



**UNIVERSIDADE TECNÓLOGICA FEDERAL DO PARANÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**  
**MULTICAMPI APUCARANA E LONDRINA**

**ALEX KIYOMASSA WATANABE**

**DESCOLORAÇÃO DO CORANTE VERDE DE MALAQUITA POR ISOLADO**  
**BACTERIANO**

LONDRINA  
2021

ALEX KIYOMASSA WATANABE

**DESCOLORAÇÃO DO CORANTE VERDE DE MALAQUITA POR ISOLADO  
BACTERIANO**

**DESCOLORATION OF MALACHITE GREEN DYE BY BACTERIAL ISOLATE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental / multicampi Apucarana e Londrina da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Área de Concentração: Engenharia Ambiental

Linha de Pesquisa: Monitoramento Ambiental

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Furlaneto-Maia

LONDRINA

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos.

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação**  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
**Câmpus Londrina**



---

ALEX KIYOMASSA WATANABE

**DESCOLORAÇÃO DO CORANTE VERDE DE MALAQUITA POR ISOLADO BACTERIANO**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Engenharia Ambiental.

Data de aprovação: 31 de Março de 2021

Prof.a Luciana Furlaneto Maia, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof.a Juliana Feijo De Souza Daniel, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof Leopoldo Sussumu Matsumoto, Doutorado - Universidade Estadual do Norte do Paraná (Uenp)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 01/04/2021.

Dedico este trabalho ao meu Mestre da vida, a minha batian, aos meus pais, aos meus irmãos, e de toda família Watanabe. Dedico também aos meus amigos, professores e de todos que acreditaram nas minhas escolhas.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEA) - Campus Apucarana / Londrina - pela oportunidade de estar concluindo o processo para obtenção do título de mestre em engenharia ambiental.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e a Fundação Araucária - que ajudaram no desenvolvimento da minha pesquisa.

Agradeço ao Coordenador da PPGEA, Prof<sup>o</sup>. Dr. Alessandro Bail; aos professores do curso de mestrado em engenharia ambiental. Em especial, a Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciana Furlaneto-Maia, pela orientação.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada (LAMBA), pela amizade, conversas e trocas de experiências; na qual alegraram o dia-a-dia no laboratório. Alunos como Natara, Nayara, Bruno, Ariadne, Aline, Lorena e Thabata – que infelizmente, muitos não estão mais participando mais do laboratório.

Agradeço aos técnicos, professores e funcionários da universidade. Em especial, ao Laboratório Multiusuário (LabMulti-Ld) e ao Departamento Acadêmico de Química (Laboratório DAQUI), pelo uso dos equipamentos, que foram essenciais nas análises das amostras.

E por fim, agradeço ao pessoal da UEL, em especial, aos alunos Renan, Cassia e Hugo e a Prof<sup>a</sup>. Dra. Marcia Cristina Furlaneto, que me auxiliaram nas análises da fitotoxicidade.

Muito obrigado a todos...

WATANABE, Alex Kiyomassa. **Descoloração do corante verde de malaquita por isolado bacteriano**. 2021. 63 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2021.

## RESUMO

Verde malaquita (VM) é um corante trifenilmetano amplamente utilizado na indústria têxtil, aquicultura e também foi relatado como tóxico para seres vivos. Quando descartado em efluentes, causam bioacumulação na biota local, além de impedirem a transmissão da luz no corpo receptor devido às fortes colorações reduzindo a fotossíntese e causando danos ao meio ambiente. Vários métodos físico e químicos são utilizados para a descoloração desse corante. Contudo, os métodos biológicos são economicamente viáveis além de serem eco-friendly. Assim sendo, este trabalho teve por objetivo isolar bactérias do ambiente de corpos d'água com potencial degradação de VM. A cepa denominada LAMBA 3.8 foi a selecionada por apresentar degradação superior a 90 % em meio contendo 50, 100 e 150 mg.L<sup>-1</sup> de corante. A degradação também foi avaliada nos pHs 7 e 8 e em duas temperaturas de incubação sendo 30 e 37 °C, nos tempos 24 e 48 h. A eficiência de descoloração foi maior nos pHs 7 e 8 em ambas temperaturas, em 48 h de incubação. A concentração do corante não afetou a taxa de descoloração. A enzima lacase foi mensurada em 1,66 U.L<sup>-1</sup>. O corante degradado foi avaliado por UV-Vis e FTIR. O espectro do UV-Vis apresentou alteração na absorbância do VM, já os picos no FTIR mostraram alterações nos grupos funcionais. No teste de fitotoxicidade a solução tratada continuou apresentar toxicidade em semente de *Vigna radiata*, já o teste de microtoxicidade mostrou que a solução tratada deixou de inibir o isolado *Enterococcus* sp, sensível ao corante VM. Concluímos que o isolado LAMBA 3.8 degradou com eficiência o VM além de perder a toxicidade após tratamento, mostrando ser um isolado viável para o processo de biorremediação.

**Palavra-chave:** trifenilmetano; biorremediação; corante têxtil

WATANABE, Alex Kiyomassa. **Descoloration of malachite green dye by bacterial isolate**. 63 f. Dissertation (Master in Environmental Engineering) – Federal University of Technology – Paraná, Londrina, 2021.

## ABSTRACT

Malachite green (VM) is a triphenylmethane dye widely used in the textile industry, aquaculture and has also been reported as toxic to living things. When discarded in effluents, they cause bioaccumulation in the local biota, in addition to preventing the transmission of light in the receiving body due to strong colorings reducing photosynthesis and causing damage to the environment. Various physical and chemical methods are used to discolor this dye. However, biological methods are economically viable in addition to being eco-friendly. Therefore, this work aimed to isolate bacteria from the environment of water bodies with potential degradation of VM. The strain denominated LAMBA 3.8 was selected because it presented degradation greater than 90 % in medium containing 50, 100 and 150 mg.L<sup>-1</sup> of dye. Degradation was also evaluated at pH 7 and 8 and at two incubation temperatures, 30 and 37 °C, at times 24 and 48 h. The decolorization efficiency was higher at pH 7 and 8 at both temperatures, in 48 h of incubation. The concentration of the dye did not affect the rate of discoloration. The laccase enzyme was measured at 1.66 U.L<sup>-1</sup>. The degraded dye was evaluated by UV-Vis and FTIR. The UV-Vis spectrum showed change in the absorbance of the VM, while the peaks in the FTIR showed changes in the functional groups. In the phytotoxicity test, the treated solution continued to present toxicity in *Vigna radiata* seed, whereas the microtoxicity test showed that the treated solution no longer inhibited the *Enterococcus* sp isolate, sensitive to the VM dye. We concluded that the LAMBA 3.8 isolate effectively degraded the VM in addition to losing toxicity after treatment, showing that it is a viable isolate for the bioremediation process.

**Key-word:** triphenylmethane; bioremediation; textile dye

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Exemplos de corantes de origem natural .....	14
<b>Figura 2</b> – Linha do tempo da utilização dos corantes .....	15
<b>Figura 3</b> – Cadeia da produção têxtil.....	16
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática das regiões cromóforos e auxicromos ...	18
<b>Figura 5</b> – Formula estrutural do corante e a coloração.....	21
<b>Figura 6</b> – Transformação do Verde de malaquita em forma Leuco .....	22
<b>Figura 7</b> – Métodos utilizados nos tratamentos de efluentes têxteis .....	23
<b>Figura 8</b> – Enzimas e suas classes. ....	32
<b>Figura 9</b> – Mapa hidrográfico do município de Assaí - PR. ....	34
<b>Figura 10</b> – Locais de coleta de água dos rios da cidade de Assai - PR.....	35
<b>Figura 11</b> – Ensaio de descoloração em meio sólido e líquido.....	45
<b>Figura 12</b> – Degradação do Verde de Malaquita pelo isolado LAMBA 3.8.....	46
<b>Figura 13</b> – Espectros de UV-Vis e FTIR do VM antes e após o tratamento.....	47
<b>Figura 14</b> – Ensaio de Toxicidade .....	49



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Alguns estudos relatando a toxicidade desses corantes.....	17
<b>Tabela 2</b> – Principais classes de corantes .....	19
<b>Tabela 3</b> – Fatores que interferem na descoloração dos corantes .....	28
<b>Tabela 4</b> – Trabalhos envolvendo a degradação do verde de malaquita.....	31
<b>Tabela 5</b> – Enzimas, natureza do poluente e mecanismo de ação .....	32

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1 JUSTIFICATIVA .....	12
1.2 OBJETIVOS .....	13
1.2.1 Objetivo geral .....	13
1.2.2 Objetivos específicos.....	13
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
2.1 SETOR TEXTIL E IMPACTO AMBIENTAL .....	14
2.2 CORANTES TÊXTEIS.....	18
2.3 CORANTE VERDE DE MALAQUITA: IMPACTO NA SAÚDE HUMANA .....	20
2.4 TÉCNICAS E TRATAMENTOS DE EFLUENTES TÊXTEIS .....	23
2.4.1 Método físico .....	24
2.4.2 Método químico .....	25
2.4.3 Método biológico .....	27
2.5 FATORES FÍSICO-QUÍMICOS QUE AUXILIAM NA DESCOLORAÇÃO .....	28
2.6 DESCOLORAÇÃO DE CORANTES POR BACTÉRIAS .....	29
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
3.1 ÁREA DE ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DOS LOCAIS DE COLETA .....	34
3.2 PREPARO DO CORANTE TÊXTIL.....	36
3.3 COLETA, ISOLAMENTO E SELEÇÃO .....	36
3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA LACASE .....	36
3.5 OBTENÇÃO DO ESPECTRO DO CORANTE .....	37
3.6 EXPERIMENTOS DE DESCOLORAÇÃO .....	37
3.7 ENSAIO DA TOXICIDADE .....	38
3.7.1 Fitotoxicidade .....	38
3.7.2 Toxicidade microbiana.....	39
3.8 ANÁLISE FTIR .....	39
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>53</b>
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	53
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Após a descoberta do primeiro corante sintético, em 1856, vários outros corantes foram produzidos posteriormente. E o seu número, vem se aumentando constantemente, bem como o seu uso. Atualmente, a produção mundial de corantes sintéticos, é cerca de 1.000.000 toneladas por ano, e mais de 100.000 corantes sintéticos estão disponíveis comercialmente em mundo todo

Na indústria têxtil, o processo de lavagem, coloração, transferência de calor, aquecimento e resfriamento, e uso de compostos químicos para fins de fixar as cores nos tecidos, tornam-se esses efluentes, a maior causa de impacto ambiental da indústria têxtil. Sabemos que, para produção de 1 kg de tecido tingido, são necessárias, cerca de 150 L de água. Sendo que 88 % desse volume são descartados como efluentes líquidos “coloridos”. E o descarte incorreto desse efluentes, podem ser contaminantes dos recursos hídricos, levando assim um grande desequilíbrio ambiental.

Além disso, muitos desses corantes são altamente solúveis em água, apresentando uma baixa degradabilidade e um elevado efeitos tóxicos e genotípicos em organismos causando problemas alérgicos, dermatológicos e carcinogênicos. O corante verde de malaquita é um corante muito utilizado na indústria têxtil, como agente de tingimento; na indústria de pesca, devido a facilidade de tratamento de parasitas e fungos de peixes; na indústria farmacêutica; e até em alimentos. Porém, esse composto, mostrou ser altamente perigoso, devidos aos seus efeitos sobre o sistema imunológico e suas propriedades carcinogênicas.

Como não há um sistema geral no tratamento desses efluentes com alta coloração, há várias formas de tratamento. Porém, nenhuma é totalmente eficaz e algumas necessitam de associações de técnicas para melhorar a eficiência, tornando-se muitas vezes inviável por gerar alto custo. Dessa forma, muitos estudos tem se concentrado em aumentar a eficiência das tecnologias já existente, tornando os métodos mais sustentáveis. A descoloração e a degradação microbiana são técnicas ecologicamente correta e de custo competitivo em comparação aos métodos convencionais de tratamento, pois ele apresenta um potencial de converter os poluentes em água e dióxido de carbono, tornando se um método ecológico na remoção de cores de efluentes têxteis.

A degradação microbiana é a capacidade de catalisar bioquimicamente um composto em um ou mais metabolitos de menor peso molecular. E a descoloração microbiana é a conversão de um composto orgânico em estrutura molecular alterada, induzindo a perda de alguma propriedade característica da substância, podendo alterar sua toxicidade. A adsorção da biomassa microbiana também pode ser utilizada na remoção desses corantes, pois diversos organismos, absorvem esses compostos altamente tóxicos.

Vários estudos, relatam a utilização de diversos microrganismos, tais como as bactérias, os fungos, as leveduras, as microalgas e as cianobactérias. Outro caminho de maior destaque atualmente é a utilização das enzimas produzidas pelos mesmos microrganismos, tais como a lacase, tirosinase, manganês peroxidase e várias outras enzimas, podem ser utilizados nos tratamentos desses efluentes.

A bioprospecção é uma prática atual e de extrema importância, visando o isolamento de novos isolados adaptados ao ambiente e com potencial aplicação na biodegradação de corantes industriais.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

O tratamento biológico é ecologicamente correto e de custo competitivo em relação aos métodos convencionais de tratamento. Nos últimos anos, numerosos estudos se concentraram na bioprospecção de novos isolados bacterianos para a biorremediação de corantes têxteis em tratamento de efluente. A seleção desse microrganismo do ambiente, o experimento da descoloração em diversos parâmetros, a eficiência de descoloração dos tratamentos, a determinação da atividade da lacase, o teste da fitotoxicidade e toxicidade microbiana com o produto da descoloração, são etapas fundamentais para o estudo.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficiência de descoloração do corante verde de malaquita por isolados bacterianos, comparando a taxa de descoloração em diferentes concentrações, pHs e temperatura.

### 1.2.2 Objetivos específicos

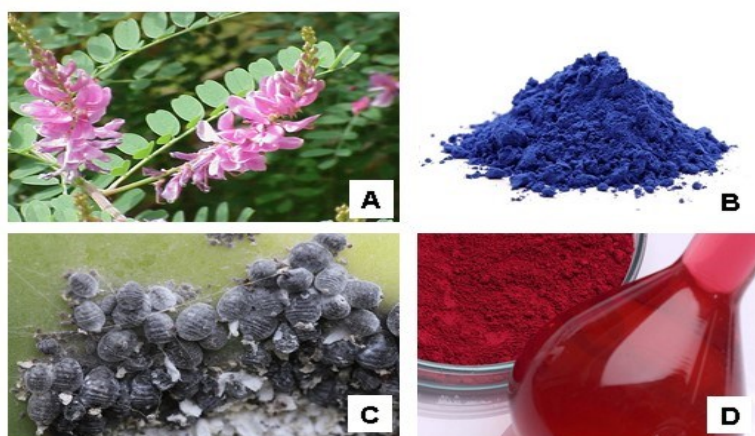
- Isolar a bactéria degradadora do corante verde de malaquita;
- Avaliar a eficiência de descoloração do corante, em diferentes concentrações, pHs e temperaturas;
- Avaliar o crescimento bacteriano em relação à descoloração do corante;
- Avaliar a fitotoxicidade e a toxicidade microbiana;
- Identificar os compostos moleculares pela espectrofotometria de UV-Vis e Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 SETOR TEXTIL E IMPACTO AMBIENTAL

A arte do tingimento iniciou nas primeiras civilizações antigas – na China, na Índia e no Egito. Registros pré-históricos relatam o uso dessa substância em cavernas e em demais objetos; além dos achados do antigo Egito (3.100 a.C. a 30 a.C.), descrevendo de forma completa, a extração desses corantes naturais e sua aplicação no tingimento. Esses corantes, eram obtidos por meio de fontes naturais, tais como as plantas, as raízes, as folhas, as flores, os frutos e os animais (FIGURA 1) (Ladchumananandasivam, 2008; Zanoni e Yamanaka, 2016).

FIGURA 1: Exemplos de corantes de origem natural.



FONTE: Compilação do autor<sup>1</sup> (2020).

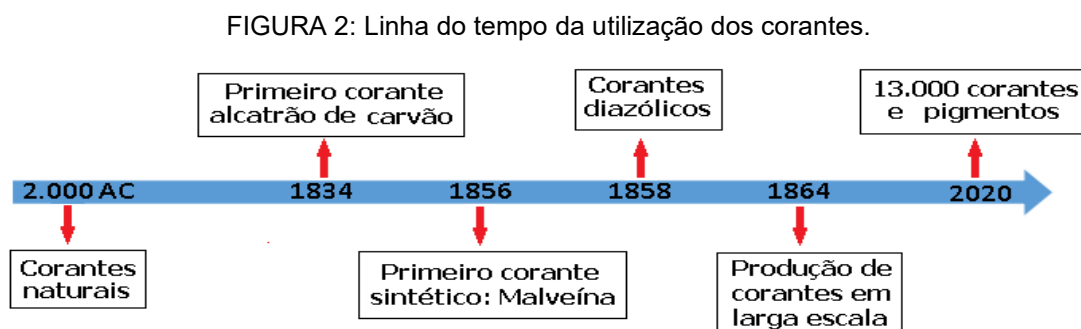
LEGENDA: Planta *Indigofera tinctoria* (A) de onde é extraído o corante índigo (B); O inseto *Dactylopius coccus* (C) dão origem a corante Vermelho carmim (D).

Esse tipo de tingimento, foi muito utilizado até a metade do século XVIII quando, em 1856, o químico britânico William Henry Perkin desenvolveu o primeiro corante sintético: a malveína. Essa substância foi formada a partir de quinina, pela oxidação da anilina, sendo capaz de tingir sedas e vários outros materiais, produzindo uma coloração violácea viva, resistente a luz solar e a lavagem (Ladchumananandasivam, 2008; Almeida et al, 2016; Zanoni e Yamanaka, 2016).

