

Trabalho de Conclusão de Curso

Curso de Graduação em Engenharia Ambiental

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS DE ORIGEM MARINHA:
PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE**

Aline Mayumi da Silva Yoshida

Prof(a). Dr(a). Lara Durães Sette

Rio Claro (SP)

2015

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

ALINE MAYUMI DA SILVA YOSHIDA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS DE ORIGEM
MARINHA: PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS E
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Geociências e Ciências Exatas -
Campus de Rio Claro, da Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho, para obtenção do
grau de Bacharel em Engenharia Ambiental.

Rio Claro - SP
2015

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

ALINE MAYUMI DA SILVA YOSHIDA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS DE ORIGEM
MARINHA: PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS E
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Geociências e Ciências Exatas -
Campus de Rio Claro, da Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho, para obtenção
do grau de Bacharel em Engenharia Ambiental.

Comissão Examinadora

Prof.^a Dra. Lara Durães Sette (orientador)

Prof.^a Dra. Eleonora Cano Carmona

Prof. Dr. Carlos Renato Corso

Rio Claro, 19 de agosto de 2015.

Aline M.S. Yoshida

Assinatura do(a) aluno(a)

Lara Durães Sette

Assinatura do(a) orientador(a)

Rio Claro - SP
2015

620.8
Y65p

Yoshida, Aline Mayumi da Silva

Potencial biotecnológico de fungos de origem marinha : produção de enzimas ligninolíticas e avaliação da toxicidade / Aline Mayumi da Silva Yoshida. - Rio Claro, 2015

35 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Ambiental) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas
Orientador: Lara Durães Sette

1. Biotecnologia. 2. Fungos de origem marinha. 3. Desenho experimental. 4. Lacase. 5. Poluentes ambientais. I. Título.

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Antonio e Fátima, e à minha irmã Renata por todo o amor recebido e pelo completo apoio em todas as minhas (insanas) empreitadas. Nenhuma de minhas conquistas seriam completas se eu não pudesse voltar para casa e partilhá-las com vocês. Obrigada.

Aos meus tios, primos e avós (*in memoriam*) que mesmo de longe, torcem sempre pelo meu sucesso. Agradeço pelo amor em forma de dinheiro para o sorvete, de reuniões de fim de ano, de bombom escondido na mala. Espero poder retribuir o carinho recebido, mesmo que fisicamente distante.

Agradeço às minhas amigas de curso, por se tornarem irmãs de coração. Sem vocês Livia, Raquel, Fernanda Esteves, Fernanda Cavallari, Tatiana e Juliana esses anos de graduação teriam sido apenas para formar-me engenheira ambiental. Cada qual com suas características próprias, acabamos nos tornando algo incrível quando juntas. Agora, enfim, cada uma já está trilhando seu próprio caminho, mas tenho a plena certeza de que teremos atalhos nos ligando de volta. Obrigada por me fazerem crescer pessoalmente e espiritualmente.

Agradeço aos incontáveis amigos de Moradia Estudantil, por me despertarem quanto ao meu papel como cidadã e quanto ao real papel da universidade. Família *Rauze 3*, Diego, José Renato, Estela, Michele, Lilian, Isadora, Rebeca, Mayra, Nuno e Família Moras como um todo, vocês me modificaram de uma maneira surpreendente e intensa. Levo um pouco de cada um de vocês na minha essência.

À minha orientadora Lara Durães Sette, pela confiança depositada em mim e pela vivacidade e energia transmitidas. Nesses dois anos de trabalho conjunto, sempre recebi o apoio, incentivo e paciência necessários para que tudo desse certo no final.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI) e do Laboratório de Ecologia e Sistemática Fúngica (LESF). Pedro, Juliana, Gabi, Juzinha, Lídia, Lia, Igor, Vivi, Fábio, Marina, Victor, Tássio, Lorena e Danilo, o auxílio técnico foi crucial para o projeto, mas a boa companhia foi o que ajudou a amenizar as horas de trabalho.

Por fim, à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de iniciação científica, possibilitando a realização desse trabalho.

RESUMO

Fungos marinhos representam um grupo de organismos pouco explorado dos pontos de vista ecológico e biotecnológico, mas com grande vantagem para aplicações em ambientes ou processos salinos. A enzima lacase pertence ao grupo das oxidases, que podem atuar na degradação de diversos poluentes ambientais, como corantes têxteis e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). O presente trabalho teve como objetivo principal selecionar o melhor fungo ligninolítico de origem marinha dentre 115 isolados e otimizar a produção de lacase avaliando diferentes fatores por desenho experimental. Em adição, a produção enzimática na presença de três corantes têxteis (Azul Brilhante de Remazol R - RBBR, Preto Reativo 5 e Preto Sulfuroso) e do HPA pireno, bem como a capacidade de detoxificação dos poluentes e descoloração dos corantes pelo fungo selecionado foram avaliadas. A quantificação da enzima lacase foi feita por espectrofotometria utilizando ABTS como substrato e resultou na seleção do isolado LAMAI 659. A etapa de otimização dos parâmetros de cultivo para produção de lacase pelo fungo selecionado foi realizada pela técnica estatística sequencial de Plackett & Burman (P&B). Na triagem inicial, o fungo apresentou produção de 68,89 U/L de lacase. Os resultados do primeiro P&B, com 10 variáveis, mostraram que a máxima produção da enzima (82,25 U/L) foi 19% maior do que em meio não-otimizado, com efeito positivo porém não significativo das seguintes variáveis: extrato de levedura, pH, farelo de trigo, glicose, temperatura, peptona e extrato de malte. No segundo P&B, com 8 variáveis, observou-se incremento ainda maior nos valores de produção da enzima, atingindo 415,89 U/L. Porém, novamente não foram evidenciados efeitos estatisticamente significativos. As variáveis temperatura, extrato de levedura, número de inóculo e farelo de trigo apresentaram efeito positivo. No terceiro P&B também foram utilizadas 8 variáveis, com a adição de guaiacol e álcool veratrílico como indutores. A produção de lacase foi de 970,68 U/L, sendo mais que o dobro do valor do último P&B. Em etapa posterior, na presença dos poluentes a produção de lacase apresentou os seguintes valores médios: 684,15 U/L (Preto Sulfuroso); 599,92 U/L (RBBR); 496,40 U/L (Preto Reativo 5); e 425,24 U/L (Pireno). Paralelamente, o teste de toxicidade utilizando *Artemia* sp. como bioindicador mostrou que, tanto para os corantes têxteis como para o pireno, não houve valores significativos de diminuição de toxicidade. No experimento de descoloração foram observados resultados qualitativos visualmente favoráveis, sugerindo que o fungo LAMAI 659 apresentou melhor capacidade de descoloração do corante RBBR, seguido pelo Preto Reativo 5 e Preto Sulfuroso. Os resultados foram promissores quanto ao potencial deste fungo de origem marinha para a produção de lacase em condições otimizadas.

A produção desta enzima se manteve alta também na presença de poluentes ambientais. Os resultados obtidos no presente trabalho estimulam a condução de novos estudos relativos à influência de diferentes fatores na detoxificação/descoloração de poluentes ambientais, bem como de caracterização e aplicação da enzima lacase.

Palavras-chave: Fungos de origem marinha. Desenho experimental. Lacase. Poluentes ambientais.

ABSTRACT

Marine-derived fungi represent a group of unexplored organisms from the ecological and biotechnological points of view, but with advantages for applications in environments or saline processes. The laccase enzyme belongs to the group of oxidases, which can act in the degradation of various environmental pollutants such as textile dyes and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). This study aimed to select the best ligninolytic fungus of marine origin among 115 isolated and optimize the laccase production by evaluating different factors with experimental design. Additionally, the enzymatic production in the presence of three textile dyes (Brilliant Blue Remazol R - RBBR, Reactive Black 5 and Black Sulphurous) and HPA pyrene, as well as the ability to detoxify pollutants and decrease colors by the selected fungus were evaluated. The quantification of the enzyme laccase was made by spectrophotometry using ABTS as substrate and resulted in the selection of the isolate LAMAI 659. The optimization of culture conditions for laccase production by the selected fungus was performed using sequential statistical technique Plackett & Burman (P&B). In the initial screening, the fungus showed 68.89 U/L of laccase production. The results of the first P&B (with 10 variables) showed that maximum enzyme production (82.25 U/L) was 19% higher than in a non-optimized medium, with positive but not significant effects for the following variables: yeast extract, pH, wheat bran, glucose, temperature, peptone and malt extract. In the second P&B, with 8 variables, there is even greater increase in enzyme production values, reaching 415.89 U/L. However, statistically significant effect again were not observed. The variables temperature, yeast extract, inoculum number and wheat bran presented positive effect. In the third P&B were also used 8 variables, with the addition of guaiacol and alcohol veratryl as inducers. The production of laccase was 970.68 U/L, more than twice the value of the last P&B. At a later stage, producing laccase showed the following averages in the presence of pollutants: 684.15 U/L (Sulphur Black); 599.92 U/L (RBBR); 496.40 U/L (Reactive Black 5); and 425.24 U/L (Pyrene). Meanwhile, the toxicity test using *Artemia* sp. as bioindicator showed that for both textiles dyes and pyrene there were no significant amounts of toxicity reduction. In the bleaching experiment were visually observed favorable qualitative results, suggesting that the fungus LAMAI 659 showed better bleaching ability of RBBR dye, followed by Black Reactive 5 and Sulphur Black dyes. The results were promising about the potential of this marine-derived fungus for the production of laccase in optimized conditions. The production of this enzyme remained high even in the presence of environmental pollutants. The results obtained in this study encourage new studies related to the influence of different factors on the detoxification/discoloration of environmental pollutants as well as characterization and application of laccase enzyme.

