

Trabalho de Formatura

Curso de Graduação em Engenharia Ambiental

APLICAÇÃO DE CONSÓRCIO MICROBIANO MARINHO
NA DESTOXIFICAÇÃO DO CONTAMINANTE PIRENO

Carla de Rezende Leme

Prof(a).Dr(a). Lara Durães Sette

Rio Claro (SP)

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Geociências e Ciências Exatas
Câmpus de Rio Claro

CARLA DE REZENDE LEME

APLICAÇÃO DE CONSÓRCIO MICROBIANO MARINHO
NA DESTOXIFICAÇÃO DO CONTAMINANTE PIRENO

Trabalho de Formatura apresentado ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas - Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, para obtenção do grau de Engenheiro Ambiental.

Rio Claro - SP
2016

620.1122 Leme, Carla de Rezende
L551a Aplicação de consórcio microbiano marinho na destoxificação do
contaminante pireno / Carla de Rezende Leme. - Rio Claro, 2016
54 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Engenharia ambiental) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas
Orientador: Lara Durães Sette
Coorientadora: Gabriela Alves Licursi Vieira

1. Biodegradação. 2. Biorremediação. 3. Destoxificação ambiental. 4.
Enzimas ligninolíticas. 5. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 6.
Planejamento experimental. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

CARLA DE REZENDE LEME

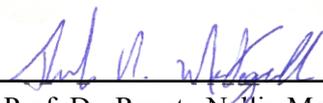
APLICAÇÃO DE CONSÓRCIO MICROBIANO MARINHO NA
DESTOXIFICAÇÃO DO CONTAMINANTE PIRENO

Trabalho de Formatura apresentado ao Instituto de
Geociências e Ciências Exatas - Câmpus de Rio
Claro, da Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, para obtenção do grau de
Engenheiro Ambiental.

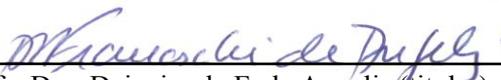
Comissão Examinadora



Profª. Dra. Lara Durães Sette (orientadora)
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho



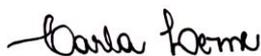
Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli (titular)
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho



Profª. Dra. Dejanira de F. de Angelis (titular)
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Dr. Eduardo Marin Morales (suplente)
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Rio Claro, 21 de novembro de 2016.



Assinatura da aluna

AGRADECIMENTOS

Este trabalho de conclusão encerra um longo caminho de conhecimento que não seria trilhado sem a colaboração de muitos envolvidos. Deixo meus sinceros agradecimentos,

À família, que mostrou seu apoio durante todos esses anos,

À universidade, onde a sabedoria foi construída,

À professora Lara e à Gabriela por todo conhecimento transmitido,

Ao pessoal do LAMAI por toda a ajuda e pelo convívio,

E, por fim, às amigas da turma Ambiental 2012 pelos momentos de descontração e os de dedicação também. Que o caminho de todos seja repleto de conquistas!

RESUMO

Diversos estudos prévios na área de microbiologia ambiental demonstram o potencial apresentado por micro-organismos em degradar e destoxificar ambientes contaminados por compostos orgânicos. Estes estudos buscam novas soluções capazes de controlar os danos proporcionados pelas atividades antrópicas poluidoras. Neste contexto, o presente trabalho teve como foco a avaliação de diferentes fatores na destoxificação do hidrocarboneto policíclico aromático pireno por consórcio microbiano de origem marinha, aplicando-se a técnica do planejamento experimental. Os fungos filamentosos de origem marinha *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 e *Mucor racemosus* CBMAI 847 juntamente com as bactérias *Dietzia* sp. CBMAI 705 e *Bacillus* sp. CBMAI 707 isoladas de petróleo degradado apresentaram resultados eficientes nos testes de toxicidade, possibilitando uma taxa de sobrevivência de até 68,53% dos microcrustáceos *Artemia* sp. Os baixos valores obtidos na avaliação da atividade enzimática indicam que as enzimas ligninolíticas não parecem estar diretamente envolvidas com o processo de destoxificação do pireno pelo consórcio estudado, sugerindo que outras enzimas ou rotas metabólicas estariam participando do processo de destoxificação. Os resultados do presente trabalho evidenciam o potencial biotecnológico dos micro-organismos de origem marinha.

Palavras-chave: Biorremediação. Destoxificação ambiental. Enzimas ligninolíticas. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Planejamento experimental.

ABSTRACT

Several previous studies related to the environmental microbiology have been demonstrating the potential presented by microorganisms to degrade and detoxify environments contaminated by organic compounds. These studies focus in the searching of new solutions in order to control the damages caused by the pollution from anthropogenic activities. In this context, the present study focused on the evaluation of different factors in the detoxification of the polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene by marine-derived microbial consortium, applying the Design of Experiments (DOE) technique. Filamentous fungi *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 and *Mucor racemosus* CBMAI 847 from marine origin along with the bacteria *Dietzia* sp. CBMAI 705 and *Bacillus* sp. CBMAI 707 isolated from degraded petroleum provided efficient results in the toxicity tests, allowing a survival rate of up to 68.53% to the microcrustaceans *Artemia* sp. The low values obtained in the enzymatic activity evaluation indicate that lignin-degrading enzymes do not seem to be directly involved in the process of detoxification of pyrene by the studied consortium, suggesting that other enzymes or metabolic routes may have been participating in the detoxification process. Results from the present study highlight the biotechnological potential of the marine-derived microorganisms.

Keywords: Bioremediation. Environmental detoxification. Lignin-degrading enzymes. Polycyclic aromatic hydrocarbons. Design of experiments.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação de molécula de lignina presente na planta <i>Populus</i> sp.....	15
Figura 2 – A estrutura policíclica aromática do pireno	17
Figura 3 – Etapas do procedimento de obtenção do sobrenadante dos ensaios do PB.....	25
Figura 4 – Características macro e microscópicas do <i>Mucor racemosus</i> CBMAI 847.....	30
Figura 5 – Características macro e microscópicas do <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062	31
Figura 6 – Características macroscópicas e microscópicas da <i>Dietzia</i> sp. CBMAI 705	32
Figura 7 – Características macroscópicas e microscópicas do <i>Bacillus</i> sp. CBMAI 707	32
Figura 8 – Atividade enzimática média de Lacase para os ensaios 17 e controles	40
Figura 9 – Atividade enzimática média de LiP para os ensaios 17 e controles.....	41
Figura 10 – Atividade enzimática média de MnP para os ensaios 17 e controles.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – As variáveis empregadas no Plackett-Burman e suas respectivas concentrações ..	22
Tabela 2 – As variáveis empregadas no DCCR e seus respectivos valores	23
Tabela 3 - Composição dos ensaios e controles da validação experimental	26
Tabela 4 – Taxa de sobrevivência de <i>Artemia</i> sp. em teste de toxicidade realizado nos ensaios do planejamento Plackett-Burman.....	33
Tabela 5 – Análise estatística do Plackett-Burman pelo <i>software</i> STATISTICA 7.0.....	34
Tabela 6 – Taxa de sobrevivência de <i>Artemia</i> sp. em teste de toxicidade realizado nos ensaios do planejamento DCCR.....	36
Tabela 7 – As variáveis do ensaio número 17 do planejamento PB e seus respectivos valores fixados para validação experimental	36
Tabela 8 – Taxa de sobrevivência e mobilidade de <i>Artemia</i> sp. em teste de toxicidade realizado nos ensaios e controles da validação do experimento 17 do PB.....	37
Tabela 9 – Taxa de sobrevivência e mobilidade de <i>Artemia</i> sp. em teste de toxicidade realizado no ensaio número 17 modificado	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. Os Processos Biológicos de Remediação	11
2.2. Os Micro-organismos como Degradores	12
2.3. O Papel das Enzimas na Degradação de Poluentes	13
2.3.1. <i>Definição de enzimas e o grupo óxido-redutase</i>	13
2.3.2. <i>As enzimas ligninolíticas e a degradação de contaminantes</i>	14
2.4. O Composto Pireno.....	16
2.4.1. <i>Composição química e propriedades</i>	16
2.4.2. <i>O potencial de toxicidade</i>	17
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo Geral.....	19
3.2. Objetivos Específicos	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. O Consórcio Microbiano	20
4.2. O Planejamento Experimental	20
4.2.1. <i>O delineamento Plackett-Burman</i>	21
4.2.2. <i>O Delineamento Composto Central Rotacional</i>	22
4.3. Condições de Cultivo e Montagem dos Ensaios do Planejamento Experimental	24
4.4. Teste de Toxicidade	25
4.5. Validação Experimental.....	26
4.6. Avaliação da Atividade Enzimática.....	27
4.6.1. <i>Lacase</i>	27
4.6.2. <i>Lignina peroxidase (LiP)</i>	27
4.6.3. <i>Manganês peroxidase (MnP)</i>	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. O Consórcio Microbiano	29
5.1.1. <i>Mucor racemosus</i>	29
5.1.2. <i>Marasmiellus sp.</i>	30
5.1.3. <i>Dietzia sp.</i>	31
5.1.4. <i>Bacillus sp.</i>	31

5.2.	A Condição Otimizada de Destoxificação.....	33
5.3.	A Validação da Condição Otimizada.....	37
5.4.	Experimento Adicional: O Ensaio Número 17 Modificado	38
5.5.	A Atividade Enzimática dos Ensaios.....	39
5.5.1.	<i>Produção de enzimas lacase</i>	39
5.5.2.	<i>Produção de enzimas lignina peroxidase (LiP)</i>	40
5.5.3.	<i>Produção de enzimas manganês peroxidase (MnP)</i>	41
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
	REFERÊNCIAS	45
	APÊNDICE A – MATRIZ PLACKETT-BURMAN PARA DESTOXIFICAÇÃO DO PIRENO.....	50
	APÊNDICE B – AS PRINCIPAIS ETAPAS DO EXPERIMENTO	51
	APÊNDICE C – CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE	52
	APÊNDICE D – CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LiP	53
	APÊNDICE E – CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MnP	54

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Atualmente, assuntos relacionados à poluição atraem cada vez mais a atenção da população e ganham mais espaço dentro da área de pesquisa. O tema ganha destaque devido, principalmente, aos impactos sobre a saúde dos indivíduos e do meio ambiente como um todo. De acordo com o relatório anual publicado em 2015 pela entidade sem fins lucrativos Pure Earth, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou, em 2012, que a exposição a poluentes presentes na água, no solo e no ar resultou em 8 milhões de mortes no mundo.

É com a intenção de solucionar os problemas trazidos pela poluição que diversos estudos na área de remediação são conduzidos. Neste trabalho, os processos biológicos de remediação (biorremediação) ganham destaque e serão detalhados nas próximas seções.

Sendo assim, diante dos grandes impactos ambientais provocados pelo aumento de atividades antrópicas que geram poluição nos meios terrestre, aquático e atmosférico, diversas pesquisas buscam novas soluções capazes de controlar, minimizar e eliminar os danos proporcionados por estas práticas de pouca consciência ambiental. Desta forma, surge na biorremediação uma alternativa capaz de reverter este quadro, com a possibilidade de recuperar ambientes contaminados, bem como a saúde e o bem-estar dos indivíduos que nele habitam.

Neste contexto, o presente trabalho teve como foco a avaliação da destoxificação do hidrocarboneto policíclico aromático pireno por consórcio microbiano de origem marinha, visando acrescentar novos conhecimentos sobre o comportamento de micro-organismos diante de compostos tóxicos. O presente trabalho teve como base estudos prévios do grupo de pesquisa da Professora Dra. Lara D. Sette (UNESP/Rio Claro) e está associado ao projeto de Doutorado de Gabriela A. L. Vieira (Processo Fapesp 2012/12622-3). Em adição, a redação deste trabalho foi embasada em literaturas especializadas sobre a temática em questão, incluindo livros, periódicos, artigos, dissertações e demais estudos nas áreas de biotecnologia, microbiologia, química ambiental, bioquímica, poluição ambiental, entre outras.

De maneira otimista, espera-se que o presente trabalho possa complementar outros estudos existentes na área acadêmica e, possivelmente, transmitir o conhecimento alcançado para leitores, pesquisadores e demais interessados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para contextualizar os problemas ambientais gerados pela contaminação de águas, solos e atmosfera, assim como os possíveis processos biológicos de remediação, os itens da revisão bibliográfica, a seguir, reúnem as principais informações sobre os assuntos abordados no presente trabalho. Acrescenta-se como orientação, que os termos “poluente” e “contaminante” são utilizados sem distinção ao longo das próximas seções.

2.1. Os Processos Biológicos de Remediação

De acordo com Vallero (2010), a biorremediação ocorre quando as atividades biológicas dos organismos são utilizadas para diminuir ou, se possível, eliminar a presença de contaminantes em um determinado local. Em outras palavras, os micro-organismos passam a utilizar o contaminante como sua fonte de carbono e energia, desta forma, os processos biológicos podem fornecer soluções para grandes problemas atuais como, por exemplo, a contaminação dos recursos naturais.

O objetivo principal da biorremediação é selecionar um micro-organismo do ambiente e colocá-lo em contato com um determinado contaminante, sob condições controladas, de maneira que ele seja capaz de degradar este composto e transformá-lo em compostos mais simples e menos tóxicos.

Entre os organismos mais comuns aplicados com a finalidade de remediar encontram-se plantas, bactérias e fungos (associados às suas fortes enzimas oxidantes) que possuem o potencial de degradar ou imobilizar um contaminante químico presente no ambiente, permitindo a transformação deste composto recalcitrante e evitando seus efeitos nocivos (MORGENSTERN et al., 2014; VALLERO, 2010).

O sucesso da biorremediação vai depender do crescimento, tamanho e sobrevivência da população microbiana. Para Vallero (2010), alguns dos fatores essenciais para garantir o êxito de uma remediação biológica são: i) um número suficiente de células de um micro-organismo; ii) a capacidade dos micro-organismos de entrar em contato com a substância a ser degradada; iii) a caracterização das condições abióticas locais; iv) a correta combinação das condições ambientais com o organismo selecionado e v) o conhecimento da movimentação do contaminante, de forma que o mesmo entre em contato com os organismos. Portanto, a biorremediação é um processo de otimização, onde devem ser selecionadas as melhores opções entre uma série de fatores biológicos, químicos e físicos. Ainda segundo o

autor, quando os organismos vivos são capazes de quebrar diversos compostos em espécies químicas menos tóxicas por meio de suas enzimas, ou de outras maneiras, ocorre o processo conhecido como biodegradação.

Os compostos resultantes deste processo de degradação podem variar consideravelmente dependendo da substância inicial presente no meio e das espécies adotadas para a degradação. Os produtos da biodegradação completa, isto é, a mineralização, são apenas dióxido de carbono e água. Qualquer processo abaixo da mineralização vai gerar compostos mais simples que o original, com características físicas e químicas diferentes, porém não necessariamente menos tóxicos. Estes novos produtos podem ter níveis variados de toxicidade e mobilidade no ambiente (VALLERO, 2010).

É válido mencionar que a biorremediação possui limitações. Dois grandes fatores limitantes de qualquer processo biológico de degradação são: a inerente biodegradabilidade do composto em questão e sua toxicidade à população microbiana (VALLERO, 2010).

Conforme os mecanismos de ação deste processo são melhores compreendidos, a eficácia da degradação será aumentada. Logo, são necessários contínuos estudos na área para que o processo seja aprimorado, de forma que se ampliem os benefícios e minimizem os custos de um tratamento biológico (VALLERO, 2010).

