorantes como Vermelho Congo e Acid Blue 113 (SOLANO et al., 2015; SHANMUGAM et al., 2017). O ácido oxálico é considerado um metabólito fitotóxico, entretanto, mesmo presente nos bioensaios a partir do 3º dia, a fitotoxicidade não foi maior do que a observada no primeiro dia de análise (Figura 8b) (CHAVES et al., 2001; HUANG et al., 2012).

O pico no TR 13,5 min, presente em todos os períodos analisados (11G, 12G, 13G e 14G) é referente ao ácido hexadecanóico. Segundo Shanmugnam et al. (2017), o ácido hexadecanóico é um ácido graxo saturado e um dos metabólitos finais da degradação de corantes azo, podendo ser utilizados para o metabolismo fúngico como fonte de carbono (AJAZ et al., 2019; MUNEEER et al., 2019). De uma maneira geral, ácidos graxos de cadeia intermediária, como os encontrados no ensaio, estão relacionados com o processo de biodegradação de corantes azo. Além disso, também são reportados por apresentarem fitotoxicidade à algumas espécies de plantas (FUKUDA et al. 2004), entretanto tanto o ácido mirístico (ou tetradecanóico), encontrado no TR 11,2 min (Figura 11E, 12E, 13E e 14E) e o ácido octadecanóico, registrado no TR 15,3 min (Figura 11H, 12H, 13H e 14H), não afetaram a espécie vegetal (*Cucumis sativus*) testada nesse estudo.

Outro metabólito encontrado nas análises de GC-MS e que está relacionada ao ácido hexadecanóico, como sendo um de seus precursores é o éster de ácido ftálico (Phthalic acid, bis(7-methyloctyl) ester), detectado no 1º e no 3º dia do bioensaio (Figura 11F e 12F), no TR 12,4 min. Esse composto pode ser transformado em diferentes ácidos graxos e aldeídos, entrando em reações de β oxidação, produzindo NADH₂ e FADH₂ e ATP (AJAZ et al., 2019). Além disso, essas moléculas podem ser sintetizadas artificialmente ou produzidas por plantas e microrganismos. As moléculas sintéticas são conhecidas como potencialmente perigosas para o ecossistema em que são descartadas, por muitas vezes apresentarem características

cancerígenas, e as moléculas naturais, produzidas muitas vezes por outras plantas, possuem efeito alelopático. Somado a isso, essas estruturas são tão difíceis de degradar quanto o corante inicial, e portanto, muitas vezes podem persistir no ambiente causando poluição (SURTI et al., 2018; KUMARI e KAUR, 2020; HUANG et al., 2021). A presença de um éster de ácido ftálico no ensaio do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 apenas nos dois primeiros períodos analisados (T1 e T3), pode ser um dos fatores que levou a uma maior taxa de fitotoxicidade do corante PR5, frente a espécie vegetativa testadas (*Cucumis sativus*) nesse período (Tabela 8b).

O último metabólito detectado relacionado a biodegradação do corante PR5 pelo fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 é o pyrrol (Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)), registrado no TR 12,0 min a partir do terceiro período analisado (Figura 12J, 13J e 14J). Essa molécula pode ser um produto da degradação do n-butil-etilenodiamina, um dos principais compostos de degradação azo, como também pode ser um dos principais metabólitos intermediários resultantes da clivagem assimétrica das ligações azo (N=N), pela ação da combinação de diversas enzimas, como as enzimas ligninolíticas provenientes dos fungos de podridão branca (SHANMUGAN et al., 2017; LIU et al., 2022). O basidiomiceto *Peniophora* sp. CBMAI 1063 é classificado como um fungo de podridão branca, o qual demonstrou produção de lacase e manganês peroxidase nos ensaios realizados (Figura 8c e 8d), sendo este mais um indicativo que corrobora a hipótese de que houve degradação do corante PR 5, também pela ação dessas enzimas. Além disso, assim como no caso do éster de ácido ftálico, esse metabólito pode ser usado como substrato no metabolismo de aminoácido, levando a produção de Acetil-CoA (AJAZ et al., 2019).

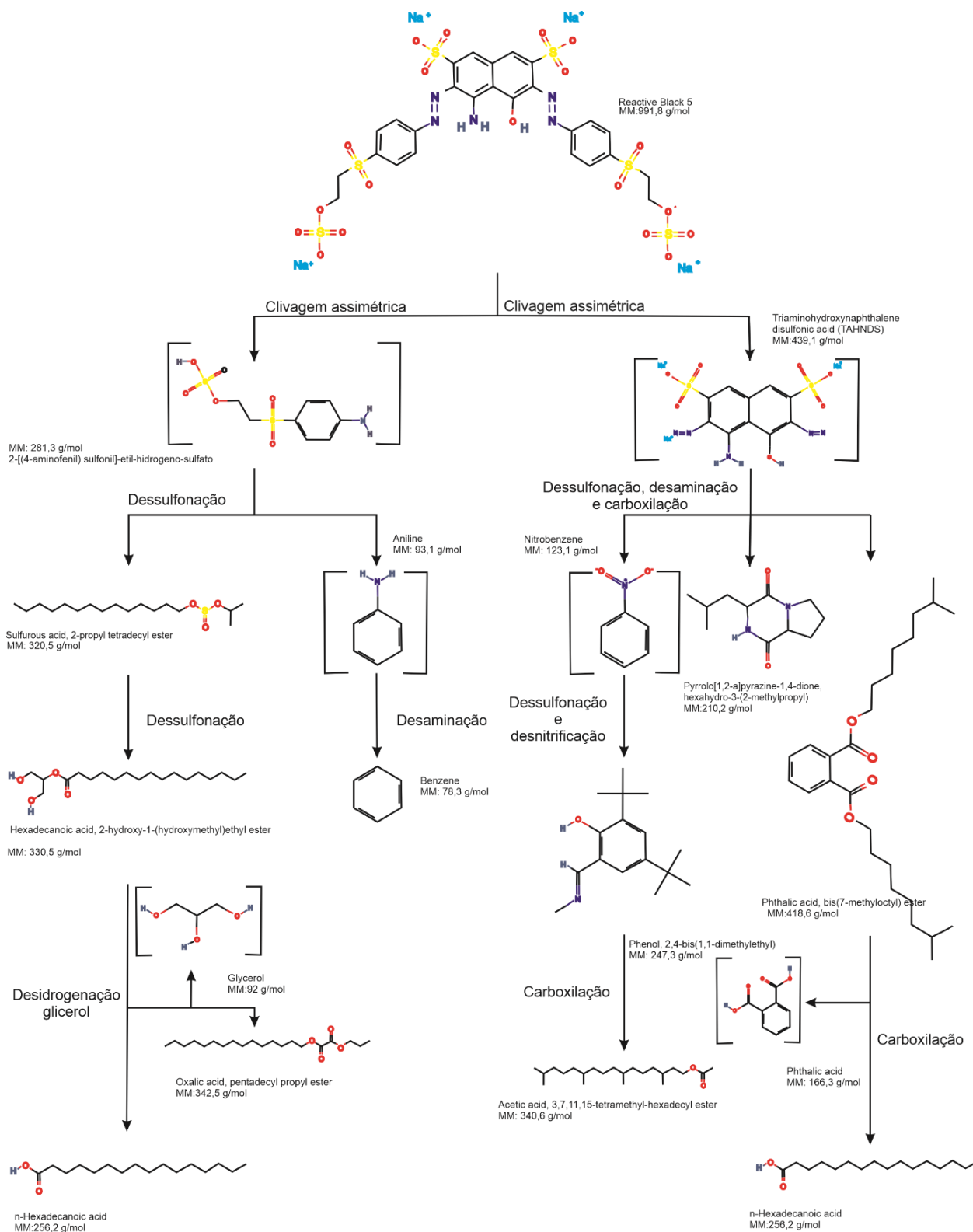
Além dos produtos indicados relacionados a biodegradação do corante PR5, foram encontrados outros compostos que não estavam presentes no controle (sem a adição do fungo). Um deles foi o octadecano (Octadecane), um composto registrado no TR 6,8 min, presente nas análises desde o primeiro período (11B, 12B, 13B e 14B). O octadecano é um composto volátil e é produto proveniente do metabolismo de fungos basidiomicetos (KAMINSKI, STAWICKI & WASOWICZ, 1974). Um outro composto volátil registrado no TR 11,5 min, presente apenas no último período analisado (Figura 12M) foi o heptadecano (1-Heptadecene). Esse composto também está relacionado ao metabolismo dos fungos de podridão branca e já foi descrito por Enoki et al. (2002), como sendo uma nova classe de metabólitos relacionados a lipídeos produzidos por *C. subvermispora* a partir de fragmentos de lignina oxidados, como no caso, a palha de trigo presente no meio otimizado no bioensaio analisado.

Sendo assim, todos os compostos citados anteriormente dão suporte à hipótese de que o fungo basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 está promovendo a

biodegradação do corante têxtil PR5, visto que os compostos intermediários se transformaram em produtos de degradação de baixo peso molecular e menor toxicidade. Além disso, segundo Liu et al. (2022) os compostos com anel de benzeno aberto e os compostos estáveis de cadeia aberta, também foram obtidos a partir da ação das enzimas ligninolíticas na degradação de azocorantes, os quais tiveram a toxicidade reduzida, reforçando ainda mais a presença dessas enzimas no processo de biodegradação do corante PR5.

Portanto, a partir dos compostos encontrados na análise de GC-MS, com base na comparação com a biblioteca NIST, no tempo de retenção (TR), peso molecular (MW) e relações massa/carga (m/z), uma possível via de biodegradação desse corante foi proposta e está demonstrada na Figura 15 abaixo.

Figura 15. Possível via de degradação do azocorante Preto Reativo 5 pelo basidiomiceto marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063. Metabólitos entre chaves não foram detectados no presente estudo e configuram parte de uma via hipotética de degradação.



De acordo com Song e al. (2015), a redução assimétrica das ligações azo (N=N) do corante PR5, é considerada como o primeiro passo para a biodegradação do corante. Como o corante PR5 é um diazocorante, ambas as ligações podem ser atacadas, liberando assim duas moléculas de 2-[(4-aminofenil) sulfonil]-etil-hidrogeno-sulfato, classificada como de alta toxicidade, risco de mutagenicidade e potencial corrosivo, e mais uma molécula composta de dois anéis aromáticos, chamada de 1,2,7-triamino-8-hidroxi-3,6-naftalinodisulfonato (TAHNDS). Esses dois compostos formados, apesar de não terem sido detectados em nossas análises, foram encontrados por Bonugli-Santos et al. (2016) em estudos de degradação do PR5 pelo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrofotometria de massa (LC-MS).

Sendo assim, após essa primeira quebra da molécula do corante, é possível que a molécula de 2-[(4-aminofenil) sulfonil]-etil-hidrogeno-sulfato sofra uma dessulfonação, resultando nas moléculas de (Sulfurous acid, 2-propyl tetradecyl ester) e de anilina (Aniline). O éster do ácido sulfúrico 2-propil tridecil formado durante a quebra inicial foi dessulfonado na presença de oxigenase para formar glicerol 1-palmitato (Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester), que se decompõe em uma molécula de glicerol e ácido hexadecanoico (ácido palmítico). O glicerol é convertido em diidroxiacetona catalisada pelo glicerol desidrogenase que, em oxidação adicional na presença de oxidoreductase, é convertida em ácido oxálico (Oxalic acid, pentadecyl propyl ester) e CO₂, sendo estes encontrados em nossas análises (WORZ et al., 2009; SHANMUGAM et al., 2017). A molécula de anilina (não encontrada em nossas análises) por sua vez sofre uma desaminação, resultando na molécula de benzeno (Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)) (AL-TOHAMY et al., 2020).

A molécula 1,2,7-triamino-8- hidroxi-3,6-naftalinodisulfonato (TAHNDS), por se tratar de um composto instável, pode ser rapidamente transformada em outros metabólitos intermediários menores, como o nitrobenzeno (não encontrado em nossas análises), éster de ácido ftálico (Phthalic acid, bis(7-methyloctyl) ester) e o pyrrol (Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl) por processos de desaminação, dessulfonação e carboxilação (AJAZ et al., 2019; AL-TOHAMY et al., 2020). A molécula de nitrobenzeno sofre os processos de dessulfonação e desnitrificação, resultando nos compostos fenol (Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)) e éster de ácido acético (Acetic acid, 3,7,11,15-tetramethyl-hexadecyl ester).