---

<sup>1</sup> Adaptado a partir das imagens coletadas no google.

A partir desse marco histórico, vários outros corantes foram fabricados; e o seu número vem aumentando constantemente, bem como seu uso (FIGURA 2). Atualmente, o Colour Index (publicação conjunta da Society of Dyers and Colourists (SDC) e da American Association of Textile Chemists and Colourist (AATCC) listaram mais de 13.000 corantes e pigmentos e 37.000 produtos catalogados pelos nomes comercial (Zanoni e Yamanaka, 2016; Colours Index, 2020).



FONTE: Adaptado de Zanoni e Yamanaka (2016); Câmara, (2017).

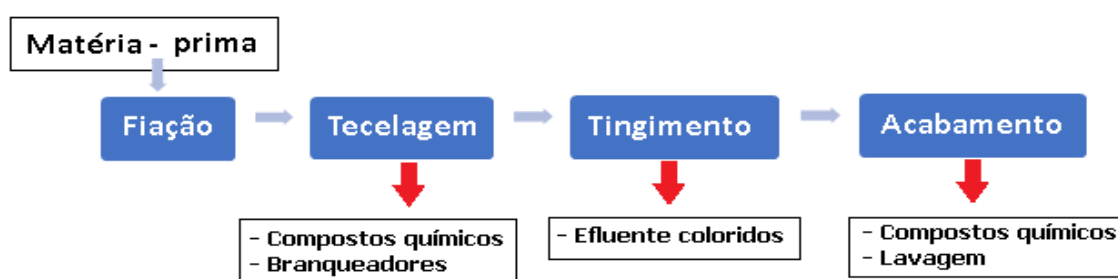
Atualmente, a china e a Índia são maiores produtores de corantes e fornecedores de tecido mundial. (Chemical Economics Handbook, 2018; Tkaczyk et al, 2020). A produção mundial de corantes sintéticos é de 1.000.000 toneladas por ano, e desse acredita-se que mais de 100.000 corantes sintéticos estejam disponíveis comercialmente em todo o mundo (Tkaczyk et al, 2020). Estes grupos de corantes é amplamente utilizados em várias indústrias tais como: a indústria têxtil, de curtimento, impressão e papel; alguns deles também encontraram aplicações nas indústrias farmacêutica e de cosméticos, bem como no processamento de alimentos e com aplicação na medicina humana e em veterinária (European Food Safety Authority, 2017; Tkaczyk et al, 2020).

A indústria têxtil brasileira apresenta uma grande importância sócio econômico na qual esse setor é o segundo maior empregador da indústria de transformação e o 5º maior produtor mundial de têxteis (Associação Brasileira da Indústria Têxtil, 2013; Almeida et al, 2016). Durante a produção têxtil, várias etapas são realizadas até a chegada do consumidor. Entre elas estão a fiação, tecelagem, beneficiamento, a confecção de vestiário entre outros (Tkaczyk et al, 2020).

Na cadeia da produção têxtil, as fibras dos tecidos são tingidas com corantes e diversos elementos são aplicados – como agentes fixadores, branqueadores e outros

compostos químicos – para fins de preservar a coloração dos tecidos tingidos (FIGURA 3). A etapa de tingimento é o principal veículo de contaminação, dela são descartados cerca de 80 % de efluentes “coloridos” durante esse processo. No final do processo, são gerados efluentes “coloridos”, os quais podem ser contaminantes dos recursos hídricos. Sabemos que, para produção de 1 kg de tecido tingido, são necessárias, cerca de 150 L de água; sendo que desse volume são descartados 88 % como efluentes líquidos e 12 % são perdidos por vaporização (Tkaczyk et al, 2020).

FIGURA 3: Cadeia da produção têxtil.



FONTE: Autoria própria (2020).

LEGENDA: As setas em vermelho representam o descarte dos efluentes e seus compostos.

Segundo Tkaczyk et al. (2020): “O maior impacto ambiental causado pela cadeia da produção têxtil se dá em função aos compostos químicos e corantes nos processos de lavagem, coloração, transferência de calor, aquecimento e resfriamento do efluente.”

Além disso, a estrutura química dos corantes – presença de anéis aromáticos, grupamento aminas, azos, grupos sulfônicos e íons metálicos – tornam-se uma molécula de difícil degradação, permanecendo no ambiente por um longo período de tempo (Almeida et al., 2016; Tkaczyk et al, 2020). E, por serem altamente solúvel em água – elevada quantidade de corantes e a presença de outros compostos aromáticos – tornam esse composto muito problemático em efluentes (Peixoto et al., 2013; Tkaczyk et al, 2020; Rathour et al., 2019).

Esse mesmo problema, foi observado por Yang et al. (2016), onde: “Os efluentes têxteis são geralmente caracterizados por alto teor de oxigênio químico (DQO), sólidos totais em suspensão, pH ácido ou alcalino e índice de cores muito alto, afetando consideravelmente a biota aquática.”

Além disso, esses corantes podem mostrar seus efeitos tóxicos e genotípicos nos organismos, incluindo efeitos cancerígenos, alérgicos e dermatológicos. Vários



estudos demonstraram que a ingestão destes corantes, reduz a fertilidade e leva a efeitos carcinogênicos e mutagênicos em seres humanos e em outros animais (Peixoto et al., 2013; Yang et al., 2016).

Diversos autores relatam problemas respiratórios e dermatológicos, após a exposição aos corantes têxteis, tais como dermatite de contato, reações alérgicas, rinite ou asma. Os efeitos tóxicos de alguns corantes têm sido registrados ao longo dos anos e os efeitos crônicos tornam-se visíveis, dependendo da exposição ao longo dos anos. (Khattab et al., 2019). A TABELA 1 apresenta alguns estudos realizados envolvendo aos efeitos toxicológico dos corantes; em animais e em alguns microrganismos.

TABELA 1: Alguns estudos relatando a toxicidade desses corantes.

Corantes	Resultado	Referencia
<b>Amaranto, Eritrosina e Tartrazina</b>	Potencial tóxico para os linfócitos humanos in vitro e ligação direta ao DNA.	Mpountoukas et al, 2010
<b>Verde de Malaquita</b>	Alterações nos genes de mRNA	Li et al, 2011
	Alterações das funções metabólicas mitocondriais, divisão celular anormal e desorganização do citoesqueleto.	Pierrard et al, 2012
	Efeitos genotoxicidade nos microrganismos (em fungos e bactérias)	Gopinathan et al. 2015
	Diminuição na estabilidade do ecossistema das comunidades microbianas do intestino.	Li et al, 2019
<b>Sudan II e Sudan IV</b>	Alteração do triptofano e tirosina, levando a alteração conformacional de proteína.	Li et al, 2017
<b>Sudan Vermelho G, Amarelo 7 e Laranja 13</b>	Efeito na gametogênese e embriogênese	Milani et al 2018
<b>Vermelho Congo</b>	edema do saco vitelino, deformidades esqueléticas e falta de batimentos cardíacos em embriões de peixe-zebra.	Hernández et al, 2019
<b>Tartrazina, Amarelo-sol, Amaranto e Vermelho Allura</b>	dificuldade de eclosão e anormalidades no desenvolvimento, como edema cardíaco, frequência cardíaca diminuída, edema do saco vitelino e defeitos da coluna, incluindo curvatura da coluna e distorção da cauda, em embriões de peixe-zebra.	Jiang et al. 2020

FONTE: autoria própria (2020).

## 2.2 CORANTES TÊXTEIS

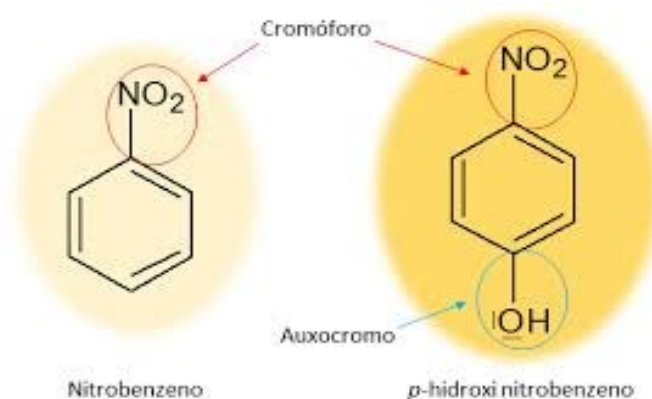
Segundo Zanoni e Yamanaka (2016): “Os corantes e pigmentos são substâncias químicas obtidas a partir de fontes naturais ou de maneira sintética, de origem orgânica ou inorgânica, e empregadas com o propósito de colorir substratos diversos”.

Esses termos, são frequentemente confundidos, já que há distinção clara entre os termos. O que diferenciam é o modo de aplicação nos substratos; os pigmentos, necessitam ser incorporados ao substrato por meio de um composto adicional, como por exemplo, em tintas ou em plásticos. Já os corantes, podem ser diretamente aplicados em vários substratos, como tecidos, couro, papéis, cabelos, entre outros (Zanoni e Yamanaka, 2016).

Os corantes apresentam duas regiões principais: região cromóforo, é responsável por transmitir a cor das moléculas dos corantes. Essa região é caracterizada pelo deslocamento do sistema eletrônico de dupla ligação conjugadas e são formados principalmente pela ligação: C=C, C=N, C=O, N=N,  $-\text{NO}_2$  e anéis quinoides (Shah, 2014).

Já a região auxocromo, eles intensificam a cor do cromóforo, alterando assim, a energia total do sistema de elétrons. Essa região constitui os substituintes que retiram elétrons ou doadores de elétrons e são formados principalmente pela ligação:  $-\text{NH}_3$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$  e  $-\text{OH}$  (Shah, 2014). Na FIGURA 4 está apresentada estas regiões (cromóforos e auxocromos), em dois exemplos: o Nitrobenzeno e o Hidroxinitrobenzeno. Observe-se os elementos de ligação e a região de ligação.

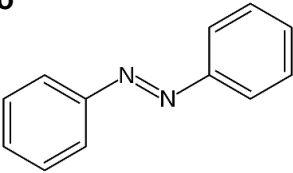
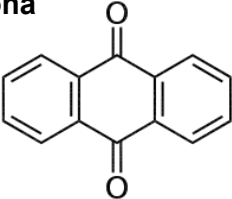
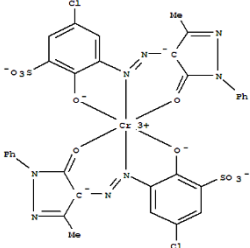
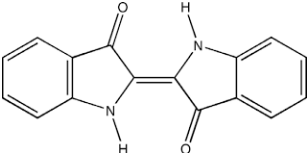
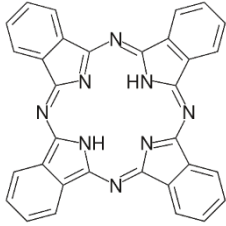
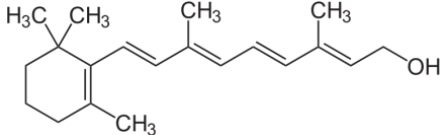
FIGURA 4: Representação esquemática das regiões cromóforos e auxicromos.

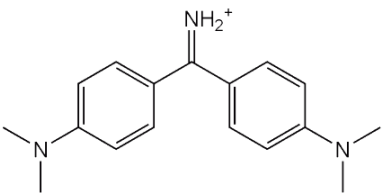
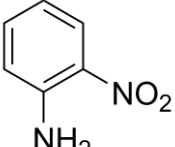
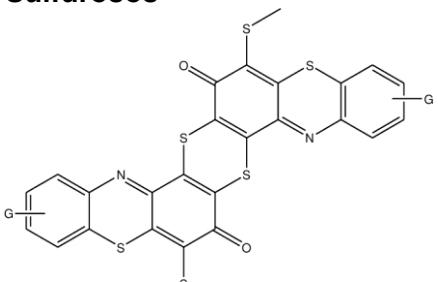


FONTE: Rodrigues, 2018.

Os corantes podem ser classificados em diversos aspectos, tais como a estrutura molecular do corante, as classes químicas, a sua aplicação, a sua origem e entre outros (Veloso, 2012; Shah, 2014). As classes mais relevantes são (TABELA 2): corantes azo, antraquinona, metalizado, indigoide, ftalocianinas, metina e polimetinas, di- e tri- rilmetanos, nitro e nitrosos e sulfurosos (Zanoni e Yamanaka, 2016).

TABELA 2: Principais classes de corantes.

Classe de corantes	Característica
<b>Azo</b> 	Substâncias químicas que contém o grupamento ( $-N=N-$ ) como cromóforo. Os grupamentos azo estão principalmente ligados ao anel de benzeno ou naftaleno, mas podem estar ligados também a grupos aromáticos heterocíclicos ou grupos alifáticos.
<b>Antraquinona</b> 	A estrutura de ressonância no anel aromático e nos grupos carbonílicos, confere a característica do cromóforo.
<b>Metalizados</b> 	Alguns corantes apresentam-se na forma de complexos metálicos, como compostos de coordenação. Nesse caso, o átomo de cobre, cromo e cobalto colabora em maior proporção na geração dessas espécies, mas níquel, ferro, alumínio e titânio também podem ser empregados.
<b>Indigoide</b> 	A estrutura conjugada cruzada básica do cromóforo, apresenta dois grupos doadores de elétrons (NH) e dois grupos de receptores de elétrons (C=O) ligados ao anel benzênico.
<b>Ftalocianinas</b> 	Compostos de coordenação macrocíclicos, altamente conjugados, constituídos por quatro anéis isoindóis. Cada um desses anéis é formado pela fusão de um anel benzênico com um anel pirrol.
<b>Metina e polimetinas</b> 	Essa classe de corantes é caracterizada pela cadeia de grupos metina ( $-CH=$ ) em um sistema conjugado de dupla ligação, que normalmente se encontra na configuração trans.

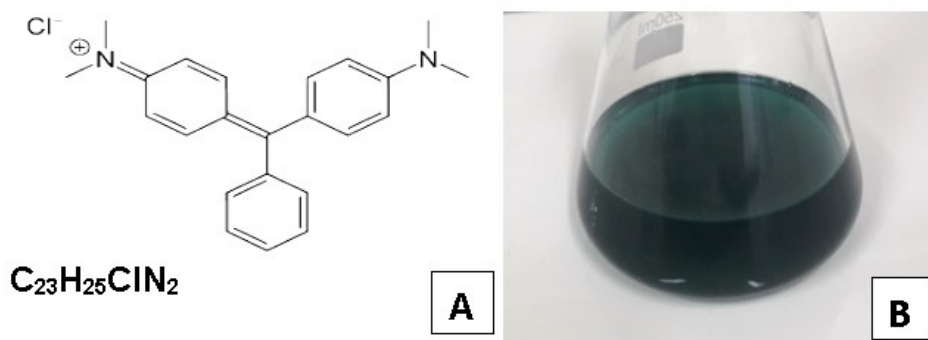
<p><b>Di- e Tri- arilmetanos</b></p> 	<p>Os corantes diarilmetinas, os ramos são criados por dois anéis arila, entre os quais a cadeia de polimetina e incorporada, e a terceira ramificação e um átomo de hidrogênio. Se o hidrogênio é substituído por um grupo arila residual, forma-se então um corante triarilmetina.</p>
<p><b>Nitro e Nitrosos</b></p> 	<p>O arranjo estrutural básico que compõe o cromóforo é um grupo nitro na posição orto com relação a um grupo doador de elétrons, no caso um grupo amino.</p>
<p><b>Sulfurosos</b></p> 	<p>Estes corantes constem de estruturas macromoleculares de tiazol e são sintetizados pelo aquecimento de compostos aromáticos ou heterocíclicos como aminas, fenóis ou nitro compostos como enxofre ou mais comumente com polissulfetos de metais alcalinos.</p>

FONTE: Veloso (2012); Almeida et al (2016); Zanoni e Yamanaka (2016).

### 2.3 CORANTE VERDE DE MALAQUITA: IMPACTO NA SAÚDE HUMANA

O verde de malaquita (C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O, C.I. 42.000) é um corante trifenilmetano, formado pela polimerização uma molécula de benzaldeído (um anel de benzeno com um grupo aldeído -COH) e duas moléculas de dimetilaniлина na presença de ácido sulfúrico concentrado ou cloreto de zinco. O corante está disponível em várias formas, principalmente como o oxalato ou em sal cloridrato em uma solução de 50 % (uma mistura de acetato e sais de cloridrato). A sua coloração é verde escura em estado sólido e líquido (FIGURA 5) (Srivastava et al., 2004; Xu et al, 2020).

FIGURA 5: Fórmula estrutural do corante e a coloração.



FONTE: Compilação do autor<sup>1</sup> (2020).

LEGENDA: Em (A) Fórmula estrutural do corante; e (B) Aspecto do corante em solução aquosa.

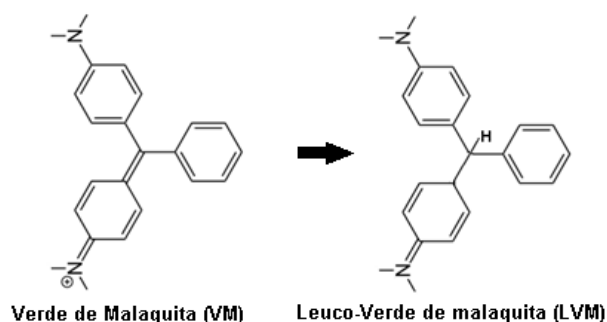
Originalmente, o verde de malaquita foi utilizado como agente de tingimento na indústria têxtil, principalmente nas indústrias de seda, lã, juta, papel e acrílico. Porém, esse corante, tem sido muito utilizado na indústria de pesca, como ectoparasiticida, fungicida, bactericida; na indústria alimentícia, como corante alimentício e aditivo alimentar; e também como desinfetante médico (Srivastava et al., 2004; Yang et al., 2016; Xu et al., 2020).