2.2. Os Micro-organismos como Degradadores

Os micro-organismos são conhecidos agentes degradadores, capazes de modificar moléculas orgânicas complexas transformando-as em produtos mais simples e solúveis em água. De acordo com Singh, Singh e Sharma (2014), em um primeiro momento, o composto químico será modificado pelo aparelho enzimático do micro-organismo. A presença de contaminantes no ambiente pode induzir ou reprimir a função enzimática desses micro-organismos. Esta capacidade dependerá das características da comunidade microbiana e dos grupos funcionais existentes no composto tóxico.

De acordo com informações reportadas pelo National Research Council (1993), o contaminante orgânico tem duas finalidades para um micro-organismo: fornecer o carbono necessário para a construção de novas células, bem como fornecer elétrons. É com a troca de elétrons que o micro-organismo vai obter sua energia. Este tipo de reação química é chamado de oxidação e redução. Nesta reação, o contaminante orgânico será oxidado, isto é, perderá elétrons, enquanto outro composto será reduzido, ganhando elétrons. Para os micro-organismos, a troca de elétrons ocorre durante o metabolismo aeróbio e anaeróbio em geral.

Neste processo, os micro-organismos usam o oxigênio (O_2) para oxidar parte do carbono presente no contaminante, transformando-o em dióxido de carbono (CO_2), o resto do carbono será utilizado pela comunidade microbiana para construir nova massa celular. O oxigênio, por sua vez, será reduzido, produzindo água. Se o processo for capaz de quebrar completamente a molécula do contaminante, gerando apenas CO_2 e água, pode-se dizer que a mineralização do composto foi alcançada.

De maneira geral, um micro-organismo individualmente não consegue mineralizar a maioria dos compostos tóxicos. Por outro lado, um consórcio de micro-organismos tem a capacidade de realizar sucessivas ações de degradação que podem resultar na completa mineralização do composto. As comunidades microbianas, em diversos habitats, possuem uma incrível versatilidade fisiológica e podem ser capazes de metabolizar e até mesmo mineralizar um grande número de moléculas orgânicas (SINGH; SINGH; SHARMA, 2014).

Entretanto, a eficiência dos agentes degradadores fora das condições controladas de laboratório pode ser alterada. A eficiência de um micro-organismo é influenciada pelo pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio, umidade, salinidade, quantidade e proporção de nutrientes, disponibilidade do contaminante no meio, entre outros fatores. Embora alguns micro-organismos resistam a ambientes extremos, a maioria se desenvolve em condições ótimas – difíceis de serem encontradas fora de um laboratório (DUA et al., 2002).

2.3. O Papel das Enzimas na Degradação de Poluentes

O processo de biorremediação vai depender principalmente de micro-organismos capazes de modificar enzimaticamente os compostos poluentes, convertendo-os em produtos inofensivos ao meio. Consta na literatura especializada um grande número de enzimas produzidas por bactérias, fungos e plantas, que estão envolvidas nos processos de degradação de poluentes tóxicos orgânicos. A seguir, são apresentadas algumas das principais enzimas relacionadas com a degradação de compostos poluentes por micro-organismos.

2.3.1. *Definição de enzimas e o grupo óxido-redutase*

Enzimas são catalisadores biológicos, isto é, capazes de modificar a velocidade de uma reação química, facilitando a conversão de substratos em produtos e proporcionando as condições que diminuem a energia de ativação da reação. Em uma enzima, as regiões diretamente envolvidas no processo catalítico são chamadas de sítios ativos. Com base em seu

local de ação, são considerados dois tipos de enzimas: intracelular, quando agem dentro da membrana celular, ou extracelular, quando agem fora dela. Os nomes dados às enzimas estão relacionados com suas funções, particularmente, com o tipo de reação catalisada por elas (KARIGAR; RAO, 2011).

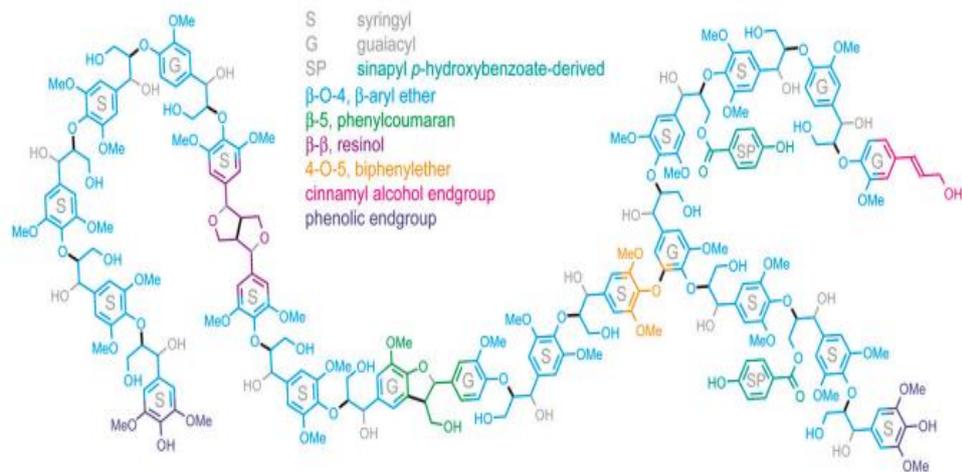
De acordo com Karigar e Rao (2011), a International Union of Biochemistry and Molecular Biology, agrupa todas as enzimas conhecidas atualmente em seis grandes classes: (1) óxido-redutases, (2) transferases, (3) hidrolases, (4) liases, (5) isomerases e (6) ligases.

As óxido-redutases são as enzimas que catalisam as reações de oxidação e redução. Elas são capazes de realizar a transferência de elétrons de um composto doador para um receptor. A destoxificação de compostos orgânicos tóxicos, realizada por bactérias, fungos e outros organismos, ocorre através da oxidação de elementos do composto mediada por enzimas óxido-redutases. De maneira geral, durante as reações de oxidação-redução, as ligações químicas do contaminante serão quebradas, transformando-o em outro composto menos perigoso (GIANFREDA; XU; BOLLAG, 1999). Segundo os autores, a capacidade dos fungos de destoxificar ambientes com presença de contaminantes se deve, principalmente, à ação de enzimas óxido-redutases extracelulares como a lacase, por exemplo, que são liberadas do micélio fúngico para o ambiente.

2.3.2. *As enzimas ligninolíticas e a degradação de contaminantes*

As enzimas ligninolíticas são as enzimas responsáveis por catalisar as reações de degradação da lignina (BONUGLI-SANTOS; DURRANT; SETTE, 2011). A lignina é um polímero fenólico encontrado na parede celular de plantas, associada à celulose, conferindo rigidez, impermeabilidade e resistência aos tecidos vegetais, tornando a planta bastante resistente à decomposição biológica. A lignina pode desacelerar ou até mesmo impedir a atuação microbiana sobre o material da parede celular (SOUZA, 2012). Um exemplo contendo parte de uma molécula de lignina presente em planta do gênero *Populus* pode ser verificado na Figura 1.

Figura 1 – Representação de molécula de lignina presente na planta *Populus* sp.



Fonte: Stewart (2009).

As enzimas degradadoras de lignina consideradas mais importantes são: as lacases, lignina peroxidases e manganês peroxidases. Essas ligninases têm papel importante no tratamento enzimático de contaminantes de composição variada, uma vez que não possuem alta especificidade pelos seus substratos por conta da estrutura diversificada da lignina (BONUGLI-SANTOS; DURRANT; SETTE, 2011). Dessa maneira, os compostos sintéticos com estrutura química semelhante a compostos naturais podem ser reconhecidos pelo sítio ativo da enzima, o que possibilita a transformação química e possível degradação destes compostos (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

De acordo com Bonugli-Santos, Durrant e Sette (2011), os micro-organismos notáveis pela eficiente produção de enzimas ligninolíticas podem ser aproveitados na biorremediação de diversos contaminantes, uma vez que suas enzimas pouco específicas podem consumir diferentes substratos.

A especificidade da enzima é uma propriedade relacionada à reação que ela catalisa. As enzimas podem apresentar diferentes graus de especificidade: (1) baixo ou pela ligação química; (2) moderado ou pela estrutura química; (3) absoluto ou pelo substrato; (4) óptico ou pela configuração estereoquímica e (5) dupla especificidade, onde a enzima pode agir em dois substratos por meio de uma reação ou em um substrato por meio de duas reações (SELIM, 2016).

Com relação à produção enzimática, os fungos derivados de ambientes marinhos apresentam a capacidade de produzir enzimas ligninolíticas, assim como as espécies terrestres, porém, por estarem adaptados à salinidade encontrada nestes ambientes constituem

um importante grupo de organismos qualificados para biorremediação de ambientes ou processos salinos (BUGNI; IRELAND, 2004; D'SOUZA et al., 2009).

2.4. O Composto Pireno

O contaminante utilizado no presente trabalho refere-se a um composto orgânico da família dos hidrocarbonetos, isto é, formado basicamente por átomos de carbono e hidrogênio (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012). Os próximos itens discorrem sobre os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de forma geral, a composição química do pireno, suas principais propriedades e sua potencial toxicidade.

2.4.1. *Composição química e propriedades*

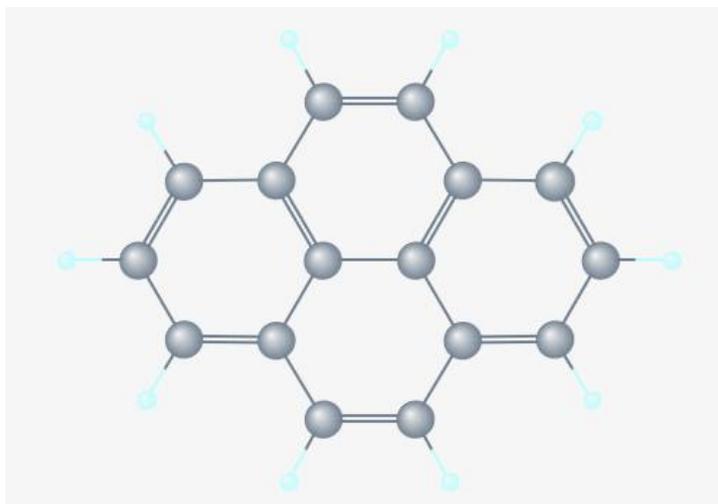
De acordo com o National Center for Biotechnology Informations (NCBI) (2016), o pireno é um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) constituído por quatro anéis aromáticos condensados.

Os HPAs são moléculas formadas por dois ou mais anéis aromáticos condensados em uma variedade de configurações estruturais, conferindo a essas moléculas diferentes propriedades. A variação do número de anéis pode influenciar algumas propriedades, por exemplo, um aumento do número de anéis do composto diminui sua volatilidade e solubilidade, por outro lado, eleva sua hidrofobicidade, toxicidade e recalcitrância (LOUVADO et al., 2015).

Como propriedades físico-químicas o pireno apresenta: fórmula molecular $C_{16}H_{10}$; massa molecular 202,256 g/mol; ponto de fusão $151^{\circ}C$ a 1 atm de pressão; ponto de ebulição $404^{\circ}C$ a 1 atm de pressão; boa solubilidade em etanol, benzeno, tolueno, solventes orgânicos em geral, entre outros (NCBI, 2016). A estrutura do composto pireno é indicada na Figura 2.

O pireno é um produto da combustão incompleta, decorrente de gases exalados por veículos; fumaças produzidas por cigarros; queima de combustíveis como carvão, petróleo e madeira; bem como outros processos que resultam em seu lançamento direto no ambiente. Quando lançado na atmosfera, o pireno pode existir na forma de vapor e material particulado (NCBI, 2016).

Figura 2 – A estrutura policíclica aromática do pireno



Fonte: NCBI (2016)

2.4.2. *O potencial de toxicidade*

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos possuem propriedades físico-químicas que lhes confere alta mobilidade no ambiente, permitindo sua distribuição pelo ar, solo e corpos d'água (AMARILLO; BUSSO; CARRERAS, 2014). A principal preocupação com os HPAs são seus efeitos adversos sobre a saúde, sendo alguns deles carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos¹ (USEPA, 2011). Consequentemente muitos HPAs foram classificados como poluentes prioritários pela Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA).

Segundo Amarillo, Busso e Carreras (2014), a combustão incompleta de combustíveis a base de carbono gera diversos hidrocarbonetos, da mesma maneira que ocorre para o pireno. Outras fontes de dispersão podem ser de origem natural, industrial, comercial, residencial e veicular, como por exemplo: queima de combustíveis fósseis, escapamento de veículos, queima da madeira e de resíduos agrícolas (MISHRA; AYOKO; MORAWSKA, 2016), atividade mineradora, incêndios florestais, derramamento de petróleo, incineração de resíduos plásticos entre outras fontes (ANTIZAR-LADISLAO; LOPEZ-REAL; BECK, 2006).

O pireno, um dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos mais comumente encontrados, também consta na lista de poluente prioritários da USEPA, embora ele não seja tão potencialmente carcinogênico ou tóxico quanto alguns HPAs com cinco ou mais anéis

¹ Define-se como agente teratogênico qualquer substância que, estando presente durante a vida embrionária ou fetal, pode produzir alteração nas estruturas ou funções da descendência (SIAT, 2016).

aromáticos. Contudo, a toxicidade do pireno sobre diversas espécies em determinadas condições não deve ser descartada (NAVARRO et al., 2013).

Informações toxicológicas sobre o pireno apontam seu potencial mutagênico em células somáticas de mamíferos, assim como em bactérias e leveduras, além de seu potencial tumorigênico de acordo com dados de testes conduzidos em animais. O composto pode ser absorvido pelo corpo por inalação, ingestão ou absorção cutânea. Os efeitos potenciais agudos sobre a saúde humana incluem irritações nos olhos e na pele, sendo que a exposição ao sol aumenta o efeito irritante desta substância, podendo resultar em descoloração crônica da epiderme. Em caso de ingestão, pode provocar lesões gastrointestinais, bem como afetar o comportamento dos sistemas nervoso, imunológico, urinário e fígado. Já a inalação desta substância pode causar irritações no trato respiratório (SCIENCE LAB, 2005).

Estudos realizados mostraram que a população, de modo geral, é exposta ao pireno mediante inalação ou contato com a pele, principalmente, em regiões industriais ou com tráfego intenso, devido à alta dispersão de poluentes. A exposição também pode ocorrer através do consumo de água ou alimentos contaminados (NCBI, 2016).

O pireno está frequentemente associado a outros compostos aromáticos. Esta mistura complexa de aromáticos pode ser mais tóxica e mais perigosa do que seus compostos seriam individualmente. Quando despejado na água, o pireno é adsorvido pelos sedimentos, sendo capaz de bioacumular de forma leve a moderada em organismos aquáticos como crustáceos, peixes, algas e moluscos. Quando liberado em ambiente terrestre, este contaminante é adsorvido pelas partículas dos solos, podendo atingir as águas subterrâneas. O grau de perigo apresentado pelo pireno reflete nos critérios rigorosos adotados para a água potável e alguns outros meios, sendo tolerada apenas uma baixa concentração deste contaminante: valores de concentração na água considerados típicos vão de 0,00023 – 11,8 µg/L, enquanto valores acima de 0,08 mg/L são considerados altos. Embora sua concentração seja mais elevada próximo às fontes primárias, sua presença em locais distantes indica que ele é razoavelmente estável na atmosfera e capaz de ser transportado por longas distâncias (IRWIN et al., 1997).

Com relação à biodegradação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, alguns micro-organismos são capazes de degradar estes compostos através de seu complexo enzimático, convertendo-os em produtos menos tóxicos. Para garantir a segurança ambiental é preciso identificar os produtos intermediários gerados nessa conversão (SHARMA et al., 2016).