Posteriormente, a molécula de ácido ftálico sofre clivagens, formando uma molécula simples de ácido ftálico e ácido hexadecanóico (n-Hexadecanoic acid) (SHANMUGAN et al. 2017). Outro produto resultante da dessulfonação e desaminação oxidativa, combinado com a

ação das enzimas ligninolíticas do composto TAHNDS é o pyrrol, o qual igualmente ao ácido ftálico e hexadecanóico, pode ser utilizado como substrato no metabolismo de aminoácidos (AJAZ et al., 2019; LIU et al., 2022). De acordo com Ajaz et al. (2019) grupos azo e SO_3 foram perdidos na degradação e os principais compostos encontrados na fase final da biodegradação do azocorante Synazol red 6HBN foram o ácido 3-aminobutanóico, o pyrrol e o ácido palmítico. Isto deve-se ao fato de que a dessulfonação do corante, a desaminação oxidativa e a carboxilação levam à produção de pyrrol, derivados de ftalatos e diferentes compostos formados por ácidos graxos e aldeídos que podem entrar direta/indiretamente nas reações de oxidação de ácidos graxos (β -oxidação) para produzir acetil-CoA, NADH₂ e FADH₂. No presente estudo, foi confirmado através da análise GC-MS que o corante azo PR5 foi biodegradado enzimaticamente em vários produtos (semelhantes aos citados acima), os quais podem estar envolvidos no processo de produção de energia como, metabolismo de aminoácidos e β -oxidação de ácidos graxos (HARWOOD e PARALES, 1996; WALKER e VAN DER DONK, 2016; SHANMUGAM et al., 2017; AJAZ et al., 2019).

6.5. Análise de Transcriptoma do basidiomiceto marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063

6.5.1. Extração de RNA, quantificação e verificação de integridade

As amostras de RNA do controle e do bioensaio extraídas com o kit RNeasy® Plant Mini kit (Qiagen) apresentaram respectivamente 57,6 ng/ μL e 59,9 ng/ μL . Tais concentrações estavam dentro ou acima do padrão solicitado pela empresa MacroGen para o envio e realização do sequenciamento. Os dados relacionados sobre os RNAs obtidos após a extração estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Amostras enviadas para sequenciamento na MacroGen com suas respectivas concentrações de RNA.

Amostra	Identificação da Amostra	Método de Extração	Concentração (ng μL^{-1})	Quantidade total por amostra (μg)	Concentração total por amostra pela MacroGen ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	Control_C1	Rneasy Kit	57,6	1,22	1-10
2	Tratament_T2		59,9	1,184	

Entretanto, a primeira análise de qualidade do RNA realizado pela empresa, das triplicatas de cada amostra enviada, somente uma réplica de cada apresentava RIN (Integrity Number) próximo de 7 (mínimo exigido). Contudo, foi sugerido a continuidade das análises das amostras e após a conversão do RNA em bibliotecas de cDNA e adição de adaptadores a cada 100 pares de bases (em ambas as extremidades), a MacroGen disponibilizou um segundo relatório de qualidade onde todas as amostras foram aprovadas para o sequenciamento na plataforma Illumina NovaSeq. As etapas referentes à análise do transcriptoma e obtenção dos transcritos foram realizadas sob orientação da Dra. Milene Ferro (CEIS-UNESP/RC).

6.5.2. Pré-processamento dos *reads*

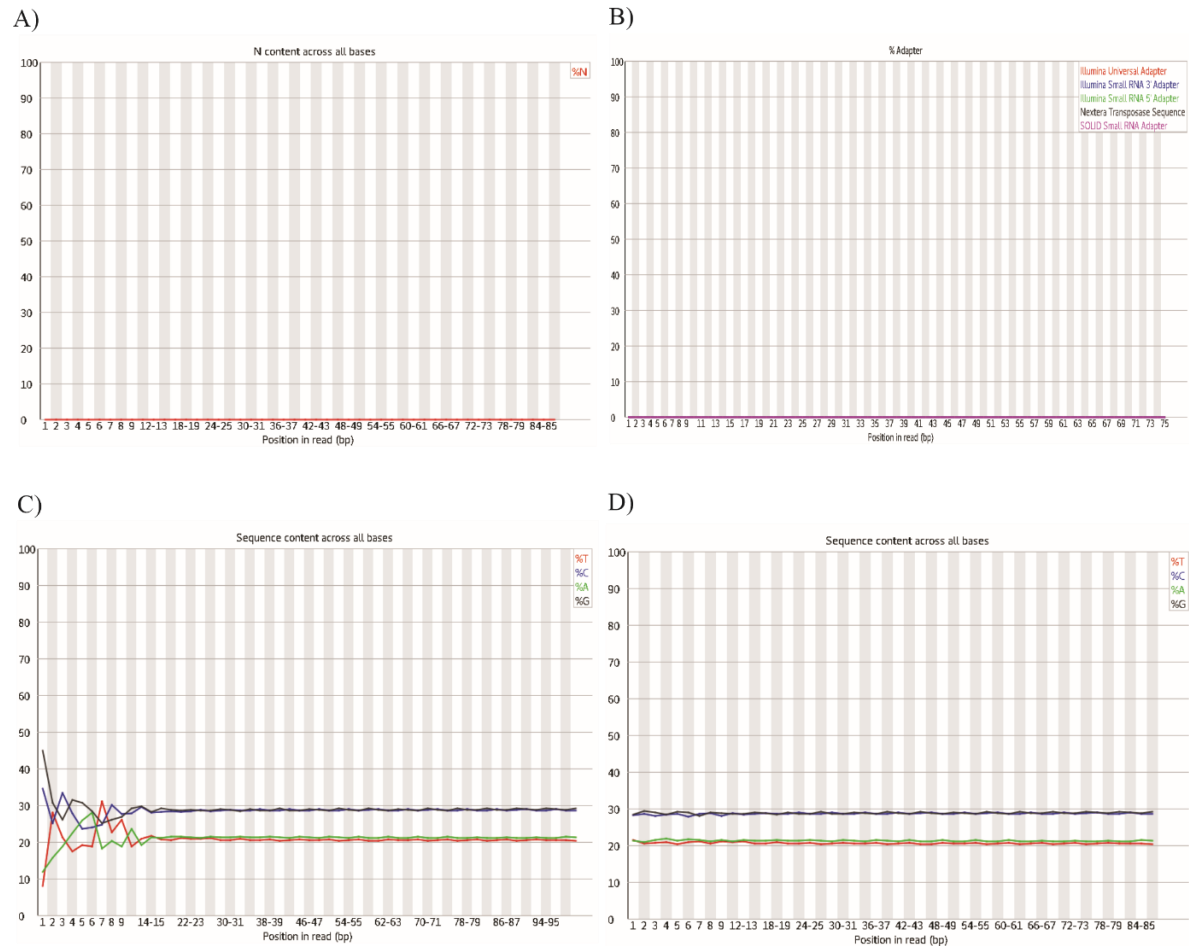
As amostras do controle e bioensaio, apresentaram mais de 50 e 62 milhões de *reads*, respectivamente, com tamanho de 100 pares de base cada (Tabela 3). Também foi reportado o índice de qualidade *Phred*, representado como Q20(%) e Q30(%), referentes à proporção de bases com pontuação de qualidade *Phred* superior a 20 e 30, respectivamente. Sendo assim, a qualidade do sequenciamento realizado foi acima de 95% (Tabela 3).

Tabela 3. Estatística dos dados brutos enviados pela MacroGen.

Amostra	Identificação da Amostra	Total de <i>reads</i>	GC (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
1	Control_C1	50.341.432	57,9	42,1	97,9	95,1
2	Tratament_T2	62.829.848	57,6	42,4	98	95,2

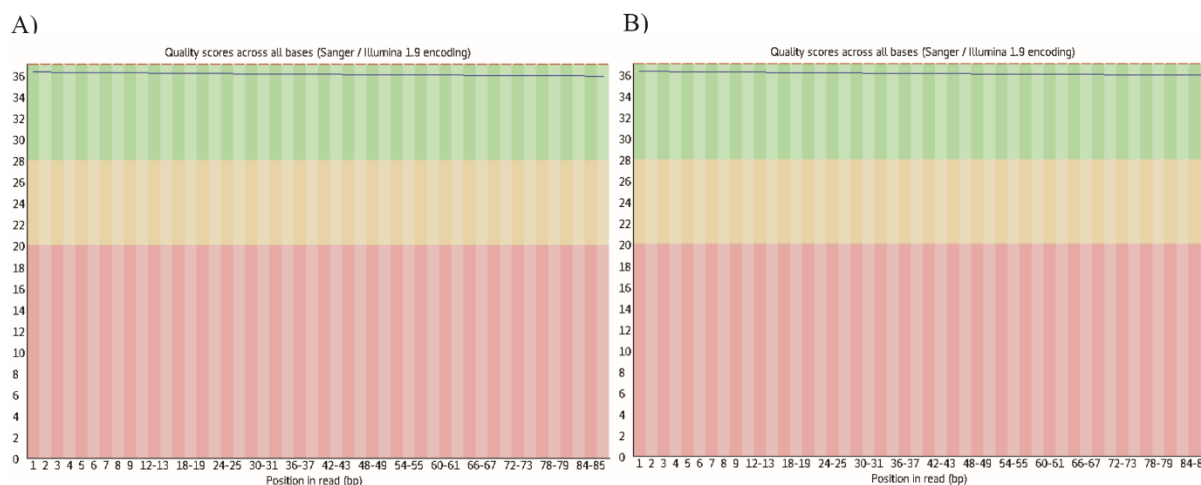
O controle de qualidade inicial dos *reads* foi realizado usando o programa FASTQC (versão 0.11.3). Na figura 14, foi possível verificar que em todas as amostras não existiam sequências N (Figura 14A) e nem resquícios de adaptadores do processo de sequenciamento (Figura 14B). Entretanto, como esperado, foi constatado o fenômeno conhecido como desvio no conteúdo GC (Figura 14C), observado no início dos *reads* e, resultante do sequenciamento na plataforma Illumina (HANSEN; BRENNER; DUDOIT, 2010). A remoção foi realizada por meio da ferramenta *fastx-trimmer* presente no pacote FASTX_Toolkit (versão 0.0.14) (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html). Ao término do corte dos 15 primeiros nucleotídeos de todos os *reads* esse problema foi resolvido conforme pode ser observado na Figura 14D.

Figura 14. Gráficos gerados pelo programa FASTQC. A) Ausência de sequências N. B) Ausências de resquícios de adaptadores do processo de sequenciamento. C) Desvio no conteúdo GC no início dos *reads* antes do pré-processamento. D) Conteúdo GC após o pré-processamento, mostrando correção do viés gerado em bases.



Foi possível observar que os *reads* já continham elevada qualidade Phred, apresentando *phred* médio por base acima de 36, tanto para controle quanto para o tratamento. A Figura 15 ilustra a qualidade média dos *reads*, após o pré-processamento, mostrando que não havia necessidade de se realizar filtros de qualidade para as amostras analisadas.

Figura 15. Gráficos do programa FASTQC para as duas amostras. A) Qualidade *phred* média por base dos *reads* do controle. B) Qualidade *phred* média por base dos *reads* do tratamento.

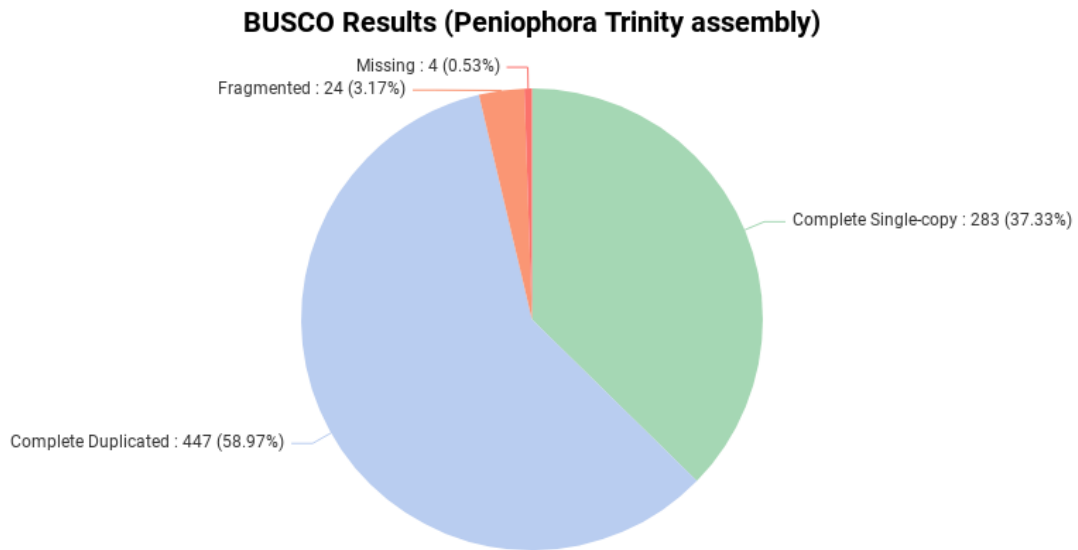


Durante a análise, os *reads* mostraram-se ricos em GC, com aproximadamente 57% de todo o conteúdo. Alto conteúdo de GC é característica geral dos genes fúngicos, segundo Eggert et al. (1998). Além disso, foi possível visualizar que após o pré-processamento (e corte dos primeiros 15 nucleotídeos) não houve perda na quantidade de sequências totais e a qualidade total ficou acima dos *Phred* 30%, indicando que a maioria dos *reads* apresentavam excelente qualidade e que o pré-processamento foi eficiente.

