

Luz Alba Ballén Sierra

Avaliação do crescimento e produção da enzima lignina peroxidase por *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor* e *Ganoderma lucidum*, imobilizados em vermiculita com e sem nanotubos de carbono

Belo Horizonte, MG

UFMG / ICB

2016

Luz Alba Ballén Sierra

Avaliação do crescimento e produção da enzima lignina peroxidase por *Pleurotus ostreatus*,  
*Pleurotus djamor* e *Ganoderma lucidum*, imobilizados em vermiculita com e sem  
nanotubos de carbono

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Microbiologia da Universidade  
Federal de Minas Gerais como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Ary Corrêa Júnior

Belo Horizonte, MG

UFMG / ICB

2016

À minha mãe Leonor Sierra grande guerreira, pela vida, pelo aconchego, pela ajuda, pelo carinho e pelo amor.

Ao meu Pai Marcos Ballén, in memoriam.

À minha avó Rosa, in memoriam, pelos seus conselhos para esta difícil viagem.

Aos meus queridos e amados tios e primos pelo apoio incondicional, pela ajuda sincera e pelo incentivo constante

Aos meus amigos e amigas na Colômbia e no Brasil.

Ao meu companheiro de caminhada “Andreu” pela força, ensinamentos, paciência, amor e disciplina

Ao meu filho Joshuah, a chave de ouro.

À família Urrego Posada pela força e confiança.

Dedico este trabalho com todo o meu amor, OBRIGADA

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Ary Correa Jr. Pela sua orientação, por ter despertado em mim a vontade de realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr Luiz Orlando Ladeira pelo apoio e interesse constante.

Ao Prof. Dr Rochel Lago pela sua ajuda com a vermiculita, sem ela não existiria este trabalho, por me despertar um interesse maior na área, também pelas curtas pero importantes conversas.

À professora Dra. Catarina Megumi Kasuya da UFV por me permitir trabalhar com os fungos.

À Camila pelo seu exemplo, pela ajuda e também pela sua enorme e importante amizade.

À Sabrina pelas ajudas metodológicas da enzima, e pela amizade.

À Raissa pelo carinho, pela força, pelas palavras certas no momento certo e pela amizade

Aos antigos e novos colegas do laboratório Fagner, Tati, Miriam e Thiago e a todas as Marias dos Anjos que aparecem no caminho.

Ao meu querido professor Dr. Carlos Salas com quem obtive a minha primeira experiência num laboratório de pesquisa no Brasil, de quem aprendi muito incluso de questões básicas da vida, também a Miriam Lopez pelo seu apoio mesmo sem nos conhecer por ser a grande mãe e por tantas coisas que só a gente sabe.

Ao prof. Dr. German, Luz H. e família, pelo seu apoio no momento que mais a gente precisava, pelo seu carinho e valiosa amizade que sempre ficara nos nossos corações.

Ao Jorge do departamento de física, Jamil da Bioquímica, a Fernanda e Ana mestres do departamento de química; sem a sua colaboração este trabalho tivesse sido muito mais complicado.

À agencia de fomento FAPEMIG

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“A vontade de se tornar algo melhor a cada dia é o que faz do ser humano uma máquina de sonhar.

Projetar idéias e desejos, lutar para transformar o que um dia foi um simples pensamento em uma situação real.

Nunca desistir de algo que se deseja muito e que se almeja fazer parte da vida.

O ser humano sonha!

Mas se ele apenas sonhasse nunca saberia do que é capaz, é preciso conquistar os sonhos”

Anônimo

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>13</b>
<b>LISTA DE EQUAÇÕES</b> .....	<b>14</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>15</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>16</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
2.1 Peroxidasas.....	19
2.2 Lignina peroxidase (LiP) .....	21
2.3 Fungos Produtores de Lignina Peroxidase.....	23
2.4 Meios e métodos de cultura, substratos e matriz para imobilização .....	25
2.4.1 Sistemas de produção de enzimas, fermentação em estado sólido (SSF) vs fermentação submersa (SmF).....	25
2.4.2 Substrato .....	26
2.4.3 Imobilização.....	26
2.4.3.1 Vermiculita: .....	27
2.4.3.2 Nanotubos de carbono.....	28
2.4.3.3 Vermiculita com nanotubos de carbono.....	29
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>30</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
4.1 Objetivo Geral .....	31
4.2 Objetivos Específicos .....	31
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
5.1 Espécies fúngicas, meios de cultura, suportes e caracterização dos suportes.....	32
5.1.1 Espécies fúngicas .....	32

5.1.2 Meios de cultura.....	32
5.1.3 Suportes .....	33
<i>VERMICULITA SEM NTC</i> .....	33
<i>VERMICULITA COM NTC</i> .....	33
5.1.4 Caracterização dos suportes.....	34
5.2 Tratamentos e Testes.....	35
5.2.1 Descoloração do corante Azul de Remazol Brilhante R (RBBR) na avaliação da produção de peroxidases em cultura sólida .....	35
5.2.2 Imobilização e produção enzimática .....	35
5.2.2.1 Avaliação inicial da imobilização e crescimento de PLO9, PLO13 e GM117 em vermiculita sem NTC e vermiculita Ref. ICEX. ....	36
5.2.2.2 Avaliação inicial da produção de lignina peroxidase por parte das espécies PLO9, PLO13 e GM117 em caldo batata imobilizadas na vermiculita Ref. ICEX.....	37
Determinação da atividade enzimática.....	38
5.2.2.3 Cultivo das espécies fúngicas para a produção de Lignina peroxidase em diferentes meios de cultura, imobilizados na vermiculita Ref.:17062015.....	38
5.2.2.4 Confirmação da produção de peroxidases nos extratos com atividade enzimática para lignina peroxidase, pela descoloração do corante Azul Brilhante de Remazol R (RBBR).....	39
5.2.2.5 Cultivo e seleção da melhor espécie fúngica produtora da enzima Lignina peroxidase na vermiculita Ref. :24062015.....	40
5.3 Determinação do Crescimento .....	40
5.3.1 Determinação do crescimento de PLO9, PLO13 e GM117 no meio onde se apresenta a mais alta atividade enzimática de lignina peroxidase sobre a vermiculita Ref. 17062015 .....	40
Extração alcalina de ergosterol.....	41
Medição de ergosterol por HPLC .....	41
5.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de energia Dispersiva (EDS).....	42

5.3.2.1	<i>Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a imobilização das espécies fúngicas à vermiculita Ref.: 17062015.....</i>	42
5.3.2.2	<i>Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a aderência da melhor espécie produtora, usando a vermiculita Ref.: 24062015.....</i>	42
5.3.2.3	<i>Espectroscopia de energia Dispersiva EDS.....</i>	42
5.4	ESTATÍSTICA .....	42
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
6.1	Suportes e caracterização dos suportes.....	44
6.1.1	Suportes .....	44
Vermiculita Ref. 17062015.....		44
Vermiculita Ref. 24062015.....		44
6.1.2	Caracterização físico química dos suportes.....	44
6.1.2.1	<i>Análise termogravimétrica e térmica diferencial TGA-DTA .....</i>	44
6.1.2.2.	<i>Espectroscopia Raman.....</i>	48
6.1.2.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....</i>	52
6.2	Tratamentos e Testes.....	58
6.2.1	Descoloração do corante Azul de Remazol Brillhante R (RBBR) na avaliação da produção de peroxidases em cultura sólida .....	58
6.2.2	Imobilização e produção enzimática .....	60
6.2.2.1	<i>Avaliação inicial da imobilização e crescimento de PLO9, PLO13 e GM117 em vermiculita Ref. ICEX.....</i>	60
6.2.2.2	<i>Avaliação inicial da produção de lignina peroxidase por parte das espécies PLO9, PLO13 e GM117 em caldo batata imobilizados na vermiculita Ref. ICEX.....</i>	62
6.2.2.3	<i>Cultivo das espécies fúngicas para a produção de Lignina peroxidase em diferentes meios de cultura imobilizados na vermiculita Ref.:17062015.....</i>	64
6.2.2.4	<i>Avaliação da produção de lignina peroxidase em caldo batata com torta de pinhão manso como indutor em diferentes porcentagens.....</i>	67
6.2.2.5	<i>Confirmação da produção de peroxidases nos extratos com maior atividade enzimática para lignina peroxidase, pela descoloração do corante Azul Brillhante de Remazol R (RBBR) .....</i>	69

6.2.2.6 <i>Cultivo da melhor espécie fúngica produtora da enzima Lignina peroxidase na vermiculita Ref. 24062015</i> .....	73
6.2.3 Determinação do Crescimento.....	74
6.2.3.1 <i>Determinação do crescimento de PLO9, PLO13 E GM117 no meio onde se apresentou a mais alta atividade enzimática de lignina peroxidase sobre a vermiculita Ref. 17062015</i> .....	74
Ergosterol, N-Heptano Vs HPLC.....	74
6.2.3.2 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de energia Dispersiva (EDS) para avaliar a imobilização das espécies fúngicas à vermiculita Ref.: 17062015</i> .....	85
6.2.3.3 <i>Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a imobilização da melhor espécie produtora, usando a vermiculita Ref.: 24062015</i> .....	88
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>89</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	<b>90</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema estrutural da vermiculita (SALDANHA, 2014).....	28
Figura 2 Análise termogravimétrica e térmica diferencial da Vermiculita sem nanotubos de carbono; em verde a porcentagem de massa e em azul a derivada. ....	45
Figura 3 Análise termogravimétrica e térmica diferencial da Vermiculita Ref. 17062015, em verde a porcentagem de massa e em azul a derivada.....	46
Figura 4 Análise termogravimétrica e térmica diferencial da vermiculita impregnada com sais de ferro e cobalto, em verde a porcentagem de massa e em azul a derivada. ....	47
Figura 5 Análise termogravimétrica e térmica diferencial da Vermiculita Ref. 24062015, em verde a porcentagem de massa e em azul a derivada. ....	48
Figura 6 Espectro Raman da vermiculita sem nanotubos de carbono, em verde bandas entre $250\text{ cm}^{-1}$ e $750\text{ cm}^{-1}$ e em azul bandas entre $750\text{ cm}^{-1}$ e $1100\text{ cm}^{-1}$ . ....	49
Figura 7 Espectro Raman da vermiculita Ref. 17062015.....	50
Figura 8 Espectro Raman da vermiculita impregnada com sais de ferro e cobalto.....	51
Figura 9 Espectro Raman da vermiculita Ref. 24062015.....	52
Figura 10 Eletromicrografia de varredura da vermiculita sem nanotubos de carbono (línea superior A) e a vermiculita Ref.: 17062015 (línea inferior B). Na linha A, se observa da esquerda para a direita na imagem 1), um grânulo de vermiculita com a sua estrutura foliar característica; e na imagem 2) e 3) a sobreposição das folhas, com espaços entre elas (↑1), também é possível observar as bordas irregulares das folhas (↑2). Na linha B, verifica-se na imagem 1) e 2) como após o CVD a estrutura foliar se manteve, agora com espaços mais uniformes e a aglomeração de estruturas de carbono (↑), observasse um recobrimento parcial da vermiculita mais especificamente nas bordas das folhas, na imagem 3) observasse os filamentos de carbono(↑). ....	53

Figura 11 Eletromicrografia de varredura da vermiculita com ferrita de cobalto, também é apresentado o local onde foi feito a análise do espectro de energia dispersiva EDS para a imagem 4 (↑).....	54
Figura 12 Espectrograma EDS da vermiculita impregnada com sais de ferro e cobalto sinaladas na Imagem 4 da figura 11. Em A: localização sinalada na figura 11 como (↑1); e em B: a localização sinalada na figura 11 como (↑2).....	55
Figura 13 Electromicrografia MEV da vermiculita Ref. 24062015, também é apresentado o local onde foi feito a análise do espectro de energia dispersiva EDS para a imagem 7 (↑) .	57
Figura 14 Espectrograma EDS da vermiculita Ref. 24062015, localização sinalada na figura 13 como (↑).....	57
Figura 15 Imagem ilustrativa da descoloração do corante RBBR em placa. ....	60
Figura 16 Imagens representativas do crescimento fungico nas vermiculitas Ref. ICEX e sem NTC em tubos de vidro, nos dias zero e dez de crescimento em caldo batata.....	61
Figura 17Micrografias do crescimento das três linhagens, sobre vermiculita Ref. ICEX e vermiculita sem NTC, no microscópio Olympus BX41 .....	62
Figura 18 Atividade enzimática de lignina peroxidase em caldo batata vermiculita Ref. ICEX.....	63
Figura 19Atividade enzimática de lignina peroxidase do GM117 inoculados em diferentes meios de cultura com vermiculita Ref. 17062015 .....	64
Figura 20 Atividade enzimática de lignina peroxidase do PLO9 inoculados em diferentes meios de cultura com vermiculita Ref. 17062015 .....	65
Figura 21Atividade enzimática de lignina peroxidase do PLO13 inoculado em diferentes meios de cultura com vermiculita Ref. 17062015 .....	66
Figura 22 Atividade enzimática de lignina peroxidase do PLO13 em caldo batata com 5% 10% e 15% de torta de pinhão manso com vermiculita Ref. 17062015 .....	68