Keywords: Marine-derived fungi. Experimental design. Laccase. Environmental pollutants.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	11
3. METODOLOGIA	
3.1. Seleção do fungo ligninolítico.....	12
3.2. Avaliação e quantificação da atividade enzimática.	12
3.3. Otimização.....	13
3.4. Avaliação da detoxificação do pireno e descoloração de corantes têxteis.....	14
a. Condições de cultivo.....	14
b. Teste de toxicidade.....	14
c. Avaliação da descoloração de corantes têxteis.....	15
d. Quantificação da atividade enzimática durante a descoloração de corantes e detoxificação do pireno.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1. Seleção dos fungos ligninolíticos.....	16
4.2. Otimização.....	17
4.3. Avaliação da toxicidade.....	25
4.4. Avaliação da descoloração de corantes têxteis.....	27
4.5. Quantificação da atividade enzimática.....	29
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUÇÃO

O interesse pela bioprospecção de organismos marinhos para o desenvolvimento de processos tecnológicos tem crescido ao longo dos últimos anos, sendo seu potencial ainda pouco explorado. Algumas vantagens podem ser destacadas na utilização de micro-organismos marinhos como fonte de compostos de interesse sócio-econômico, incluindo: i) a grande diversidade de espécies a serem isoladas, conhecidas e exploradas; ii) a variedade e ineditismo das moléculas obtidas; iii) a possibilidade do cultivo *in vitro*; iv) a redução dos custos em relação à síntese química; e v) o favorecimento da produção em escala industrial (SCOPEL, 2012).

A área da micologia marinha tem se destacado recentemente, devido à sua aplicabilidade tecnológica de interesse industrial e ambiental. Esses micro-organismos podem apresentar vantagens biológicas para aplicação em ambientes ou processos salinos, se atendidos também outros fatores que influenciam no crescimento e produção dos metabólitos de interesse ao homem, como por exemplo, nutrientes, temperatura, pH e tempo de incubação.

Os metabólitos extracelulares produzidos pelos fungos são moléculas importantes para seu desenvolvimento no meio natural. Alguns exemplos são as enzimas celulasas, hemicelulasas, pectinases e ligninases, que 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 (ROMMINGER, 2008).

A lignina é descrita como um polímero aromático, tridimensional e hidrofóbico altamente resistente à degradação química e biológica. Sua alteração é essencial no meio natural para a utilização da celulose pelos micro-organismos e a ciclagem do carbono (CARDOSO et al., 2009). Os fungos de podridão branca, que pertencem em sua maioria ao filo Basidiomycota, são os mais efetivos na degradação de materiais ligninocelulósicos, com capacidade de degradar ou modificar a lignina através de enzimas oxidativas extracelulares.

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. As principais enzimas associadas com a degradação da lignina são: lignina peroxidase (EC 1.11.1.14 – LiP), manganês peroxidase (EC 1.11.1.13 - MnP) e lacases (EC 1.10.3.2). Alguns fungos produzem todas elas enquanto outros produzem um ou duas delas e, segundo Songulashvili et al. (2007), o tipo e a composição dos substratos ligninocelulósicos parece determinar a quantidade e o tipo de enzima produzida.

Diferentes fungos de podridão branca podem produzir diferentes combinações destas enzimas. Há fungos produtores de LiP - MnP, MnP - lacase, LiP - lacase e fungos que não produzem nem LiP nem MnP, mas sim lacase e aril álcool oxidase (AAO). Fungos pertencentes ao grupo LiP - MnP são efetivos degradadores da lignina, enquanto a capacidade de degradação de fungos pertencentes ao grupo LiP - lacase é muito mais baixa (CARDOSO et al., 2009). As enzimas ligninolíticas, por terem baixa especificidade, são capazes de oxidar uma ampla variedade de poluentes ambientais de difícil degradação, como os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs), os corantes têxteis e outros compostos recalcitrantes.

Os HPAs são componentes naturais do petróleo ou outros compostos orgânicos constituídos por dois ou mais anéis aromáticos com alto poder carcinogênico e mutagênico e apresentam toxicidade. Os HPAs também podem ser oriundos da combustão incompleta de combustíveis fósseis, de processos industriais e da queima da madeira. Suas características químicas dependem de propriedades como o número de anéis aromáticos e sua configuração estrutural, gerando diferentes graus de solubilidade e estabilidade (OLIVEIRA, 2006). Em ambiente marinhos, eles podem ser liberados por derramamentos acidentais ou durante as operações de rotina em plataformas petrolíferas e no transporte de óleo. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA - Environmental Protection Agency) mantém uma relação de 16 HPAs indicados para monitoramento biológico, por serem considerados os mais perigosos à saúde humana e ao meio ambiente, devido à sua capacidade de bioacumulação em cadeias alimentares.

Os basidiomicetos que degradam lignina, normalmente, não assimilam os HPAs como única fonte de carbono, realizando cometabolismo com outras substâncias como por exemplo a glicose, cuja degradação resulta na formação de quinonas, catalisadas então pelas enzimas ligninolíticas extracelulares (LEMOS et al., 2008).

Dentre os HPAs amplamente estudados, o pireno é um exemplo de composto formado a partir da combustão incompleta de matéria orgânica. Constituído por quatro anéis benzênicos condensados unidos por mais de uma face, ele inicialmente era usado na fabricação de corantes sintéticos (Figura 1). Por suas propriedades fotofísicas, passou a ser utilizado em componentes eletrônicos e em aplicações de estudos biológicos.

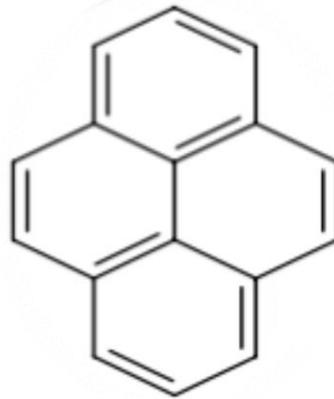


Figura 1 – Fórmula estrutural do pireno. (Fonte: Autor)

O maior problema relacionado aos corantes são os efluentes decorrentes dos processos de tingimento. Estima-se que atualmente estejam disponíveis 2.000 tipos de corantes para a indústria têxtil, quantidade justificada pela diversidade de fibras existentes e pelas características próprias e bem definidas de cada corante. De fácil detecção a olho nu em despejos industriais, os corantes possuem uma ampla classificação de acordo com sua estrutura química ou com o modo de fixação à fibra têxtil, sendo os principais: corantes reativos, diretos, azóicos, ácidos, de enxofre, dispersivos, pré-metalizados e branqueadores (GUARATINI; ZANONI, 2000). Suas estruturas moleculares são complexas, e apresentam um grupo cromóforo (os mais conhecidos são azo, antraquinona e nitro) e grupos auxiliares que se fixam à fibra têxtil (natural ou sintética). Metade dos corantes usados atualmente são do tipo azo e cerca de 15% de seus rejeitos industriais são descartados no ambiente sem tratamento prévio (ZANONI; CARNEIRO, 2001).

Tendo em vista a aplicação de enzimas ligninolíticas produzidas por micro-organismos marinhos na biorremediação de ambientes salinos contaminados por HPAs ou em processos industriais e tratamento de efluente têxtil, o presente estudo pretende obter novos recursos genéticos para aplicação industrial e/ou ambiental e ampliar o conhecimento sobre os fungos derivados de ambiente marinho.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal do trabalho proposto é selecionar o melhor fungo ligninolítico de origem marinha e avaliar a produção de enzimas ligninolíticas visando a otimização do processo de produção por meio de desenho experimental.

Outros objetivos são:

- Avaliar a capacidade de descoloração de três corantes têxteis;
- Avaliar a capacidade de detoxificação do hidrocarboneto policíclico aromático pireno;
- Quantificar a produção enzimática do fungo selecionado em meio contendo corante têxtil e pireno.