6.5.3. Montagem dos *contigs*, busca por genes específicos e anotação

Após o processo de montagem *de novo*, foram obtidos 33.943 *contigs* com valor N50 igual a 2.965, média de 2.094, porcentagem (%) de GC de 56.21 e total de bases para a montagem dos transcritos de 71.080.457. A qualidade da montagem foi avaliada por meio do programa BUSCO (versão 5), revelando que 96,31% dos genes estavam completos e íntegros (genes de cópia única e/ou duplicados), 3,17% estavam fragmentados (parcialmente recuperados) e 0,53% dos genes estavam faltantes quando comparados com o banco de dados de sequência de ortólogos do Reino Fungi (*lineage dataset*: fungi_odb10) (Figura 16).

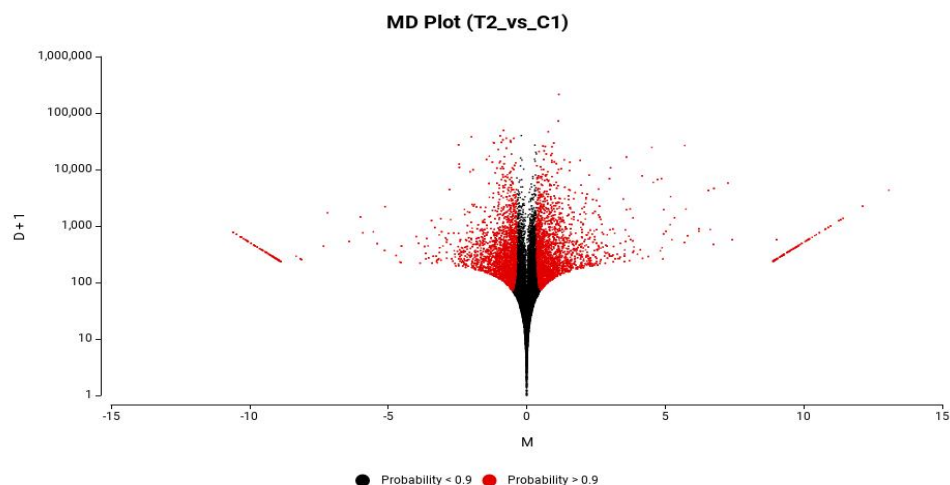
Figura 16. Gráfico de pizza mostrando a qualidade da montagem do transcriptoma.



Após a realização da análise de expressão gênica diferencial, com o auxílio da ferramenta NOISeq-sim (TARAZONA et al., 2015) na plataforma OmicsBox foram obtidos 4.268 genes diferencialmente expressos (probabilidade > 0,9), sendo que 2.093 *up-regulated* e 2.175 *down-regulated* (Figura 17).

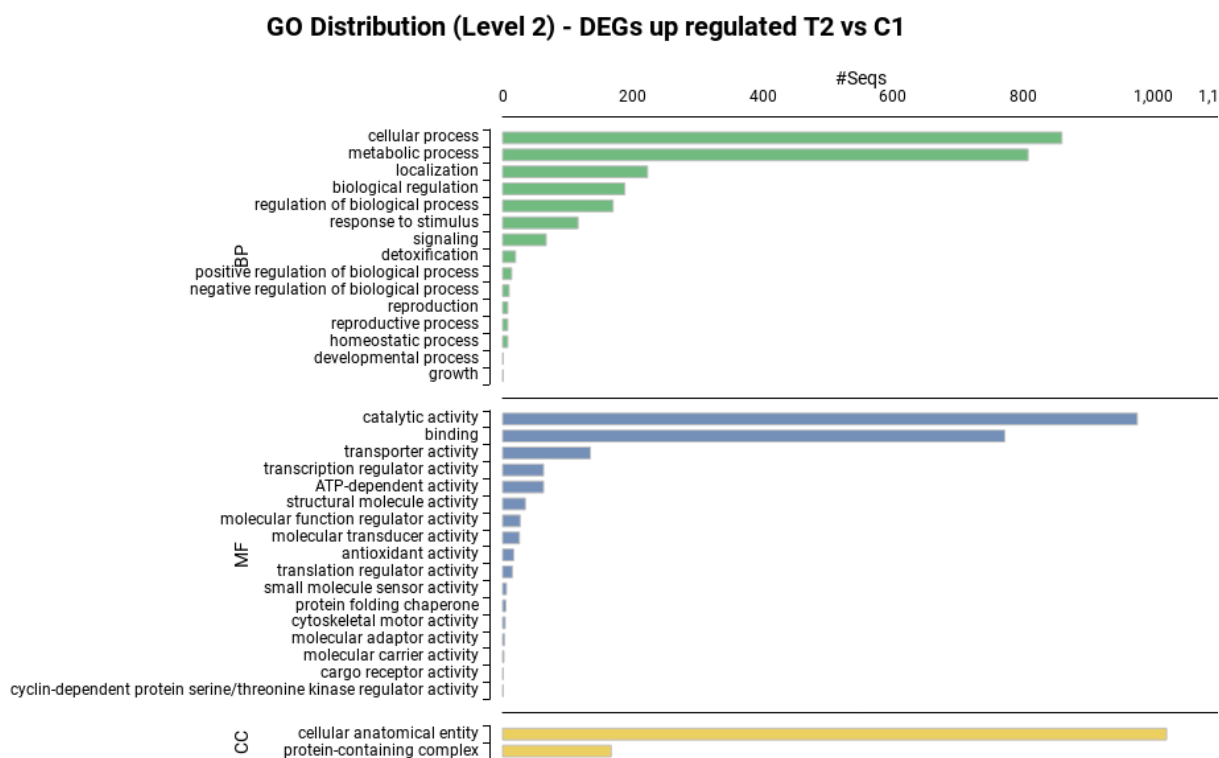
Para a melhor compreensão metabólica do processo de descoloração, destoxificação e degradação do azocorante PR5 pelo basidiomiceto marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063, apenas os genes putativos regulados positivamente (*up-regulated*) referentes aos diferentes processos de biodegradação, foram considerados para as análises nesse estudo.

Figura 17. Expressão gênica diferencial. Genes diferencialmente expressos em vermelho (probabilidade > 0,9) e *down-regulated* (lado negativo) e *up-regulated* (lado positivo).



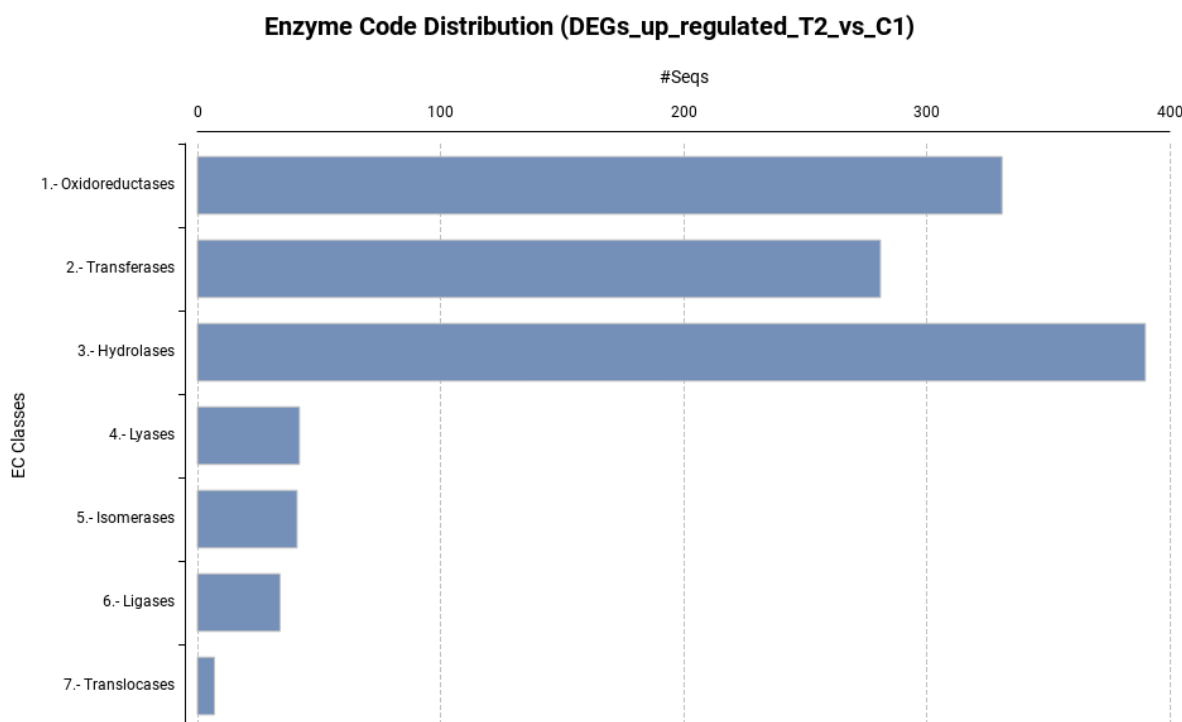
No intuito de classificar funcionalmente os genes *up-regulated* diferencialmente expressos na condição otimizada na presença do azocorante PR5, foi utilizada a distribuição dos termos do banco de dados *Gene Ontology* (GO) nível 2. Os 2.093 genes *up-regulated* foram mapeados em 34 grupos funcionais divididos em três categorias: Processos Biológicos (BP); Funções Moleculares (MF) e Componentes Celulares (CC). Sendo assim, os termos com maior quantidade de sequência foram os associados à “entidade” anatômica celular (CC), atividade catalítica (MF), processos celulares (BP), processos metabólicos (BP) e termos relacionados com atividade de “ligação” (MF) (Figura 18). A distribuição de GO permite uma visão geral da expressão gênica de um organismo sob determinada condição (HUNTLEY et al., 2014). A maioria dos termos estão relacionados a funções moleculares (MF) e processos biológicos (BP), indicando a atuação de uma rica diversidade de enzimas na síntese de metabólitos secundário, ou seja, compostos orgânicos que não estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos fungos.

Figura 18. Distribuição dos termos de GO. Barras verdes – termos mapeados em processos biológicos (BP); barras azuis – termos mapeados em funções moleculares (MF); barras vermelhas – termos mapeados em componentes celulares (CC).



Além disso, com o objetivo de conhecer quais foram as classes de enzimas mais abundantes presentes no transcriptoma, frente às categorias apresentadas acima (Figura 18), foi realizada uma anotação dos DEGs com resultados de Blast e verificou-se que as hidrolases, oxidoredutases e transferases foram as classes de enzimas mais abundantes, com cerca de 390, 330 e 280 transcritos, respectivamente (Figura 19).

Figura 19. Gráfico de barras com a distribuição das principais classes enzimáticas para genes *up-regulados*.



As hidrolases, grupo mais presente nesta análise, são conhecidas por englobar um grupo de enzimas que catalisam a quebra de ligações covalentes em reação com a água e são amplamente utilizadas para a biodegradação de pesticidas, inseticidas e redução da toxicidade de diversos compostos. O uso destas enzimas para a degradação de compostos orgânicos tóxicos é seguro e econômico em comparação aos tratamentos físico-químicos (KARIGAR e RAO, 2011). Diversas ligações químicas como ésteres, ligações peptídicas, ligações de halogenato de carbono, entre outras, podem ser rompidas por diferentes enzimas hidrolíticas, as quais estão incluídas em diversos grupos, como: proteases, xilanases, fosfatases, amilases, lipases, peptidases, esterases, dehalogenases, epóxido hidrolases e nucleosidases, tornando-se uma das classes mais versáteis e conhecidas (NARDINI e DIJKSTRA, 1999).