Figura 23 Descoloração do Azul Brilhante de Remazol R (RBBR) 40 mg/L por parte dos extratos enzimáticos provenientes de crescimentos sem NTC (indicado pela letra A) e com NTC vermiculita Ref. 17062015 (indicado pela letra B) nos meios onde se apresentou a maior atividade enzimática. ....	70
Figura 24 Descoloração do Azul Brilhante de Remazol R (RBBR) 50 mg/L por parte dos extratos enzimáticos provenientes de crescimentos sem NTC (indicado pela letra A) e com NTC vermiculita Ref. 17062015 (indicado pela letra B) nos meios onde se apresentou a maior atividade enzimática. ....	72
Figura 25 Concentração de ergosterol na fração heptânica e por HPLC nas amostras de GM117, PLO9 e PLO13, crescidas em vermiculita Ref. 17062015 nos meios onde se apresentou a melhor atividade enzimática. ....	77
Figura 26 Concentração de ergosterol na fração heptânica de GM117, PLO9 e PLO13; todas em vermiculita sem NTC e vermiculita Ref. 170625 com NTC, nos meios onde se apresentou a melhor atividade enzimática. ....	80
Figura 27 Gráficos das curvas de crescimento VS a atividade enzimática em vermiculita sem nanotubos de carbono A1, B1, C1 e com NTC vermiculita Ref. 17062015 A2, B2, C2; sendo que as letras A é para GM117, B é para PLO9 e C para PLO13. ....	82
Figura 28 Electromicrografia do GM117 vermiculita sem nanotubos de carbono (linha superior A) e com nanotubos de carbono (linha inferior B). ....	85
Figura 29 Electromicrografia do PLO9 vermiculita sem nanotubos de carbono (linha superior A) e com nanotubos de carbono (linha inferior B). ....	86
Figura 30 Electromicrografia do PLO13 vermiculita sem nanotubos de carbono (linha superior A) e com nanotubos de carbono (linha inferior B). ....	87
Figura 31 Electromicrografia de PLO13 após dez dias de crescimento em caldo batata com torta de pinhão manso em vermiculita impregnada de ferrita de cobalto e com NTC após CVD. ....	88

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Oxireductases: funções biológicas e aplicações em diferentes setores industriais (JAQUELINE et al., 2010; ZURITA, 2012).....	21
Tabela 2 Quadro indicando os tipos de suportes usados frente às diferentes linhagens e meios de cultura. Os números no sobrescrito indicam o meio de cultura utilizado assim: Caldo batata <sup>1</sup> - Pontecorvo completo <sup>2</sup> - Solução salina com glicose e torta de pinhão manso <sup>3</sup> - Caldo batata com torta de pinhão manso <sup>4</sup> .....	36
Tabela 3 Bandas características do espectro Raman da vermiculita sem nanotubos de carbono .....	49
Tabela 4 Diâmetro de colônia, diâmetro de halo e índice enzimático para atividade de peroxidases em teste em placa dos isolados PLO9, PLO13 e GM117apos 5 dias de crescimento.....	59
Tabela 5 Comparação da quantidade media de massa para cada uma das espécies tanto na vermiculita sem NTC quanto com NTC, com a correspondente media da atividade enzimática, com 10 dias de crescimento. (Estes dados foram baseados nos gráficos anteriores (Fig. 27).....	83

## **LISTA DE EQUAÇÕES**

Equação 1 Calculo índice enzimático .....	35
Equação 2 Porcentagem de descoloração .....	39

## RESUMO

Com o avanço da nanotecnologia, diversos novos materiais foram desenvolvidos para inúmeras aplicações. Este trabalho é parte integrante de um projeto que tem como objetivo otimizar a produção de enzimas ligninolíticas produzidas por espécies de fungos de podridão branca, aderidos a uma matriz composta de vermiculita com nanotubos de carbono (NTC). Essa matriz foi utilizada no presente trabalho como suporte para o crescimento de fungos de interesse biotecnológico, pois é um material hidrofílico, poroso e magnético; propriedades que permitem o estabelecimento de diferentes protocolos de crescimento de fungos. Este trabalho teve como objetivo determinar a viabilidade da utilização da vermiculita com nanotubos de carbono, como suporte para o crescimento de três isolados fúngicos pertencentes aos *Basidiomicetos* e avaliar a produção de lignina peroxidase (LiP). A produção desta enzima é objeto de pesquisa pelo seu potencial de aplicação em múltiplos processos industriais, como a descoloração de corantes e a degradação de poluentes orgânicos. Utilizou-se, duas espécies de *Pleurotus* e uma de *Ganoderma*. Observou-se que os isolados utilizados têm capacidade de produzir a enzima Lignina Peroxidase quando crescidos em vermiculita sem e com NTC; o isolado PLO13 é capaz de produzir LiP, na presença de um indutor como a torta de pinhão manso (*Jatropha curcas*). Além disso, observamos que o extrato de PLO13 com torta de pinhão manso crescido sobre vermiculita com NTC, é capaz de descolorar 70% de uma solução do corante Azul Brilhante de Remazol R, numa concentração de 40 mg/L. Concluímos, que houve aumento da massa fúngica, sem inibição por elementos presentes nos diferentes suportes, demonstrando ser viável o uso da vermiculita nanoestruturada como suporte de crescimento dos fungos, permitindo o aproveitamento das características estruturais do material no desenvolvimento de um biorreator no futuro.

## ABSTRACT

Concomitant with the advancement of nanotechnology, many new materials have been developed for numerous applications. This work is part of a project that aims to optimize the production of ligninolytic enzymes produced by species of white rot fungi attached to a matrix composed of vermiculite with carbon nanotubes (NTC). This matrix was used in this study as a support for the growth of fungi of biotechnological interest, in virtue of their hydrophilic, porous and magnetic characteristics. These properties allow the establishment of different protocols for fungal growth. The first stage of this study aims to determine the feasibility of using the vermiculite, with carbon nanotubes, as support for the growth of two *Basidiomycetes* gender, and, to evaluate the production of lignin peroxidase (LiP). This enzyme production is an object of research for their potential application in several industrial processes such as discoloration of dyes and the degradation of organic pollutants. In this research, two strains of *Pleurotus spp* and *Ganoderma spp* were used. It was observed that the strains used in this work were able to produce lignin peroxidase when exposed to vermiculite with and without NTC; the PLO13 strain was able to produce the LiP enzyme in the presence of an inducer such as *Jatropha curcas* cake. In addition, we observed that PLO13 extract, with *Jatropha* cake grown on vermiculite NTC, it is able to decolorize 70% of a dye solution of Remazol Brilliant Blue R, at a concentration of 40 mg/L; this fact is a measure of enzyme production with environmental-recovery activity. We concluded that mycelial mass was increased, without being inhibited by the different elements present in the supports, demonstrating the feasibility of usage of nanostructured vermiculite as fungal growth medium, allowing the use of the structural characteristics of the material in the future development of a bioreactor.

## 1. INTRODUÇÃO

Na atualidade, quase 4000 enzimas são conhecidas, sendo que em uso comercial aproximadamente 200 são de origem microbiana. Para o ano de 2015 é estimado um aumento na demanda comercial de enzimas segundo Li *et al* (2012), com consequente maior investimento em tecnologias que fazem uso dessas substâncias, inclusive para aplicações ambientais. A enzima lignina peroxidase (LiP) caracteriza-se pela transformação e a mineralização de uma variedade de compostos aromáticos recalcitrantes, como hidrocarbonetos e corantes. A LiP é uma enzima da família das oxireductases produzida de forma intrínseca por diferentes microorganismos, entre eles, os fungos de podridão branca que a produzem para degradar a lignina durante a degradação de matéria vegetal morta (BAPTISTA *et al.*, 2012; CARVALHO, 2011; ORTH; ROYSE; TIEN, 1993).

A produção e aplicação de oxirredutases é um desafio para a indústria, devido à falta de produtores da enzima em quantidades economicamente adequadas e o custo da adição de mediadores redox, essenciais para a sua atividade. (RODRÍGUEZ COUTO; TOCA HERRERA, 2006).

A via mais comum de produção de enzimas é em biorreatores, onde são utilizados fungos filamentosos. Entre os diversos sistemas de produção de enzimas, encontramos dois tipos de fermentação: em estado sólido (SSF) e a submersa (SmF). A SSF pode ser definida como um processo de fermentação onde os microrganismos crescem em um suporte sólido, em ausência ou quase ausência de água livre dentro do sistema; já a SmF é uma técnica realizada em meio líquido, sendo a metodologia predominantemente usada em escala industrial (PANDEY *et al.*, 2000). Fatores como a purificação das moléculas de interesse e a facilidade do controle da temperatura de cultivo, justificam a utilização deste método. No entanto a SmF, na maioria das vezes, resulta em crescimento descontrolado do micélio, o que influencia na transferência de massa, na taxa metabólica e na secreção do produto de interesse, e são empecilhos que devem ser minorados na otimização do protocolo de cultivo (COUTO; TOCA-HERRERA, 2007; NILADEVI; PREMA, 2008).

A habilidade natural dos fungos de aderir a superfícies propiciou o desenvolvimento de diversos métodos de cultivo através da imobilização do micélio a um substrato. Esta metodologia permite a fácil separação das células do meio líquido como os usados na SmF, à diminuição da viscosidade do caldo de cultura, permitindo o fornecimento de oxigênio e uma adequada transferência de massa, sendo as culturas imobilizadas mais resistentes as perturbações ambientais (COUTO; TOCA-HERRERA, 2007).

Diversas matrizes para a imobilização de diferentes espécies fúngicas têm sido estudadas, e mais recentemente materiais nanoestruturados tem sido preconizados como um bom suporte de crescimento (COUTO; TOCA-HERRERA, 2007). Dentre os diversos nanomateriais disponíveis os nanotubos de carbono apresentam vantagens pelas suas características hidrofóbicas que facilitariam a sua interação com as estruturas fúngicas.

O presente trabalho avalio a imobilização de fungos de podridão branca cultivados em diferentes meios de cultura líquidos. Para a avaliação da eficiência de produção da enzima LiP com relação a matrizes, de vermiculita com e sem nanotubos de carbono.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Peroxidases

As peroxidases são um grupo de enzimas dependentes de peróxido, entre elas a lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidases (MnP). As enzimas dependentes de peróxido, junto com as lacases (não dependentes de peróxido) fazem parte do complexo das fenoloxidasas (CARVALHO *et al.*, 2009; MAGANHOTTO; MELO; ROBERTO, 2004; MG, 2011; QI-HE *et al.*, 2011).

A atividade das peroxidases foi identificada em plantas, micro-organismos e animais, sendo divididas em duas superfamílias: peroxidases de mamíferos e peroxidases de plantas. As peroxidases de plantas, por sua vez são distribuídas em três classes segundo a sua similaridade estrutural, sendo a classe II constituída pelas peroxidases fúngicas extracelulares, dentre elas, e de especial importância neste trabalho, a lignina peroxidase (WELINDER; MAUROZ; NRSKOV-LAURITSEN, 1992).

As peroxidases extracelulares fúngicas são produzidas como parte do metabolismo secundário em resposta ao esgotamento de fontes de nitrogênio, carbono e enxofre (QI-HE *et al.*, 2011), e são capazes de catalisar a redução de peróxidos e oxidação de uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos (ZURITA, 2012).

