

**ACTAS DA  
6ª CONFERÊNCIA NACIONAL  
SOBRE A QUALIDADE DO AMBIENTE**



**Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente  
Faculdade de Ciências e Tecnologia  
Universidade Nova de Lisboa**

**Esta publicação contém as comunicações apresentadas na  
6ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente,  
realizada em Lisboa, de 20 a 22 de Outubro de 1999**

## ESTUDOS DE BIODEGRADABILIDADE DE CORANTES AZO DE APLICAÇÃO TÊXTIL POR *Phanerochaete chrysosporium*

M.A. MARTINS<sup>1,2</sup>, I.C. FERREIRA<sup>1</sup>, I.M. SANTOS<sup>2</sup>, M.J. QUEIROZ<sup>1</sup> e N. LIMA<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Centro de Química - IBQF, Universidade do Minho, 4700-320 Braga;  
<sup>2</sup>Centro de Engenharia Biológica - IBQF, Universidade do Minho, 4700-320 Braga.

### RESUMO

Sintetizaram-se corantes *azo* de aplicação têxtil, usando como componentes *diazo* ácidos aminobenzóicos e aminosulfônicos e como componentes de acoplamento 2-metoxifenol e 2,6-dimetoxifenol. A utilização destas componentes de acoplamento teve como objectivo aumentar a bioacessibilidade dos corantes ao fungo lenhicolítico da podridão branca *Phanerochaete chrysosporium*, já que estes grupos estão presentes na estrutura da lenhina e têm sido referidos como pontos de acesso para o sistema enzimático lenhicolítico do fungo. As experiências de biodegradação realizaram-se em meio líquido, com sacarose e em condições limitantes de azoto, com agitação e temperatura controladas. A biodegradação dos corantes foi acompanhada por espectrofotometria UV-Visível, quantificando a diminuição da intensidade da banda de absorção máxima ( $\lambda_{max}$ ) do corante. Em estudos preliminares estabeleceram-se condições experimentais optimizadas relativamente ao meio de pré-adaptação e à concentração de sacarose utilizada. Estabeleceram-se algumas correlações entre a estrutura química dos corantes e a sua biodegradação.

**PALAVRAS CHAVE:** Corantes *azo*, estrutura química/extensão da biodegradação, bioacessibilidade, *P. chrysosporium*, tratamento de efluentes.

### INTRODUÇÃO

Os corantes sintéticos do tipo *azobenzeno* são extensivamente usados nas indústrias de tinturaria têxtil, estando estimado que 10 a 15% do corante é perdido para o efluente durante o processo de tingimento. Este tipo de corantes são, no entanto, compostos xenobióticos recalcitrantes devido a possuírem a ligação N=N e, ainda, devido ao facto de poderem conter outros grupos que não são facilmente biodegradáveis como, por exemplo, grupos sulfónicos (SO<sub>3</sub>H). Para além de, por si só, serem considerados tóxicos, o seu impacte ambiental nocivo é aumentado pela formação de

aminas aromáticas (anilinas) consideradas carcinogénicas e/ou mutagénicas, originadas pela quebra redutiva da ligação *azo* que, normalmente, ocorre em condições de anaerobiose [1,4].

Alguns fungos filamentosos como, por exemplo, o fungo lenhínolítico da podridão branca *P. chrysosporium*, demonstraram capacidade de biodegradar este tipo de corantes através dos seus mecanismos oxidativos, o que pode evitar a formação de anilinas e conduzir a uma completa mineralização do corante [6,8,9]. Verifica-se que os corantes *azo* são biodegradados mais eficazmente sob determinadas condições do meio de cultura, nomeadamente quando a fonte de azoto é limitada [8]. A biodegradação deste tipo de corantes também é influenciada pela posição e a natureza dos substituintes em relação à ligação *azo* [5].

Sintetizaram-se corantes *azo* (Fig. 1) com grupos bioacessíveis, 2-metoxifenol (guaiacol) e 2,6-dimetoxifenol (siringol), ao *P. chrysosporium* [3] com o objectivo de aumentar a extensão da biodegradação, já que esses grupos são pontos de acesso para o sistema enzimático lenhínolítico do fungo [4,6,8].