As oxidoredutases catalisam a transferência de elétrons de uma molécula doadora de elétrons (redução) para outra, aceptora de elétrons (oxidação). Em alguns casos, a molécula de

oxigênio (O_2), pode ser utilizada como aceptor de elétrons e em outros, há a participação de átomos de hidrogênio, onde o oxigênio pode ser reduzido à água (H_2O) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MAY e PADGETTE, 1983). As oxidoredutases mais conhecidas e mais bem estudadas são as lacases (fenoloxidasas), as peroxidases (lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e versátil peroxidase (VP)) e as oxigenases (monoxigenases e dioxigenases) (SARITHA et al., 2012; DESHMUKH et al., 2016). Essas enzimas estão bastante envolvidas em processos de degradação, principalmente da lignina e de substâncias que apresentam subunidades fenólicas, devido a ampla especificidade pelo substrato que possuem. Além disso, para uma eficiente degradação, as oxigenases e peroxidases são preferíveis a hidrolases devido à alta ocorrência de pontes de carbono-carbono, nesses compostos (SARITHA et al., 2012; POLLEGIONI et al., 2015).

As transferases, terceira classe de enzimas mais presente nesse estudo, estão envolvidas em diferentes vias metabólicas e inúmeras reações nas células, pois participam de processos que catalisam as transferências de grupos funcionais específicos (como grupo metil ou glicosil) de uma molécula (doadora) para outra (aceptora) (MOORE e JENCKS et al., 1982). Essa classe atualmente, engloba mais de 450 diferentes enzimas, divididas em 10 categorias, sendo algumas dessas as metiltransferases, transcetolase, aciltransferases, glicosiltransferase, transaminase, fosfotransferase, sulfotransferase, entre outras (WISHART, 2013; HERBST e MACPHERSON, 2014).

Os dados relacionados com as classes enzimáticas (mais presentes) codificadas pelos genes expressos diferencialmente no transcriptoma do bioensaio nos mostra que várias dessas enzimas estão relacionadas a diferentes processos de biodegradação e vias metabólicas relacionadas a destoxificação e degradação de poluentes ambientais (VIEIRA et al., 2021). A tabela 4 apresenta os genes putativos que foram expressos na condição otimizada do fungo marinho basidiomiceto *Peniophora* sp. CBMAI 1063 na presença do azocorante PR5 e que possivelmente estão relacionados ao processo de biodegradação deste composto.

Tabela 4. Genes expressos diferencialmente pelo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 na condição otimizada com PR5. Genes possivelmente relacionados à biodegradação e desintoxicação de corantes.

Código	Gene	E-Value	EC number
TRINITY_DN2772_c0_g1_i1	Multicopper oxidase (Lacase)	0	EC: 1.10.3.2
TRINITY_DN2365_c0_g1_i3	Multicopper oxidase (Lacase)	0	
TRINITY_DN2168_c0_g1_i3	Multicopper oxidase (Lacase)	2,04E-130	
TRINITY_DN2168_c0_g1_i1	Laccase C	0	
TRINITY_DN322_c0_g1_i1	Quinone oxidoreductase	1,35E-166	EC: 1.6.5.2
TRINITY_DN1594_c0_g1_i9	Quinone oxidoreductase	0	
TRINITY_DN495_c0_g1_i7	Class II peroxidase	0	EC: 1.11.1
TRINITY_DN434_c0_g4_i1	Class II peroxidase	1,40E-145	
TRINITY_DN4539_c0_g2_i3	Dyp-type peroxidase	0	EC: 1.11. 1.19
TRINITY_DN5091_c0_g1_i8	GMC oxidoreductase	0	EC: 1.1
TRINITY_DN1815_c0_g3_i3	GMC oxidoreductase	0	
TRINITY_DN6507_c0_g1_i1	Alcohol oxidase	0	EC 1.1.3.13
TRINITY_DN3875_c0_g1_i2	Alcohol oxidase	0	
TRINITY_DN3875_c0_g1_i3	Alcohol oxidase	0	
TRINITY_DN1665_c0_g1_i20	Arv1-domain-containing protein	0	EC: 1.13
TRINITY_DN1993_c1_g1_i11	Arv1-domain-containing protein	0	
TRINITY_DN3764_c1_g2_i5	N-acyltransferase	0	EC: 2.3.1
TRINITY_DN2973_c0_g1_i2	N-acyltransferase	2,50E-118	
TRINITY_DN4983_c0_g1_i6	N-acyltransferase	0	

TRINITY_DN10_c2_g1_i1	Aromatic ring-hydroxylating dioxygenase	0	EC: 1.13.11.1
TRINITY_DN4173_c1_g4_i1	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	0	EC: 1.5.1.36
TRINITY_DN125_c0_g1_i1	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	0	
TRINITY_DN488_c0_g3_i1	FAD binding domain-containing protein	0	EC: 1
TRINITY_DN3023_c0_g1_i1	FAD binding domain-containing protein	0	
TRINITY_DN472_c4_g1_i1	FAD binding domain-containing protein	0	
TRINITY_DN4121_c0_g1_i1	FAD binding domain-containing protein	0	
TRINITY_DN1012_c0_g1_i1	FAD binding domain-containing protein	0	
TRINITY_DN4121_c0_g1_i1	FAD/NAD(P)-binding domain-containing protein	0	EC:1
TRINITY_DN1012_c0_g1_i1	FAD/NAD(P)-binding domain-containing protein	0	
TRINITY_DN3137_c0_g2_i1	FMN-linked oxidoreductase	0	EC: 1.5.1
TRINITY_DN9501_c0_g1_i1	FMN-linked oxidoreductase	0	
TRINITY_DN6995_c0_g1_i1	Cytochrome P450	0	EC:1.14
TRINITY_DN1299_c0_g4_i1	Cytochrome P450	0	
TRINITY_DN5294_c1_g4_i1	Cytochrome P450	0	
TRINITY_DN1087_c0_g1_i1	Cytochrome P450	0	
TRINITY_DN1576_c0_g1_i1	Cytochrome P450	0	
TRINITY_DN3406_c0_g3_i1	Cytochrome P450	0	
TRINITY_DN2625_c0_g5_i1	Cytochrome P450	0	
TRINITY_DN213_c0_g6_i1	Aldo/keto reductase	0	EC:1.6.1
TRINITY_DN7135_c0_g1_i1	Aldo/keto reductase	0	
TRINITY_DN515_c0_g1_i1	Aldo/keto reductase	0	
TRINITY_DN7835_c0_g1_i1	Aldo/keto reductase	0	

TRINITY_DN2672_c0_g1_i1	Aldo/keto reductase	0	
TRINITY_DN1668_c0_g1_i2	Aldehyde dehydrogenase	0	
TRINITY_DN2050_c0_g1_i11	Aldehyde dehydrogenase	0	
TRINITY_DN2818_c0_g1_i2	Aldehyde dehydrogenase	0	EC:3
TRINITY_DN2561_c0_g1_i1	Aldehyde dehydrogenase	0	
TRINITY_DN2561_c0_g1_i3	Aldehyde dehydrogenase	0	
TRINITY_DN10059_c0_g1_i1	Glutathione S-transferase	0	
TRINITY_DN19_c0_g1_i1	Glutathione S-transferase	0	
TRINITY_DN2138_c0_g1_i1	Glutathione S-transferase	1,36E-163	EC:2.5.1.18
TRINITY_DN7892_c0_g1_i1	Glutathione S-transferase	0	
TRINITY_DN1968_c0_g1_i1	Glutathione S-transferase	9,95E-170	
TRINITY_DN1623_c0_g1_i1	Glutathione S-transferase	6,55E-175	
TRINITY_DN407_c0_g1_i1	Alpha/Beta hydrolase	0	
TRINITY_DN226_c0_g2_i1	Alpha/Beta hydrolase	0	
TRINITY_DN3261_c1_g1_i1	Alpha/Beta hydrolase	0	
TRINITY_DN1266_c0_g2_i1	Alpha/Beta hydrolase	0	EC:3
TRINITY_DN10061_c0_g1_i1	Alpha/Beta hydrolase	0	
TRINITY_DN1073_c0_g1_i1	Alpha/Beta hydrolase	0	
TRINITY_DN2190_c0_g4_i1	Alpha/Beta hydrolase	0	
TRINITY_DN722_c0_g1_i4	Lipase class 3 family protein	0	EC:3.2.1
TRINITY_DN932_c0_g1_i1	Epoxide hydrolase	0	EC 3.3.2.10

Os compostos com conformação parecidas aos azocorantes podem ser biodegradados principalmente através de duas vias: a ação das enzimas ligninolíticas (SHARMA; DANGI; SHUKLA, 2018) e ação das dioxigenases e monooxigenases do sistema P450 (VIERA et al., 2021). Sendo assim, considerando que o PR5 é um azocorante formado por compostos aromáticos é possível que a degradação deste corante siga caminhos semelhantes, tendo em vista os compostos gerados (Figuras 11, 12, 13 e 14) a via de biodegradação putativa (Figura 15) e os genes expressos (Tabela 4). Liu et al. (2022) relataram a capacidade das enzimas ligninolíticas (oxidoredutases), como as lacases e manganês peroxidases de oxidar o PR5, promovendo a degradação da molécula e removendo significativamente a cor.

Neste estudo, foram expressos 3 genes de lacase que podem estar ligados à quebra do anel aromático presente no PR5. A lacase, como dito anteriormente, está relacionada a biodegradação do azocorante PR5 pelo *Peniophora* sp. CBMAI 1063, uma vez que ela pode agir reduzindo a toxicidade do composto alvo, clivando as ligações azo e abrindo o anel benzênico, formando metabólitos menos tóxicos (LIU et al., 2022). Além disso, duas quinonas oxidases putativas foram encontradas, indicando uma possível atividade prévia de manganês peroxidase (MnP), uma vez que essa enzima esteve presentes nos ensaios realizados neste estudo (item 6.3, Figura 9b). A presença de quinonas no meio está relacionada a indução da expressão desses genes, visto que as quinonas são metabólitos derivados do sistema ligninolítico, o qual é utilizado por muitos microrganismos para degradar poluentes orgânicos (CERNIGLIA e SUTHERLAND, 2009; VASCONCELOS et al., 2019).

As peroxidases podem ser produzidas por animais, plantas, fungos e bactérias e são conhecidas por auxiliarem no processo de degradação da lignina e de outros contaminantes aromáticos, usando peróxido de hidrogênio (BANSAL e KANWAR, 2013). Tais enzimas também estão relacionadas ao processo de abertura do anel de compostos aromáticos, entretanto, a oxidação de Mn^{2+} em Mn^{3+} pelo peróxido de hidrogênio pode resultar na quebra de diferentes partes da molécula do corante (CERNIGLIA, 1997; CERNIGLIA e SUTHERLAND, 2009). Essas enzimas foram apontadas como iniciadoras do processo de biodegradação de outros corantes têxteis, como o RBBR (ROUTOULA e PATWARDHAN, 2020; VIERA et al., 2021).

No presente trabalho, foram encontrados 6 diferentes genes relacionados à essa classe de enzima, sendo dois descritos como peroxidase de classe II. As enzimas desta classe estão relacionadas às peroxidases fúngicas, como ligninas peroxidases (LiP), manganês peroxidases (MnP), entre outras (HINNER et al., 2002; SHARMA et al., 2018). No caso deste estudo, como não houve a detecção da LiP através do método utilizado, a enzima codificada possivelmente

se refere à MnP ou Peroxidase Versátil (PV) (não mensurada neste estudo). De acordo com o Zhang et al. (2016) foi relatado que a manganês peroxidase (MnP) purificada do fungo de podridão branca *Trametes* sp. 48424 foi capaz de descolorir sozinha o azocorante Remazol Brilliant Violet 5R (100 mg L⁻¹) em 88,2% em apenas 4 h. Somado a isso, um estudo realizado com uma peroxidase descolorante de corante ou “*Dye-decolorizing peroxidases*” (DyPs) pertencente à classe II das peroxidases, foi capaz de descolorir diferentes corantes do tipo azo, em especial o Metil laranja, o qual atingiu uma porcentagem de descoloração de 94,6% em 48 h. Além do mais foi retratado que essa enzima foi capaz de mitigar a toxicidade do corante e de seus intermediários (RAJHANS et al., 2020; DE EUGENIO et al., 2021). Possivelmente a enzima putativa de classe II apontada na tabela, pode ser também uma DyP visto que ela apresenta atividade ótima em uma faixa de pH de 3,5 a 7 e uma temperatura por volta de 28 °C, condições que são semelhantes às realizadas neste estudo, além de ter sido encontrado um único gene relacionado a essa enzima (*Dyp-type peroxidase*). As peroxidases do tipo *Dyp* (EC: 1.11.1.19) são uma superfamília de heme peroxidases que participam da oxidação de vários corantes, juntamente com as outros tipos de peroxidases (HOFRICHTER et al., 2010).

