

LUCAS MOREIRA MAIA

**UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS PARA A LIBERAÇÃO DE
CARBOIDRATOS E DESCOLORAÇÃO DO CORANTE PRESENTE EM
RESÍDUOS DE TECIDO DENIM**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes

Coorientadora: Marisa Vieira de Queiroz

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

M217u
2022
Maia, Lucas Moreira, 1994-
Utilização de enzimas fúngicas para a liberação de carboidratos e
descoloração do corante presente em resíduos de tecido denim / Lucas
Moreira Maia. - Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (58 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.285>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Indústria têxtil de algodão. 2. Resíduos industriais. 3. Enzimas
fúngicas. 4. Brim (Tecido). I. Mendes, Tiago Antônio de Oliveira, 1986-. II.
Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III.
Título.

CDD 22. ed. 660.62

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

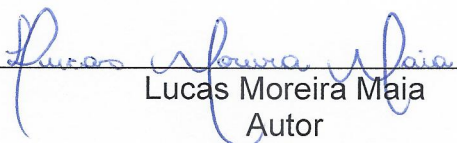
LUCAS MOREIRA MAIA

UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS PARA A LIBERAÇÃO DE
CARBOIDRATOS E DESCOLORAÇÃO DO CORANTE PRESENTE EM
RESÍDUOS DE TECIDO DENIM

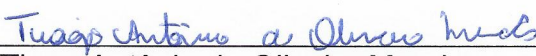
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2022.

Assentimento:



Lucas Moreira Maia
Autor



Tiago Antônio de Oliveira Mendes
Orientador

*Dedico este trabalho aos meus pais Cláudia
e Adilson, e aos meus avós Ieda, Marco
Aurélio e Cida.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela coragem, proteção, sabedoria e principalmente saúde dada para finalizar essa trajetória durante esse período tão intenso. Ao professor e meu orientador Tiago Mendes, que me acompanhou ao longo desses anos de mestrado, por ter contribuído com tantos ensinamentos e ter me orientado com bastante paciência e otimismo. Às professoras Marisa Vieira e Gabriela Maitan-Alfnas por disponibilizar espaço e recursos dos laboratórios pelas quais são responsáveis. Foi fundamental para o desenvolvimento desta pesquisa. Aos pós-doc Túlio Morgan e Leandro Lopes por todo auxílio.

Aos colegas do LGMM, Leandro, Felipe, Osiel, Rafael, Ediones, Patrícia, Mirele e Janaína, entre outros, muito obrigado pelo acolhimento, pela parceria, pelos ensinamentos, e, principalmente, por tornar o ambiente de trabalho um ambiente extremamente agradável. Adorei conhecer vocês.

A toda equipe do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM) pelo suporte e amizade.

Aos amigos de Viçosa que presenteou.

Aos meus familiares por permitir que esta conquista fosse possível. Em especial aos meus pais Claudia e Adilson. Amo todos vocês.

À Universidade Federal de Viçosa, a coordenação do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e às agências financiadoras CAPES, CNPq e, em especial, à FAPEMIG por permitirem a realização desse trabalho.

RESUMO

MAIA, Lucas Moreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Utilização de Enzimas Fúngicas para a Liberação de Carboidratos e Descoloração do Corante Presente em Resíduos de Tecido Denim.** Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes. Coorientadora: Marisa Vieira de Queiroz.

O aumento da demanda global por produtos têxteis nos últimos anos tem tornado a indústria têxtil um setor de destaque na produção manufatureira. O aumento do poder de consumo da população aliado as mudanças rápidas da moda, contribui para o aceleramento da geração de resíduos têxteis que se acumulam no meio ambiente. O tecido denim representa uma das maiores frações desses resíduos, resultando em um montante de 2,16 milhões de toneladas anuais. Grande parte desses resíduos são descartados em aterros, tornando-se nocivos ao solo, a água e a atmosfera, principalmente pela presença de substâncias xenobióticas recalcitrantes, como os corantes sintéticos. Porcentagens mínimas de resíduos têxteis são recicladas ou reutilizadas. A reciclagem bioquímica de têxteis utilizando produtos de origem microbiológica é um método de recuperação de componentes valiosos presentes nesses resíduos. Essa rota de reciclagem tem sido considerada ambientalmente mais adequada em comparação com técnicas clássicas de gestão de resíduos, no entanto, mais pesquisas são necessárias para aumentar a sua viabilidade técnica e econômica. Enzimas lignocelulolíticas têm potencial para degradar e transformar compostos poliméricos das fibras vegetais. Nos tratamentos de resíduos de origem vegetal, essas enzimas podem ser aplicadas para recuperar açúcares fermentescíveis que são convertidos em produtos de alto valor agregado. Índigo *blue* é o corante mais utilizado na pigmentação do denim. Na natureza, esse corante se torna recalcitrante ou modificado em aminas altamente tóxicas. As enzimas lacases são capazes de oxidar compostos hidróxifenólicos, sendo bastante utilizadas em processos biotecnológicos para a oxidação da porção fenólica da lignina. Na presença de mediadores redox, as lacases têm a sua ação expandida para diversos outros substratos, incluindo compostos não fenólicos. Em vista disso, muitos estudos têm explorado lacases fúngicas associadas as moléculas mediadoras para a descoloração de corantes derivados da indústria têxtil. Em contato com o denim, as celulases liberam carboidratos presentes nas fibras de algodão, entretanto, essas enzimas são capazes de acelerar a abrasão do corante, sendo esses liberados no meio ambiente.

Esse fato mostra que reciclagem bioquímica do denim deve envolver não somente a hidrólise das fibras, mas também a descoloração do corante. A produção de enzimas lignocelulolíticas por fungos endofíticos está diretamente relacionado a sua capacidade de colonizar os hospedeiros durante fases específicas da infecção. Fungos endofíticos produzem enzimas que são frequentemente mais estáveis em relação a outras fontes. Determinadas espécies do gênero *Colletotrichum* com diferentes estilos de vida já foram identificadas como lacase positivas, porém faltam estudos que explorem o potencial biotecnológico dessas enzimas. Diante disso, este trabalho tem como objetivo desenvolver estratégias integradas de valoração da matéria celulolítica do denim, além de avaliar o potencial de espécies de *Colletotrichum* em expressar as enzimas de interesse.

Palavras-chave: Resíduos têxteis. Denim. Enzimas fúngicas. Endofíticos. *Colletotrichum*. Recuperação de glicose. Descoloração.

ABSTRACT

MAIA, Lucas Moreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2022. **Use of Fungal Enzymes to Release Carbohydrates and Decolorize Dye Present in Denim Fabric Waste.** Adviser: Tiago Antônio de Oliveira Mendes. Co-adviser: Marisa Vieira de Queiroz.

The increase in global demand for textile products in recent years has made the textile industry a prominent sector in manufacturing production. The increase in the population's purchasing power combined with the rapid changes in fashion, contributes to the accelerated generation of textile waste that accumulates in the environment. Denim fabric represents one of the largest fractions of this waste, resulting in an amount of 2.16 million tons annually. Much of this waste is disposed of in landfills, becoming harmful to soil, water and atmosphere, mainly due to the presence of recalcitrant xenobiotic substances, such as synthetic dyes. Minimal percentages of textile waste are recycled or reused. Biochemical recycling of textiles using products of microbiological origin is one method of recovering valuable components present in this waste. This recycling route has been considered environmentally more suitable compared to classical waste management techniques, however, more research is needed to increase its technical and economic feasibility. Lignocellulolytic enzymes have the potential to degrade and transform polymeric compounds from plant fibers. In plant-based waste treatments, these enzymes can be applied to recover fermentable sugars that are converted into high value-added products. Indigo *blue* is the most widely used dye in denim pigmentation. In nature, it becomes recalcitrant or modified into highly toxic amines. The enzyme laccase is able to oxidize hydroxyphenolic compounds, being widely used in biotechnological processes for the oxidation of the phenolic portion of lignin. In the presence of redox mediators, laccases have their action potential expanded to several other substrates, including non-phenolic compounds. In view of this, many studies have explored fungal lacases associated with mediator molecules for the decolorization of dyes derived from the textile industry. In contact with denim, the cellulases release carbohydrates present in the cotton fibers, however, these enzymes are able to accelerate the abrasion of the dye, and these are released into the environment. This fact shows that biochemical recycling of denim must involve not only the hydrolysis of the fibers, but also the decolorization of the dye. The production of lignocellulolytic enzymes by endophytic

fungi is directly related to their ability to colonize the hosts during specific phases of infection. Endophytic fungi produce enzymes that are often more stable relative to other sources. Certain species of the genus *Colletotrichum* with different lifestyles have already been identified as laccase positive, but studies exploring the biotechnological potential of these enzymes are lacking. In view of this, this work aims to develop integrated strategies to valorize cellulolytic matter from denim, and to evaluate the potential of *Colletotrichum* species to express the enzymes interesting for this study.

Keywords: Textile waste. Denim. Fungal enzymes. Endophytes. *Colletotrichum*. Glucose recovery. Decolorization.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: Introdução geral	11
Objetivo geral	24
Objetivos específicos	25
Bibliografia	26
Utilização de Enzimas Fúngicas para a Liberação de Carboidratos e Descoloração do Corante Presente em Resíduos de Tecido Denim.	32
Resumo	32
Introdução	34
Métodos	36
Tecido denim.....	36
Caracterização lignocelulósica.....	36
Enzimas comerciais	37
Atividade de lacases	37
Atividade de celulases	37
Avaliação de tratamento enzimático para descoloração do índigo	38
Sacarificação e descoloração do denim com extratos comerciais	38
Microrganismos e preparo do inóculo	40
Fermentação em Estado Sólido (FES) e Recuperação do Extrato	40
Quantificação de Proteínas Totais	40
Atividade Enzimática dos Extratos de <i>Colletotrichum</i>	41
Sacarificação do tecido denim e descoloração	41
Análise Estatística.....	41
Resultados	42
Composição química do denim	42
Atividade de celulases totais e lacase dos extratos comerciais	43
Descoloração do índigo <i>blue</i>	44
Prospecção <i>in sílico</i>	45
Atividades do complexo das celulases e atividade de lacase dos extratos comerciais e extratos de <i>Colletotrichum</i>	47
Sacarificação e descoloração do denim.....	48
Discussão	50
Conclusão	55
Bibliografia	56

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

Introdução geral

O ciclo de vida de artefatos têxteis abrange uma complexa cadeia de produção e consumo (Jordão et al., 2018). Ao longo dos últimos anos, o setor têxtil e de confecção tem se tornado inflado pela grande demanda do mercado por novos produtos (Bartl, 2011). O aumento do consumo mundial de têxteis está diretamente associado ao crescimento populacional, ao aumento do poder de compra e a moda, que influenciam na alta rotatividade dos vestuários (Bartl, 2011; Rapsikevičienė et al., 2019). O impacto da produção e consumo no âmbito sociocultural está diretamente relacionado com a geração de poluentes que se acumulam no meio ambiente (Cruz, 2017). Atualmente, 150 milhões de toneladas de resíduos têxteis são produzidos em todo o mundo a cada ano, sendo a China (26 milhões ton/ano), os EUA (15,1 milhões ton/ano) e o Reino Unido (1,7 milhões ton/ano) os maiores geradores desses sólidos, o que representa cerca de 6% do total de resíduos sólidos urbanos mundial (Hu et al., 2018; Meng et al., 2020). No Brasil, a produção de resíduos têxteis é avaliada em cerca de 175 mil toneladas por ano, dos quais 90% são descartados incorretamente (Jordão et al., 352 2018).

Os resíduos têxteis podem ser classificados em resíduos de pré-consumo, que incluem todo o material (fibras, fios, peças, etc.) produzido durante o processo de fabricação do vestuário, e pós-consumo, que são os produtos descartados após o uso pelo consumidor (Rubino et al., 2018; Rapsikevičienė et al., 2019). Grande parte dos resíduos gerados ao longo do ciclo de vida da peça (pré-consumo e pós-consumo) são destinados aos aterros sanitários. Estima-se que, em média global, 32 kg de resíduos têxteis são descartados per capita a cada ano, dos quais cerca de 27,2 kg são depositados em aterros (Hu et al., 2018).

Uma série de impactos ambientais estão relacionados ao acúmulo de materiais têxteis no meio ambiente, uma vez que grande parte dos resíduos não são facilmente degradados, podendo levar centenas de anos para que isso ocorra (Gordon e Hsieh, 2006; Aishwariya, 2018). A incineração dos tecidos depositados nos aterros resulta na liberação de gases tóxicos (e.g. CO₂ e metano), enquanto o soterramento compromete a qualidade do solo circundante e das águas subterrâneas, principalmente pela liberação de materiais nocivos provenientes de corantes têxteis sintéticos, como Pb, Cr, Hg, Ni (Aishwariya, 2018; Aki et al., 2020; Meng et al., 2020; Yousef et al., 2020).

O denim se destaca por ser um dos tecidos mais consumidos no mundo. É um tecido de algodão trançado de sarja usado para a confecção das peças popularmente conhecidas como jeans, sendo o algodão virgem puro revestido com corante índigo a composição predominante. Em decorrência do imenso hábito de consumo e tendência de peças jeans, o denim é considerado a maior fração têxtil que é descartada. A geração de remanescentes do denim é estimada em 2,16 milhões de toneladas por ano (Luiken e Bouwhuis, 2015; Youself et al., 2020).

A reutilização e reciclagem de têxteis opera na necessidade de desenvolver tecnologias mais sustentáveis para reduzir impactos ambientais iminentes (Luiken e Bouwhuis, 2015; Rubino et al., 2018; Rapsikevičienė et al., 2019). As rotas de reuso e reciclagem promovem a diminuição do volume de resíduos têxteis de origem industrial e doméstica que são habitualmente descartados em rios, baías e aterros sanitários (Baruque-Ramos et al., 2017).

A reutilização é um processo não destrutivo que devolve potencial ativo de uso ao produto (Cooper e Gutowski 2015). A reutilização do têxtil ocorre quando itens pós-consumo passam a ter um novo valor para outro proprietário, prolongando a vida útil de uso da peça (Sandin e Peters, 2018). É comum que os materiais sejam reaproveitados de forma industrial ou artesanal, no qual as sobras de tecido são transformadas em objetos diversos (Baruque-Ramos et al., 2017).

Na reciclagem, ocorre a derivação dos materiais usados em novos produtos têxteis ou não têxteis (Sandin e Peters, 2018). As rotas de reciclagem podem ser classificadas em processos *upcycling* ou *downcycling*. *Upcycling* refere-se ao processo que adiciona valor aos produtos, como na recuperação de polímeros, oligômeros e monômeros a partir das fibras originais (Jordão et al., 2018). Por outro lado, *downcycling* diz respeito à produção de itens considerados inferiores (em termos de qualidade de fibra), como materiais isolantes, estofados e cobertores (Sandin e Peters, 2018). As tecnologias convencionais para tratamento de resíduos têxteis incluem aplicações mecânicas, térmicas e químicas ou, mais comumente, uma integração dessas três abordagens (Subramanian et al., 2020; Yousef et al., 2020). A abordagem mecânica é usualmente empregada na preparação dos materiais que serão submetidos aos tratamentos químicos ou térmicos (Sandin e Peters, 2018). Na reciclagem térmica, uma combinação de calor e fricção é aplicada para fundir grânulos de Polietileno tereftalato (PET) e formar fibras sintéticas (Nelson, 2015). Por fim, na reciclagem química, as fibras são dissolvidas (fibras naturais) ou despolimerizadas

(fibras sintéticas) para gerar oligômeros, monômeros ou matéria-prima bruta na forma gasosa ou líquida (Sandin e Peters, 2018, Damayanti et al., 2021). Essa rota envolve processos físico-químicos clássicos incluindo glicólise, hidrólise e alcoólise, além de processos termoquímicos (pirólise, hidrocraqueamento e gaseificação), e bioquímicos, como a hidrólise enzimática (Piribauer e Bartl, 2019; Damayanti et al., 2021).