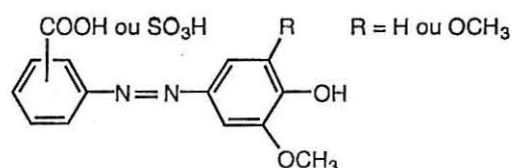


Fig. 1 - Estrutura química geral dos corantes *azo* sintetizados.

Os resultados obtidos permitiram estabelecer algumas correlações entre a estrutura dos corantes e a extensão da descoloração observada e demonstraram que o processo biodegradativo pode ser influenciado pela posição e natureza dos grupos substituintes, ácidos carboxílicos ou sulfónicos, nas posições *meta* ou *para* em relação à ligação N=N e pela natureza da componente fenólica [7].

## MATERIAL E MÉTODOS

### Microrganismo

A estirpe ATCC 24725 do fungo da podridão-branca *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall & Eslyn 1974 utilizada nas experiências de biodegradação foi cedida pela Micoteca da Universidade do Minho e previamente adaptada a um dos corantes *azo* sintetizados (*Sm-g*: Corante ácido 3-aminobenzenossulfónico → guaiacol) em meio sólido.

### Síntese de corantes azo

Sintetizaram-se 8 corantes *azo* usando como componentes diazo ácidos *meta* ou *para* aminobenzóicos ou aminosulfônicos e como componentes de acoplamento guaiacol ou siringol (Fig. 2).

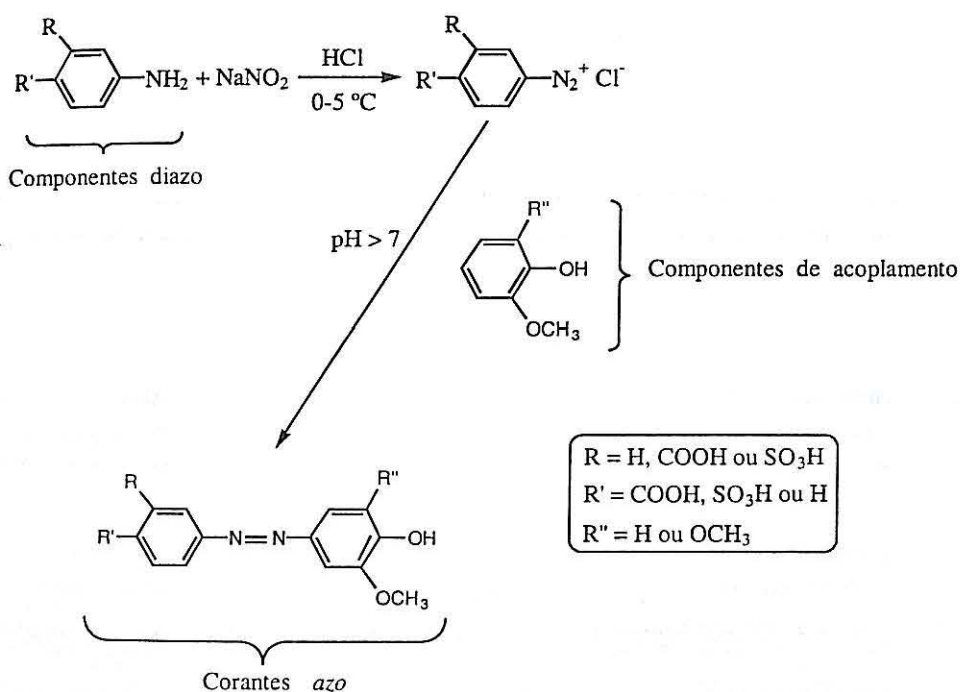
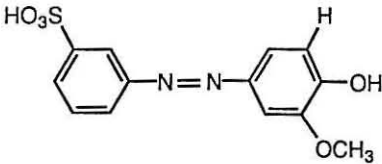
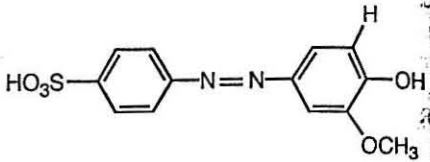
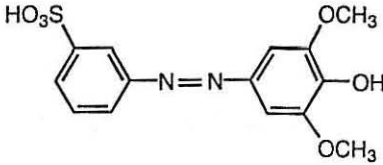
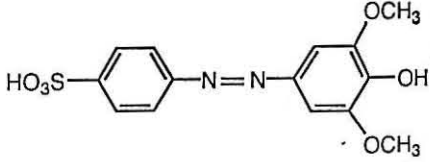
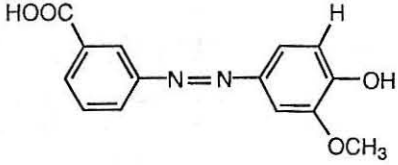
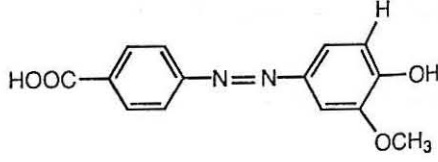
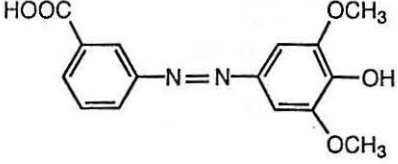
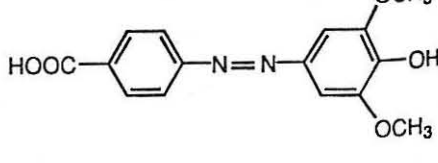


