UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS E CIÊNCIAS EXATAS

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

TRABALHO DE FORMATURA

PRODUÇÃO DE LACASE POR FUNGO ISOLADO DE SEDIMENTO MARINHO

Cindy Kurovski de Castro Paiva

Orientadora: Profª. Drª. Lara Durães Sette

Co-orientadora: MsC. Gabriela Alves Licursi Vieira

Rio Claro – SP

2016

CINDY KUROVSKI DE CASTRO PAIVA

PRODUÇÃO DE LACASE POR FUNGO ISOLADO DE SEDIMENTO MARINHO

Projeto de Pesquisa apresentado à Comissão do Trabalho de Formatura do Curso de Graduação em Engenharia Ambiental, Instituto de Geociências e Ciências Exatas – UNESP, Campus de Rio Claro, como parte das exigências para o cumprimento da disciplina Trabalho de Formatura no ano letivo de 2016.

Orientador: Profª. Drª. Lara Durães Sette

Co-orientador: MsC Gabriela Alves Licursi Vieira

Rio Claro – SP

2016

547.758 Paiva, Cindy Kurovski de Castro
P149p Produção de lacase por fungo isolado de sedimento marinho / Cindy Kurovski de Castro Paiva. - Rio Claro, 2016
35 f. : il., figs., gráfs., tabs.

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

1. Enzimas. 2. Fungos filamentosos. 3. Planejamento experimental. 4. Plackett & Burmann. 5. Biorremediação. I. Título.

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

CINDY KUROVSKI DE CASTRO PAIVA

PRODUÇÃO DE LACASE POR FUNGO ISOLADO DE SEDIMENTO MARINHO

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 (orientador)

Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre

Renato Montagnolli

Rio Claro, 24 de Novembro de 2016.

Cindy Kurovski de Castro Paiva

Profa. Dra. Lara Durães Sette

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar agradecendo às minhas orientadoras Profª Drª Lara Sette e MsC Gabriela Vieira. À primeira por me aceitar tão prontamente como orientanda, mesmo em cima da hora, e permitir que eu fizesse parte do time do seu laboratório e à segunda porque sem ela simplesmente não haveria TCC para apresentar. Obrigada Gabi por me ajudar por tantas dificuldades que eu tive e te dando tanto trabalho ao longo de todo este ano. Te desejo tudo de melhor na carreira, que tenho certeza, será de muito sucesso.

Quero agradecer também o Prof. Dr. Humberto Milagre, um exemplo para mim desde o primeiro ano, por ter aceitado participar da minha banca e ter se disponibilizado a vir de longe para tal, e ao Renato Montagnolli também por ter aceitado participar da minha banca, mesmo em cima da hora.

Gostaria de agradecer aos meus pais, por terem me proporcionado a possibilidade de estudar em outra cidade, o que resultou na melhor experiência que eu já vivi até hoje. Estudar em Rio Claro me proporcionou estar em uma universidade cheia de possibilidades, e mesmo que eu não tenha aproveitado todas elas, conviver com pessoas de todos os tipos diferentes e com as cabeças mais brilhantes, criativas, amorosas e abertas trouxe coisas para o meu crescimento pessoal que eu levaria décadas para aprender no mundo lá fora. Morar sozinha e depois morar com amigos foram experiências incríveis. Assim como o intercâmbio proporcionado pela Universidade. Gostaria de agradecer à UNESP.

Gostaria de agradecer a todos meus amigos integrantes da REP KITS por me proporcionarem uma coisa que eu sempre sonhei: um grupo de amigos sensacional. Nunca esquecerei nossos encontros de jogo das palavras.

Gostaria de agradecer à minhas veteranas queridas por todos os momentos vividos, festas, aulas de violão e “teclado” e pelas risadas.

Gostaria de agradecer também à Lila, minha amiga querida, por ter me proporcionado continuar esse TCC à distância, usufruindo do seu lar, o que alegrou muito as minhas semanas e me possibilitou enfrentar as dificuldades do laboratório.

RESUMO

Os fungos filamentosos e seus metabólitos vem se destacando nos processos de biorremediação em virtude do alto potencial degradativo, biossortivo e dos mecanismos de resistência em condições ambientais adversas. Uma das mais importantes enzimas ligninolíticas é a lacase (benzenodiol oxigênio oxidoredutase; EC 1.10.3.2). As lacases são oxidases que catalisam a oxidação de um amplo espectro de substratos, tais como orto e parafenóis, polifenóis, amino fenóis e aminas aromáticas ou alifáticas. Essas enzimas agem tanto em compostos fenólicos como não-fenólicos relacionados à lignina, bem como em poluentes ambientais altamente recalcitrantes e podem ser utilizadas em diferentes setores industriais. Tendo em vista a importância industrial e ambiental das lacases, o presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes fatores na produção desta enzima pelo fungo de origem marinha LAMAI 659, visando otimização do processo. Para tanto foi utilizado o planejamento experimental baseado em princípios estatísticos, seguindo o modelo de Plackett & Burmann. O presente trabalho foi desenvolvido considerando os estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Lara Sette (IB-UNESP/Rio Claro). Para a estruturação dos ensaios, o fungo foi reativado em meio sólido MA2 (2% de extrato de malte e 2% de ágar) a 28ºC por 7 dias e utilizado como inóculo. Os ensaios foram incubados por 7 dias a 140 rpm e 25°C e a atividade da lacase foi detectada pela leitura da absorbância durante a oxidação do substrato ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico). A influência das variáveis estudadas na produção de lacase foi analisada utilizando o software STATISTICA 7.0, sendo os ensaios que demonstraram melhores resultados de produção enzimática selecionados para validação das condições de cultivo. O primeiro planejamento (1º P&B) foi definido a partir do trabalho de TCC anterior de Aline Yoshida, com as seguintes variáveis independentes: quantidade de inóculo, extrato de levedura, farelo de trigo, álcool veratrílico, guaiacol e pH, gerando uma atividade máxima da enzima de 375,00 $U.L^{-1}$. Já no segundo planejamento (2º P&B), a quantidade de inóculo foi fixada em sete cilindros de inóculo e as variáveis farelo de trigo e pH tiveram suas quantidades alteradas, gerando uma atividade máxima da enzima de 902,65 $U.L^{-1}$, resultado similar ao obtido em por

Aline Yoshida. Para o terceiro e ultimo planejamento (3º P&B), as concentrações das variáveis farelo de trigo e guaiacol foram aumentadas, gerando uma atividade máxima de lacase de 3.870,37 $U.L^{-1}$. O planejamento experimental foi aplicado com sucesso, pois possibilitou um aumento de 2,29 vezes na atividade enzimática obtida no trabalho anterior. Os resultados obtidos no presente trabalho estimulam novos estudos relacionados com a produção da lacase produzida pelo fungo LAMAI 659 em escalas maiores (biorreator de bancada), além da caracterização e aplicação biotecnológica da mesma, incluindo a destoxificação de poluentes ambientais tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, corantes têxteis, diesel e petróleo.

Palavras-chave: Fungos filamentosos, planejamento experimental, Plackett & Burmann, bioremediação.