3. METODOLOGIA

3.1 Seleção do fungo ligninolítico

A seleção do melhor fungo ligninolítico foi realizada dentre cerca de 115 fungos filamentosos isolados de diferentes amostras marinhas (esponjas, ouriços, algas e sedimentos) coletadas na região de Angra dos Reis (Rio de Janeiro) e Alcatrazes (São Paulo) no âmbito do Projeto Temático da Fapesp 2010/50190-2. Os fungos encontram-se mantidos na coleção de pesquisa associada à Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) e foram estudados no âmbito do projeto Fapesp 2013/19486-0 intitulado “Biotecnologia marinha e Antártica: enzimas microbianas e suas aplicações”.

Os fungos foram reativados em meio sólido MA2% (20 g/L de extrato de malte e 20 g/L de ágar) a 28°C por 7 dias e submetidos a análises de pureza e viabilidade celular. A pureza foi avaliada a partir de exames macroscópicos a olho nu e com lupa, verificando-se a qualidade do desenvolvimento da colônia e de seus micélios.

Para a seleção, as linhagens foram inoculadas em tubos Falcon de 50 mL contendo 15 mL de meio líquido B&K contendo guaiacol (10 g/L de glicose, 2 g/L de peptona, 1 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de ágar – adicionado de 0,4 mM de guaiacol em meio já autoclavado), a 28°C por 7 dias e a 140 rpm. Na presença da enzima lacase o guaiacol se transforma em um composto de coloração marrom escura (guaiacoquinona) formado junto ao micélio do fungo. Foram selecionados os isolados que apresentaram a mudança de coloração.

3.2 Avaliação e quantificação da atividade enzimática

Para a obtenção dos caldos enzimáticos o meio líquido de cultivo MA2% foi centrifugado a 8.000 rpm por 15 min a 4°C. As atividades enzimáticas foram medidas em espectrofotômetro e determinadas a partir do cálculo da diferença de absorbância.

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

$$U/L = \Delta A \times V \times 10^6 / \epsilon \times R \times t \quad (1)$$

Onde,

ΔA	diferença entre a absorvância final e 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 ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
R	quantidade de caldo enzimático (L)
t	tempo de reação (min)

Lacase: A atividade da Lacase foi detectada à 37°C pela leitura da absorvância durante a oxidação do substrato ABTS a 420 nm ($\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) por 5 min e 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 caldo enzimático e 0,1 mL de solução de ABTS (0,5 mM). A medição foi feita em triplicatas.

Lignina peroxidase: A atividade da LiP foi avaliada a partir da leitura da absorvância durante a formação do aldeído veratrílico produzido na oxidação do álcool veratrílico usado como substrato (TIEN; KIRK, 1984). A mistura continha 0,2 mL de álcool veratrílico (2,0 mM) em tampão tartarato de sódio (0,4 M; pH 4,5), 0,2 mL de H_2O_2 (2,0 mM) e 0,6 mL do caldo enzimático. A reação foi iniciada pela adição do H_2O_2 à temperatura ambiente e a formação do aldeído veratrílico determinado pela leitura da absorvância a 310 nm ($\epsilon = 9300 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) após 10 min. A medição também foi realizada em triplicatas.

Manganês peroxidase: A atividade de MnP foi quantificada pelo método modificado de Wariishi et al. (1992) com a adição de 50 μL de H_2O_2 (2 mM) em 0,8 mL de tampão malonato de sódio (60 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 pela leitura da absorvância a 270 nm ($\epsilon = 11590 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) após 5 min, em triplicatas.

Após a quantificação da produção das três enzimas, a seleção do fungo a ser otimizado deu-se através da análise quantitativa dos resultados obtidos.

3.3 Otimização

A etapa de otimização dos parâmetros de cultivo do fungo selecionado foi embasada na técnica de pesquisa estatística sequencial de Plackett & Burman (P&B). Durante a fase de pré-planejamento, foi definido qual o objetivo do experimento a ser realizado, suas unidades experimentais, a seleção dos fatores a serem estudados e a seleção da(s) variável(is)-

independentes. Em seguida, foi realizado o ensaio (inicialmente com n=10 variáveis) de acordo com os parâmetros e condições estabelecidos (item 4.2), em amostras inoculadas em meio líquido em Erlenmeyers de 100 ml e incubadas a 140 rpm, com a posterior quantificação dos dados por espectrofotometria. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com o programa computacional STATISTICA versão 7 (MAGRINI, 2012). Foi então estudada a influência e a significância dos parâmetros nos resultados obtidos, e a partir deles novos delineamentos foram realizados.

3.4 Avaliação da detoxificação e descoloração de poluentes ambientais

a. Condições de cultivo

As condições de cultivo foram as mesmas tanto para os ensaios com o HPA pireno como para os ensaios com corantes têxteis. O fungo selecionado foi inicialmente cultivado em meio sólido MA2% a 28°C por 7 dias. Em seguida, cilindros (cerca de 5mm de diâmetro) de ágar com inóculo foram transferidos para Erlenmeyer (150ml) nas condições otimizadas (item 3.3). Após 72h de incubação, a 25°C e 140 rpm, foram adicionados aos frascos corantes e pireno nas seguintes concentrações (DA SILVA, 2008):

- *Corante Preto Reativo 5 (PR5): 200 ppm (200 mg/L)*
- *Corante Preto Sulfuroso (P Sulf): 500 ppm (500 mg/L)*
- *Corante Azul Brilhante de Remazol R (RBBR): 500 ppm (500 mg/L)*
- *Pireno, previamente dissolvido em dimetilsulfóxido: 40 ppm (40 mg/L)*

Os ensaios foram feitos em triplicatas, além de ensaios-controle contendo meio + corante/pireno, e contendo meio + isolado. Após 7 dias de incubação, o sobrenadante utilizado nos ensaios de toxicidade e produção enzimática foi obtido através de filtração a vácuo (adaptado de SANTOS, 2010).

b. Teste de toxicidade

A toxicidade dos ensaios contendo corantes têxteis ou pireno foi avaliada utilizando-se o microcrustáceo *Artemia* sp., da ordem Anostraca, como bioindicador de toxicidade aguda. Ovos de *Artemia* sp. foram incubados em ASW – Artificial Seawater sob iluminação incandescente (entre 25°C e 30°C) por 48 horas, para a eclosão das larvas (náuplios). Em seguida, preparou-se os tubos de ensaio contendo 0,3 ml de solução salina de NaCl (30%), 2,7

mL da respectiva solução (corante têxtil, pireno ou amostra-controle) e 30 larvas. Foram feitas triplicatas para cada poluente (corantes têxteis e pireno) e controle negativo (meio e poluente). Os tubos de ensaio foram incubados em temperatura ambiente (20°C-25°C) e sob luminosidade constante. Depois de 24 horas de exposição do bioindicador à amostra de poluente foi realizada a contagem de mortos e sobreviventes, e os resultados foram analisados estaticamente em software computacional livre BioEstat versão 5.0.

c. Avaliação da descoloração de corantes têxteis

A capacidade de descoloração em meio líquido foi diretamente avaliada a partir dos sobrenadantes obtidos, utilizados para ensaios de toxicidade (item 3.4). Os ensaios foram comparados com os ensaios-controle e avaliados qualitativamente em relação à descoloração, a partir de quatro diferentes classificações visuais: nenhuma descoloração (-), pouca descoloração (+), descoloração mediana (+ +), e alta descoloração (+ + +).

d. Quantificação da atividade enzimática durante a descoloração/detoxificação de poluentes ambientais

Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para a determinação das atividades enzimática, tanto na presença dos corantes têxteis como na presença de pireno, seguindo a metodologia reportada no item 3.2, além dos ensaios-controle para cada poluente.

4. Resultados e Discussão

4.1 Seleção dos fungos ligninolíticos

Dentre os 115 fungos estudados, 28 apresentaram resultados positivos para produção de lacase no teste em meio líquido B&K contendo guaiacol. A partir deste resultado, foi realizada a quantificação das enzimas LiP, MnP e Lacase utilizando a espectrofotometria. Os parâmetros utilizados para o cálculo da atividade enzimática estão apresentados na Tabela 1 e os resultados da quantificação das enzimas estudadas estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 1 – Parâmetros usados em espectrofotômetro na quantificação das enzimas ligninolíticas LiP, MnP e Lacase (adaptado de Brexó, 2013).