Fig. 2 - Esquema da síntese dos corantes *azo* preparados neste trabalho.

Os corantes sintetizados (Quadro I) foram caracterizados usando espectroscopia de UV-Visível, espectroscopia de IV, espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN e espectrometria de massa [3].

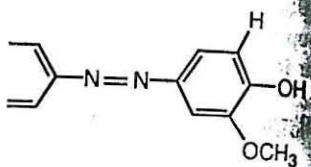
A nomenclatura apresentada em que se indica a componente *diazo* → componente de acoplamento é usada em química têxtil, para sugerir o processo de síntese. As siglas utilizadas traduzem o tipo de ácido (Sulfônico - S ou Carboxílico - C) a sua posição em relação à ligação *azo* (*meta* - *m* ou *para* - *p*) e também a componente de acoplamento (guaiacol - *g* e siringol - *s*).

Quadro I - Estrutura e identificação dos 8 corantes *azo* sintetizados.

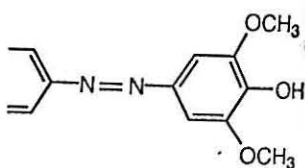
<p>•Corante <i>Sm-g</i> - Corante ácido 3-aminobenzenossulfônico→guaiacol</p> 	<p>•Corante <i>Sp-g</i> - Corante ácido 4-aminobenzenossulfônico→guaiacol</p> 
<p>•Corante <i>Sm-s</i> - Corante ácido 3-aminobenzenossulfônico→siringol</p> 	<p>•Corante <i>Sp-s</i> - Corante ácido 4-aminobenzenossulfônico→siringol</p> 
<p>•Corante <i>Cm-g</i> - Corante ácido 3-aminobenzóico→guaiacol</p> 	<p>•Corante <i>Cp-g</i> - Corante ácido 4-aminobenzóico→guaiacol</p> 
<p>•Corante <i>Cm-s</i> - Corante ácido 3-aminobenzóico→siringol</p> 	<p>•Corante <i>Cp-s</i> - Corante ácido 4-aminobenzóico→siringol</p> 

s azo sintetizados.