ABSTRACT

Filamentous fungi and their metabolites have been prominent in the processes of bioremediation due to the high degradation potential, biosorption, and mechanisms of resistance in adverse environmental conditions. One of the most important ligninolytic enzymes is laccase (benzenodiol: oxygen oxidoreductase; EC 1.10.3.2). Laccases are oxidases which catalyze the oxidation of a broad spectrum of substrates, such as *ortho*- and *para*-diphenols, polyphenols, aminophenols, and aromatic or aliphatic amines. These enzymes act on both phenolic and nonphenolic lignin-related compounds as well as highly recalcitrant environmental pollutants, and they can be effectively used in different industrial sectors. Based on the industrial and environmental importance of laccases, the objective of this work was to evaluate different factors in the production of laccase by the marine-derived fungus LAMAI 659, aiming to optimize the production process. For that end, experimental design based on statistical principles was used, following the Plackett & Burmann model. The present work was developed considering the previous studies carried out by the research group coordinated by the Prof. Dr. Lara Sette (IB-UNESP / Rio Claro). For the structure of the assays, the fungus was reactivated in solid MA2 medium (2% malt extract and 2% agar) at 28ºC for 7 days and used as inocula. Assays were incubated for 7 days at 140 rpm and 25 °C. Laccase activity was detected by absorbance reading during the oxidation of the ABTS substrate (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). The influence of the variables studied on laccase production was analyzed using the software STATISTICA 7.0, being the assays that presented the best results of enzymatic production selected for validation of the culture conditions. The first experimental design (1st P&B) was defined from the previous work (TCC - Aline Yoshida) with the following independent variables: amount of inoculum, yeast extract, wheat bran, veratryl alcohol, guaiacol, and pH, generating a maximum enzymatic activity of 375,00 UL^{-1}. In the second design (2nd P&B), the variable amount of inoculum was fixed in seven inoculum cylinders, also the wheat bran and pH variables had their amounts altered, generating a maximum enzymatic activity of 902.65 UL^{-1}, similar to the previous result obtained by Aline Yoshida. For the third and final design (3rd P&B), the concentrations of wheat bran and guaiacol variables were increased, generating a maximum laccase activity of

3,870.37 $U.L^{-1}$. The experimental design was successfully applied, as it allowed an increase of 2.29 times in the enzymatic activity obtained in the previous study. Results obtained in the present work stimulate new studies related to the production of laccase by the fungus LAMAI 659 in larger scales (e.g. bench-top bioreactor), as well as, enzymatic characterization and biotechnological application, including the detoxification of environmental pollutants, such as polycyclic aromatic hydrocarbons, textile dyes, diesel, and oil.

Key-words: Filamentous fungi, experimental design, Plackett & Burmann, bioremediation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 10

2. MATERIAL E MÉTODOS 13

2.1 Micro-organismo 13

2.2. Otimização da produção de lacase 14

2.3. Quantificação da atividade de lacase 16

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 17

3.1 Planejamentos Plackett & Burmann 17

3.2 Validações 24

3.2.1 Validação ensaio 4 24

3.2.2 Validação ensaio 5 25

3.2.3 Validação ensaio 6 25

3.2.4 Validação ensaio 7 26

3.2.5 Conclusão das validações 26

4. CONCLUSÃO E DIRETRIZES FUTURAS 28

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 29

6. ANEXOS 33

ANEXO A. Matriz de Plackett & Burmann utilizada no 1º P&B. 33

ANEXO B Matriz de Plackett & Burmann utilizada no 2º P&B 34

ANEXO C Matriz de Plackett & Burmann utilizada no 3º P&B 35

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRAFICA

O oceano é considerado um grande reservatório de biodiversidade. Comunidades microbianas nos ambientes marinhos são ecologicamente relevantes como intermediárias de energia e desenvolvem um papel importante nos ciclos de nutrientes pela decomposição de matéria orgânica. O desenvolvimento de pesquisas utilizando micro-organismos marinhos possui benefícios, tais como a grande diversidade de espécies a serem isoladas, conhecidas e exploradas; a variedade e ineditismo das moléculas obtidas; e a possibilidade do cultivo *in vitro,* que reduz os custos em relação à síntese química e favorece a produção em escala industrial (SCOPEL, 2012).

Em um processo conhecido como biorremediação, os micro-organismos são utilizados para a degradação de poluentes ambientais. Esse método surgiu como uma tecnologia alternativa de remediação de locais impactados com poluentes orgânicos e se fundamenta na utilização de populações microbianas que possuem a habilidade de modificar ou decompor determinados poluentes. As estratégias de biorremediação têm sido adotadas seriamente como uma maneira eficaz e de baixo custo para a remediação de ambientes contaminados por petróleo e de outros compostos orgânicos causando menores distúrbios na superfície a ser tratada. O beneficio máximo desse processo é a mineralização, obtendo como produto final CO_2 e H_2O pela via aeróbica assim como a formação de biomassa (CUNHA, 1996).

Dentre o grupo dos micro-organismos, os fungos filamentosos e seus metabólitos vem se destacando nos processos de biorremediação em virtude do alto potencial degradativo, biossortivo (metais pesados e corantes) e dos mecanismos de resistência em condições ambientais adversas. Os fungos secretam uma grande diversidade de eficientes enzimas no ambiente, as quais são utilizadas para auxiliar em sua nutrição (BENNETT, 1998), desta maneira são responsáveis pela deterioração de vários materiais naturais, refinados ou processados.

Enzimas, tais como celulases, hemicelulases, pectinases e ligninases, permitem o acesso aos polissacarídeos de vegetais, fonte primária de carbono e energia. Na natureza, a lignina e celulose são os principais constituintes da parede celular dos vegetais, e em conjunto com a hemicelulose formam uma estrutura conhecida como lignocelulose.

A lignina é descrita como um polímero aromático, tridimensional e hidrofóbico, que confere suporte estrutural para as plantas e é altamente resistente à degradação química e biológica. Através da sua estrutura complexa, estável e insolúvel em água (Figura 1), a lignina confere rigidez à madeira, diminuição da permeabilidade das paredes das células do xilema à água e proteção aos tecidos vegetais contra o ataque microbiano (HIGUSHI 1985). Sua alteração é essencial no meio natural para a utilização da celulose pelos micro-organismos e a ciclagem do carbono (CARDOSO et al., 2009).