As fenoloxidasas lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase, são muito valorizadas por suas aplicações em processos industriais e biotecnológicos, pela capacidade de oxidar diversos xenobióticos recalcitrantes e por apresentar atividade dentro de uma vasta variedade de substratos inespecíficos orgânicos e inorgânicos. Estas aplicações variam desde a indústria de alimentos, indústria do papel, indústria têxtil, biorremediação, na síntese de compostos orgânicos, médicos, farmacêuticos e cosméticos (Tabela 1). (JAQUELINE *et al.*, 2010; ZURITA, 2012)

	<b>Lignina Peroxidase</b>	<b>Manganês peroxidase</b>	<b>Lacase</b>
<b>Indústria de alimentos</b>	Origem de aromatizantes naturais  Produção de vanilina		Remoção fenólica de alimentos e bebidas  Determinação de ácido ascórbico
<b>Indústria do papel</b>	Descolorização de polpas de Kraft	Branqueamento de polpas de Kraft	Despolimerização da lignina  Deslignificação da polpa da madeira. Branqueamento de polpas de Kraft
<b>Indústria têxtil</b>	Tratamento de efluentes	Degradação de PAHs, corantes sintéticos  Tratamento de lixiviados de fábricas produtoras de papel, DDT, PCB, TNT	Degradação de corantes têxteis e branqueamento
<b>Biorremediação</b>	Degradação de corantes azo, reativos heterocíclicos e corantes poliméricos.  Mineralização de contaminantes do meio ambiente  Degradação de xenobióticos e pesticidas		Degradação de xenobióticos.  Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos PAHs
<b>Síntese de compostos</b>	Síntese de compostos funcionais	Polimerização acrilamida	Produção de polímeros, produtos de

<b>orgânicos, médicos, farmacêuticos e cosméticos.</b>	Cosméticos e produtos dermatológicos para a pele	Degradação de polímeros	higiene pessoal, biosensores, acoplamento de fenóis e esteroides
--	--	-------------------------	--

---

*Tabela 1 Oxireductases: funções biológicas e aplicações em diferentes setores industriais (JAQUELINE et al., 2010; ZURITA, 2012)*

## **2.2 Lignina peroxidase (LiP)**

A LiP é considerada como uma das mais importantes enzimas fúngicas extracelulares. Ela compõe o sistema de degradação do polímero lignina, e é importante no processo de reciclagem do carbono (MARTINEZ, 2002). A enzima, primeiramente denominada de ligninase, é uma glicoproteína monomérica, que contém ferro protoporfirina IX (heme) como grupo prostético e requer peróxido de hidrogênio para sua atividade catalítica (WELINDER et al., 1992).

Essa enzima é expressa em várias isoformas (MARTINEZ, 2002), apresentando peso molecular que varia de 38 a 42 kDa (LEONOWICZ *et al.*, 2001). Estudos subsequentes demonstraram que a lignina peroxidase (LiP), na presença de peróxido de hidrogênio, é capaz de degradar uma variedade de compostos aromáticos recalcitrantes, fenólicos e não fenólicos (AITKEN et al., 1994). Diferente das lacases e manganês peroxidases, que apresentam um potencial de redução suficiente para retirar elétrons somente de estruturas fenólicas, a sua ação pode ser estendida também para estruturas não fenólicas na presença de mediadores apropriados (CARVALHO *et al.*, 2009).

A produção e atividade da enzima LiP depende de fatores como disponibilidade de oxigênio, concentração de carbono, nitrogênio, pH e temperatura (RODRIGUES *et al.*, 2012; KAHRAMAN, 2002).

Schoemaker e Piontek (1996) descreveram o mecanismo pelo qual a lignina peroxidase interage com o polímero de lignina. Nesse processo, o álcool veratrílico (Valc), um metabólito secundário de fungos de podridão branca, atua como um substrato mediador

preferencial para a enzima e, aparentemente, a protege contra a inativação do excesso de peróxido de hidrogênio (HARVEY *et al.*, 1986; VALLI *et al.*, 1990).

As reações do ciclo catalítico da LiP requerem a presença de peróxido de hidrogênio em concentrações adequadas. Primeiramente, o peróxido de hidrogênio atua como o aceptor de elétrons natural para a enzima férrica (Fe III), o que resulta na formação do composto I, denominado LiP I (Fe IV), que é um oxo-complexo deficiente em 2 elétrons. A redução de LiP I até a enzima nativa ocorre em duas etapas, com a retirada de um elétron de cada vez. Assim, LiP I oxida a molécula de álcool veratrílico para o radical cátion correspondente (valc<sup>+</sup>; veratraldeído), sendo este liberado a partir do sítio ativo, formando o composto LiP II. Em seguida, a segunda molécula de substrato mediador é oxidada por LiP II para formar um segundo radical valc<sup>+</sup>. Nesse processo, LiP II é convertida à enzima nativa. Assim, através do seu ciclo catalítico, LiP catalisa clivagens das ligações C-C e C-O nas cadeias laterais de compostos como a lignina, conduzindo, em geral, a despolimerização de dímeros a oligômeros (DE JONG *et al.*, 1994).

As enzimas que produzem peróxido de hidrogênio para a catálise da reação são acessórias às peroxidases, gerando peróxido de hidrogênio *in situ* e possibilitando que as peroxidases atuem. Entre as principais enzimas produtoras de peróxido descritas na literatura encontram-se: as intracelulares - glucose oxidase e metanol oxidase e as extracelulares - glioxal oxidase 24 e aril-álcool oxidase.

Em resumo, a LiP gera:

- a) Oxidação de álcoois benzílicos;
- b) Quebra de cadeias aromáticas laterais C $\alpha$ -C $\beta$ ;
- c) Desmetilação;
- d) Rearranjos intramoleculares;
- e) Quebra de anéis em compostos fenólicos e não fenólicos

(COLONNA *et al.*, 1999).

A procura por linhagens fúngicas produtoras de LiP é constante, e se inicia com os trabalhos de Tien e Kirk (1983) com *Phanerochaete chrysosporium*. Mas recentemente, a procura por novas linhagens produtoras também é feita através da busca por isolados que

expressem genes relacionados com LiP. Este protocolo já foi usado com sucesso em *Panus sp.*, *P. coccineus*, *P. sanguineus* e *Perenniporia medula*. (MENEZES; BARRETO, 2015; CARVALHO, 2011).

### 2.3 Fungos Produtores de Lignina Peroxidase

Fungos filamentosos são eficientes agentes de biodegradação da madeira. O processo começa com a invasão da hifa fúngica no lúmen da célula vegetal. Para se instalar, o fungo promove uma intensa secreção de metabólitos extracelulares, entre eles enzimas que decompõem a lignina, celulose e hemicelulose. Assim, a lignina pela ação da lignina peroxidase sofre uma série de alterações oxidativas, incluindo a clivagem e demetilação do anel aromático (CARVALHO *et al.*, 2009; KERSTEN, 2004; KIRK *et al.*, 1987).

Os fungos decompositores da madeira na sua maioria são *Basidiomicetos*, e podem ser classificados em três grupos de acordo com o tipo de degradação que fazem, assim: (I) fungos de podridão branca: capazes de degradar os três componentes da parede celular vegetal (celulose, hemicelulose e lignina). Especialmente eficazes para degradar de maneira seletiva, rápida e extensiva a lignina presente no material vegetal (KIRK T.K., 1987); (II) fungos de podridão parda: degradam as frações polissacarídicas (celulose e hemicelulose); (III) fungos de podridão branda ou macia: podem degradar tanto os polissacarídeos quanto a lignina, porém em velocidades muito reduzidas (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

Os fungos de podridão branca têm um papel central no ciclo global do carbono, e são capazes de produzir diversos tipos de enzimas ligninolíticas com capacidade de catalisar diferentes reações (JAQUELINE *et al.*, 2010). Além de substratos naturais, os fungos da podridão branca são capazes de degradar diversos poluentes recalcitrantes (REDDY, 1995; MCMULLAN, 2001; ESPOSITO & AZEVEDO, 2010), devido à sua capacidade de oxidar compostos aromáticos com estruturas semelhantes ao seu substrato natural, a lignina. A habilidade de degradar compostos fenólicos é utilizada como critério para identificação de fungos de degradação branca verdadeiros (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

No presente trabalho utilizamos dois gêneros de fungos *Basidiomicetos*, a saber: *Pleurotus* e *Ganoderma*.

O gênero *Pleurotus* é parte do reino *Fungi*; filo: *Basidiomycota*; classe: *Agaricomycetes*; ordem: *Agaricales* e da família: *Pleurotaceae*. Tem um potencial biotecnológico promissor incluindo a produção de enzimas lignolíticas, além de beta-glucanas e proteínas de baixo peso molecular (ANDRINO *et al.*, 2011). O gênero inclui espécies comestíveis e medicinais. Na natureza, o fungo pertence ao grupo dos fungos de podridão branca crescendo em madeira morta, mas pode ser cultivada artificialmente em resíduos agrícolas (cascas de café, serragem de eucalipto, carolos de milho e bagaço de cana). A utilização destes resíduos depende da capacidade do fungo para a produção do complexo de enzimas lignocelulolíticas. O complexo inclui a oxidação pelas enzimas lacase (Lac), lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP), que estão envolvidas na degradação da lignina, a xilanase e celulase, que estão envolvidas na degradação da celulose e hemicelulose (RODRIGUES J M., 2012). A degradação eficiente da lignina não precisa de nenhum tipo de pré-tratamento químico ou biológico, fazendo com que uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos possam ser usados e reciclados como substrato para o crescimento de estas espécies fúngicas (MENDOZA, 2009).

O gênero *Ganoderma* é parte do reino *Fungi*; filo: *Basidiomycota*; classe: *Agaricomycetes*; ordem: *Polyporales*; família: *Ganodermataceae*. É um fungo com grande importância econômica e também usado na medicina tradicional na Ásia. Seu uso na medicina se deve às suas propriedades de produção de componentes biologicamente ativos como os triterpenóides e polissacarídeos (SUDHA H. *et al.*, 2013), com efeitos potencialmente antitumorais, imuno-regulatórios, antioxidantes, hipoglicêmicos, antibacterianos, antivirais, antifúngicos e redutores de colesterol (JOO SS, 2008; YUEN JW, 2005; SANODIYA BS, 2009).

A família *Ganodermataceae*, tem aproximadamente 219 espécies descritas e encontradas em todo o mundo. As suas características morfológicas estão sujeitas à alteração resultante nas diferenças de cultivo e também da variabilidade genética natural de espécies individuais, o que torna este grupo pleomórfico (SUDHA H. *et al.*, 2013).

A importância do gênero *Ganoderma* na indústria dá-se pela produção de enzimas que degradam componentes como a lignina e celulose. Existe um significativo interesse na investigação científica para aproveitar o poder destas enzimas, em processos como a

biopolpação ou na biorremediação no tratamento de efluentes contaminados (RIGAS *et al.*, 2007).

## **2.4 Meios e métodos de cultura, substratos e matriz para imobilização**

Um dos grandes desafios das indústrias de biotecnologia é desenvolver procedimentos que resultem no aumento da produtividade das enzimas e o seu tempo de meia-vida, requisitos indispensáveis para proporcionar a produção em larga escala e a preparação econômica viável (DATTA *et al.*, 2013).

Diversos fatores afetam a produção de enzimas ligninolíticas, como o tipo de sistema de produção usado, suas características acessórias como a velocidade de crescimento, produção de biomassa e o tipo de meio de cultura (TIEN & KIRK, 1983; REGINA *et al.* 2009).

### **2.4.1 Sistemas de produção de enzimas, fermentação em estado sólido (SSF) vs fermentação submersa (SmF)**

Entre os métodos de produção de enzimas, os sistemas podem ser divididos em dois tipos: fermentação em estado sólido (SSF) e a fermentação submersa (SmF). A SSF pode ser definida como um processo de fermentação onde os microrganismos crescem em um suporte sólido em ausência ou quase ausência de água livre, com suportes naturais que atuarão concomitantemente, como fontes de carbono e como plataforma de crescimento do microrganismo. Já a SmF é uma técnica realizada com o crescimento de microrganismos em meio líquido rico em nutrientes e com uma moderada concentração de oxigênio, sendo esta a metodologia usada em escala industrial seja em crescimentos contínuos ou em bateladas (PANDEY *et al.*, 2000; CASTRO, 2010; COUTO; TOCA-HERRERA, 2007).

O uso da SmF em escala industrial permite a purificação das moléculas de interesse e é facilitada pela ausência ou baixa concentração de partículas de substrato, o alto teor de água e a natureza diluída do meio que facilitam o controle da temperatura de cultivo. A SmF, na maioria das vezes resulta em crescimentos descontrolados do micélio, o qual influencia na transferência de massa, na taxa metabólica e na secreção do produto de interesse, sendo

este um impasse que pode ser superado pela imobilização dos fungos produtores em suportes sólidos (NILADEVI; PREMA, 2008; PANDEY *et al.*, 2000).

A fermentação submersa é uma metodologia que também permite o aproveitamento das propriedades de outras metodologias, como o uso de resíduos agroindustriais, que podem atuar como fonte de carbono ou mesmo como indutores da produção enzimática (NILADEVI; PREMA, 2008).

#### **2.4.2 Substrato**

O uso de indutores para estimular a síntese de enzimas ligninolíticas vem sendo um campo novo com relação ao seu uso em meios submergidos. Já o uso de resíduos agroindustriais foi principalmente direcionado à fermentação em estado sólido (SSF), sendo atribuídas a seu uso as vantagens de este tipo de fermentação (PANDEY *et al.* 2000; NILADEVI; PREMA, 2008).