As peroxidases são bastante importantes no processo de mineralização dos compostos aromáticos devido ao seu potencial redox relativamente alto. Entretanto, para a função eficiente dessas enzimas, é indispensável a presença do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que é um aceptor de elétrons para as peroxidases. Os fungos de podridão branca produzem H₂O₂ necessário para a oxidação de diversos compostos através de enzimas que foram encontradas no presente estudo, como as *GMC oxidoreductase*, *alcohol oxidase* e *Arv1-domain-containing protein*. A presença marcante dessas oxidases, pode representar um auxílio às peroxidases no processo de degradação, descoloração e destoxificação do PR5, já que estas enzimas fornecem o H₂O₂ necessário para as peroxidases ligninolíticas (FERREIRA et al., 2015; RAVICHANDRAN et al., 2022).

Além da presença das enzimas citadas acima, outras também se mostraram possivelmente envolvidas no processo de biodegradação do azocorante PR5 pelo basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063. Enzimas do tipo NADH: flavin oxidoreductase/NADH oxidase, N-acetyltransferase, aromatic compound dioxygenase e do complexo citocromo P450, detectadas no presente estudo, foram relatadas como enzimas chave para a degradação e descoloração de outros corantes o azocorante Acid Blue 113 (100 mg L⁻¹) em apenas 24h, com uma taxa maior que 80% (SANTHANARAJAN et al., 2022). Ainda no estudo de Santhanarajan et al. (2022) foi visto que as enzimas NADH: flavin oxidoreductase/NADH oxidase e Quinone oxidoreductase foram enzimas que atuaram em

conjunto com o complexo P450 na quebra/degradação da ligação azo substituindo a ação de enzimas azorredutases, na primeira quebra do azocorante Acid Blue 113, dando assim início a via metabólica. As flavinas redutases dependentes de NAD(P)H, pertencem a classe das oxidorredutases e desempenham um papel crucial em conjunto com as monooxigenases dependentes de flavina (atua como mediador de elétrons) (EC 1.13 e EC 1.14) no catabolismo de vários compostos (MATSUO et al., 1998; GRONING et al., 2014). Além disso, o estudo reportado por Santhanarajan et al. (2022) também citou que devido à ausência de algumas enzimas envolvidas no processo de degradação de compostos como naftaleno e benzeno como 3-hidroxibutiril-CoA desidrogenase, naftaleno dissulfonato 1,2-dioxigenase e anilina dioxigenase, a dioxigenase hidroxilante de anel aromático (*Aromatic ring-hydroxylating dioxygenase*) foi considerada como uma possível enzima alternativa para a degradação destes compostos (MORRISON et al., 2012; ZHANG et al. 2021; SANTHANARAJAN et al., 2022).

As flavoproteínas oxidorredutases são amplamente difundidas na natureza e participam de uma ampla gama de reações químicas. Entretanto, essas enzimas necessitam de um cofator/coenzima para realizar a reação catalítica. Os cofatores permitem a transferência de grupos químicos, bem como a transferência de elétrons em reações redox. Esses cofatores podem ser inorgânicos (íons metálicos) organometálicos (ex.: porção *heme* ou cobalamina) e orgânicos (HEINE et al., 2018). O grupo orgânico abrange um enorme conjunto de cofatores, como vitaminas e derivados, pequenos peptídeos e lipídeos, como por exemplo, adenosina trifosfato (ATP), mononucleotídeo de flavina (FMN), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NAD(P)), dinucleotídeo de flavina adenina (FAD) e glutathione (BOGACHEV et al., 2018; TRISOLINI et al., 2019). Entre os cofatores mais versáteis estão a FAD e FMN, capazes de realizar transferência de um a dois elétrons, os quais são doados pelo NAD(P)H, o que lhes permite suportar uma ampla gama de reações catalíticas e processos biológicos. Um grupo específico das flavoproteínas que tem recebido atenção crescente na área de biotecnologia e que se utiliza desses dois cofatores, são as monooxigenases dependentes de flavina (EC 1.14.13), as quais estão relacionadas às enzimas de FMN (*FMN-linked oxidoreductase*), FAD (*FAD binding domain-containing protein*) e NAD(P) (*FAD/NAD(P)-binding domain-containing protein*) detectadas no presente estudo. Essas enzimas são conhecidas por catalisar reações de hidroxilação, epoxidação, halogenação e estão fisiologicamente envolvidas no metabolismo de aminoácidos, além de participarem do processo degradação/mineralização e destoxificação de diversos compostos aromáticos (HEINE et al., 2018; TRISOLINI et al., 2019). Além das enzimas citadas acima, a *Dimethylaniline Monooxygenase* (FMO) relacionada à *FAD/NAD(P)-binding domain-containing protein*, também foi expressa no transcriptoma do *Peniophora* sp.

CBMAI 1063. Essa família de enzimas já foi relatada em várias espécies de fungo e é conhecida por conter um único FAD como grupo prostético e utilizar NAD(P)H como cofator. Assim, essas enzimas catalisam a oxigenação de nitrogênio, enxofre, fósforo e outros produtos que contêm heteroátomos, estando envolvidas na degradação de uma variedade de compostos aromáticos (CASHMAN e ZHANG et al., 2006; RAVICHANDRAN et al., 2022), e portanto, podem estar agindo na via de biodegradação do azocorante PR5 pelo basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

A biodegradação dos azocorantes recalcitrantes, como já dito anteriormente, representam um grande desafio para a biodegradação de efluentes industriais, pois geralmente, espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas pela formação de intermediários provenientes da quebra da molécula poluente, durante sua degradação microbiana (LIU et al., 2020). A presença de EROs no ambiente, pode levar à morte celular ao danificar o DNA e as proteínas e desencadear a peroxidação lipídica. Em resposta ao estresse causado pelos poluentes tóxicos, os fungos de podridão branca (*white-rot fungi*), induzem a produção de enzimas e proteínas ligadas a funções celulares de destoxificação, defesa e reparo em resposta a esta condição, para resistir aos danos causados pelas EROs (UJOR et al., 2012; ZHONG et al., 2019; LIU et al., 2020). No presente estudo, além dos genes citados acima, muitos dos que foram regulados positivamente (*up regulated*), codificaram enzimas putativas que podem estar envolvidas na degradação/destoxificação de xenobióticos, na resposta protetora ao estresse oxidativo e na redução de espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo enzimas do citocromo P450 (*Cytochrome P450*), aldo/ceto redutase (*Aldo/keto reductase*), aldeídos desidrogenases (*Aldehyde dehydrogenase*), glutathione S-transferase (*Glutathione S-transferase*), alfa/beta hidrolase (*Alpha/Beta hydrolase*), lipases de classe 3 (*Lipase class 3 family protein*) e epóxido hidrolase (*Epoxide hydrolase*).

As enzimas do citocromo P450 (CYP), são heme proteínas ligadas à membrana e pertencem a uma superfamília multigênica de genes que codificam uma série de enzimas que catalisam a oxidação, hidroxilação, desaminação e dessulfonação de uma ampla variedade de compostos endógenos e xenobióticos, incluindo poluentes ambientais (MANIKANDAN et al., 2018; LIN et al., 2022). Em nosso estudo, descobrimos que o estresse oxidativo/resposta protetora pode estar ativo durante o processo de descoloração do azocorante PR5, devido à regulação positiva de muitos DEGs que codificam grupos funcionais relacionados à geração de EROs, como as enzimas do citocromo P450, que estão envolvidas no metabolismo xenobiótico à custa do aumento de EROs durante o processo do ciclo catalítico (ZHONG et al., 2019). Somado a isso, a regulação positiva dessas enzimas, foram relatadas como importantes

redutases envolvidas na biodegradação de corantes azo, promovendo a descoloração e destoxificação destes compostos (KOLEKAR et al., 2012; MANIKANDAN et al., 2018; LI et al., 2022). Um estudo realizado por Góralczyk-Bińkowska et al. (2021) revelou a capacidade do fungo ascomiceto *Nectriella pironii* na remoção eficiente dos azocorantes Acid Orange 7 e Reactive Red 120 e de uma amina aromática perigosa (*o-tolidine*), utilizada na produção de corantes azo. Os autores reportaram a participação da lacase e enzimas do CYP no processo de biodegradação destes compostos, alcançando assim uma taxa de descoloração de mais de 80% em 72 h.

As aldo-ceto redutases são oxidorredutases dependentes de NAD(P)H que existem amplamente nos organismos procarióticos e eucarióticos e são responsáveis pelo metabolismo redutivo de grupos xenobióticos a álcoois primários e secundários. Assim como as enzimas aldeídos desidrogenases (*Aldehyde dehydrogenase*), pertencem ao grupo das enzimas de destoxificação de xenobióticos, devido ao seu papel no metabolismo de compostos aromáticos intermediários, aldeídos exógenos, através da redução do grupo carbonila em um grupo álcool e, conseqüentemente, protege as células contra o estresse oxidativo (CHEN et al., 2014; WANG et al., 2018; ABRAHAM et al., 2022).

No presente estudo, seis genes foram transcritos relacionados às enzimas glutatônicas S-transferases (GST), as quais estão envolvidas no metabolismo de compostos xenobióticos (como compostos aromáticos), na destoxificação e proteção celular durante a resposta ao estresse a agentes externos como metais pesados, contaminantes orgânicos e EROs (ZHONG et al., 2019). Um estudo realizado por Zhang et al. (2021) relatou que GST, em conjunto com CYP e enzimas ligninolíticas (MnP e Lac), foi um grupo de enzima importante e bastante expresso (aumento de 1,8x na atividade enzimática) no processo de descoloração, desintoxicação e degradação do corante Vermelho de alizarina (do tipo antraquinona), pelo fungo de podridão branca *Trametes gibbosa*. De acordo com os autores, em 14 h, tempo final do experimento, foi possível observar uma taxa de descoloração de mais de 20% do corante, além da presença do ácido ftálico, como intermediário de degradação, o qual também foi detectado no presente estudo. Em 2020, um estudo realizado por Liu e colaboradores investigou o efeito e o mecanismo de ação do fungo de podridão branca *Trametes hirsuta* TH315 na remoção do corante PR5. De acordo com os autores, a taxa de descoloração do PR5 (50 mg L⁻¹) foi de 85,65 % em 3 dias e foi notável a expressão de GST durante esse processo, a quais em conjunto com a lacase atuou ativamente no processo de biodegradação (LIU et al., 2020).

A família alfa/beta hidrolase, também foi bastante expressa, apresentando 7 transcritos no presente estudo. Essa família de enzimas é considerada atualmente um dos maiores grupos

de enzimas relacionadas com diversas funções catalíticas que compartilham propriedades estruturais comuns e parecem estar relacionadas por evolução divergente (HOLMQUIST et al., 2000). Os membros desta família perderam a similaridade de sequência durante a seleção natural e a especialização de um ancestral comum, e assim operam de maneira eficiente em vários substratos que apresentam diferentes estruturas e propriedades físico-químicas, através da presença de uma tríade catálítica Nucleófilo-His-Ácido desenvolvida para operar em vários contextos biológicos (LENFANT et al., 2013). Além disso, os membros dessa família incluem hidrolases, transferases, lipases, dehalogenases, haloperoxidases, celulasas, carboxilesterases epóxido hidrolase, glicosídeos hidrolases, entre outras. Sendo assim, por estarem presentes neste estudo, essas enzimas podem estar relacionadas à degradação do corante PR5 pelo *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

Um gene relacionado a famílias das lipases de classe 3 (*Lipase class 3 family protein*) foi detectado no presente estudo. Essas enzimas de maneira geral, são onipresentes na natureza, estando presente em diversas espécies de bactérias, plantas e fungos, catalisando a hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa em glicerol e ácidos graxos livres. Essa enzima putativa pode estar relacionada com a produção e hidrólise dos metabólitos intermediários e finais do processo de degradação do azocorante PR5, como o ácido ftálico e ácido hexadecanóico, os quais podem ser utilizados como fonte de carbono, pelo metabolismo fúngico (SHARMA et al., 2018; AJAZ et al., 2019). Além disso, um gene transcrito codificador de epóxido hidrolase (*Epoxide hydrolase*), também foi encontrado no presente estudo. As epóxido hidrolases já foram detectadas em diversos organismos, como mamíferos, plantas e microrganismos, incluindo leveduras, bactérias e fungos filamentosos (filo Ascomycota e Basidiomycota). Essas enzimas, quando agem sozinhas ou em conjunto com as enzimas ligninolíticas, são consideradas ecologicamente corretas na utilização para a biodegradação de resíduos industriais recalcitrantes e tóxicos. Além disso, são responsáveis principalmente pela destoxificação de vários xenobióticos e mineralização de compostos aromáticos (RUDAKIYA et al., 2019; AHSAN et al., 2021). Um estudo realizado por Sun et al. (2017), reportou a descoloração completa do azocorante DR5B (100 mg L^{-1}) após 120 h de incubação com o fungo de podridão-branca *Ipex lacteus* CD2, indicando a epóxido hidrolase e as enzimas ligninolíticas como as principais enzimas responsáveis pela descoloração e destoxificação deste azocorante. Além disso, estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, relatam a presença dessa enzima durante o processo de biodegradação e destoxificação do corante RBBR e do HPA pireno por fungos filamentosos de origem marinha, como o *Mucor racemosus* (CBMAI 847), *Aspergillus sclerotium* (CBMAI 849), *Cladosporium cadosporioides* (CBMAI 857), *Marasmiellus* sp.