3. OBJETIVOS

A fim de orientar a condução dessa pesquisa, alguns objetivos iniciais foram propostos e mantidos até o final do presente trabalho.

3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho está associado ao projeto intitulado “Destoxificação e Descoloração de Poluentes Ambientais por Consórcios Microbianos Marinhos” (Processo Fapesp 2012/12622-3) que envolveu o estudo de destoxificação e degradação dos poluentes ambientais: diesel, corante têxtil e pireno, por consórcios de micro-organismos derivados de ambiente marinho.

A pesquisa realizada neste Trabalho de Conclusão de Curso teve como objetivo principal avaliar diferentes fatores na destoxificação do pireno pelo consórcio microbiano previamente selecionado na Tese de Doutorado supracitada, aplicando-se os métodos estatísticos Plackett-Burman e Delineamento Composto Central Rotacional, buscando a condição otimizada da destoxificação.

3.2. Objetivos Específicos

- i) Avaliar a interação de diversas variáveis envolvidas no cultivo do consórcio microbiano previamente selecionado, através dos planejamentos Plackett-Burman e Delineamento Composto Central Rotacional visando à otimização da destoxificação dos ensaios com pireno;
- ii) Realizar testes de toxicidade nas amostras com a finalidade de validar a melhor condição encontrada no planejamento experimental, isto é, a condição que apresentou melhor indício de destoxificação;
- iii) Verificar a produção de enzimas ligninolíticas (lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase) na condição otimizada e validada de destoxificação do pireno pelo consórcio estudado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção do presente trabalho, são detalhados os micro-organismos, reagentes químicos, aparelhos e quaisquer materiais utilizados no laboratório, assim como os métodos adotados para a condução da pesquisa.

4.1. O Consórcio Microbiano

O consórcio microbiano utilizado no presente trabalho é constituído por 4 micro-organismos:

- Dois fungos filamentosos (*Mucor racemosus* CBMAI 847 e *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062) previamente isolados de ambientes marinhos da costa brasileira e estudados quanto à capacidade de degradação de HPAs e produção de enzimas ligninolíticas pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Lara Sette (UNESP/RC);
- Duas bactérias (*Dietzia* sp. CBMAI 705 e *Bacillus* sp. CBMAI 707) isoladas de reservatório de petróleo (*offshore*) pelo grupo de pesquisa da Dra. Valéria Maia de Oliveira (CPQBA/UNICAMP) e previamente selecionadas pela capacidade de degradação dos hidrocarbonetos fenantreno e/ou *n*-octadecano.

4.2. O Planejamento Experimental

O planejamento de experimentos e a otimização de processos através do delineamento experimental foram realizados visando otimização da taxa de destoxificação do contaminante pireno. Em um processo, diversos fatores ou variáveis podem influenciar a resposta desejada. Desta forma, uma triagem com a finalidade de analisar as variáveis experimentais e as interações entre variáveis que têm influência significativa sobre os diferentes resultados de interesse foi realizada por meio do planejamento experimental.

Para tanto, foi adotado um delineamento do tipo Plackett-Burman (modelo adequado para triagem inicial devido ao grande número de variáveis a serem testadas para alcançar um resultado satisfatório de destoxificação) e um Delineamento Composto Central Rotacional, que permite refinar a resposta obtida (RODRIGUES; IEMMA, 2005). Ambos são descritos nos itens a seguir.

4.2.1. *O delineamento Plackett-Burman*

Rodrigues e Iemma (2005) descrevem o delineamento do tipo Plackett-Burman (PB) como um planejamento fatorial fracionado saturado aplicável para identificar os fatores (ou variáveis) mais importantes na fase inicial do experimento. Para montar a matriz deste delineamento, baseia-se no número de ensaios (N), de 12 a 48, sempre múltiplos de 4, e no número de variáveis independentes. O número de variáveis (k) deve ser menor que o número de ensaios. Recomenda-se que o número de ensaios seja, no mínimo, 4 a mais que o número de variáveis, isto é, $N=k+4$. Outra recomendação dos autores é a adoção de, no mínimo, 3 repetições dos pontos centrais nos ensaios.

O planejamento Plackett-Burman é fundamentado na estatística e, para tanto, as variáveis inseridas adotam valores superiores (+1), que se referem à quantidade máxima daquela variável; valores inferiores (-1), referentes às quantidades mínimas e, por fim, um valor central, que será a quantidade média da variável, auxiliando na determinação do erro padrão do processo (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

No presente trabalho, foi adotado um planejamento com 24 ensaios, sendo 10 ensaios de valor superior (+1); 10 ensaios de valor inferior (-1) e 1 ponto central (0) repetido quatro vezes, além de 13 variáveis que foram selecionadas baseadas em literatura sobre biodegradação de poluentes, bem como nas características dos micro-organismos utilizados. Dessa forma, diferentes fontes de carbono e nitrogênio, pH, salinidade e concentração dos poluentes foram utilizadas como variáveis independentes no estudo estatístico. A salinidade correspondeu ao volume de água do mar artificial (ASW) utilizada nos ensaios, onde 100% era equivalente ao volume total do ensaio composto por ASW, cuja salinidade é de 3,5% e possui a seguinte composição: 23,82 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ • 3,32 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ • 0,044 g de $SrCl_2 \cdot 6H_2O$ em 748 mL de água destilada; 52,64 g de NaCl • 8,82 g de Na_2SO_4 • 1,49 g de KCl • 0,432 g de $NaHCO_3$ • 0,216 g de KBr • 0,058 g de H_3BO_3 em 1452 mL de água destilada.

Para dar início ao estudo da destoxificação do pireno, uma matriz PB com as 13 variáveis e 20 ensaios com 4 pontos centrais foi construída baseada no modelo “Plackett & Burman de 20 ensaios (PB 20): possível avaliar até 16 fatores”, apresentado na obra de Rodrigues e Iemma (2005). Em seguida, essa matriz foi preenchida com as quantidades adotadas para cada variável como pode ser visto no APÊNDICE A. Para facilitar a compreensão, as variáveis do PB e seus respectivos valores foram extraídos da matriz e apresentados em forma de tabela a seguir (Tabela 1).

Tabela 1 – As variáveis empregadas no Plackett-Burman e suas respectivas concentrações

Variáveis	-1	0	1
1. Nº de cilindros do inóculo fúngico (0,5 cm)	2	3	4
2. Inóculo bacteriano (mL/50mL)	1	2	3
3. Glicose (g/50mL)	0	0,5	1
4. Extrato de levedura (g/50mL)	0	0,25	0,5
5. Peptona (g/50mL)	0	0,05	0,1
6. Extrato de malte (g/50mL)	0	0,5	1
7. MnSO ₄ (mM)	0	2	4
8. KH ₂ PO ₄ (mM)	0	0,37	0,73
9. CuSO ₄ (mM)	0	2	4
10. Riboflavina (mM)	0	0,23	0,46
11. Pireno (mg/50mL)	5	10	15
12. pH	6	7	8
13. Salinidade (% em volume)	0	50	100

Fonte: elaborada pela autora (2016).

Após a conclusão dos ensaios PB, uma análise de significância foi realizada fazendo uso do *software STATISTICA 7.0* (STAT SOFT, INC. 1995) e das informações obtidas através dos melhores resultados do teste de toxicidade. Desta forma, o *software* calculou os efeitos principais e o erro padrão do planejamento PB, determinando, assim, o nível de significância da variável. Cabe ao pesquisador utilizar também seus conhecimentos para decidir quais variáveis podem ser fixadas e, portanto, eliminadas do planejamento PB e quais devem seguir sendo estudadas.

Com as variáveis selecionadas pelo processo supracitado prosseguiu-se com a otimização do experimento. Na fase seguinte, foi montado o Delineamento Composto Central Rotacional.

4.2.2. O Delineamento Composto Central Rotacional

Um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) é um planejamento de experimentos do tipo superfície de resposta. Este método se baseia na matemática estatística

para encontrar o resultado otimizado e é utilizado com frequência para refinar modelos após a determinação dos fatores mais significantes por meio de experimentos fatoriais. A diferença entre uma equação de superfície de resposta e a equação para um experimento fatorial é a adição dos termos quadráticos (pontos axiais) que permitem modelar uma curvatura na resposta, o que as torna úteis para determinar os níveis das variáveis que otimizam uma resposta. De modo geral, em um DCCR com 2 níveis originais, tem-se 2^k pontos fatoriais + $(2 \times k)$ pontos axiais + um número arbitrário de repetições do ponto central (recomenda-se, no mínimo, 3 repetições) (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Após a realização do Plackett-Burman, 5 variáveis foram eliminadas, 6 tiveram seu valor fixado e as restantes seguiram sendo estudadas pelo método do DCCR. A Tabela 2 mostra as variáveis do DCCR e seus respectivos valores dentro dos parênteses, assim como seus níveis inferior (-1), superior (1), central (0) e axial ($\pm 1,41$), presentes no delineamento composto. Pela Tabela 2, é possível observar a fórmula adotada por Rodrigues e Iemma (2005) para a montagem do DCCR: com o número de variáveis $k = 2$; o número de ensaios (pontos fatoriais) $2^k = 2^2 = 4$; o número de ensaios (pontos axiais) $2 \times k = 2 \times 2 = 4$ e 1 ponto central repetido 4 vezes, totalizando 12 ensaios.

Tabela 2 – As variáveis empregadas no DCCR e seus respectivos valores

Ensaio	Extrato de malte	pH
1	-1 (1g/50mL)	-1 (6)
2	1 (3g/50mL)	-1 (6)
3	-1 (1g/50mL)	1 (8)
4	1 (3g/50mL)	1 (8)
5	-1,41 (0,59g/50mL)	0 (7)
6	1,41 (3,41g/50mL)	0 (7)
7	0 (2g/50mL)	-1,41 (5,59)
8	0 (2g/50mL)	1,41 (8,41)
9	0 (2g/50mL)	0 (7)
10	0 (2g/50mL)	0 (7)
11	0 (2g/50mL)	0 (7)
12	0 (2g/50mL)	0 (7)

Fonte: elaborada pela autora (2016).

Para Rodrigues e Iemma (2005), existe uma estratégia sequencial para se atingir as condições otimizadas: a seleção de variáveis (por um modelo fatorial fracionado como o PB); a otimização (por um modelo fatorial completo como o DCCR) e a validação da condição otimizada. Essa estratégia foi seguida e, finalizados o PB e DCCR, o melhor resultado de destoxificação foi selecionado para validação das condições de cultivo.

4.3. Condições de Cultivo e Montagem dos Ensaios do Planejamento Experimental

Para que fossem utilizados nos ensaios de destoxificação, os micro-organismos do consórcio foram cultivados para constituição do pré-inóculo. Os fungos filamentosos de origem marinha foram cultivados em meio ágar malte MA 2% (300 mL de água destilada • 6 g de extrato de malte • 5,4 g de ágar), durante 7 dias a 28°C, enquanto as bactérias foram cultivadas em meio ágar nutriente NA (300 mL de água destilada • 8,4 g de ágar nutriente), por 4 dias a 28°C

Após o período de incubação, um determinado número de “plugs” (de acordo com o que fora estabelecido no planejamento PB) era retirado das placas dos fungos e inoculado nos ensaios determinados pela matriz PB. Os erlenmeyers contendo meio de cultivo mais fungos (pré-inóculo) foram incubados a 28°C sob agitação de 140 rpm por 3 dias. As bactérias, um dia após a inoculação dos fungos, eram inoculadas em erlenmeyers contendo meio mineral Zinder (1000 mL de água destilada • 0,5 g de NH_4Cl • 0,4 g de KH_3PO_4 • 0,1 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ • 0,05 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ • 10 mL de solução traço de metais), a 28°C e 140 rpm por 2 dias.

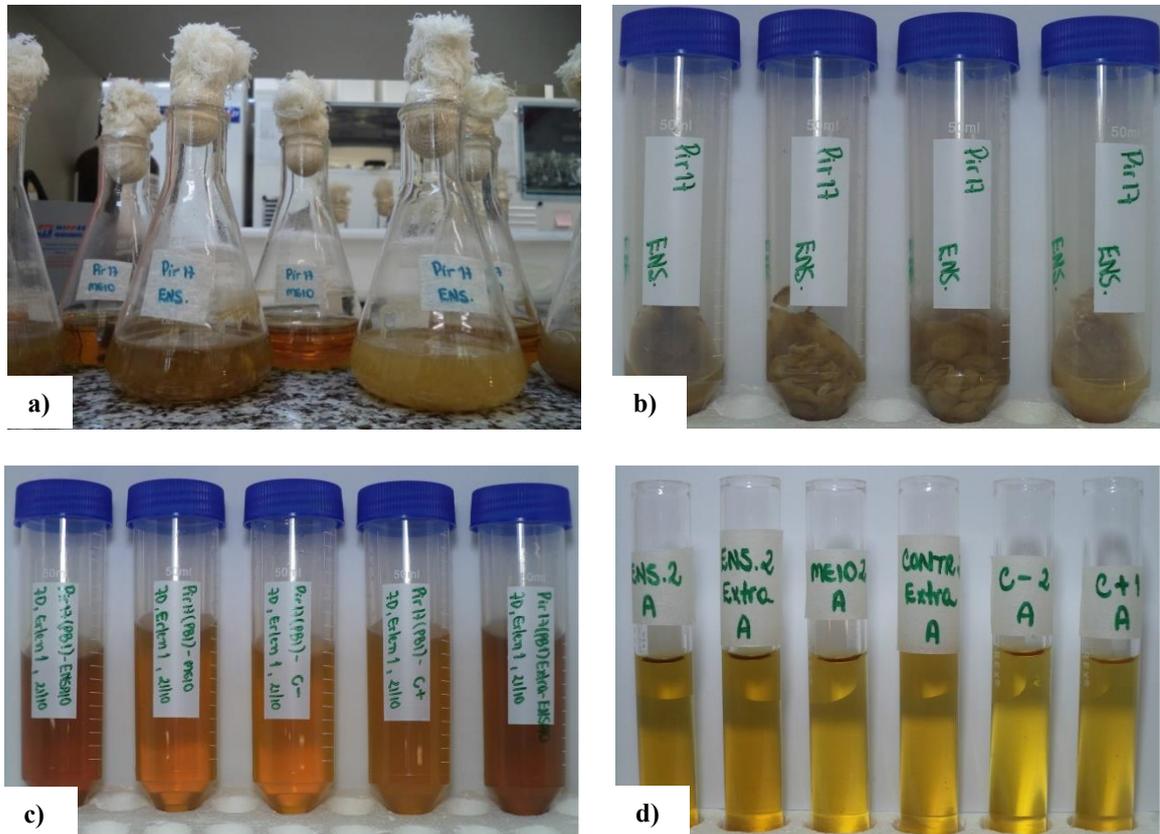
Decorridos os 3 dias de pré-inóculo dos fungos filamentosos, os ensaios estavam prontos para receber o inóculo bacteriano e o poluente pireno. Para tanto, uma amostra de inóculo bacteriano de densidade óptica igual a 0,4 (densidade analisada em espectrofotômetro Biochrom, modelo: Libra 560, em comprimento de onda 600 nm) foi inculada nos ensaios, em volumes estabelecidos para cada ensaio do planejamento.

O pireno (Sigma-Aldrich – 98%) foi diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO), solvente orgânico amplamente utilizado em laboratório, na proporção 15 mg de pireno/0,5 mL de DMSO e adicionado aos ensaios nas concentrações indicadas na Tabela 1 do PB e Tabela 2 do DCCR.