Por mais promissoras que as técnicas de reciclagem possam parecer, também são fontes de uma série de impactos ambientais em virtude, principalmente, do consumo de outros materiais potencialmente nocivos e alta demanda energética provinda de combustíveis fósseis (Sandin e Peters, 2018; Subramanian et al., 2020). Damayanti et al. (2021) explicam que muitos desses processos químicos exigem altas temperaturas, alto consumo de energia e abundância de reagentes químicos não recuperáveis, mas que, em contrapartida, a reciclagem bioquímica é uma tecnologia que não demanda altas temperaturas e possui altíssima seletividade pelo substrato.

Nesse contexto, pesquisas que utilizam enzimas derivadas de microrganismos para a valorização de resíduos sólidos têm recebido bastante atenção por se tratar de uma tecnologia ambientalmente mais adequada (Subramanian et al., 2020).

A necessidade de repensar novas fontes de energia como alternativa ao uso de combustíveis fósseis tem estimulado estudos na busca por matérias-primas renováveis e previsivelmente sustentáveis (Gupta et al., 2016). Assim, é importante destacar o papel das biorrefinarias, que são unidades tecnológicas que utilizam a fração orgânica do fluxo de resíduos sólidos para obter diversos insumos químicos (Hu et al., 2018; Wang et al., 2018; Monteiro, 2019). Materiais celulósicos são apresentados como uma opção atraente, pois constituem uma biomassa vegetal amplamente disponível e o custo é relativamente baixo (Lynd et al., 2002; Gupta et al., 2016). Em biorrefinarias, o processamento de fontes celulolíticas têm gerado produtos de amplo interesse, como etanol, biogás, enzimas, ácidos orgânicos (Chandel et al., 2012), hidrogênio (Juhász et al., 2005). Esforços para aumentar a viabilidade do bioprocessamento implicam, principalmente, superar a recalcitrância da celulose utilizando métodos de menor custo e na busca por microrganismos com produtores de celulasas (Lynd et al., 2002).

Resíduos têxteis podem ser considerados uma biomassa renovável alternativa para a produção de produtos de alto agregado (Kuo et al. 2010). Wang et al. (2018) utilizaram uma mistura de resíduos têxteis (algodão/poliéster 40:60) como substrato

para a produção de celulases por *Trichoderma reesei* ATCC 24449 por fermentação submersa. Em uma linha de pesquisa similar, Li et al. (2018) avaliaram diferentes condições enzimáticas para a otimizar o processo de hidrólise de resíduo têxtil para recuperação de glicose e poliéster. O rendimento de glicose alcançou cerca de 98% após 96 h de tratamento. Kuo et al. (2014) observaram a produção de 0,48 g de etanol/g de denim por sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) por *Saccharomyces cerevisiae*. Cruz (2017) submeteram resíduos de denim a hidrólise ácida e enzimática e obtiveram nanocristais de celulose, um produto de interesse industrial e acadêmico para aplicação na melhoria de propriedades de diversos materiais.

As fibras têxteis são classificadas de acordo com o seu material de origem, assim, podem ser definidas como: naturais, regeneradas ou sintéticas. Fibras naturais possuem origem vegetal (algodão, sisal, linho, rami, etc.), animal (seda e lã) e mineral (metálica). As fibras regeneradas, também conhecidas como fibras semissintéticas ou artificiais, são produzidas a partir de polímeros naturais processados quimicamente (e.g., viscose, acetato, modal e rayon). Fibras sintéticas são derivadas exclusivamente de produtos petroquímicos, por exemplo, o nylon, o poliéster, a poliamida, o acrílico e o elastano (Piribauer e Bartl, 2019; Damayanti et al., 2021). A figura 1 apresenta uma classificação geral das fibras têxteis baseada em sua composição química. Atualmente, tem sido comum a confecção de tecidos que misturam fibras naturais e sintéticas, principalmente algodão e poliéster, conferindo maior versatilidade às peças (Damayanti et al., 2021).

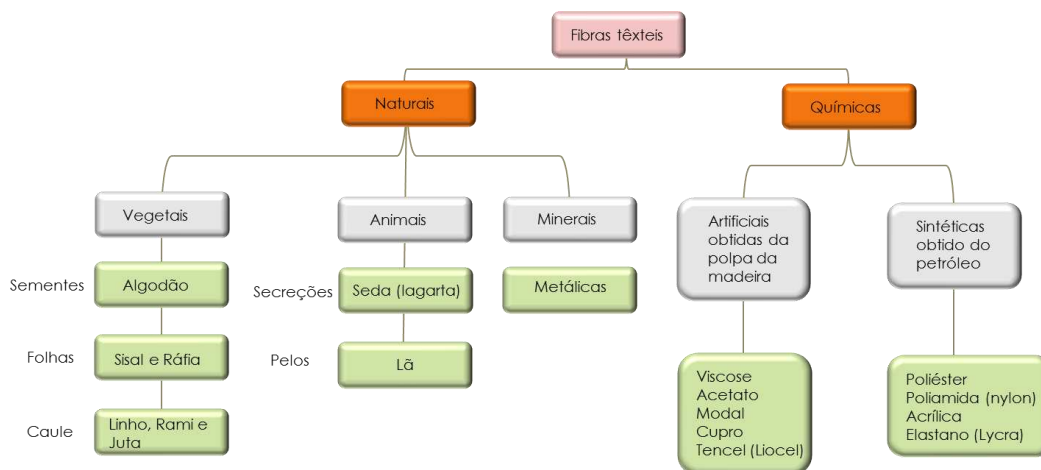


Figura 1. Categorização dos tipos de fibras têxteis. Adaptado de Misnon et al. (2014).

As fibras de algodão representam o insumo vegetal mais relevante para a indústria têxtil, sendo usual na produção de roupas, artigos de decoração e vários artefatos industriais (Wakelyn et al., 2006; Krifa et al., 2016). O algodão (família Malvaceae, gênero *Gossypium*) possui diversas propriedades exclusivas, como a cor, a massa específica, a cristalinidade e a hidrofiliçidade, tornando-o historicamente um produto útil como fibra têxtil por mais de 5 mil anos. Comercialmente, existem quatro principais espécies utilizadas: *G. hirsutum*, *G. barbadense*, *G. aboreum* e *G. herbaceum* (Wakelyn et al., 2006; Cruz, 2017). Cada fibra de algodão madura é uma única célula sem protoplasma que cresce em torno da semente, caracterizando-se pela cor esbranquiçada e comprimento curto ou alongado (Krifa et al., 2016; Liu, 2018). Essas fibras são compostas pela parede primária, parede secundária e lúmen. A parede celular primária é envolvida por uma fina camada de cutícula, que corresponde a uma mistura de ceras, gorduras e materiais não celulósicos. Celulose de baixo grau de organização e materiais não celulósicos (pectina, hemicelulose e sais insolúveis) compõem a maior parte da parede celular primária, conferindo flexibilidade à fibra e proteção hidrofóbica, respectivamente. Ao contrário disso, a parede celular secundária é composta majoritariamente por celulose altamente organizada (Figura 2) (Ruan, 2005; Wakelyn et al., 2006; Dochia et al., 2012; Liu, 2018).

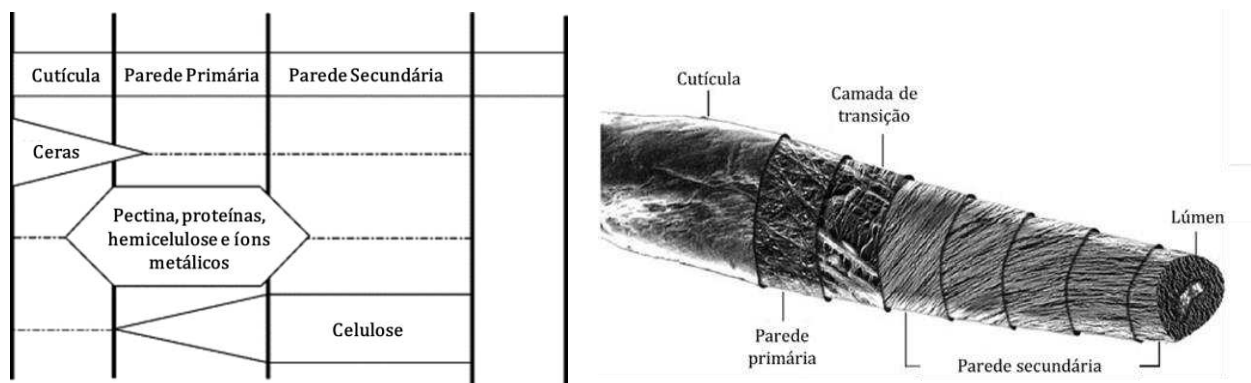


Figura 2. Representação morfológica da fibra madura do algodão (esquerda) e dos componentes celulósicos e não celulósicos de cada região da fibra (direita) (Modificado de Dochia *et al.*, 2012).

A celulose representa a maior porção das fibras maduras (88,0 – 96,0%). Os componentes não celulósicos, que estão localizados principalmente na cutícula, na parede primária e no lúmen, são representados por proteínas (1,1 – 1,9%), pectinas (0,7 – 1,2%), ceras (0,4 – 1,0%), compostos inorgânicos (0,7 – 1,6%) e outras substâncias (0,5 – 8,0%) (Wakelyn, 2006; Liu, 2018). Durante o tratamento dos têxteis, grande parte dos componentes não celulósicos podem ser removidos por solventes específicos gerando fibras com até 99% de celulose (Wakelyn, 2006).

A celulose é um homopolissacarídeo linear formado pela ligação de monômeros de glicose (β -1-4-glicosídica), sendo o resíduo de celobiose a unidade repetitiva. É um polímero natural que se destaca pela alta massa molecular e significativo teor de cristalinidade e insolubilidade em água (Wakelyn, 2006; Huber et al., 2012). A celulose das fibras de algodão possui diversas regiões altamente ordenadas (grau de cristalinidade – aprox. 70%), mescladas com regiões amorfas, que possuem seus grupos funcionais mais acessíveis para a atividade de compostos químicos ou enzimas (Lengowski et al., 2013; Cruz, 2017).

Comumente, a produção de têxteis utiliza diferentes tratamentos enzimáticos para enobrecer o tecido, melhorando as suas características físicas e visuais, além de favorecer a fixação do corante durante o tingimento (Araújo et al., 2008). Enzimas como amilases, pectinases, proteases, lipases e enzimas do tipo oxirredutases (e.g., catalases e lacases) são extensivamente aplicadas nas diferentes fases de processamento do tecido para a remoção de materiais não celulósicos presentes, mantendo a resistência e o peso do tecido (Araújo et al., 2008; Mosjsov, 2011). Após

a remoção do conteúdo não celulósico, a fibra crua pode alcançar em torno de 95-99% de celulose (Wakelyn, 2006).

A confecção do tecido abrange diversas etapas de produção inter-relacionadas. Em síntese, a produção costuma ocorrer em quatro etapas: i) a fiação, em que as fibras ou filamentos são agrupadas em fio; ii) a tecelagem, onde os fios são reunidos em um mesmo comprimento e tracionados gerando tecidos planos; iii) o acabamento ou beneficiamento, que é etapa que confere o melhoramento das propriedades físico-químicas do tecido; e iv) a confecção, em que são determinadas as características estéticas. Na produção de tecidos com cor, os fios são tingidos com corantes orgânicos durante a preparação para a tecelagem (Hiratuka et al., 2008; Cruz, 2017).

O denim é um material sólido e durável de algodão em que a trama passa sob dois ou mais urdumes. O denim índigo é a variação mais conhecida, em que o urdume é tingido e o fio da trama é mantido branco, assim o tecido formado possui uma face colorida e a uma face branca (Figura 3) (Elmogahzy, 2020). Sua utilização é registrada desde o século XVII, sendo artigo para a confecção de calças, jaquetas, macacões, estofados, toldos e diversos outros acessórios. Por muitos anos foi utilizado, especialmente, para fabricação de roupas usadas em trabalhos mais pesados, entretanto foi acolhido como item de moda sendo profundamente popularizado. É dito que 10% de todo algodão agregado produzido no mundo é destinado a fabricação do denim (Paul, 2015; Muthu, 2017).

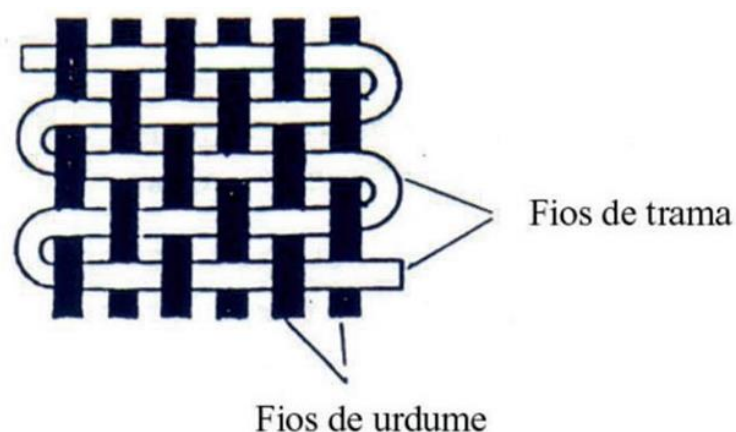


Figura 3. Esquematização do modelo de tecelagem do denim (Guia de interpretação – normas para confecção de jeans, 2012).

No processo de produção de vestuários, é comum utilizar diferentes tratamentos enzimáticos para enobrecer o tecido melhorando as suas características físicas e visuais, além de favorecer a fixação do corante durante tingimento (Araújo et al., 2008). Na confecção do jeans, as celulases também são aplicadas para gerar efeito “envelhecido” às peças. Nesse processo, as celulases que aceleram a abrasão pela liberação do índigo, pois hidrolisam parcialmente a superfície das fibras tingidas (Araújo et al., 2009; Saravanan, Ramachandran, 2009; Agrawal, 2017) (Figura 4).

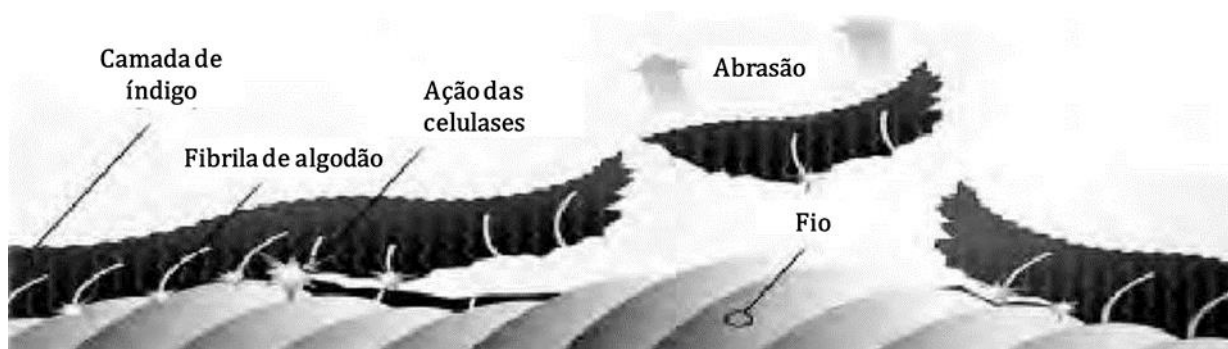


Figura 4. Mecanismo de ação da celulase no processo de lavagem de tecido denim (Agrawal, 2017).