(CBMAI 1062), *Arthopyrenia salicis* (CBMAI 1330), *Pleospora* sp. (CBMAI 1358), *Trichoderma harzianum* (CBMAI 1359) e *Xylaria* sp. (CBMAI 1464).

7. CONCLUSÕES

A estratégia de utilização de indutores na condição otimizada de degradação do corante PR5 pelo fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 visando a redução do tempo e/ou obtenção de melhores taxas de descoloração e destoxificação revelou melhor capacidade do *Peniophora* sp. CBMAI 1063 para descolorir e destoxificar o corante PR5 na condição sem a adição de nenhum indutor (MOFF), com resultados de descoloração e destoxificação de aproximadamente 94% e 47%, respectivamente em um período de 7 dias de ensaio. Foi visto neste estudo que a adição de indutores no meio de cultivo do *Peniophora* sp. CBMAI 1063 não incrementou a taxa de descoloração já obtida anteriormente (94%) e não reduziu o tempo de obtenção das taxas de descoloração, destoxificação e degradação. Os resultados indicam que a descoloração e destoxificação nessas condições ocorreu por adsorção do corante pela biomassa fúngica e farelo de trigo, combinada com a ação de enzimas do metabolismo fúngico.

A análise da cinética de descoloração, atividades enzimáticas e destoxificação do PR5 indicaram o terceiro dia de tratamento (72 h), como crucial para o processo de degradação do azocorante PR5. O resultado referente à análise de descoloração revelou que o fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 atingiu uma taxa de descoloração de aproximadamente 80% do corante PR5 já no terceiro dia (T3) de experimento, a qual foi aumentando de maneira mais lenta e gradual até atingir o pico máximo de descoloração observada no sétimo dia (94%). Com relação à cinética da atividade enzimática, os resultados das enzimas lacase (Lac) e manganês peroxidase (MnP), nos mostram o pico de atividade também no terceiro dia de tratamento (T3), onde a lacase apresentou uma atividade enzimática de aproximadamente 250 U L⁻¹ e a manganês peroxidase de aproximadamente 60 U L⁻¹. As análises de destoxificação, apresentaram um padrão semelhante, visto que no decorrer do experimento a taxa de inibição do hipocótilo e da radícula da plântula de pepino (*Cucumis sativus*) diminuiu até atingir aproximadamente 25 % no terceiro dia (T3), mantendo-se estável até o último dia de tratamento.

As análises de metabólitos gerados durante o processo de degradação (T1, T3, T5 e T7) mostraram que não foram geradas aminas carcinogênicas durante o processo de quebra do azocorante PR5, além de que a quebra da ligação azo (-N=N-) do corante PR5, possivelmente deu início ao processo de degradação deste composto. As primeiras moléculas resultantes deste processo foram o 1,2,7-triamino-8-hidroxi-3,6-naftalinodisulfonato (TAHNDS) e 2-[(4-aminofenil) sulfonil]-etil-hidrogeno-sulfato, consideradas de alta toxicidade e compostas por anéis aromáticos. A partir daí, processos de desaminação, dessulfonação e carboxilação deram origem a diversas outras moléculas tais como fenol e pyrrol, ésteres de ácido sulfúrico, ácido

ftálico, ácido acético, ácido hexadecanoico/ ácido palmítico e moléculas de benzeno, onde alguns apresentaram menor toxicidade, comparado ao composto original e podem ser utilizados pelo metabolismo fúngico, como fonte de carbono.

A análise transcriptômica do terceiro dia (T3) do bioensaio realizada na presença e na ausência do azocorante PR5, demonstrou que os genes diferencialmente expressos do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 na presença do PR5, apresentam uma ação/atuação voltada para o processo de biodegradação deste composto. Os dados derivados desta análise demonstraram a presença de enzimas relacionadas às enzimas ligninolíticas (Lac, MnP e DyP), ao complexo citocromo P450, além de aldo-ceto redutases, aldeídos desidrogenases, glutathione-S-transferases, alfa/beta hidrolases e epóxido hidrolases. A ação conjunta dessas enzimas pode clivar as ligações azo e realizar a quebra dos compostos aromáticos presentes na estrutura inicial do azocorante e nos metabólitos intermediários, além de provavelmente serem responsáveis pela diminuição da toxicidade vista nas condições estudadas.

Os resultados combinados das análises enzimáticas, dos metabólitos gerados e da transcriptômica comparativa permitiram indicar uma possível via metabólica utilizada pelo basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 na biodegradação do azocorante PR5. Sendo assim, os resultados obtidos neste estudo evidenciam ainda mais o potencial de aplicação do *Peniophora* sp. CBMAI 1063, no processo de descoloração, degradação e destoxificação de corantes do tipo azo, abrindo novas perspectivas para estudos de fungos marinhos aplicados à biodegradação de diferentes tipos de poluentes ambientais. Além disso, apresenta informações que podem ser relevantes para o campo da biotecnologia ambiental aplicada diretamente às indústrias têxteis e para a biorremediação dos efluentes que são descartados por estas empresas no ambiente sem tratamento prévio e que muitas vezes apresentam um combinação de diferentes tipos de corantes na sua composição.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. AHMED, I. et al. Synthesis and characterization of silica-coated oxyhydroxide aluminum/doped polymer nanocomposites: a comparative study and its application as a sorbent. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1520, 2020.
- ABD EL-RAHIM, W. M. et al. Biodegradation of azo dyes by bacterial or fungal consortium and identification of the biodegradation products. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 47, n. 3, p. 269–276, 2021.
- ABDEL-KADER, M. M. et al. Laboratory evaluation of some chemicals affecting pathogenic fungal growth. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 8, n. 1, p. 523–530, 2012.
- ABIT. Setor Têxtil e Confecção. **Perfil do Setor**. Disponível em: <<https://www.abit.org.br/cont/perfil-do-setor>>. Acesso em 05/09/2022.
- ABRAHAM, N. et al. Structure–function characterization of an aldo–keto reductase involved in detoxification of the mycotoxin, deoxynivalenol. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 14737, 30 ago. 2022.
- AFREEN, S. et al. Screening and optimization of laccase from cyanobacteria with its potential in decolorization of anthraquinonic dye Remazol Brilliant Blue R. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 10, p. 403–410, 2017.
- AHSAN, Z. et al. Enzyme-assisted bioremediation approach for synthetic dyes and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 960–981, 2021.
- AL-ANSARI, M. M. et al. Decolourization of azo dye using a batch bioreactor by an indigenous bacterium *Enterobacter aerogenes* ES014 from the waste water dye effluent and toxicity analysis. **Environmental Research**, v. 205, p. 112189, 2022.
- ALCALDE, M. et al. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 281–287, 1 jun. 2006.
- ALDALBAHI, A. et al. Effects of technical textiles and synthetic nanofibers on environmental pollution. **Polymers**, v. 13, n. 1, p. 155, 2021.
- ALEGBELEYE, O. O.; OPEOLU, B. O.; JACKSON, V. A. Polycyclic aromatic hydrocarbons: a critical review of environmental occurrence and bioremediation. **Environmental management**, v. 60, p. 758–783, 2017.
- AL-MAMUN, M. R. et al. Photocatalytic activity improvement and application of UV-TiO₂ photocatalysis in textile wastewater treatment: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 5, p. 103248, 2019.
- AL-TOHAMY, R. et al. Ecofriendly biodegradation of Reactive Black 5 by newly isolated *Sterigmatomyces halophilus* SSA1575, valued for textile azo dye wastewater processing and detoxification. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2020.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- AMBRÓSIO, S. T. et al. A biosorption isotherm model for the removal of reactive azo dyes by inactivated mycelia of *Cunninghamella elegans* UCP542. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 452-462, 2012.
- AZUBUIKE, C. C.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. Bioremediation techniques–classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 1-18, 2016.
- BANSAL, N.; KANWAR, S. S. Peroxidase(s) in Environment Protection. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. e714639, 24 dez. 2013.
- BENKHAYA, S.; M'RABET, S.; EL HARFI, A. Classifications, properties, recent synthesis

- and applications of azo dyes. **Heliyon**, v. 6, n. 1, p. e03271, 2020.
- BHATIA, D. et al. Biological methods for textile dye removal from wastewater: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 19, p. 1836-1876, 2017.
- BHATIA, D. et al. Physicochemical assessment of industrial textile effluents of Punjab (India). **Applied Water Science**, v. 8, n. 3, p. 83, 2018.
- BILAL, M. et al. Oxidoreductases as a versatile biocatalytic tool to tackle pollutants for clean environment—a review. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 420-435, 2022.
- BIRCHER, K. G. et al. Combination of UV oxidation with other treatment technologies for the remediation of contaminated water. **Journal of Advanced Oxidation Technologies**, v. 2, n. 3, p. 435-441, 1997.
- BIRHANLI, E.; YEŞİLADA, O. The effect of various inducers and their combinations with copper on laccase production of *Trametes versicolor* pellets in a repeated-batch process. **Turkish Journal of Biology**, v. 41, n. 4, p. 587-599, 2017.
- BOGACHEV, A. V.; BAYKOV, A. A.; BERTSOVA, Y. V. Flavin transferase: the maturation factor of flavin-containing oxidoreductases. **Biochemical Society Transactions**, v. 46, n. 5, p. 1161–1169, 28 ago. 2018.
- BOHACZ, J. Removal of a textile dye (RBRR) from the water environment by fungi isolated from lignocellulosic composts. **Archives of Environmental Protection**, v. 46, n. 2, p. 12–20, 2020.
- BONUGLI-SANTOS, R. C. et al. Enhanced textile dye decolorization by marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 using integrated statistical design. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 9, p. 8659-8668, 2016.
- BONUGLI-SANTOS, R. C. et al. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 269, 2015.
- BONUGLI-SANTOS, R. C. et al. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 1, p. 32-37, 2010.
- BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SETTE, L. D. The production of ligninolytic enzymes by marine-derived basidiomycetes and their biotechnological potential in the biodegradation of recalcitrant pollutants and the treatment of textile effluents. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 223, p. 2333–2345, 2012.
- BRENELLI, B. et al. Novel redox-active enzymes for ligninolytic applications revealed from multiomics analyses of *Peniophora* sp. CBMAI 1063, a laccase hyper-producer strain. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.
- BRÜSCHWEILER, B. J.; MERLOT, C. Azo dyes in clothing textiles can be cleaved into a series of mutagenic aromatic amines which are not regulated yet. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 88, p. 214-226, 2017.
- CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 5–6, p. 324–333, 1 nov. 1997.
- CERNIGLIA, C. E.; SUTHERLAND, J. B. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi. Em: GADD, G. M. (Ed.). **Fungi in Bioremediation**. British Mycological Society Symposia. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. p. 136–187.
- CHEN, H. et al. Contamination features and health risk of soil heavy metals in China. **Science of the total environment**, v. 512, p. 143-153, 2015.
- CHEQUER, FM et al. Textile dyes: dyeing process and environmental impact. **Eco-friendly textile dyeing and finishing**, v. 6, n. 6, p. 151-176, 2013.