	LiP	MnP	Lacase
ΔA - diferença entre absorbâncias final e inicial	$Abs_f - Abs_i$ (310 nm)	$Abs_f - Abs_i$ (270 nm)	$Abs_f - Abs_i$ (420 nm)
V – volume da reação	0,001 L (1 ml)	0,001 L (1 ml)	0,001 L (1 ml)
ϵ - coeficiente de extinção ($M^{-1} cm^{-1}$)	9.300	4.460	36.000
R – quantidade de caldo enzimático (L)	0,0006 (0,6 mL)	0,0001 (0,1 mL)	0,0006 (0,6 mL)
t – tempo de reação (min)	10	5	5 e 10

Tabela 2 – Quantificação das enzimas ligninolíticas LiP, MnP e Lacase produzidas pelos fungos com resultados positivos no teste com B&K líquido e guaiacol (7 dias de cultivo a 28 °C e 140 rpm).

CÓDIGO	LiP (U/L)	MnP (U/L)	Lacase (U/L)
LAMAI 625	0	0	6,37
LAMAI 629	0	0	0
LAMAI 631	0	0	0
LAMAI 633	0	0	0
LAMAI 635	0	0	0
LAMAI 637	0	0	0
LAMAI 640	0	0	0,012
LAMAI 641	0	0	0,038
LAMAI 646	0	0	17,22
LAMAI 648	6,03	2,01	0
LAMAI 650	0	0	0
LAMAI 651	0	0	0,10
LAMAI 652	0	0	0,03
LAMAI 653	0	0	6,86
LAMAI 658	0	0	14,12
LAMAI 659	0	0	68,89
LAMAI 660	0	0	3,40
LAMAI 664	0,66	0	7,85

<i>LAMAI 687</i>	0	0	0
<i>LAMAI 697</i>	0	0	0,03
<i>LAMAI 698</i>	0	0	0,09
<i>LAMAI 699</i>	0	0	10,31
<i>LAMAI 700</i>	0	0	0
<i>LAMAI 701</i>	0	0	0
<i>LAMAI 702</i>	0	0	0
<i>LAMAI 703</i>	1,43	0	0,03
<i>LAMAI 704</i>	0	6,50	0
<i>LAMAI 705</i>	0	0	0

Em geral, os isolados não apresentaram ou apresentaram atividades muito baixas para as enzimas LiP e MnP. A produção de lacase foi mais expressiva, sendo dado enfoque para a mesma na etapa seguinte. Os isolados que se destacaram na produção de lacase foram LAMAI 699 (10,31 UI/L), LAMAI 658 (14,12 UI/L), LAMAI 646 (17,22 UI/L) e LAMAI 659 (68,89 UI/L). Com base nos resultados obtidos, o isolado LAMAI 659 (Figura 2) foi selecionado e submetido aos experimentos de otimização.



Figura 2. Fungo filamentosso LAMAI 659 isolado de amostra de sedimento fino na região de Alcatrazes no Estado de São Paulo. (Fonte: Autor)

4.2 Otimização

A otimização da produção de lacase através do método Plackett&Burman (P&B) foi iniciada com a utilização de 10 variáveis, a saber: número de inóculos, glicose, extrato de malte, extrato de peptona, extrato de levedura, farelo de trigo, sulfato de cobre (CuSO_4), temperatura, salinidade (água do mar, ASW – Artificial Seawater) e pH. Em ensaios onde a salinidade foi selecionada como variável, fez-se uso de ASW – Artificial Seawater, cuja composição incluía: 10,827 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,509 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,020 g/L $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 23,926 g/L NaCl; 4,008

g/L Na₂SO₄; 0,677 g/L KCl; 0,196 g/L NaHCO₃; 0,098 g/L KBr; e 0,026 g/L H₃BO₃. As unidades experimentais estão detalhadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Variáveis utilizadas no 1º P&B e os seus respectivos valores (concentrações)

<i>Variáveis</i>	<i>1º P&B – LAMAI 659</i>		
	-1	0	+1
<i>1. Nº de cilindros do inóculo</i>	3	4	5
<i>2. Glicose (g/L)</i>	0	5 (0,25 g/50 ml)	10 (0,50 g/50 ml)
<i>3. Ext. malte (g/L)</i>	0	10 (0,50 g/50 ml)	20 (1g/50 ml)
<i>4. Peptona (g/L)</i>	0	1 (0,05 g/50 ml)	2 (0,1 g/50 ml)
<i>5. Ext. levedura (g/L)</i>	0	1 (0,05 g/50 ml)	2 (0,1 g/50 ml)
<i>6. Farelo de trigo (g/L)</i>	1 (0,05 g/50 ml)	2 (0,1 g/50 ml)	3 (0,2 g/50 ml)
<i>7. CuSO₄ mM</i>	0	2,5	5
<i>8. Temperatura (°C)</i>	15	20	25
<i>9. Salinidade - ASW (ml)</i>	0 (0%)	25 ml (50%)	50 ml (100%)
<i>10. pH</i>	4,5	6,25	8

Para um total de n=10 variáveis, foi utilizada uma matriz com 16 interações entre os parâmetros, além da inclusão de 4 amostras-controle (nível 0), totalizando 20 ensaios. Os experimentos foram incubados por 7 dias a 140 rpm, de acordo com a matriz apresentada abaixo. Os resultados da produção de lacase estão apresentados na última coluna da Tabela 4.

Tabela 4 – Matriz 1º P&B para 16 ensaios e a produção de lacase (U/L).

	<i>Inóculo</i>	<i>Glicose</i>	<i>Ext. Malte</i>	<i>Peptona</i>	<i>Ext. Levedura</i>	<i>Farelo de Trigo</i>	<i>CuSO₄ (mM)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>ASW</i>	<i>pH</i>	<i>H₂O destilada</i>	<i>Lacase (U/L)</i>
1	5	0	0	0	0,1 g	0,05 g	0	25	50 ml	4,5	0	1,42
2	5	0,50 g	0	0	0	0,2 g	0	15	50 ml	8	0	0,96
3	5	0,50 g	1 g	0	0	0,05 g	5	15	0	8	50 ml	0
4	5	0,50 g	1 g	0,1 g	0	0,05 g	0	25	0	4,5	50 ml	30,72
5	3	0,50 g	1 g	0,1 g	0,1 g	0,05 g	0	15	50 ml	4,5	0	7,88
6	5	0	1 g	0,1 g	0,1 g	0,2 g	0	15	0	8	50 ml	48,49
7	3	0,50 g	0	0,1 g	0,1 g	0,2 g	5	15	0	4,5	50 ml	0
8	5	0	1 g	0	0,1 g	0,2 g	5	25	0	4,5	50 ml	0,17
9	5	0,50 g	0	0,1 g	0	0,2 g	5	25	50 ml	4,5	0	0,20
10	3	0,50 g	1 g	0	0,1 g	0,05 g	5	25	50 ml	8	0	0
11	3	0	1 g	0,1 g	0	0,2 g	0	25	50 ml	8	0	0
12	5	0	0	0,1 g	0,1 g	0,05 g	5	15	50 ml	8	0	0,61
13	3	0,50 g	0	0	0,1 g	0,2 g	0	25	0	8	50 ml	82,25
14	3	0	1 g	0	0	0,2 g	5	15	50 ml	4,5	0	0,025
15	3	0	0	0,1 g	0	0,05 g	5	25	0	8	50 ml	0,67
16	3	0	0	0	0	0,05 g	0	15	0	4,5	50 ml	0
17 (C)	4	0,25g	0,50g	0,05 g	0,05 g	0,1 g	2,5	20	25 ml	6,25	25 ml	61,88
18 (C)	4	0,25g	0,50g	0,05 g	0,05 g	0,1 g	2,5	20	25 ml	6,25	25 ml	54,01
19 (C)	4	0,25g	0,50g	0,05 g	0,05 g	0,1 g	2,5	20	25 ml	6,25	25 ml	40,46
20 (C)	4	0,25g	0,50g	0,05 g	0,05 g	0,1 g	2,5	20	25 ml	6,25	25 ml	51,17

Os resultados demonstraram que a maior produção de lacase ocorreu no ensaio 13 (82,25 U/L), sendo 19% maior do que a atividade enzimática obtida em meio não otimizado (68,89 U/L). As condições de cultivo do ensaio 13 foram: 50 ml de água destilada (ausência de salinidade); 3 *pellets* de inóculo; 0,05g de glicose; 0,1g de extrato de levedura; e 0,2g de farelo de trigo, temperatura de 25°C e pH 8. Os ensaios-controle mostraram similaridade em seus resultados, validando assim o experimento.

A análise estatística no programa computacional STATISTICA gerou as informações destacadas na Tabela 5. A análise estatística em software possibilita indicar se o efeito de determinada variável foi positivo ou negativo em relação ao objeto de estudo do planejamento experimental, e em que grau. O valor de *p* indica a significância estatística de determinada variável, isto é, o grau de confiabilidade de um resultado. Para o desenho experimental de sistemas biológicos, considerou-se significativo valores de $p < 0,1$.