Corantes têxteis são derivados de fontes naturais (animal, vegetal ou mineral) ou produzidos de forma sintética. Corantes orgânicos sintéticos possuem propriedades físico-químicas que os tornam mais atrativos para a indústria de tecidos em relação aos corantes naturais, pois costumam ser mais resistentes ao calor, à luz e ao ar (Buscio et al., 2014). Cerca de 70% de todo corante orgânico sintético que é produzido é destinado à produção têxtil. Os corantes são formados por duas estruturas principais: o grupo cromóforo e o grupo funcional. O grupo cromóforo é responsável pela absorção da radiação na faixa de comprimento de onda de luz visível. Já o grupo funcional é a estrutura que permite a fixação do corante no tecido. A sua classificação é definida conforme a composição química ou modo que se fixa às fibras têxteis (diretos, reativos, ácidos, básicos, à cuba, dispersos, sulfurosos, pré-metalizados e branqueadores) (Guaratini e Zanoni, 2000; El Harfi e El Harfi, 2017). Corantes à cuba são extensivamente aplicados na confecção têxtil. São praticamente insolúveis em água, portanto, em sua forma original, não são capazes de se fixarem

as fibras, sendo necessário que sejam reduzidos por ditionito de sódio em meio alcalino para se tornarem solúveis (leucoforma). Uma vez em contato com o oxigênio, esses corantes retornam à forma original e se fixam no tecido. Índigos, tioíndigóides e antraquinóides são os principais tipos de corantes à cuba (Guaratini e Zanoni, 2000). O índigo *blue* é o corante mais utilizado na manufatura do denim, promovendo a cor azulada característica desse tecido. No processo de tingimento, a forma insolúvel do índigo *blue* é caracterizada pela presença de grupos cetônicos (C=O), que são reduzidos (C-OH) a molécula leucoíndigo, a forma solúvel do índigo, identificada pela cor amarelada (Figura 5) (Buscio et al., 2014; Cruz, 2017).

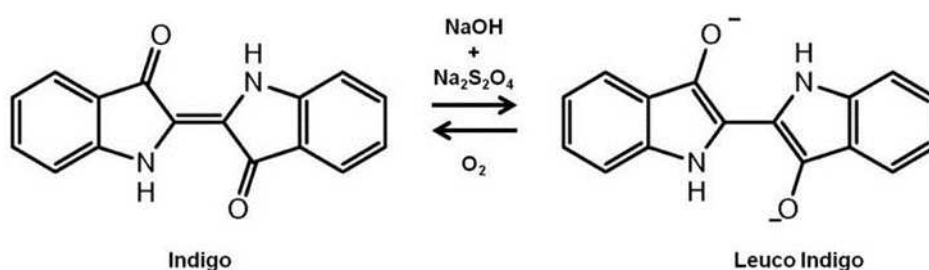


Figura 5. A molécula de índigo hidrofóbica é reduzida a leucoíndigo, solúvel em água. A leucoforma pode ser reoxidada a índigo (Buscio et al., 2015).

A produção do jeans demanda o uso intensivo de água e diversos recursos químicos potencialmente tóxicos ao meio ambiente. Uma única peça requer 10.000 L de água e 0,5 kg de produtos químicos, além da aplicação de detergentes e corantes que liberam subprodutos que permanecem nas águas residuais (Hendaoui et al., 2018). Em condição aeróbica, os índigos tornam-se insolúveis e resistentes à degradação e em condições anaeróbicas são modificados em aminas altamente tóxicas (Solís-Oba et al., 2008). A poluição de efluentes por corantes sintéticos aplicados em tecidos é uma questão crítica, levando a altas cargas de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO), além da geração de produtos secundários de baixa biodegradabilidade (Rodak e Paulista, 2017). Por essas razões, numerosas técnicas de tratamento (físico, químico, mecânico e biológico) têm sido desenvolvidas na esperança de limitar a contaminação de águas superficiais e subterrâneas pelo depósito de efluentes têxteis altamente tóxicos (Kaykhail et al., 2018). O tratamento biológico é considerado uma via

alternativa sustentável e ecologicamente correta. Lacases (EC 1.10.3.2) são enzimas p-difenol:dioxigênio oxirredutases capazes de catalisarem a oxidação de grupos hidróxifenólicos e aminoaromáticos. Possuem quatro átomos de cobre: um centro de Cu tipo 1 (sítio T1), um centro de Cu tipo 2 (sítio T2) e um centro de Cu tipo 3 (sítio T3), sendo esse último composto por dois átomos de Cu (Cu3a e Cu3b) (Figura 6). Foram descritas pela primeira vez em 1883, sendo assim consideradas uma das primeiras enzimas descritas (Rodríguez-Couto, 2012). São produzidas por plantas, procariotos, fungos e insetos, no entanto, os fungos se destacam devido a abundância de espécies produtoras desta enzima, sobretudo, fungos da podridão branca. Funções biológicas das lacases fúngicas incluem a regulação morfológica, controle da virulência e deslignificação de tecidos lenhosos, mas as possibilidades de aplicações práticas são os fatores que atizam o interesse por sua comercialização (Campos et al., 2001; Mayer e Staples, 2002; Rodríguez Couto, 2012).

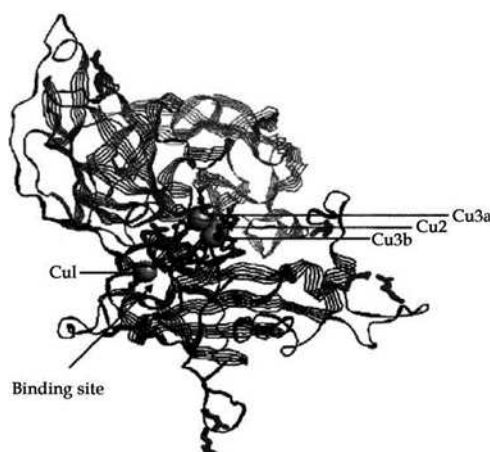


Figura 6. Representação tridimensional de uma lacase típica composta por três centros de cobre (Rodríguez-Couto, 2012).

Lacases apresentam baixo potencial redox (0,5 - 0,8 V), contudo, a sua atividade oxidativa é expandida na presença de mediadores (Bail, 2020). Mediadores redox são compostos de baixo peso molecular que são facilmente oxidados pela lacases podendo formar radicais catiônicos instáveis e altamente reativos. A exemplo, o ABTS (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico)), um mediador orgânico sintético, quando oxidado a $ABTS^{+ \cdot}$ pela lacase, é capaz de oxidar substratos mais complexos e retornar a sua forma original (Bail 2020). Os elétrons capturados pelo sítio T1 da lacase são transferidos para os sítios T2/T3. (centro tri nucleado de cobre),

onde o oxigênio é reduzido e a água é liberada como subproduto (Rodríguez-Couto, 2012).

As aplicações mais recentes das lacases abrangem o uso na indústria de alimentos, na biorremediação de ambientes contaminados com xenobióticos aromáticos, na indústria de celulose e papel, na indústria têxtil, entre outros (Mayer e Staples, 2002; Madhavi e Lele, 2009). Na indústria têxtil, podem ser utilizadas para o branqueamento de tecidos como um método mais eficiente e menos custoso quando comparado às aplicações químicas e físicas (Nyanhongo et al., 2002; Solís-Oba et al., 2008; Madhavia e Lele, 2018). Nos últimos anos houveram numerosas pesquisas que investigam métodos funcionais de utilizar lacases na descoloração de efluentes contaminados com corantes (Pensupa et al., 2017).

Corante presente em efluente da indústria têxtil foi degradado em até 76% num sistema de fermentação em estado sólido (SSF) composto pelo fungo *Ganoderma lucidum*, 10 g de pupunha residual (substrato indutor) e 60 mL de efluente. O sistema proporcionou a descoloração por meio da expressão e atividade de lacases e adsorção do corante a fibras de pupunha (Chicatto et al., 2018). Abadula et al. (2000) utilizaram lacases de *Trametes hirsuta* para o promover a remoção de corantes em efluentes têxteis. Cerca de 80% dos corantes antraquinônicos foram removidos. No estudo de Tiang et al. (2013), a cepa de *Ganoderma weberianum* TZC1 cultivada em meio com efluente de corante índigo foi capaz de descolorir 92% do índigo em apenas 1h. Após aplicação das lacases brutas de *G. weberianum* foi confirmado que as lacases foram importantes para o processo de descoloração. Solís-Oba et al. (2008) ajudaram a elucidar o mecanismo de descoloração da molécula de índigo pelo sistema Lacase-ABTS, revelando que o ABTS realiza diversos ciclos redox entre as lacases e o substrato (Figura 7).

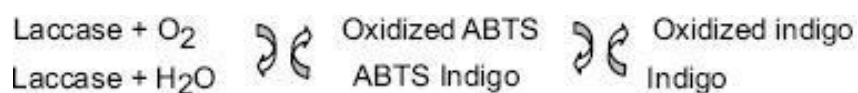


Figura 7. Mecanismo de oxidação da corante índigo pelo sistema lacase/ABTS proposto por Sólis-Oba et al. (2008).

O grupo cromóforo do índigo é destruído produzindo o composto isatina, que posteriormente é convertido no ácido antranílico (Campos et al., 2001; Solís-Oba et al., 2008; Madhavia e Lele, 2018).

Celulases (EC 3.2.1.4) são enzimas da família das glicosídeo hidrolases, capazes de converter polissacarídeos e oligossacarídeos em glicose. É uma enzima de natureza complexa que despertou um enorme interesse de vários setores industriais devido às diversas possibilidades de aplicação biotecnológica (Shahzadi et al., 2014). Hoje em dia, o uso de celulases se estende às indústrias de bioetanol, ao processamento de bebidas, a produção de alimentos/rações, ao tratamento de resíduos sólidos poluentes, a indústria têxtil, a farmacêutica, ciências da saúde, entre outros (Lynd et al., 2002; Shahzadi et al., 2014). As celulases são produzidas essencialmente por bactérias, fungos e protozoários. Com destaque para os fungos, esses microrganismos usualmente obtêm carbono de biomassas lignocelulósicas de baixo custo e residuais sob várias condições de cultivo. Após inúmeras pesquisas envolvendo milhares de espécies de fungos celulolíticos, os estudos destacam grupos de fungos causadores da podridão mole (*Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium* e etc.) e fungos da podridão branca (*Phanerochaete*, *Pycnoporus* e etc.) como bons produtores de celulases (Chulalaksananukul et al., 2014).

Existem três tipos principais de celulases envolvidas na hidrólise de celulose em glicose: endoglucanases, (EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.91) e β -1,4-glucosidases (EC 3.2.1.21). Quando aplicadas em conjunto, essas enzimas atuam em sinergia na despolimerização da fração de celulose altamente cristalizada (Lynd et al., 2002, Hu et al., 2018). Endoglucanases, são enzimas que agem majoritariamente sobre as regiões amorfas do complexo das celulases, catalisando quebras aleatórias das ligações β -1,4-glicosídicas com liberação de terminais livres. As novas extremidades formadas são atacadas pela celobiohidrolase, uma exoglucanase, formando celobiose (dissacarídeo glicosil-glicose). Por fim, a celobiose é hidrolisada em glicose pela atividade das β -1,4-glucosidases (Cruz, 2017; 665 Mojssov, 2011) (Figura 8).

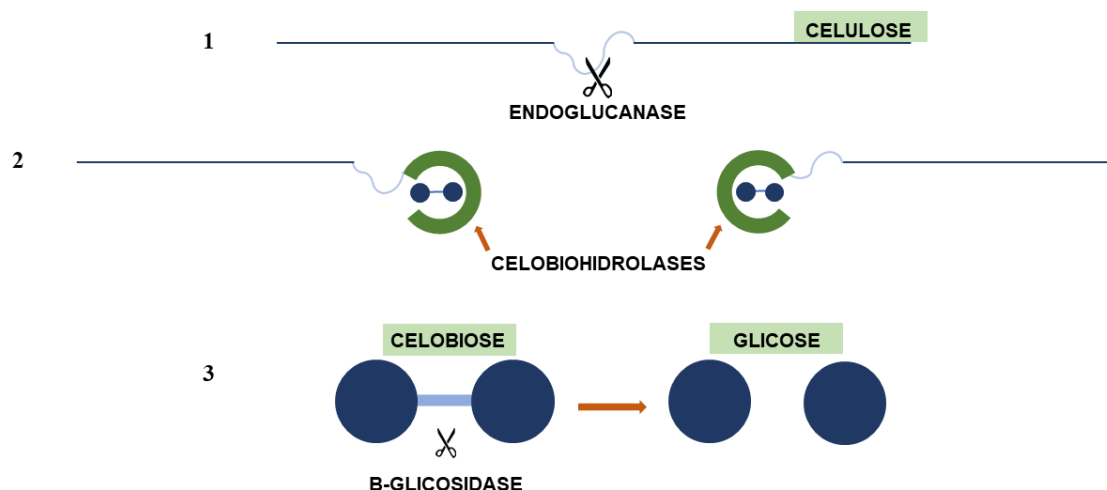


Figura 8. Ação catalítica do complexo das celulases sobre a estrutura da celulose. Adaptado de Tebeka et al. (2009).

Fatores que influenciam diretamente o sucesso da hidrólise estão relacionados ao tipo de substrato, a concentração de celulases, a temperatura, ao pH e a proporção substrato/líquido (Chandel et al., 2012). Diversos estudos têm utilizado abordagens clássicas para potencializar a produção de celulases pelos diferentes fungos, por exemplo, a mutagênese física e química, o desenvolvimento de recombinantes e fusão de protoplastos (Chandel et al., 2012). A sinergia entre enzimas fúngicas para o desenvolvimento de bioprodutos a partir da biomassa tem se mostrado uma estratégia eficiente. O custo de produção das celulases pode chegar até 40% do valor total de despesas em biorrefinarias, evidenciando a demanda por técnicas de menor custo (Hu et al., 2018; Lima, 2011). Com isso, torna-se atrativa a prospecção por microrganismos que ofereçam um consórcio enzimático para a bioconversão eficiente de matéria-prima de biomassa residual (Gupta et al., 2016).

Muitos fungos e bactérias são capazes de obter monômeros de glicose degradando a biomassa celulósica (Sandin e Peters, 2018). Já é conhecida a competência de fungos filamentosos (*Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Fusarium oxysporum*) em expressar celulases sob diferentes condições de cultivo (Hu et al., 2018). *Colletotrichum* spp. são fungos filamentosos com distribuição em ambientes tropicais, subtropicais e temperados, e apresentam estilos de vida endofítico, patogênico, epifítico e saprófita. Possuem diversas estratégias de colonização dos tecidos para alcançar as células hospedeiras, variando entre hemibiotrofos intracelulares e necrotróficos subcuticulares (Moreno, 2016).