Finalizada a montagem do experimento, os ensaios foram incubados por 7 dias a 28°C sob agitação de 140 rpm. Posterior ao período de 7 dias, os ensaios foram submetidos à centrifugação de 10000 rpm durante 20 minutos. Parte do líquido sobrenadante foi utilizada nos testes de toxicidade e na avaliação da atividade enzimática, o restante foi armazenado em

freezer (-20°C). A Figura 3 retrata o processo de obtenção do sobrenadante para a realização das avaliações de destoxificação e atividade enzimática.

Figura 3 – Etapas do procedimento de obtenção do sobrenadante dos ensaios do PB



Fonte: a autora (2016).

Legenda: em a) erlenmeyers nas situações ensaio, contendo meio de cultivo, micro-organismos e poluente, e meio, contendo apenas meio de cultivo; b) biomassa restante nos tubos falcon após centrifugação da quadruplicata de ensaios; c) comparação entre os líquidos sobrenadantes de ensaio, meio de cultivo, controle negativo, controle positivo e ensaio modificado, respectivamente da esquerda para direita e d) sobrenadantes colocados em tubos de ensaio para aplicação do teste de toxicidade.

Uma ilustração esquemática contendo as principais etapas do experimento, da montagem ao teste de toxicidade, pode ser conferida no APÊNDICE B.

4.4. Teste de Toxicidade

A variável dependente de cada etapa da otimização do processo por planejamento experimental foi a avaliação de toxicidade utilizando o microcrustáceo, de ambiente salino, *Artemia* sp., cujos ovos foram adquiridos em estabelecimento de produtos para aquário. Para

este experimento, a porcentagem de sobrevivência das artêmias correspondia ao nível de destoxificação alcançado na amostra.

Para a realização do teste de destoxificação, uma placa de Petri contendo aproximadamente 40 mL água do mar artificial (ASW) e 0,2 g de ovos do microcrustáceo foi recoberta com plástico filme (com pequenos furos para aeração) e colocada sob luz artificial, por 48 horas para eclosão dos ovos. Após esse tempo, as larvas eclodidas (náuplios) foram empregadas nos ensaios de toxicidade, da seguinte maneira: com auxílio de lupa e pipeta, 30 náuplios foram colocados em contato com 5 mL de amostra de cada ensaio do planejamento e após 24 horas foi verificada a porcentagem de larvas sobreviventes. Para cada ensaio foi realizada a contagem das artêmias em triplicata, totalizando 90 náuplios em 15 mL de amostra.

A taxa de sobrevivência foi apresentada em porcentagem de acordo com a seguinte equação: $T = (100 \times n) / 90$, sendo “n” o número de artêmias vivas na triplicata e “T” a porcentagem de sobrevivência.

4.5. Validação Experimental

Finalizados os planejamentos Plackett-Burman e DCCR, aplicou-se o teste de toxicidade nas amostras e com base no melhor resultado obtido foi apontada a condição otimizada. Esta condição foi repetida para obter sua comprovação.

Para a validação experimental foram feitas quadruplicatas de 4 situações diferentes (1 situação representando o ensaio e outras 3 como parâmetros para controle) de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 - Composição dos ensaios e controles da validação experimental

	Meio de cultivo na condição otimizada	Fungos	Bactérias	Poluente (pireno+DMSO)
Ensaios	•	•	•	•
Meios	•			
Controles (+)	•			•
Controles (-)	•	•	•	

Fonte: elaborada pela autora (2016).

4.6. Avaliação da Atividade Enzimática

A condição de cultivo que melhor favoreceu a destoxificação do poluente ambiental proposto (condição otimizada), após validação experimental, foi avaliada quanto a capacidade de produção de enzimas ligninolíticas, de acordo com os seguintes protocolos abaixo apresentados:

4.6.1. *Lacase*

A atividade enzimática da lacase foi determinada em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo: UV-1800) pela oxidação do 2,2-azino-bis-etilbentiazolína (ABTS): a mistura foi composta de 0,3 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), 0,1 mL de solução de ABTS a 0,03% e 0,6 mL do caldo enzimático (BUSWELL et al., 1995). A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da absorvância a 420 nm ($\epsilon_{420\text{nm}} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) após 10 minutos de incubação a 37°C.

4.6.2. *Lignina peroxidase (LiP)*

A atividade da lignina peroxidase foi avaliada por espectrofotometria UV/VIS, em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo: UV-1800), a partir do aldeído veratrílico produzido ($\epsilon_{310\text{nm}} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) na oxidação do álcool veratrílico usado como substrato. A mistura foi composta por 0,2 mL da solução tampão tartarato de sódio 0,4 M (pH 4,5) com álcool veratrílico 2 mM; 0,2 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 0,6 mL do caldo enzimático. A reação é iniciada adicionando o peróxido de hidrogênio e o aparecimento do aldeído veratrílico é determinado lendo-se a absorvância a 310 nm, após 10 minutos de reação (ARORA; GILL, 2001).

4.6.3. *Manganês peroxidase (MnP)*

A atividade desta enzima foi quantificada pelo método modificado de Wariishi e colaboradores (1992) com a adição de 50 μL de peróxido de hidrogênio (2 mM) em 0,8 mL de tampão malonato de sódio (50 mM; pH 4,5), 50 μL de MnSO_4 (10 mM), e 0,1 mL de caldo enzimático. A formação do complexo Mn^{+3} -malonato foi acompanhada a 270 nm ($\epsilon = 11590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) após 5 min de reação.

Através dos protocolos supracitados, obtém-se a medida da absorvância das amostras. Este valor deve ser convertido em unidade enzimática por litro de amostra para que se obtenha a quantificação da atividade enzimática. Uma unidade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de substrato por minuto. A atividade enzimática será expressa em U L^{-1} de caldo enzimático e os cálculos para avaliação das enzimas ligninolíticas foram realizados a partir da equação descrita abaixo, derivada da Lei de Lambert-Beer:

$$\text{U L}^{-1} = \Delta A \times V \times 10^6 / \varepsilon \times R \times t$$

Onde:

- ΔA** diferença entre a absorvância final e a inicial
- V** volume da reação (0,001 L em todos os casos)
- 10^6** converte os mols de ε para μmols
- ε** coeficiente de extinção ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
- R** quantidade de caldo enzimático (L)
- t** tempo de reação (min)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos durante a pesquisa, assim como algumas comparações e observações. Os gráficos construídos pela autora do presente trabalho, utilizados nesta seção, foram montados com o auxílio do *software Microsoft Excel* (2010).

5.1. O Consórcio Microbiano

O consórcio microbiano utilizado no presente trabalho foi previamente selecionado por apresentar potencial de destoxificação de poluentes ambientais no âmbito do Doutorado de Gabriela A. L. Vieira em desenvolvimento junto ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Aplicada da UNESP Campus Rio Claro. Tendo em vista a relevância dos micro-organismos e suas enzimas na destoxificação e degradação de poluentes ambientais, segue abaixo informações sobre os fungos de origem marinha e bactérias do petróleo que constituem o consórcio microbiano estudado.

5.1.1. *Mucor racemosus*

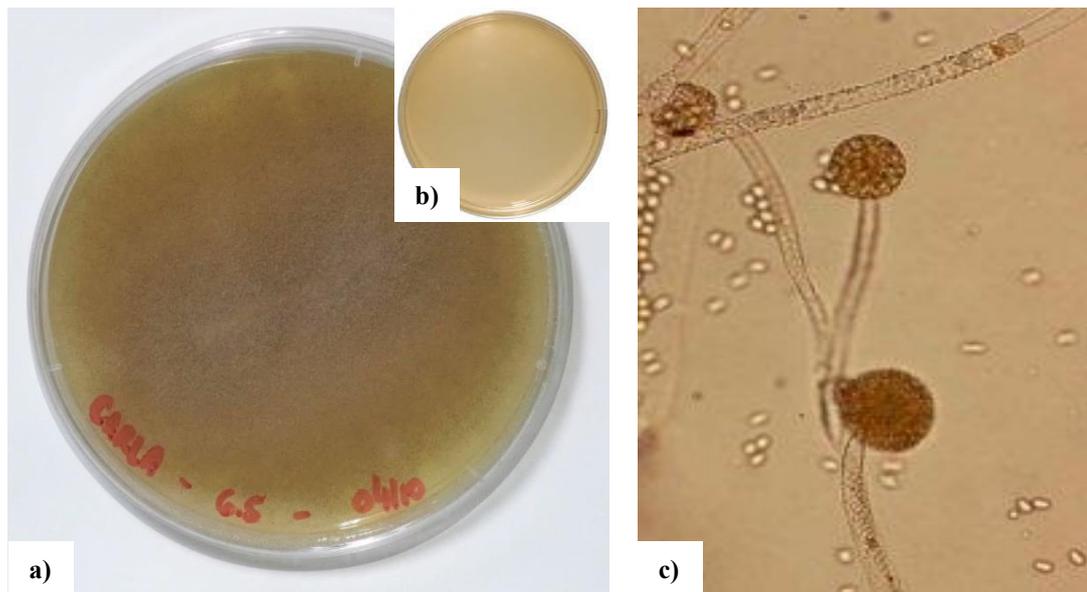
Representantes do gênero *Mucor* pertencem ao filo Zygomycota (INDERLIED; PETERS; CIHLAR, 1985). O fungo filamentosso *Mucor racemosus* é dimórfico, isto é, pode se apresentar nas formas filamentosso ou leveduriforme de acordo com a temperatura a qual foi exposto durante o seu desenvolvimento (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004). Para esta pesquisa, o fungo se apresentava na forma filamentosso ao ser cultivado a temperatura de 28°C.

Conforme constatado durante o andamento da pesquisa e de acordo com parâmetros estabelecidos no manual “Detecção e Identificação de Fungos de Importância Médica” da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de 2004, é possível afirmar que este fungo possui velocidade de crescimento rápida (até 7 dias) a intermediária (8 a 14 dias). Em geral, este organismo constrói um micélio espesso de coloração cinza a marrom, devido ao acúmulo de esporângios escurecidos (INDERLIED; PETERS; CIHLAR, 1985). Esta característica pode ser observada na Figura 4.

O isolado utilizado no presente trabalho, *Mucor racemosus* CBMAI 847 (Figura 5), foi recuperado de amostra de cnidário marinha *Mussismilia hispida* no litoral norte do estado de

São Paulo e apresentou capacidade para degradar pireno e Benzo[a]pireno nos estudos conduzidos por Passarini et al. (2011), bem como para produção de enzimas ligninolíticas (BONUGLI-SANTOS et al., 2010a).

Figura 4 – Características macro e microscópicas do *Mucor racemosus* CBMAI 847



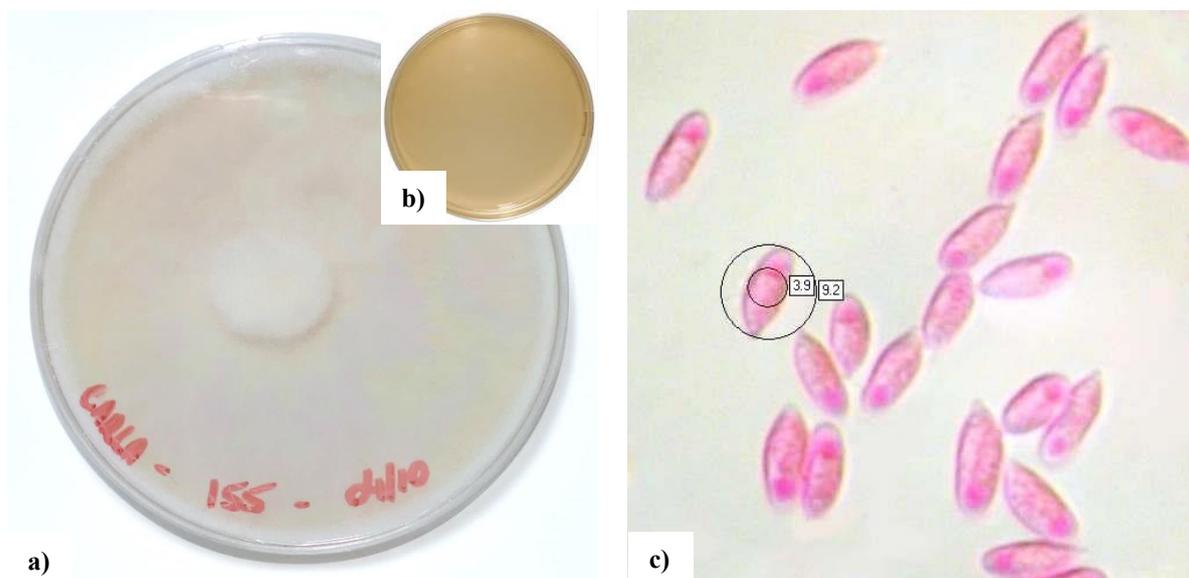
Legenda: em a) características macroscópicas do fungo (fonte: a autora, 2016); b) placa de petri contendo apenas meio de cultivo ágar malte como parâmetro (fonte: www.eolabs.com, 2016) e c) detalhe dos esporângios de *Mucor racemosus* (fonte: www.ual.es, 2016).

5.1.2. *Marasmiellus* sp.

O gênero *Marasmiellus* pertence ao filo Basidiomycota (CABI, 2016). Representantes deste gênero apresentam um espesso micélio de cor branca como pode ser visualizado na Figura 5. Assim como o *Mucor racemosus*, este fungo também foi incubado a 28°C, apresentando crescimento rápido (até 7 dias) de acordo com os parâmetros do manual da ANVISA (2004).

O fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, utilizado no presente trabalho, foi isolado de amostra de esponja marinha *Amphimedon viride* coletada no litoral norte do estado de São Paulo e apresentou habilidade para produzir lacase (BONUGLI-SANTOS et al., 2010b), descolorir corantes têxteis (BONUGLI-SANTOS et al., 2012), bem como degradar pireno e Benzo[a]pireno (MAGRINI, 2012).

Figura 5 – Características macro e microscópicas do *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062



Legenda: em a) características macroscópicas do fungo (fonte: a autora, 2016); b) placa de petri contendo apenas meio de cultivo ágar malte como parâmetro (fonte: www.eolabs.com, 2016) e c) detalhe dos esporos de *Marasmiellus ramealis* (fonte: www.first-nature.com, 2016).

5.1.3. *Dietzia* sp.

Bactérias do gênero *Dietzia* pertencem ao grupo das actinobactérias sendo, portanto, aeróbicas, Gram-positivas e não formadoras de esporos. As células apresentam forma arredondada e as colônias possuem coloração de laranja a avermelhada (KOERNER; GOODFELLOW; JONES, 2009).

A bactérias *Dietzia* sp. utilizada no presente trabalho (Figura 6) foi isolada de petróleo altamente degradado e apresentou capacidade para degradação de n-octadecano e de fenantreno + n-octadecano (VASCONCELLOS et al., 2011).