- CHOWDHARY, P. et al. Microbial manganese peroxidase: A ligninolytic enzyme and its ample opportunities in research. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2019.
- CONESA, A. et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674-3676, 2005.
- CROCE, R. et al. Aquatic toxicity of several textile dye formulations: acute and chronic assays with *Daphnia magna* and *Raphidocelis subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, p. 79-87, 2017.
- CROWE, J. D.; OLSSON, S. Induction of laccase activity in *Rhizoctonia solani* by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains and a range of chemical treatments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2088-2094, 2001.
- DA SILVA, M. et al. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. **Environmental technology**, v. 29, n. 12, p. 1331-1339, 2008.
- DAS, S.; LYLA, P. S.; KHAN, S. Ajmal. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. **Current science**, p. 1325-1335, 2006.
- DE ALMEIDA, A. P. et al. Decolorization and detoxification of different azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* ME-446 under submerged fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 727-738, 2021.
- DE CAMPOS VENTURA-CAMARGO, B.; MARIN-MORALES, M. A. Azo dyes: characterization and toxicity-a review. **Textiles and Light Industrial Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 85-103, 2013.
- DE EUGENIO, L. I. et al. Characterization of a Dye-Decolorizing Peroxidase from *Irpex lacteus* Expressed in *Escherichia coli*: An Enzyme with Wide Substrate Specificity Able to Transform Lignosulfonates. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 5, p. 325, maio 2021.
- DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; SARGENT, K. The effect of lignin-related compounds on the growth and production of laccases by the ascomycete, *Botryosphaeria* sp. **Enzyme and microbial technology**, v. 30, n. 3, p. 374-380, 2002.
- DESHMUKH, R.; KHARDENAVIS, A. A.; PUROHIT, H. J. Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. **Indian journal of microbiology**, v. 56, n. 3, p. 247-264, 2016.
- Dimethylaniline Monooxygenase - an overview | ScienceDirect Topics**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/dimethylaniline-monooxygenase>>. Acesso em: 8 fev. 2023.
- DUARTE, A. W. F. et al. Production of cold-adapted enzymes by filamentous fungi from King George Island, Antarctica. **Polar Biology**, v. 41, n. 12, p. 2511-2521, 2018.
- EL BOURAIE, M.; EL DIN, W. S. Biodegradation of Reactive Black 5 by *Aeromonas hydrophila* strain isolated from dye-contaminated textile wastewater. **Sustainable Environment Research**, v. 26, n. 5, p. 209-216, 2016.
- ENAYATIZAMIR, K. et al. Assessment of the joint effect of laccase and cellobiose dehydrogenase on the decolouration of different synthetic dyes. **Journal of hazardous materials**, v. 169, n. 1-3, p. 176-181, 2009.
- ENAYATIZAMIR, N. et al. Biodegradation pathway and detoxification of the diazo dye Reactive Black 5 by *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10359-10362, 2011.
- ENOKI, M. et al. Chemical synthesis, iron redox interactions and charge transfer complex formation of alkylitaconic acids from *Ceriporiopsis subvermispora*. **Chemistry and physics of lipids**, v. 120, n. 1-2, p. 9-20, 2002.
- ENSHASY, El et al. *Pleurotus ostreatus*: A Biofactory for Lignin-Degrading Enzymes of Diverse Industrial Applications. In: **Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi**. Springer, Cham, 2019. p. 101-152.

- FERREIRA, P. et al. A survey of genes encoding H₂O₂-producing GMC oxidoreductases in 10 Polyporales genomes. **Mycologia**, v. 107, n. 6, p. 1105–1119, 1 nov. 2015.
- FONSECA, M. I. et al. Effect of chemical and metallic compounds on biomass, mRNA levels and laccase activity of *Phlebia brevispora* BAFC 633. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 8, p. 2251-2262, 2014.
- FONTES, B. et al. Laccases produced by *Peniophora* from marine and terrestrial origin: A comparative study. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 35, 2021.
- FOROUTAN, Rauf et al. Characteristics and performance of Cd, Ni, and Pb bio-adsorption using *Callinectes sapidus* biomass: real wastewater treatment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 7, p. 6336-6347, 2019.
- FREITAS, A. C. et al. Biological treatment of the effluent from a bleached kraft pulp mill using basidiomycete and zygomycete fungi. **Science of the total environment**, v. 407, n. 10, p. 3282-3289, 2009.
- GALHAUP, C.; HALTRICH, D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 225-232, 2001.
- GAVRILESCU, M. et al. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. **New biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 147-156, 2015.
- GIANFREDA, Liliana; XU, Feng; BOLLAG, Jean-Marc. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-26, 1999.
- GIČEVIĆ, A.; HINDIJA, L.; KARAČIĆ, A. Toxicity of azo dyes in pharmaceutical industry. In: **International Conference on Medical and Biological Engineering**. Springer, Cham, 2019. p. 581-587.
- GIOVANELLA, P. et al. Metal and organic pollutants bioremediation by extremophile microorganisms. **Journal of hazardous materials**, v. 382, p. 121024, 2020.
- GLAZUNOVA, O. A. et al. Purification and characterization of two novel laccases from *peniophora lycii*. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 340, 2020.
- GÓRALCZYK-BIŃKOWSKA, A. et al. Environmental and molecular approach to dye industry waste degradation by the ascomycete fungus *Nectriella pironii*. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 23829, 13 dez. 2021.
- GRABHERR, M. G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644-652, 2011.
- GRÖNING, J. A. D. et al. A mechanistic study on SMOB-ADP1: an NADH:flavin oxidoreductase of the two-component styrene monooxygenase of *Acinetobacter baylyi* ADP1. **Archives of Microbiology**, v. 196, n. 12, p. 829–845, 1 dez. 2014.
- GROSSART, H.; ROJAS-JIMENEZ, K. Aquatic fungi: targeting the forgotten in microbial ecology. **Current opinion in microbiology**, v. 31, p. 140-145, 2016.
- HANSEN, K. D.; BRENNER, S. E.; DUDOIT, S. Biases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 12, p. e131-e131, 2010.
- HAROLD, L. K. et al. FAD-sequestering proteins protect mycobacteria against hypoxic and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 8, p. 2903–5814, 1 fev. 2019.
- HE, X. et al. Efficient degradation of azo dyes by a newly isolated fungus *Trichoderma tomentosum* under non-sterile conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 150, p. 232-239, 2018.
- HEINE, T. et al. Two-Component FAD-Dependent Monooxygenases: Current Knowledge and Biotechnological Opportunities. **Biology**, v. 7, n. 3, p. 42, set. 2018.

- HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP) Enzyme Microb Technol. 2002; 30: 454–466. doi: 10.1016. **S0141-0229 (01)**, p. 00528-2, 2002.
- HOLMQUIST, M. Alpha Beta-Hydrolase Fold Enzymes Structures, Functions and Mechanisms. **Current Protein and Peptide Science**, v. 1, n. 2, p. 209–235, 1 set. 2000.
- HOU, H. et al. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1415-1419, 2004.
- HUSSAIN, R. et al. Fungal P450 monooxygenases-the diversity in catalysis and their promising roles in biocontrol activity. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 104, n. 3, p. 989-999, 2020.
- IMRAN, M. et al. Microbial biotechnology for decolorization of textile wastewaters. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 14, n. 1, p. 73-92, 2015.
- IP, A. W.; BARFORD, J. P.; MCKAY, G. Biodegradation of Reactive Black 5 and bioregeneration in upflow fixed bed bioreactors packed with different adsorbents. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 658–667, 2010.
- ISSAKHOV, A.; ALIMBEK, A.; ZHANDAULET, Y. The assessment of water pollution by chemical reaction products from the activities of industrial facilities: Numerical study. **Journal of Cleaner Production**, v. 282, p. 125239, 2021.
- JANG, M. Y.; RYU, W. Y.; CHO, M. H. Enhanced production of laccase from *Trametes* sp. by combination of various inducers. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 11, p. 96–99, 2006.
- KAIIRA, M. G. et al. Allelopathic potential of compounds in selected crops. **J. of Agricultural Science**, 2021.
- KANT, R. Textile dyeing industry an environmental hazard. 2011.
- KARIGAR, C. S.; RAO, S. S. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–11, 7 set. 2011.
- KAUR, H.; KAPOOR, S.; SHARMA, S. An efficient method for qualitative screening of ligninolytic enzyme potential of *ganoderma lucidium*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**, v. 7, p. 2442-59, 2018.
- KAUSHIK, P.; MALIK, A. Fungal dye decolourization: recent advances and future potential. **Environment international**, v. 35, n. 1, p. 127-141, 2009.
- KOLEKAR, Y. M. et al. Decolorization and biodegradation of azo dye, reactive blue 59 by aerobic granules. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 818–822, 1 jan. 2012.
- KOLLMANN, A. et al. Oligomeric compounds formed from 2, 5-xylydine (2, 5-dimethylaniline) are potent enhancers of laccase production in *Trametes versicolor* ATCC 32745. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 251-258, 2005.
- KUMAR, A. et al. Review on bioremediation of polluted environment:: A management tool. **International journal of environmental sciences**, v. 1, n. 6, p. 1079, 2011.
- LANG, W. et al. Caracterização de uma nova azoredutase insensível ao oxigênio de *Brevibacillus laterosporus* TISTR1911: Rumo à descoloração de corante usando um reator de afinidade de metal de leito empacotado. **Tecnologia de biorecursos**, v. 150, p. 298-306, 2013.
- LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature methods**, v. 9, n. 4, p. 357-359, 2012.
- LENFANT, N. et al. Proteins with an alpha/beta hydrolase fold: Relationships between subfamilies in an ever-growing superfamily. **Chemico-Biological Interactions**, 11th International Meeting on Cholinesterases. v. 203, n. 1, p. 266–268, 25 mar. 2013.
- LEVIN, L. N. et al. Decolorization and Detoxification of Synthetic Dyes by Mexican Strains of *Trametes* sp. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 23, p. 4610, 2019.

- LEVIN, L.; MELIGNANI, E.; RAMOS, A. M. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. **Bioresource technology**, v. 101, n. 12, p. 4554-4563, 2010.
- LI, B.; DEWEY, C.; N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 1-16, 2011.
- LI, H. et al. Manganese peroxidase production from cassava residue by *Phanerochaete chrysosporium* in solid state fermentation and its decolorization of indigo carmine. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 1, p. 227-233, 1 jan. 2015.
- LI, J. et al. Efficient decolorization and detoxification of azo dyes by a halotolerant yeast *Meyerozyma guilliermondii* A3 with relatively low external carbon source. **Journal of Water Process Engineering**, v. 47, p. 102810, 1 jun. 2022.
- LI, Xuelian et al. Highly efficient biodecolorization/degradation of Congo red and alizarin yellow R by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*: catalytic mechanism and degradation pathway. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 38, p. 13572-13579, 2013.
- LIN, S. et al. Bioremediation of organic pollutants by white rot fungal cytochrome P450: The role and mechanism of CYP450 in biodegradation. **Chemosphere**, v. 301, p. 134776, 1 ago. 2022.
- LIU, J. et al. Response of *Trametes hirsuta* to hexavalent chromium promotes laccase-mediated decolorization of reactive black 5. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 205, p. 111134, 1 dez. 2020.
- MADHAV, S. et al. A review of textile industry: Wet processing, environmental impacts, and effluent treatment methods. **Environmental Quality Management**, v. 27, n. 3, p. 31-41, 2018.
- MAINARDI, P. H. et al. Laccase production in bioreactor scale under saline condition by the marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063. **Fungal biology**, v. 122, n. 5, p. 302-309, 2018.
- MANIKANDAN, P.; NAGINI, S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. **Current Drug Targets**, v. 19, n. 1, 5 jan. 2018.
- MAO, Y. et al. Rapid degradation of malachite green by CoFe₂O₄-SiC foam under microwave radiation. **Royal Society open science**, v. 5, n. 6, p. 180085, 2018.
- MATE, D. M.; ALCALDE, M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1457-1467, 2017.
- MATSUO, M.; ENDO, T.; ASADA, K. Isolation of a Novel NAD(P)H-Quinone Oxidoreductase from the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. **Plant and Cell Physiology**, v. 39, n. 7, p. 751-755, 1 jul. 1998.
- MAY, S. W.; PADGETTE, S. R. Oxidoreductase Enzymes in Biotechnology: Current Status and Future Potential. *Bio/Technology*, N. 1, 677-686, 1983.
- MAZMANCI, M. A.; ÜNYAYAR, A. Decolourisation of Reactive Black 5 by *Funalia trogii* immobilised on *Luffa cylindrica* sponge. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 337-342, 2005.
- MOORE, S. A.; JENCKS, W. P. Model reactions for CoA transferase involving thiol transfer. Anhydride formation from thiol esters and carboxylic acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 18, p. 10882-10892, 25 set. 1982.
- NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W. α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, n. 6, p. 732-737, 1 dez. 1999.
- New and classic families of secreted fungal heme peroxidases | **SpringerLink**. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-010-2633-0>>. Acesso em: 5 fev. 2023.