Tabela 5 – Análise do 1º P&B (n=10) em software Statistica, versão 7.

<i>1º P&B</i>	<i>Efeito</i>	<i>p</i>
<i>1. N° de cilindros do inóculo</i>	-1,03	0,947
<i>2. Glicose (g/L)</i>	8,81	0,577
<i>3. Ext Malte (g/L)</i>	0,12	0,994
<i>4. Peptona (g/L)</i>	0,48	0,975
<i>5. Ext levedura (g/L)</i>	13,54	0,397
<i>6. Farelo de trigo (g/L)</i>	11,36	0,474
<i>7. CuSO4 mM</i>	-21,27	0,196
<i>8. Temperatura (°C)</i>	7,18	0,648
<i>9. ASW (ml)</i>	-18,90	0,246
<i>10. pH</i>	11,54	0,468

Apesar de não evidenciarmos efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,1$) a análise indicou efeito positivo das seguintes variáveis, em ordem de significância: (5) Extrato de levedura, (10) pH, (6) Farelo de trigo, (2) Glicose, (8) Temperatura, (4) Peptona e (3) Extrato de malte. Três variáveis apresentaram influência negativa na produção de lacase, sendo a mais significativa a (7) CuSO₄, seguido pela (9) ASW e (1) número de inóculos.

Para otimização do ensaio, optou-se por eliminar as variáveis Peptona e Extrato de malte, por apresentarem baixa significância (ainda que positiva) para a produção da lacase. O CuSO₄ teve elevado efeito negativo, embora seja conhecida sua influência como indutor na

produção de lacases (LEONOWICZ, 2001). As demais variáveis positivas e as com efeito negativo foram mantidas, porém alterou-se suas proporções, como demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Variáveis utilizadas no 2º P&B e os seus respectivos valores (concentrações)

<i>Variáveis</i>	<i>2º P&B</i>		
	-1	0	+1
1. N° de cilindros do inóculo	3	4	5
2. Glicose (g/L)	0	10 (0,5 g/50 ml)	20 (1,0 g/50 ml)
3. Ext levedura (g/L)	0	2 (0,1 g/50 ml)	4 (0,2 g/50 ml)
4. Farelo de trigo (g/L)	0	2 (0,1 g/50 ml)	4 (0,2 g/50 ml)
5. CuSO₄ mM	0	1	2
6. Temperatura (°C)	15	20	25
7. ASW (ml)	0 (0%)	25 ml (50%)	50 ml (100%)
8. pH	6	7	8

Para um total de n=8 variáveis, foi utilizada uma matriz P&B com 12 interações entre os parâmetros, mantendo-se os 4 ensaios para controle. As amostras foram inoculadas e incubadas por 7 dias a 140 rpm, de acordo com a matriz apresentada na Tabela 7. Os resultados de produção de lacase estão apresentados na última coluna da Tabela 7.

Tabela 7 - Matriz 2º P&B para 12 ensaios e a produção de lacase (U/L)

	<i>Inóculo</i>	<i>Glicose</i>	<i>Ext. Levedura</i>	<i>Farelo de Trigo</i>	<i>CuSO₄ (mM)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>ASW</i>	<i>pH</i>	<i>H₂O destilada</i>	<i>Lacase (U/L)</i>
1	5	0	0,2 g	0	0	15	50 ml	8	0	0
2	5	1,0 g	0	0,2 g	0	15	0	8	50 ml	0,06
3	3	1,0 g	0,2 g	0	2	15	0	6	50 ml	0
4	5	0	0,2 g	0,2 g	0	25	0	6	50 ml	415,89
5	5	1,0 g	0	0,2 g	2	15	50 ml	6	0	0,85
6	5	1,0 g	0,2 g	0	2	25	0	8	50 ml	116,32
7	3	1,0 g	0,2 g	0,2 g	0	25	50 ml	6	0	87,96
8	3	0	0,2 g	0,2 g	2	15	50 ml	8	0	0,09
9	3	0	0	0,2 g	2	25	0	8	50 ml	1,32
10	5	0	0	0	2	25	50 ml	6	0	0
11	3	1,0 g	0	0	0	25	50 ml	8	0	0,03
12	3	0	0	0	0	15	0	6	50 ml	1,05
13 (C)	4	0,50 g	0,1 g	0,1 g	1	20	25 ml	7	25 ml	256,69
14 (C)	4	0,50 g	0,1 g	0,1 g	1	20	25 ml	7	25 ml	208,59
15 (C)	4	0,50 g	0,1 g	0,1 g	1	20	25 ml	7	25 ml	536,26
16 (C)	4	0,50 g	0,1 g	0,1 g	1	20	25 ml	7	25 ml	241,77

Neste segundo P&B, foi observado um aumento considerável nos valores obtidos para a produção de lacase no ensaio 4 (415, 89 U/L), sendo 503,7% maior do que o valor sem otimização (68,89 U/L) e 405,6% maior do que o valor da primeira otimização (82,25 U/L). O ensaio 4 era composto por: 5 inóculos; 0,2 g de extrato de levedura; e 0,2 g de farelo de trigo, temperatura de 25°C e pH 6. Novamente, o meio que mais produziu lacase não apresentava salinidade em sua composição, indicando a possibilidade do isolado selecionado ser um fungo marinho facultativo. Um valor de produção de lacase ainda maior que a do ensaio 4 foi encontrado no ensaio 15 (ponto central). Entretanto, entre os valores obtidos nas amostras-controle (ponto central) é perceptível que o valor do ensaio 15 (C) = 536,26 U/L está muito acima dos demais, sendo que suas condições eram idênticas às do ensaio 13 (C) = 256,69 U/L; ensaio 14 (C) = 208,59 U/L; e ensaio 16 (C) = 241,77 U/L. Para continuação da otimização, o ensaio 4 e a amostra-controle foram refeitos para validação dos valores. Os resultados confirmaram a elevada produção nas condições do ensaio 4 (462, 18 U/L) e o valor para o ensaio-controle (148,99 U/L) foi mais próximo aos dos ensaios 13(C), 14 (C) e 16 (C).

A análise estatística do segundo P&B gerou os resultados da Tabela 8, apresentados a seguir.

Tabela 8 - Análise do 2º P&B (n=8) em software Statistica, versão 7.

<i>2º P&B</i>	<i>Efeito</i>	<i>p</i>
<i>1. Nº de cilindros do inóculo</i>	73,78	0,552
<i>2. Glicose (g/L)</i>	-35,52	0,773
<i>3. Ext Levedura (g/L)</i>	102,83	0,413
<i>4. Farelo de trigo (g/L)</i>	64,80	0,601
<i>5. CuSO4 mM</i>	-64,40	0,603
<i>6. Temperatura (°C)</i>	103,24	0,412
<i>7. ASW (ml)</i>	-74,28	0,550
<i>8. pH</i>	-64,65	0,602

Novamente não foi evidenciado efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,1$). Entretanto, o efeito positivo deu-se pelas seguintes variáveis, em ordem de significância: (6) Temperatura, (3) Extrato de levedura, (1) Número de inóculos e (4) Farelo de trigo. Em contrapartida, as variáveis (7) ASW, (8) pH, (5) CuSO4 e (2) Glicose apresentaram influência negativa para a produção de lacase.

Com base nos resultados obtidos no 2º P&B, foi estruturado um terceiro onde a variável glicose foi retirada da constituição do meio e os valores de CuSO₄ e ASW foram reduzidos. A temperatura, que nos ensaios anteriores havia se mostrado favorável ao desenvolvimento do isolado em 25°C, foi então fixada como condição de cultivo geral. Além disso, foram adicionados outros dois indutores da produção de lacase, o guaiacol e o álcool veratrílico (ARORA; GILL, 2000), como demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9 – Variáveis utilizadas no 3º P&B e os seus respectivos valores (concentrações)

<i>Variáveis</i>	3º P&B		
	-1	0	1
1. Nº de cilindros do inóculo	5	6	7
2. Ext Levedura (g/L)	4 (0,2 g/50ml)	(0,3 g/50ml)	(0,4 g/50ml)
3. Farelo de trigo (g/L)	4 (0,2 g/50ml)	(0,3 g/50ml)	(0,4 g/50ml)
4. CuSO₄ mM	0	0,5mM	1mM
5. Álcool veratrílico mM	0	0,2mM	0,4mM
6. Guaiacol mM	0	0,2mM	0,4mM
7. ASW (ml)	0 (0%)	12,5 ml (50%)	25 ml (100%)
8. pH	6	7	8

Assim como no ensaio anterior, foi utilizada uma matriz P&B com 12 interações entre os parâmetros, e os 4 ensaios para controle. As amostras foram inoculadas e incubadas por 7 dias a 140 rpm, de acordo com a matriz da Tabela 10, que também apresenta os resultados para a produção de lacase.