No entanto, o corante verde de malaquita se tornou um composto problemático, devido aos seus efeitos sobre o sistema imunológico e suas propriedades carcinogênicas (Maleki et al., 2012). Nas concentrações de 0,1 mg.L<sup>-1</sup> esse corante apresenta uma toxicidade classificada como subagudas, sendo que na concentração de 0,05 g.L<sup>-1</sup>, o verde de malaquita causam diminuições nos níveis séricos de cálcio e proteína, nos pescadores após apenas uma exposição de curto prazo (10-20 dias) (Du et al., 2011).

Srivastava et al. (2004) relataram os efeitos toxicológico do uso de verde de malaquita, pois este pode ser metabolizado e reduzido na forma leuco-verde de malaquita (LVM) através da via processo redox (FIGURA 6). O LVM é absorvido nos tecidos dos animais, acumulando em vários órgãos e vísceras por um longo período (Shukla, 2020).

<sup>1</sup> Adaptado a partir das imagens coletadas no google.

FIGURA 6: Transformação do Verde de malaquita em forma Leuco.



FONTE: Compilação do autor<sup>1</sup> (2020).

O verde de malaquita pode também causar alterações genotóxicas e carcinogênicas, devido ao potencial intercalante na molécula de DNA, causando aberrações cromossômicas e geração de radicais livres. Dentre as alterações carcinogênicas inclui tumores no sistema hepático, renal, tireóide, pulmonar e gônadas (Shukla, 2020). Stamatii et al. (2005) concluíram que o verde malaquita pode inibir a atividade da glutathione S-transferase humana e induzir tumor.

O Food and Drug Administration (FDA) dos Estados unidos e da Europa proibiram o uso de Verde de malaquita na indústria de alimentos e na aquicultura. Porém devido a facilidade de síntese, baixo custo e amplo distribuição comercial, o verde de malaquita ainda é utilizado e vendido no mundo todo (Shukla, 2020).

A Rapid Alert Reports for Food and Feed (RASFF), da União europeia, relataram que em 2017, houve uma detecção do corante Verde de malaquita em muitas espécies de peixes em mundo todo, indicando assim que esse produto químico ainda é utilizado pelos aquicultores (Kwan, 2019).

Apesar da alerta do RASFF, o verde de malaquita e seus resíduos metabólicos foram encontrados em peixes e outros componentes associados (Dubreil et al, 2019). Mitrowska et al. (2007) relataram que os métodos de cocção a elevadas temperaturas não garantem a degradação completa dos resíduos de verde de malaquita nos alimentos. Devido a possibilidade de resíduos do corante verde de malaquita ser disseminado pela cadeia alimentar, ameaçando consideravelmente a saúde humana, é crucial o desenvolvimento de métodos para a degradação do verde da malaquita (Mitrowska et al, 2007; Shukla, 2020).

<sup>1</sup> Adaptado a partir das imagens coletadas no google.

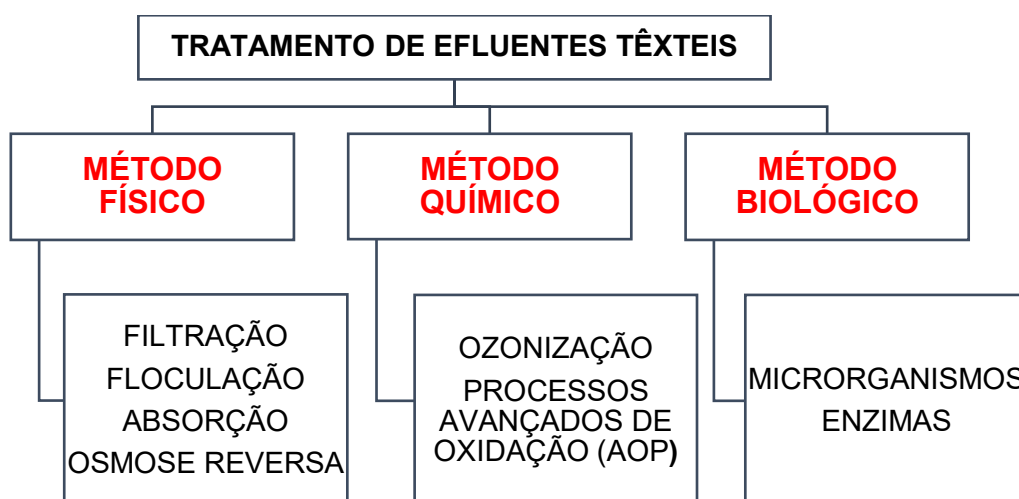
## 2.4 TÉCNICAS E TRATAMENTOS DE EFLUENTES TÊXTEIS

A Resolução Conama nº 001, publicado em 1986, conceitua o impacto ambiental como “qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente, causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas, afetando a saúde da população, a biota e a qualidade dos recursos naturais” (Brasil, 1986).

Diversas resoluções foram aprovadas, em especial a Resolução Conama nº 357, que estabelece as condições e padrões para lançamento de efluentes industriais, inclusive quanto ao potencial para provocar efeitos tóxicos no corpo receptor (Brasil, 2005). De modo geral, não há sistema de tratamento para efluentes com alta coloração. mas, existe vários tipos de tratamento, mas nenhuma é totalmente eficaz e algumas necessitam de associações de técnicas para melhorar a eficiência, tornando-se muitas vezes inviável por gerar alto custo (Almeida et al., 2016).

Dessa forma, muitos estudos tem se concentrado no aumento da eficiência das tecnologias já existente, tornando os métodos mais sustentáveis (Almeida et al., 2016). A FIGURA 7 mostra as principais técnicas mais utilizados no tratamento desses efluentes, logo abaixo, uma descrição completa desse método de tratamento e as técnicas utilizados.

FIGURA 7: Métodos utilizados nos tratamentos de efluentes têxteis.



FONTE: Adaptado de Jamee et al (2019).

### 2.4.1 Método físico

A coagulação foi considerada um dos únicos métodos aplicados na remoção de cores e no tratamento de efluentes têxteis, hoje, podemos utilizar várias outras técnicas na remoção de cores do efluente têxteis. O tratamento físico baseia-se no princípio de coagulação e flotação, os quais removem partículas coloidais de cor, turbidez e bactérias. Também podem ser aplicados, as membranas filtrantes, para auxiliar na remoção dessas partículas coloidais (Zanoni e Yamanaka, 2016).

Coagulantes, como  $Fe_3$  ou  $Al_3$ , são adicionados em concentração suficiente para a formação de precipitados de hidróxidos desses metais. A partícula coloidal fica envolvido no precipitado e acomoda-se junto com o mesmo. Podemos também combinar vários outros coagulantes, fazendo com que aumente a eficiência da remoção desses corantes. Porém essa técnica não é capaz de tratar todos os tipos de corantes, pois os corantes catiônicos, não coagulam facilmente (Zanoni e Yamanaka, 2016).

A coagulação/floculação apresenta-se uma grande desvantagem pois gera quantidades de lodo tóxico, na qual gera novos problemas de manuseio e no tratamento desse resíduo. Pelo fato de corantes sintéticos não serem removidos por métodos tradicionais, alguns métodos físico econômicos estão sendo estudados. (Holkar, 2016; Zanoni e Yamanaka, 2016; Collivignarelli et al, 2019).

Desses métodos econômicos, destacam-se duas técnicas:

#### a) Técnica de Adsorção:

A técnica de adsorção, tornaram-se essa técnica bem popular no tratamento desses poluentes coloridos. A remoção de cores se baseia em dois mecanismos: a adsorção e a troca iônica. Para isso, diversos fatores físico-químicos, influenciam na eficiência de remoção desses corantes. Tais como a interação corante/adsorvente, área de superfície do adsorvente, tamanho da partícula, temperatura, pH e tempo de contato (Zanoni e Yamanaka, 2016; Collivignarelli et al., 2019).

Os materiais que apresentam propriedades adsorventes, como carvão ativado, turfa, argila bentonita, resinas poliméricas, ou até materiais bióticos como bagaço de milho, resíduo de trigo, casca de amendoim, pedras de tâmara, e entre outros, são



utilizados no tratamento desses efluentes têxteis (Holkar, 2016; Zanoni e Yamanaka, 2016)

b) Técnica de Filtragem por membranas:

A filtração por membranas é uma tecnologia extensivamente utilizada em indústria, na qual há concentração, purificação e o aumento da qualidade do produto final dessas indústrias. Essa técnica pode ser dividida em quatro categorias: osmose reversa, nano filtração, ultra filtração e micro filtração (Zanoni e Yamanaka, 2016; Tkaczyk et al, 2020).

Na indústria têxtil, a aplicação das membranas filtrantes oferece um potencial para a reciclagem de corantes reativos hidrolisados e auxiliares usados durante o tingimento. Porém, essa técnica apresentam uma grande desvantagem tais como o custo de investimento inicial, possível incrustação de membranas e a geração de outros resíduos contendo corantes insolúveis em água (Holkar, 2016; Zanoni e Yamanaka, 2016; Tkaczyk et al, 2020).

#### 2.4.2 Método químico

O processo oxidativos são os mais utilizados na descoloração de corantes, por via química, devido a sua simplicidade de aplicação. Os principais agentes oxidantes são: peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), Hipoclorito de sódio ( $NaClO$ ) e ozônio ( $O_3$ ). Esses processos apresentam capacidade de degradar a substância tóxica inicial e seus subprodutos químicos, corantes, pesticidas – de forma parcial ou completamente em condições ambientais (Holkar, 2016; Zanoni e Yamanaka, 2016).

A oxidação química baseia-se no uso de agentes oxidantes como o ozônio ( $O_3$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Ambas as substâncias, são utilizados para oxidação direta de contaminantes, pois apresentam um alto poder oxidante; e também podem ser aplicados em conjunto a outros sistemas para geração de radicais hidroxila, que tornam mais poderosos oxidantes. Essas substâncias podem efetivamente quebrar as ligações duplas conjugadas dos cromóforos de corante, bem como outros grupos funcionais e assim diminui a cor dos efluentes (Holkar, 2016; Zanoni e Yamanaka, 2016; Collivignarelli et al., 2019).

Os processos oxidativos tem se destacado atualmente, por apresentar alto potencial oxidante dos radicais hidroxila (OH), capazes de oxidar completamente a maioria dos contaminantes orgânicos e convertendo em água, CO<sub>2</sub> e íons inorgânicos (Holkar, 2016; Zaroni e Yamanaka, 2016; Collivignarelli et al., 2019).

Os principais processos oxidativos avançados mais comuns são:

a) Oxidação fotocatalítica:

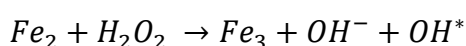
A oxidação fotocatalítica baseia no uso de um material semicondutor – muitas vezes é utilizado o TiO<sub>2</sub> – na qual, sob irradiação UV é capaz de gerar radicais \*OH. Quando um fóton incide sobre a superfície de um semicondutor, estimula a formação de um par de elétrons. Outro ponto interessante é a possibilidade de utilizar a luz solar para ativação do semicondutor, porém muitos estudos ainda devem ser realizados na possibilidade desse uso (Zaroni e Yamanaka, 2016; Collivignarelli et al., 2019).

Atualmente, tem se utilizado combinações dos processos fotocatalíticos e eletroquímico, no intuito de retardar os efeitos indesejados da recombinação. A técnica fotoeletrocatalise é baseada no uso de um fotocatalizador e a ativação UV. Porém, a desvantagem dessa técnica fotoeletrocatalica é a necessidade de transferência de massa até o fotoânodo (TiO<sub>2</sub>), um reator um pouco mais complexo e a utilização da lâmpada de UV (Zaroni e Yamanaka, 2016).

b) Reação de Fenton:

A reação de Fenton e foto-Feton, baseia-se na reação entre espécies de ferro (Fe<sup>3+</sup>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), com ou sem a presença de irradiação UV. Essa técnica foi desenvolvida em 1894, pelo químico britânico, Henry John Horstman Fenton. O poder oxidativo dessa técnica foi atribuído aos radicais hidroxila (\*OH), gerado na decomposição catalítica do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em meio ácido, e por conta disso passou a ser chamado de reação de Fenton (EQUAÇÃO 1) (Zaroni e Yamanaka, 2016; Collivignarelli et al., 2019).

EQUAÇÃO 1



No entanto, a sua aplicação em contaminantes orgânicos só foram iniciados após quase um século, pois muitos estudos envolvendo o seu poder de oxidação estavam sendo observados. O uso de concentrações adequadas de espécies de ferro e de peróxido de hidrogênio é fundamental para obtenção da máxima eficiência de degradação. Inclusivamente, a velocidade de degradação de contaminantes podem ser fortemente aumentadas pela incidência de irradiação UV e até mesmo o visível (UV-Vis) (Zanoni e Yamanaka, 2016).

Outra forma de tratamento utilizando a reação de Fenton se consiste na utilização de um catalisador sólido contendo ferro - como a goetita, a magnetita, a hematita e o óxido de ferro - na presença de  $H_2O_2$ . Alguns pesquisadores sugerem a utilização do catalisador em solução aquosa com a participação do ferro dissolvido (Zanoni e Yamanaka, 2016).

#### 2.4.3 Método biológico

O método biológico, em comparação entre os métodos físicos e químicos, geralmente são considerados melhores alternativas na remoção de corantes sintéticos - por apresentarem menor custo de tratamentos, alta eficiência e gerar menos poluição secundárias - pois, consiste em remover, as matérias orgânicas dissolvida no efluente têxtil (Almeida et al., 2016; Zanoni e Yamanaka, 2016; Jamee, 2019).

A descoloração microbiana pode ocorrer de dois modos: a bioadsorção, na qual utilizam biomassas microbianas - como as bactérias, os fungos, as leveduras e as biomassas - capazes de biodegradar e bioadsorver corantes; a degradação enzimática, oriunda desses microrganismos; ou pela combinação das duas. A eficiência da descoloração do corante depende das características dos corantes, características físico-químicas do efluentes, a adaptabilidade dos microrganismos selecionados e da atividade das enzimas (Holkar, 2016; Zanoni e Yamanaka, 2016; Jamee, 2019).

Uma grande variedade de organismos como bactérias, fungos, leveduras, plantas e algas são capazes de degradar uma grande variedade de corantes presentes nas águas residuais têxteis. O uso de bactérias pode ser trabalhado de duas formas: o uso de culturas puras, onde somente uma espécie é estudada; e a cultura consórcio, onde se utiliza duas ou mais espécies (Holkar, 2016; Jamee, 2019). (Jamee, 2019).

Outra técnica de biodegradação oxidativa, se baseia na utilização de enzimas, como manganês peroxidase, lacase, lignina peroxidase, NADH-DCIP redutase e tirosinase. Tais oxidases podem ser encontradas em bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Holkar, 2016; Zaroni e Yamanaka, 2016; Jamee, 2019). Os tratamentos biológicos apresentam grande interesse por apresentarem soluções de custos mais acessíveis. Vários estudos estão sendo realizados para melhorar a eficiência na descoloração de corantes.

## 2.5 FATORES FÍSICO-QUÍMICOS QUE AUXILIAM NA DESCOLORAÇÃO

A biodegradação de corantes sintéticos e outros produtos químicos do efluentes têxtil é altamente influenciada por alterações em diferentes parâmetros - físicos, químicos e biológicos além de alguns outros fatores ambientais (Jamee, 2019; Pande et al, 2019). Assim, para a obtenção da eficiência máxima da degradação dos corantes, é necessário conhecer alguns fatores de crescimento e a descoloração do sistema. A TABELA 3 mostra os principais fatores que contribui no desempenho da descoloração de corantes sintéticos.

TABELA 3: Fatores que interferem na descoloração dos corantes.

<b>Fatores</b>	<b>Descrição</b>
<b>Estrutura de corante</b>	Corantes que apresentam estruturas mais simples e de baixo peso moleculares são degradados em alta eficiência em comparação com estruturas mais complexas e maior peso molecular.
<b>Concentração de corante</b>	Quando mais concentrado o corante menor a taxa de descoloração. Isso pode ser devido ao efeito tóxico dos corantes nos microrganismos.
<b>Fontes de carbono e nitrogênio.</b>	A maioria dos microrganismos geralmente não utilizam o carbono e/ou nitrogênio dos corantes. Algumas culturas bacterianas requerem uma fonte de carboidratos ou fontes orgânicas complexas, como extrato de levedura, peptona ou uma combinação de ambos para a decomposição.
<b>pH do meio</b>	A taxa de descoloração é maior no pH entre 6,0 a 10,0. Os processos industriais têxteis ocorrem principalmente em condições alcalinas (entre 5,0 - 6,0); assim, a tolerância ao pH alto é particularmente importante para a sobrevivência e o desenvolvimento do microrganismo.

<b>Temperatura</b>	Temperaturas muito altas podem desnaturar enzimas importantes e com isso, diminui ainda mais a degradação dos corantes
<b>Oxigênio dissolvido</b>	Diferentes grupos de bactérias estão envolvidos na descoloração dos corantes sob condições anaeróbias, facultativas anaeróbias e aeróbicas. A presença ou ausência de oxigênio afeta muito na biodegradação desses corantes.

FONTE: Holkar et al., 2016; Jamee, 2019; Pande et al 2019.