No contexto brasileiro, substratos como bagaço de cana-de-açúcar, farelo de arroz, bagaço de mandioca, serragem, sabugo de milho e farelo de aveia, entre outros, possuem potencial biotecnológico e podem ser usados em meios de cultura, atuando como substratos, pois estão disponíveis em grandes quantidades e têm custo reduzido (REGINA *et al.* 2009). Um substrato alternativo que tem despertado interesse é a torta de pinhão-manso (*Jatropha curcas*). A cultura desta oleaginosa tem papel de destaque na produção de óleos combustíveis e o uso industrial de seus resíduos é de interesse econômico e ambiental (DABDOUB, 2009; PANDEY *et al.* 2000).

#### **2.4.3 Imobilização**

A imobilização é uma metodologia útil na fermentação submersa já que permite o melhor controle sobre o crescimento celular. A imobilização de microorganismos pode ser definida como qualquer técnica que limite a livre migração das células (COUTO & TOCA-HERRERA, 2007). Vale a pena ressaltar, no que tange à imobilização, que as células de fungos imobilizadas têm várias vantagens sobre as células dispersas, assim, os sistemas onde é usada a imobilização são mais resistentes a mudanças de pH, à presença de agentes tóxicos no meio, tem um nível mais elevado de atividade e permitem a fácil separação das

células do meio líquido; tornando possível o crescimento nos meios de cultura em lotes ou de forma contínua, simplificando todos os processos de operação (COUTO; TOCA-HERRERA, 2007).

Técnicas de imobilização de fungos em diferentes tipos de materiais estão disponíveis, entre eles suportes porosos e biodegradáveis como géis, polímeros naturais, como o alginato, até outros sintéticos como espumas de poliuretano ou de nylon. O uso desses materiais permite a combinação das propriedades físicas da matriz e as propriedades bioquímicas dos fungos e suas enzimas (FERNANDEZ *et al.*, 2009).

Com o surgimento de novos materiais nanoestruturados novas possibilidades de aplicação estão sendo desenvolvidas, onde os atributos deste tipo de materiais são uma peça chave no desenvolvimento de sistemas eficientes e de uso viável na indústria. Neste trabalho, usa-se um novo exemplo de material nanoestruturado, a Vermiculita com Nanotubos de Carbono, um material que articula às características de alguns suportes já usados como a porosidade, uma propriedade natural da vermiculita, com as características dos nanotubos de carbono, como a sua hidrofobicidade. Esta combinação pode fazer deste material uma ótima opção como suporte de imobilização útil em crescimentos feitos usando a fermentação submersa.

A seguir, descreveremos as características de cada um dos componentes, tanto da vermiculita quanto dos nanotubos de carbono e, por fim, do material conjugado, a vermiculita com nanotubos de carbono.

#### **2.4.3.1 Vermiculita:**

Segundo Saldanha (2014, PP 5) a vermiculita é:

*“um mineral pertencente à classe dos silicatos, à família dos filossilicatos e ao grupo das micas. Sua estrutura apresenta uma camada octaédrica entre duas camadas tetraédricas. Os vértices dos grupos tetraédricos e octaédricos são compostos por íons hidroxila e átomos ou íons oxigênio, que estão ao redor de pequenos cátions interlamelares. Esses cátions, por possuírem apreciáveis entalpias de hidratação, são facilmente hidratados, atribuindo à vermiculita, características hidrofílicas. Entre os cátions interlamelares substituíveis estão o  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Na^{+}$  e  $K^{+}$ .*

A camada octaédrica é composta por  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  ou  $Fe^{3+}$ ,  $Al^{3+}$  e a camada tetraédrica constituída por Si e Al' (Figura 1)

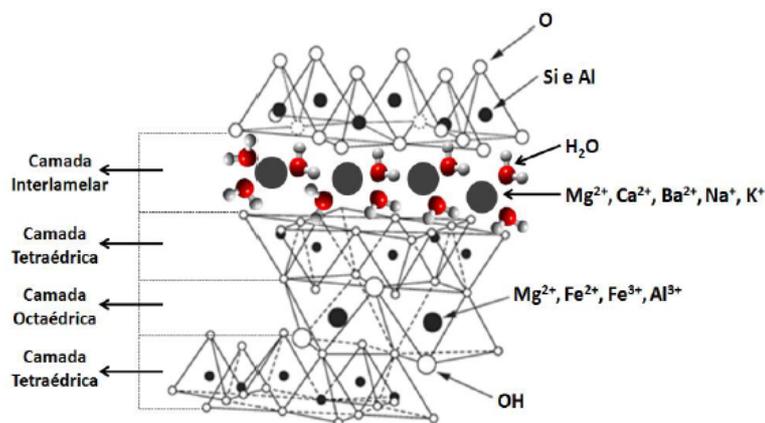


Figura 1 Esquema estrutural da vermiculita (SALDANHA, 2014)

Os atributos da vermiculita quando expandida são: baixa densidade e alta capacidade de isolamento térmico, acústico e elétrico, não se decompõe ou se deteriora, não é prejudicial à saúde, e também é lubrificante. Além disso, pode absorver normalmente até cinco vezes sua massa em água devido aos espaços interlamelares presentes na sua estrutura quando tratada termicamente a 750-850 °C (vermiculita esfoliada) (SALDANHA, 2014).

#### 2.4.3.2 Nanotubos de carbono

Foram descobertos em 1991 por Iijima e consistem de minúsculos cilindros de grafite, fechados ou não, em cada uma das extremidades (IJJIMA, 1991). Geralmente os nanotubos podem ser divididos em duas categorias: nanotubos de carbono de parede única (SWNTS) com diâmetro entre 1 e 2 nm e nanotubos de carbono de parede múltipla (MWNTS) com diâmetro entre 2 a 25 nm dependendo do número de camadas concêntricas de nanotubos (LEE *et al.*, 2006; GONG *et al.*, 2005; LUO *et al.*, 2001).

Os nanotubos de carbono são um tipo de nanomaterial com propriedades estruturais, eletrônicas e mecânicas únicas, sendo um dos materiais mais duros e resistentes, destacam-se pela sua elevada flexibilidade e resistência a danos quando dobrados ou submetidos à alta pressão isto quando não existem defeitos na sua estrutura (LEE *et al.*, 2006; JOSHI *et al.*, 2006, OLIVEIRA, 2009). Além disso, os NTC recentemente têm ganhado destaque na

formação de sistemas híbridos como no caso da vermiculita com NTC. (SALDANHA, 2014)

#### **2.4.3.3 Vermiculita com nanotubos de carbono**

É um sistema híbrido recentemente desenvolvido, magnético e anfifílico onde as características hidrofílicas são cedidas pela vermiculita e as hidrofóbicas pelos nanotubos de carbono. Este composto foi desenvolvido e amplamente estudado pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Rochel Montero Lago do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais. O material foi sintetizado usando a metodologia CVD (Chemical Vapor Deposition) um método de produção de NTC que é prático, econômico e permite a produção de grandes quantidades de material. (PURCENO *et al.*, 2011)

O método CVD para este caso consiste na deposição catalítica de uma fonte de carbono (etileno metanol, etanol e tolueno) sobre um suporte termicamente estável (vermiculita). Os catalisadores devem estar dispersos no suporte e normalmente são nanopartículas de metais de transição, como ferro, níquel e cobalto. Em alguns casos pode-se fazer uma impregnação ou precipitação de sais metálicos catalisadores no suporte, o que leva a um enriquecimento sobre o material. Este processo é seguido de uma calcinação. Normalmente, o CVD é realizado em temperaturas entre 500 e 1200 °C (SALDANHA, 2014).

O caráter magnético do material deve-se ao efeito das altas temperaturas durante o CVD que leva à oxidação do ferro (II) a ferro (III), que é um constituinte natural da vermiculita. (SALDANHA, 2014).

A vermiculita com nanotubos de carbono é uma excelente matriz para fixação de espécies fúngicas pelas suas ótimas características estruturais, que podem ser exploradas tanto na imobilização quanto no desenvolvimento de um futuro biorreator. No entanto, se faz necessário corroborar os efeitos que estes materiais podem ter sobre o crescimento fúngico, até agora desconhecidos para as espécies fúngicas aqui avaliadas.

### 3. JUSTIFICATIVA

Em diferentes áreas da biotecnologia são utilizados microrganismos com a finalidade de aproveitar suas atividades catalíticas naturais, fazendo do tratamento enzimático uma promissora alternativa em múltiplos processos industriais e de biorremediação. Assim, pesquisas que objetivam a produção de enzimas em grande escala com potencial despoluente merecem destaque, não só no mercado, mais também em modelos de desenvolvimento sustentável.

A lignina peroxidase ganha destaque pela sua atividade sobre poluentes orgânicos, frequentemente tóxicos e resistentes à degradação. Esta enzima é capaz de quebrar as cadeias aromáticas e fazer rearranjos intramoleculares, o que aumenta o seu valor industrial e ambiental. A sua produção em grande escala tem sido difícil e custosa, problema que tem que ser resolvido visando o aproveitamento de todos os benefícios que esta enzima pode oferecer ao mercado e ao meio ambiente.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de lignina peroxidase em diferentes meios de cultura, assim como a sua atividade na curva de crescimento de fungos filamentosos com relação aos diversos suportes de vermiculita sem e com nanotubos de carbono. No futuro, estes dados permitirão desenvolver um sistema bifásico de alta eficiência, empregando os melhores fungos *Basidiomicetos* imobilizados avaliados nas melhores condições, que a sua vez estarão unidos magneticamente às paredes de um biorreator.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

- Avaliar o crescimento e produção de lignina peroxidase por parte de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor* e *Ganoderma lucidum*, imobilizados ou não a vermiculita com e sem nanotubos de carbono.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Determinar a possibilidade do uso da vermiculita com nanotubos de carbono como suporte para o crescimento de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor* e *Ganoderma lucidum*.
- Avaliar a produção da enzima LiP em diferentes meios de cultura.
- Determinar a produção da enzima Lignina Peroxidase por *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor* e *Ganoderma lucidum*, imobilizados em vermiculita com nanotubos de carbono ao longo da curva de crescimento.
- Avaliar a capacidade de descoloração dos extratos enzimáticos com maior atividade enzimática.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizadas a infraestrutura do Laboratório de Mecanismos Gerais de Infecções Fúngicas, do Departamento de Microbiologia - ICB/UFMG; do Laboratório de Nanomateriais do departamento da física, ICEX, UFMG; Laboratório Química Inorgânica, Departamento da Química, UFMG; Laboratório de Materiais Poliméricos Multicomponentes, Departamento da Química, UFMG. As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no Centro de Microscopia da UFMG.

A descrição do material e métodos foi dividido em quatro itens: (I) Espécies fúngicas, Meios de cultura, Suportes e Caracterização dos suportes (II) Tratamentos e testes (III) Crescimento.

### **5.1 Espécies fúngicas, meios de cultura, suportes e caracterização dos suportes.**

#### **5.1.1 Espécies fúngicas**

Três espécies fúngicas foram testadas sendo elas *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor* e *Ganoderma lucidum*, gentilmente cedidas pela professora Dra. Catarina Megumi Kasuya da Universidade Federal de Viçosa, todos eles *Basidiomycetes* de podridão branca. Os fungos foram crescidos e mantidos em placas de Petri contendo Batata-Dextrose Agar (BDA), pH 4,5 a 26 °C. Os isolados foram denominados PLO13 e PLO9 para as espécies de *Pleurotus* e GM117 para a espécie de *Ganoderma*. Todos foram conservadas em geladeira a 4 °C.

#### **5.1.2 Meios de cultura**

##### ***Caldo batata dextrose***

200g de batatas fatiadas foram colocadas em 500 mL de água destilada e fervido por 5 min. O caldo foi filtrado e acrescido de 20 g de glicose, para volume final de 1L. O preparado foi autoclavado por 15 min a 121 °C, apresentando pH entre 6,0 e 6,6.

##### ***Caldo batata com Torta de Pinhão Manso***

Caldo batata com adição de 10% de torta de pinhão manso, com pH entre 6,0 e 7,0.

Para a melhor espécie fúngica capaz de produzir a enzima lignina peroxidase, na presença da torta de pinhão manso em caldo batata, usou-se diferentes porcentagens do indutor (5% 10% e 15%), isto para avaliar o comportamento da produção da enzima segundo a percentualidade da torta de pinhão manso.

#### ***Solução salina com glicose e torta de pinhão manso***

À solução salina 0,85%, foi adicionado 1% de glicose e torta de pinhão manso 10%, com pH entre 6,0 e 7,0.