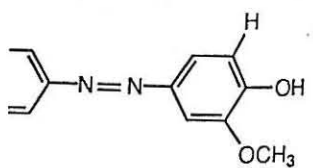
nte *Sp-g* - Corante ácido  
enzenossulfónico → guaiacol



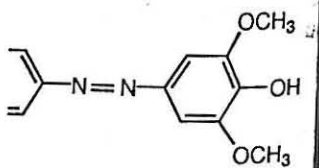
ite *Sp-s* - Corante ácido  
enzenossulfónico → siringol



te *Cp-g* - Corante ácido  
obenzóico → guaiacol



e *Cp-s* - Corante ácido  
obenzóico → siringol



### Condições de cultura

O meio líquido (de composição química: 5g/L de Sacarose, 0,5g/L de Sulfato de Amónio, 35 g/L de meio mineral base YNB-Yeast Nitrogen Base, 1 g/L de L-Asparagina e 50 mg/L de um dos corantes azo sintetizados) foi autoclavado e o valor do pH controlado (pH = 4,4). As soluções-mãe dos corantes (100 x), de YNB (10 x) e de L-Asparagina (10 x) foram adicionadas asepticamente ao meio de cultura, depois de esterilizadas por filtração, através de membranas de porosidade 0,45 µm. Os meios sólidos usados foram: TWA - Tape Water Agar (meio composto por 15 g/L de agar em água da torneira), MEA - Malt Extract Agar, meio re-hidratado na concentração de 30g/L (composto por 30 g/L de Extracto de malte, 5 g/L de Peptona micológica e 15 g/L de Agar) e o meio de pré-adaptação - MPA (meio de composição química igual à do meio líquido com o corante *Sm-g*, solidificado com 15 g/L de agar).

O inóculo foi constituído por 5 cilindros, de 8 mm de diâmetro, obtidos a partir de uma cultura em meio sólido.

### Experiências de biodegradação

As experiências de biodegradação dos 8 corantes, utilizando a estirpe referida de *P. chrysosporium*, foram efectuadas em meio nutritivo de sacarose e com a fonte de azoto limitada, em culturas líquidas agitadas (a 150 rpm) numa incubadora orbital Certomat com condições controladas de temperatura (a 30 °C). A partir do tempo zero, recolheram-se amostras em intervalos de tempo regulares (de 7 em 7 dias) até ao fim de 28 dias de incubação, com o objectivo de determinar a biomassa, a concentração do corante e a concentração de sacarose.

A biomassa foi obtida por filtração por vácuo através de membranas de porosidade 0,45 µm, colocadas na estufa a 105 °C, de forma a determinar, por análise gravimétrica, o valor do seu peso seco.

A concentração de sacarose foi determinada, ao longo do tempo, pelo método colorimétrico, utilizando-se o Kit/teste-combinação cat.No.139041 Boehringer Mannheim, registando-se as absorvâncias a 340 nm de forma a permitir calcular o valor da concentração de sacarose a partir da respectiva curva de calibração.

A biodegradação dos corantes foi acompanhada por espectroscopia de UV-Visível, quantificando a diminuição da intensidade da banda de absorção máxima ( $\lambda_{max}$ ) do corante, num espectrofotómetro UV/VIS Jasco 7850 (Japan Spectroscopic Co., Ltd). Os espectros foram traçados a partir de 1 ml de amostra do sobrenadante diluída em 2,5 ml de solução tampão apropriada. Para isso, prepararam-se soluções tampão de ácido cítrico/hidrogenofosfato de sódio [2] de diferentes valores de pH (de 3,0 a 6,4) com o objectivo de seleccionar o mais adequado (pH = 4,4), considerando que o espectro de absorção deste tipo de corantes é dependente do valor do pH.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo do tempo foi evidente a descoloração do meio de cultura, a par do desenvolvimento da biomassa da estirpe de *P. chrysosporium* inoculada (Fig. 3).