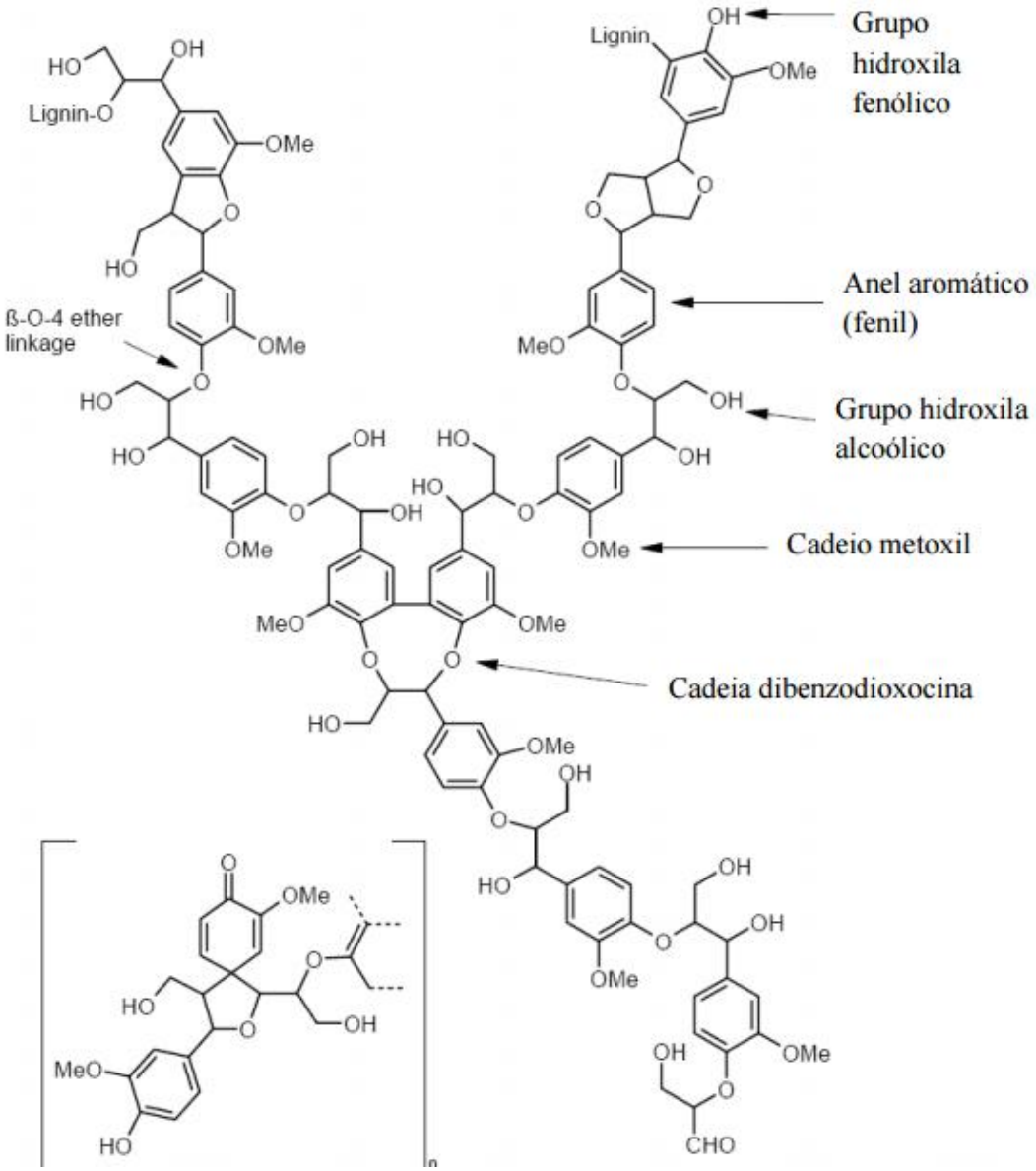

Figura 1. Segmento de um polímero de lignina. (FONTE: BRUNOW, 2001)

Muitas espécies de fungos pertencentes ao Filo Basidiomycota, são degradadoras de madeira e podem ser divididas em dois grandes grupos: os

fungos causadores de podridão branca e os causadores de podridão parda (RYVARDEN & JOHANSE 1980). Os fungos de podridão branca são os mais reconhecidamente efetivos na degradação de lignina, celulose e hemicelulose em moléculas menores até gás carbono e água (MATHEUS & OKINO, 1998).

A degradação da lignina ocorre a partir da ação concomitante das enzimas ligninolíticas, as quais participam em diferentes reações oxidativas, quebrando a estrutura aromática e as ligações entre as unidades básicas deste polímero (Figura 2).

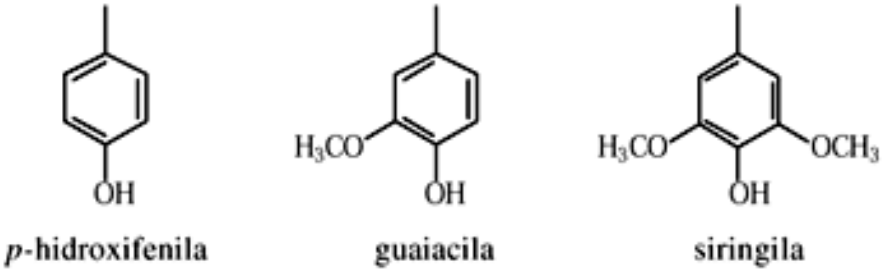

Figura 2. Principais unidades aromáticas presentes na molécula de lignina. (FONTE: SANTOS, 2000)

Uma das mais importantes enzimas ligninolíticas é a lacase (benzenodiol:oxygen oxidoreductase; EC 1.10.3.2). As lacases são polifenol oxidases, enzimas pertencentes à classe de oxidoredutases, que catalisam reações de oxidação de um amplo espectro de substratos, como orto- e para-difenóis, polifenóis, aminofenóis e aminas aromáticas ou alifáticas. As lacases descolorem e destoxificam efluentes industriais e ajudam no tratamento de águas residuárias. Elas agem tanto em compostos fenólicos como não-fenólicos relacionados à lignina, bem como em poluentes ambientais altamente recalcitrantes e, por isso, podem ser utilizados por indústrias de papel e celulose, indústrias têxteis, degradação xenobiótica e biorremediação (VISWANATH et al, 2014). Exemplos de aplicações biotecnológicas das lacases estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Aplicações industriais e biotecnológicas das lacases. (Fonte: MAINARDI, 2014).

Indústria Alimentícia	Indústria de Polpa e Papel	Indústria Têxtil	Bioremediação	Química Sintética e Nanobiotecnologia
Remoção de Fenóis de Alimentos e Bebidas; Diminuição de Turbidez	Despolimezação da Lignina; Deslignificação da Polpa na Madeira; Bio-branqueamento da *Polpa* Kraft	Degradação de Corantes	Biodegradação ou remoção de componentes xenobióticos	Produção de Polímeros; Agentes Farmacêuticos; Biosensores; Novos Produtos Sintéticos.

Considerando a importância industrial e ambiental das lacases, o presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes fatores no processo de produção de lacase pelo fungo de origem marinha LAMAI 659, dando continuidade a estudos anteriores que o selecionaram como potencial para a produção dessa enzima pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Lara Sette (IB-UNESP/Rio Claro).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo

Foi utilizado o fungo filamentoso LAMAI 659 (Figura 3) isolado de sedimento marinho em Alcatrazes (litoral do Estado de São Paulo). O fungo encontrava-se preservado por dois métodos distintos (Castellani e criopreservação) na coleção de pesquisa associada à Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP).

Análises morfológicas preliminares indicaram que o fungo LAMAI 659 pertence ao grupo dos basidiomicetos. O fungo está sendo identificado por meio de taxonomia molecular pelo grupo da Profa. Dra. Lara Sette (IB-UNESP/Rio Claro).

Figura 3. Fungo filamentoso LAMAI 659 isolado de amostra de sedimento fino na região de Alcatrazes no Estado de São Paulo. (Fonte: YOSHIDA, 2015)

2.2. Otimização da produção de lacase

O uso do planejamento experimental baseado em princípios estatísticos permite extrair de um sistema de ensaios o máximo de informação relevante, utilizando um número mínimo de experimentos. É uma ferramenta ideal para se chegar às condições otimizadas de um processo, principalmente envolvendo a análise de diversos fatores e seus efeitos na resposta desejada. Nesse trabalho, foi aplicado o planejamento do tipo Plackett & Burman (1946) para a construção das matrizes de Hadamard (matrizes com elementos 1 e -1).

As variáveis do primeiro planejamento (1ºP&B) foram definidas com base nos dados obtidos de YOSHIDA (2015) e estão apresentados na Tabela 2. Neste 1ºP&B, 6 variáveis foram utilizadas, totalizando 12 ensaios (matriz PB12) e quatro pontos centrais adicionais para a determinação do erro padrão durante a análise dos resultados, como pode ser observado no Anexo A.

Tabela 2. Variáveis utilizadas no 1º P&B e suas respectivas concentrações.

Variáveis	-1	0	1
1. Nº de cilindros do inóculo (0,5cm)	5	6	7
2. Ext Levedura (g.50mL^{-1})	0	0,4	0,8
3. Farelo de trigo (g.50mL^{-1})	0	0,2	0,4
4. Álcool veratrílico mM	0	0,4	0,8
5. Guaiacol mM	0	0,2	0,4
6. pH	7	8	9

Com base nas respostas das variáveis independentes utilizadas no 1ºP&B, um segundo P&B contendo 5 variáveis independentes foi estruturado de acordo com os dados apresentados na Tabela 3. Neste PB, foi aplicada uma matriz com 12 ensaios (PB12) e quatro pontos centrais adicionais (ANEXO B).

Tabela 3. Variáveis utilizadas no 2º P&B e suas respectivas concentrações.

Variáveis	-1	0	1
1. Ext Levedura (g.50mL^{-1})	0,4	0,6	0,8
2. Farelo de trigo (g.50mL^{-1})	0,4	0,6	0,8
3. Álcool veratrílico mM	0,4	0,6	0,8
4. Guaiacol mM	0	0,2	0,4
5. pH	6	7	8

A partir da análise dos resultados do 2ºP&B foi estruturado um terceiro P&B, contendo 5 variáveis independentes, cujas concentrações/valores estão apresentados na Tabela 4. Neste PB, foi aplicada uma matriz com 12 ensaios (PB12) e quatro pontos centrais adicionais (ANEXO C).