Tabela 10 - Matriz Codificada 3º P&B para 12 ensaios e a produção de lacase (U/L)

	<i>Inóculo</i>	<i>Ext. Levedura</i>	<i>Farelo de Trigo</i>	<i>CuSO₄</i>	<i>Álcool Veratrílico</i>	<i>Guaiacol</i>	<i>ASW</i>	<i>pH</i>	<i>H₂O destilada</i>	<i>Lacase (U/L)</i>
1	7	0,2 g	0,4 g	0	0	0	25 ml	8	25 ml	80,44
2	7	0,4 g	0,2 g	1	0	0	0	8	50 ml	527,01
3	5	0,4 g	0,4 g	0	0,4	0	0	6	50 ml	831,28
4	7	0,2 g	0,4 g	1	0	0,4	0	6	50 ml	136,77
5	7	0,4 g	0,2 g	1	0,4	0	25 ml	6	25 ml	344,91
6	7	0,4 g	0,4 g	0	0,4	0,4	0	8	50 ml	970,68
7	5	0,4 g	0,4 g	1	0	0,4	25 ml	6	25 ml	317,13
8	5	0,2 g	0,4 g	1	0,4	0	25 ml	8	25 ml	257,72
9	5	0,2 g	0,2 g	1	0,4	0,4	0	8	50 ml	449,07
10	7	0,2 g	0,2 g	0	0,4	0,4	25 ml	6	25 ml	145,25
11	5	0,4 g	0,2 g	0	0	0,4	25 ml	8	25 ml	2,15
12	5	0,2 g	0,2 g	0	0	0	0	6	50 ml	447,02
13 (C)	6	0,3 g	0,3 g	0,5	0,2	0,2	12,5 ml	7	37,5 ml	425,15
14 (C)	6	0,3 g	0,3 g	0,5	0,2	0,2	12,5 ml	7	37,5 ml	358,80
15 (C)	6	0,3 g	0,3 g	0,5	0,2	0,2	12,5 ml	7	37,5 ml	343,36
16 (C)	6	0,3 g	0,3 g	0,5	0,2	0,2	12,5 ml	7	37,5 ml	296,30

Neste terceiro P&B, o maior valor de produção de lacase foi obtido no ensaio 6 (970,68 U/L), sendo 14 vezes maior do que o valor sem otimização (68,89 U/L), 12 vezes maior do que o valor da primeira otimização (82,25 U/L), e mais de 2 vezes maior do que o valor da última otimização (415,89 U/L). O ensaio 6 era composto de: 7 inóculos; 0,4 g de extrato de levedura; 0,4 g de farelo de trigo; álcool veratrílico a 4 mM; e guaiacol a 0,4 mM. A temperatura estava fixada a 25°C, com pH 8.

A análise estatística do terceiro P&B gerou os resultados da Tabela 11, apresentados abaixo.

Tabela 11 - Análise do 3º P&B (n=8) em software Statistica, versão 7.

<i>3º P&B</i>	<i>Efeito</i>	<i>p</i>
<i>1. N° de cilindros do inóculo</i>	-16,55	0,826
<i>2. Ext. levedura (g/L)</i>	246,15	0,011
<i>3. Farelo de trigo (g/L)</i>	113,10	0,163
<i>4. CuSO4 mM</i>	-74,03	0,342
<i>5. Álcool Veratrílico mM</i>	248,07	0,011
<i>6. Guaiacol mM</i>	-77,88	0,319
<i>7. ASW (ml)</i>	-369,04	0,001
<i>8. pH</i>	10,78	0,886

Com esta nova batelada de ensaios foi possível evidenciar efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,1$) das variáveis: (7) ASW, (2) Extrato de Levedura e (5) Álcool Veratrílico, sendo estas duas últimas com efeito positivo. O efeito positivo foi observado nas seguintes variáveis: (5) Álcool Veratrílico, (2) Extrato de levedura, (3) Farelo de trigo e (8) pH. Por outro lado, (7) ASW, (6) Guaiacol, (4) CuSO₄ e (1) Número de inóculo apresentaram influência negativa para a produção de lacase.

De modo geral é possível observar que, após três etapas de otimização, 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), o extrato de levedura (como fonte de nitrogênio) e o farelo de trigo (substrato fibroso rico em carbono e nitrogênio). A Figura 3 evidencia a progressão da atividade da enzima produzida pelo fungo LAMAI 659 ao longo do processo de otimização.

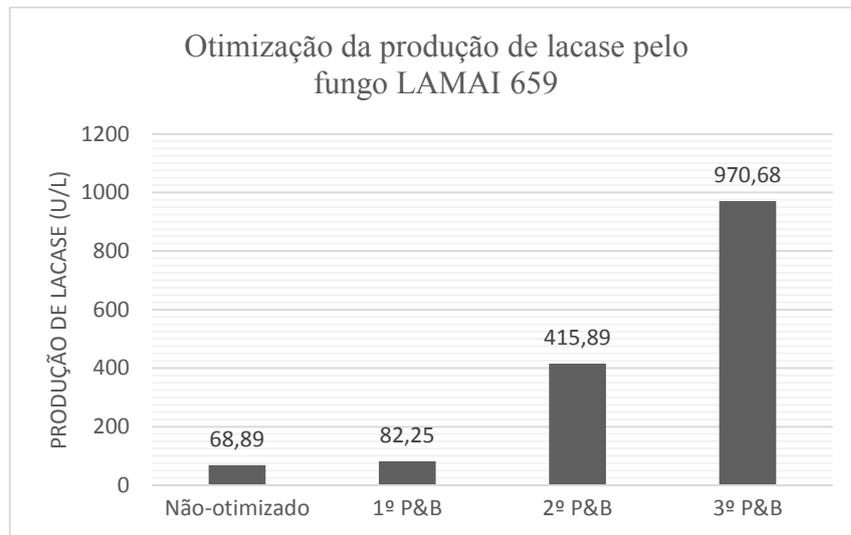


Figura 3 – Gráfico de desenvolvimento da produção de lacase ao longo etapas de otimização. (Fonte: Autor)

Um dos principais desafios da aplicação das enzimas ligninolíticas em processos industriais é a sua obtenção em grandes quantidades e a custos competitivos. Além disso, a escolha adequada do micro-organismo, do tipo de biorreator e das condições do bioprocessamento são determinantes para a viabilidade da produção (MOILANEN et al, 2015). Diversos trabalhos destacam a elevada produção de enzimas ligninolíticas por basidiomicetos, sendo o fungo *Tratemes pubescens* atualmente o maior produtor de lacase (740.000 U/L após 692 h de cultivo em sistema de batelada alimentada) (GALHAUP & HALTRICH, 2001; GALHAUP et al., 2002). No Brasil, Bettin et al. (2011) reportaram valores de 40.000 U/L em 144 horas de cultivo do fungo *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em biorreator de bancada. Mainardi (2015) utilizou sistemas de biorreator de bancada com agitação mecânica e *air-lift* para estudar a produção de lacase pelo fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063, onde foi possível observar produção de 2.700 U/L e 4.014 U/L, respectivamente.

Além dos fungos da podridão branca (*white-rot fungi*), conhecidos como produtores de enzimas ligninolíticas, a atividade de lacase em fungos anamórficos e ascomicetos também tem sido reportada. Aghaie-Khouzani et al. (2012) conseguiram otimizar a produção da enzima lacase de 970 U/L para 16.678 U/L com o ascomiceto *Paraconiothyrium variabile*. De forma semelhante, Sadhasivam et al. (2008) reportaram 4.360 U/L de lacase (após 4 dias de incubação) produzida pelo fungo *Trichoderma harzianum* WL1 após otimização e purificação.

4.3 Avaliação da toxicidade

A contagem de microcrustáceos sobrevivente e mortos após 24 horas de exposição do bioindicador à amostra de corante têxtil ou pireno, está indicada na Tabela 12. Os valores utilizados para a análise estatística foram: (1) total de sobreviventes no ensaio controle (meio e fungo), (2) total de sobreviventes em cada controle dos respectivos corantes ou pireno, e (3) valor médio do total de sobreviventes das triplicatas. Os valores foram comparados em modelo de meta-análise, para várias proporções, o resultado obtido em software encontra-se a seguir.

Tabela 12 – Relação de microcrustáceos sobreviventes e mortos, após 24 horas de exposição a poluentes, e análise estatística dos resultados.