Baseado em parâmetros científicos e econômicos, *Colletotrichum* é classificado como o oitavo gênero mais importante de fungos fitopatogênicos (Dean et al., 2012; Moreno, 2016; Bezerra, 2017). São os principais agentes causadores da antracnose, uma doença que afeta diversas culturas agrícolas, sendo caracterizada pela formação rápida de necrose em folhas, caules, flores e frutos, resultando em murchidão e morte do tecido (Dean et al., 2012; Silva e Michereff, 2013). Várias enzimas são mobilizadas em conjunto com a pressão mecânica para a infecção bem sucedida no hospedeiro. Enzimas como cutinases, pectinases, hemicelulases, celulases, amilases, lipases, proteases e lacases são secretadas em fases de pré-penetração ou propagação do fungo (Velho et al., 2018; Armesto et al., 2019). Como endofíticos, habitam o interior dos tecidos sem causar danos à planta, podendo produzir diversos compostos bioativos (Bezerra, 2017; Pamphile et al., 2017). Essas características dispõem *Colletotrichum* como uma fonte interessante para exploração de metabólitos secundários e enzimas com potencial biotecnológico (Pamphile et al., 2017), incluindo as enzimas importantes para degradação de denim e descoloração do corante.

O desenvolvimento de novas metodologias aplicadas a reciclagem de resíduos de origem ligninocelulolítica surge da demanda por tecnologias mais limpas e ambientalmente sustentáveis. Métodos comumente adotados para tratamento de resíduos demandam alto consumo de reagentes, levam a rendimento insuficiente de produtos e podem gerar subprodutos tóxicos. O uso de resíduos têxteis, em especial o denim, como fonte de biomassa, ainda carece de mais estudos e tecnologias aplicadas, visto que são recursos ricos em celulose. Diante às necessidades expostas, este estudo visa desenvolver estratégias integradas e mais acessíveis para a valoração do denim residual através do acoplamento de hidrólise enzimática para obtenção de monômeros de carboidratos e tratamento enzimático para inativar a toxicidade do corante índigo.

Objetivo geral

Avaliar potencial do uso de enzimas fúngicas comerciais e enzimas secretadas por fungos do gênero *Colletotrichum* para promover a despolimerização da fração

orgânica do tecido denim, juntamente com a descoloração do corante liberado em solução.

Objetivos específicos

- Determinar a composição química das fibras formadoras do tecido denim;
- Avaliar a capacidade das enzimas lignocelulolíticas comerciais selecionadas em utilizar carboidratos estruturais das fibras de tecido denim como substrato;
- Analisar o potencial de lacases comerciais em degradar o corante índigo *blue* na presença e ausência de mediadores redox;
- Prospecção por bioinformática de genes codificadores de celulases e lacases em genomas de fungos do gênero *Colletotrichum*;
- Avaliar a capacidade de espécies selecionadas do gênero *Colletotrichum* em expressar as enzimas de interesse sob a condição de fermentação sólida;
- Avaliar o percentual de recuperação de glicose do tecido por hidrólise dos extratos comerciais e secretados por fungos do gênero *Colletotrichum*;
- Analisar a atividade dos extratos em descolorir o corante índigo das fibras de tecido denim.

Bibliografia

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A., & Gübitz, G. M. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 66, n. 8, p. 3357-3362, 2000.
- Aishwariya, S. Waste management technologies in textile industry. **Innovative Energy & Research**, [S.L.], v. 07, n. 03, p. 2576-1463, 2018.
- Agrawal, B. J. Bio-Stoning of denim- an environmental-friendly approach. **Current Trends In Biomedical Engineering & Biosciences**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 45-47, 2017.
- Araújo, R., Casal, M., & Cavaco-Paulo, A. Application of enzymes for textile fibres processing. **Biocatalysis And Biotransformation**, [S.L.], v. 26, n. 5, p. 332-349, 2008.
- Armesto, C., Maia, F. G. M., Monteiro, F. P., & De Abreu, M. S. de. Exoenzymes as a pathogenicity factor for *Colletotrichum gloeosporioides* associated with coffee plants. **Summa Phytopathologica**, [S.L.], v. 45, n. 4, p. 368-373, 2019.
- Cruz, L. P. R. **Obtenção de nanocelulose por hidrólise ácida e enzimática de fibras de algodão de resíduo de tecido tingido com corante índigo**. Tese (Doutorado) – Curso de Engenharia Mecânica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2017.
- Bartl, A. Textile waste. **Waste**, [S.L.], p. 167-179, 2011.
- Baruque-ramos, J., Amaral, M C., Laktim, M C., Santos, H N., Araujo, F B., & Zonatti, W F. Social and economic importance of textile reuse and recycling in Brazil. Iop Conference Series: **Materials Science and Engineering**, [S.L.], v. 254, p. 192003, 2017.
- Buscio, V., Crespi, M., & Gutiérrez-bouzán, C. A critical comparison of methods for the analysis of indigo in dyeing liquors and effluents. **Materials**, [S.L.], v. 7, n. 9, p. 6184-6193, 2014.
- Campos, R., Kandelbauer, A., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A., & Gübitz, G. M. Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. **Journal of Biotechnology**, [S.L.], v. 89, n. 2-3, p. 131-139, 2001.
- Chandel, A. K., Chandrasekhar, G., Silva, M. B., & Da Silva, S. S. The realm of cellulases in biorefinery development. **Critical Reviews In Biotechnology**, [S.L.], v. 32, n. 3, p. 187- 778, 2011.
- Chicatto, J. A., Rainert, K. T., Gonçalves, M. J., Helm, C. V., Altmajer-Vaz, D., & Tavares, L. B. B. Decolorization of textile industry wastewater in solid state fermentation with Peach-Palm (*Bactris gasipaes*) residue. **Brazilian Journal of Biology**, [S.L.], v. 78, p. 718-727, 2018.

- Chulalaksananukul, W. Beta-Glucosidase from *Trichoderma* to improve the activity of cellulase cocktails. **Biotechnology And Biology of *Trichoderma***, [S.L.], v. 1, p. 281-290, 2014.
- Cooper, D. R., & Gutowski, T. G. The environmental impacts of reuse: a review. **Journal of Industrial Ecology**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 38-56, 2015.
- Damayanti, D., Wulandari, L. A., Bagaskoro, A., Rianjanu, A., & Wu, H. Possibility routes for textile recycling technology. **Polymers**, [S.L.], v. 13, n. 21, p. 3834, 2021.
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., & Ellis, J. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012.
- Dochia, M., Sirghie, C., Kozłowski, R.M., & Roskwitalski, Z. Cotton fibres. **Handbook of Natural Fibres**, [S.L.], p. 11-23, 2012.
- El Harfi, S., & El Harfi, A. Classifications, properties and applications of textile dyes: A review. **Applied Journal of Environmental Engineering Science**, v. 3, n. 3, p. 311-320, 2017.
- Elmogahzy, Y. E. Performance Characteristics of traditional textiles: denim and sportswear products. **Engineering Textile**, v. 2, p. 319-346, 2000.
- Gordon, S., & Hsieh, Y. L. (Eds.). **Cotton: Science and Technology**. Woodhead Publishing, 2006.
- Guaratini, C. C. I., & Zanoni, M. V. B. **Corantes têxteis. Química Nova**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000.
- Gupta, V. K., Kubicek, C. P., Berrin, J., Wilson, D. W., Couturier, M., Berlin, A., X.F., Filho, E., & Ezeji, T. Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass. **Trends in Biochemical Sciences**, [S.L.], v. 41, n. 7, p. 633-645, 2016.
- Hendaoui, K., Ayari, F., Rayana, I. B., Amar, R. B., Darragi, F., & Trabelsi-Ayadi, M. Real indigo dyeing effluent decontamination using continuous electrocoagulation cell: study and optimization using response surface methodology. **Process Safety and Environmental Protection**, [S.L.], v. 116, p. 578-589, 2018.
- Hiratuka, C., Viana, C., Araújo, R. D., Mello, C. H., & Ulharuzo, C.G. **Relatório de acompanhamento setorial: Têxtil e confecção**. ABDI/Unicamp, Brasília, 2008.
- Hu, Y., Du, C., Leu, S., Jing, H., Li, X., & Lin, C. S. K. Valorisation of textile waste by fungal solid state fermentation: an example of circular waste-based biorefinery. Resources, **Conservation and Recycling**, [S.L.], v. 129, p. 27-35, 2018.

- Huber, T., Müssig, J., Curnow, O., Pang, S., Bickerton, S., & Staiger, M. P. A critical review of all-cellulose composites. **Journal of Materials Science**, [S.L.], v. 47, n. 3, p. 1171- 819, 2011.
- Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K., Siika-aho, M., & Viikari, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 40, n. 11, p. 3519-3525, 2005.
- Jordão, C., Puppim, R., & Broega, A. Solutions Notes on clean textile waste. Innovation, **Engineering and Entrepreneurship**, [S.L.], v. 505, p. 682-689, 2018.
- Kaykhaili, M., Sasani, M., & Marghzari, S. Removal of dyes from the environment by adsorption Process. **Chemical and Materials Engineering**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 31-35, 2018.
- Krifa, M., & Stevens, S. S. Cotton utilization in conventional and non-conventional textiles—a statistical review. **Agricultural Sciences**, [S.L.], v. 7, n. 10, p. 747-758, 2016.
- Kuo, C., Lin, P., & Lee, C. Enzymatic saccharification of dissolution pretreated waste cellulosic fabrics for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [S.L.], v. 85, n. 10, p. 1346-1352, 2010.
- Kuo, C., Lin, P., Wu, Y., Ye, Li., Yang, D., Shieh, C., & Lee, C. *Simultaneous saccharification* and fermentation of waste textiles for ethanol production. **Bioresources**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 2866-2875, 2014.
- Lengowski, E. C., De Muniz, G. I. B., Nisgosk, S., & Magalhaes, W. L. E. Avaliação de métodos de obtenção de celulose com diferentes graus de cristalinidade. **Forest Science**, [S.L.], v. 41, n. 98, p. 185-194, 2013.
- Li, X., Hu, Y., Du, C., & Lin, C. S. K. Recovery of glucose and polyester from textile waste by enzymatic hydrolysis. **Waste And Biomass Valorization**, [S.L.], v. 10, n. 12, p. 3763-3772, 2018.
- Lima, C. A. F. de. Avaliação econômica do processo de produção de celulase através de cultivo em meio sólido. Dissertação (Mestrado) – Curso de Engenharia Química, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP. 2010.
- Liu, Y. Chemical composition and characterization of cotton fibers. **Physics, Chemistry and Biology**, [S.L.], p. 75-94, 2018.
- Luiken, A., & Bouwhuis, G. Recovery and recycling of denim waste. **Denim**, [S.L.], p. 527-540, 2015.

- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S.L.], v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.
- Martinez, G. C., Giese, E. C., Pereira, J. O., Dekker, R. F. H., & Barbosa, A. M. Seleção de isolados de *Colletotrichum* da biodiversidade da Amazônia como produtores de lacases utilizando uma metodologia simplificada. **Semina: Ciências Agrárias**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 397-398, 2009.
- Madhavi, V., & Lele, S. S. Laccase: properties and applications. **BioResources**, v. 4, n. 4, p. 1694-1717, 2009.
- Mayer, A. M., & Staples, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 60, n. 6, p. 551-565, 2002.
- Meng, X., Fan, W., Ma, Y., Wei, T., Dou, H., Yang, X., Tian, H., Yu, Y., Zhang, & T., Gao, L. Recycling of denim fabric wastes into high-performance composites using the needle-punching nonwoven fabrication route. **Textile Research Journal**, [S.L.], v. 90, n. 5-6, p. 695-709, 2019.
- Mojsov, Kiro. Application of enzymes in the textile industry: a review. In: **II International Congress "Engineering, Ecology and Materials in the Processing Industry"**, Proceedings. Bosnia and Hercegovina, p. 230-239, 2011.
- Monteiro, A. L. **Avaliação técnico-econômica do aproveitamento da lignina em biorrefinarias integrada 1G2G para obtenção de lignossulfonatos**. Tese (Doutorado) – Curso de Biotecnologia Industrial, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2019.
- Moreno, H. L. A. **Diversidade de espécies de *Colletotrichum* endofíticas da seringueira**. Dissertação (Mestrado) – Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2016.
- Muthu, S. S. Sustainability in the textile industry. **Textile Science And Clothing Technology**, [S.L.], v. 1, p. 1-8, 2017.
- Nyanhongo, G.S., Gomes, J., Gübitz, G. M., Zvauya, R., Read, J., & Steiner, W. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. **Water Research**, [S.L.], v. 36, n. 6, p. 1449-1456, 2002.
- Pamphile, J. A., Costa, A. T., Rosseto, P., Polonio, J. C., Pereira, J. O., & Azevedo, J. L. **Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum sp.*** Revista Uningá, Maringá-PR, v. 3, p. 1, 2017.
- Pensupa, N., Leu, S. Y., Hu, Y., Du, C., Liu, H., Jing, H., & Lin, C. S. K. Recent trends in sustainable textile waste recycling methods: Current situation and future prospects. **Chemistry and Chemical Technologies in Waste Valorization**, [S.L.], 189-228, 2017.

- Piribauer, B., & Bartl, A. Textile recycling processes, state of the art and current developments: a mini review. **Waste Management & Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy**, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 112-119, 2019.
- Rapsikevičienė, J., Gurauskienė, I., & Jučienė, A. Model of Industrial Textile waste management. **Environmental Research, Engineering and Management**, [S.L.], v. 75, n.1, p. 43-55, 2019.
- Rodak, P. C., & Paulista, P. F. **Aplicação de lacases na degradação de corantes sintéticos**. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2017.
- Rodríguez-Couto, S. Laccases for denim bleaching: an eco-friendly alternative. **Sigma**, [S.L.] v. 1, p. 10-12, 2012.
- Ruan, Y. Recent advances in understanding cotton fibre and seed development. **Seed Science Research**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 269-280, 2005.
- Rubino, C., Liuzzi, S., Martellotta, F., & Stefanizzi, P. Textile wastes in building sector: a review. **Modelling, Measurement and Control**, [S.L.], v. 87, n. 3, p. 172-179, 2018.
- Sandin, G., & Peters, G. M. Environmental impact of textile reuse and recycling – a review. **Journal of Cleaner Production**, [S.L.], v. 184, p. 353-365, 2018.
- Shahzadi, T., Mehmood, S., Irshad, M., Anwar, Z., Afroz, A., Zeeshan, N., Rashid, U., & Sughra, K. Advances in lignocellulosic biotechnology: a brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, [S.L.], v. 05, n. 03, p. 246-251, 2014.
- Silva, C., & Michereff, S. J. Biology of *Colletotrichum* spp. and epidemiology of the anthracnose in tropical fruit trees. **Caatinga**, v. 26, n. 4, p. 130 - 138, 2013.
- Sólís-oba, M., Almendáriz, J., & Viniegra-González, G. Biotechnological treatment for colorless denim and textil wastewater treatment with laccase and ABTS. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 5-11, 2008.
- Spinacé, M. A. S., & Paoli, M. A. A tecnologia da reciclagem de polímeros. **Química Nova**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 65-72, 2005.
- Subramanian, K., Chopra, S., Cakin, E., Li, X., & Lin, C. S. K. Environmental life cycle assessment of textile bio-recycling – valorizing cotton-polyester textile waste to pet fiber and glucose syrup. **Resources, Conservation And Recycling**, [S.L.], v. 161, p. 104989, 2020.
- Saravanan, D., Vasanthi, N. S., & Ramachandran, T. A review on influential behaviour of biopolishing on dyeability and certain physico-mechanical properties of cotton fabrics. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 76, n. 1, p. 1-7, 2009.