Tabela 4. Variáveis utilizadas no 3º P&B e suas respectivas concentrações.

Variáveis	-1	0	1
1. Ext Levedura (g.50mL^{-1})	0,4	0,6	0,8
2. Farelo de trigo (g.50mL^{-1})	1	2	3
3. Álcool veratrílico mM	0,4	0,6	0,8
4. Guaiacol mM	0	0,4	0,8
5. pH	6	7	8

Todos os experimentos dos planejamentos P&B foram conduzidos por sete dias a 25ºC e 140 rpm.

A influência das variáveis estudadas na produção de lacase foi analisada utilizando o software STATISTICA 7.0 (MAGRINI, 2012). Ao final do 3ºP&B os ensaios que culminaram nos melhores resultados de produção enzimática foram selecionados para validação das condições de cultivo.

2.3. Quantificação da atividade de lacase

A atividade da lacase foi detectada a 37°C pela leitura da absorbância durante a oxidação do substrato ABTS (Figura 4) a 420 nm (ε = 36.000 M^{-1} cm^{-1}) por 10 min segundo Li *et al*. (2008). A mistura da reação continha 0,3 mL de tampão acetato de sódio (0,1 M; pH 5,0), 0,6 mL de extrato enzimático e 0,1 mL de solução de ABTS (0,5 mM). A medição foi realizada em triplicata.

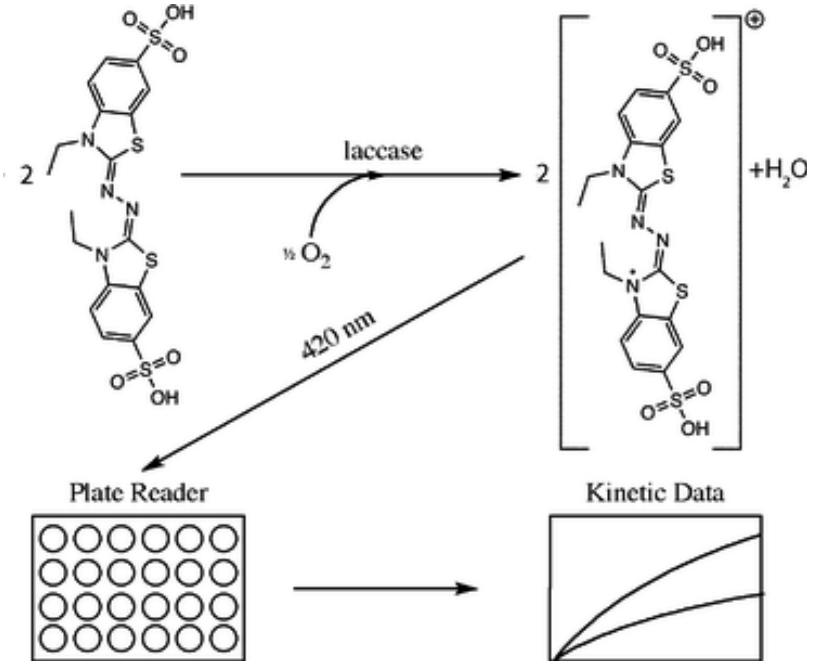

Figura 4. Oxidação do ABTS. (FONTE: REHMANN et al., 2012)

Para a obtenção dos extratos enzimáticos, os cultivos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante utilizado como caldo enzimático.

Uma unidade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de substrato por minuto. A atividade enzimática foi expressa em $U.L^{-1}$ de caldo enzimático e os cálculos foram realizados a partir da Equação 1, derivada da Lei de Lambert-Beer.

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

Onde:

ΔA diferença entre a absorbância final e a inicial

V volume da reação (0,001 L em todos os casos)

10^6 converte os mols do ε para μmols

ε coeficiente de extinção molar (M^{-1} cm^{-1})

R quantidade de caldo enzimático (L)

t tempo de reação (min)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Planejamentos Plackett & Burmann

A investigação dos efeitos das condições de cultivo sobre o processo de produção de lacase pelo fungo LAMAI 659 foi iniciado em YOSHIDA (2015).

Após a condução de três planejamentos experimentais do tipo Plackett & Burmann no trabalho de YOSHIDA (2015), a produção de lacase passou de 82,25 $U.L^{-1}$ para 970,68 $U.L^{-1}$. Desta forma, foi dada continuidade aos estudos partindo das respostas das variáveis independentes do último planejamento aplicado (3ºP&B) e da análise estatística desse P&B, cujos resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Análise estatística do 3º P&B de YOSHIDA (2015)

3º P&B	Efeito	*P*
1. Nº de cilindros do inóculo	-16,550	0,826196
2. Ext Levedura ($g.L^{-1}$)	246,146	0,011595[a]
3. Farelo de trigo ($g.L^{-1}$)	113,101	0,163246
4. CuSO4 mM	-74,035	0,341808
5. Álcool veratrílico mM	248,067	0,011185[a]
6. Guaiacol mM	-77,885	0,318970
7. ASW (ml)	-369,038	0,001426[a]
8. pH	10,785	0,886102

[a] indica as variáveis de efeito significativo ($p<0,1$)

Nesse ensaio, foi possível evidenciar efeitos estatisticamente significativos ($p<0,1$) das variáveis: ASW (*Artificial seawater*), extrato de levedura e álcool veratrílico, sendo estas duas últimas com efeito positivo. O efeito positivo foi

observado nas seguintes variáveis: álcool veratrílico, extrato de levedura, farelo de trigo e pH. Por outro lado as variáveis ASW, guaiacol, $CuSO_4$ e número de inóculo apresentaram influência negativa para a produção de lacase (YOSHIDA, 2015).

No trabalho de YOSHIDA (2015) foi possível observar que o fungo selecionado se desenvolveu bem em temperatura ambiente (25°C) e em condições de baixa salinidade, com pH em torno de 8. Os principais componentes do meio que demonstraram efeito positivo foram o álcool veratrílico, como indutor de lacase (Figura 5), o extrato de levedura como fonte de nitrogênio e o farelo de trigo como substrato fibroso rico em carbono e nitrogênio.

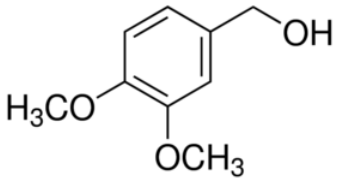

Figura 5. Formula estrutural do álcool veratrílico. (FONTE: SIGMA-ALDRICH)

Desta forma, no presente trabalho foi definido o planejamento seqüente com as seguintes variáveis independentes: quantidade de inóculo, extrato de levedura, farelo de trigo, álcool veratrílico, guaiacol e pH. A variável salinidade (ASW) foi excluída, uma vez que apresentou no trabalho anterior resultado estatisticamente significativo, mas negativo. A variável $CuSO_4$ foi excluída por não estar presente no ensaio que apresentou maior valor de atividade enzimática no trabalho anterior (970,68 $U.L^{-1}$). As variáveis extrato de levedura e álcool veratrílico tiveram suas quantidades aumentadas por apresentarem efeitos positivos e estatisticamente significativos. As quantidades de inóculo, farelo de trigo e guaiacol foram mantidas como no 3ºP&B do trabalho de YOSHIDA (2015), pois estavam presentes no ensaio que resultou no melhor valor de produção de lacase, mas os resultados não foram estatisticamente significativos. Em adição, a variável pH foi aumentada, visto que no ensaio que apresentou o melhor resultado de produção de lacase em YOSHIDA (2015), o pH estava no valor mais elevado (pH=8). As variáveis independentes utilizadas no 1º P&B do presente trabalho, bem como suas respectivas concentrações/quantidades, estão apresentadas na Tabela 6.