			CONTROLE (M + F)						
			VIVO	MORTO					
			Controle (meio + isolado)	34	56				
RBBR (500 ppm)			PR 5 (200 ppm)			Preto Sulfuroso (500 ppm)			
			VIVO	MORTO	VIVO	MORTO	VIVO	MORTO	
Controle (meio + poluente)			21	69	9	81	11	79	
TRIPLICATAS (meio + poluente + isolado)			VIVO	MORTO	VIVO	MORTO	VIVO	MORTO	
RBBR T1			12	77	13	77	8	82	
RBBR T2			33	57	3	87	0	90	
RBBR T3			10	80	7	83	10	80	
Valor médio das triplicatas			18	71	8	82	6	84	
Comparações RBBR			q	p-valor	Comparações PR 5			q	p-valor
Proporções (1) e (2)			2.9626	ns	Proporções (1) e (2)			6.3612	< 0.01
Proporções (1) e (3)			3.7205	< 0.05	Proporções (1) e (3)			6.7119	< 0.01
Proporções (2) e (3)			0.7579	ns	Proporções (2) e (3)			0.3506	ns
Valor crítico (0.05) =			3.314	---	Valor crítico (0.05) =			3.314	---
Valor crítico (0.01) =			4.12	---	Valor crítico (0.01) =			4.12	---
Comparações P SULF			q	p-valor	Comparações P SULF			q	p-valor
Proporções (1) e (2)			5.7057	< 0.01	Proporções (1) e (2)			5.7057	< 0.01
Proporções (1) e (3)			7.4749	< 0.01	Proporções (1) e (3)			7.4749	< 0.01
Proporções (2) e (3)			1.7692	ns	Proporções (2) e (3)			1.7692	ns
Valor crítico (0.05) =			3.314	---	Valor crítico (0.05) =			3.314	---
Valor crítico (0.01) =			4.12	---	Valor crítico (0.01) =			4.12	---

Tabela 12 – Relação de microcrustáceos sobreviventes e mortos, após 24 horas de exposição a poluentes, e análise estatística dos resultados. (cont.)

Pireno (40 ppm)		
	VIVO	MORTO
Controle (Meio + poluente)	15	75
TRIPLICATAS (meio + poluente + isolado)		
PIRENO T1	5	85
PIRENO T2	5	84
PIRENO T3	17	73
Valor médio das triplicatas	9	81

Comparações Pireno	q	p-valor
Proporções (1) e (2)	45,259	< 0.01
Proporções (1) e (3)	63,612	< 0.01
Proporções (2) e (3)	18,353	ns
Valor crítico (0.05) =	3,314	---
Valor crítico (0.01) =	4.12	---

De modo geral, os resultados apresentaram valores não significativos (ns) de detoxificação para os corantes têxteis (RBBR, PR 5 e P Sulf) e para o pireno. Isso pode ser percebido pela proporção entre (2) e (3), que não indicou um acréscimo expressivo de sobreviventes após o período de incubação do fungo selecionado com o poluente. Além disso, a proporção entre (1) Número de sobreviventes no ensaio controle (meio + fungo) e (3) Valor médio do total de sobreviventes das triplicatas apresentou significância de resultados para os três corantes e o pireno, indicando que o número de microcrustáceos vivos após o ensaio (RBBR= 18; PR 5 = 8; Preto Sulfuroso = 6 e Pireno= 9) foi menor do que no ensaio-controle (Controle [M+F]= 34). É importante destacar que o próprio ensaio contendo apenas meio de cultivo e o fungo apresentou valores relativamente baixos de sobreviventes (média de 11 sobreviventes por triplicata), podendo ser um indicativo de que o meio de cultivo otimizado apresente certa toxicidade.

4.4 Avaliação da descoloração de corantes têxteis

A descoloração dos corantes Azul Brilhante de Remazol R (RBBR), Preto Reativo 5 (PR5), e Preto Sulfuroso (P Sulf) foi avaliada visualmente e qualitativamente em relação aos ensaios-controle (meio e corante) para cada um dos corantes. Os resultados seguem indicados na Tabela 13, seguidos de fotos referentes a cada corante e seus ensaios em triplicatas (Figura 4).

Tabela 13 – Avaliação visual da descoloração de corantes em relação aos seus respectivos ensaios-controle

	TRIPLICATA 1	TRIPLICATA 2	TRIPLICATA 3
RBBR	++	+++	-
PR 5	++	-	++
P SULF	+	+	+

Legenda: nenhuma descoloração (-), pouca descoloração (+), descoloração mediana (+ +), e alta descoloração (+ + +).

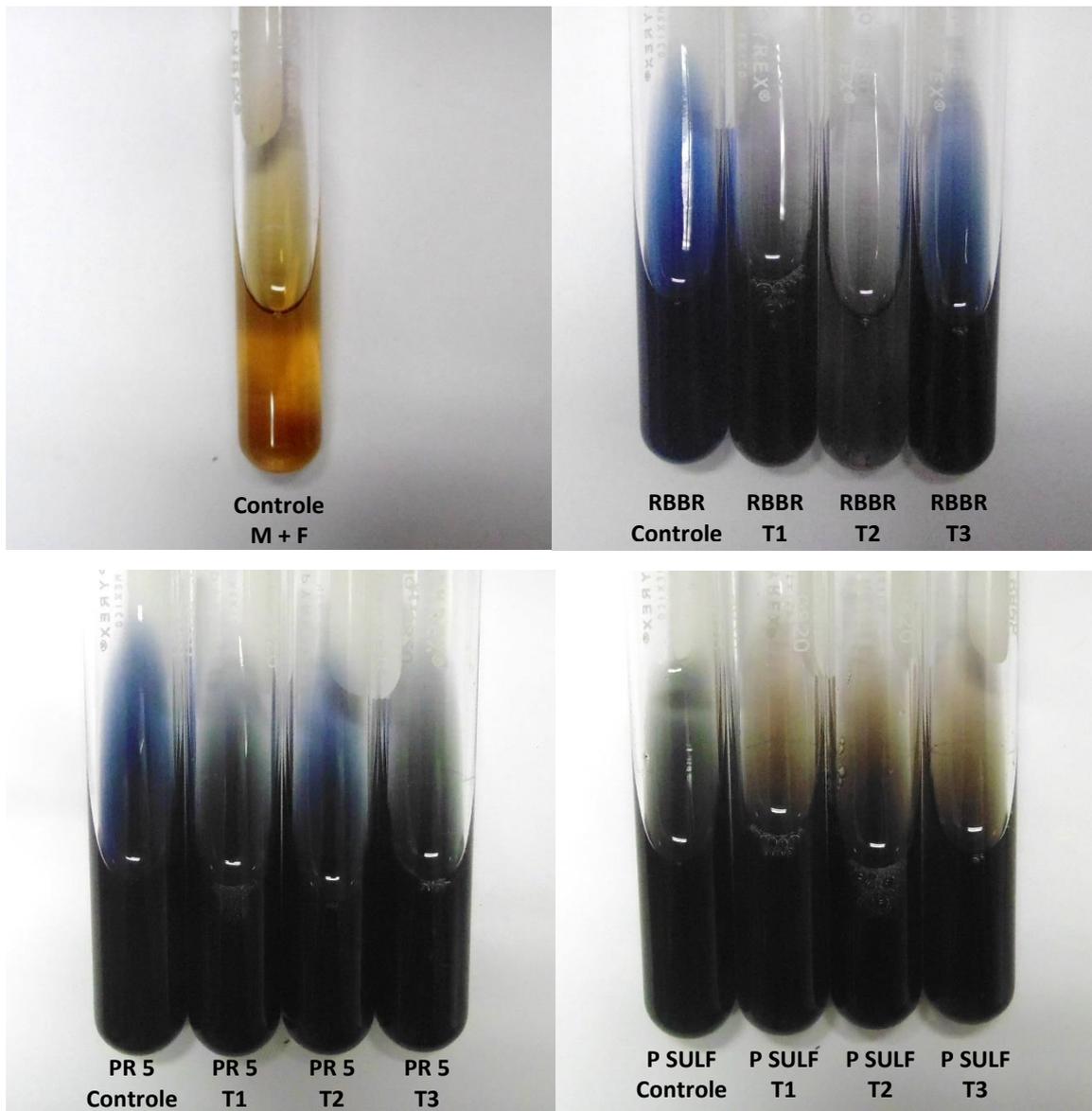


Figura 4 – Fotos do ensaio contendo apenas o meio e o isolado, e dos ensaios contendo corantes Azul Brillante de Remazol R (RBBR), Preto Reativo 5 (PR5), e Preto Sulfuroso (P Sulf). (Fonte: Autor)

Ribeiro (2013) enfatiza que a produção de enzimas ligninolíticas, dentre elas a lacase, pode contribuir efetivamente para a mineralização de compostos recalcitrantes como HPAs e corantes aromáticos. Nas imagens da Figura 3 podemos verificar alteração na tonalidade entre o ensaio-controle e as amostras (bioensaios) de cada corante. A amostra RBBR T2 foi a que apresentou, visualmente, maior clareamento em relação ao seu ensaio controle. Entretanto, as amostras RBBR T3 e PR5 T2 não apresentaram variação da coloração, sugerindo alguma falha de inoculação durante a execução dos ensaios. Em adição, cabe ressaltar que o meio de cultivo utilizado apresentava guaiacol em sua composição, que por si só induz à mudança de cor uma

vez que sua oxidação pela lacase (produzida pelo isolado) gera uma coloração de tom marrom no meio. Essa alteração deve ser levada em conta em ensaios futuros de quantificação da descoloração dos corantes.