## 2.6 DESCOLORAÇÃO DE CORANTES POR BACTÉRIAS

A descoloração e a degradação microbiana são técnicas ecologicamente correta e de custo competitivo em comparação com os métodos convencionais de tratamento físico-químico. Os processos biológicos possuem o potencial de converter os poluentes em água e dióxido de carbono, ou seja, é o método mais adequado para a remoção de cores de efluentes têxteis. (Parmar e Shukla, 2018).

O que diferenciam entre degradação microbiana e a descoloração microbiana é a maneira que os metabolitos são alterados. A degradação microbiana é a capacidade de catalisar bioquimicamente um composto em um ou mais metabolitos de menor peso molecular. E a descoloração microbiana é a conversão de um composto orgânico em estrutura molecular alterada, induzindo a perda de alguma propriedade característica da substância, podendo alterar sua toxicidade.

Desde a década de 1970, diversos estudos utilizando bactérias potenciais na remediação dos efluentes têxteis foram estudados, entre elas estão: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e *Aeromonas hydrophila* (Jamee, 2019). E o descarte desses efluentes coloridos contribui para um aumento da toxicidade, redução da penetração da luz e uma redução da concentração do oxigênio dissolvido nesse efluente, o que tornam um ambiente anóxica e toxico a maioria dos organismos (Wanyonyi et al, 2017; Jamee, 2019)

A eficiência do processo de biodegradação depende da adaptação dos microrganismos selecionados. A dificuldade na remoção desses poluentes encontra-se no isolamento de microrganismos, período de adaptação e a capacidade de descolorir diversas estruturas (Forgiarini, 2006; Vasconcelos, 2010).

Sabendo que o verde de malaquita é frequentemente utilizado no tingimento de tecidos da indústria têxtil e no tratamento parasitários da indústria de pesca, o corante, também contribuem em um sério problema ambiental e na saúde daqueles que é exposto a esse composto, causando câncer e outros agentes teratogênicos (Gan et al. 2018).

Kwan et al. (2019), estudaram os efeitos do verde de malaquita e seus resíduos metabólicos, leuco-verde de malaquita, em tilápia vermelha. A Tilápia vermelha é um peixe muito consumido na Ásia e no Oceano Pacífico ocidental (Ásia Oriental, Sul da Ásia, sudeste da Ásia e Oceania). Apesar da alta adaptabilidade do peixe em sobreviver em amplas condições ambientais, poucos trabalhos envolvendo a exposição do peixe em concentrações subagudas e sub letais de verde de malaquita foram realizados.

Em seus estudos, os peixes expostos a concentrações subagudas (de 0,105 mg.L<sup>-1</sup>) apresentaram uma maior catalase no fígado e no baço; enquanto nas concentrações sub letais (de 0,053 mg.L<sup>-1</sup>) apresentaram altos níveis de glutathione reduzida nos rins e no baço. Já a quantidade de verde de malaquita e do leuco-verde de malaquita em músculo dos peixes, a quantidade acumulada desses compostos chegaram de 108,04 µg.kg<sup>-1</sup> (para o sub agudo) e de 80,68 µg.kg<sup>-1</sup> (para o sub letal) (Kwan et al. 2019).

A presença do leuco-verde de malaquita no músculo dos peixes vem da transformação metabólica do verde de malaquita em uma forma derivado leuco, por via redox. Os peixes expostos ao verde de malaquita revelam que após o corante ser absorção nos tecidos desses animais, esses compostos podem persistir nos tecidos e em vários órgãos e vísceras, por longos períodos de tempo, causando bioacumulação no ecossistema (Tao et al, 2017; Ray et al, 2018; Shukla, 2020)

Além disso, a forma leuco, se assemelha estruturalmente às aminas aromáticas clássicos, por conta disso apresenta uma alta afinidade nas regiões genicas, levando uma mutação genica (Ray et al, 2018). E a complexidade estrutural do corante, torna-se esse composto difíceis de degradar. Entre os métodos físicos, químicos e biológicos que são aplicados para os tratamentos desses efluentes “coloridos”. A biorremediação, é considerado a abordagem mais promissora na remoção de contaminantes, utilizando organismos vivos (Tao et al, 2017; Shang et al, 2019).

A TABELA 4 demonstra os principais trabalhos realizados envolvendo a degradação do verde de malaquita pelas bactérias, no período de 10 anos (2010-2020).

TABELA 4: Trabalhos envolvendo a degradação do verde de malaquita.

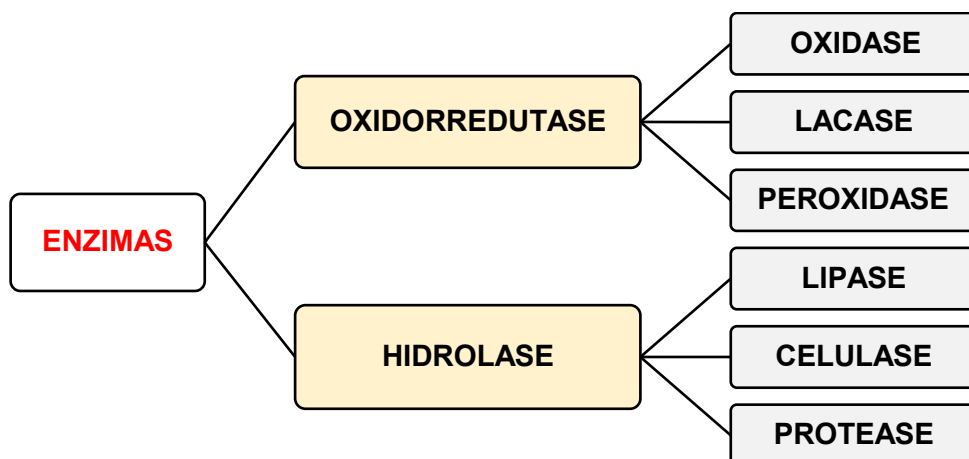
Referencias	Microrganismo	Eficiência
Chen et al., 2010	<i>Shewanella decolorationis</i>	Eficiência de 66.1 % em 100 mg.L <sup>-1</sup> e 12 h de tratamento
Fang et al., 2010	<i>Arthrobacter sp.</i>	Eficiência de 80 % em 20 mg.L <sup>-1</sup> e 12 h de tratamento
Du et al., 2011	<i>Pseudomonas sp.</i>	Eficiência de 97.2 % em 100 mg.L <sup>-1</sup> e 24 h de tratamento
Wang et al., 2011	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Eficiência de 86 % em 2.000 mg.L <sup>-1</sup> e 1 h de tratamento
Wang et al., 2012	<i>Exiguobacterium sp.</i>	Eficiência de 93.5 % em 2500 mg.L <sup>-1</sup> e 2 h de tratamento
Du et al., 2012	<i>Micrococcus sp.</i>	Eficiência de 96.9 % em 100 mg.L <sup>-1</sup> e 1 h de tratamento
Lv et al., 2013	<i>Deinococcus radiodurans</i>	Eficiência de 97.2 % em 50 mg.L <sup>-1</sup> e 30 min. de tratamento
Vijayalakshmi, 2014	<i>Ochrobactrum sp.</i>	Eficiência de 96.2 % em 50 mg.L <sup>-1</sup> e 48 h de tratamento
Tao et al., 2017	<i>Pseudomonas sp.</i>	Eficiência de 90.4 % em 1500 mg.L <sup>-1</sup> e 24 h de tratamento
Wanyonyi et al., 2017	<i>Bacillus cereus</i>	Eficiência de 98 % em 9,3 mg.L <sup>-1</sup> e 12 h de tratamento
Gan et al., 2018	<i>Burkholderia cepacia</i>	Eficiência de 94.8 % em 60 mg.L <sup>-1</sup> e 6 h de tratamento
Qu et al., 2018	<i>Tenacibaculum sp.</i>	Eficiência de 98.8 % em 20 mg.L <sup>-1</sup> e 2 h de tratamento
Farha et al., 2018	<i>Bacillus vietnamensis</i> <i>Planococcus maritimus</i> <i>Bacillus pumilus</i>	Eficiência de 74,6 % em 24 h Eficiência de 73 % em 24 h Eficiência de 72,8 % em 24 h
Sutar et al., 2019	<i>Photobacterium leiognathi</i>	Eficiência de 92.5 % em 1.0 g.L <sup>-1</sup> e 24 h de tratamento
Shang et al., 2019	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Eficiência de 99 % em 100 mg.L <sup>-1</sup> e 8 h de tratamento
Nath et al., 2019	<i>Bacillus cereus</i>	Eficiência de 96 % em 50 mg.L <sup>-1</sup> e 48 h de tratamento
Han et al., 2020	<i>Synechococcus elongatus</i>	Eficiência de 99.5 % em 100 mg.L <sup>-1</sup> e 12 h de tratamento
Xu et al., 2020	<i>Escherichia coli</i>	Eficiência de 60 % em 500 mg.L <sup>-1</sup> e 5 h de tratamento
Song et al., 2020	<i>Pseudomonas veronii</i>	Eficiência de 93.5 % em 50 mg.L <sup>-1</sup> e 7 dias

FONTE: Autoria própria (2020).

Nessas últimas décadas, tem se estudados diferentes mecanismos tem sido proposto para bactérias degradadoras do verde de malaquita. Um exemplo disso foi o trabalho de Shang et al. (2019), onde a ação da enzima, Trifenilmetano Reductase (TMR) foi a principal enzima estudada. Essa enzima recém descoberta tem a função de degradar especificamente os corantes de trifenilmetano e seus derivados. Mas, ainda não se sabe quais os mecanismos de ação, a enzima atua.

Diversos trabalhos apontam outras enzimas na degradação dos corantes têxteis, em destaque está a lacase, a tirosinase e o manganês peroxidase. A chave para a degradação desses compostos, envolve em 2 principais classes de enzimas: a oxidoreduções e a hidrolases (FIGURA 8) (Shang et al, 2019; Pande et al. 2019). A TABELA 5, mostra essas principais enzimas, a natureza do poluente e seus mecanismos de ação.

FIGURA 8: Enzimas e suas classes.



FONTE: Adaptado de Pande et al. (2019).

TABELA 5: Enzimas, natureza do poluente e mecanismo de ação.

	<b>Enzimas</b>	<b>Natureza do poluente</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
	<b>Oxidoredução</b>		
<b>Oxigenase</b>	Mono-oxigenase	Alcano, compostos aromáticos, esteroides, e ácido graxo	Adição do átomo de oxigênio ao substrato e utilização do substrato como agente oxidante.
	Di-oxigenase	Compostos aromáticos	A incorporação de dois átomos de oxigênio ao substrato resulta em clivagem intradiol e extradiol com geração de produto alifático



<b>Lacase</b>	Lacase	Orto e Para difenóis, aminofenóis, polifenóis, arildiaminas, ligninas e poliaminas	Oxidação, descarboxilação e desmetilação do substrato
<b>Peroxidase</b>	Manganês peroxidase	Lignina e outros compostos fenólicos	O co-substrato catalisa a oxidação de $Mn^{2+}$ a $Mn^{3+}$ na presença de $Mn^{2+}$ e $H_2O_2$ , resultando em um oxalato quelato de $Mn^{3+}$ , que oxida ainda mais os substratos fenólicos
	Lignina peroxidase	Compostos policíclicos aromáticos, compostos fenólicos halogenados e outros compostos aromáticos	Na presença de co-substrato $H_2O_2$ e um mediador como o álcool veratrílico, a oxidação do substrato
	Outras Peroxidase	Compostos fenólicos aromáticos e metoxibenzenos	A enzima catalisa a transferência de elétrons do substrato oxidável, resultando na produção e redução dos intermediários do composto I e do composto II
<b>Hidrolase</b>			
<b>Lipase</b>	Lipase	Poluentes orgânicos, como derramamentos de óleo	Hidrólise de triacilgliceróis em gliceróis e ácidos graxos livres
<b>Celulas</b>	Celulase	Compostos celulósicos	Hidrolisa o substrato em carboidratos simples
<b>Protea</b>	Protease	Proteínas	Hidrolisa ligações peptídicas em ambientes aquosos

FONTE: adaptado de Pande et al. (2019).

Sendo assim, a aplicação da biotecnologia, nas soluções de problemas ambientais, tem se mostrado resultados positivos na remoção da cor em períodos curtos de tempo. A utilização desses microrganismos na degradação desses compostos xenobioticos, desempenha-se papéis cruciais na mineralização desses componentes. A degradação microbiana é uma técnica ecologicamente correta e economicamente viáveis em relação os métodos convencionais de tratamento (Franciscon, 2010; Shah, 2014; Parmar e Shukla 2018).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ÁREA DE ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DOS LOCAIS DE COLETA

Os microrganismos a serem avaliados neste estudo foram isolados de corpos d'água do município de Assaí (23°22'22" S 50°50'27" O), norte do estado do Paraná. Foram coletadas amostras de 3 pontos distintos (FIGURA 9), destacados em vermelho, e o que apresentaram muito despejo incorreto de lixo ou canalizado (FIGURA 10).

FIGURA 9: Mapa hidrográfico do município de Assaí - PR.



FONTE: autoria própria (2019).

FIGURA 10: Locais de coleta de água dos rios da cidade de Assai - PR



FONTE: Autoria própria (2019).

### 3.2 PREPARO DO CORANTE TÊXTIL

O corante verde de malaquita (Sigma-Aldrich) foi preparado na concentração de  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$ , sendo que o pó foi diluído em álcool e o restante completado com água destilada estéril. A solução foi filtrada em membrana de poliestireno descartável com porosidade de  $0,22 \mu\text{m}$  (Millipore®). A concentração final dos corantes empregados nos ensaios foi de 50, 100 e  $150 \text{ mg.L}^{-1}$

### 3.3 COLETA, ISOLAMENTO E SELEÇÃO

As amostras de água, dos pontos de coletas, foram coletadas em garrafas de politereflalato de etileno de 500 mL, pré-tratadas com solução 0,1 % de tween 80 e acomodadas em caixa isotérmica contendo gelo. Em seguida, foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada da UTFPR - Campus Londrina.

As amostras de água do ponto de coletas, foram submetidas a diluições seriadas, seguida de plaqueamento em ágar Brain Heart Infusion (BHI) acrescido de 1 mL de verde de malaquita, para obtenção da concentração de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de corante. As placas foram incubadas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por até 48 h. Após esse período, os isolados que apresentarem alterações na coloração colonial ou perda da coloração do meio, foram selecionados para uma nova seleção, em ágar BHI acrescido de 2 mL de corante (ajustado na concentração de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

### 3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA LACASE

A lacase é uma das enzimas mais importantes utilizadas na degradação de corantes têxteis. Mensurar a quantidade de enzima produzida fornece uma boa evidência de degradação e descoloração desses compostos coloridos. Para isso, o isolado bacteriano selecionado, foi previamente cultivado em caldo nutriente (NA) contendo 2 mM de guaiacol e o pH ajustado para 6,0. As culturas foram incubadas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  em um agitador orbital a 180 rpm. Em seguida, as culturas bacterianas foram

centrifugadas (9.000 rpm) por 20 min a 4 °C, e o sobrenadante foi coletado utilizando como "enzima extracelular bruta" (EEB)

O ensaio de atividade de lacase foi realizado monitorizando a oxidação de guaiacol. 200 mL de EEB foram retirados e misturados com 800 µL de guaiacol a 1 % em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 6,0 (Xiao et al., 2004). A oxidação de guaiacol foi determinada pela monitorização do aumento da absorbância a 520 nm. O tempo de monitoramento, foi de 1 minuto de reação. Uma unidade de atividade de lacase será descrita como a quantidade necessária de enzima para oxidar 1 µmol de absorvente guaiacol ( $\epsilon$ : 48.000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) / min usando espectrofotômetro (Leonowicz e Grzywnowicz 1981, Nadaroglu e Tasgin 2013). As reações foram realizadas em temperatura ambiente.

### 3.5 OBTENÇÃO DO ESPECTRO DO CORANTE

O espectro ultravioleta visível dos corantes foi obtido por meio da varredura espectral, em duplicata, em diversos comprimento de onda em espectrofotômetro (Santos, 2011).

Os testes de estabilidade em meio de cultura foram realizados em meio BHI acrescido de corantes nas concentrações de 50, 100 e 150 mg.L<sup>-1</sup>. O pHs do meio foram ajustados em pH de 5, 6, 7 e 8. As soluções foram analisadas em espectrofotometria ultravioleta visível em cubetas de quartzo para a varredura espectral das amostras entre os comprimentos de onda  $\lambda$  = 190-1100 nm (Santos, 2011).

### 3.6 EXPERIMENTOS DE DESCOLORAÇÃO

Os ensaios de descoloração foram realizados conforme o protocolo descrito por Konishi et al. (1997). Para tanto, 150 mL de caldo BHI foram preparados em Erlenmeyer de 250 mL. Os tratamentos constaram de corantes nas concentrações de 50 e 100 e 150 mg.L<sup>-1</sup>; o pH foi ajustado 5, 6, 7 e 8. A concentração de bactérias em cada tubo foi de 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. O inóculo foi incubado sob agitação a 180 rpm por 48 horas na ausência de luz. Alíquota de 30 ml do sobrenadante, nos intervalos de 24 e

48 horas, foram retiradas e centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos para a análise de descoloração em espectrofotômetro UV-VIS, através da diminuição da absorbância (ABS). A leitura será realizada no comprimento de onda específico para cada corante (determinada nas análises anteriores), seguindo a metodologia descrita por (Eichlerova et al., 2007). Nestes mesmos períodos, foi realizado a contagem da unidade formadora de colônia de cada tratamentos, para fins de quantificar o crescimento da bactéria em relação aos tratamentos.