- Tian, C. E., Tian, R., Zhou, Y., Chen, Q., & Cheng, H. Decolorization of indigo dye and indigo dye-containing textile effluent by *Ganoderma weberianum*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 11, p. 941-947, 2013.
- Tebeka, I. R., Silva, A. G., & Petri, D. F. Hydrolytic activity of free and immobilized cellulase. **Langmuir**, v. 25 n. 3, 1582-1587, 2009.
- Velho, A. C., Mondino, P., & Stadnik, M. J. Extracellular enzymes of *Colletotrichum fructicola* isolates associated to apple bitter rot and *Glomerella* leaf spot. **Mycology**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 145-154, 2018.
- Wakelyn, P. J. Cotton Fiber Chemistry and Technology. Boca Raton: Crc Press, 2006. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/cotton-fiber-chemistry-technology-phillip-wakelyn/10.1201/9781420045888>. Acesso em: 01 jan. 2022.
- Wang, H., Kaur, G., Pensupa, N., Uisan, K., Du, C., Yang, X., & Lin, C. S. K. Textile waste valorization using submerged filamentous fungal fermentation. **Process Safety And Environmental Protection**, [S.L.], v. 118, p. 143-151, 2018.
- Yousef, S., Tatarants, M., Tichonovas, M., Kliucininkas, L., Lukošiūtė, S., & Yan, L. Sustainable green technology for recovery of cotton fibers and polyester from textile waste. **Journal Of Cleaner Production**, [S.L.], v. 254, p. 120078, 2020.

Utilização de Enzimas Fúngicas para a Liberação de Carboidratos Descoloração do Corante Presente em Resíduos de Tecido Denim.

Resumo

Resíduos têxteis do pós-consumo são produtos diretamente relacionados com a geração de poluentes que acumulam na natureza. O denim, um tecido composto por fibras de algodão tingidas com corante orgânico sintético (índigo *blue*), representa a maior fração dos resíduos têxteis depositados em aterros. O corante índigo é um composto aromático recalcitrante e altamente tóxico para o meio ambiente. Afim de recuperar açúcares fermentescíveis de denim residual, foi investigado a hidrólise enzimática desse tecido por enzimas produzidas por fungos do gênero *Colletotrichum* capazes de, em um mesmo sistema de reação, despolimerizar a estrutura da celulose e descolorir o corante liberado. Para reduzir os custos de operação, foram prospectados in silico e avaliados in vitro, fungos capazes de expressar as enzimas de interesse utilizando uma fonte de carbono de baixo custo como substrato. A análise composicional do denim por métodos gravimétricos e cromatográficos mostraram que o denim residual é composto predominantemente por celulose (~ 80%), com baixos índices de lignina (< 2%) e concentrações não detectadas de hemicelulose e pectina. Com isso, foi determinado que apenas o conjunto das celulases e lacases seriam as enzimas necessárias para compor o coquetel enzimático. Determinadas espécies do gênero *Colletotrichum* com diferentes estilos de vida já foram identificadas como lacase positivas, porém faltam estudos que exploraram o potencial biotecnológico dessas enzimas. *Colletotrichum siamense* e *Colletotrichum fructicola* foram selecionados por serem as espécies derivadas que apresentaram em análise genômica a menor perda de genes de celulases e lacases em relação a aquisição. Extrato enzimático de *C. siamense* 404F26F obtido por fermentação semi-sólida em farelo de trigo (umidade de 60%) apresentou atividade de endoglucanase, β -glicosidase e celobiohidrolase iguais a 0,78 U/mL, 0,25 U/mL e 0,25 U/mL, respectivamente. Extratos de *C. fructicola* 229F1F obtidos sob essas mesmas condições tiveram atividades iguais a 0,63 U/mL (endoglucanase), 0,31 U/mL (β -glicosidase) e 0,33 U/mL (celobiohidrolase). Houve diferença significativa para atividade de lacase entre os extratos de *C. siamense* 404F26F (193,8 U/L) e *C. fructicola* 229F1F (5,86 U/L). O rendimento de glicose recuperada do denim tratado

com o extrato de *C. siamense* 404F26F foi de 4,8% em 72h. Já a recuperação de glicose do denim tratado com o coquetel de celulases e lacases comerciais alcançou 18% de rendimento após 72h. A descoloração do produto de reação após 72h é visualmente perceptível entre os tratamentos sem (controle) e com o sistema lacase/ABTS, porém é necessário que técnicas mais precisas sejam aplicadas para quantificar a eficiência de descoloração. Estudos futuros podem buscar avaliar um sistema mais complexo de condições, envolvendo diferentes cargas enzimáticas, diferentes concentrações de sólidos, tempos mais longos de reação e pré-tratamentos de redução mecânica do substrato. Em combinação, o extrato enzimático de celulase e lacase apresenta potencial para aplicação no processo de hidrólise lignocelulósica do denim residual, juntamente com a redução de poluentes ambientais e obtenção de compostos de valor agregado para a indústria.

Introdução

O ciclo de vida de artefatos têxteis abrange uma complexa cadeia de produção e consumo (Jordão et al., 2018). Ao longo dos últimos anos a indústria têxtil tem enfrentado uma enorme demanda por novos produtos do setor (Rapsikevičienė et al., 2019). Essa procura está diretamente associada ao aumento do poder de compra e à moda, que influenciam na alta rotatividade de vestuários (Bartl, 2011; Rapsikevičienė et al., 2019; Yousef et al., 2020). No entanto, o impacto da produção e consumo global de têxteis está intimamente relacionado com a geração de poluentes que se acumulam no meio ambiente (Cruz, 2017).

Atualmente, 150 milhões de toneladas de resíduos têxteis são produzidos em todo o mundo a cada ano (Hu et al., 2018). A China, EUA e Reino Unido são maiores geradores desses resíduos, com a produção estimada em 26, 15,1 e 1,7 milhões de toneladas anuais, somando cerca de 6% do total de resíduos sólidos urbanos (Hu et al., 2018; Meng et al., 2020). No Brasil, a produção de resíduos do vestuário é avaliada em cerca de 175 mil toneladas por ano, dos quais 90% são descartados incorretamente (Jordão et al., 2018).

O denim é um dos tecidos mais consumidos no mundo, sendo o algodão virgem puro revestido com corante índigo a composição predominante e, portanto, é considerado a maior fração têxtil que é descartada, com geração de remanescentes estimada em 2,16 milhões de toneladas por ano (Luiken e Bouwhuis, 2015; Youself et al., 2020). A incineração dos tecidos depositados nos aterros resulta na liberação de gases tóxicos, enquanto o soterramento compromete a qualidade do solo circundante e das águas subterrâneas, principalmente pela liberação de materiais nocivos provenientes de corantes têxteis sintéticos, como Pb, Cr, Hg, Ni e derivados de enxofre (Aishwariya, 2018; Aki et al., 2020; Meng et al., 2020; Yousef et al., 2020).

A reutilização e reciclagem de tecidos descartados opera na necessidade de reduzir os impactos iminentes e no desenvolvimento de tecnologias mais sustentáveis, podendo assim limitar a necessidade de aterros (Luiken e Bouwhuis, 2015; Rapsikevičienė et al.; 2019). A necessidade de repensar novas fontes de energia como alternativa ao uso de combustíveis fósseis tem estimulado estudos na busca por matérias-primas renováveis e previsivelmente sustentáveis (Gupta et al., 2016). Em vista disso, materiais lignocelulósicos têm sido veemente estudados como fonte renovável de biomassa (Wang et al., 2018). À exemplo, destaca-se o papel das

biorrefinarias, que são unidades tecnológicas que utilizam a fração orgânica do fluxo de resíduos sólidos para obter diversos insumos químicos, como, etanol, biogás, enzimas, ácidos orgânicos e hidrogênio (Juhász et al., 2005; Chandel et al., 2012; Hu et al., 2018; Wang et al., 2018; Monteiro, 2019).

A recuperação de monômeros de açúcar presentes em resíduos lignocelulósicos ocorre pela ação sinérgica de celulases que agem hidrolisando a fração de celulose altamente cristalizada. Endoglucanases são enzimas que agem majoritariamente sobre as regiões amorfas do complexo da celulase, catalisando quebras aleatórias das ligações β -1,4-glicosídicas com liberação de terminais livres. As novas extremidades formadas são atacadas pela celobiohidrolase formando a molécula celobiose (dissacarídeo glicosil-glicose). Por fim, a celobiose é hidrolisada em glicose pela atividade da β - β -1,4-glucosidases (Cruz, 2017; Mojsov, 2011). Quando se trata da recuperação de açúcares presentes nas fibras do denim, a hidrólise pelas celulases também envolve liberação do corante para o meio. Isso ocorre porque as celulases hidrolisam parcialmente a superfície das fibras tingidas acelerando a abrasão natural do corante (Araújo et al., 2009; Saravanan, Vasanthi e Ramachandran, 2009; Agrawal, 2017).

Nos últimos anos houveram numerosas pesquisas que investigam métodos funcionais de utilizar lacases na descoloração de efluentes contaminados com corantes (Pensupa et al., 2017). Lacase (EC 1.10.3.2) é uma enzima oxirredutase que possui quatro átomos de cobre na sua estrutura e catalisa a oxidação de grupos hidróxifenólicos e aminoaromáticos, no qual reduzem o oxigênio à molécula de água (Martinez et al., 2009). O uso de coquetéis enzimáticos ricos em diversas enzimas lignocelulolíticas e enzimas acessórias é uma estratégia para aumentar a eficiência de hidrólise da biomassa. Com isso, torna-se atrativa a prospecção por microrganismos que ofereçam um consórcio enzimático para a bioconversão de matéria-prima de biomassa residual (Gupta et al., 2016). Entre estes microrganismos, fungos do gênero *Colletotrichum* pode ser considerados uma fonte interessante para exploração de metabólitos secundários e enzimas com potencial biotecnológico (Pamphile et al., 2017), incluindo as enzimas importantes para degradação de denim.

Neste trabalho, nosso objetivo foi investigar a composição do tecido denim para selecionarmos um coquetel adequado de enzimas fúngicas. Esse coquetel deve ser eficiente em recuperar glicose do denim e, concomitantemente, degradar o corante que é liberado. A partir disso, prospectar por isolados de *Colletotrichum* spp. capazes

de produzir o conjunto das enzimas de interesse, uma vez que o uso de enzimas comerciais encarece o processo.

Métodos

Tecido denim

Foi empregado o tecido denim 100% algodão adquirido em um brechó local (Viçosa, Minas Gerais), com o objetivo de ser uma peça usada. Pré-tratamento de descoloração. Para obter amostras sem corante índigo, um processo químico de descoloração foi realizado seguindo o protocolo definido por Hsieh et al. (1996), com modificações. Um total de 3 g de denim foi mergulhado em 40 mL de solução redutora (ditionito de sódio 20 g/L e NaOH 3% (p/v) a 70° C por 30 min), seguido da imersão do tecido em 40 mL de solução de hipoclorito de sódio 1% a 40° C por 12 horas. A amostra branqueada foi lavada em água destilada até obtenção de pH neutro.

Caracterização lignocelulósica

A caracterização química do denim foi necessária para definirmos um conjunto adequado de enzimas hidrolíticas. Aproximadamente 3 g de amostra de tecido pré-tratado (descolorido) e sem tratamento tiveram os extraíveis removidos em aparelho *Soxhlet* com lavagem em água por 24 h e lavagem em etanol 95% por mais 24 h, em seguida, as amostras foram secas a 50° C por 16 h (Cruz, 2017). Os métodos para determinação de açúcares, lignina total e cinzas seguiram as normas da TAPPI (*Technical Association of the Pulp and Paper Industry Atlanta*) (TAPPI, 1999, 2002a, 2002b). Para definir a composição de açúcares, 0,3 g das amostras foram hidrolisadas com 3 mL de ácido sulfúrico 72% (v/v), a 30 °C em banho-maria por 1 h. As amostras foram diluídas com a adição de 84 mL de água, seguido pelo aquecimento da solução a 121 °C. Posteriormente, os materiais foram filtrados duas vezes por filtração à vácuo em filtro de vidro poroso número 3. Para determinar o teor de lignina insolúvel, as porções retidas foram secas a 105 °C até o peso constante. A lignina solúvel foi determinada por meio da leitura do conteúdo filtrado em espectroscopia de UV a 215_{nm} e 280_{nm}. Açúcares monoméricos da porção solúvel

foram determinados por cromatografia líquida (CLAE) usando uma coluna Aminex HPX-87H(BioRad), 60 °C, 0,6 mL/min, e eluição isocrática com água deionizada.

Enzimas comerciais

Conforme os resultados da análise composicional do denim, definimos prosseguir o estudo utilizando o conjunto das celulasas (endoglucanases, celobiohidrolase e β -glicosidase) e lacases obtidas comercialmente. Foram utilizadas celulasas de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich) e lacases de *Aspergillus* spp. (Sigma-Aldrich).

Atividade de lacases

A atividade de lacases de *Aspergillus* spp. foi mensurada monitorando a oxidação do substrato ABTS. A mistura reacional, disposta em microplaca de 96 poços, continha 20 μ L da solução de lacase apropriadamente diluída, 20 μ L ABTS 10 mM e 160 μ L tampão acetato de sódio. A mistura foi incubada a 25°C por 5 min e depois lida em espectrofotômetro a 420 nm. A atividade de lacase foi calculada utilizando o princípio de Lambert-Beer, considerando o coeficiente $\epsilon=36000$ mM⁻¹ cm⁻¹ e caminho óptico = 0,5 cm. Uma unidade de lacase é considerada equivalente à quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μ mol de ABTS em 1 min. A atividade de lacase também foi avaliada em outras temperaturas de incubação (30, 35, 40, 45 e 50° C).

Atividade de celulasas

Os ensaios enzimáticos foram realizados em tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5, a 50° C, e em triplicata. As atividades de FPase, endoglucanase, β -glicosidase e celobiohidrolase foram conduzidas de acordo com as condições descritas por Ghose (1987) e Adney e Baker (1996). Em todos os testes as misturas reacionais continham 3 μ L do extrato enzimático comercial. Papel de filtro Whatman No. 1, carboximetilcelulose (CMC) 1% foram utilizados como substratos para as atividades FPase, endoglucanase, respectivamente. O açúcar redutor total liberado

durante os ensaios enzimáticos foi quantificado pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), usando glicose como padrão. Os substratos sintéticos pPNGlc e pNPCel na concentração de 1,25 mM foram utilizados para a atividade de β -glicosidase e celobiohidrolase, respectivamente. As reações foram interrompidas com carbonato de sódio 0,5 M, lidas a 410_{nm} e os resultados confrontados com a curva de padrão de p-nitrofenol. Para todas as atividades, uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μ mol do produto correspondente (glicose ou p-nitrofenol) por minuto, nas condições de ensaio utilizadas.