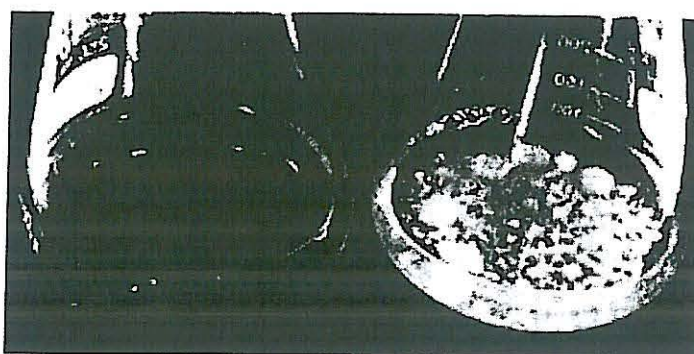


Fig. 3 - Meio de cultura líquido com o corante *Cm-s*, no tempo zero, após a inoculação (à esquerda) e ao fim de 28 dias de incubação (à direita).

A par destas observações, obtiveram-se os espectros de UV-Visível das várias amostras recolhidas ao longo do tempo, que confirmavam a diminuição da intensidade de cor das soluções dos corantes testados (ex. Fig. 4).

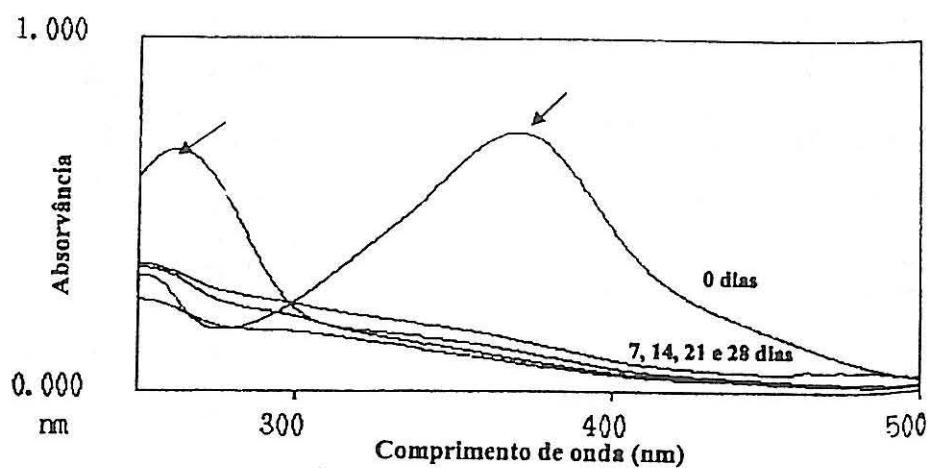


Fig. 4 - Espectro de UV-vis, relativo à biodegradação do corante *Sp-g*, ao longo de diferentes tempos de amostragem. As setas indicam a tendência para a diminuição das bandas na região do UV e do Visível.

ração do meio de cultura, a *Asporium* inoculada (Fig. 3).



te *Cm-s*, no tempo zero, após 7, 14, 21 e 28 dias de incubação (à direita).

ectros de UV-Visível das várias amostras indicam a diminuição da intensidade da banda de absorção do corante ao longo do tempo.



ção do corante *Sp-g*, ao longo do tempo, os resultados indicam a tendência para a biodegradação do corante no UV-Visível.

Ao longo de todos os ensaios observou-se uma descoloração do meio de cultura e uma respectiva diminuição da intensidade da banda na zona do UV próximo-visível, evidenciando a biodegradação deste tipo de corantes, atendendo a que, nos ensaios realizados, não se registou uma variação significativa da concentração dos corantes devido, meramente, à formação de complexos de adsorção corante/microrganismo (biomassa incolor). O aparecimento de bandas de absorção na região UV longínquo pode indicar a formação de moléculas mais simples resultantes da biodegradação dos corantes azo testados. A diminuição da banda na região UV longínquo permite evidenciar a tendência para a mineralização deste tipo de corantes (ex. Fig. 4).

Perante diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura (1, 5 e 10 mg/L) verificou-se a existência de resultados mais favoráveis com a utilização de 5 mg/L de sacarose (Fig. 5).