A eficiência de descoloração foi obtida utilizando-se a EQUAÇÃO 2, onde  $ABS_{inicial}$  representa o valor da absorbância do meio BHI contendo o corante e  $ABS_{final}$  representa o valor da absorbância após o tratamento com a bactéria (Konishi et al. 1997).

EQUAÇÃO 2: 
$$Descoloração (\%) = \left( \frac{ABS_{inicial} - ABS_{final}}{ABS_{inicial}} \right) \times 100$$

### 3.7 ENSAIO DA TOXICIDADE

#### 3.7.1 Fitotoxicidade

A toxicidade da solução tratada e não tratada de verde de malaquita foi estimada por ensaio com sementes de feijão (*Vigna radiata*) (Andrade, 2010). As sementes foram selecionadas de tamanho uniforme e sanitizadas com 0,2 % de hipoclorito de sódio por 5 min e bem lavadas com água destilada estéril. Para cada teste, foram utilizadas 10 (dez) sementes, adicionadas sobre papel de filtro umedecido com 5 mL da solução tratada e não tratada. Como controle negativo será utilizada água destilada estéril. Os experimentos foram conduzidos durante 7 dias. Os testes foram realizados em duplicata.

Os resultados foram expressos na forma de crescimento médio das raízes (cm), Índice Relativo de Crescimento (ICR) e a Índice de Germinação (IG). O índice Relativo de crescimento (ICR) é dado pela EQUAÇÃO 3 e o índice de germinação (IG) é dado pela EQUAÇÃO 4 (Oliveira, 2013).

EQUAÇÃO 3: 
$$ICR = \frac{CRA}{CRC}$$

EQUAÇÃO 4: 
$$IG = ICR \times \left( \frac{SGA}{SGC} \right) \times 100$$

Onde CRA é o crescimento da radícula na amostra e CRC é o crescimento da radícula no controle negativo. O SGA é o número de sementes que germinaram na amostra e SGC é o número de sementes que germinaram no controle.

### 3.7.2 Toxicidade microbiana

Para o teste da toxicidade microbiana, foram pré-selecionados os microrganismo-testes do laboratório. Para o teste, as cepas bacterianas foram inoculados em meio ágar BHI contendo 100 mg.L<sup>-1</sup> de corante e incubados a 37 °C por até 24 h. O microrganismo que não apresentou crescimento foi escolhido para o ensaio da toxicidade.

O ensaio da citotoxicidade microbiana se baseia no método de difusão em ágar-poço, conforme o protocolo descrito por Furlaneto-Maia et al (2020). O microrganismo-teste “escolhido” foi reativado em Agar BHI e incubado a 37 °C por 18 h, após esse período, foi então, inoculado em 10 mL de água destilada e ajustado na concentração da escala de Mcfarland (10<sup>6</sup>). 200 µL da solução foi adicionado em 20 mL de meio BHI soft (ágar a 0,8 %), para padronizar a porcentagem do inoculo do microrganismo-teste (a 1 %). Logo, foi agitado e plaqueado posteriormente. Após solidificar o meio, foram realizados os poços com auxílio de uma ponteira de micropipeta, para o armazenamento das soluções controle e soluções tratadas. Em cada poço foi adicionado 20 µL de cada soluções e incubados a 37 °C por 24 h. Após o crescimento, foram mensurados o diâmetro dos halos de cada tratamentos.

### 3.8 ANALISE FTIR

Após o processo de biodegradação, as amostras foram analisadas por meio do espectrofotômetro FTIR. 5 mL das amostras tratadas e não tratadas foram colocadas em placas de petri previamente identificados, congelados e mantidos em liofilizador,

a  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 36 horas. Posteriormente, as placas foram transferidos para uma estufa de secagem a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 2 horas, e seguido da confecção das pastilhas.

Durante a secagem das amostras, foram também colocado o Brometo de Potássio (KBr), para a remoção da água já presente no sal. A água presente no KBr “hidratado” influencia no erro durante a leitura das amostras, por isso é essencial as amostras e o KBr estejam totalmente secas.

As pastilhas foram preparadas com 1 mg da amostra (em peso seco) e 149 mg de KBr seco, por meio da compressão a 40 kN por 5 minutos. As pastilhas confeccionadas foram devidamente colocadas no equipamento de espectrometria de infravermelho, na qual as leituras foram realizados no intervalo de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ , para obtenção das bandas. O branco da amostra foi obtido somente com o KBr seco, macerado e sem amostra.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho estão apresentados em forma de manuscrito científico.

### INTRODUÇÃO

O verde malaquita (VM) (4 - [(4-dimetilaminofenil) -fenil-metil] - N, N- dimetil anilina) é um corante trifenilmetano, com ampla utilização industrial, principalmente no tingimento de seda, lã, juta, couro, cerâmica, algodão; e também em tratamento de infecções microbianas em peixe. VM possui facilidade e eficácia de custo na síntese, alta estabilidade em relação à luz, temperatura e detergente (Yagub et al., 2014).

Contudo, quando descartado em efluentes, o VM interfere na penetração da luz visível nas águas, resultando em diminuição da fotossíntese e, portanto, inibição da atividade biológica. VM não só causa séria poluição da água, mas também afeta organismos vivos por meio de propriedades mutagênicas, carcinogênicas, teratogênicas, e alergênicas contra vários organismos (Chen et al., 2010).

Nos últimos anos, muitos métodos tradicionais físicos, químicos, biológicos e combinados, têm sido usados para remediar efluentes contendo corantes de moléculas complexa. Estes métodos incluem adsorção física, troca iônica, técnicas de filtração por membrana, precipitação química, floculação, oxidação e tratamento aeróbio / anaeróbio (Gan et al., 2018).

Embora eficientes, alguns métodos podem reduzir o VM em verde leuco-Verde de malaquita (LVM), podendo persistir em tecidos de peixes comestíveis por longos períodos de tempo e, portanto, causam bioacumulação no ecossistema (Hastein et al., 2006; Du et al, 2011; Li et al, 2019). Além disso, corantes com estruturas moleculares aromáticas complexas são mais estáveis e mais difíceis de biodegradar. Por estes fatos, os Estados Unidos da América, Canadá e União Europeia baniram o uso de VM nos processos industriais. Contudo, em outros países ainda são utilizados devido seu baixo custo e eficiência no processo industrial (Tao et al., 2017).

A degradação de corantes por microrganismos foi considerada como uma das tecnologias mais econômicas e eficazes, tornando-se uma alternativa *eco-friendly*

(Arabi et al., 2017). Assim, nos últimos anos, numerosos estudos se concentraram na bioprospecção de novos isolados bacterianos para a biorremediação de corantes têxteis em tratamento de efluente.

Diversas cepas de bactérias e fungos com capacidade de descolorir ou degradar os corantes trifenilmetano foram isoladas de solos, lagos e resíduos líquidos. Em estudos anteriores, algumas cepas de degradação bacteriana, como *Pseudomonas veronii* (Song et al. 2020), *Deinococcus radiodurans* (Lv et al., 2013), *Bacillus cereus* (Wanyonyi et al., 2017), *Micrococcus* sp. (Du et al., 2012), *Klebsiella aerogenes* (Shang et al., 2019), tem mostrado grande habilidade na biodegradação do verde malaquita. Fungos que podem degradar o verde malaquita também foram isolados, e incluem *Cunninghamella elegans* (Cha et al., 2001), *Phanerochaete chrysosporium* (Rani et al., 2014) e *Irpex lacteus* (Yang et al., 2016).

No entanto, a bioprospecção é uma prática atual e de extrema importância, visando o isolamento de novos isolados adaptados ao ambiente e com potencial aplicação na biodegradação de corantes industriais. Em vista do exposto, este trabalho tem como objetivo isolar bactérias do ambiente e avaliar sua capacidade de descoloração de VM, em diferentes condições de pH e temperatura.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Preparo da solução de verde de malaquita**

O corante VM foi obtido da Sigma-Aldrich. A solução foi preparada na concentração de 1000 mg.L<sup>-1</sup>, diluindo o corante em etanol (Himedia Laboratories Pvt. Ltd.) e completado com água ultra pura. A solução foi esterilizada por filtração em membrana 0,22 µm Millipore®.

### **Microrganismos**

Os isolados bacterianos foram provenientes de diversos pontos de coleta em rios na cidade de Assaí (S 23°22'22" W 50°50'27"), Paraná, Brasil. As amostras de água foram plaqueadas superfície em meio Brain Heart Infusion (BHI-Himedia) contendo 50 mg.L<sup>-1</sup> de corante verde de malaquita. As placas foram incubadas a 37 °C por até 72 h ou até o surgimento de halo de degradação ao redor da colônia.

### Experimentos de descoloração

Os ensaios de descoloração do verde de malaquita foram realizados conforme o protocolo descrito por Konishi et al. (1997) com modificações. Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer 250 mL contendo 100 mL de solução corante (50, 100 e 150 mg.L<sup>-1</sup>), e 1 % (v / v) de biomassa bacteriana (1,0 x 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>), em seguida foram incubados sob agitação de a 150 rpm/min e protegidos da luz.

As condições de cultivo no efeito de biodescoloração foram realizados testes com diferentes temperaturas (30 e 37 °C) e valores de pH (5, 6, 7 e 8), sob agitação a 180 rpm, em 24 h e 48 h de incubação.

### Análise UV - Vis

A degradação foi analisada quantitativamente por espectroscopia UV-Visível (S60 Libra, Biochrom). O espectro de UV de VM em 0 h e os metabólitos degradados derivados de VM após 24 e 48 h de reação foram analisados na faixa de 200-800 nm. Em cada tempo, foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 min para obter o sobrenadante para análise de descoloração. O cálculo de descoloração foi da seguinte forma:

$$\text{Descoloração (\%)} = \left( \frac{ABS_{inicial} - ABS_{final}}{ABS_{inicial}} \right) \times 100$$

### Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

As alterações nos grupos funcionais da estrutura VM após incubação com isolado microbiano foram estudados usando FT-IR (Perkin Elmer Spectrum RXI), conforme descrito por Du et al. (2011). O extrato foi seco em liofilizador de bancada, e misturado com KBr. Os espectros foram coletados em uma faixa de varredura de 400-4000 cm<sup>-1</sup>.

### Ensaio da fitotoxicidade

A fitotoxicidade do VM (150 mg.L<sup>-1</sup>) e seus produtos degradados foram investigados usando *Vigna radiata* (feijão mungu). Inicialmente, as sementes foram esterilizadas em superfície com solução de hipoclorito de sódio 1,0 % e depositados

em superfície de papel absorvente, contendo solução tratada e não tratada de VM, separadamente.

As sementes de controle foram tratados com água destilada esterilizada. Após tratamento, o comprimento da plúmula e radícula, e a porcentagem da taxa de germinação foram anotado conforme descrito em Watharkar et al. (2015).

### **Ensaio de toxicidade microbiana**

O teste de toxicidade microbiana foi realizado usando MG (150 mg.L<sup>-1</sup>) e seus produtos de degradação contra a cepa *Enterococcus* sp, pela técnica difusão em ágar-poço (Furlaneto-Maia et al., 2020). A zona de inibição em torno o poço foi observado após 24 h de incubação a 37 °C e expresso em mm de diâmetro.

### **Determinação da atividade de lacase**

A atividade da lacase produzida pelo isolado bacteriano foi medida monitorando o aumento na absorbância a 520 nm ( $\epsilon$ : 48.000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) de uma reação contendo guaiacol 10 mM em tampão de acetato de sódio 0,1 M pH 6,0 com o substrato livre de célula (Xiao et al., 2004). Reações enzimáticas foram realizadas à temperatura ambiente (~25 °C). Uma unidade de atividade enzimática foi definido como a quantidade de enzima que oxida 1 mol de substrato por min.

## **RESULTADO**

Um total de 24 isolados foram selecionados com base na produção da zona halo ao entorno da colônia bacteriana em meio de cultura contendo o corante VM. Do total de isolados, o isolado renomeado LAMBA 3.8 foi o que exibiu melhor atividade descolorante no meio de triagem, e portanto, selecionado para os experimentos posteriores (FIGURA 11 A).

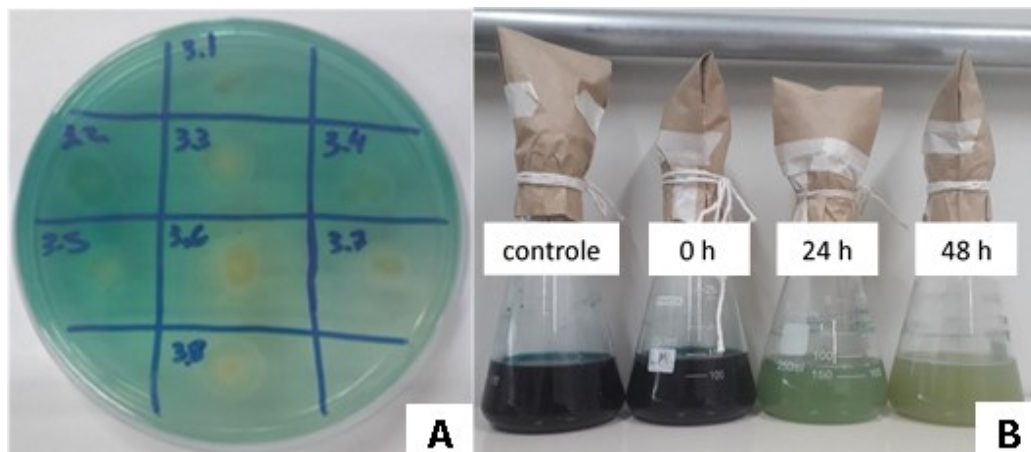


FIGURA 11: Ensaio de descoloração em meio sólido e líquido. Em (A) Isolamento de colônias bacterianas no meio seletivo Brain Heart Infusion suplementado com verde de malaquita ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ); e em (B) teste de descoloração pelo isolado bacteriano LAMBA 3.8 em cultura líquida contendo  $150 \text{ mg.L}^{-1}$  do corante verde de malaquita.

As atividades de descoloração em cultura líquida afirmou que o isolado LAMBA 3.8 foi capaz de descolorir VM nas concentrações de 50, 100 e  $150 \text{ mg.L}^{-1}$  (FIGURA 11 B). A figura 12 apresenta a taxa de descoloração, pH e unidade formadora de colônia ( $\text{UFC.mL}^{-1}$ ), em 30 e 37 °C. Com estes resultados, pode-se inferir que a eficiência da descoloração aumentou consideravelmente nos pH 7 e 8, após 48 h de incubação, em ambas temperaturas, apresentando eficiência superior a 85 %.

O pH foi um fator importante no crescimento bacteriano e na degradação do VM, uma vez que as menores taxas de degradação ocorreram nos pH 5 e 6, coincidindo com o baixo crescimento celular, confirmando que a degradação do VM foi devido a presença do microrganismo ou seus metabolitos.

A concentração do corante não afetou a taxa de descoloração, mostrando que mesmo em elevadas concentrações, o isolado LAMBA 3.8 foi capaz de degradar o VM. Ressaltamos que nas condições de cultura utilizados neste estudo, a atividade de lacase foi mensurada em  $1,66 \text{ U.L}^{-1}$ , sugerindo a enzima pode ter auxiliado no processo de descoloração.