- O'MAHONY, T.; GUIBAL, E.; TOBIN, J. M. Reactive dye biosorption by *Rhizopus arrhizus* biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 4, p. 456-463, 2002.
- OBEROI, A. S.; PHILIP, L. Variation in toxicity during the biodegradation of various heterocyclic and homocyclic aromatic hydrocarbons in single and multi-substrate systems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, p. 337-346, 2017.
- OTERO, I. V. R. et al. De novo transcriptome assembly: a new laccase multigene family from the marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.
- PASZCZYNSKI, A.; CRAWFORD, R. L. Potential for Bioremediation of Xenobiotic Compounds by the White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology Progress**, v. 11, n. 4, p. 368-379, 1995.
- PATEL, H.; GUPTE, A.; GUPTE, S. Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation. **BioResources**, v. 4, n. 1, p. 268-284, 2009.
- POLLEGIONI, L; et al. Lignin-degrading enzymes. *FEBS Journal*, v. 282, 1190-1213, 2015.
- Pyruvate dehydrogenase kinase-4 contributes to the recirculation of gluconeogenic precursors during postexercise glycogen recovery | **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpregu.00150.2013>>. Acesso em: 20 fev. 2023.
- RAJHANS, G. et al. Elucidation of fungal dye-decolourizing peroxidase (DyP) and ligninolytic enzyme activities in decolourization and mineralization of azo dyes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 6, p. 1633-1643, 2020.
- RATHI, B. S.; KUMAR, P. S. Sustainable approach on the biodegradation of azo dyes: A short review. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 33, p. 100578, 2022.
- RAVICHANDRAN, A. et al. **Transcriptomic analysis of *Lentinus squarrosulus* provide insights into its biodegradation ability**. [s.l.] Molecular Biology, 28 set. 2020. Disponível em: <<http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.09.28.316471>>. Acesso em: 7 fev. 2023.
- REKIK, H. et al. Physical and enzymatic properties of a new manganese peroxidase from the white-rot fungus *Trametes pubescens* strain i8 for lignin biodegradation and textile-dyes biodecolorization. **International journal of biological macromolecules**, v. 125, p. 514-525, 2019.
- RIEGAS-VILLALOBOS, A. et al. Efficient removal of azo-dye Orange II by fungal biomass absorption and laccase enzymatic treatment. **3 Biotech**, v. 10, n. 4, p. 1-10, 2020.
- ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010.
- ROBINSON, M. D.; SMYTH, G. K. Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. **Biostatistics**, v. 9, n. 2, p. 321-332, 2008.
- ROUTOULA, E.; PATWARDHAN, S. V. Degradation of Anthraquinone Dyes from Effluents: A Review Focusing on Enzymatic Dye Degradation with Industrial Potential. **Environmental Science & Technology**, v. 54, n. 2, p. 647-664, 21 jan. 2020.
- ROVIRA, J.; DOMINGO, J. L. Human health risks due to exposure to inorganic and organic chemicals from textiles: A review. **Environmental Research**, v. 168, p. 62-69, 2019.
- RUDAKIYA, D. M. et al. Fungal Bioremediation: A Step Towards Cleaner Environment. Em: SATYANARAYANA, T.; DESHMUKH, S. K.; DESHPANDE, M. V. (Eds.). **Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology: Basic and Applied Aspects of Fungi**. Singapore: Springer, 2019. p. 229-249.

- SAMSAMI, S. et al. Recent advances in the treatment of dye-containing wastewater from textile industries: Overview and perspectives. **Process safety and environmental protection**, v. 143, p. 138-163, 2020.
- SANTHANARAJAN, A.-E. et al. Transcriptomic Analysis of Degradative Pathways for Azo Dye Acid Blue 113 in *Sphingomonas melonis* B-2 from the Dye Wastewater Treatment Process. **Microorganisms**, v. 10, n. 2, p. 438, fev. 2022.
- SARAVANAN, S. et al. Biodegradation of textile dye Rhodamine-B by *Brevundimonas diminuta* and screening of their breakdown metabolites. **Chemosphere**, v. 308, p. 136266, 2022.
- SARITHA, M; et al. Biological pretreatment of lignocellulosic substrates for enhanced delignification and enzymatic digestibility. *Indian J Microbiol*, v. 52, 122-130, 2012
- SEN, S. K. et al. Fungal decolouration and degradation of azo dyes: A review. *Fungal Biology Reviews*, v. 30, n. 3, p. 112–133, 1 jul. 2016.
- SEPPEY, M.; MANNI, M.; ZDOBNOV, E. M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness. In: **Gene prediction**. Humana, New York, NY, 2019. p. 227-245.
- SHAH, M. P.; PATEL, K. A. Microbial degradation of reactive red 195 by three bacterial isolates in anaerobic-aerobic bioprocess. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, v. 2, n. 1, p. 5-11, 2014.
- SHAH, P. D.; DAVE, S. R.; RAO, M. S. Enzymatic degradation of textile dye Reactive Orange 13 by newly isolated bacterial strain *Alcaligenes faecalis* PMS-1. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 69, p. 41–50, 2012.
- SHANMUGAM, B. K. et al. Metabolic pathway and role of individual species in the bacterial consortium for biodegradation of azo dye: a biocalorimetric investigation. **Chemosphere**, v. 188, p. 81–89, 2017.
- SHANMUGAM, L. et al. Decolorization and detoxification of reactive azo dyes using cell cultures of a memory tonic herb *Evolvulus alsinoides* L. **Journal of environmental chemical engineering**, v. 6, n. 5, p. 6479–6488, 2018.
- SHARMA, B.; DANGI, A. K.; SHUKLA, P. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 210, p. 10–22, 15 mar. 2018.
- SEYEDI, Z. S.; ZAHRAEI, Z.; JOOKAR KASHI, F. Decolorization of Reactive Black 5 and Reactive Red 152 Azo Dyes by New Haloalkaliphilic Bacteria Isolated from the Textile Wastewater. *Current Microbiology*, v. 77, n. 9, p. 2084–2092, 1 set. 2020.
- SI, J.; CUI, B.; DAI, Y. Decolorization of chemically different dyes by white-rot fungi in submerged cultures. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1099-1108, 2013.
- SILVA, M. C. et al. The use of soybean peroxidase in the decolourization of Remazol Brilliant Blue R and toxicological evaluation of its degradation products. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 122-129, 2013.
- SINGH, A. K. et al. Bioremediation of lignin derivatives and phenolics in wastewater with lignin modifying enzymes: Status, opportunities and challenges. **Science of the Total Environment**, v. 777, p. 145988, 2021.
- SIVAPERUMAL, P.; KAMALA, K.; RAJARAM, R. Bioremediation of industrial waste through enzyme producing marine microorganisms. In: **Advances in food and nutrition research**. Academic Press, 2017. p. 165-179.
- SMIT, M. S. Fungal epoxide hydrolases: new landmarks in sequence-activity space. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 123–129, 1 mar. 2004.
- SMPDB: The Small Molecule Pathway Database | Nucleic Acids Research | Oxford Academic. Disponível em:

- <https://academic.oup.com/nar/article/38/suppl_1/D480/3112152?login=false>. Acesso em: 20 fev. 2023.
- SOUZA, N. A. DE et al. Differential Protein Expression in *Shewanella seohaensis* Decolorizing Azo Dyes. **Current Proteomics**, v. 16, n. 2, p. 156–164, [s.d.].
- STONE, C. et al. Natural or synthetic—how global trends in textile usage threaten freshwater environments. **Science of the Total Environment**, v. 718, p. 134689, 2020.
- STRONG, P. J.; CLAUS, H. Laccase: a review of its past and its future in bioremediation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 4, p. 373-434, 2011.
- SUN, S. et al. Enhancement of Environmental Hazard Degradation in the Presence of Lignin: a Proteomics Study. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 11356, 12 set. 2017.
- SURTI, A.; ANSARI, R. Characterization of dye degrading potential of suspended and nanoparticle immobilized cells of *Pseudomonas aeruginosa* AR-7. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2021, p. 774–780, 2021.
- SYAFIUDDIN, A.; FULAZZAKY, M. A. Decolorization kinetics and mass transfer mechanisms of Remazol Brilliant Blue R dye mediated by different fungi. **Biotechnology Reports**, v. 29, p. e00573, 1 mar. 2021.
- TAHIR, U. et al. Assessment of biodecolorization potentials of biofilm forming bacteria from two different genera for Mordant Black 11 dye. **Bioremediation Journal**, v. 25, n. 3, p. 252-270, 2021.
- TARAZONA, S. et al. Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 21, p. e140-e140, 2015.
- Targeting Aldehyde Dehydrogenase 2: New Therapeutic Opportunities | Physiological Reviews.** Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00017.2013>>. Acesso em: 11 fev. 2023.
- TAVARES, Magali Ferreira et al. Decolorization of azo and anthraquinone dyes by crude laccase produced by *Lentinus crinitus* in solid state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 99-106, 2020.
- THAKKAR, A. T.; BHATT, S. A. Isolation, identification, and optimization of laccase from *Alternaria alternata*. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 6-9, 2020.
- TRISOLINI, L. et al. FAD/NADH Dependent Oxidoreductases: From Different Amino Acid Sequences to Similar Protein Shapes for Playing an Ancient Function. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 12, p. 2117, dez. 2019.
- UJOR, V. C. et al. The mycelial response of the white-rot fungus, *Schizophyllum commune* to the biocontrol agent, *Trichoderma viride*. **Fungal Biology**, v. 116, n. 2, p. 332–341, 1 fev. 2012.
- VASCONCELOS, M. R. S. et al. Pyrene degradation by marine-derived ascomycete: process optimization, toxicity, and metabolic analyses. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 12, p. 12412–12424, 1 abr. 2019.
- VIEIRA, G. A. L. et al. Marine associated microbial consortium applied to RBBR textile dye detoxification and decolorization: Combined approach and metatranscriptomic analysis. **Chemosphere**, v. 267, p. 129190, mar. 2021.
- VIEIRA, G. A. L. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by marine-derived basidiomycetes: optimization of the degradation process. **brazilian journal of microbiology**, v. 49, p. 749-756, 2018.
- WANG, B. et al. Heterologous expression and characterisation of a laccase from *Colletotrichum lagenarium* and decolourisation of different synthetic dyes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 1-9, 2016.

- WANG, H. et al. An aldo-keto reductase, Bbakr1, is involved in stress response and detoxification of heavy metal chromium but not required for virulence in the insect fungal pathogen, *Beauveria bassiana*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 111, p. 7–15, 1 fev. 2018.
- WANG, Na et al. Decolorization and degradation of Congo red by a newly isolated white rot fungus, *Ceriporia lacerata*, from decayed mulberry branches. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 117, p. 236-244, 2017.
- WANG, X. et al. Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. **Chemosphere**, v. 44, n. 8, p. 1711-1721, 2001.
- WANG, Yuyang et al. Resuscitation, isolation and immobilization of bacterial species for efficient textile wastewater treatment: a critical review and update. **Science of the Total Environment**, v. 730, p. 139034, 2020.
- YAKOP, F. et al. Isolation of fungi from various habitats and their possible bioremediation. **Curr Sci**, v. 116, n. 5, p. 733, 2019.
- YANG, X. et al. Increasing manganese peroxidase production and biodecolorization of triphenylmethane dyes by novel fungal consortium. **Bioresource technology**, v. 102, n. 22, p. 10535-10541, 2011.
- YAO, N. et al. Impact of industrial production, dam construction, and agriculture on the Z-IBI in river ecosystems: A case study of the wanan river basin in China. **Water**, v. 13, n. 2, p. 123, 2021.
- ZHANG, H. et al. 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**, v. 320, p. 265–277, 15 dez. 2016.
- ZHANG, J.; CHI, Y.; FENG, L. The mechanism of degradation of alizarin red by a white-rot fungus *Trametes gibbosa*. **BMC Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 64, 5 nov. 2021.
- ZHONG, Z. et al. Transcriptome analysis of differential gene expression in *Dichomitus squalens* during interspecific mycelial interactions and the potential link with laccase induction. **Journal of Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 127–137, 1 fev. 2019.