#### ***Meio mineral Pontecorvo completo descrito por Destefano, 2003***

Como meio mineral, foi utilizado o meio Pontecorvo contendo para 500 ml: 3 g de nitrato de sódio, (NaNO<sub>3</sub>), 0,26 g de cloreto de potássio (KCl), 0,26 g de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), 0,77 g de fosfato monobásico de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 5,0 g glicose (ou Dextrose), 0,005g de sulfato de ferro (FeSO<sub>4</sub>), 0,005g sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>), 1,00 g de peptona, 0,25 g extrato de levedura, 0,75 g de caseína hidrolisada, 500 mL de água destilada. Adicionalmente, foram acrescidos 0,5 mL de solução de vitaminas contendo: ácido nicotínico 100 mg, ácido p-aminobenzóico 10 mg, tiamina (Aneurina) 50 mg, biotina 0,2 mg, piridoxina (Cloridrato) 50 mg, riboflavina 100 mg, água destilada 100 mL. O pH do meio esteve entre 5,5 e 6,0.

### **5.1.3 Suportes**

Como suporte para o crescimento fúngico, foram utilizados: vermiculita sem NTC (controle negativo), e com NTC Ref.: ICEX, Ref.:17062015 e Ref.: 24062015.

#### ***VERMICULITA SEM NTC***

A vermiculita expandida sem nanotubos de carbono, com granulometria 2/3, foi adquirida na empresa Vermiculita do Brasil, marca Izo Flok.

#### ***VERMICULITA COM NTC***

Os lotes de vermiculita com nanotubos de carbono foram sintetizados e assim denominados:

**VERMICULITA REF.-ICEX:** cedido gentilmente pelo Dr. Rochel Montero Lago, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais e sintetizado por deposição química da fase vapor (CVD) ao partir de etanol.

**VERMICULITA REF.:17062015:** sintetizado a partir de vermiculita comercial 2/3 (Izo Flok – Vermiculita do Brasil) pelo processo CVD usando o etanol como fonte de carbono, nas dependências do laboratório do Dr Rochel Montero Lago.

**VERMICULITA REF.: 24062015:** sintetizado a partir de vermiculita comercial 2/3 (Izo Flok – Vermiculita do Brasil) previamente impregnadas com sais de ferro e de cobalto e submetidos ao método CVD no Laboratório de Nanomateriais Icx-UFMG.

#### **5.1.4 Caracterização dos suportes**

A caracterização das vermiculitas foi realizada através das técnicas de Análise Termogravimétrica e Térmica Diferencial (TGA-DTA), Espectroscopia Raman, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).

A TGA-DTA que é uma análise que permite detectar a variação da massa das vermiculita em função da temperatura, permitindo a identificação dos componentes da amostra e a análise da pureza, esta análise foi realizada no equipamento TGA-TA Instruments, modelo Q5000 do Laboratório Materiais Poliméricos Multicomponentes, utilizando como atmosfera o ar, com taxa de fluxo de 100 mL/min, razão de aquecimento de 10 °C por min, atingindo a temperatura máxima de 900 °C. Foram pesados aproximadamente 3 mg de vermiculita para cada análise.

A espectroscopia Raman é uma metodologia que permite evidenciar as regiões espectrais segundo a composição de cada material, foi realizada no laboratório de Espectroscopia Raman do Departamento da Física de UFMG, utilizando um espectrômetro Andor Technology Sharmrock303i. Para excitar a amostra utilizou-se o laser no comprimento de onda de 633-773 nm com potência de 1,50mW. Por questões técnicas, uma amostra foi feita no espectrômetro Raman Bruker Senterra, usando o laser 633 nm com potência de 2 mW do Departamento de Química da UFMG.

A MEV e a EDS foram realizadas no Microscópio Eletrônico de Varredura FIB - Quanta FEG 3D FEI, do Centro de Microscopia da UFMG.

## 5.2 Tratamentos e Testes

### 5.2.1 Descoloração do corante Azul de Remazol Brilhante R (RBBR) na avaliação da produção de peroxidases em cultura sólida

Foram feitos testes para avaliar a capacidade de descoloração por partes das isolados fúngicos, sendo este um indicativo da produção de peroxidases degradadoras de lignina usando o corante Azul de Remazol Brilhante R (RBBR) comumente utilizado para este tipo de *screening qualitativo*.

A avaliação da produção de peroxidases em cultura sólida, foi feita usando o corante polimérico Azul de Remazol Brilhante R (RBBR). Neste teste, a taxa de descoloração do corante foi avaliada em placas de Agar BDA, determinando o índice enzimático para cada uma das espécies fúngicas segundo o diâmetro do halo formado ao redor dos crescimentos.

Em Erlenmeyers de 500 mL foi preparado 250 mL de Batata-Dextrose Agar (BDA), autoclavado e adicionado 0,05% do corante azul de Remazol Brilhante e vertido em placas de Petri para 25 mL do meio por placa.

Explantos de cada espécie fúngica foram transferidos para as placas com o corante e mantidos a 26 °C, protegidos da luz.

Após 5 e 10 dias de crescimento as placas foram avaliadas através do cálculo do índice enzimático  $-IE-$ , (*Equação 1*):

#### *Equação 1 Cálculo índice enzimático*

$$IE = \frac{\text{Diâmetro da colônia (mm)}}{\text{Diâmetro do halo formado (mm)}}$$

### 5.2.2 Imobilização e produção enzimática

Os isolados fúngicos foram imobilizados nos diferentes suportes sendo marcados com um "X" (Tabela 2), sendo que para cada caso foi usado um meio de cultura específico indicado

com os números de 1 a 4 como se observa na mesma, isto de forma condensada, já que posteriormente serão descritos cada um dos tratamentos e testes feitos de forma detalhada. Foi usado como critério de exposição de cada isolado aos diferentes tipos de vermiculita, a quantidade de material de um mesmo lote que se tinha a disposição.

<b>Esécie</b> \ <b>Suporte</b>	<b>Vermiculita Sem NTC</b>	<b>Ref. ICEX</b>	<b>Ref.17062015</b>	<b>Ref. 24062015</b>
<b>PLO9</b>	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>1234</sup>	
<b>PLO13</b>	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>1234</sup>	X <sup>4</sup>
<b>GM117</b>	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>1234</sup>	

*Tabela 2 Quadro indicando os tipos de suportes usados frente às diferentes linhagens e meios de cultura. Os números no sobrescrito indicam o meio de cultura utilizado assim: Caldo batata<sup>1</sup> - Pontecorvo completo<sup>2</sup> - Solução salina com glicose e torta de pinhão manso<sup>3</sup> - Caldo batata com torta de pinhão manso<sup>4</sup>*

Assim, os isolados PLO9, GM117 e PLO13 foram imobilizados nos suportes Vermiculita sem NTC, Vermiculita ICEX e Vermiculita Ref.17062015 e incubados no meio BDA. Estes isolados também foram incubados nos meios Pontecorvo, solução salina com glicose e torta de pinhão manso e BDA com torta de pinhão manso. Adicionalmente considerando a quantidade do material e os resultados obtidos do crescimento e produção enzimática do isolado PLO13, este também foi imobilizado em Vermiculita Ref..24062015 e incubado em meio BDA acrescido de torta de Pinhão manso.

#### ***5.2.2.1 Avaliação inicial da imobilização e crescimento de PLO9, PLO13 e GM117 em vermiculita sem NTC e vermiculita Ref. ICEX.***

Explantos dos diferentes isolados fúngicos foram usados como inóculo. Os fungos foram crescidos em meio BDA a 26 °C por 10 dias. Após o crescimento, foram retirados fragmentos do crescimento micelial e transferidos para tubos de cultura com vermiculita.

Os tubos continham 3 mL de caldo batata, acrescidos de 0,5 g de vermiculita -vermiculita sem NTC ou a vermiculita Ref.:ICEX- e foram inoculados com cada um dos isolados fúngicos. Os tubos foram preparados em triplicata e mantidos por 10 dias a uma temperatura de 26 °C com agitação manual vigorosa uma vez por dia.

Observou-se a formação de grumos no meio, que foi confirmada pela observação microscópica de estruturas fúngicas nas preparações após a coloração das amostras com azul de algodão em lactofenol, por microscopia óptica (Olympus BX41).

#### ***5.2.2.2 Avaliação inicial da produção de lignina peroxidase por parte das espécies PLO9, PLO13 e GM117 em caldo batata imobilizadas na vermiculita Ref. ICEX***

Os fungos foram crescidos em meio BDA a 26 °C por 10 dias. Após o crescimento, foram retirados discos de 1 cm de diâmetro de meio de cultura contendo micélio fúngico e transferidos para frascos de Erlenmeyer de 250 mL com vermiculita Ref. ICEX.

Aos frascos Erlenmeyer de 250 mL antes de receber o inóculo foram adicionados 3g de vermiculita Ref. ICEX, os recipientes foram tampados com tampões de gaze e algodão presos com elásticos e cobertos com coifas de papel, a seguir foram autoclavados por 30 min a 120 °C e depois levados para estufa a 50 °C por 24 horas para secagem do material. Foram adicionados 150 mL de caldo batata, resfriados os meios estavam prontos para receber 3 discos de micélio de 1cm de diâmetro de cada uma das espécies fúngicas para cada erlenmeyer.

Os cultivos foram incubados durante 10 dias sob agitação de 140 rpm a 26 °C, em incubadora refrigerada com agitação (TECNAL TE 421) sobre proteção da luz. Durante todos os dias 1 mL do meio de cultura contendo os diferentes extratos brutos foram coletados e filtrados através de filtro de porosidade de 0,22 µm da Millipore, para posterior estimativa da atividade enzimática de lignina peroxidase, este processo sempre foi feito para todos os testes. A avaliação da produção de lignina peroxidase foi feita avaliando-se a atividade enzimática para cada extrato.

### ***Determinação da atividade enzimática***

A atividade da lignina peroxidase foi determinada por espectrofotometria (Espectrofotômetro Hitachi U1100) a 310 nm, conforme descrito por Tien & Kirk (1983). O volume de reação do ensaio foi adaptado para leitura em placa de Elisa (UV Plate 96 well da Costar Corning). As seguintes quantidades foram usadas: 100 µl de tampão tartarato (100 mM, pH 3,5), 100 µl de álcool veratrílico (4 mM), 50 µL de peróxido de hidrogênio (0,2 M) e 10µL do extrato enzimático.

O volume de reação foi incubado por 5 min a 37 °C para posterior leitura no espectrofotômetro.

A atividade de LiP foi expressa em unidade (U) por mL. Uma unidade (U) de LiP foi definida como a quantidade de enzima requerida para oxidar 1µmol de álcool veratrílico em 1 min, pH 3,5 a 37°C (TIEN & KIRK, 1983).

### ***5.2.2.3 Cultivo das espécies fúngicas para a produção de Lignina peroxidase em diferentes meios de cultura, imobilizados na vermiculita Ref.:17062015.***

Os isolados PLO9, PLO13 e GM117 foram crescidos nos seguintes meios de cultura: I) caldo batata, um meio de cultura natural simples; II) o caldo batata com indutor –torta de pinhão manso-, solução salina, torta de pinhão manso e glicose; III) meio mineral Pontecorvo completo. Todos eles imobilizados na vermiculita Ref.:17062015.

A frascos de Erlenmeyer de 50 mL foi adicionado 1 g de vermiculita Ref.. 17062015, os frascos foram tampados com tampões de gaze e algodão, que foram presos com elásticos e cobertos com coifas de papel. A seguir, os frascos foram autoclavados por 30 min a 120 °C e depois levados para estufa a 50 °C por 24 h para secagem do material. Após adicionou-se 25 mL do meio de cultura. A seguir, resfriados os meios, estavam prontos para receber 1 disco de 1 cm contendo o micélio do isolado fúngico.

Todos os testes foram feitos em triplicata junto com um controle negativo ou abiótico o qual não tinha inóculo fúngico. Os frascos contendo os isolados foram incubados durante

20 dias sob agitação de 140 RPM a 26 °C, em incubadora refrigerada com agitação (TECNAL TE 421) sobre proteção da luz.

Durante todos os dias 1 mL do meio de cultura contendo os diferentes extratos brutos foram coletados e filtrados através de filtro de porosidade de 0,22 µm da Millipore, para posterior estimativa da atividade enzimática de lignina peroxidase.

#### ***5.2.2.4 Confirmação da produção de peroxidases nos extratos com atividade enzimática para lignina peroxidase, pela descoloração do corante Azul Brillante de Remazol R (RBBR)***

Para confirmar a presença da enzima lignina peroxidase e sua eficiência na descoloração, o teste colorimétrico descrito por QI-HE *et al* (2011) foi usado, utilizando o corante Azul Brillante de Remazol R (RBBR) da Sigma-Aldrich.

A solução de reação continha: Tampão Tartarato 100 mM, pH 3,5, peróxido de hidrogênio 0,2 M, corante RBBR com uma concentração do estoque de 0,2g/L e o extrato enzimático com a LiP em volume constante de 10 µl para um volume final de 320 µl em placa de Elisa. Uma curva padrão foi determinada usando concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 mg/L do corante RBBR foi usada para a interpolação dos dados obtidos.