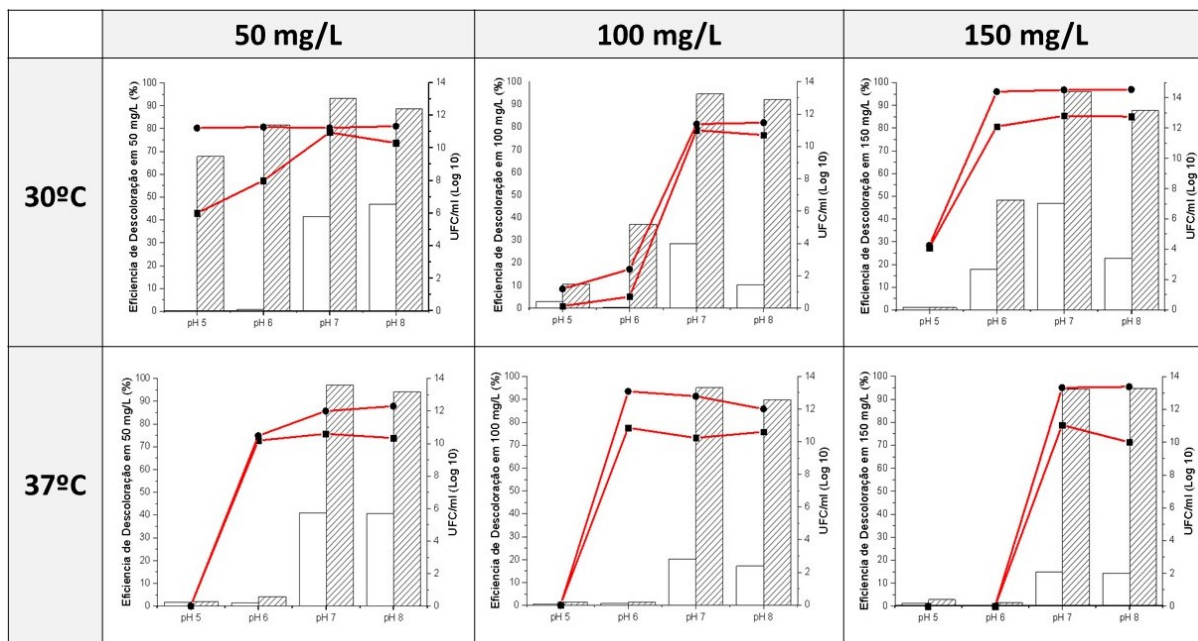


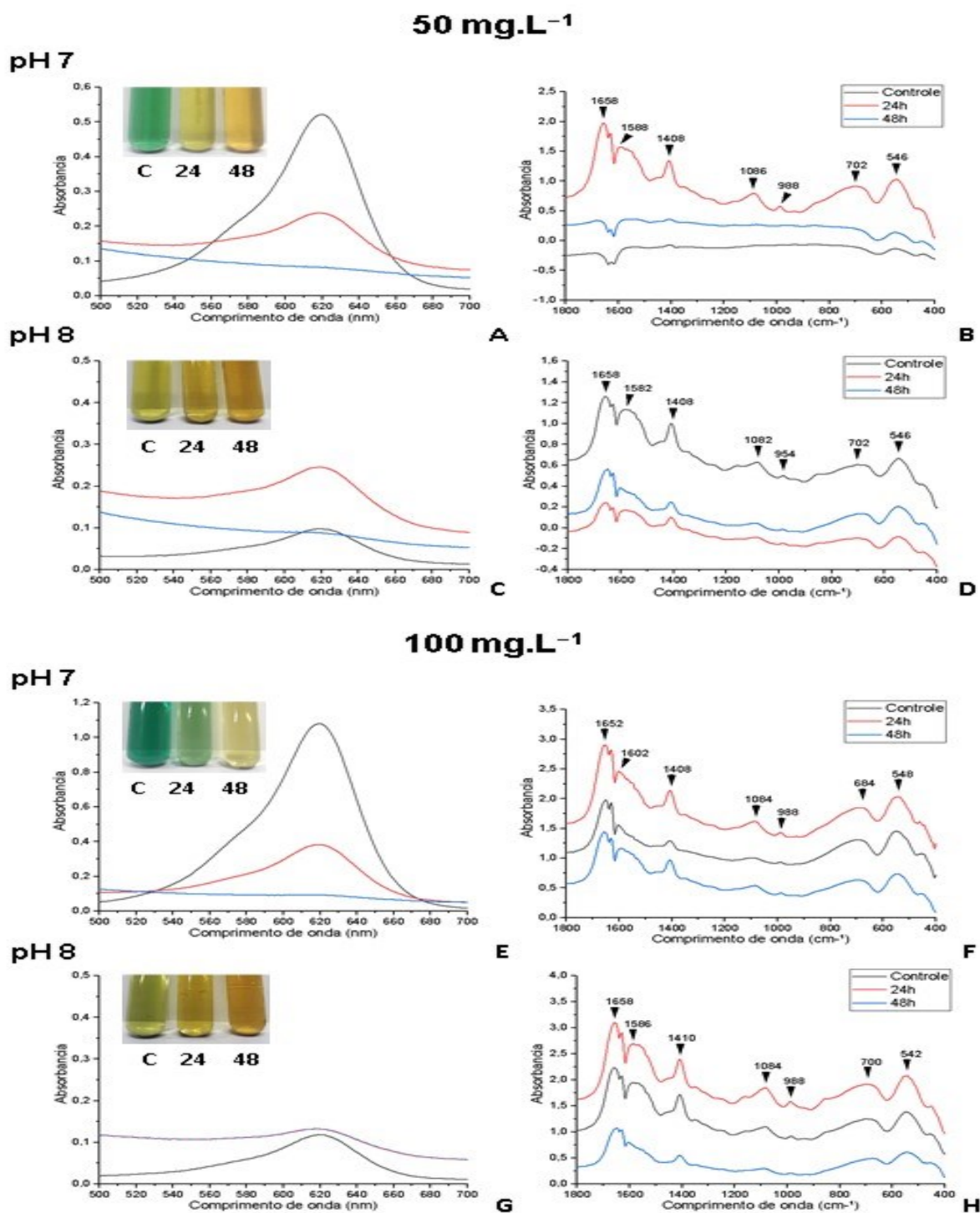
FIGURA 12: Degradação do Verde de Malaquita pelo isolado LAMBA 3.8; incubado nas temperaturas de 30 e 37 °C, em diferentes concentrações de corante (50, 100 e 150 mg.L<sup>-1</sup>) e pHs (de 5, 6, 7 e 8). As colunas □ e ▨ representa a eficiência de descoloração (%), e as linhas —■— e —●— representa a quantidade de UFC.mL<sup>-1</sup> (Log 10), analisados nos intervalos de 24 h e 48 h, respectivamente.

A partir dos resultados de eficiência e UFC obtidos, selecionamos os tratamentos de pH 7 e 8, nas três concentrações de VM e temperatura de 37 °C, para dar sequência as análises de UV-Vis e FTIR.

A FIGURA 13 apresenta os espectros de UV-Vis e FTIR realizado antes e após a descoloração do VM, pelo isolado LAMBA 3.8. O espectro de absorção UV-Vis obtido para o controle e o tratamento não mostrou mudança no deslocamento do comprimento de onda (618 nm a 608 nm), porém alterou a intensidade de absorção, indicando a degradação do corante.

A análise de FTIR revelou uma diferença significativa entre VM e produtos descoloridos. A região (500-1.500 cm<sup>-1</sup>) referente ao alongamento do anel benzeno monossustituídos e para-dissustituídos, característicos do corante. A ausência ou presença de picos variados nessas regiões indica perda de anel benzeno ou aromáticos. As bandas de vibração em 1167 cm<sup>-1</sup> e 1365 cm<sup>-1</sup> foram picos característicos de alongamento C – N e CH<sub>2</sub>. Além disso, um pico a 1585 cm<sup>-1</sup> para o alongamento C = C dos anéis de benzeno.

Pode-se notar que o pH também influenciou na distribuição de bandas do corante no FTIR, mostrando bandejamento distintos em cada tratamento. Contudo, fica evidente as alterações moleculares ocorridas na molécula do corante após tratamento pela bactéria LAMBA 3.8.



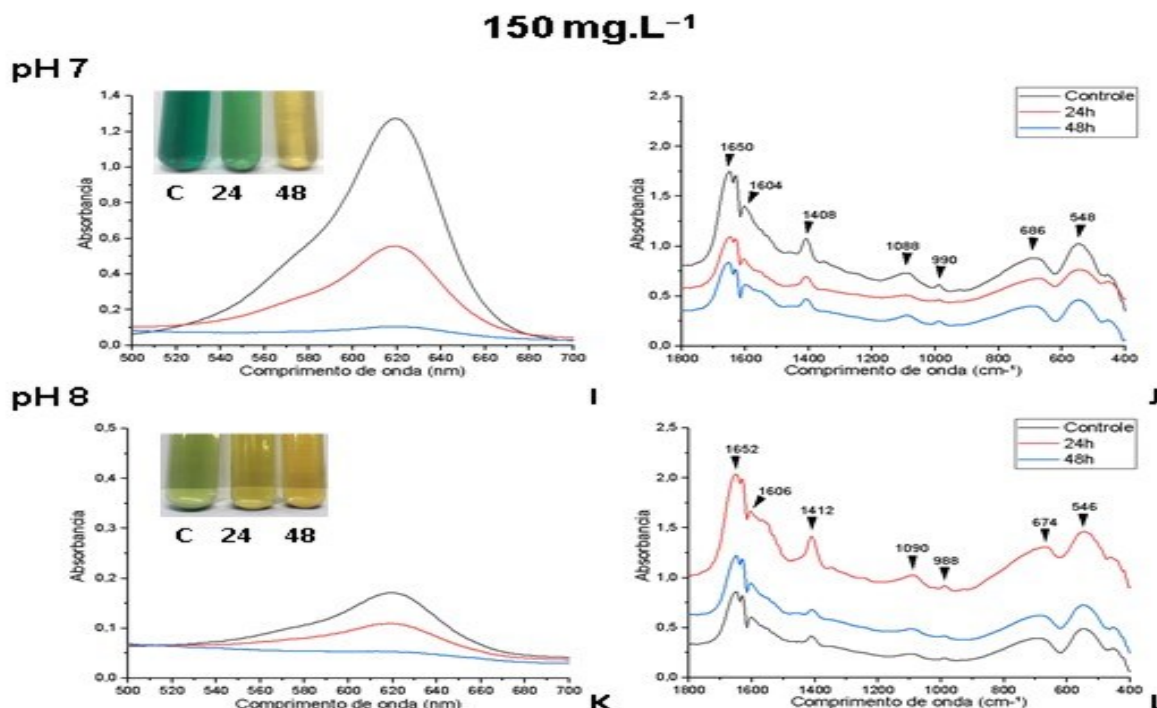


FIGURA 13: Espectros de UV-Vis e FTIR do VM antes e após o tratamento de 24 e 48 h, com o isolado bacteriano LAMBA 3.8 e incubado a 37 °C. Em **A – D** representam perfis de picos formados a 50 mg.L<sup>-1</sup>, pH 7 (**A e B**) e pH 8 (**C e D**). Em **E – H**, perfis de pico a 100 mg.L<sup>-1</sup> e pH 7 (**E e F**) e pH 8 (**G e H**). Em **I – L**, perfil de pico 150 mg.L<sup>-1</sup> e pH 7 (**I e J**) e pH 8 (**K e L**). Destaque para a descoloração do corante (tubos).

A avaliação do impacto toxicológico do VM e seus metabólitos produzidos após a biodegradação em populações de plantas e microrganismos do ambiente é de grande importância, devido ao impacto ambiental, principalmente cadeia trófica. No presente estudo, utilizamos sementes de feijão mungu para análise toxicológica de corante e metabólitos (FIGURA 14 A). O teste de fitotoxicidade foi realizado com o produto de degradação do VM (150 mg.L<sup>-1</sup>) em pH 8 e 37 °C.

Em comparação com a solução tratada e não tratada, a germinação e o alongamento da raiz da plântula ainda foi sensível aos metabólitos de VM residuais presentes após a descoloração catalisada por LAMBA 3.8 (FIGURA 14 A). Após 7 dias, o % de germinação das sementes com VM tratado foi 7 % menor quando comparado ao tratamento negativo. Contudo, os resultados não mostraram diferença significativa entre VM tratada e não tratada.

A microtoxicidade em *Enterococcus sp* apresentou zona inibitória (1,8 a 2,4 cm) em torno do poço contendo corante não tratado (FIGURA 14 C). Já nos testes de



descoloração em pH 7 e 8, o produto de degradação não mostrou zona inibição, confirmando a natureza não tóxica do corante tratado (FIGURA 14 B). Nos pHs 5 e 6 ainda apresentou zona de inibição do VM tratado, corroborando com os resultados de baixa eficiência de descoloração nesses pHs, apresentados anteriormente.

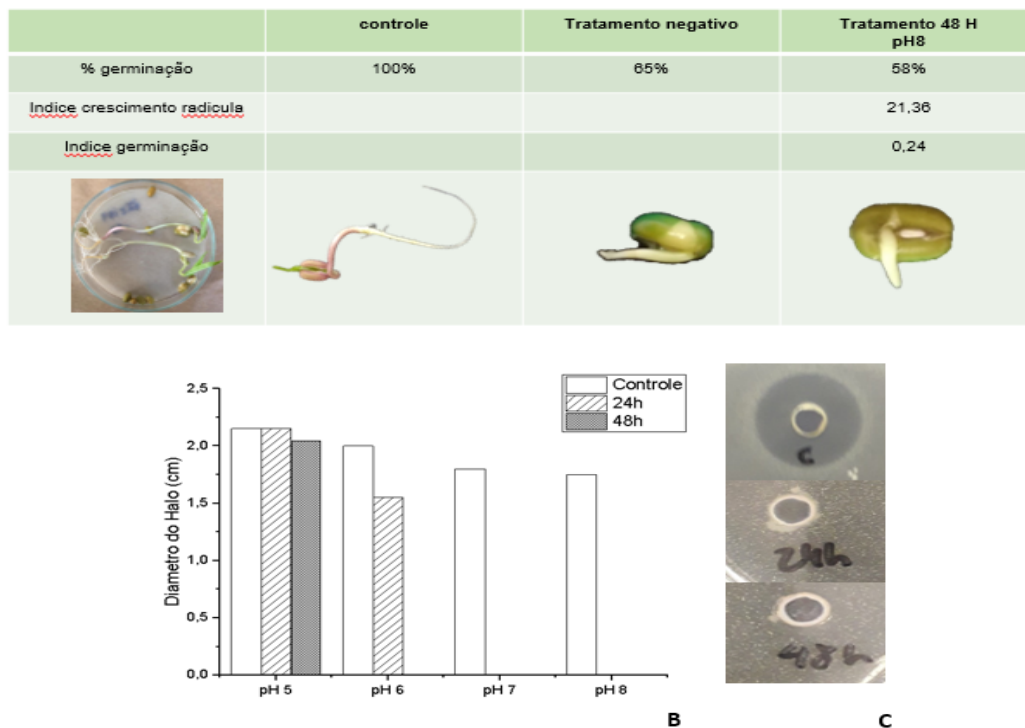


FIGURA 14: Ensaio de Toxicidade. Em (A) germinação de sementes de *Vigna radiata* e dados de % de germinação e índice de crescimento da radícula; Em (B) diâmetro do halo de inibição de *Enterococcus sp* após contato com corante VM, e os tratados a 24 e 48 h, em diferentes pHs; e em (C) halo de inibição formado em teste poço difusão, com corante VM e tratados em pH 8.

## DISCUSSÃO

O corante verde malaquita é altamente tóxico para células de mamíferos, mesmo em baixas concentrações ( $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Também é caracterizado como potencial agente carcinogênico, além de causar anormalidades reprodutivas em animais (Zhou et al., 2019). Por causa de seu baixo custo, pronta disponibilidade e eficácia como um agente antifúngico para tanques de criação de peixes, o público em geral pode ser exposto a esta corante e seus metabólitos através do consumo deste corante na cadeia alimentar (Fessard et al., 1999).

Uma estratégia promissora para remediar a poluição de VM é o uso de microrganismos, conhecidos como eco-friendly, para a degradação de compostos tóxicos devido aos baixos custos de operação e formação de produtos de degradação não tóxicos (Forgacs et al., 2004). Neste estudo, o isolado denominado LAMBA 3.8 mostrou ser um candidato potencial para o tratamento biológico na degradação de VM. Por ter sido isolado de efluentes, apresenta a vantagem de adaptabilidade às condições ambientais, além de mostrar eficiência superior a 85% em condições de pH neutro.

Muitas investigações foram realizadas na área de biodegradação do VM; Deng et al. (2008) relataram a eficiência de 96 % de degradação de 20 mg.L<sup>-1</sup> de corante por *B. cereus*. *A. hydrophila* descoloriu 50 mg.L<sup>-1</sup> de VM com eficiência de 90 % (Ren et al., 2006); *Citrobacter* sp. reduziu o VM em mais de 80 %, numa concentração de 36,5 mg.L<sup>-1</sup> (Guerra-Lopez et al., 2007), e *P. otitidis* removeu 95 % do verde malaquita com 182 mg.L<sup>-1</sup> de concentração de corante (Wu et al., 2009). Em contrapartida, *Tenacibaculum* sp teve crescimento inibido com 100 mg.L<sup>-1</sup> de VM, devido ao efeito tóxico deste corante (Qu et al., 2018). Neste estudo mostramos que o aumento na concentração de corante não interferiu no crescimento do isolado LAMBA 3.8.

Os fatores como pH e temperatura também são importantes no processo adaptativo do microrganismo e o processo de descoloração. Parmar e Shukla (2017) afirmou que a temperatura desempenha um papel fundamental no crescimento, produção e estabilidade das enzimas na cepa bacteriana. Nossos resultados mostraram que o isolado LAMBA 3.8 apresentou desenvolvimento e eficiência de degradação tanto a 30 e 37 °C, contrapondo os resultados apresentados por Liu et al. (2021) e Du et al (2011) que relataram a temperatura de 30 °C como sendo o ótimo de degradação de VM por bactérias.

Em relação ao pH, mostramos que o pH 7 e 8 foi determinante para a eficiência de degradação do VM, devido ao maior crescimento bacteriano. Os trabalhos mostram que o pH e temperatura são muito variáveis, dependendo exclusivamente do desenvolvimento microbiano. *Staphylococcus hominis* (Parmar e Shukla, 2017) e *Klebsiella* sp. (Cui et al, 2014), também apresentaram condições de pH neutro como ótimo para descoloração de VM. Já, *Sphingomonas paucimobilis* teve seu ótimo de crescimento e biodegradação do VM em pH 9 e temperatura de 25 °C (Ayed et al., 2009).

A biodegradação de corantes pode ocorrer por duas estratégias: a adsorção pela biomassa microbiana ou degradação por metabolitos celulares. Quando a célula funciona como um absorvente, ficam absorção profundamente coloridos, enquanto aqueles que causam degradação permanecerá incolor (An et al., 2002). Observamos que as células do isolado LAMBA 3.8 ficaram ligeiramente colorido na fase inicial de biodegradação do corante. No entanto, com o passar do tempo, a cor do sobrenadante células bacterianas externas desapareceram completamente, confirmando a biodegradação microbiana. Provavelmente nosso isolado emprega ambos mecanismos (dados não apresentados).

O deslocamento de absorção no UV-Vis nos picos entre 399 nm a 430 nm e perda de cor durante a incubação, sugere que o corante VM pode ter sido reduzido para sua forma leuco (Jadhav e Govindwa, 2006; Chen et al., 2010). Essas alterações corroboraram com os resultados vibracionais obtidos no FTIR. Estas observações indicaram que o composto VM foi eficientemente degradado por LAMBA 3.8. Esses resultados estão de acordo com trabalhos descritos por Chaturvedi et al. (2013) e Ayed et al. (2009) para confirmar a degradação de VM.