Para a estruturação dos ensaios do 1ºP&B o fungo foi reativado em meio sólido MA2 (2% de extrato de malte e 2% de ágar) a 28ºC por 7 dias e utilizados como inóculo. Os ensaios foram incubados por 7 dias a 140 rpm e 25°C.

Os resultados do 1ºP&B estão apresentados na Tabela 6. Os valores dos pontos centrais foram próximos, indicando confiabilidade nos resultados apresentados e foram os melhores resultados de produção de lacase. A maior atividade da enzima (375,00 $U.L^{-1}$) no 1ºP&B foi bastante inferior ao melhor resultado obtido pelo mesmo fungo no TCC da Aline Yoshida (970,68 $U.L^{-1}$).

Tabela 6. Produção de lacase pelo fungo LAMAI 659 e valores reais da matriz do primeiro planejamento de Plackett-Burman com 6 variáveis (PB12).

Ensaios	Nº de cilindros inóculo	Ext Levedura ($g.50mL^{-1}$)	Farelo de trigo ($g.50mL^{-1}$)	Álcool veratrílico mM	Guaiacol mM	pH	Lacase ($U.L-^{1}$)
1	7	0,0	0,4	0,0	0,0	7	78,40
2	7	0,8	0,0	0,8	0,0	7	26,88
3	5	0,8	0,4	0,0	0,4	7	0
4	7	0,0	0,4	0,8	0,0	9	93,44
5	7	0,8	0,0	0,8	0,4	7	34,60
6	7	0,8	0,4	0,0	0,4	9	0
7	5	0,8	0,4	0,8	0,0	9	0
8	5	0,0	0,4	0,8	0,4	7	44,07
9	5	0,0	0,0	0,8	0,4	9	0,77
10	7	0,0	0,0	0,0	0,4	9	0,22
11	5	0,8	0,0	0,0	0,0	9	0,01
12	5	0,0	0,0	0,0	0,0	7	25,80
13 C	6	0,4	0,2	0,4	0,2	8	264,81
14 C	**6**	**0,4**	**0,2**	**0,4**	**0,2**	**8**	**375,00**
15 C	6	0,4	0,2	0,4	0,2	8	353,09
16 C	6	0,4	0,2	0,4	0,2	8	342,59

Os resultados foram inseridos no software STATISTICA 7.0 (MAGRINI, 2012) para análise da significância dos resultados e os dados estão apresentados

na Tabela 7. Neste primeiro P&B, não houve resultados estatisticamente significativos, porém as variáveis inóculo, farelo de trigo e álcool veratrílico apresentaram efeito positivo, enquanto que as outras variáveis apresentaram efeito negativo.

Tabela 7. Análise estatística do 1º P&B.

1ºPB	Efeito	*p*
1. Nº de cilindros do inóculo (0,5cm)	27,1483	0,800670
2. Ext. Levedura (g.50mL^{-1})	-30,2017	0,778899
3. Farelo de trigo (g.50mL^{-1})	21,2717	0,843069
4. Álcool veratrílico mM	15,8883	0,882388
5. Guaiacol mM	-24,1450	0,822262
6. pH	-19,2183	0,858019

Com base nos resultados do primeiro P&B, um segundo P&B foi estruturado. Para tanto, a quantidade de inóculo foi fixada no seu maior valor (7 cilindros de inóculo) e as quantidades de farelo de trigo foram aumentadas, visto que no ensaio que apresentou maior valor de produção de lacase, essas variáveis estavam presentes no seu maior valor. Os valores de pH foram também alterados. As variáveis independentes utilizadas no segundo P&B do presente trabalho, bem como suas respectivas concentrações/quantidades, estão apresentadas na Tabela 8.

Novamente as amostras foram inoculadas e incubadas por 7 dias a 140 rpm e 25°C, utilizando a mesma matriz de PB12 anterior, gerando os resultados apresentados na Tabela 8. Os resultados dos pontos centrais do 2º P&B apresentaram baixo desvio padrão. A maior produção de lacase (902,65 U.L^{-1}) foi obtida nas condições do ensaio 3, foi maior do que a do 1º P&B (375,00 U.L^{-1}) e próxima ao valor obtido por YOSHIDA (2015) de 970,68 U.L^{-1}.

Os resultados das análises de significância do 2º P&B (Tabela 9) revelaram que a variável farelo de trigo apresentou efeito estatisticamente significativo, mas negativo para a produção da enzima. A única variável que apresentou efeito positivo foi o álcool veratrílico.

Tabela 8. Produção de lacase pelo fungo LAMAI 659 e valores reais da matriz do segundo planejamento de Plackett-Burman com 5 variáveis (PB12).

Ensaios	Ext. de Levedura ($g.50mL^{-1}$)	Farelo de trigo ($g.50mL^{-1}$)	Álcool veratrílico (mM)	Guaiacol (mM)	pH	Lacase ($U.L^{-1}$)
1	0,8	0,4	0,8	0,0	6	0
2	0,8	0,8	0,4	0,4	6	867,28
3	**0,4**	**0,8**	**0,8**	**0,0**	**8**	**902,65**
4	0,8	0,4	0,8	0,4	6	750,62
5	0,8	0,8	0,4	0,4	8	397,22
6	0,8	0,8	0,8	0	8	45,37
7	0,4	0,8	0,8	0,4	6	138,89
8	0,4	0,4	0,8	0,4	8	0,09
9	0,4	0,4	0,4	0,4	8	313,89
10	0,8	0,4	0,4	0,0	8	145,52
11	0,4	0,8	0,4	0,0	6	129,94
12	0,4	0,4	0,4	0,0	6	376,23
13 C	0,6	0,6	0,6	0,2	7	863,58
14 C	0,6	0,6	0,6	0,2	7	738,89
15 C	0,6	0,6	0,6	0,2	7	814,81
16 C	0,6	0,6	0,6	0,2	7	866,67

Tabela 9. Análise estatística do 2º P&B.

2ºPB	Efeito	*p*
Extrato de levedura	-2,1667	0,434920
Farelo de trigo	-5,1667	0,081124[a]
Álcool veratrílico	1,1667	0,670701
Guaiacol	-2,1667	0,434920
pH	-0,5000	0,854857

[a] indica as variáveis de efeito significativo ($p<0,1$)

Considerando os efeitos das variáveis e a presença ou ausência das mesmas no ensaio que apresentou a maior produção de lacase no 2º P&B, um

terceiro P&B foi estruturado. Para o terceiro P&B as concentrações/valores de extrato de levedura, álcool veratrílico e pH foram mantidas e as concentrações de farelo de trigo e guaiacol foram aumentadas. As variáveis independentes utilizadas no terceiro P&B do presente trabalho, bem como suas respectivas concentrações/quantidades, estão apresentadas na Tabela 10.

Seguindo os modelos anteriores, os ensaios do 3º P&B foram incubados por 7 dias a 140 rpm e 25°C. Os resultados estão apresentados na Tabela 10 e revelaram valores mais altos de lacase. Novamente os resultados dos pontos centrais foram coerentes (baixo desvio padrão). As maiores atividades foram obtidas nas condições dos ensaios 6 (3.870,37 $U.L^{-1}$) e 7 (3.407,41 $U.L^{-1}$).