As placas foram mantidas a temperatura ambiente por 5 min e lidas a 600 nm por espectrofotometria (Espectrofotômetro Hitachi U1100). Os valores de cálculo da porcentagem de descoloração foram estimados pela equação 2:

#### ***Equação 2 Porcentagem de descoloração***

$$Descoloração = \left( \frac{(i) - (f)}{(i)} \right) * 100$$

Onde **Abs i** é a absorbância inicial e a **Abs f** é a absorbância final (GÜL, 2013).

### ***5.2.2.5 Cultivo e seleção da melhor espécie fúngica produtora da enzima Lignina peroxidase na vermiculita Ref. :24062015***

Após avaliação da produção enzimática nos quatro meios de cultura, foi selecionado o melhor meio de cultura com a respectiva espécie fúngica que apresentara a maior produção enzimática. O crescimento foi feito mantendo as mesmas condições iniciais, mais usando como suporte de imobilização a vermiculita Ref.:24062015.

## **5.3 Determinação do Crescimento**

### **5.3.1 Determinação do crescimento de PLO9, PLO13 e GM117 no meio onde se apresenta a mais alta atividade enzimática de lignina peroxidase sobre a vermiculita Ref. 17062015**

A quantidade de biomassa foi estimada pela quantidade de ergosterol presente nos tratamentos. Este teste de crescimento foi feito seguindo as mesmas condições de cultura, volume, e esterilização que as usadas para os cultivos que foram anteriormente feitos para avaliar a produção de lignina peroxidase. Para os testes aqui feitos de crescimento, foi escolhido o meio de cultura onde se apresenta a maior atividade enzimática para cada isolado quando imobilizados na vermiculita Ref. 17062015, o critério de eleição de esta vermiculita foi devido à maior quantidade do material de um mesmo lote. Assim, foram preparados 60 Erlenmeyers por espécie para 20 dias de crescimento. Cada frasco foi preparado com 1 g de vermiculita, e 2,5 g de torta de pinhão manso, e 25 mL do meio de cultura correspondente. Posteriormente, foram inoculados com 1 inóculo de cada um dos isolados fúngicos e mantidos em agitação de 140 RPM a 26 °C, em incubadora refrigerada (TECNAL TE 421) sobre proteção da luz,

Os experimentos foram feitos em triplicata. Durante cada um dos 20 dias foram retirados 3 Erlenmeyers de cada espécie e um controle negativo (sem inóculo fúngico), a massa total de cada Erlenmeyer foi filtrado em pano multiusos da Scotch-Brite 3M, da fração retida, foi pesado 1 g e posteriormente submetida à extração alcalina.

### **Extração alcalina de ergosterol**

Foi usado o método de extração alcalina descrito por De Ridder-Duine *et. al.* (2006) com algumas modificações:

Aproximadamente, um grama da fração retida foi adicionada a um tubo de centrífuga com tampa de rosca de 15 mL de polipropileno (Kasvi) contendo 3 mL de solução etanólica com KOH 25%. Após agitação em vórtex por 10s e ultrassom 10 min (Ultracleaner 1400 Unique) os tubos de centrifuga foram colocados num banho de água a 70 °C durante 90 min, em seguida resfriados até a temperatura ambiente.

Após o tratamento térmico e a subsequente adição de 1 mL de água destilada e 3 mL de n-heptano (Heptano, Sigma Aldrich), os tubos foram agitados durante 3 min e logo depois centrifugados a 2000 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente (Hitachi Himac CF7D2), a seguir a fase superior (fração de heptano) foi removida e lida a 280 nm conforme descrito por Santos *et al.* (2012). 2 mL das frações de heptano foram coletadas e evaporados durante 24 h num banho de água a 45 °C.

Todas as amostras precipitadas e secas foram estocadas a -20 °C para posterior análise por HPLC. Uma curva padrão para ergosterol foi feita usando ergosterol comercial (Ergosterol  $\geq 95.0\%$  Sigma Aldrich, PM 386,7 g/mol). Os resultados foram expresos em  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

### **Medição de ergosterol por HPLC**

Os precipitados obtidos pela extração alcalina foram dissolvidos em 500  $\mu\text{l}$  de metanol (Metanol grau HPLC, JT Baker) e mantidos em aquecimento a 40 °C durante 15 min, depois filtrado através de um filtro de PTFE com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$  ficando prontas para carregar no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - Shimadzu Prominence LC 20), com os seguintes parâmetros: Coluna fase inversa C18 (2.5mm x 25cm); eluente isocrático metanol Fluxo de 1mL / min (Metanol grau HPLC JT Baker); volume de injeção de amostra nestas condições: 100 $\mu\text{l}$ ; detector UV ajustado a 280 nm A temperatura da coluna foi mantida a 30 °C para um tempo total da corrida de 12 min.

### **5.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de energia Dispersiva (EDS)**

#### ***5.3.2.1 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a imobilização das espécies fúngicas à vermiculita Ref.: 17062015***

Fragmentos dos tratamentos de imobilização após 10 dias de cultura foram coletados e dispostos em tubos Falcon. O meio de cultura foi retirado e as amostras crescidas foram fixadas com tampão fosfato 0,1M pH 7.4 e glutaraldeído 2,5% e tratados com tetraóxido de ósmio e ácido tânico. O material foi posteriormente desidratado e seco em ponto crítico de CO<sub>2</sub>. Para observação do material foi feita uma metalização planetária com ouro.

#### ***5.3.2.2 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a aderência da melhor espécie produtora, usando a vermiculita Ref.: 24062015***

A partir do cultivo da melhor espécie fúngica produtora de LiP na vermiculita Ref. 24062015, as preparações fúngicas foram coletadas e preparadas da mesma forma que a descrita no item anterior para posterior observação da imobilização a través da Microscopia Eletrônica de varredura (MEV).

#### ***5.3.2.3 Espectroscopia de energia Dispersiva EDS***

Para algumas amostras se fez um análise do espectro de energia dispersiva EDS sobre diversos pontos no material, usando o Microscópio Eletrônico de Varredura FIB - Quanta FEG 3D FEI, do centro de microscopia da UFMG para avaliação da composição elementar da amostra.

## **5.4 ESTATÍSTICA**

Os testes de atividade enzimática e crescimento foram feitos com 3 réplicas, para todos os casos foi feito um controle negativo ou abiótico, aos valores obtidos para as amostras sempre foi subtraído do valor de controle abiótico para análise. Para a esquematização dos gráficos foi usado o programa SigmaPlot 10.0. Realizou-se uma análise estatística

descritiva usando a média e o desvio padrão para cada uma das amostras na avaliação da produção de lignina peroxidase a partir de extratos líquidos para as amostras com maior atividade enzimática e para as curvas de crescimento VS a atividade enzimática em vermiculita sem nanotubos de carbono e com NTC (vermiculita Ref. 17062015.)

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 Suportes e caracterização dos suportes**

#### **6.1.1 Suportes**

##### **Vermiculita Ref. 17062015**

Após o processo de CVD o material teve um ganho de massa de 200 g, tendo um rendimento de 40%, isto se deu pela deposição de estruturas de carbono sobre a vermiculita tendo assim uma massa final total de aproximadamente 700 g de vermiculita Ref. 17062015.

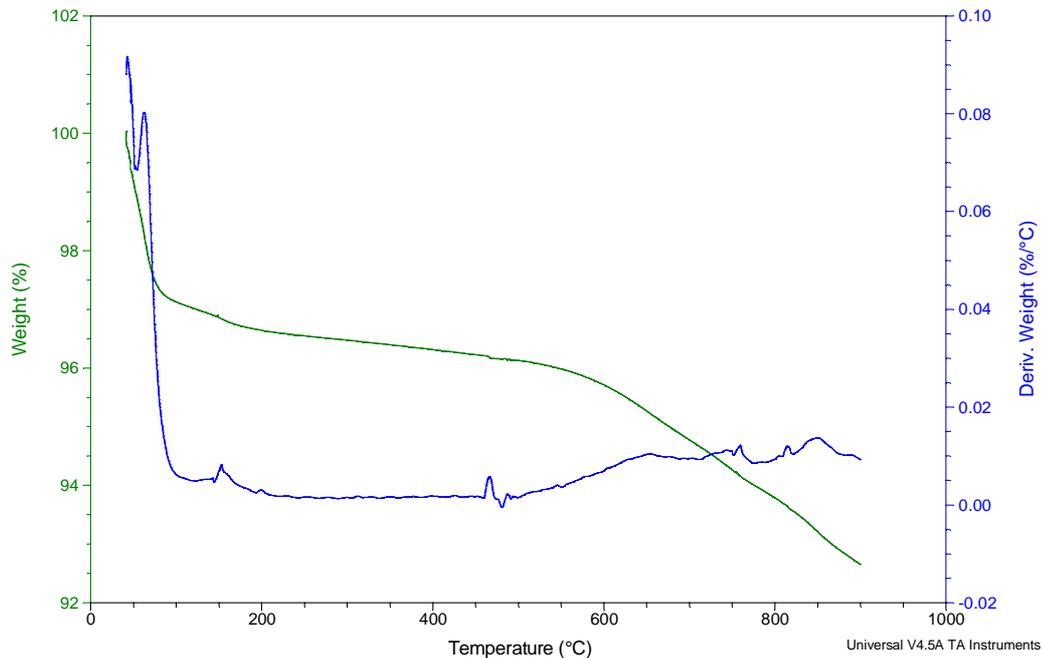
##### **Vermiculita Ref. 24062015**

Após o processo de CVD a vermiculita impregnada com sais de ferro e cobalto, teve um ganho de massa de 3,71 g, obtendo-se um peso final de 5,71 g tendo assim um rendimento após o CVD de 185,5%.

#### **6.1.2 Caracterização físico química dos suportes**

##### ***6.1.2.1 Análise termogravimétrica e térmica diferencial TGA-DTA***

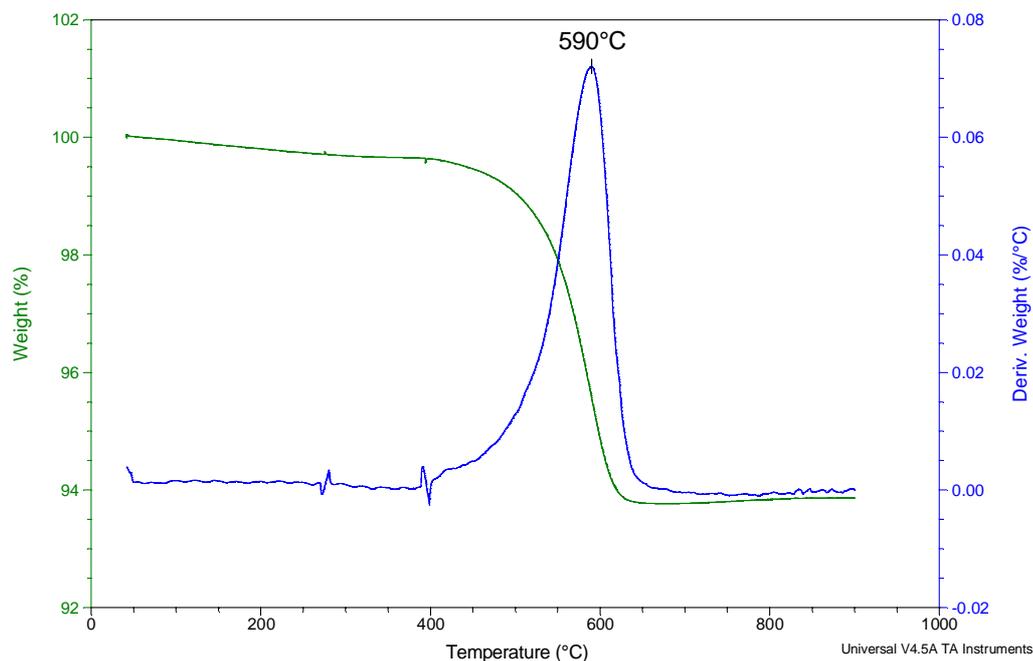
Os gráficos das análises termogravimétricas permitem detectar a variação da massa das vermiculita em função da temperatura, permitindo a identificação dos componentes da amostra e a análise da pureza, assim: observa-se o gráfico obtido para a vermiculita sem nanotubos de carbono (Figura 2), vermiculita Ref. 17062015 (Figura 3), vermiculita depois de impregnada com a ferrita de cobalto (Figura 4), e a vermiculita com sais de ferro e cobalto e NTC após o CVD Ref. 24062015 (Figura 5).