A toxicidade da solução de VM antes e após do tratamento foi testado com sementes de feijão mungu. Os resultados obtidos não mostraram a restauração completa na germinação e comprimento de radícula das sementes expostas ao VM tratado, uma vez que não foram estatisticamente diferentes. Vale ressaltar que as condições do metabolito tratado foi na concentração de 150 mg.L<sup>-1</sup> de VM, em pH 8. Possivelmente o pH possa ter interferido na germinação das sementes, e outras condições de tratamento podem gerar resultados diferentes.

Ainda, a escolha da semente pode não ter sido adequada para a condução do experimento, uma vez que vários autores relatam a utilização de sementes de *Trigonella foenumgraecum* (Vijayalakshmidivi e Muthukumar, 2014), *Nicotiana tabacum* e *Lactuca sativa* (Yang et al., 2015), *Triticum aestivum* (Parshetti et al., 2006).

Em contrapartida, Du et al (2011) reportaram germinação parcial de sementes de *Medicago sativa* e *Brassica chinensis* após tratamento de VM por *Pseudomonas* sp., corroborando com nossos resultados. Os mesmos autores relataram que a natureza tóxica do corante VM pode causar organogênese inadequada e afetando a germinação das sementes. Ainda, trabalhos anteriores mostraram que a degradação de VM em leuco-verde malaquita (subproduto) é igualmente tóxico (Burchmore e Wilkinson, 1993).

O resultado do ensaio de microtoxicidade mostrou que a ausência de zona de inibição indica que os produtos degradados de VM não apresentaram toxicidade para *Enterococcus* sp. Resultados similares foram obtidos por Sneka et al. (2014) e Vignesh et al (2020). Neste contexto, o isolado LAMBA 3.8 pode ser a cepa potencial para degradar VM. É importante ressaltar que os efluentes / solo tratados por bactéria pode ser favorável para utilização no ambiente por não afetar a fauna e microbiota ambiental.

## **CONCLUSÃO**

Em conclusão, o isolado LAMBA 3.8, proveniente de corpos hídricos que recebem efluentes industriais e residenciais, apresentou potencial capacidade de degradar eficientemente altas concentrações de VM. Além disso, determinamos que pH neutro e temperatura ambiente foi favorável para o desenvolvimento do isolado LAMBA 3.8, bem como o % de degradação do corante VM. O teste de citotoxicidade indicou que a água tratada é menos tóxica em comparação com a não tratada, e o teste de fitotoxicidade mostrou que o modelo utilizado pode ter interferido nas análises dos resultados. Em conjunto, os resultados sugeriram que este isolado pode ser valioso para a biorremediação de VM.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como foi relatado na conclusão do artigo, o isolado LAMBA 3.8, proveniente de corpos hídricos que recebem efluentes industriais e residenciais, apresentou potencial capacidade de degradar eficientemente altas concentrações de VM.

O pH neutro e temperatura ambiente foi favorável para o desenvolvimento do isolado LAMBA 3.8, bem como o % de degradação do corante VM.

O teste de citotoxicidade indicou que a água tratada é menos tóxica em comparação com a não tratada, e o teste de fitotoxicidade mostrou que o modelo utilizado pode ter interferido nas análises dos resultados.

Em conjunto, os resultados sugeriram que este isolado pode ser valioso para a biorremediação de VM.

### 5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Devido ao isolado ser proveniente de corpo hídrico em temperatura ambiental (20 - 25 °C), é necessário avaliar a eficiência de descoloração em outras temperaturas. além disso, foi realizado o ensaio da fitotoxicidade com sobrenadante de um dos tratamentos (150mg.L<sup>-1</sup> pH 8 e 37 °C). Seria interessante avaliar a germinação em outros tratamentos e realizar o ensaio em outros tipos de sementes como alface, cenoura, rabanete, entre outros. O estudo sobre os metabólitos secundário devem ser estudados detalhadamente, o HPLC, Cromatografia Gasosa, Espectrometria de massa seria um bom análise detalhadamente dos compostos degradados desse corante por isolado LAMBA 3.8.

## 6 REFERENCIAS

ALMEIDA, É. J. R., DILARRI, G., CORSO, C. R. A. A indústria têxtil no Brasil: Uma revisão dos seus impactos ambientais e possíveis tratamentos para os seus efluentes. **Conexão água**. 2016. Disponível em: <<http://conexaoagua.mpf.mp.br/arquivos/artigos-cientificos/2016/01-a-industria-textil-no-brasil-uma-revisao-dos-seus-impactos-ambientais-e-possiveis-tratamentos-para-os-seus-efluentes.pdf>> Acessado em 3 de março de 2020 as 2041

AN, S. Y.; MIN, S. K.; CHA, I. H.; CHOI, Y. L.; CHO, Y. S.; KIM, C. H.; LEE, Y. C. Decolorization of triphenylmethane and azo dyes by *Citrobacter sp.* **Biotechnology Letters**, 24, 12, 1037–1040, 2002. DOI: [10.1023/a:1015610018103](https://doi.org/10.1023/a:1015610018103)

ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 73, 4, 626-631, 2010. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2009.12.012](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.12.012)

ARABI, M.; GHAEDI, M.; OSTOVAN, A. Development of a lower toxic approach based on green synthesis of water-compatible molecularly imprinted nanoparticles for the extraction of hydrochlorothiazide from human urine. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, 5, 5, 3775–3785, 2017. DOI: [10.1021/acssuschemeng.6b02615](https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b02615)

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL. Cartilha Indústria Têxtil e de Confecção Brasileira - Cenários, Desafios, Perspectivas e Demandas. **ABIT**, Brasília: junho de 2013. Disponível em <<http://abit-files.abit.org.br/site/publicacoes/cartilha.pdf>> Acesso em; 1 de Março de 2021 as 13:50.

AYED, L.; CHAIEB, K.; CHEREF, A.; BAKHROUF, A. Biodegradation of triphenylmethane dye Malachite Green by *Sphingomonas paucimobilis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 25, 4, 705-711, 2009. DOI: [10.1007/s11274-008-9941-x](https://doi.org/10.1007/s11274-008-9941-x).

BRASIL, **Ministério do Meio Ambiente**. RESOLUÇÃO CONAMA nº 1, de 23 de janeiro de 1986. Publicada no DOU, de 17 de fevereiro de 1986, Seção 1. 2548-2549.

BRASIL, **Ministério do Meio Ambiente**. RESOLUÇÃO No 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005. Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005. 58-63.

BURCHMORE, S.; WILKINSON, M. United Kingdom department of the Environment. **Water Research Center**, Marlow, Buckinghamshire, United Kingdom. Report no. 316712 (November 1993).

CÂMARA, M. Corantes azo: características gerais, aplicações e toxicidade. 2017. 60 f. Dissertação (Trabalho de Conclusão de Curso). Departamento de nutrição. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

CHA C.J., DOERGE D.R., CERNIGLIA C.E. Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans*. **Applied and Environmental Microbiology**, 67, 9, 4358-4360, 2001. DOI: [10.1128/AEM.67.9.4358-4360.2001](https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.4358-4360.2001)

CHATURVEDI, V.; BHANGE, K.; BHATT, R.; VERMA, P. Biodetoxification of high amounts of malachite green by a multifunctional strain of *Pseudomonas mendocina* and its ability of metabolize dye adsorbed chicken feathers. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 1, 4, 1205–1213, 2013. DOI: [10.1016/j.jece.2013.09.009](https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.09.009)

CHEMICAL ECONOMICS HANDBOOK. Dyes. Publicado em julho de 2018. Disponível em: <https://ihsmarkit.com/products/dyes-chemical-economics-handbook.html> Acesso em: 9 de Mar. de 2020 as 14:34.

CHEN, C. Y.; KUO, J. T.; CHENG, C. Y.; HUANG, Y. T.; HO, I. H.; CHUNG, Y. C. Biological decolorization of dye solution containing malachite green by *Pandoraea pulmonicola* YC32 using a batch and continuous system. **Journal of Hazardous Materials**, 172, 2-3, 1439–1445, 2009.

CHEN, C. H.; CHANG, C. F.; LIU, S. M. Partial degradation mechanisms of malachite green and methyl violet B by *Shewanella decolorationis* NTOU1 under anaerobic conditions. **Journal of Hazardous Materials**, 177, 1-3, 281–289, 2010. DOI: [10.1016/j.jhazmat.2009.12.030](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.030)

COLLIVIGNARELLI, M. C.; ABBÀ, A.; MIINO, M. C.; DAMIANI, S. Treatments for color removal from wastewater: State of the art. **Journal of Environmental Management**, 236, 727–745, 2019. DOI: [0.1016/j.jenvman.2018.11.094](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.094)

COLOURS INDEX. Definitions of a dye and pigment. Disponível em: <https://colour-index.com/definitions-of-a-dye-and-a-pigment> Acesso em: 20 de Mar. de 2020 as 20:08

CROCE, R.; CINÀ, F.; LOMBARDO, A.; CRISPEYN, G.; CAPPELLI, C. I.; VIAN, M.; MAIORANA, S.; BENFENATI, E.; BADERNA, D. Aquatic toxicity of several textile dye formulations: Acute and chronic assays with *Daphnia magna* and *Raphidocelis subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 144, 79–87, 2017.

CUI, D.; LI, G.; ZHAO, M.; HAN, S. Decolourization of azo dyes by a newly isolated *Klebsiella* sp. strain Y3, and effects of various factors on biodegradation. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 28, 3, 478-486, 2014. DOI: [10.1080/13102818.2014.926053](https://doi.org/10.1080/13102818.2014.926053)

DENG, D.; GUO, J.; ZENG, G.; SUN, G. Decolorization of anthraquinone, triphenylmethane and azo dyes by a new isolated *Bacillus cereus* strain DC11. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 62, 3, 263–269, 2008. DOI: [10.1016/j.ibiod.2008.01.017](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.01.017)

DU, L. N.; WANG, S.; LI, G.; WANG, B.; JIA, X. M.; ZHAO, Y. H.; CHEN, Y. L. Biodegradation of malachite green by *Pseudomonas* sp. strain DY1 under aerobic condition: characteristics, degradation products, enzyme analysis and phytotoxicity. **Ecotoxicology**, 20, 2, 438–446, 2011. DOI: [10.1007/s10646-011-0595-3](https://doi.org/10.1007/s10646-011-0595-3)

DU, L. N.; ZHAO, M.; LI, G.; ZHAO, X. P.; ZHAO, Y. H. Highly efficient decolorization of Malachite Green by a novel *Micrococcus* sp. strain BD15. **Environmental Science and Pollution Research**, 19, 7, 2898–2907, 2011. DOI: [10.1007/s11356-012-0796-1](https://doi.org/10.1007/s11356-012-0796-1)

DUBREIL, E.; MOMPÉLAT, S.; KROMER, V.; GUITTON, Y.; DANION, M.; MORIN, T.; HURTAUD-PESSEL, D.; VERDON, E. Dye residues in aquaculture products: Targeted and metabolomics mass spectrometric approaches to track their abuse. **Food Chemistry**, 294, 355–367, 2019. DOI: [10.1016/j.foodchem.2019.05.056](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.056)

EICHLEROVÁ, I.; HOMOLKA, L.; NERUD, F. Decolorization of high concentration of synthetic dyes by the white rot fungus *Bjerkandera adusta* strain CCBAS 232. **Dyes and Pigments**, 75, 1, 38-44, 2007. DOI: [10.1016/j.dyepig.2006.05.008](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2006.05.008)

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Chemicals in food**, 2016. Overview of selected data collection., 1-40, 2016.

FANG, G.; LI, L.; LI, R.; ZHU, J.; HONG, Q.; LI, S. Isolation and characterization of a malachite green-degrader *Arthrobacter* sp. M6. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, 16, 4, 581-584, 2010. DOI: [10.3724/SP.J.1145.2010.00581](https://doi.org/10.3724/SP.J.1145.2010.00581)

FARHA, A. K.; TR, T.; PURUSHOTHAMAN, A.; SALAM, J. A.; HATH, A. M. Phylogenetic diversity and biotechnological potentials of marine bacteria from continental slope of eastern Arabian Sea. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 16, 2, 253-258, 2018. DOI: [10.1016/j.jgeb.2018.06.002](https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.06.002)

FESSARD, V.; GODARD, T.; HUET, S.; MOUROT, A.; POUL, J. M. Mutagenicity of malachite green and leucomalachite green in in vitro tests. **Journal of Applied Toxicology**, 19, 6, 421-430, 1999. DOI: [10.1002/\(SICI\)1099-1263\(199911/12\)19:6<421::AID-JAT595>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1263(199911/12)19:6<421::AID-JAT595>3.0.CO;2-6)

FORGIARINI, E. Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis Pela Enzima *Horseradish* Peroxidase (HRP). 2006. 124 f. Dissertação (mestrado) em engenharia química. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.

FRANCISCON, E. Descoloração e degradação de azocorantes por bactérias. 2010. 114 f. Tese (doutorado) em Ciências de Alimentos. Departamento de Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2010.

FURLANETO-MAIA, L.; ROCHA, K. R.; HENRIQUE, F. C.; GIAZZI, A. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* sp isolated from soft cheese in Southern Brazil. **Advances in Applied Microbiology**, 4, 3, 175-181, 2014. DOI: [10.4236/aim.2014.43023](https://doi.org/10.4236/aim.2014.43023)

FURLANETO-MAIA, L.; RAMALHO, R.; ROCHA, K. R. FURLANETO, M. C. Antimicrobial activity of enterocins against *Listeria* sp. and other food spoilage bacteria. **Biotechnology Letters**, 42, 5, 797–806, 2020. DOI: [10.1007/s10529-020-02810-7](https://doi.org/10.1007/s10529-020-02810-7)

GAN, LI.; ZHOU, F.; OWENS, G.; CHEN, Z. *Burkholderia cepacia* immobilized on eucalyptus leaves used to simultaneously remove malachite green (MG) and Cr (VI).



**Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 172, 1, 526–531, 2018. DOI: [10.1016/j.colsurfb.2018.09.008](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.09.008)

GOMARE, S. S.; PARSHETTI, G. K.; GOVINDWAR, S. P. Biodegradation of Malachite Green by *Brevibacillus laterosporus* MTCC 2298. **Water Environment Research**, 81, 11, 2329-2336, 2009. DOI: [10.2175/106143009X407357](https://doi.org/10.2175/106143009X407357)

GOPINATHAN, R.; KANHERE, J.; BANERJEE, J. Effect of malachite green toxicity on no target soil organisms. **Chemosphere**, 120, 637-644, 2015. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2014.09.043](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.043)

GUERRA-LOPEZ, D.; DANIELS, L.; RAWAT, M. *Mycobacterium smegmatis* mc 2155 fbiC and MSMEG 2392 are involved in triphenylmethane dye decolorization and coenzyme F420 biosynthesis. **Microbiology**, 153, Pt 8, 2724–2732, 2007. DOI: [10.1099/mic.0.2006/009241-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/009241-0)

HAN, S.; HAN, W.; CHEN, J.; SUN, Y.; DAI, M.; ZHAO, G. Bioremediation of malachite green by cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 engineered with a triphenylmethane reductase gene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 104, 7, 3193–3204, 2020. DOI: [10.1007/s00253-020-10438-w](https://doi.org/10.1007/s00253-020-10438-w)

HASTEIN, T.; HJELTNES, B.; LILLEHAUG, A.; SKARE, J. U.; BERNTSSEN, M.; LUNDEBYE, A. K. Food Safety Hazards That Occur During the Production Stage: Challenges for Fish Farming and the Fishing Industry. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, 25, 2, 607–625, 2006.

HENDERSON, A. L.; SCHMITT, T. C.; HEINZE, T. M.; CERNIGLIA, C. E. Reduction of Malachite Green to Leucomalachite Green by Intestinal Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 63, 10, 4099–4101, 1997. DOI: [10.1128/AEM.63.10.4099-4101.1997](https://doi.org/10.1128/AEM.63.10.4099-4101.1997)

HERNÁNDEZ-ZAMORA, M.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F. Congo red dye diversely affects organisms of different trophic levels: a comparative study with microalgae, cladocerans, and zebrafish embryos. **Environmental science and pollution research international**, 26, 12, 11743-11755, 2019. DOI: [10.1007/s11356-019-04589-1](https://doi.org/10.1007/s11356-019-04589-1)

HOLKAR, C. R.; JADHAV, A. J.; PINJARI, D. V.; MAHAMUNI, N. M.; PANDIT, A. B. A critical review on textile wastewater treatments: Possible approaches. **Journal of Environmental Management**, 182, 351-366, 2016. DOI: [10.1016/j.jenvman.2016.07.090](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.07.090)

JADHAV, J. P.; GOVINDWA, S. P. Biotransformation of malachite green by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. **Yeast**, 23, 4, 315–323, 2006. DOI: [10.1002/yea.1356](https://doi.org/10.1002/yea.1356)

JAMEE, R.; SIDDIQUE, R. Biodegradation of Synthetic Dyes of Textile Effluent by Microorganisms: An Environmentally and Economically Sustainable Approach. **European Journal of Microbiology and Immunology**, 9, 4, 114–118, 2019. DOI: [10.1556/1886.2019.00018](https://doi.org/10.1556/1886.2019.00018)

JIANG, L. L.; LI, K.; YAN, D. L.; YANG, M. F.; MA, L.; XIE, L. Z. Toxicity Assessment of 4 Azo Dyes in Zebrafish Embryos. **International Journal of Toxicology**, 39, 2, 115-123, 2020. DOI: [10.1177/1091581819898396](https://doi.org/10.1177/1091581819898396)

KHATTAB, T. A.; ABDELRAHMAN, M. S.; REHAN, M. Textile dyeing industry: environmental impacts and remediation. **Environmental Science and Pollution Research**, 27, 4, 1-16, 2019. DOI: [10.1007/s11356-019-07137-z](https://doi.org/10.1007/s11356-019-07137-z)

KONISHI, J.; ISHII, Y.; ONAKA, T.; OKUMURA, K.; SUZUKI, M. Thermophilic carbon-sulfur-bond-targeted biodesulfurization. **Applied and Environmental Microbiology**, 63, 8, 3164–3169, 1997.