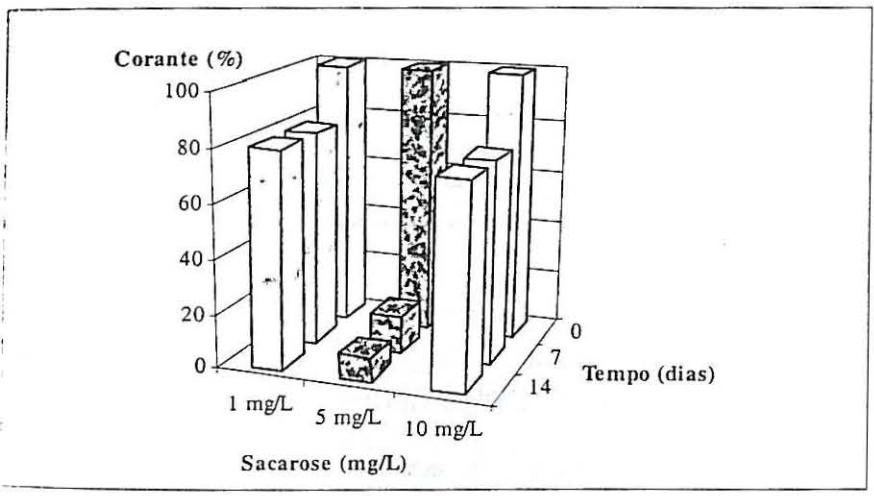


Fig. 5 - Biodegradação do corante *Sm-g* ao longo do tempo de incubação, em meios de cultura com diferentes concentrações de sacarose.

A biodegradação deste tipo de corantes não se verificou na ausência de sacarose, o que indica que o fungo não foi capaz de utilizar os corantes como única fonte de carbono e energia. O desenvolvimento da biomassa acompanhou o desaparecimento da sacarose e a biodegradação do corante como se pode verificar, a título exemplificativo, no caso do corante *Sm-g* (Fig. 6).

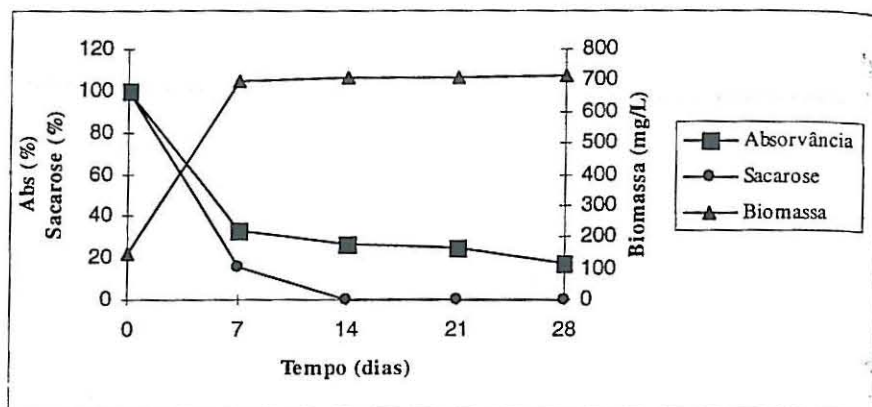


Fig. 6 - Diminuição da concentração do corante *Sm-g*, da concentração de sacarose e o aumento da biomassa, ao longo do tempo de incubação.

Perante estes resultados coloca-se a hipótese do corante ser utilizado como nutriente numa situação de cometabolismo.

O meio de cultura sólido, que demonstrou ser mais adequado para a obtenção do inóculo do fungo, foi o MPA, que permitiu uma pré-adaptação a este tipo de corantes (Fig. 7).