4.5 Quantificação da atividade enzimática

Os resultados da quantificação das atividades enzimáticas dos meios acrescidos dos corantes Preto Sulfuroso (P Sulf), Preto Reativo 5 (PR5) e Azul Brilhante de Remazol R (RBBR) estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Análise da quantificação enzimática dos ensaios com corantes Preto Sulfuroso (P. Sulf.), Preto Reativo 5 (PR5) e Azul Brilhante de Remazol R (RBBR), em triplicatas.

	Lacase (U/L)	LiP (U/L)	MnP (U/L)
Controle sem poluentes (Meio + isolado)	510,80	0	0

Preto Sulfuroso (triplicatas)	Lacase (U/L)	LiP (U/L)	MnP (U/L)
P Sulf T1	696,76	0	0
P Sulf T2	627,31	0	0
P Sulf T3	728,39	0	1,15

Preto Reativo 5 (triplicatas)	Lacase (U/L)	LiP (U/L)	MnP (U/L)
PR5 T1	514,92	0	0
PR5 T2	7,14	0	17,26
PR5 T3	477,88	0	5,75

RBBR (triplicatas)	Lacase (U/L)	LiP (U/L)	MnP (U/L)
RBBR T1	614,20	0	19,44
RBBR T2	585,65	0	18,41
RBBR T3	----	----	----

A análise dos resultados demonstra que houve elevada produção da enzima lacase nos ensaios dos três corantes, atingindo valores próximos e inclusive maiores do que no ensaio controle (510,80 U/L), o qual continha apenas o meio otimizado e o fungo. Assim como no

teste de descoloração, duas amostras (PR5 T2 e RBBR T3) apresentaram valores que não condizem com as demais triplicatas e, portanto, foram descartadas das análises dos resultados. A maior média de produção de lacase foi obtida no ensaio contendo o corante Preto Sulfuroso (684,15 U/L), enquanto que para os ensaios com RBBR e Preto Reativo 5 os resultados médios foram, respectivamente, 599,92 U/L e 496,40 U/L.

O fato de não ocorrer produção de LiP e baixa produção de MnP condiz com os resultados obtidos anteriormente na etapa de seleção do isolado visto que não havia indicação da produção destas enzimas. Os valores obtidos para MnP podem estar relacionados com a utilização de meio de cultivo otimizado nesta etapa, visto que na etapa de seleção do fungo foi utilizado o meio MA 2%.

As atividades enzimáticas para os ensaios contendo o HPA pireno estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Análise da quantificação enzimática dos ensaios com HPA pireno, em triplicatas.

Controle Pireno	Lacase (U/L)	LiP (U/L)	MnP (U/L)
Controle sem poluente (Meio + isolado)	425,92	0,60	0

Pireno (triplicatas)	Lacase (U/L)	LiP (U/L)	MnP (U/L)
Pireno T1	419,75	0	3,57
Pireno T2	448,56	0	21,86
Pireno T3	407,41	0	20,36

Assim como os ensaios com corantes têxteis, a produção de lacase não foi afetada pelo acréscimo do pireno ao ensaio, mantendo um valor médio (425,24 U/L) muito próximo ao ensaio-controle (425,92 U/L). Como diferencial, o ensaio contendo pireno aparentemente induziu a produção de MnP, em média de 15,26 U/L, um valor relativamente significativo uma vez que nos ensaios-controle não foi observado nenhum incremento para MnP.

5. Considerações Finais

O uso de micro-organismos para remediação de áreas contaminadas é uma alternativa de baixo custo que vem sendo cada vez mais utilizada (CETESB, 2001), apresentando resultados promissores em contaminações *in situ* de compostos recalcitrantes, metais pesados, entre outros.

A produção enzimática de fungos de origem marinha se mostrou razoável no ensaio inicial, e sua otimização proporcionou um incremento expressivo para a enzima lacase.

Os ensaios de toxicidade apresentaram valores elevados, mas estudos similares com fungos basidiomicetos indicam um tempo ótimo de incubação maior do que o utilizado no presente trabalho (RIBEIRO, 2013; PEIXOTO, MARINHO & RODRIGUES, 2013), sendo esta uma questão a ser estudada em trabalhos futuros.

A descoloração de corantes têxteis foi visualmente observada, entretanto, ensaios adicionais devem ser realizados a fim de se melhorar a descoloração e avaliar a influência enzimática neste processo.

Os resultados obtidos no presente trabalho ressaltam o potencial biotecnológico de fungos de origem marinha e estimulam novos estudos relacionados à caracterização e aplicação da enzima lacase produzida pelo fungo LAMAI 659. Cabe ressaltar que estudos preliminares morfológicos indicam ser este um fungo do grupo dos basidiomicetos. Análises de taxonomia molecular estão em andamento para caracterização taxonômica do fungo de origem marinha LAMAI 659.

6. Referências Bibliográficas

AGHAIE-KHOUZANI, M.; FOROOTANFAR, H.; MOSHFEGH, M.; KHOSHAYAND, M. R.; FARAMARZI, M. A. Decolorization of some synthetic dyes using optimized culture broth of laccase producing ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 60, p. 9-15, 2012.

ARORA, D. S., GILL, P. K. Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. *J. Biorresource Technology*, v. 73, p. 283-285, 2000.

BETTIN, F.; ROSA, L. O.; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T. A.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M.; DILLON, A. J. P. Growth kinetics, production, and characterization of extracelular laccases from *Pleurotus sojour-caju* PS-2001. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 758-764, 2011.

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.

BREXÓ, R. P. Produção de enzimas ligninolíticas, glioxal oxidase e proteases por fungos marinhos. 2013. 52f. Dissertação (Trabalho de Conclusão de Curso) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2013.

DA SILVA, M., PASSARINI, M. R. Z., BONUGLI, R. C., SETTE, L. D. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. *Environmental Technology*, v.29, p. 1331–1339; 2008.

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.

GUARATINI, C. C. I., ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. *Química Nova*, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000.

LEMONS, 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.

LEONOWICZ, A. et al. Fungal Laccase: properties and activity on lignin. *J. Bas. Microb.*, v. 41, p. 185-227, 2001.

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*, p. 181-183, 2008.

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.

MAGRINI, M. J. Degradação de HPAs e produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos derivados de esponjas marinhas. 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

Manual de Gerenciamento de Áreas Contaminadas. São Paulo: CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2001. Disponível em:

<<http://areascontaminadas.cetesb.sp.gov.br/manual-de-gerenciamento/>>

Acesso em: jul/2015

MOILANEN, U.; WINQUIST, E.; MATTILA, T.; HATAKKA, A.; EERIKAINEN, T. Production of manganese peroxidase and laccase in a solid-state bioreactor and modeling of enzyme production kinetics. *Biprocess and Biosystems Engineering*, vol. 38, p. 57-68, 2015.

OLIVEIRA, C. R. Avaliação da Biodegradação de Pireno pela microbiota nativa em sedimento do Manguezal do Itacorubi, Florianópolis, SC. 2006. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

PEIXOTO, F., MARINHO, G., RODRIGUES, K. Corantes têxteis: uma revisão. *Holos*, ano 29, v. 5, p. 98-106, 2013.

RIBEIRO, A. P. A. Efeito de fungos basidiomicetos na descoloração e fitotoxicidade de corante sintético e efluente têxtil. 2013. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

ROMMINGER, S. Avaliação do potencial metabólico de linhagens de fungos isolados de uma espécie de alga marinha do gênero *Sargassum*. 2008. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

SADHASIVAM, S.; SAVITHA, S.; SWAMINATHAN, K.; FENG-HUEI LIN. Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 736-742, 2008.

SANTOS, R. C. B. Fungos isolados de macro-organismos marinhos brasileiros: diversidade genética e potencial biotecnológico. 2010. 174 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

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.

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.

TIEN, M., KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization and catalytic properties of unique H₂O₂ requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Science*, 1984.

WARIISHI, H., VALLI, K., GOLD, M. H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.*, 1992.

ZANONI, M. V. B.; CARNEIRO, P. A. O descarte dos corantes têxteis. *Ciência Hoje*. v. 9, n. 174, p. 61-64, ago 2001.