KWAN, P. P.; BANERJEE, S.; SHARIFF, M.; YUSOFF F. M. Residual quantification and oxidative stress induced by malachite green after subacute and sublethal exposure in red tilapia. **Veterinary World**, 12, 9, 1416-1421, 2019. DOI: [10.14202/vetworld.2019.1416-1421](https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1416-1421).

LADCHUMANANANDASIVAM, R. Processos Químicos Têxteis. Volume III – Tingimento Têxtil (revisado 2ª Edição). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN. 2008.

LEONOWICZ, A.; GRZYWNOWICZ, K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, 3, 1, 55-58, 1981. DOI: [10.1016/0141-0229\(81\)90036-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(81)90036-3)

LI, G.; SHEN, D.; LIANG, X. F.; HE, Y.; HE, S. Effects of Malachite Green on the mRNA Expression of Detoxification-Related Genes in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Other Major Chinese Freshwater Fishes. **Environmental Toxicology**, 28, 3, 137-145, 2013. DOI: [10.1002/tox.20706](https://doi.org/10.1002/tox.20706)

LI, T.; HAO, M.; PAN, J.; ZONG, W.; LIU, R. Comparison of the toxicity of the dyes Sudan II and Sudan IV to catalase. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, 31, 10, 1-8, 2017. DOI: [10.1002/jbt.21943](https://doi.org/10.1002/jbt.21943)

LI, T.; TIAN, D.; ZHU, Z.; JIN, W.; WU, S.; LI, H. The gut microbiota: a new perspective on the toxicity of malachite green (MG). **Applied Microbiology and Biotechnology**, 103, 23-24, 9723–9737, 2019. DOI: [10.1007/s00253-019-10214-5](https://doi.org/10.1007/s00253-019-10214-5)

LIU, Y.; SHAO, Z.; RENG, X.; ZHOU, J. Dye-decolorization of a newly isolated strain *Bacillus amyloliquefaciens* W36. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 37, 8, 2021. DOI: [10.1007/s11274-020-02974-4](https://doi.org/10.1007/s11274-020-02974-4).

LV, G. Y.; CHENG, J. H.; CHEN, X. Y.; ZHANG, Z. F.; FAN, L. F. Decolorization of malachite green by *Deinococcus radiodurans* R1. **Bioresource Technology**, 144, 275–280, 2013. DOI: [10.1016/j.biortech.2013.07.003](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.003)

MALEKI, R.; FARHADI, K.; NIKKHAHI, Y. Trace determination of malachite green in water samples using dispersive liquid–liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-diode array detection. **International Journal of**

**Environmental Analytical Chemistry**, 92, 9, 1026–1035, 2012. DOI: [10.1080/03067319.2010.536227](https://doi.org/10.1080/03067319.2010.536227)

MILANI, D.; BARTLETT, A. J.; DE SOLLA, S. R.; PARROTT, J. L.; INTINI, K. D.; LEGAULT, D.; UNSWORTH, J.; BALAKRISHNAN, V. K. Comparative toxicity of azo dyes to two infaunal organisms (*Hexagenia spp.* and *Tubifex tubifex*) in spiked-sediment exposures. **Environmental Science and Pollution Research**, 25, 7, 6937-6950, 2018. DOI: [10.1007/s11356-017-0993-z](https://doi.org/10.1007/s11356-017-0993-z)

MITROWSKA, K.; POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J. The effects of cooking on residues of malachite green and leucomalachite green in carp muscles. **Analytica Chimica Acta**, 586, 1-2, 420–425, 2007. DOI: [10.1016/j.aca.2007.01.042](https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.01.042)

MPOUNTOUKAS, P.; PANTAZAKI, A.; KOSTARELI, E.; CHRISTODOULOU, P.; KARELI, D.; POLILIOU, S.; MOURELATOS, C.; LAMBROPOULOU, V.; LIALIARIS, T. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. **Food and Chemical Toxicology**, 48, 10, 2934-2944, 2010. DOI: [10.1016/j.fct.2010.07.030](https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.030)

NADAROGLU, H.; TASGIN, E. Purification and characterisation of laccase from *Lactarius volemus* and its application in removal of phenolic compounds from fruit juice. **Journal of Food Agriculture and Environment**, 11, 3, 109-114, 2013.

NATH, J.; BAG, S.; BERA, D.; RAY, L. Biotreatment of malachite green from aqueous solution and simulated textile effluent by growing cells (batch mode) and activated sludge system. **Groundwater for Sustainable Development**, 8, 172–178, 2019. DOI: [10.1016/j.gsd.2018.11.002](https://doi.org/10.1016/j.gsd.2018.11.002)

OLIVEIRA, M. B. DE; ALVES, P. F. S.; TEIXEIRA, M. F. F. SILVA, H, D, DA; SÁ, R. A.; CAMPOS, R. G.C.; CARVALHO, A. J. DE; ASPIAZÚ, I. Fitotoxicidade de herbicidas aplicados em diferentes épocas em pós-emergência do feijão-caupi. **Montes Claros**, 15,1, 62-70, 2013.

PANDE, V.; PANDEY, S. C.; JOSHI, T.; SATI, D.; GANGOLA, S.; KUMAR, S.; SAMANT, M. Biodegradation of toxic dyes: a comparative study of enzyme action in a microbial system. In: \_\_\_\_\_ (org.). **Smart Bioremediation Technologies**, 255-287, 2019. DOI: [10.1016/B978-0-12-818307-6.00014-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818307-6.00014-7)

PARMAR, N; SHUKLA S. Biodegradation of Anthraquinone Based Dye Using an Isolated Strain *Staphylococcus Hominis* Subsp. *hominis* DSM 20328. **Environmental Progress & Sustainable Energy**. 2017. DOI: [10.1002 /ep.12655](https://doi.org/10.1002 /ep.12655)

PARSHETTI, G. K.; KALME, S. D. Biodegradation of malachite green by *Kocuria rosea* MTCC 1532. **Acta Chimica Slovenica**, 53, 4, 492–498, 2006.

PEIXOTO, F., MARINHO, G., RODRIGUES, K. Corantes têxteis: uma revisão. **Holos**, 5, 29, 98-106, 2013. DOI: [10.15628/holos.2013.1239](https://doi.org/10.15628/holos.2013.1239)

PIERRARD, M. A.; KESTEMONT, P.; DELAIVE, E.; DIEU, M.; RAES, M.; SILVESTRE, F. Malachite green toxicity assessed on Asian catfish primary cultures of peripheral

blood mononuclear cells by a proteomic analysis. **Aquatic Toxicology**, 114-115, 142-152, 2012. DOI: [0.1016/j.aquatox.2012.02.020](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.02.020)

QU, W.; HONG, G.; ZHAO, J. Degradation of malachite green dye by *Tenacibaculum* sp. HMG1 isolated from Pacific deep-sea sediments. **Acta Oceanologica Sinica**, 37, 6, 104–111, 2018. DOI: [10.1007/s13131-018-1187-3](https://doi.org/10.1007/s13131-018-1187-3)

RANI B, KUMAR V, SINGH J, BISHT S, TEOTIA P, SHARMA S, KELA R. Bioremediation of dyes by fungi isolated from contaminated dye effluent sites for bio-usability. **Brazilian Journal of Microbiology**, 45, 3, 1055-1063, 2014. DOI: [10.1590/s1517-83822014000300039](https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000300039)

RATHOUR, R.; JAIN, K.; MADAMWAR, D.; DESAI, C. Microaerophilic biodegradation of raw textile effluent by synergistic activity of bacterial community DR4. **Journal of Environmental Management**, 250, 109549. 2019. DOI: [10.1016/j.jenvman.2019.109549](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109549)

RAY, T.; BRAHMA, D.; MITRA, R.; DUTTA, D. Effective Decolorization of Malachite Green Using *Kocuria marina* DAGII and its Toxicological Study. **International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, 113–117, 2018. DOI: [10.1145/3180382.3180411](https://doi.org/10.1145/3180382.3180411)

REN, S.; GUO, J.; ZENG, G.; SUN, G. Decolorization of triphenylmethane, azo, and anthraquinone dyes by a newly isolated *Aeromonas hydrophila* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 72, 1316–1321, 2006. DOI: [10.1007/s00253-006-0418-2](https://doi.org/10.1007/s00253-006-0418-2)

RODRIGUES, J. Auxocromo | Laboratório Online. Matéria publicado no site em 1 de março de 2018. Disponível em <<https://www.fcencias.com/2018/03/01/auxocromo-laboratorio-online/>> Acesso em 9 de março de 2020 as 14:35.

SANTOS, N. S. A. Controle de qualidade em laboratório de ensaios. 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais) - Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Viseu. Viseu, 2011.

SHAH, K. Biodegradation of azo dye compounds. **International Research Journal of Biochemistry and Biotechnology**, 1, 2, 5-13, 2014.

SHANG, N.; DING, M.; DAI, M.; SI, H.; LI, S.; ZHAO, G. Biodegradation of malachite green by an endophytic bacterium *Klebsiella aerogenes* S27 involving a novel oxidoreductase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 103, 5, 2141–2153, 2019. DOI: [10.1007/s00253-018-09583-0](https://doi.org/10.1007/s00253-018-09583-0)

SHUKLA, D.; DAS, M.; KASADE, D; PANDEY, M.; DUBEY, A. K.; YADAV, S. K.; PARMARA, A. S. Sandalwood-derived carbon quantum dots as bioimaging tools to investigate the toxicological effects of malachite green in model organisms. **Chemosphere**, 248, 125998, 2020. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2020.125998](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125998).

SNEHA, U.; POORNIMA, R.; SRIDHAR, S. Optimization and decolorization of malachite green using *Pseudomonas putida*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, 6, 12, 50-57, 2014.

SONG, J.; HAN, G.; WANG, Y.; JIANG, X.; ZHAO, D.; LI, M.; YANG, Z.; MA, Q.; PARALES, R. E.; RUAN, Z.; MU, Y. Pathway and kinetics of malachite green biodegradation by *Pseudomonas veronii*. **Scientific Reports**, 10,1, 2020. DOI: [10.1038/s41598-020-61442-z](https://doi.org/10.1038/s41598-020-61442-z)

SRIVASTAVA, S.; SINHA, R.; ROY, D. Toxicological effects of malachite green. **Aquatic Toxicology**, 66, 3, 319–329, 2004. DOI: [10.1016/j.aquatox.2003.09.008](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.09.008)

STAMMATI, A.; NEBBIA, C.; DE ANGELIS, I.; ALBO, A. G. CARLETTI, M.; REBECCHI, C.; ZAMPAGLIONI, F.; DACASTO, M. Effects of malachite green (MG) and its major metabolite, leucomalachite green (LMG), in two human cell lines. **Toxicology in Vitro**, 19, 7, 853– 858, 2005. DOI: [10.1016/j.tiv.2005.06.021](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.06.021)

SUTAR, S. S.; PATIL, P. J.; TAMBOLI, A. S.; PATIL, D. N.; APINE, O. A.; JADHAV, J. P. Biodegradation and detoxification of malachite green by a newly isolated bioluminescent bacterium *Photobacterium leiognathi* strain MS under RSM optimized culture conditions. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 20, 101183, 2019. DOI: [10.1016/j.bcab.2019.101183](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101183)

TAO, Y.; WANG, F.; MENG, L.; GUO, Y.; HAN, M.; LI, J.; SUN, C.; WANG, S. Biological Decolorization and Degradation of Malachite Green by *Pseudomonas sp.* YB2: Process Optimization and Biodegradation Pathway. **Current Microbiology**, 74, 10, 1210-1215, 2017. DOI: [10.1007/s00284-017-1306-y](https://doi.org/10.1007/s00284-017-1306-y). 2017

TKACZYK, A.; MITROWSKA, K.; POSYNIAK, A. Synthetic organic dyes as contaminants of the aquatic environment and their implications for ecosystems: A review. **Science of the Total Environment**, 717, 137222, 2020. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.137222](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137222)

VASCONCELOS, F., R. Bactérias com potenciais biotecnológicos na descoloração de corantes têxteis. 2010. 64 f. Dissertação (mestrado) em engenharia de pesca. Departamento de engenharia de pesca. Universidade federal do ceara. Fortaleza, 2010.

VELOSO, L. A. Corantes e Pigmentos. Dossiê técnico. **Instituto de Tecnologia do Paraná**, 2012.

VIGNESH, A.; MANIGUNDAN, K.; SANTHOSHKUMAR, J.; SHANMUGASUNDARAM, T.; GOPIKRISHNAN, V.; RADHAKRISHNAN, M.; JOSEPH, J.; AYYASAMY, P. M.; KUMAR, G. D.; MEGANATHAN, R.; BALAGURUNATHAN, R. Microbial degradation, spectral analysis and toxicological assessment of malachite green by *Streptomyces chrestomyceticus* S20. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 43, 8, 1457-1468, 2020. DOI: [10.1007/s00449-020-02339-z](https://doi.org/10.1007/s00449-020-02339-z)

VIJAYALAKSHMIDEVI, S. R.; MUTHUKUMAR, K. Biodegradation of malachite green by *Ochrobactrum* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 30, 429–437, 2014. DOI: [10.1007/s11274-013-1452-8](https://doi.org/10.1007/s11274-013-1452-8)

WANG, J.; QIAO, M.; WEI, K.; DING, J.; LIU, Z.; ZHANG, K. Q.; HUANG, X. Decolorizing Activity of Malachite Green and Its Mechanisms Involved in Dye Biodegradation by *Achromobacter xylosoxidans* MG1. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, 20, 4, 220–227, 2011. DOI: [10.1159/000330669](https://doi.org/10.1159/000330669)

WANG, J.; GAO, F.; LIU, Z.; QIAO, M.; NIU, X.; ZHANG, K. Q.; HUANG, X. Pathway and Molecular Mechanisms for Malachite Green Biodegradation in *Exiguobacterium* sp. MG2. **PLoS ONE**, 7, 12, 1-10, e51808, 2012. DOI: [10.1371/journal.pone.0051808](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051808)

WANYONYI, W. C.; ONYARI, J. M.; SHIUNDU, P. M.; MULAA, F. J. Biodegradation and Detoxification of Malachite Green Dye Using Novel Enzymes from *Bacillus cereus* Strain KM201428: Kinetic and Metabolite Analysis. **Energy Procedia**, 119, 38-51, 2017. DOI: [10.1016/j.egypro.2017.07.044](https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.07.044)

WATHARKAR, A. D.; KHANDARE, R. V.; WAGHMARE, P. R.; JAGADALE, A. D., GOVINDWAR, S., P. JADHAV, J. P. Treatment of textile effluent in a developed phytoreactor with immobilized bacterial augmentation and subsequent toxicity studies on *Etheostoma olmstedii* fish. **Journal of Hazardous Materials**, 283, 698–704, 2015. DOI: [10.1016/j.jhazmat.2014.10.019](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.019)

WU, J.; LI, L.; DU, H.; JIANG, L.; ZHANG, Q.; WEI, Z.; WANG, X.; XIAO, L.; YANG, L. Lipoproteins Binding Malachite Green to Slow the Decolorization of Malachite Green in *Pseudomonas* sp. JT-1. **Microbes and Environments**, 26, 1, 81–83, 2011. DOI: [10.1264/jsme2.ME10162](https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10162)

XIAO, Y. Z.; CHEN, Q.; HANG, J.; SHI, Y. Y.; XIAO, Y. Z.; WU, J.; HONG, Y. Z.; WANG Y. P. Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. **Mycologia**, 96, 1, 26-35, 2004.

XU, K. Z.; MA, H., WANG, Y. J.; CAI, Y. J.; LIAO, X. R.; GUAN, Z. B. Extracellular expression of mutant CotA-laccase SF in *Escherichia coli* and its degradation of malachite green. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 193, 110335, 2020. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2020.110335](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110335)

YAGUB, M. T.; SEN, T. K.; AFROZE, S.; ANG, H. M. Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, 209, 172-184, 2014. DOI: [10.1016/j.cis.2014.04.002](https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.04.002)

YANG, J.; YANG, X.; LIN, Y.; NG, T. B.; LIN, J.; YE, X. Laccase-Catalyzed Decolorization of Malachite Green: Performance Optimization and Degradation Mechanism. **PLoS One**, 10, 5, 2015. e0127714. Published online 2015 May 28. DOI: [10.1371/journal.pone.0127714](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127714)

YANG, X.; ZHENG, J.; LU, Y.; JIA, R. Degradation and detoxification of the triphenylmethane dye malachite green catalyzed by crude manganese peroxidase

from *Irpex lacteus* F17. **Environmental Science and Pollution Research**, 23, 10, 9585-9597, 2016. DOI: [10.1007/s11356-016-6164-9](https://doi.org/10.1007/s11356-016-6164-9)

ZANONI, B; YAMANAKA, H. Corantes caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento. São Paulo: **cultura acadêmica**, 2016.

ZHOU, X.; ZHANG, J.; PAN, Z.; LI, D. Review of Methods for the Detection and Determination of Malachite Green and Leuco-Malachite Green in Aquaculture. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 1, 1-20, 2019. DOI: [10.1080/10408347.2018.1456314](https://doi.org/10.1080/10408347.2018.1456314)