Tabela 10. Produção de lacase pelo fungo LAMAI 659 e valores reais da matriz do terceiro planejamento de Plackett-Burman com 5 variáveis (PB12)

Ensaios	Ext. de Levedura ($g.50mL^{-1}$)	Farelo de trigo ($g.50mL^{-1}$)	Álcool veratrílico (mM)	Guaiacol (mM)	pH	Lacase ($U.L^{-1}$)
1	0,8	1,0	0,8	0	6	138,27
2	0,8	3,0	0,4	0,8	6	388,27
3	0,4	3,0	0,8	0	8	3,86
4	0,8	1,0	0,8	0,8	6	2.719,14
5	0,8	3,0	0,4	0,8	8	2.509,26
6	**0,8**	**3,0**	**0,8**	**0**	**8**	**3.870,37**
7	0,4	3,0	0,8	0,8	6	3.407,41
8	0,4	1,0	0,8	0,8	8	983,02
9	0,4	1,0	0,4	0,8	8	913,58
10	0,8	1,0	0,4	0	8	1.265,43
11	0,4	3,0	0,4	0	6	2.095,68
12	0,4	1,0	0,4	0	6	1.623,46
13 C	0,6	2,0	0,6	0,4	7	2.296,30
14 C	0,6	2,0	0,6	0,4	7	2.015,43
15 C	0,6	2,0	0,6	0,4	7	2.842,59
16 C	0,6	2,0	0,6	0,4	7	2.907,41

As análises de significância dos resultados do 3ºP&B estão apresentadas na tabela 11. As variáveis extrato de levedura e pH foram estatisticamente significativas, sendo a primeira com efeito negativo e a segunda com o efeito positivo. A variável álcool veratrílico também apresentou efeito positivo e as outras duas variáveis apresentaram efeito negativo na produção de lacase pelo fungo LAMAI 659.

Tabela 11. Análise estatística do 3º P&B

3ºPB	Efeito	*p*
Extrato de levedura	-6,6667	0,012852[a]
Farelo de trigo	-0,6667	0,768692
Álcool veratrílico	1,0000	0,660011
Guaiacol	-1,6667	0,467373
pH	4,0000	0,099881[a]

[a] indica as variáveis de efeito significativo (p<0,1)

A evolução da produção de lacase ao longo dos três planejamentos experimentais realizados no presente trabalho está apresentada na Figura 6.

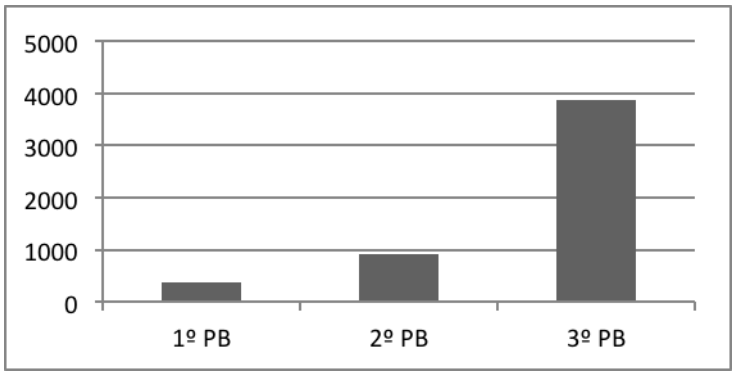

Figura 6. Evolução da produção de lacase em cada planejamento Plackett & Burmann.

A aplicação do planejamento experimental foi eficiente para a produção de lacase pelo fungo de origem marinha LAMAI 659. Resultados similares foram obtidos nos estudos de PERIASAMY & PALVANNAN (2010), onde a otimização do meio de cultivo para a produção de lacase desempenhou um papel importante.

Segundo os autores, a utilização da matriz ortogonal de Taguchi levou a um aumento no rendimento da lacase produzida pelo basideomiceto *Pleurotus orstreatus* (IMI395545) de 485 $U.L^{-1}$ para 820 $U.L^{-1}$.

3.2 Validações

Considerando os resultados obtidos no 3º PB, os quatro ensaios que apresentaram maiores valores de produção de lacase (ensaios 4, 5, 6 e 7) foram submetidos ao experimento de validação. Os ensaios foram repetidos em triplicata nas seguintes condições:

- Ensaio 4: 50 mL de água destilada; 7 cilindros de inóculo; 0,8 g de extrato de levedura; 1 g de farelo de trigo; 0,8 mM álcool veratrílico a; 0,8 mM guaiacol e pH 6.

- Ensaio 5: 50 mL de água destilada; 7 cilindros de inóculo; 0,8 g de extrato de levedura; 3 g de farelo de trigo; 0,4 mM álcool veratrílico, 0,8 mM guaiacol e pH 8.

- Ensaio 6: 50 mL de água destilada; 7 cilindros de inóculo; 0,8 g de extrato de levedura; 3 g de farelo de trigo; 0,8 mM álcool veratrílico e com pH 8.

- Ensaio 7: 50 mL de água destilada; 7 cilindros de inóculo; 0,4 g de extrato de levedura; 3 g de farelo de trigo; 0,8 mM álcool veratrílico; 0,8 mM guaiacol e pH 6.

Todos os experimentos de validação foram incubado por 7 dias a 25° C e 140 rpm.

3.2.1 Validação ensaio 4

Os experimentos de validação das condições de cultivo do ensaio 4 apresentaram uma grande variação nas triplicatas (Tabela 12), sendo a atividade enzimática média no valor de 2.079,21 $U.L^{-1}$.

Tabela 12. Experimentos de validação e variação relativa ao ensaio 4 do 3º P&B.

	Produção de lacase ($U.L^{-1}$)	Variação em relação ao ensaio 4 do 3º P&B
Ensaio 4a	3.879,63	43%
Ensaio 4b	1.398,14	-49%
Ensaio 4c	959,87	-65%

3.2.2 Validação ensaio 5

O ensaio 5 foi o que apresentou menor variação entre os resultados da validação e o ensaio original, com variação menor que 30%, como pode ser observado na Tabela 13. A média da atividade enzimática para a validação deste ensaio foi de 2.224,27 $U.L^{-1}$.

Tabela 13. Experimentos de validação e variação relativa ao ensaio 5 do 3º P&B.

	Produção de lacase ($U.L^{-1}$)	Variação em relação ao ensaio 5 do 3º P&B
Ensaio 5a	2.003,08	-20%
Ensaio 5b	2.861,11	14%
Ensaio 5c	1.808,64	-28%

3.2.3 Validação ensaio 6

O ensaio 6 apresentou uma grande variação entre os resultados da validação e o ensaio original, entretanto há um resultado positivo que pode indicar necessidade de futuras análises, visto que no ensaio 6b houve um incremento muito significativo na produção de lacase, como pode ser observado na Tabela 14. A média da atividade enzimática para a validação deste ensaio foi de 3.379,11 $U.L^{-1}$.

Tabela 14. Experimentos de validação e variação relativa ao ensaio 6 do 3º P&B.

	Produção de lacase ($U.L^{-1}$)	**Variação em relação ao ensaio 6 do 3º P&B**
Ensaio 6a	2.873,45	-27%
Ensaio 6b	6.858,02	73%
Ensaio 6c	405,86	-90%

3.2.4 Validação ensaio 7

O ensaio 7 apresentou também uma grande variação entre os resultados da validação e o ensaio original, como pode ser observado na Tabela 15. A média da atividade enzimática para a validação deste ensaio foi de 1.364,20 $U.L^{-1}$.

Tabela 15. Experimentos de validação e variação relativa ao ensaio 7 do 3º P&B.

	Produção de lacase ($U.L^{-1}$)	**Variação em relação ao ensaio 7 do 3º P&B**
Ensaio 7a	2.024,69	-41%
Ensaio 7b	1101,85	-68%
Ensaio 7c	966,05	-72%

3.2.5 Conclusão das validações

Com base nos resultados da validação, a condição ótima para a produção de lacase pelo fungo LAMAI 659 foi determinada como sendo a condição do ensaio 5 do 3ºP&B devido ao menor desvio padrão entre as tréplicas dos ensaios de validação e, como pode ser visto na Figura 7, menor diferença também entre a média dos ensaios de validação e o ensaio original.