*Figura 2 Análise termogravimétrica e térmica diferencial da Vermiculita sem nanotubos de carbono; em verde a porcentagem de massa e em azul a derivada.*

Nesta figura é possível constatar, uma pequena perda de massa de aproximadamente 3,5% até os 200 °C, e uma mais significativa no intervalo entre 650 °C e 900 °C como evidencia-se pela curva de TGA (verde). Já na curva de DTA (azul) observa-se os picos, correspondentes à temperatura onde houve a perda de massa podendo ser observados picos nos primeiros 100, 150 e 200 °C que correspondem as etapas de desidratação da vermiculita, já picos entre 650 e 900 °C podem estar relacionados à desidroxilação do mineral. (VALÁŠKOVÁ et al.,2012).

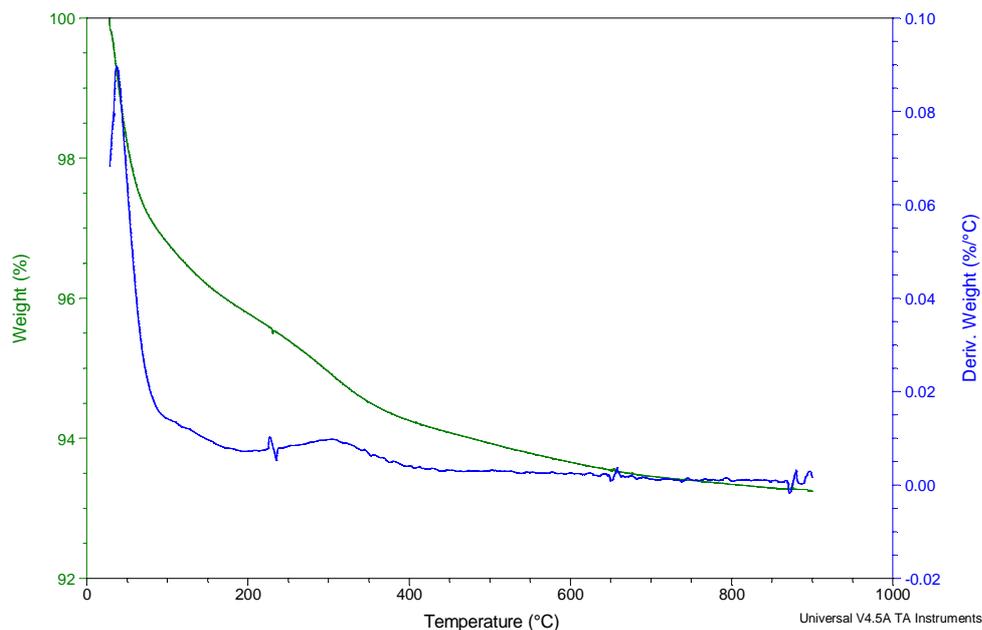
Este resultado mostra que qualquer mudança no ganho ou perda de massa poderá ser atribuído ao processo CVD e não à vermiculita segundo Saldanha, 2014.



*Figura 3 Análise termogravimétrica e térmica diferencial da Vermiculita Ref. 17062015, em verde a porcentagem de massa e em azul a derivada.*

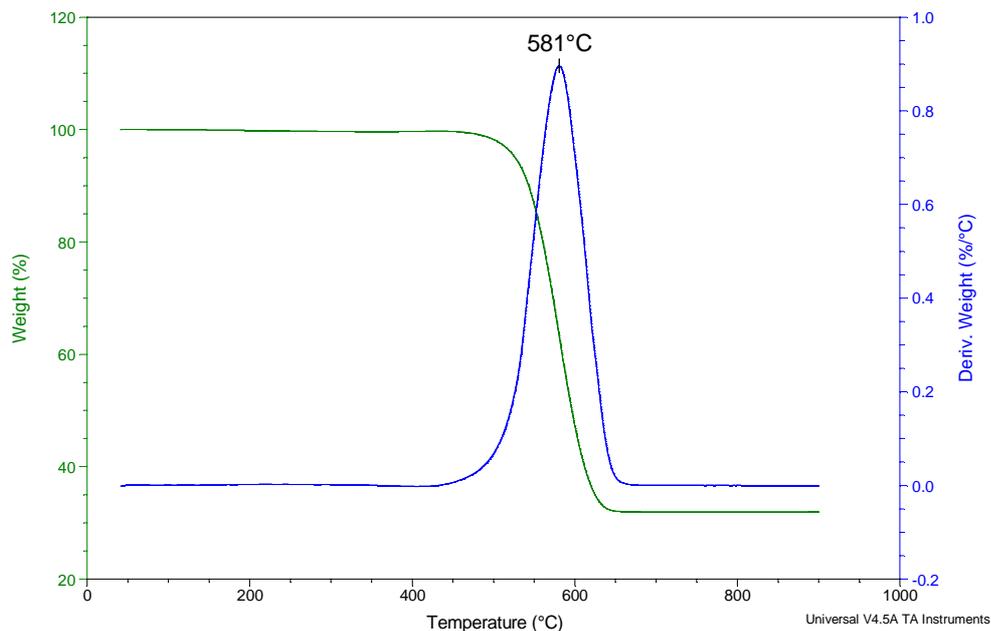
Para a vermiculita Ref. 17062015, como se observa na figura 3, é possível constatar uma pequena perda de massa até os 400 °C, e outra perda de aproximadamente 6% no intervalo entre 450°C a 650°C.

Na curva de DTA (azul), observam-se picos pequenos até os 400 °C, sem uma linearidade entre os 250 e 400°C, o que significa que provavelmente houve perda de massa nessas temperaturas, podendo ser atribuído às etapas de desidratação do material, já que isto também foi observado na vermiculita pura, com alguns deslocamentos de estes picos à esquerda ou à direita. O pico maior que se apresenta na temperatura meia de 590°C, onde houve expressiva perda de massa, coincide com a temperatura onde acontece a degradação do esqueleto de carbono, que é no intervalo entre 500 e 700°C. (AGHABOZORG et al., 2010).



*Figura 4 Análise termogravimétrica e térmica diferencial da vermiculita impregnada com sais de ferro e cobalto, em verde a porcentagem de massa e em azul a derivada.*

Na figura 4, observa-se como na curva TGA (verde), da vermiculita com sais de ferro e cobalto, o declínio da perda de massa é menos acentuado em comparação com a vermiculita pura (ver figura 2). Na curva de DTA (azul) pode-se observar um pico entre 200°C e 400°C, que correspondem conjuntamente a desidratação do material já descrita e às prováveis transformações dos hidróxidos e oxihidróxidos em  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , segundo Camilo (2006).



*Figura 5 Análise termogravimétrica e térmica diferencial da Vermiculita Ref. 24062015, em verde a porcentagem de massa e em azul a derivada.*

No gráfico da vermiculita 24062015 exposto na figura 5, observa-se na curva TGA (verde), uma perda de massa acentuada entre 450 °C e 650 °C; já na curva de DTA (azul) se apresenta um pico único em 581°C, correspondente a temperatura média onde houve a perda de massa, o que evidencia o alto grau de pureza da amostra.

Também nota-se a linearidade da curva TGA, em temperaturas abaixo de 450 °C e acima de 650 °C, a qual significa que não houve perda de massa em temperaturas fora dessa faixa (450 °C e 650 °C) a qual corresponde a queima do esqueleto de carbono (AGHABOZORG et al.,2010).

### **6.1.2.2. Espectroscopia Raman**

O espectro Raman da vermiculita evidencia as regiões espectrais segundo a composição de cada material, assim: observa-se o gráfico para a vermiculita sem NTC (Figura 6); vermiculita Ref. 17062015 (Figura 7); a vermiculita depois de impregnadas com a sais de ferro e cobalto (Figura 8); e a vermiculita Ref. 24062015 com sais de ferro e cobalto e NTC após o CVD (Figura 9).

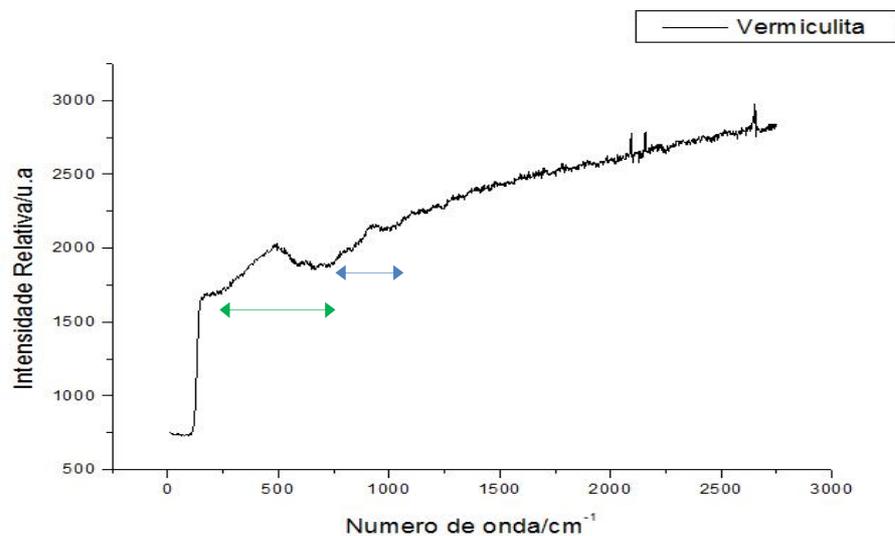


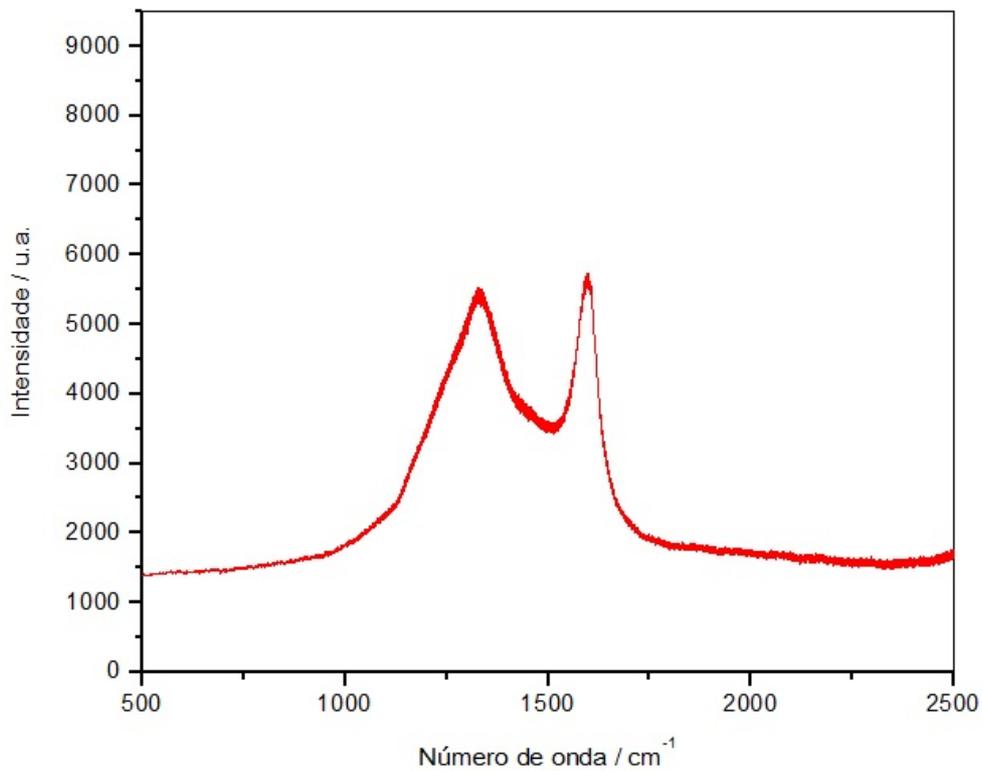
Figura 6 Espectro Raman da vermiculita sem nanotubos de carbono, em verde bandas entre  $250\text{ cm}^{-1}$  e  $750\text{ cm}^{-1}$  e em azul bandas entre  $750\text{ cm}^{-1}$  e  $1100\text{ cm}^{-1}$ .

A partir do gráfico na figura 6 é possível observar a presença de um pico aparente entre os  $250\text{ cm}^{-1}$  e  $750\text{ cm}^{-1}$  que provavelmente correspondem às bandas características da vermiculita descritas por Ritz, M., J. et al.,2014, (Tabela 3) e um pico aproximadamente entre  $750\text{ cm}^{-1}$  e  $1100\text{ cm}^{-1}$ ; este resultado mostra que qualquer mudança com perda o ganho da presença dos picos poderá ser atribuído ao processo CVD e não a vermiculita.