Avaliação de tratamento enzimático para descoloração do índigo

Todos os experimentos foram preparados em tubos de ensaio, volume reacional igual a 5 mL e tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5, conforme definido por Liu et al. (2017), com modificações. Foi preparado uma solução estoque 2 g/L do corante índigo *blue* sólido (Sigma-Aldrich) solubilizado em Dimetilsulfóxido (DMSO). Foram delineados três grupos experimentais: (a) índigo 50 mg/L, lacase 100 U/L e ABTS 25 μ M; (b) índigo 50 mg/L e ABTS 25 μ M; (c) índigo 50 mg/mL e lacase 100 U/L. As amostras foram agitadas a 150 rpm a 25° C por 8 dias. A taxa de descoloração foi determinada a cada 24h em espectrofotômetro monitorando a diminuição do comprimento de onda de absorção máxima do índigo (620_{nm}).

Sacarificação e descoloração do denim com extratos comerciais

Todos os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços e em triplicata. O tecido denim foi cortado em pequenos pedaços circulares de 8 mm de diâmetro, com peso equivalente a 16 mg. Foram analisados dois grupos reacionais: **(a)** Tampão acetato de sódio (97 μ L), 3 μ L de celulase comercial e um pedaço de denim (15 mg); **(b)** Tampão acetato de sódio (97 μ L), celulase comercial (3 μ L), lacase comercial (100 U/L), ABTS (25 μ M) e um pedaço de denim (15 mg). A microplaca foi vedada com filme de selagem Platemax® e mantidas em estufa na melhor temperatura definida anteriormente. As reações foram avaliadas em diferentes tempos de incubação (0,5 h, 2 h, 8 h, 24 h, 48 h e 72 h). Os tratamentos **a** e **b** foram comparados por análise

visual da descoloração da solução resultante. Posteriormente, essas soluções foram filtradas em filtro de seringa (0,22 µm) para remover fibras liberadas no meio. As amostras filtradas foram paralisadas com ácido dinitrosalicílico (DNS) 1:1, seguido pela incubação da microplaca em termociclador a 99,9 °C por 5 min. A absorbância foi mensurada em 540 nm e os valores foram confrontados com a curva padrão da glicose. Identificação e análise de genes codificadores de celulasas e lacases no genoma de diferentes espécies de *Colletotrichum*. Os genomas e proteínas preditas de *Colletotrichum* spp. Foram obtidos no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. O *completeness* dos genomas foi acessado com a ferramenta “Busco v.4”, que busca por genes ortólogos de cópia única universal de Sordariomycetes (Seppey et al., 2019). Apenas os genomas com *completeness* igual ou superior a 90,0% foram mantidos. As sequências de proteínas foram agrupadas em ortogrupos utilizando o Orthofinder v.2.3.3 com parâmetros de MCL inflation de 1,5 (Emms e Kelly, 2015) e método de inferência de árvore filogenética utilizando os programas Mafft v.7.305 e FastTree v.2.1.9. As sequências de nucleotídeos correspondentes às proteínas de cada grupo de ortólogos de cópia única foram recuperadas com um script em Python e alinhadas com Mafft v.7.305 (Kato e Standley, 2013) usando a estratégia L-INS-i. Os arquivos de alinhamento gerados para cada ortogrupo foram combinados em um único arquivo de alinhamento. O arquivo Fasta de sequências concatenadas foi utilizado na construção da árvore filogenética, aplicando o método de máxima verossimilhança com RaxML v.8.2.12 (Stamatakis, 2014). O modelo GTR + I + G de substituição de nucleotídeos foi aplicado para realizar buscas da árvore de melhor pontuação (maior verossimilhança). A visualização da árvore e as anotações foram executadas com o pacote “ggtree” do *software* R (Yu et al., 2017). As informações de presença ou ausência de táxons (sequências de genes) em cada ortogrupo foram recuperadas usando um *script* em Python. A estimativa de perdas e ganhos de genes foi realizada com o programa dollop do Phylip package v.3.696 (Felsenstein, 2005), tendo a árvore filogenética de máxima verossimilhança como um guia. A anotação funcional das proteínas de cada clado das árvores geradas foi feita no servidor Pannzer2 (Toronen et al., 2018) e Pfam v33.0 (El-Gebali et al., 2019). As anotações fornecidas pelas duas ferramentas foram concatenadas com um *script* Python.

Microrganismos e preparo do inóculo

As espécies selecionadas por análise genômica foram obtidas da micoteca do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. Os isolados foram cultivados em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e incubados em BOD a 25°C por 7 dias e fotoperíodo de 12h/12h. Os inóculos foram preparados por meio da adição de 10 mL de água estéril e espalhamento das culturas, obtendo-se uma suspensão de esporos. A concentração de esporos das amostras foi determinada por contagem na câmara de Neubauer.

Fermentação em Estado Sólido (FES) e Recuperação do Extrato

Celulases e lacases de fungos do gênero *Colletotrichum* foram produzidas de acordo com a metodologia descrita por Visser et al. (2013) para fermentação em estado semi-sólido. O farelo de trigo foi escolhido como substrato por ser uma fonte de carbono de baixo custo e indutora da atividade de lacases. Em frasco Erlenmeyer de 250 mL foram misturados 12,5 g de farelo de trigo e 18,75 mL do meio de cultura (NH_4NO_3 1 g/L; KH_2PO_4 1,5 g/L; MgSO_4 0,5 g/L; CuSO_4 0,25 g/L e extrato de levedura 2 g/L). Os frascos com os meios foram esterilizados (121 °C, 20 min) e, em seguida, os esporos obtidos anteriormente foram inoculados para uma concentração final de 1×10^4 esporos/mL. Os frascos foram mantidos em estufa 25°C por 6 dias. As enzimas foram extraídas com 50 mL tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5, sob agitação de 150 (30 min, 25 °C). Os produtos da fermentação foram filtrados em gaze e os filtrados foram centrifugados a 15.000 g por 10 min. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20° C até o seu uso nos ensaios de atividade enzimática.

Quantificação de Proteínas Totais

O teor de proteínas totais presentes nos diferentes extratos foi determinado pelo método de ligação de *Coomassie Blue*. Albumina sérica bovina foi utilizada como proteína padrão da curva de calibração (Bradford, 1976).

Atividade Enzimática dos Extratos de *Colletotrichum*

Todos os extratos enzimáticos preparados foram investigados em relação à atividade endoglucanase, β -glicosidase, celobiohidrolase e lacase. Os ensaios foram realizados da seguinte maneira seguindo o mesmo protocolo estabelecido para os extratos comerciais, utilizando uma carga enzimática equivalente.

Sacarificação do tecido denim e descoloração

A recuperação de glicose das fibras do tecido denim pela atividade de celulases de *Colletotrichum*, concomitante com a descoloração da solução com índigo pela atividade do sistema lacase/ABTS foi investigada seguindo os passos que foram descritos para as enzimas comerciais.

Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism (versão 6), no qual os resultados da hidrólise em diferentes condições serão comparados usando uma análise de variância (ANOVA). Diferenças significativas entre os tratamentos foram determinadas pelo teste de múltipla hipótese de Bonferroni. Valores de p menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

Composição química do denim

Após o pré-tratamento de descoloração com ditionito de sódio e hipoclorito de sódio, amostras de denim descolorido e tingido foram secas para a determinação da composição química (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química do denim (jeans) tingido e descolorido. As quantidades de celulose, hemicelulose, lignina, extraíveis e cinzas são baseadas em peso seco.

Amostras	Composição (%)						
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Pectina	Extraíveis	Cinzas	Total
Tecido tingido	79,96 ± 0,47	n.d.	1,88 ± 0,05	n.d.	6,77 ± 0,02	1,28 ± 0,07	89,89
Tecido descolorido	80,06 ± 2,13	n.d.	1,26 ± 0,23	n.d.	6,06 ± 0,02	1,80 ± 0,07	89,18

n.d., não detectado.

A análise química das amostras de tecido denim tingido e descolorido mostra que a remoção do corante não afetou significativamente na concentração de componentes do tecido. O teor de celulose para ambas as amostras equivale a aproximadamente 80% da biomassa seca. Como previsto, as proporções de lignina e hemicelulose foram extremamente baixas. O teor de extraíveis no tecido tingido foi discretamente maior do que no tecido descolorido. Isso pode ter ocorrido porque o corante índigo é ligeiramente solúvel em água e álcool, sendo parcialmente liberado no tratamento em Soxhlet. Elucidar a composição química do denim nos direcionou na escolha do conjunto enzimático mais adequado para o processo de sacarificação do tecido. É comum que estudos de hidrólise e sacarificação de biomassas utilizem coquetéis enzimáticos compostos por variadas enzimas lignocelulolíticas e acessórias. No entanto, como a estrutura é rica em celulose e escassa de outros

componentes, apenas as celulases foram selecionadas para a função de hidrólise das fibras.

Atividade de celulases totais e lacase dos extratos comerciais

Inicialmente, foram determinadas as atividades de celulases totais de extrato comercial de *Trichoderma reesei* e atividade de lacases de extrato comercial de *Aspergillus spp.* Foram avaliadas diferentes faixas de temperatura (25 - 50° C) em pH 5 ao longo de 1 hora (Figura 1).

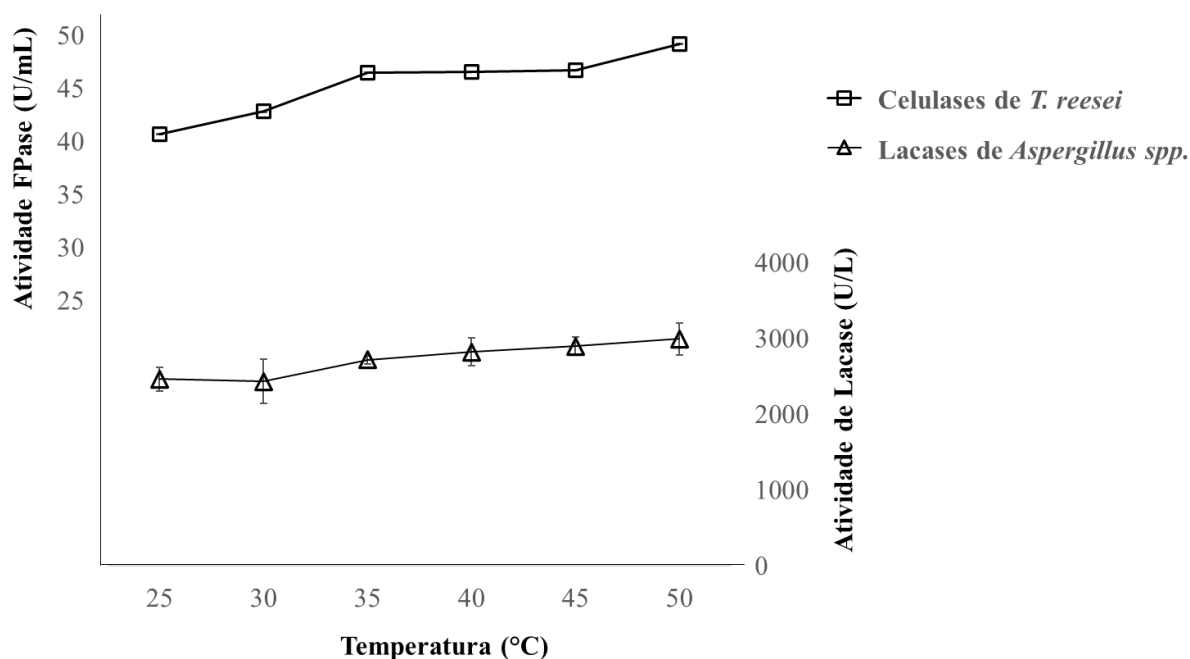


Figura 1. Atividade de celulases totais (FPase) de extrato comercial de *T. reesei* (Sigma- Aldrich) e atividade de lacase do extrato comercial de *Aspergillus spp.* (Sigma- Aldrich). As atividades foram analisadas em diferentes temperaturas (25° C – 50° C).

As celulases não tiveram variação substancial de atividade FPase entre as temperaturas analisadas, mantendo-se constante entre 35° C e 45° C (46,5 FPU/mL) e alcançando a maior atividade a 50° C (49,2 FPU/mL). A curva da atividade de lacases de *Aspergillus spp.* apresentou comportamento similar a atividade FPase, mostrando pouca variação no gradiente de temperatura. A atividade máxima detectada foi de 2.996 U/L (50° C). A temperatura de 50° C foi escolhida para os testes posteriores das celulases e lacases em função das maiores atividades enzimáticas observadas ao

longo de 30 minutos. Também foi definido que os testes de hidrólise e descoloração prosseguiriam utilizando cargas enzimáticas de 33 FPU e 100 U/L de celulasas e lacases, respectivamente.

Descoloração do índigo *blue*

O sistema lacase/ABTS foi aplicado para descolorir a solução de índigo *blue* (50 mg/L). A taxa de descoloração foi comparada com atividade individual da lacase e do ABTS (Figura 2).

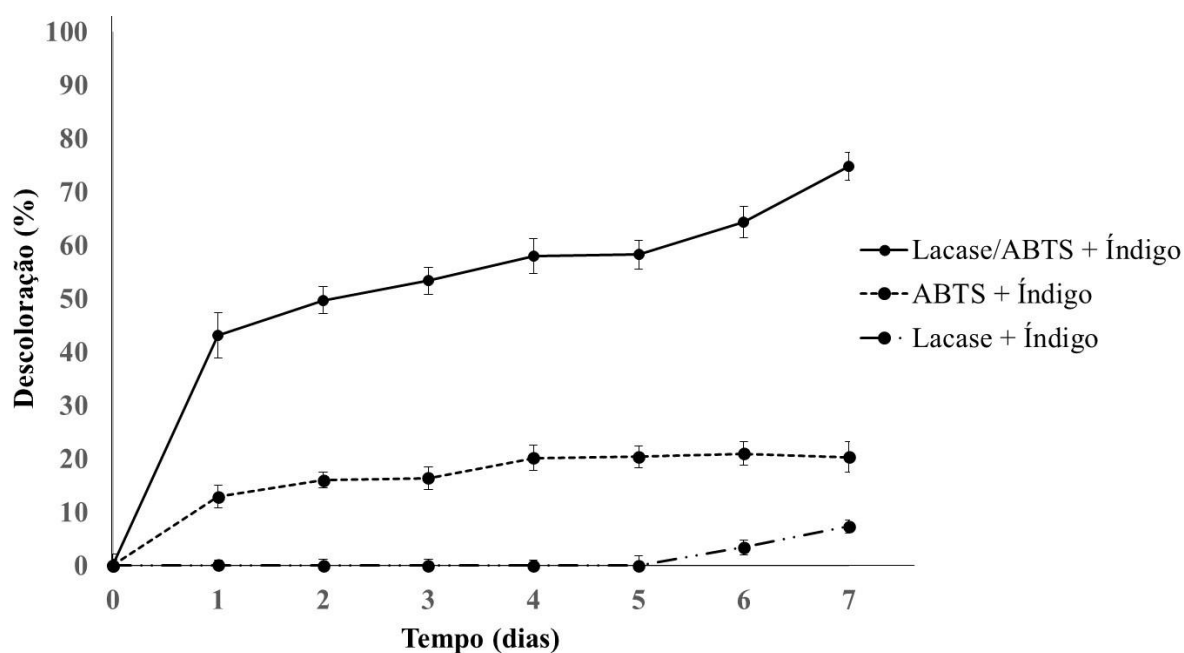


Figura 2. Descoloração do índigo *blue* (50 mg/L) por ABTS (25 μ M), lacase (100 U/L) e lacase/ABTS (100 U.L-1/ 25 μ M) em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5 com agitação de 150 rpm à temperatura ambiente.