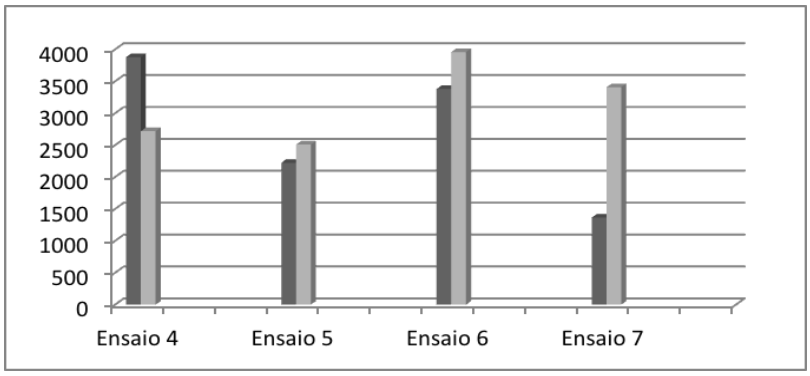

Figura 7. Médias de produção de lacase pela triplicada de validações de cada ensaio (em cinza escuro) e a condição original do 3º P&B (em cinza claro).

A produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos tem sido reportada na literatura, mas ainda são escassos os estudos de produção desta enzima por fungos de origem marinha. O presente trabalho demonstrou crescimento significativo da produção de lacase através de métodos de otimização, mas ainda existe necessidade de aumentar ainda mais essa produção com outros métodos como os utilizados por GALHAUP et al. (2002), que utilizou sistema de batelada alimentada com o fungo *Trametes pubescens* alcançando uma produção de 743.000 $U.L^{-1}$ após 692 h de cultivo, sendo atualmente o maior produtor de lacase.. Em ensaio de frascos agitados, o fungo *T. pubescens* apresentou um máximo de 319.000 $U.L^{-1}$ após 16 dias de cultivo, o que demonstra um aumento de 2,33 vezes em biorreator.

A eficiência do uso de biorreatores no aumento da quantidade de lacase produzida também foi demonstrada em estudos como der MAINARDI (2015), no qual a atividade máxima de lacases produzidas pelo fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em biorreator de agitação mecânica foi de 2.700 $U.L^{-1}$ em 120h de cultivo e em biorreator *air-lift* de 4.014 $U.L^{-1}$ em 96 horas de cultivo. Sendo que nos experimentos iniciais de otimização das condições de cultivo em escala de frascos agitados (50 mL) o fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 apresentou atividade máxima de lacases de cerca de 1.800 $U.L^{-1}$, quantidade 1,24 vezes menor que a obtida neste trabalho.

No estudo realizado por NÊLANIA (2011) os fungos *Aspergillus terreus, Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune* também apresentaram capacidade para produção de enzimas ligninolíticas. A atividade de lacase produzida pelo fungo *P. commune* foi de 1.947 $U.L^{-1}$ em meio caldo Sabouraud

(1,14 vezes menor que a obtida neste trabalho), enquanto em meio Bushnell Haas acrescido de óleo diesel a produção de lacase pelos fungos *A. terreus* e *C. echinulata* foi de 18.970 $U.L^{-1}$ e 18.705 $U.L^{-1}$, respectivamente, o que demonstra um aumento de 8,53 e 8,41 vezes em relação ao presente trabalho. Esses resultados revelam a importância da lacase frente à possibilidade de utilização do óleo diesel como substrato pra a nutrição microbiana nos processos de descontaminação do ambiente.

Com base nos estudos acima citados é possivel verificar que a escolha adequada do micro-organismo, do tipo de processo de otimização ou biorreator e das condições do processo são determinantes para viabilizar a produção de quantidades expressivas de lacase.

4. CONCLUSÕES E DIRETRIZES FUTURAS

O fungo de origem marinha LAMAI 659 foi capaz de produzir quantidades significativas de lacase em condição de cultivo relativamente simples, composta por extrato de levedura; farelo de trigo, álcool veratrílico e guaiacol, em um volume de 50 mL e pH 8.

O planejamento experimental foi aplicado com sucesso, pois possibilitou um aumento de 2,29 vezes na atividade enzimática obtida no trabalho anterior de YOSHIDA (2015). As condições otimizadas no presente trabalho resultaram em um aumento significativo na produção de lacase pelo fungo LAMAI 659 quando comparado às condições de cultivo utilizadas na triagem do fungo em YOSHIDA (2015) (82,25 $U.L^{-1}$). Esses resultados revelam o potencial do fungo estudado para a produção de lacase e do planejamento experimental como uma ferramenta relevante no estudo de avaliação de diferentes variáveis na produção enzimática e otimização do processo produtivo.

Por ser um fungo de crescimento relativamente lento, a clonagem e expressão heteróloga da enzima em hospedeiro eucarioto (leveduras) pode resultar na aceleração do processo de produção da enzima.

Os resultados obtidos estimulam novos estudos relacionados com a produção da lacase produzida pelo fungo LAMAI 659 em escalas maiores como em biorreator de bancada, bem como caracterização e aplicação biotecnológica da mesma, incluindo a destoxificação de poluentes ambientais tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, corantes têxteis, diesel e petróleo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS NETO, B de; SCARMINIO, S. I; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

BRUNOW, G. Methods to reveal the structure of lignin. In: Hofrichter M., Steinbüchel A. (Eds.). Lignin, Humic Substances and Coal. Wiley-VCH, 89-116. Alemanha, 2001.

CARDOSO, M. L.; OLIVEIRA, H. S. S.; UETANABARO, A. P. T.; KAMIDA, H. M. Biodegradação de celulose e lignina por fungos: uma breve revisão. *Sitientibus* – Série Ciências Biológicas, Bahia, v. 9, p. 35-39, 2009.

COX, D. R. Planning of Experiments. University of London, Birkback College. Wiley International Edition. England, 1958.

CUNHA, C. D. (1996). “Avaliação da Biodegradação de Gasolina em Solo”. Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 97p

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; SYED, T. A.; QIN, W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. International Journal of Biochemical and Molecular Biology, v.1, p.36-50, 2010.

GALHAUP, C.; HALTRICH, D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. Applied Microbiology. Biotechnology, v. 56, p. 225-232; 2001.

GALHAUP, C.; WAGNER, H.; HINTERSTOISSER, B.; HALTRICH, D. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. Enzyme and Microbial Technology, v. 30, p. 529-536, 2002.

GARCIA, A. K. Avaliação da atividade lipolítica de fungos filamentosos da costa brasileira. 55f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

HAWKSWORTH, D.L. e ROSSMAN, A.Y. Where are all the undescribed fungi? Phytopathol, 87: 888-891. 1997.

HIGUCHI, T. Biosynthesis of Lignin. In: Higuchi, T. (ed.). Biosynthesis and biodegradation of wood components. San Diego: Academic Press, 141-160, 1985.

LEMOS, J. L. S.; BARROS, C. A.; OLIVEIRA, S. D.; REICHE, A. P. Fungos filamentosos: agentes de degradação de petróleo e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). *Série Tecnologia Ambiental*. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008.

Li, A.; ZHU, Y.; XU, L.; ZHU, W. & TIAN, X. Comparative study on the determination of assay for laccase of Trametes sp. African Journal of Biochemistry Research, 2008, p. 181-183.

MAGRINI, M. J. Degradação de HPAs e produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos derivados de esponjas marinhas. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

MAINARDI, P. H. Produção de lacases pelo fungo filamentoso de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em biorreator de bancada. 2015. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2015.

MÁRQUEZ-ROCHA, F. J., HÉRNANDEZ-RODRÍGUEZ, V. Z., VÁZQUEZ-DUHALT, R. Biodegradation of soil-adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus.* Biotechnology Letters, vol. 22, p. 469-472, 2000.

MATHEUS, D. R. & OKINO, L. K. 1998. *Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos*. In: Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos – noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. Bononi, V. L. R. e Grandi, R. A. P. (eds.). São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado de Meio Ambiente. 184p.

NELÂNIA, D. Q. (2011). Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos. Recife-PE: Universidade Federal de Pernambuco.