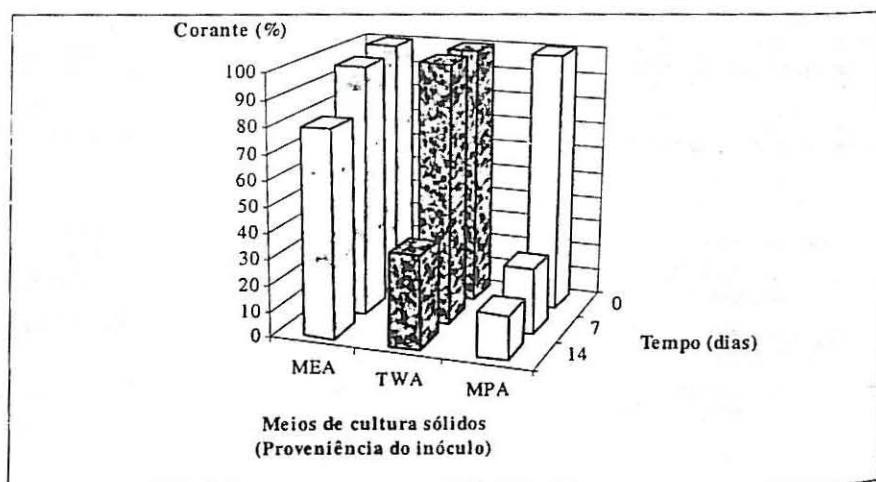
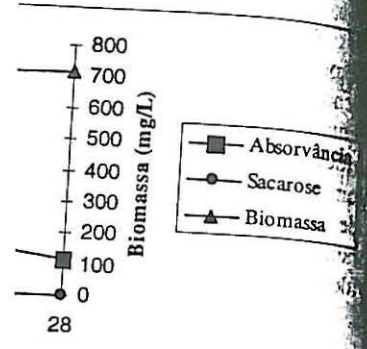


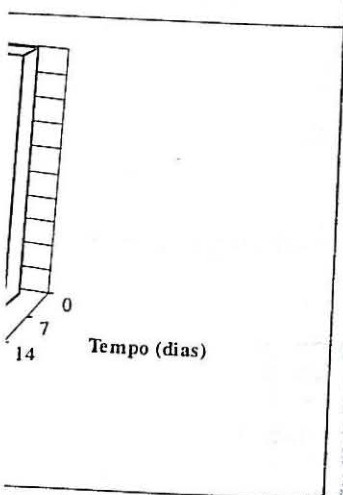
Fig. 7 - Biodegradação do corante *azo Sm-g* em meio líquido, utilizando inóculos provenientes de diferentes meios de cultura sólidos: MEA, TWA e MPA.



ante *Sm-g*, da concentração do ongo do tempo de incubação.

do corante ser utilizado como

ais adequado para a obtenção do laptação a este tipo de corantes



em meio líquido, utilizando s de cultura sólidos: MEA,

As componentes de acoplamento utilizadas, guaiacol e siringol, comprovaram ser grupos bioacessíveis, atingindo-se valores consideráveis de biodegradação, 89 % no caso do corante *Sp-g* e 88 % no caso do corante *Cm-s* (Fig. 8).

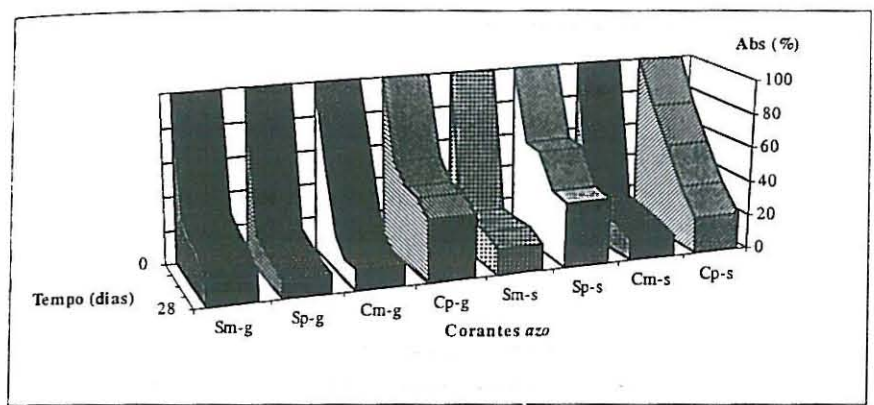


Fig. 8 - Biodegradação dos 8 corantes azo ao longo de 28 dias de incubação, com o fungo pré-adaptado a *Sm-g*.