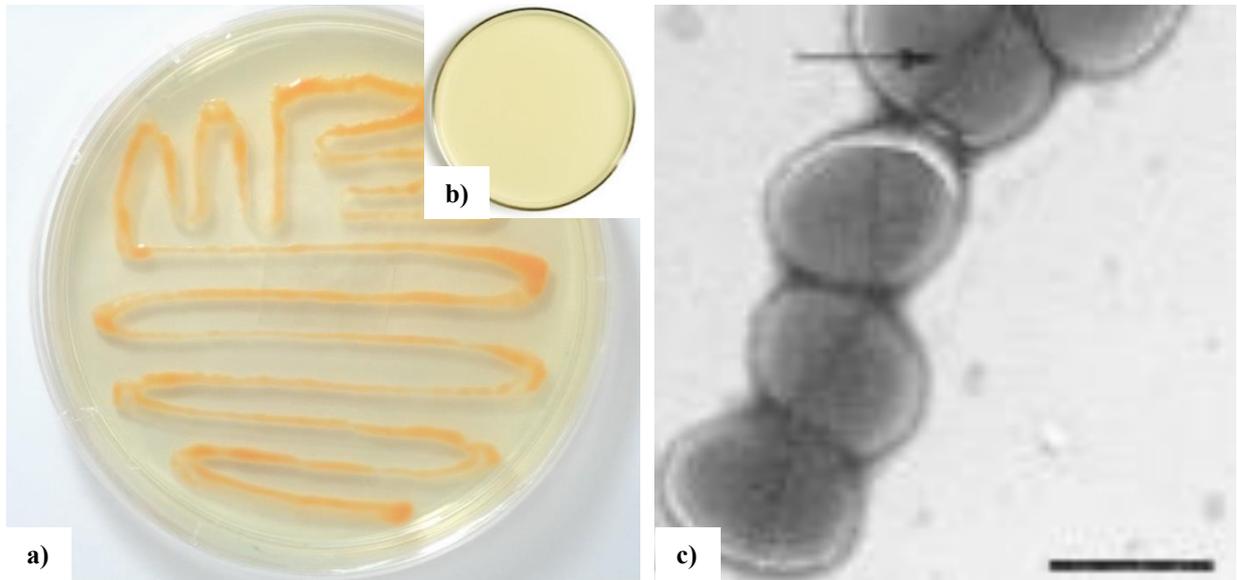
5.1.4. *Bacillus* sp.

As espécies do gênero *Bacillus* são bastonetes com extremidades retas ou arredondadas de tamanhos variáveis, formadores de esporos, Gram positivos ou Gram variáveis (coloração de Gram não é positiva nos cultivos jovens). O gênero *Bacillus* é extremamente heterogêneo tanto geneticamente quanto fenotipicamente (GOMES, 2013).

As placas de Petri inoculadas com *Bacillus* sp. CBMAI 707 apresentaram coloração amarelo-esbranquiçada quando incubadas a 28°C (Figura 7). Esta bactéria foi isolada de

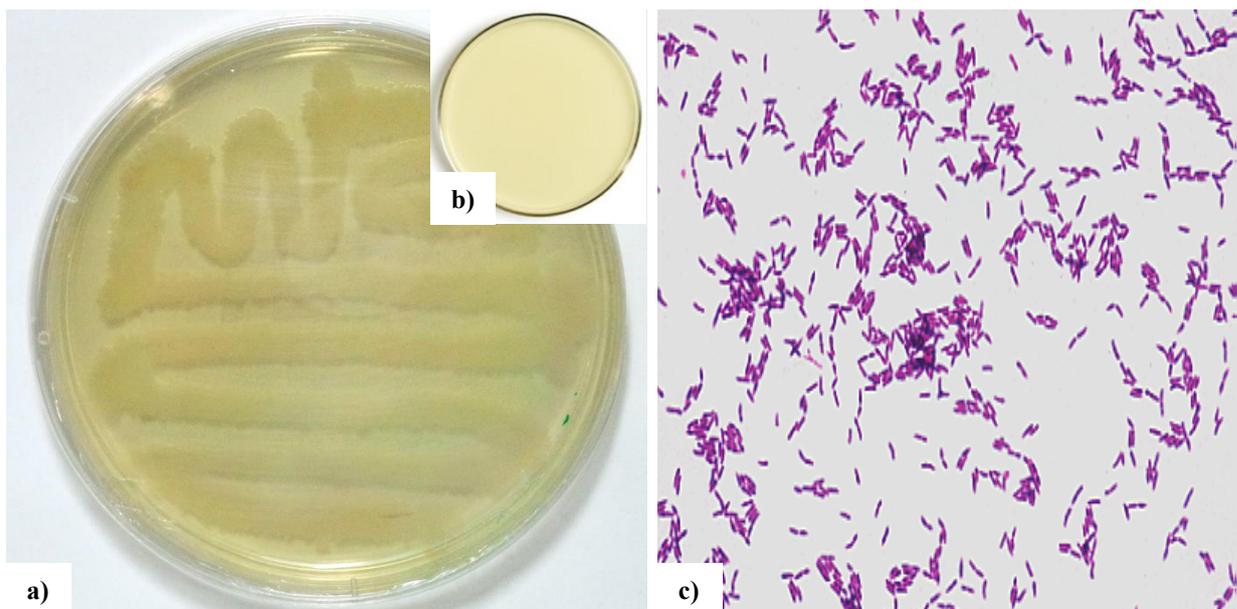
petróleo altamente degradado e apresentou capacidade para degradação de fenantreno e produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (VASCONCELLOS et al., 2011).

Figura 6 – Características macroscópicas e microscópicas da *Dietzia* sp. CBMAI 705



Legenda: em a) características macroscópicas da bactéria (fonte: a autora, 2016); b) placa de petri contendo apenas meio de cultivo ágar nutriente como parâmetro (fonte: www.ekbak.com.tr, 2016) e c) células de *Dietzia* sp. em imagem de microscopia eletrônica de transmissão (fonte: www.midasfieldguide.org, 2016).

Figura 7 – Características macroscópicas e microscópicas do *Bacillus* sp. CBMAI 707



Legenda: em a) características macroscópicas da bactéria (fonte: a autora, 2016), b) placa de petri contendo apenas meio de cultivo ágar nutriente como parâmetro (fonte: www.ekbak.com.tr, 2016) e c) imagem de microscópio de *Bacillus* sp. Gram-positivos após coloração (fonte: www.uaz.edu.mx, 2016).

5.2. A Condição Otimizada de Destoxificação

Após a finalização dos ensaios do planejamento Plackett-Burman foi realizado o teste de toxicidade nas amostras. Os resultados obtidos podem ser verificados na Tabela 4.

Tabela 4 – Taxa de sobrevivência de *Artemia* sp. em teste de toxicidade realizado nos ensaios do planejamento Plackett-Burman

Ensaio	Taxa de sobrevivência (%)
1	-
2	-
3	-
4	-
5	27,78
6	-
7	-
8	-
9	-
10	-
11	43,34
12	16,67
13	37,78
14	-
15	-
16	-
17	47,67
18	-
19	-
20	34,45
21	-
22	-
23	-
24	-

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

O uso de *Artemia* sp. é amplamente empregado em estudos de ecotoxicologia. Estes organismos-teste possuem um baixo grau de tolerância com relação a variações na qualidade do ambiente, sendo assim, uma pequena alteração ambiental provocada por determinado agente, pode resultar na mortalidade dos microcrustáceos (BUENO; PIOVEZAN, 2015). De acordo com Laitano e Matias (2006), a resposta destes organismos, no caso, sua taxa de sobrevivência, pode avaliar os efeitos adversos que uma substância, possivelmente, possui sobre os sistemas biológicos do meio ambiente.

Pela análise da Tabela 4, verificou-se que o melhor resultado de destoxificação, indicado pela maior sobrevivência de artêmias, foi encontrado no ensaio número 17. Com base neste resultado, o ensaio 17 foi selecionado como uma possível condição otimizada.

As taxas de sobrevivência de todos os ensaios foram inseridas no *software STATISTICA 7.0* (STAT SOFT, INC. 1995) para análise da significância dos resultados. Essa análise forneceu as variáveis mais significativas no processo, isto é que apresentam efeito positivo sobre o experimento (Tabela 5).

Tabela 5 – Análise estatística do Plackett-Burman pelo *software STATISTICA 7.0*

Variáveis	Efeito	p
1. Nº de cilindros do inóculo fúngico (0,5 cm)	-14,9000	0,308237
2. Inóculo bacteriano (mL/50mL)	-5,3000	0,710543
3. Glicose (g/50mL)	-29,9000	0,056647
4. Extrato de levedura (g/50mL)	0,3000	0,983180
5. Peptona (g/50mL)	-3,9000	0,784437
6. Extrato de malte (g/50mL)	7,5000	0,600756
7. MnSO ₄ (mM)	3,7000	0,795200
8. KH ₂ PO ₄ (mM)	-7,3000	0,610368
9. CuSO ₄ (mM)	-25,7000	0,093778
10. Riboflavina (mM)	-3,5000	0,806008
11. Pireno (mg/50mL)	-0,1000	0,994393
12. pH	-12,9000	0,374538
13. Salinidade (%)	9,7000	0,500544

Fonte: elaborada pela autora (2016).

Em métodos de delineamento experimental como o Plackett-Burmann, adota-se um nível de significância de 0,1 como apropriado, ou seja, apenas 10% de probabilidade de ocorrência de erro tipo I. Portanto, para aceitar o valor de uma variável como estatisticamente significativo, seu p-valor deve ser menor que 0,1. Por sua vez, o efeito que a variável exerce sobre o processo deve ser positivo para mostrar sua relevância, quanto maior o valor, maior a importância da variável para o resultado a ser atingido. (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Os resultados fornecidos pelo *software* foram comparados com os resultados do teste de toxicidade, desta análise conjunta foram selecionadas as variáveis mais significativas e que continuariam a ser estudadas: extrato de malte e pH. As seguintes variáveis foram eliminadas: glicose, extrato de levedura, peptona, $Mn SO_4$ e $CuSO_4$. Enquanto as variáveis: inóculo fúngico (4 cilindros de 0,5 cm cortados das placas com auxílio de furador), inóculo bacteriano (1 mL/50 mL), KH_2PO_4 (36 μ L/50 mL), riboflavina (2,65 mL/50 mL), pireno (15 mg/50 mL) e salinidade (100%) foram fixadas nas concentrações encontradas no ensaio número 17.

Com as variáveis extrato de malte e pH foi montado o Delineamento Composto Central Rotacional. Os ensaios do DCCR foram realizados adotando os mesmos procedimentos do planejamento PB citados no item 4.3. Os resultados do teste de toxicidade nas amostras resultantes do DCCR estão apresentados na Tabela 6. Os maiores valores de destoxificação do DCCR (ensaios 1 e 8) foram próximos ao maior valor obtido no PB (ensaio 17).

Com base nos resultados obtidos pelo planejamento DCCR, foram escolhidos os ensaios número 1 e 8 para repetição e sua possível comprovação como condição otimizada. Entretanto, os novos testes de toxicidade aplicados não atingiram os mesmos valores satisfatórios de taxa de sobrevivência (próximo de 60%), permanecendo muito abaixo do esperado. Desta forma, os ensaios 1 e 8 não foram selecionados como a condição otimizada e, portanto, não seguiram para a etapa de validação.

Para dar continuidade à pesquisa, o ensaio número 17 do planejamento PB foi selecionado como condição otimizada e encaminhado à etapa de validação. Para esta nova etapa, as variáveis do ensaio 17 tiveram seus valores todos fixados e são apresentados na Tabela 7.

Tabela 6 – Taxa de sobrevivência de *Artemia* sp. em teste de toxicidade realizado nos ensaios do planejamento DCCR

Ensaio	Taxa de sobrevivência (%)
1	62
2	-
3	10
4	-
5	46
6	2
7	3,5
8	61
9	12
10	7
11	40
12	-

Fonte: elaborada pela autora (2016).

Tabela 7 – As variáveis do ensaio número 17 do planejamento PB e seus respectivos valores fixados para validação experimental

Variáveis	Valores fixados
1. Inóculo fúngico	4 cilindros
2. Inóculo bacteriano	1 mL/50 mL
3. Extrato de malte	1 g/50 mL
4. Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	36 µL/50 mL
5. Riboflavina	2,65 mL/50 mL
6. Pireno	15 mg/ 50 mL
7. pH	8
8. Salinidade	50 mL (100%)

Fonte: elaborada pela autora (2016).

5.3. A Validação da Condição Otimizada

Para a confirmação do resultado de destoxificação, o ensaio 17 foi realizado em quadruplicata com seus respectivos controles, como mencionado no item 4.5. A taxa de sobrevivência média das artêmias nas quadruplicatas dos ensaios foi de 58,53%, superando o valor obtido no planejamento experimental.

As taxas de sobrevivência para os ensaios e controles da validação são apresentadas na Tabela 8. Além do número de sobreviventes, esta Tabela incluiu a mobilidade das artêmias como outro parâmetro, para que fosse possível uma análise mais detalhada dos efeitos do poluente.

Vale ressaltar que as amostras do controle positivo (meio + poluente) não foram centrifugadas para realizar o teste de toxicidade, garantindo que o pireno não precipitasse no fundo do tubo falcon como ocorrera em testes anteriores.

Tabela 8 – Taxa de sobrevivência e mobilidade de *Artemia* sp. em teste de toxicidade realizado nos ensaios e controles da validação do experimento 17 do PB

Nº erlenmeyer	Taxa de sobrevivência (%)			
	Ensaio	Controle meio	Controle +	Controle -
1	42,23	100	51,12	-**
2	90	100	61,12	97,78
3	10*	100	-	94,45
4	43,34	95,56	75,56	97,78
Média(%)	58,53	98,89	46,95	96,67
Mobilidade ⁽¹⁾	Alta	Alta	Baixa	Alta

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Notas:

*O erlenmeyer nº 3 do Ensaio foi excluído do cálculo da média, pois as artêmias apresentaram-se presas em micélio no fundo do tubo de ensaio.

**O erlenmeyer nº 1 do Controle negativo foi excluído do cálculo da média por apresentar valor zero, divergindo dos demais.

⁽¹⁾A mobilidade das artêmias foi julgada considerando as categorias: baixa, regular e alta.

5.4. Experimento Adicional: O Ensaio Número 17 Modificado

Para efeito de comparação, foi realizado mais um teste com as condições do ensaio 17, porém com algumas modificações: a quantidade de inóculo bacteriano passou a ser 4 mL e o poluente foi colocado primeiramente em contato com a solução de bactérias. Dessa forma, o novo inóculo (4 mL de *Bacillus* sp. + 4 mL de *Dietzia* sp. + 0,5 mL de solução DMSO-Pireno) foi incubado por 2 dias a 28°C sob agitação de 140 rpm. Após o período de incubação, esta solução foi transferida para erlenmeyers contendo o meio de cultivo da condição otimizada do ensaio 17 e os dois fungos filamentosos, previamente cultivados como apresentado no item 4.3. Os ensaios foram incubados sob as mesmas condições anteriores, por 7 dias.

O experimento 17 modificado foi realizado em triplicata e foram montados 3 ensaios contendo: meio de cultivo nas condições otimizadas, os fungos filamentosos, as bactérias e o poluente pireno, bem como 3 controles contendo: meio de cultivo nas condições otimizadas, as bactérias e o poluente (sem adição dos fungos filamentosos).

O teste de toxicidade foi realizado da mesma maneira dos experimentos anteriores e revelou que a taxa de sobrevivência média de artêmias foi elevada para 68,53%, um aumento de 10% quando comparada a taxa do ensaio 17 otimizado (58,53%). Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Taxa de sobrevivência e mobilidade de *Artemia* sp. em teste de toxicidade realizado no ensaio número 17 modificado

Nº erlenmeyer	Taxa de sobrevivência (%)	
	Ensaio	Controle
1	81,12	34,35
2	54,45	41,12
3	70	47,78
Média(%)	68,53	41,12
Mobilidade ⁽¹⁾	Alta	Alta

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Nota: ⁽¹⁾A mobilidade das artêmias foi julgada considerando as categorias: baixa, regular e alta.