VISWANATH, B., RAJESH, B., JANARDHAN, A., PRAVEEN, A. K., & NARASIMHA, G. (15 de May de 2014). Fungal Laccases and Their Applications in Bioremediation. ResearchGate, 2014.

OECD Best Practice Guidelines for Biological Resources Centers. Organization for Economic Cooperation and Development, p. 115, 2007.

PEREIRA, A. R. B.; BUENO, F. L.; SANTOS, S. C.; LIMA, C. A. A.; DIAS, A. L. T. Biodegradação de corantes e efluentes têxteis por fungos. *Holos Environment*, v. 10 n.2, p. 167-171, 2010.

PERIASAMY, R. and PALVANNAN, T. "Optimization of laccase production by *Pleurotus ostreatus* IMI 395545 using the Taguchi DOE methodology," *Journal of BasicMicrobiology*, vol. 50,no. 6, pp. 548–556, 2010.

REHMANN, L., IVANOVA, E. FERGUSON, J.L. GUNARATNE,H.Q.N., SEDDON, K.R., STEPHENS, G.M. Measuring the effect of ionic liquids on laccase activity using a simple, parallel method, Green Chem., 2012,14, 725-733.

RODRIGUES, M. I; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1ª Ed. Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.

RYVARDEN, L., JOHANSEN, I. A Preliminary Polypore Flora of East Africa. Fungiflora, 589-590. Oslo, 1980.

SANTOS, Hélio F. Dos. Análise Conformacional de modelos de lignina. Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Martelos, 36036-330, Juiz de Fora , Minas Gerais, 2000.

SCOPEL, M. Isolamento, investigação química e avaliação do potencial antibiótico, antibiofilme e anti-*Trichomonas vaginalis* de fungos associados a organismos marinhos da Costa Sul do Brasil. Dissertação (Pós-Graduação) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2012.

SIGMA-ALDRICH. 3,4-Dimethoxybenzyl alcohol. 96%. Synonym: Veratryl alcohol. Disponível em: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/d133000?lang=pt&region=BR. Acesso em 29 de Novembro de 2016.

SILVA, C. H. D. Fungos associados a invertebrados marinhos: isolamento, seleção e avaliação da produção de enzimas celulolíticas. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SONGULASHVILI, G. et al. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, p. 57-61, 2007.

TORRALBA, L. R. B. Estudo de fungos da coleção de microrganismos de referência do incqs e de fungos isolados de sedimentos de igarapés em manaus (AM) com capacidade de descolorir e detoxificar corantes têxteis. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2008.

VERMA, A. K.; RAGHUKUMAR, C.; VERMA, P.; SHOUCHE, Y. S.; NAIK, C. G. Four marine-derived fungi for bioremediation of raw textile mill effluents. *Biodegradation*, v. 21, p. 217-233, 2010.

VISWANATH, B., RAJESH, B., JANARDHAN, A., Praveen, A. K., & NARASIMHA, G. Fungal Laccases and Their Applications in Bioremediation. *ResearchGate*, 2014.

YOSHIDA, A. Potencial biotecnológico de fungos de origem marinha: Produção de enzimas ligninolíticas e avaliação da toxicidade. UNESP, Instituto de Geociências e Ciências Exatas. Rio Claro, SP, 2015.

6. ANEXOS

6.1 Anexo A. Matriz de Plackett & Burmann de 12 ensaios (PB12) para um planejamento experimental com até 8 variáveis, utilizada para o primeiro P&B.

Ensaios	Nº de cilindros inóculo	Ext Levedura ($g.50mL^{-1}$)	Farelo de trigo ($g.50mL^{-1}$)	Álcool veratrílico mM	Guaiacol mM	pH
1	1	-1	1	-1	-1	-1
2	1	1	-1	1	-1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1
4	1	-1	1	1	-1	1
5	1	1	-1	1	1	-1
6	1	1	1	-1	1	1
7	-1	1	1	1	-1	1
8	-1	-1	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	1	1
10	1	-1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	-1	-1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13 C	0	0	-1	0	0	0
14 C	0	0	0	0	0	0
15 C	0	0	0	0	0	0
16 C	0	0	0	0	0	0

Fonte: RODRIGUES & IEMMA, 2005

6.2 Anexo B. Matriz de Plackett & Burmann de 12 ensaios (PB12) para um planejamento experimental com até 8 variáveis, utilizada para o segundo P&B.

Ensaios	Ext Levedura ($g.50mL^{-1}$)	Farelo de trigo ($g.50mL^{-1}$)	Álcool veratrílico mM	Guaiacol mM	pH
1	1	-1	1	-1	-1
2	1	1	-1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1
4	1	-1	1	1	-1
5	1	1	-1	1	1
6	1	1	1	-1	1
7	-1	1	1	1	-1
8	-1	-1	1	1	1
9	-1	-1	-1	1	1
10	1	-1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	-1	-1
12	-1	-1	-1	-1	-1
13 C	0	0	-1	0	0
14 C	0	0	0	0	0
15 C	0	0	0	0	0
16 C	0	0	0	0	0

Fonte: RODRIGUES & IEMMA, 2005

6.3 Anexo C. Matriz de Plackett & Burmann de 12 ensaios (PB12) para um planejamento experimental com até 8 variáveis, utilizada para o terceiro P&B.

Ensaios	Ext Levedura ($g.50mL^{-1}$)	Farelo de trigo ($g.50mL^{-1}$)	Álcool veratrílico mM	Guaiacol mM	pH
1	1	-1	1	-1	-1
2	1	1	-1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1
4	1	-1	1	1	-1
5	1	1	-1	1	1
6	1	1	1	-1	1
7	-1	1	1	1	-1
8	-1	-1	1	1	1
9	-1	-1	-1	1	1
10	1	-1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	-1	-1
12	-1	-1	-1	-1	-1
13 C	0	0	-1	0	0
14 C	0	0	0	0	0
15 C	0	0	0	0	0
16 C	0	0	0	0	0

Fonte: RODRIGUES & IEMMA, 2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Coordenadoria Geral de Bibliotecas
C@pelo - Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso (TCCs)

TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Nome do autor: _____

CPF: _____ **Telefone**: [ ] _____

E-mail do autor: _____

Autoriza a divulgação deste endereço eletrônico na Biblioteca Digital C@pelo? [ ] Sim [ ] Não

Título: _____

_____

_____

Palavras-chave:_____

Unidade:_____

Campus:_____

Curso de Graduação:_____

Orientador:_____

Co-orientador:_____

Banca:_____

_____

_____

Data da defesa: _____/_____/_____

[ ] AUTORIZO a Universidade Estadual Paulista (UNESP), a publicar em ambiente digital institucional, sem ressarcimento dos direitos autorais, o texto integral da obra acima citada, em formato PDF, a título de divulgação da produção científica gerada pela Universidade.

_____ _____/_____/_____
Assinatura do(a) autor(a) Data

TRAMITAÇÃO NA UNESP

DE ACORDO COM A PORTARIA UNESP Nº 03/09, O CONSELHO DE CURSO É SOBERANO PARA DECIDIR OS CRITÉRIOS DE QUALIDADE PARA ENVIAR OU NÃO OS TCCs DEFENDIDOS NO CURSO, PARA DIVULGAÇÃO NA BIBLIOTECA DIGITAL C@PELO.

Conselho de Curso de Graduação

_____ _____
Nome do coordenador(a) Assinatura

Recebido em: _____/_____/_____ Liberado em: _____/_____/_____

Biblioteca da Unidade

Recebido em: _____/_____/_____

Liberado em: _____/_____/_____

CGB - Biblioteca Digital C@pelo

Recebido em: _____/_____/_____

Obs: Preencher este Termo em uma via assinada e enviar à Biblioteca da Unidade, juntamente com o arquivo eletrônico em formato PDF.

O ARQUIVO PDF NÃO DEVE CONTER SENHA DE PROTEÇÃO