Após 24 h, o sistema lacase/ABTS foi capaz de descolorir cerca de 45% da solução de corante. A taxa de descoloração/dia variou entre 0,2 a 10,5%, alcançando, no total, 74,4% da solução descolorida no sétimo dia. A taxa de descoloração observada no tratamento com ABTS sozinho foi de 12,9% em 24 h e 20,3% em sete dias. Não foi detectado atividade de descoloração pela lacase sozinho até o quinto dia

de tratamento, no entanto, nos dias seguintes, foi observado uma pequeno percentual de descoloração da solução (7,3%).

Prospecção *in silico*

A prospecção genômica *in silico* foi realizada para estudo de quantidade e evolução de genes codificadores de celulasas e lacases. Foram encontrados 22 isolados de *Colletotrichum* com sequências do genoma publicadas. Essas sequências foram atribuídas a 15 espécies diferentes. O Othofinder agrupou 406 mil genes em aproximadamente 22.879 ortogrupos, onde foram encontrados 1.826 ortólogos de cópia única em todas as espécies analisadas. A árvore filogenética foi construída com base no alinhamento concatenado de 1.826 ortólogos de cópia única obtidos do genoma de 15 espécies de *Colletotrichum*. Os padrões gerais de ganho e perda de genes associados às endoglucanases, celobiohidrolases, β -glicosidase e lacases são mostrados na Figura 3.

Em cada classe de enzimas, o número total de genes perdidos foi estimado pela diferença do número de genes das espécies derivadas em relação ao ancestral comum mais recente. *C. siamense* ICMP 18578 (ramo 13) e *C. fructicola* 1104-7 (ramo 14) apresentaram o maior ganho de genes em relação a perda para as quatro classes enzimáticas. Visto isso, isolados de *C. siamense* e *C. fructicola* disponíveis na coleção de fungos do Laboratório de Genética de Molecular de Microrganismos (UFV) foram selecionadas para os testes *in vitro* de expressão e atividade enzimática.

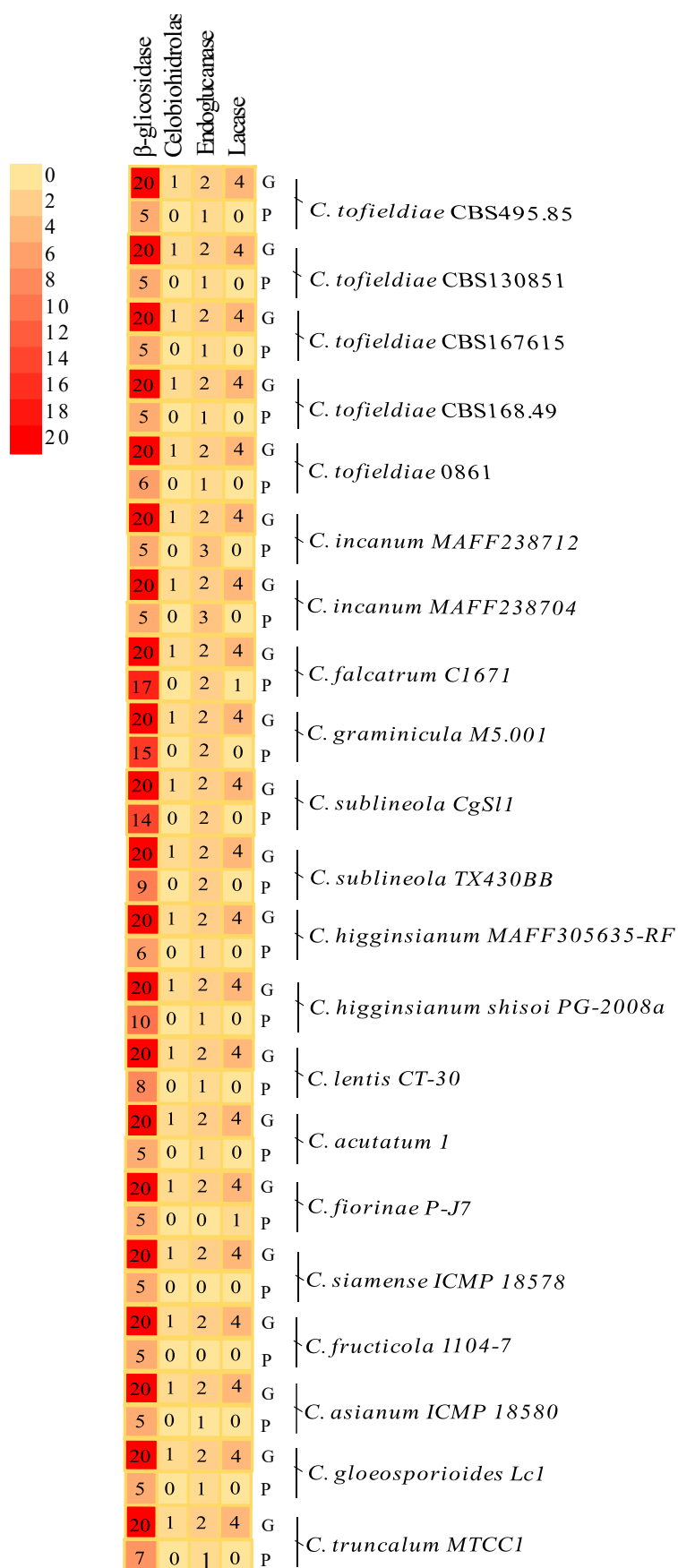


Figura 3. Os padrões gerais de ganho (G) e perda (P) de genes associados a 21 nós.

Atividades do complexo das celulases e atividade de lacase dos extratos comerciais e extratos de *Colletotrichum*

Inicialmente, foram determinadas as concentrações das proteínas totais e as atividades enzimática dos diferentes extratos comerciais e dos secretados pelos fungos cultivados em farelo de trigo (*C. siamense* 404F26F e *C. fructicola* 229F1F) (Tabela 2).

Tabela 2. Análise da concentração e atividade do extrato bruto de *C. siamense* 404F26F e *C. fructicola* 229F1F e dos extratos comerciais de *T. reesei* e *Aspergillus* spp. (Sigma-Aldrich)

	Proteínas totais (mg/mL)	Endoglucanase	β -glicosidase (U/mL)	Celobiohidrolase	Lacase (U/L)
<i>C. siamense</i> 404F26F	0,42 \pm 0,03	0,78 \pm 0,07	0,25 \pm 0,01	0,25 \pm 0,007	193,79 \pm 3,84
<i>C. fructicola</i> 229F1F	0,50 \pm 0,04	0,63 \pm 0,07	0,31 \pm 0,01	0,33 \pm 0,02	5,86 \pm 0,60
<i>T. reesei</i> (Sigma-Aldrich)	1,45 \pm 0,06	44,8 \pm 0,28	3,9 \pm 0,33	35,3 \pm 0,58	-
<i>Aspergillus</i> spp. (Sigma-Aldrich)	1,46 \pm 0,03	-	-	-	2.996 \pm 20,89

Em todos os extratos investigados, a atividade endoglucanase foi maior em relação as atividades β -glicosidase e celobiohidrolase. Para *C. siamense* 404F26F, a atividade endoglucanase foi cerca de 3,1 vezes maior do que as outras atividades celulolíticas analisadas. Já para *C. fructicola* 229F1F, essa diferença foi aproximadamente 2 vezes. Há uma enorme diferença entre o perfil de atividade de lacase entre essas espécies. É de se esperar que a atividade dos extratos comerciais seja consideravelmente maior, uma vez que são extratos enzimáticos altamente concentrados e estáveis. Lacase de *C. fructicola* 229F1F apresentou atividade 33 vezes menor (5,86 U/L) do que a observada no pelo extrato de *C. siamense* 404F26F (193,79 U/L). Com base nisso, apenas a *C. siamense* 404F26F foi escolhida para os testes de sacarificação e descoloração do denim.

Sacarificação e descoloração do denim

Os ensaios de sacarificação seguiram utilizando a biomassa sem pré-tratamento, submetida ao tratamento com celulases e lacases em microplacas, na temperatura de 50° C, como definido previamente no item 3.2. Esse teste comparou o efeito do uso integrado de celulases e lacases com o uso individual dessas enzimas na geração de açúcares redutores, na descoloração do corante liberado no meio e na recuperação de glicose por rendimento total (%) (Figura 4).

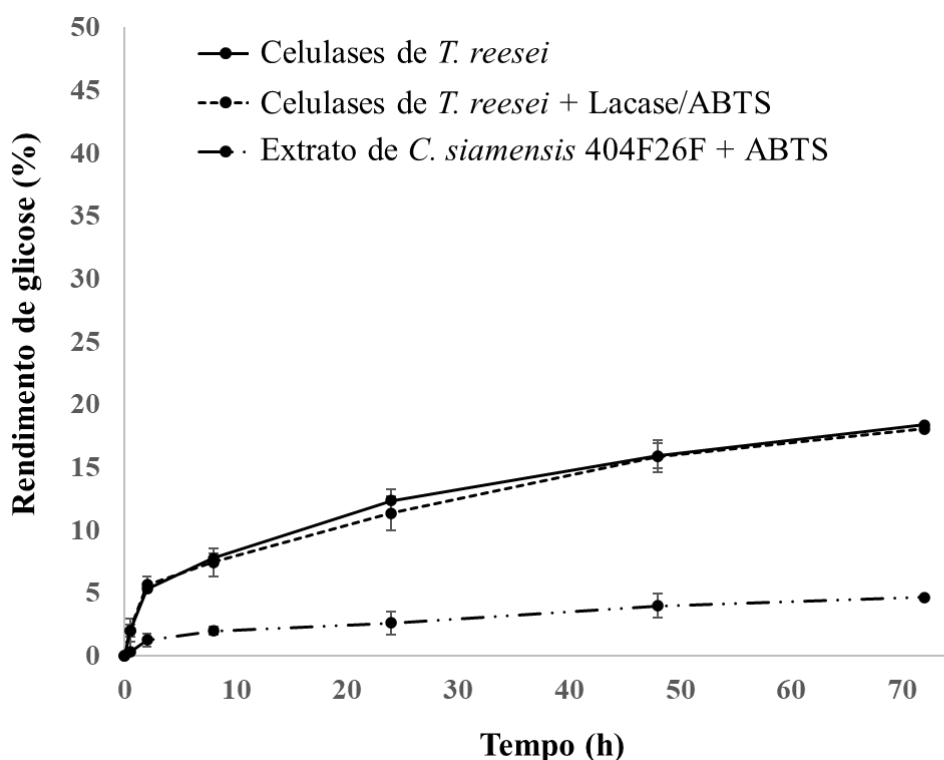


Figura 4. Rendimento de glicose (%) ao longo de 72 h por hidrólise enzimática de carboidratos do tecido denim. Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços a 50° C.

A taxa de rendimento de glicose foi similar nos tratamentos com celulases de *T. reesei* com e sem a adição de lacases. Em 72 h, ambos os tratamentos foram capazes de recuperar 18% de glicose das fibras de denim. O rendimento de glicose do denim pelo extrato bruto de *C. siamense* 404F26F (4,6%) foi 4 vezes menor do que pela hidrólise com o extrato comercial. Foi possível observar visualmente a diferença de coloração entre os diferentes tratamentos. Amostras de denim tratadas apenas com celulases puras tiveram parte do corante removido e liberados no meio, como

previsto em literatura (Figura 5a). Aparentemente, ocorreu a descoloração de parte do corante liberado pelo tratamento com celulases em conjunto com o sistema lacase/ABTS (Figura 5c). No tratamento com extrato de *C. siamense* 404F26F (Figura 5b) é bem evidente a diferença de coloração comparado aos outros testes, como se grande parte do corante liberado tivesse sido degradado.

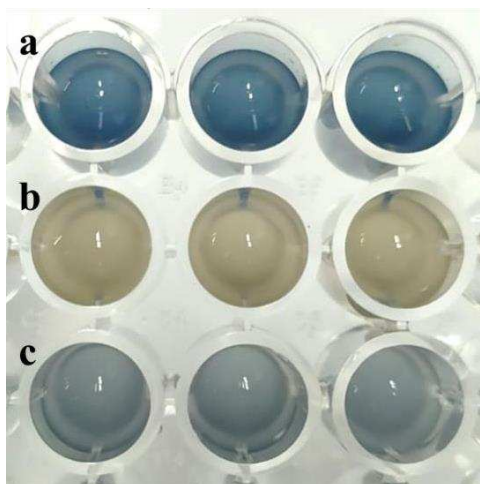


Figura 5. Soluções resultantes da sacarificação e descoloração do tecido denim em microplaca de 96 poços por 72h a 50°C. (a) Produto do tratamento com celulases de *T. reesei* (Sigma-Aldrich) (b) Tratamento com extrato bruto de *C. siamense* 404F26F + ABTS. (c) Tratamento com celulases de *T. reesei* (Sigma-Aldrich) + lacases de *Aspergillus* spp. + ABTS.

Discussão

Comumente, a produção de têxteis utiliza diferentes tratamentos enzimáticos para enobrecer o tecido, melhorando as suas características físicas e visuais, além de favorecer a fixação do corante durante o tingimento (Araújo et al., 2008). Enzimas como amilases, celulasas, pectinases, proteases, lipases e oxirredutases (e.g., catalases e lacases) são extensivamente aplicadas nas diferentes fases de processamento do tecido para a remoção de materiais celulósicos e não celulósicos presentes, mantendo a resistência e o peso do tecido (Araújo et al., 2008; Mojsov, 2011). Após a remoção do conteúdo não celulósico, a fibra crua pode alcançar em torno de 95-99% de celulose (Wakelyn, 2006). Encontramos um único trabalho na literatura que apresentou uma análise composicional das fibras de algodão tingidas com corante índigo. Grande parte dos nossos dados conferem com os descritos por Cruz (2017), no qual determinou 81,20% e 80,03% de celulose no tecido tingido e no tecido descolorido, respectivamente. A diferença mais evidente está relacionada a concentração de hemicelulose, no qual a literatura conta $\cong 3\%$, enquanto neste trabalho não foi detectada.

A reciclagem de resíduos lignocelulósicos agroindustriais envolve a recuperação de glicose livre da celulose para a geração de produtos de alto valor agregado, como biocombustíveis de segunda geração (Juhász et al., 2005; Maitan-Alfenas et al., 2015). Os resíduos comumente utilizados nesses processos de reciclagem (e.g., palha e bagaço cana-de-açúcar, casca de arroz, palha de trigo, espiga de milho, fibra de coco, etc.) apresentam em torno de 35-50% de celulose e 25-30% de lignina na sua composição (Santos et al., 2012). Componentes da lignina são capazes de diminuir o rendimento de hidrólise da biomassa por interagirem inespecificamente com uma enorme quantidade de enzimas celulolíticas (Berlin et al., 2005; Maitan-Alfenas et al., 2015). O alto teor de celulose e baixo teor de lignina no denim mostra que esse tecido pode ser uma fonte atraente de açúcares fermentescíveis em comparação com as fontes citadas.