A partir dos resultados obtidos com o experimento 17 modificado, foi certificado que as modificações realizadas (aumento no volume de bactérias e o contato prévio entre pireno e inóculo bacteriano) produziram um aumento de 10% na taxa de sobrevivência das artêmias. É provável que as bactérias provoquem transformações no pireno que facilitem uma posterior degradação/destoxificação realizada pelos fungos filamentosos. Em adição, o controle deste experimento não contava com a presença dos fungos, desta forma, apenas as bactérias se encarregaram da destoxificação. Como pode ser observado na Tabela 8 acima, a taxa de sobrevivência média das artêmias nos ensaios foi de 68,53%, enquanto que nos controles foi reduzida para 41,12%, indicando a importância da participação dos fungos de origem marinha neste processo de destoxificação.

A maior eficiência trazida pelo contato prévio entre poluente e bactérias talvez possa ser explicada baseando-se no trabalho de Vasconcellos et al. (2011). A autora afirma que algumas bactérias, por exemplo, representantes de gênero *Bacillus*, são capazes de produzir bioemulsificantes, um tipo de substância polimérica extracelular (EPS), que podem contribuir com a degradação extracelular de hidrocarbonetos, bem como promover a adesão microbiana em moléculas, facilitando sua solubilização. No trabalho mencionado, *Bacillus* sp. CBMAI 707 foi responsável por produzir a maior quantidade de EPS quando em contato com os hidrocarbonetos testados. A *Dietzia* sp. CBMAI 705 também foi avaliada e demonstrou habilidade de emulsificar compostos hidrofóbicos como derivados de petróleo e diesel. Desta forma, o potencial de emulsificação das bactérias do consórcio pode estar favorecendo a degradação e conseqüente destoxificação do pireno pelos fungos filamentosos.

5.5. A Atividade Enzimática dos Ensaios

As amostras do experimento 17 foram avaliadas quanto à presença de enzimas ligninolíticas. Para tanto, os procedimentos descritos no item 4.6 foram aplicados e tabelas e gráficos foram gerados para comparação de resultados.

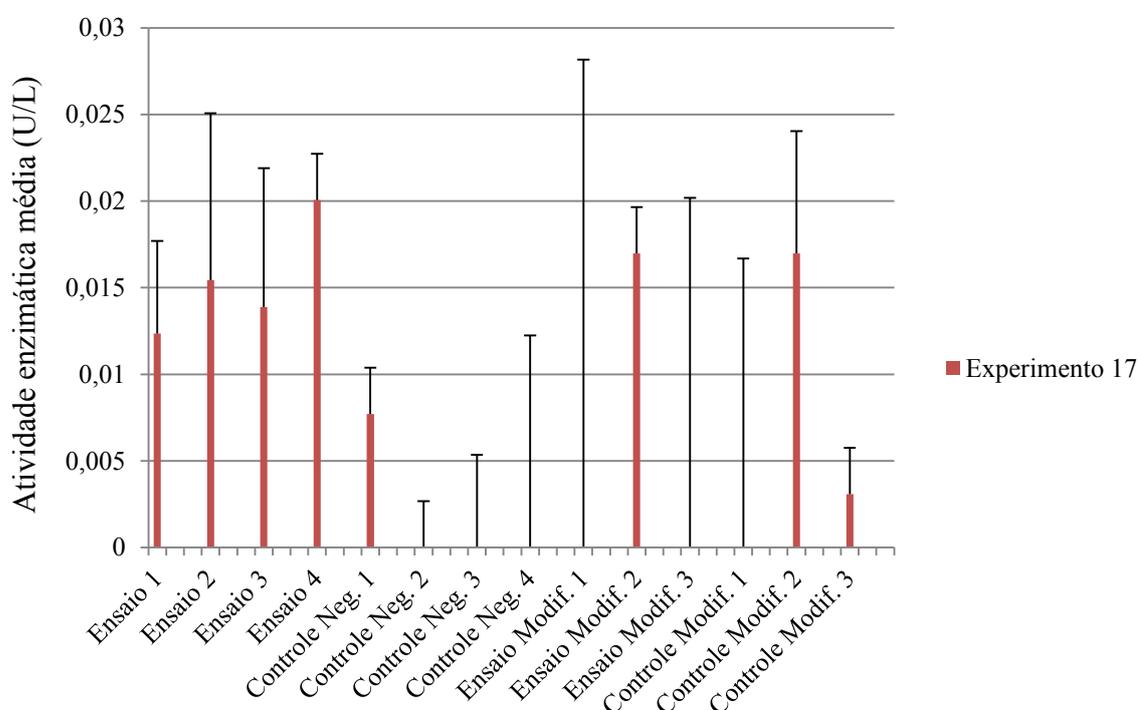
5.5.1. Produção de enzimas lacase

Os resultados da atividade enzimática média de lacase das triplicatas para todas as amostras do ensaio 17 estão apresentados na Figura 8. Os dados completos da avaliação da atividade enzimática podem ser conferidos no APÊNDICE C.

Os resultados evidenciam a presença de lacase na maioria dos ensaios apesar dos valores de atividade para esta enzima serem muito baixos. A lacase não foi detectada nos controles, com exceção do Controle Negativo 1 (ensaio 17) e Controle Negativo 2 (ensaio 17 modificado).

A presença do poluente parece estar associada à produção de lacase, uma vez que o restante dos controles negativos (sem poluente) não apresentou valores detectáveis desta enzima.

Figura 8 – Atividade enzimática média de Lacase para os ensaios 17 e controles

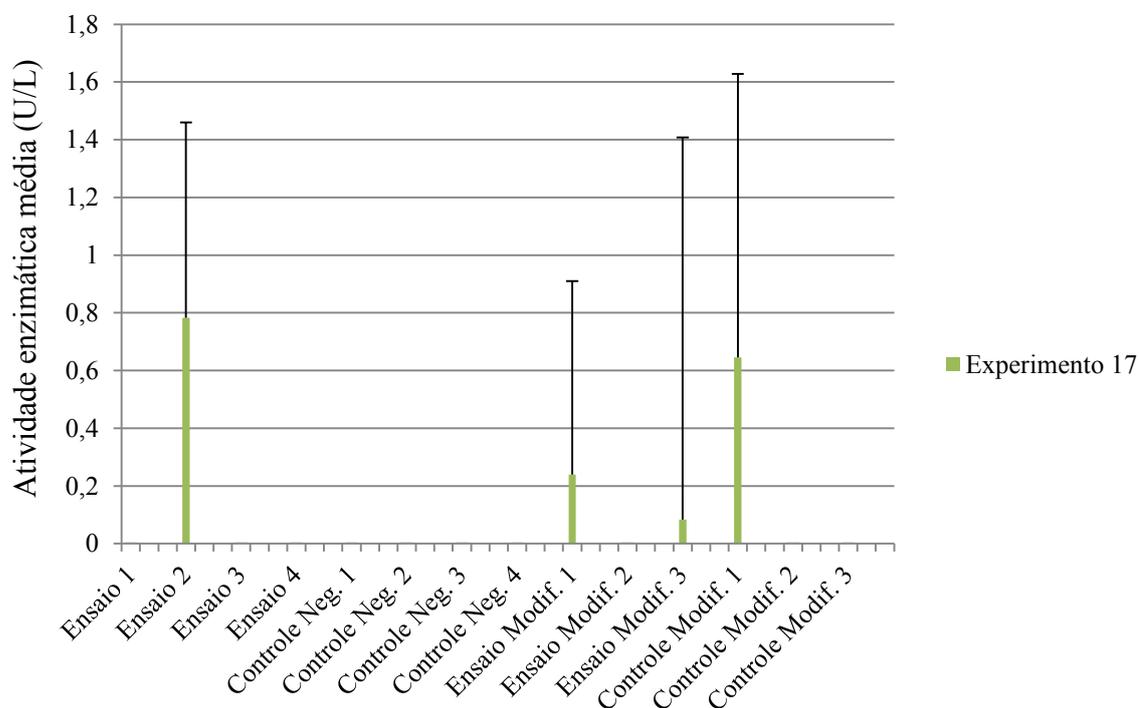


Fonte: elaborada pela autora, 2016.

5.5.2. Produção de enzimas lignina peroxidase (LiP)

Assim como para a lacase, a produção de LiP foi pouco expressiva. Os resultados podem ser observados na Figura 9. Os dados completos da avaliação da atividade enzimática podem ser conferidos no APÊNDICE D.

Figura 9 – Atividade enzimática média de LiP para os ensaios 17 e controles

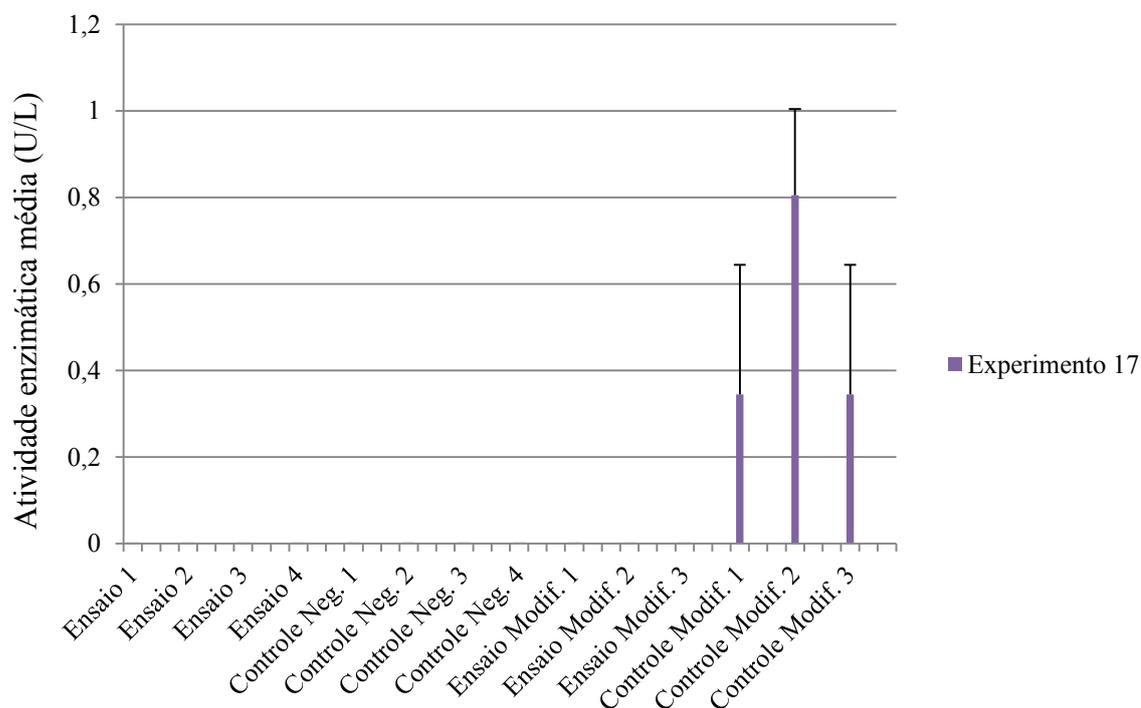


Fonte: elaborada pela autora, 2016.

5.5.3. Produção de enzimas manganês peroxidase (MnP)

Do mesmo modo ocorrido para as outras enzimas, a enzima Manganês Peroxidase foi pouco expressiva nos experimentos do ensaio 17. Os resultados estão apresentados na Figura 10. Os dados completos da avaliação da atividade enzimática podem ser observados no APÊNDICE E.

Os resultados mostram que a enzima MnP foi produzida apenas nos Controles Negativos do ensaio modificado (com ausência de fungos). Apesar dos valores baixos, a produção de MnP foi superior a de LiP e Lacase.

Figura 10 – Atividade enzimática média de MnP para os ensaios 17 e controles

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Considerando o baixo valor das atividades enzimáticas, é possível que as enzimas lacase, LiP e MnP não sejam as responsáveis pela destoxificação do poluente. A baixa produção de enzimas ligninolíticas apresentada pelo consórcio microbiano do presente trabalho já havia sido observada anteriormente durante estudos do doutorado de Gabriela A. L. Vieira. Vale ressaltar que isoladamente, os fungos filamentosos utilizados se mostraram bons produtores de enzimas ligninolíticas, em condições diferentes da adotada.

Alguns fatores externos podem provocar uma queda na produção de lacase por fungos ligninolíticos como, por exemplo, a concentração do poluente. Para Bertrand (2013), alguns compostos aromáticos podem funcionar como indutores ou inibidores da produção de enzimas dependendo da concentração adotada. No estudo de Bertrand (2013), o aumento da concentração dos indutores aromáticos prejudicou o crescimento fúngico e/ou apresentou efeito inibitório sobre a atividade de lacase.

Assim como a lacase, a produção de LiP e MnP também pode ser influenciada pelas condições do meio de cultivo (REDDY 1993). A manifestação destas enzimas, provavelmente, é resultante de modificações fisiológicas do micro-organismo sob diferentes condições e tipos de substrato (SILVA, MELO, OLIVEIRA, 2004).

De acordo com Hofrichter (2002), a produção de manganês peroxidase parece ser limitada a um determinado grupo de fungos basidiomicetos, não havendo registros de produção considerável de MnP para outros micro-organismos. Porém os estudos de Dawkar et al. (2009) e Khelil, Choubane e Cheba (2014) reportam a produção de enzimas do tipo peroxidase, incluindo a MnP, por *Bacillus* sp. Em adição, Naz et al. (2015) detectaram atividade enzimática ligninolítica (lacase, LiP e MnP) em *Bacillus* sp. isolado de amostras de solo. Estes fatos podem justificar um valor mais elevado de atividade para MnP encontrado nos Controles Modificados do experimento 17.

Em geral, bactérias não possuem as peroxidases comuns que os fungos empregam para degradação da lignina, a produção dessas enzimas pode requerer condições diferenciadas que não são compatíveis com os mecanismos bacterianos para produção de proteínas. Sendo assim, algumas enzimas menos complexas capazes de degradar lignina podem ser encontradas nas bactérias. De acordo com Gonzalo et al. (2016), algumas enzimas bacterianas capazes de agir sobre a lignina são: dyedecolorizing peroxidases (DyP), lacases bacterianas modificadoras de lignina, as superóxido-dismutases dependente de manganês (MnSODs), as catalase-peroxidases (associadas a degradação da lignocelulose) e um grupo de dioxigenases bacterianas que também podem exercer um importante papel. Isso demonstra que a atividade enzimática ocorrida nos controles contendo bactérias e poluentes pode estar associada à produção de algumas destas outras enzimas.

Cabe ressaltar a existência de outras rotas metabólicas para degradação e destoxificação de poluentes por micro-organismos. O metabolismo de hidrocarbonetos policíclico aromáticos pode ser mediado pela utilização de enzimas do sistema citocromo P-450 e da epóxido hidrolase como mostra o estudo de Vasconcelos (2014). No estudo citado, a autora sugere que o mecanismo utilizado por fungos do gênero *Marasmiellus* e *Mucor* seja mediado pelo sistema citocromo P-450 monooxigenase, seguido pela conjugação de íons sulfato. A família enzimática citocromo P-450 possui um sistema de transferência de elétrons que desempenha um papel importante em reações de hidroxilação e oxidação de processos que conduzem à degradação e destoxificação de moléculas.

Outra possibilidade inclui a capacidade de adsorção pelo micélio fúngico, isto é, parte do pireno poderia ser adsorvida no micélio dos fungos filamentosos, fato que necessitaria de ensaios de adsorção com micélio morto para sua comprovação. É possível que estas outras vias de degradação/destoxificação citadas tenham sido utilizadas pelos fungos do consórcio aplicado no presente trabalho, os quais juntamente com as enzimas bacterianas foram capazes de apresentar os resultados de destoxificação observados.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do planejamento experimental revelaram este como uma excelente ferramenta para atingir as condições otimizadas de um processo, possibilitando avaliação dos efeitos e impactos que as variáveis possuem sobre as respostas do bioprocessos.