Verificou-se que todos os corantes que apresentam o grupo substituinte ácido na posição *meta* são mais eficazmente biodegradados, em particular, os carboxílicos, *Cm-g* e *Cm-s* (Fig. 8). Verifica-se uma exceção no caso do corante *Sp-g*, cuja extensão de biodegradação não difere de forma significativa do corante *Sm-g*, o que se poderá justificar pela importância de se ter utilizado um corante também sulfônico e com igual componente de acoplamento (guaiacol) no meio sólido de pré-adaptação, sendo necessária mais investigação nesse sentido.

### CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Sintetizaram-se corantes com bioacessibilidade aumentada para fungos lenhicolíticos, como o fungo da podridão branca *P. chrysosporium*, pela introdução de grupos presentes na estrutura da lenhina.

Optimizaram-se as condições experimentais para a biodegradação destes corantes por este fungo (concentração de sacarose e pré-adaptação).

Verificou-se que a biodegradação ocorreu em grande extensão confirmando-se, entre outros factores, a relação estrutura química do corante-biodegradação.

Criam-se assim perspectivas vantajosas tanto para as indústrias têxteis, na utilização de corantes que possuam na sua estrutura grupos bioacessíveis a determinados agentes biológicos, como para o tratamento biológico de efluentes usando microrganismos que utilizem processos oxidativos de biodegradação evitando a produção de aminas aromáticas por redução da ligação N=N (*azo*).

## AGRADECIMENTOS

Isabel M. Santos e M. Adosinda Martins são financiadas, respectivamente, pelas Bolsas de Doutorado Praxis XXI/BD/9120/96 e Praxis XXI/BD/15878/98.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]CHUNG, K.-T. e JR. STEVENS, E. 1993. Degradation of Azo dyes by environmental microorganisms and helminths. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **12**, 2121-2132.
- [2]DAWSON, R.M.C. *et al.* 1986. *Data for Biochemical Research*. 3ª ed. Oxford Science Publications. Clarendon Press, Oxford.
- [3]FERREIRA, I.C. 1998. *Síntese e Biodegradação de corantes azo por Phanerochaete chrysosporium*. Tese de Mestrado em Ciências do Ambiente, Universidade do Minho, Braga.
- [4]GOTTSCHALK, G. e KNACKMUSS, H-J. 1993. Bacteria and the Biodegradation of Chemicals achieved naturally by combination or by construction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32**, 1398-1408.
- [5]PASTY-GRIGSBY, M.B.; PASZCZYNSKI, A.; GOSZCZYNSKI, S.; CRAWFORD, D.L. e CRAWFORD, R.L. 1992. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3605-3613.
- [6]PASZCZYNSKI, A.; PASTI-GRIGSBY, M.B.; GOSZCZYNSKI, S.; CRAWFORD, D.L. e CRAWFORD, R.L. 1991. New approach to improve degradation of recalcitrant azo dyes by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 378-384.
- [7]PASZCZYNSKI, A.; PASTI-GRIGSBY, M.B.; GOSZCZYNSKI, S.; CRAWFORD, R.L. e CRAWFORD, D.L. 1992. Mineralization of sulfanated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3598-3604.
- [8]SPADARO, J.T.; GOLD, M.H. e RENGANATHAN, V. 1992. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *P. chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2397-2401.
- [9]ZHOU, W. e ZIMMERMANN, W. 1993. Decolorization of industrial effluents containing reactive dyes by actinomycetes. *FEMS Microbiology Letters* **107**, 157-162.

**ACTAS**  
**DA**  
**6ª CONFERÊNCIA NACIONAL**  
**SOBRE A QUALIDADE DO AMBIENTE**

**Lisboa**  
**20 a 22 de Outubro de 1999**

**VOLUME 3**

**Comissão Organizadora**

**Fernando José Pires Santana**  
**Lia Maldonado Teles de Vasconcelos**  
**Maria do Rosário Sintra de Almeida Partidário**  
**Maria Júlia Fonseca Seixas**  
**Maria Paula Oliveira Sobral**

A Publicação das Actas foi, parcialmente, apoiada pela *Fundação Calouste Gulbenkian*