O ABTS atua como um mediador eletrônico, disponibilizando para as lacases os elétrons removidos dos corantes (Campos et al., 2001). Wong e Yu (1999) observaram que, na ausência de mediadores, a taxa de degradação inicial do corante índigo não foi proporcional à atividade de lacase de *Trichoderma versicolor*. Em contrapartida, o corante antraquinona aumentou proporcionalmente ao aumento

da atividade enzimática, demonstrando que, ao contrário do índigo, a antraquinona é um substrato para aquela lacase. De modo similar, vimos que a descoloração do índigo *blue* pela lacase sozinha é nula até o quinto dia, indicando que esse corante não é um substrato típico da lacase de *Aspergillus* spp. O ABTS sozinho descoloriu 20% do corante em sete dias. É possível que radicais ABTS • + tenham se formado ao entrar contanto com componentes específicos da mistura de reação, promovendo a oxidação da solução. Entretanto, esse mecanismo foi limitado pela baixa concentração de ABTS no meio (25 µM). A descoloração do corante índigo pelo sistema lacase/ABTS foi reportado por Liu et al. (2015) e Liu et al. (2017). Em ambos os trabalhos o sistema foi capaz de descolorir ~ 96% do corante índigo carmim em até 15 min. O índigo carmim presente no meio de cultura de *T. versicolor* (atividade de lacase = 164 U/L) com 0,5 µM de ABTS teve a maior taxa de descoloração inicial (80 mg/L.h-1) comparado as outras combinações (Wong e Yu, 1999). Observamos um menor taxa de descoloração do índigo em função do tempo (74%) pelo sistema lacase/ABTS em relação a esses estudos. A velocidade de biodegradação de corantes é influenciada por fatores como capacidade de adsorção, limitações no transporte e na acessibilidade e pelo potencial redox da enzima e do substrato (Pearce, 2003). Visto que a lacase e o corante utilizados neste estudo são diferentes daqueles utilizados nos trabalhos citados, é comum que essas diferenças sejam observadas.

O sistema lacase/ABTS ajudou na remoção de índigo de águas residuais e fixado às fibras de algodão (Sólis-Oba et al., 2008). Nesse trabalho, foi explicado que os mediadores realizam diversos ciclos de oxirredução entre a lacase e o índigo, e com isso demonstraram que uma baixa concentração do ABTS é suficiente para descolorir altas concentrações do corante. A principal vantagem disso vem do fato de que a maioria dos mediadores sintéticos são caros, instáveis e tóxicos em altas concentrações (Cañas e Camarero, 2010). Utilizamos 100 U/L de lacase para descolorir o índigo *blue*, pois é suficiente para degradar um amplo espectro de substratos (Frasconi et al., 2010). Mendoza et al. (2011) observaram que o aumento da concentração de lacase de *Trichoderma versicolor* de 100 U/L para 500 U/L levou a diminuição do percentual de descoloração. Assim como a adição de mais mediadores (50 µM para 500 µM) também reduziu a descoloração, possivelmente, pela perda de atividade da lacase.

A remoção do corante inclui a redução do índigo a leucoíndigo pela ação do ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), gerando produtos secundário altamente tóxicos ao ambiente, como sulfitos, sulfatos e outros compostos derivados de enxofre (Yi et al., 2020). Nossos testes mostraram que não há necessidade de remoção do corante por pré-tratamentos químicos para otimizar a recuperação de glicose das fibras, diminuindo a laboriosidade da técnica e evitando que mais poluição seja gerada. O rendimento da sacarificação pela hidrólise com extrato comercial (18%) ou com as enzimas extraídas de *C. siamense* (4,8%) foi próximo do valor encontrado por Hong et al. (2012) para tecidos sem tratamento de modificação da fibra (~10%). Entretanto, essas taxas são consideravelmente menores quando comparadas aos resultados de estudos com tecido pré-tratado (Hong et al., 2012; Austad, 2018; Li et al., 2018). Uma série de fatores que a sacarificação foi de 79,2% após tratamento do denim com ácido fosfórico 85% (50° C, 7 horas). Em geral, esses estudos revelam que a eficiência da hidrólise pode ser otimizada pelo aumento da superfície disponível para as enzimas e diminuição do grau de cristalinidade das fibras. A hidrólise da celulose por *T. reesei* é limitada pelos baixos níveis β -glicosidases, a enzima responsável pela conversão da celobiose em glicose (Chandel et al., 2012). A β -glicosidase limita a ação inibitória que o acúmulo de celobiose exerce sobre a atividade das endo e exoglucanases. 1461

(Cruz, 2017). É comum que os extratos de *T. reesei* sejam complementados com diferentes coquetéis celulolíticos (Chandel et al., 2012). Outros parâmetros importantes para a sacarificação estão relacionados a faixa de pH, a carga enzimática e concentração de substrato. Revisões que abordam as variáveis que influenciam no rendimento da hidrólise e fermentação mostram que, de modo geral, as celulases têm atividades ótimas na faixa de 40 a 50° C e pH 4 a 5 (Olsson e Hahn-Hägerdal, 1996; Dashtban et al., 2009; Chandel et al., 2012). A carga enzimática utilizada deve estar em equilíbrio com a proporção de substrato. Altas concentrações do substrato podem afetar diretamente a inibição da enzima resultando na diminuição da taxa de hidrólise (Sun e Cheng, 2002). Por outro lado, altas cargas de celulase aumentam consideravelmente o custo do processo (Chandel et al., 2012). A proporção de sólido:líquido = 1:20 (ou seja, 5% de substrato) geralmente fornece a melhor eficiência de hidrólise de materiais lignocelulósicos (Chandel et al., 2012). A condução do ensaio de sacarificação em microplaca com volumes reduzidos de reagentes limitou a proporção de substrato a 15%. Valores menores ou maiores foram difíceis de serem testados devido a limitação dos aparatos utilizados. Os ensaios em microplaca de 96

poços permitiram a economia de reagentes e maior agilidade de trabalho, porém é interessante que estes estudos também sejam validados com uso de dispositivos que permitem testar volumes maiores.

O conjunto de celulases expressas por grande parte dos fungos é reflexo da sua capacidade de colonizar os hospedeiros durante os estágios iniciais da infecção (Pensupa et al, 2017). Além as celulases, enzimas como cutinases, pectinases, hemicelulases, amilases, lipases, proteases e lacases são secretadas em fases de pré-penetração ou propagação do fungo (Velho et al., 2018; Armesto et al., 2019). A função de lacases fúngicas vai além do sistema de degradação de componentes da lignina, pelo qual essas enzimas são normalmente conhecidas. Mutantes de *C. gloeosporioides* patógenos de manga com interrupção de um gene para lacase (*lac1*) tiveram alteração em relação ao crescimento, a diferenciação micelial, a conidiação, a formação de apressório, a pigmentação, a biossíntese de melanina, a secreção de enzimas hidrolíticas extracelulares e a nutrição (Wei et al., 2017). Vimos que o número de genes para lacases foram conservadas em quase todas as espécies de *Colletotrichum* estudadas. De modo geral, esses dados evidenciam que as lacases possuem um importante papel para os diferentes estilos de vida desses fungos.

Extratos de *Colletotrichum sp.* e *C. lindermuthianum* endofíticos de folhas de *Avicennia marina* (Mangue cinza) apresentaram atividade de lacase igual a 520 U/L (Obanan et al., 2022). Esses autores também mostraram que as espécies de *Colletotrichum* citadas foram capazes de descolorir > 90% do corante sintético vermelho congo em solução. Verificamos que atividade de lacase para o extrato de *C. siamense 404F26F* (193,79 U/L) foi menor do que no estudo citado. Entretanto, é importante observar o tempo de fermentação para a produção enzimática foi menor (6 dias) neste trabalho em relação tempo (10 dias) testado e Obanan et al. (2022), de modo que pode ter ocorrido uma maior concentração de enzimas no meio.

Como as taxas de recuperação de glicose do denim foram as mesmas para os tratamentos em que haviam ou não lacase/ABTS misturadas a celulases (18%), e considerando que a quantidade de corante liberado no meio foi a mesma, é possível inferir que a diferença de coloração observada entre esses tratamentos foi causada exclusivamente pela atividade da lacase. Para o tratamento com extrato de *C. siamense 404F26F* a hidrólise do tecido foi menor, então mesmo observando uma grande diferença de coloração desse meio em relação aos outros tratamentos, não é

crível fazer comparações entre as amostras. É necessário que técnicas mais precisas sejam aplicadas para quantificar a eficiência de descoloração.

Conclusão

O tecido denim é composto predominantemente por celulose (cerca de 80%). As baixíssimas concentrações de componentes como lignina, hemicelulose e pectina indica que apenas a ação sinérgica de celulases é necessária para promover a hidrólise desse tecido. Foi investigado a recuperação de glicose e a descoloração do corante índigo via hidrólise enzimática. A ação de celulases promoveu a liberação de parte do corante índigo que está aderido as fibras que algodão. O corante liberado em solução, ou até mesmo aderido ao tecido no começo da reação, não interfere na eficiência de sacarificação das fibras, mostrando que não é necessário tratamentos químicos prévios para remover o corante. Celulases comerciais em conjunto com o sistema lacase/ABTS recuperaram até 18% de glicose do tecido denim em 72 h e promoveram descoloração aparente da solução. O extrato enzimático produzido de *Colletotrichum siamense* 404F26F com a presença do mediador ABTS recuperou 4,6% de glicose e evidente descoloração do meio no mesmo intervalo de tempo. Em conclusão, a bioconversão de denim para recuperar glicose sem gerar produtos secundário nocivos é possível com aplicação de coquetéis composto com celulases, lacases e mediador ABTS. Estudos futuros podem investigar cargas enzimáticas mais altas, variadas condições de reação e modificação física do denim.

Bibliografia

- Armesto, C., Maia, F. G. M., Monteiro, F. P., & De Abreu, M. S. de. Exoenzymes as a pathogenicity factor for *Colletotrichum gloeosporioides* associated with coffee plants. **Summa Phytopathologica**, [S.L.], v. 45, n. 4, p. 368-373, 2019.
- Adney, B., & Baker, J. Measurement of Cellulase Activities. LAP-006 NREL Analytical Procedure, **National Renewable Energy Laboratory**, Golden, CO, 1996.
- Araújo, R., Casal, M., & Cavaco-Paulo, A. Application of enzymes for textile fibres processing. **Biocatalysis and Biotransformation**, [S.L.], v. 26, n. 5, p. 332-349, 2008.
- Austad, Anna. Enzymatic conversion of cotton textiles. Dissertação de Mestrado. Norwegian University of Life Sciences, Ås. Berlin, A., Gilkes, N., Kurabi, A., Bura, R., Tu, M., Kilburn, D., & Saddler, J. Weak lignin-binding enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S.L.], v. 121, n. 1, p. 163-170, 2005.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- Campos, R., Kandelbauer, A., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A., & Gübitz, G. M. Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. **Journal of Biotechnology**, [S.L.], v. 89, n. 2-3, p. 131-139, 2001.
- Cañas, A. I., & Camarero, S. Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. **Biotechnology Advances**, [S.L.], v. 28, n. 6, p. 694-705, 2010.
- Chandel, A. K., Chandrasekhar, G., Silva, M. B., & Da Silva, S. S. The realm of cellulases in biorefinery development. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S.L.], v. 32, n. 3, p. 187-202, 2011.
- Cruz, L. P. R. **Obtenção de nanocelulose por hidrólise ácida e enzimática de fibras de algodão de resíduo de tecido tingido com corante índigo**. Tese (Doutorado) – Curso de Engenharia Mecânica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2017.
- Dashtban, M., Schraft, & H., Qin, Wensheng. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, [S.L.], v. 5, n. 6, p. 578, 2009.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., Qureshi, M., Richardson, L. J., A Salazar, G., Smart, A. **The Pfam protein families database in 2019**.

- Nucleic Acids Research, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 427-432, 2019. Emms, D. M., Kelly, S. OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. **Genome Biology**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 1-14, 2015.
- Felsenstein, J. **PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6**. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, 2005.
- Frasconi, M., Favero, G., Boer, H., Koivula, A., & Mazzei, F. Kinetic and biochemical properties of high and low redox potential laccases from fungal and plant origin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1804, n.4, p. 899-908, 2010.
- Obanan, S. P., Sadaba, R. B., Alva-Gatchalian, P., Cadiz, A. V., Basilio, E. M., & Belong, D. B. Decolorization of synthetic textile dyes by fungal endophytes isolated from the leaves of Philippine Mangrove (*Avicennia marina*). **Environment Asia**, [S.L.], v.15, n. 1, p. 21-32, 2022.
- Olsson, L., & Hahn-Hägerdal, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, [S.L.], v.18, n. 5, p. 312-331, 1996.
- Pearce, C. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. **Dyes and Pigments**, [S.L.], v. 58, n. 3, p. 179-196, 2003.
- Santos, F. A., De Queiróz, J. H., Colodette, J. L., Fernandes, S. A., Guimarães, V. M., & Rezende, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, [S.L.], v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.
- Seppely, M., Manni, & M., Zdobnov, E. M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness. **Methods in Molecular Biology**, [S.L.], p. 227-245, 2019.
- Sólís-oba, M., Almendáriz, J., & Viniegra-González, G. Biotechnological treatment for colorless denim and textil wastewater treatment with laccase and ABTS. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 5-11, 2008.
- Stamatakis, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014.
- Sun, Y., & Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.
- Tappi. Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525°C. **Tappi Standard Methods (T 211 om-02)**, Atlanta, 2002b.
- Tappi. Moisture in pulp, paper and paperboard, **Tappi Standard Methods (T-421 om-02)**, Atlanta, 2002a.

- Tappi. Technical association of the pulp and paper industry. **Tappi Standard Methods (T-222 om-98)**, Atlanta, 1999.
- Törönen, P., Medlar, A., & Holm, L. PANNZER2: a rapid functional annotation web server. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 46, n. W1, p. W84-W88, 2018.
- Velho, A. C., Mondino, P., & Stadnik, M. J. Extracellular enzymes of *Colletotrichum fructicola* isolates associated to apple bitter rot and *Glomerella* leaf spot. **Mycology**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 145-154, 2018.
- Visser, E. M., Falkoski, D. L., de Almeida, M. N., Maitan-Alfenas, G. P., & Guimarães, V. M. Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 144, 587-594, 2013.
- Wakelyn, P. J. Cotton Fiber Chemistry and Technology. Boca Raton: Crc Press, 2006. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/cotton-fiber-chemistry-technology-phillip-wakelyn/10.1201/9781420045888>. Acesso em: 01 jan. 2022.
- Wei, Y., Pu, J., Zhang, H., Liu, Y., Zhou, F., Zhang, K., & Liu, X. (2017). The laccase gene (LAC1) is essential for *Colletotrichum gloeosporioides* development and virulence on mango leaves and fruits. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 99, 55-64.
- Wong, Y., & Yu, J. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. **Water Research**, [S.L.], v. 33, n. 16, p. 3512-3520, 1999.
- Yi, C., Tan, X., Bie, B., Ma, H., & Yi, H. Practical and environment-friendly indirect electrochemical reduction of indigo and dyeing. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-8, 2020.
- Yu, G., Smith, D. K., Zhu, H., Guan, Y., Lam, T. T. Ggtree: an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. **Methods in Ecology and Evolution**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 28-36, 2017.