Com relação ao consórcio microbiano aplicado e sua capacidade de destoxificação *in vitro*, os resultados apontam sua eficiência, pois pelo menos metade da população de artêmias sobreviveu aos ensaios com diferentes condições de cultivo.

As enzimas ligninolíticas estudadas (Lacase, LiP e MnP), foram detectadas em quantidades muito baixas e, portanto, não parecem estar diretamente envolvidas com o processo de destoxificação do pireno pelo consórcio estudado.

Os resultados de destoxificação do pireno obtidos são promissores e estimulam a condução de novos estudos, incluindo a avaliação da degradação desse poluente e metabólitos formados durante a degradação, bem como de caracterização das enzimas envolvidas no processo degradativo, os quais poderiam ser realizados por meio de análises de metatranscriptoma (extração de RNA após o cultivo nas condições otimizadas seguido de sequenciamento de última geração) e/ou secretoma (eletroferese em gel SDS-PAGE seguido de extração de bandas e caracterização por espectrofotometria de massas).

Estudos como estes poderiam ampliar a compreensão dos processos de degradação e destoxificação do poluente estudado, bem como de outros compostos cuja eliminação no ambiente representa um desafio para a sociedade.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Deteção e identificação de fungos de importância médica**: módulo VII. Brasília, 2004. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf>. Acesso em: 22 out. 2016.
- ANTIZAR-LADISLAO, Blanca; LOPEZ-REAL, Joe; BECK, Angus James. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in an aged coal tar contaminated soil under invessel composting conditions. **Environmental Pollution**, v. 141, n. 3, p. 459-468, jun. 2006.
- ARORA, D. S., GILL, P. K. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 28, p.602-605, 2001.
- BERTRAND, Brandt; MARTÍNEZ-MORALES, Fernando; TINOCO, Raunel; ROJAS-TREJO, Sonia; SERRANO-CARREÓN, Leobardo; TREJO-HERNÁNDEZ, Maria R. Induction of lacase in *Trametes versicolor* by aqueous wood extracts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 135-142, jul. 2013.
- BONUGLI-SANTOS, R. C., DURRANT, L. R., SETTE, L. D. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. **Fungal Biology**, v. 114, p. 863-872, 2010a.
- BONUGLI-SANTOS, R. C., DURRANT, L. R., SETTE, L. D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by brazilian marine-derived fungi. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 46, p. 32-37, 2010b.
- BONUGLI-SANTOS, Rafaella C.; DURRANT, Lucia Regina; SETTE, Lara Durães. The Production of Ligninolytic Enzymes by Marine-Derived Basidiomycetes and Their Biotechnological Potential in the Biodegradation of Recalcitrant Pollutants and the Treatment of Textile Effluents. **Water, Air & Soil Pollution**. Dordrecht, v. 223, n. 5, p. 2333–2345, jun. 2012.
- BUENO, Ariele Cardoso; PIOVEZAN, Marcel. **Bioensaio toxicológico utilizando artemia salina: fatores envolvidos em sua eficácia**. Disponível em <<http://docente.ifsc.edu.br/michael.nunes/MaterialDidatico/Analises%20Quimicas/TCC%20II/TCC%202015%20/Ariele.pdf>>. Acesso em: 02 nov. 2016.
- BUGNI, Tim S., IRELAND, Chris M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 21, n. 1, p. 143-163, jan. 2004.
- BUSWELL, J. K., CAI, Y. J. CHANG, S. T. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by *Lentinula* (*Lentinus*) *edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 81-88, 1995.

CENTRE FOR AGRICULTURE AND BIOSCIENCES INTERNATIONAL (CABI). **Index fungorum**. c2016. Disponível em <<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>>. Acesso em: 02 nov. 2016.

CLAYDEN, Jonathan; GREEVES, Nick; WARREN, Stuart. **Organic chemistry**. 2 ed. New York: Oxford University Press, 2012. 1265 p.

DAWKAR, Vishal V.; JADHAV, Umesh U.; TELKE, Amar A.; GOVINDWAR, Sanjay P. Peroxidase from *Bacillus* sp. VUS and its role in the decolorization of textile dyes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 361, jun. 2009.

D'SOUZA, D. T., TIWARI, R., SAH, A. K., & RAGHUKUMARA, C. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. **Enzyme and Microbial Technology**. Amsterdã, v. 38, n. 3-4, p. 504–511, fev. 2006.

DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N.; JOHRI, A. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Berlin, v. 59, n. 2, p. 143-152, jul. 2002.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biociência**, n. 34, p. 36-43, jan./jun. 2005. Disponível em <http://www.biociencia.com.br/revista/bio34/biorremediacao_34.pdf>. Acesso em: 28 out. 2016.

GIANFREDA, Liliana; XU, Feng; BOLLAG, Jean-Marc. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation Journal**. Oxfordshire, v. 3, n. 1, p. 1-25, 1999.

GOMES, M. J. P. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. **Gênero *Bacillus* spp.** 2013. Disponível em <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Bacillus%204-2013-1%20vers%C3%A3o%202013.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2010.

GONZALO, Gonzalo de; COLPA, Dana I.; HABIB, Mohamed H. M.; FRAAIJE, Marco W. Bacterial enzymes involved in lignina degradation. **Journal of Biotechnology**, v. 236, p. 110-119, ago. 2016.

HOFRICHTER, Martin; Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 454-466, 2002.

INDERLIED, Clark B.; PETERS, Julius; CIHLAR, Ronald L. *Mucor racemosus*. In: SZANISZLO, Paul J.; HARRIS, James L. **Fungal dimorphism: with emphasis on fungi pathogenic for humans**. New York: Plenum Press, 1985. p. 337-338. Disponível em <<http://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4684-4982-2>>. Acesso em: 22 out. 2016.

IRWIN, Roy J.; MOUWERIK, Mark Van; STEVENS, Lynette; SEESE, Marion Dubler; BASHAM, Wendy. **Environmental contaminants encyclopedia: pyrene entry**. Colorado, jul. 1997. Disponível em <<http://www.nature.nps.gov/hazardssafety/toxic/pyrene.pdf>>. Acesso em: 24 nov. 2016.

KARIGAR, Chandrakant S.; RAO, Shwetha S. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. **Enzyme Research**. London, v. 2011, p. 11, 2011.

KHELIL, Omar; CHOUBANE, Slimane; CHEBA, Bem Amar. Co-production of cellulases and manganese peroxidases by *Bacillus* sp. R2 and *Bacillus cereus* 11778 on waste newspaper: applications in dyes decolourization. **Procedia Technology**, v. 19, p. 980-987, 2015.

KOERNER, Roland J.; GOODFELLOW, Michael; JONES, Amanda L. The genus Dietzia: a new home for some known and emerging opportunist pathogens. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 296-305, jan. 2009.

LAITANO, K. dos Santos; MATIAS, W. G. Testes de toxicidade com *Daphnia magna*: uma ferramenta para avaliação de um reator experimental UASB. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 43-47, 2006.

LOUVADO, A.; GOMES, N. C. M.; SIMÕES, M. M. Q.; ALMEIDA, A.; CLEARY, D. F. R.; CUNHA, A. Polycyclic aromatic hydrocarbons in deep sea sediments: microbe–pollutant interactions in a remote environment. **Science of the Total Environment**, v. 526, p. 312-328, set. 2015.

MAGRINI, M. J. **Produção de enzimas ligninolíticas e degradação de HPAs por fungos basidiomicetos derivados de esponjas marinhas**. 2012. 120 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

MISHRA, Nitika; AYOKO, Godwin A.; MORAWSKA, Lidia. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban environment: occurrence, toxicity and source apportionment. **Environmental Pollution**, v. 208, part A, p. 110-117, jan. 2016.

MORGENSTERN, Ingo; POWLOWSKI, Justin; TSANG, Adrian. Fungal cellulose degradation by oxidative enzymes: from dysfunctional GH61 family to powerful lytic polysaccharide monooxygenase family. **Briefings in Functional Genomics**. Oxfordshire, v. 13, n. 6, p. 471-481, nov. 2014.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATIONS (NCBI). **PubChem Compound Database**, Pyrene, CID = 31423. 2016. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31423>>. Acesso em: 28 out. 2016.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATIONS (NCBI). **PubChem Compound Database**, Dimethyl sulfoxide, CID = 679. 2016. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/679>>. Acesso em: 28 out. 2016.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, Principles of bioremediation. In: _____. **In situ bioremediation: when does it work?** Washington, DC: The National Academies Press, 1993, p. 16-35.

NAVARRO, V. C.; LEPPÄNEN, M. T.; KUKKONEN, J. V. K.; OLMOS, S. G. Trophic transfer of pyrene metabolites between aquatic invertebrates. **Environmental Pollution**, v. 173, p. 61-67, fev. 2013.

NAZ, Sabiha; DEVTARE, Sheetal; SATAPATHY, Sneha; GUPTA, Shadhana. Study of ligninolytic bacteria isolation and characterization from Dhamdha agro field of Bhilai-Durg region. **International Journal of Research in Engineering and Technology**, v. 4, n. 2, p. 258-262, fev. 2015.

PASSARINI, M. R. Z., RODRIGUES, M. V. N., DA SILVA, M., SETTE, L. D. Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 364-370, 2011.

PURE EARTH. **World's worst pollution problems**. New York, 2015. Disponível em: <<http://www.worstpolluted.org/>>. Acesso em: 10 out. 2016.

REDDY, C. A. An overview of the recent advances on the physiology and molecular biology of lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biotechnology**, v. 30, p. 91-107, 1993.

SCIENCE LAB. **Material Safety Data Sheet Pyrene MSDS**. c2005. Disponível em <<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9924760>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

SELIM, Mohammad Ibrahim. **Enzyme specificity**. Mansoura University. Disponível em <http://osp.mans.edu.eg/medbiochem_mi/Cources/Biochemistry/1st_year_medicine/Enzymes/files/Lecture_02.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2016.

SHARMA, Anamika; SINGH, Bala Shashi; SHARMA, Richa; CHAUDHARY, Priyanka; PANDEY, Alok Kumar; ANSARI, Raunaq; VASUDEVAN, Venugopal; ARORA, Anju; SINGH, Surender; SAHA, Supradip; NAIN, Lata. Enhanced biodegradation of PAHs by microbial consortium with different amendment and their fate in in-situ condition. **Journal of Environmental Management**, v. 181, p. 728-736, out. 2016.

SILVA, Célia Maria Maganhotto de Souza; MELO, Itamar Soares; OLIVEIRA, Pablo Roberto. **Produção de enzimas ligninolíticas por fungos isolados de solos sob cultivo de arroz irrigado**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 18. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), mar. 2004. Disponível em <http://www.cnpma.embrapa.br/download/boletim_18.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2016.

SINGH, Ravindra; SINGH, Pushpendra; SHARMA, Rajesh. Microorganism as a tool of bioremediation technology for cleaning environment: a review. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**. Hong Kong, v. 4, n. 1, p. 1-6, mar. 2014.

SISTEMA DE INFORMAÇÕES SOBRE AGENTES TERATOGENICOS (SIAT). **Agentes Teratogênicos**. Disponível em <<http://www.siat.ufba.br/node/90>>. Acesso em: 07 nov. 2016.

SOUZA, Gleison. **Produção, extração e estabilidade de enzimas lignocelulolíticas para uso em degradação em compostos poluentes**. 2012. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

STEWART, J. J.; AKIYAMA, T.; CHAPPLE, C.; RALPH, J.; MANSFIELD, S.D. The effects on lignin structure of overexpression of ferulate 5-hydroxylase in hybrid poplar. **Plant Physiology**, v. 150, p. 621–635, 2009.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Exposure Factors Handbook 2011 Edition** (Final). Washington, DC, EPA/600/R-09/052F, out. 2011. Disponível em < <https://cfpub.epa.gov/ncea/risk/recordisplay.cfm?deid=236252> >. Acesso em: 08 out. 2016.

VALLERO, Daniel A. **Environmental biotechnology: a biosystems approach**. 1 ed. San Diego: Academic Press, 2010. 750 p.

VASCONCELLOS, S. P.; DELLAGNEZZE, B. M.; WIELAND, A.; KLOCK, J. H.; SANTOS NETO, E. V.; MARSAIOLI, A. J.; OLIVEIRA, V. M.; MICHAELIS, W. The potential for hydrocarbon biodegradation and production of extracellular polymeric substances by aerobic bacteria isolated from a brazilian petroleum reservoir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 1513-1518, jun. 2011.

VASCONCELOS, M. R. S. **Prospecção de fungos derivados de esponjas marinhas na degradação/descoloração de poluentes ambientais**. 2014. 92 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

WARIISHI, H., VALLIS, K., GOLD, M. H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 23689-23695, 1992.

APÊNDICE A – MATRIZ PLACKETT-BURMAN PARA DESTOXIFICAÇÃO DO PIRENO

MATRIZ CODIFICADA PLACKETT-BURMAN PARA 20 ENSAIOS (PB20) - PIRENO														
Ensaio	1. Inóculo fúngico (cilindros de 0,8 cm)	2. Inóculo bacteriano (mL)	3. Glicose (g)	4. Extrato de levedura (g)	5. Peptona (g)	6. Extrato de malte (g)	7. MnSO ₄ (mL)	8. KH ₃ PO ₄ (μL)	9. CuSO ₄ (mL)	10. Riboflavina (mL)	11. Pireno	12. pH	13. Salinidade (ASW %)	Quantidade de ASW (mL)
1	1 (4)	-1 (1)	1 (1g/50mL)	1 (0,5g/50mL)	-1 (0g)	-1 (0g)	-1 (0mL)	-1 (0μL)	1 (0,2mL)	-1 (0mL)	1	-1(6)	1 (100)	48,8
2	1 (4)	1 (3)	-1 (0g)	1 (0,5g/50mL)	1 (0,1g/50mL)	-1 (0g)	-1 (0mL)	-1 (0μL)	-1 (0mL)	1 (2,65mL)	-1	1 (8)	-1 (0)	44,35
3	-1 (2)	1 (3)	1 (1g/50mL)	-1 (0g)	1 (0,1g/50mL)	1 (1g/50mL)	-1 (0mL)	-1 (0μL)	-1 (0mL)	-1 (0mL)	1	-1(6)	1 (100)	47
4	-1 (2)	-1 (1)	1 (1g/50mL)	1 (0,5g/50mL)	-1 (0g)	1 (1g/50mL)	1 (0,2mL)	-1 (0μL)	-1 (0mL)	-1 (0mL)	-1	1 (8)	-1 (0)	48,8
5	1 (4)	-1 (1)	-1 (0g)	1 (0,5g/50mL)	1 (0,1g/50mL)	-1 (0g)	1 (0,2mL)	1 (36μL)	-1 (0mL)	-1 (0mL)	-1	-1(6)	1 (100)	48,8
6	1 (4)	1 (3)	-1 (0g)	-1 (0g)	1 (0,1g/50mL)	1 (1g/50mL)	-1 (0mL)	1 (36μL)	1 (0,2mL)	-1 (0mL)	-1	-1(6)	-1 (0)	46,8
7	1 (4)	1 (3)	1 (1g/50mL)	-1 (0g)	-1 (0g)	1 (1g/50mL)	1 (0,2mL)	-1 (0μL)	1 (0,2mL)	1 (2,65mL)	-1	-1(6)	-1 (0)	43,95
8	1 (4)	1 (3)	1 (1g/50mL)	1 (0,5g/50mL)	-1 (0g)	-1 (0g)	1 (0,2mL)	1 (36μL)	-1 (0mL)	1 (2,65mL)	1	-1(6)	-1 (0)	44,15
9	-1 (2)	1 (3)	1 (1g/50mL)	1 (0,5g/50mL)	1 (0,1g/50mL)	-1 (0g)	-1 (0mL)	1 (36μL)	1 (0,2mL)	-1 (0mL)	1	1 (8)	-1 (0)	46,8
10	1 (4)	-1 (1)	1 (1g/50mL)	1 (0,5g/50mL)	1 (0,1g/50mL)	1 (1g/50mL)	-1 (0mL)	-1 (0μL)	1 (0,2mL)	1 (2,65mL)	-1	1 (8)	1 (100)	46,15
11	-1 (2)	1 (3)	-1 (0g)	1 (0,5g/50mL)	1 (0,1g/50mL)	1 (1g/50mL)	1 (0,2mL)	-1 (0μL)	-1 (0mL)	1 (2,65mL)	1	-1(6)	1 (100)	44,15
12	1 (4)	-1 (1)	1 (1g/50mL)	-1 (0g)	1 (0,1g/50mL)	1 (1g/50mL)	1 (0,2mL)	1 (36μL)	-1 (0mL)	-1 (0mL)	1	1 (8)	-1 (0)	48,8
13	-1 (2)	1 (3)	-1 (0g)	1 (0,5g/50mL)	-1 (0g)	1 (1g/50mL)	1 (0,2mL)	1 (36μL)	1 (0,2mL)	-1 (0mL)	-1	1 (8)	1 (100)	46,6
14	-1 (2)	-1 (1)	1 (1g/50mL)	-1 (0g)	1 (0,1g/50mL)	-1 (0g)	1 (0,2mL)	1 (36μL)	1 (0,2mL)	1 (2,65mL)	-1	-1(6)	1 (100)	45,95
15	-1 (2)	-1 (1)	-1 (0g)	1 (0,5g/50mL)	-1 (0g)	1 (1g/50mL)	-1 (0mL)	1 (36μL)	1 (0,2mL)	1 (2,65mL)	1	-1(6)	-1 (0)	46,15
16	-1 (2)	-1 (1)	-1 (0g)	-1 (0g)	1 (0,1g/50mL)	-1 (0g)	1 (0,2mL)	-1 (0μL)	1 (0,2mL)	1 (2,65mL)	1	-1(6)	-1 (0)	45,95
17	1 (4)	-1 (1)	-1 (0g)	-1 (0g)	-1 (0g)	1 (1g/50mL)	-1 (0mL)	1 (36μL)	-1 (0mL)	1 (2,65mL)	1	1 (8)	1 (100)	46,35
18	1 (4)	1 (3)	-1 (0g)	-1 (0g)	-1 (0g)	-1 (0g)	1 (0,2mL)	-1 (0μL)	1 (0,2mL)	-1 (0mL)	1	1 (8)	1 (100)	46,6
19	-1 (2)	1 (3)	1 (1g/50mL)	-1 (0g)	-1 (0g)	-1 (0g)	-1 (0mL)	1 (36μL)	-1 (0mL)	1 (2,65mL)	-1	1 (8)	1 (100)	44,35
20	-1 (2)	-1 (1)	-1 (0g)	-1 (0g)	-1 (0g)	-1 (0g)	-1 (0mL)	-1 (0μL)	-1 (0mL)	-1 (0mL)	-1	-1(6)	-1 (0)	49
21 (C)	0 (3)	0 (2)	0 (0,5g/50mL)	0 (0,25g/50mL)	0 (0,05g/50mL)	0 (0,5g/50mL)	0 (0,1mL)	0 (18μL)	0 (0,1mL)	0 (1,3mL)	0	0 (7)	0 (50)	46,5
22 (C)	0 (3)	0 (2)	0 (0,5g/50mL)	0 (0,25g/50mL)	0 (0,05g/50mL)	0 (0,5g/50mL)	0 (0,1mL)	0 (18μL)	0 (0,1mL)	0 (1,3mL)	0	0 (7)	0 (50)	46,5
23 (C)	0 (3)	0 (2)	0 (0,5g/50mL)	0 (0,25g/50mL)	0 (0,05g/50mL)	0 (0,5g/50mL)	0 (0,1mL)	0 (18μL)	0 (0,1mL)	0 (1,3mL)	0	0 (7)	0 (50)	46,5
24 (C)	0 (3)	0 (2)	0 (0,5g/50mL)	0 (0,25g/50mL)	0 (0,05g/50mL)	0 (0,5g/50mL)	0 (0,1mL)	0 (18μL)	0 (0,1mL)	0 (1,3mL)	0	0 (7)	0 (50)	46,5

Fonte: elaborada pela autora (2016).

Nota:

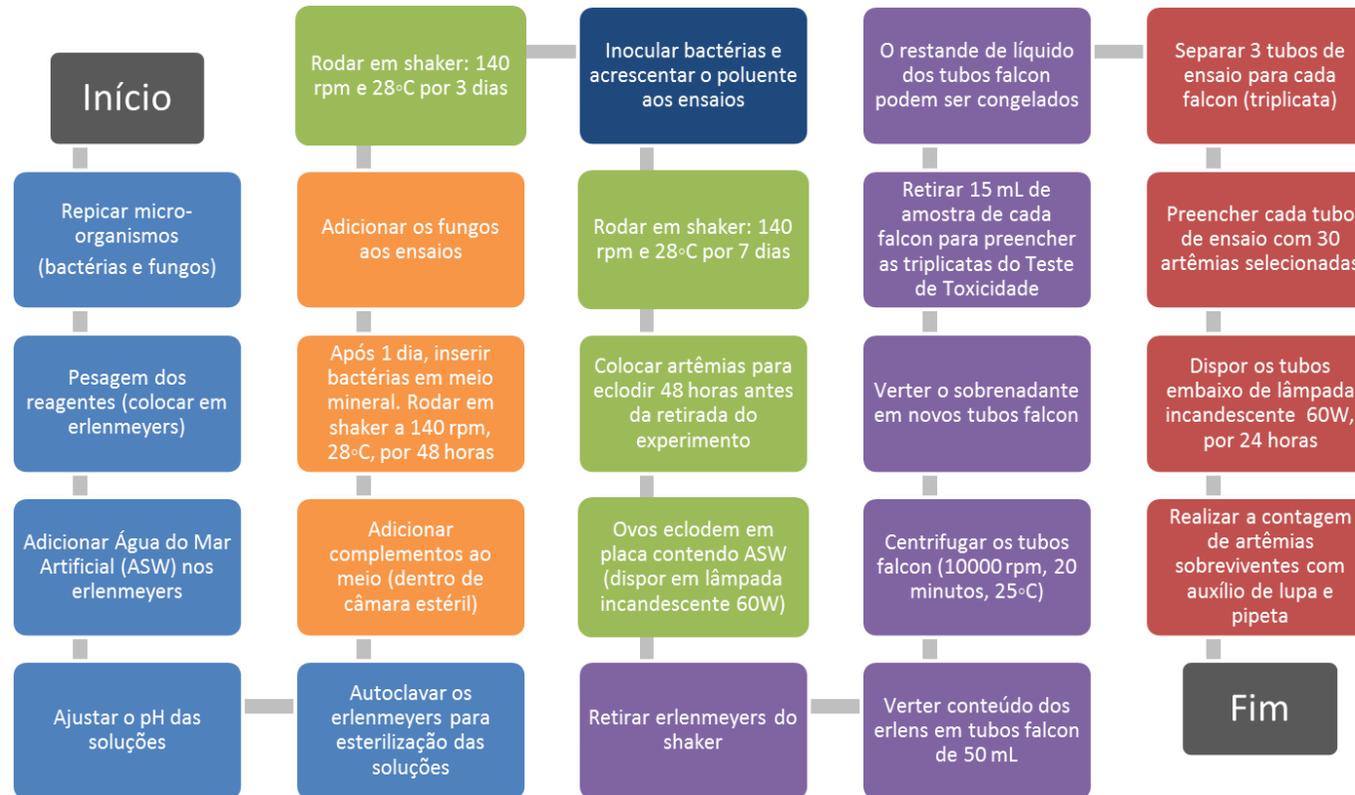
Os volumes adotados para salinidade:

(100) = 50 mL de ASW

(50) = 25 mL de ASW + 25 mL água destilada

(0) = 50 mL de água destilada.

APÊNDICE B – AS PRINCIPAIS ETAPAS DO EXPERIMENTO



Fonte: elaborada pela autora (2016).

Legenda:



APÊNDICE C – CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE

Produção de Lacase - Condição Otimizada do Ensaio 17									
Experimentos	Tempo	Triplicatas	Abs Inicial	Abs Final	Δ ABS	Ativi. Enz. (U/L)	Zerar valor	Ativ. Média Trip. (U/L)	Desvio padrão
Ensaio 1	10 min	1	0,281	0,283	0,002	0,009259259		0,012345679	0,005345836
		2	0,289	0,291	0,002	0,009259259			
		3	0,262	0,266	0,004	0,018518519			
Ensaio 2	10 min	1	0,235	0,236	0,001	0,00462963		0,015432099	0,009637343
		2	0,229	0,233	0,004	0,018518519			
		3	0,221	0,226	0,005	0,023148148			
Ensaio 3	10 min	1	0,259	0,261	0,002	0,009259259		0,013888889	0,008018754
		2	0,259	0,264	0,005	0,023148148			
		3	0,231	0,233	0,002	0,009259259			
Ensaio 4	10 min	1	0,219	0,223	0,004	0,018518519		0,020061728	0,002672918
		2	0,223	0,227	0,004	0,018518519			
		3	0,225	0,230	0,005	0,023148148			
Controle Neg. 1	10 min	1	0,228	0,230	0,002	0,009259259		0,007716049	0,002672918
		2	0,207	0,208	0,001	0,00462963			
		3	0,211	0,213	0,002	0,009259259			
Controle Neg. 2	10 min	1	0,049	0,048	-0,001	-0,00462963	0	0	0,002672918
		2	0,054	0,052	-0,002	-0,009259259	0		
		3	0,059	0,058	-0,001	-0,00462963	0		
Controle Neg. 3	10 min	1	0,036	0,036	0	0	0	0	0,005345836
		2	0,044	0,042	-0,002	-0,009259259	0		
		3	0,028	0,028	0	0	0		
Controle Neg. 4	10 min	1	0,062	0,053	-0,009	-0,041666667	0	0	0,012248849
		2	0,060	0,056	-0,004	-0,018518519	0		
		3	0,058	0,053	-0,005	-0,023148148	0		
Ensaio Modif. 1	10 min	1	0,302	0,299	-0,003	-0,013888889	0	0	0,028160938
		2	0,292	0,278	-0,014	-0,064814815	0		
		3	0,296	0,292	-0,004	-0,018518519	0		
Ensaio Modif. 2	10 min	1	0,379	0,382	0,003	0,013888889		0,016975309	0,002672918
		2	0,364	0,368	0,004	0,018518519			
		3	0,387	0,391	0,004	0,018518519			
Ensaio Modif. 3	10 min	1	0,265	0,259	-0,006	-0,027777778	0	0	0,020180088
		2	0,245	0,246	0,001	0,00462963	0		
		3	0,251	0,253	0,002	0,009259259	0		
Controle Modif. 1	10 min	1	0,154	0,148	-0,006	-0,027777778	0	0	0,016692367
		2	0,169	0,170	0,001	0,00462963	0		
		3	0,178	0,177	-0,001	-0,00462963	0		
Controle Modif. 2	10 min	1	0,040	0,042	0,002	0,009259259		0,016975309	0,007071876
		2	0,018	0,022	0,004	0,018518519			
		3	0,021	0,026	0,005	0,023148148			
Controle Modif. 3	10 min	1	0,182	0,182	0	0		0,00308642	0,002672918
		2	0,186	0,187	0,001	0,00462963			
		3	0,199	0,200	0,001	0,00462963			

Fonte: elaborada pela autora (2016).

Nota:

A coluna “zerar valor” foi construída para substituir as condições em que o Abs inicial possuía valor maior que o Abs final. Portanto, para estes casos, adotou-se Absorbância igual a zero.

APÊNDICE D – CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LiP

Produção de Lignina Peroxidase - Condição Otimizada do Ensaio 17								
Experimentos	Tempo	Triplicatas	Abs Inicial	Abs Final	Δ ABS	Ativi. Enz. (U/L)	Ativ. Média Trip. (U/L)	Desvio padrão
Ensaio 1	10 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
Ensaio 2	10 min	1	0,170	0,235	0,065	1,164874552	0,78255675	0,67777326
		2	0,210	0,210	0	0		
		3	0,195	0,261	0,066	1,182795699		
Ensaio 3	10 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
Ensaio 4	10 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
Controle Neg. 1	10 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
Controle Neg. 2	10 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
Controle Neg. 3	10 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
Controle Neg. 4	10 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
Ensaio Modif. 1	10 min	1	0,190	0,246	0,056	1,003584229	0,238948626	0,670867151
		2	0,322	0,320	-0,002	-0,035842294		
		3	0,322	0,308	-0,014	-0,250896057		
Ensaio Modif. 2	10 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
Ensaio Modif. 3	10 min	1	0,175	0,196	0,021	0,376344086	0,083632019	1,323781319
		2	0,235	0,159	-0,076	-1,362007168		
		3	0,127	0,196	0,069	1,23655914		
Controle Modif. 1	10 min	1	-0,060	0,034	0,094	1,684587814	0,64516129	0,982726156
		2	0,046	0,075	0,029	0,519713262		
		3	0,107	0,092	-0,015	-0,268817204		
Controle Modif. 2	10 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
Controle Modif. 3	10 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		

Fonte: elaborada pela autora (2016).

Nota:

Nas condições em que o Abs inicial possuía valor maior que o Abs final inseriu-se zero no valor da célula. Portanto, para estes casos, adotou-se Absorbância igual a zero.

APÊNDICE E – CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MnP

Produção de Manganês Peroxidase - Condição Otimizada do Ensaio 17								
Experimentos	Tempo	Triplicatas	Abs Inicial	Abs Final	Δ ABS	Ativi. Enz. (U/L)	Ativ. Média Trip. (U/L)	Desvio padrão
Ensaio 1	5 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
Ensaio 2	5 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
Ensaio 3	5 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
Ensaio 4	5 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
Controle Neg. 1	5 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
Controle Neg. 2	5 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
Controle Neg. 3	5 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
Controle Neg. 4	5 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
Ensaio Modif. 1	5 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
Ensaio Modif. 2	5 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
Ensaio Modif. 3	5 min	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
Controle Modif. 1	5 min	1	0,159	0,160	0,001	0,172562554	0,345125108	0,298887111
		2	0,166	0,170	0,004	0,690250216		
		3	0,207	0,208	0,001	0,172562554		
Controle Modif. 2	5 min	1	-0,229	-0,223	0,006	1,035375324	0,805291918	0,199258074
		2	-0,189	-0,185	0,004	0,690250216		
		3	-0,188	-0,184	0,004	0,690250216		
Controle Modif. 3	5 min	1	0,228	0,228	0	0	0,345125108	0,298887111
		2	0,290	0,293	0,003	0,517687662		
		3	0,242	0,245	0,003	0,517687662		

Fonte: elaborada pela autora (2016).

Nota:

Nas condições em que o Abs inicial possuía valor maior que o Abs final inseriu-se zero no valor da célula. Portanto, para estes casos, adotou-se Absorbância igual a zero.