Banda	Atividade
155 $\text{cm}^{-1}$	Está associada à vibração dos cátions interlamelares presentes na estrutura da vermiculita.
410 $\text{cm}^{-1}$	Atribuída à vibração de deformação das ligações O-Mg-O.
630 $\text{cm}^{-1}$	Relacionada a vibrações de estiramento das ligações Mg-O.
750 $\text{cm}^{-1}$	Está relacionada a vibrações de estiramento das ligações Si-O

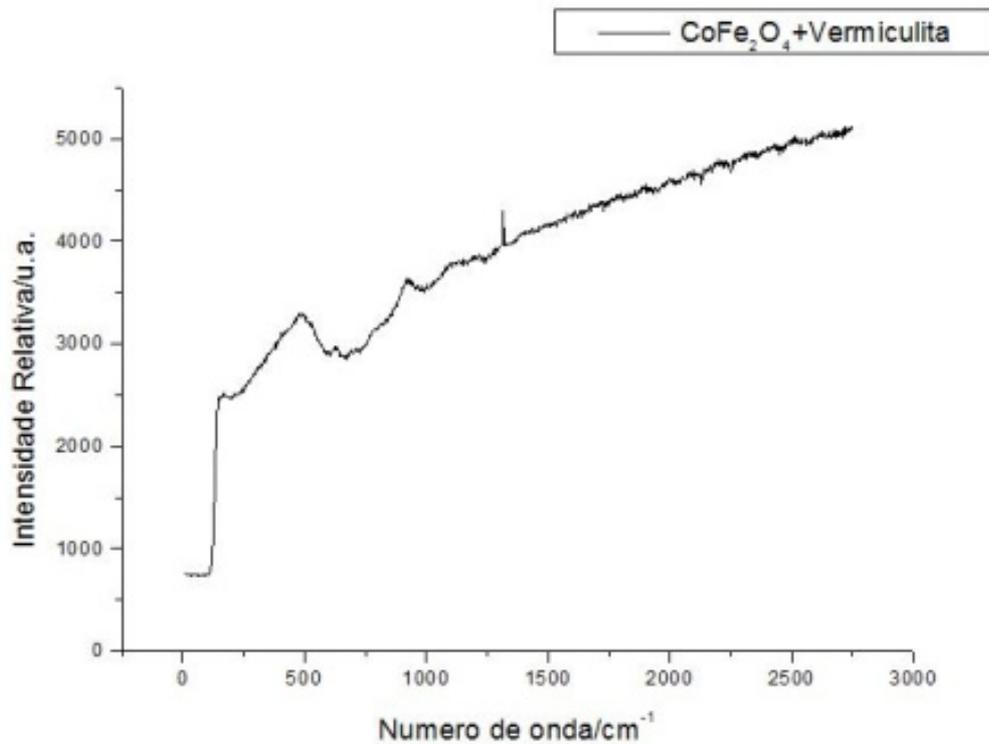
Tabela 3 Bandas características do espectro Raman da vermiculita sem nanotubos de carbono

Ainda que na imagem não seja possível discriminar cada uma das bandas da vermiculita por espectroscopia Raman, cabe destacar que todas estão dentro da posição onde há um aumento geral da intensidade.



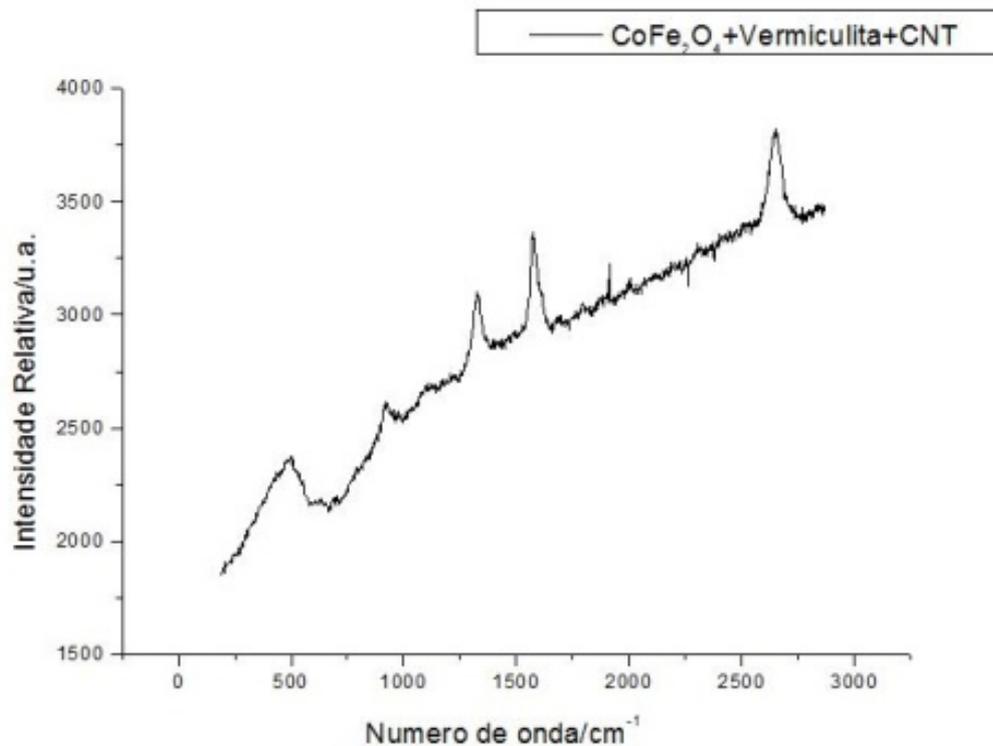
*Figura 7 Espectro Raman da vermiculita Ref. 17062015*

A partir do gráfico na figura 7 é possível observar a presença de dois picos aparentes entre os  $1100\text{ cm}^{-1}$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$ , correspondente a uma banda em aproximadamente  $1350\text{ cm}^{-1}$  (Banda D) relacionada com defeitos nas estruturas de carbono, e uma banda em  $1580\text{ cm}^{-1}$  (Banda G) associada com as vibrações C-C nas direções tangenciais observadas no grafite e nos materiais grafíticos, isto permite confirmar que se efetuou a formação de estruturas de carbono sobre o material (DRESSELHAUS, M.S., et al., 2005).



*Figura 8 Espectro Raman da vermiculita impregnada com sais de ferro e cobalto*

No gráfico da figura 8 é possível observar a presença de um pico aparente entre os  $250\text{ cm}^{-1}$  e  $750\text{ cm}^{-1}$  correspondente as bandas características já descritas da vermiculita segundo Ritz, M., J., et al 2014 (bandas em 155, 410, 630,  $750\text{ cm}^{-1}$ ). Nesta figura também é observado um pico entre  $750\text{ cm}^{-1}$  e  $1100\text{ cm}^{-1}$  mais acentuado que na vermiculita, o que pode corresponder as sais usadas na impregnação.

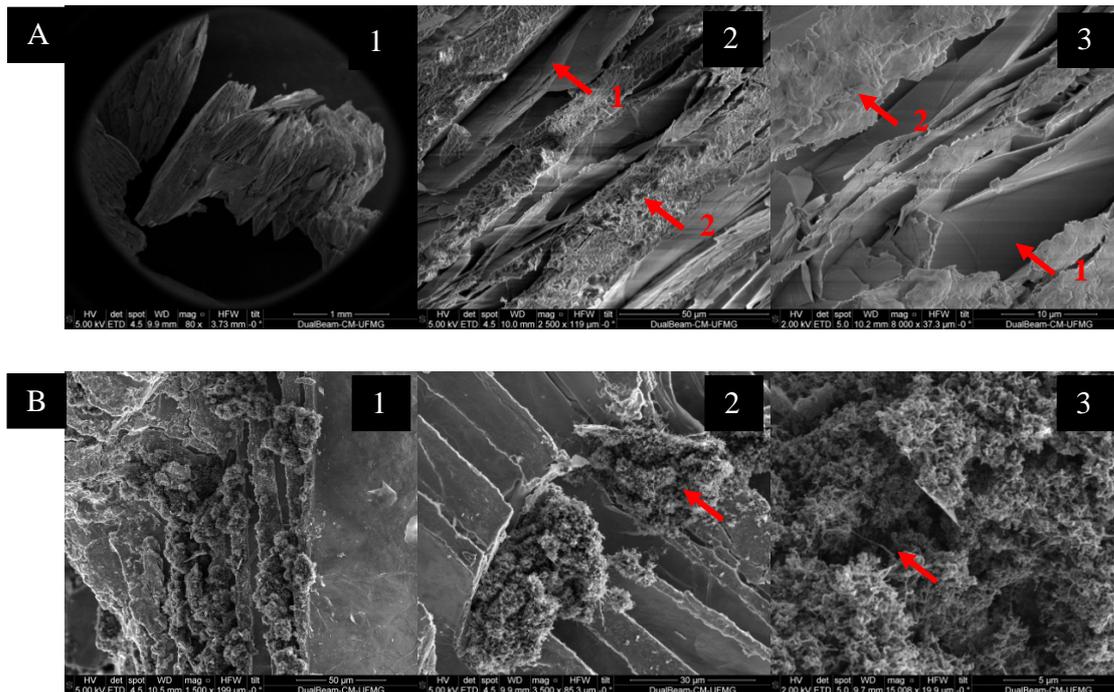


*Figura 9 Espectro Raman da vermiculita Ref. 24062015*

A partir da figura 9 é possível observar tanto um pico entre  $250\text{ cm}^{-1}$  e  $750\text{ cm}^{-1}$  correspondente as bandas já descritas da vermiculita; quanto a presença das regiões espectrais típicas dos NTC, assim, além de se observar as bandas D e G já descritas, também observou se a presença de uma banda entre 2500 e 2750, que é uma banda de segunda ordem geralmente localizada entre 2450 e 2650  $\text{cm}^{-1}$  chamado de modo G' (Ritz, M.,J. et al.,2014; Dresselhaus, M.S., et al., 2005).

### ***6.1.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)***

As imagens da Microscopia Eletrônica de Varredura da vermiculita sem NTC e a vermiculita Ref. 17062015, evidenciam a estrutura foliar da vermiculita e a presença de estruturas tubulares sobre a vermiculita Ref.17062015 (Figura 10).

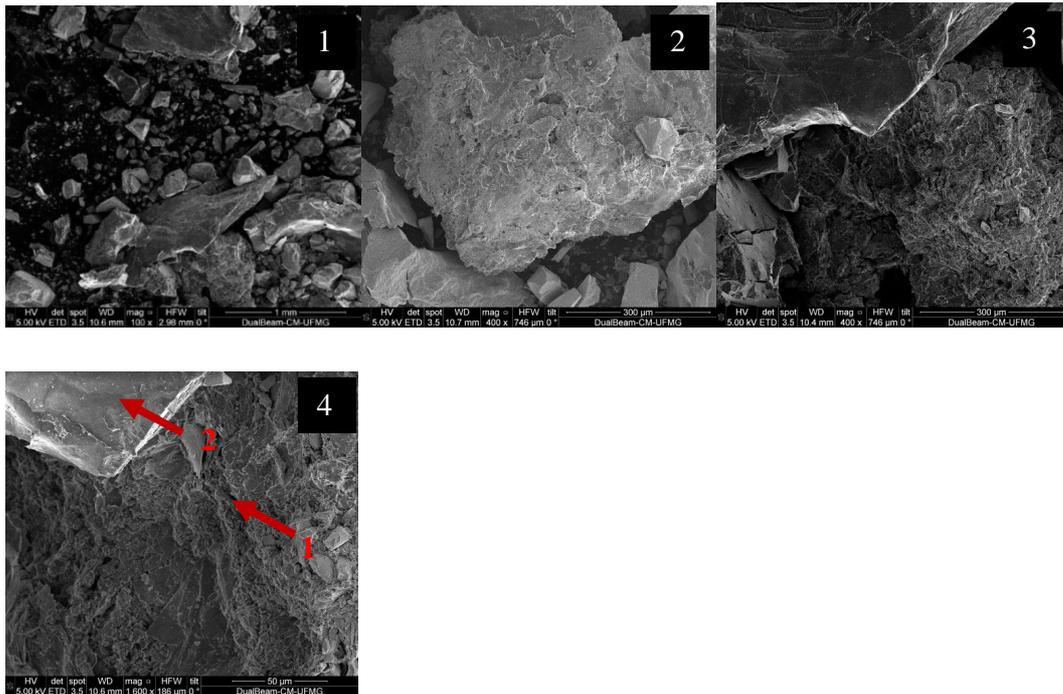


*Figura 10 Eletromicrografia de varredura da vermiculita sem nanotubos de carbono (línea superior A) e a vermiculita Ref.: 17062015 (línea inferior B). Na linha A, se observa da esquerda para a direita na imagem 1), um grânulo de vermiculita com a sua estrutura foliar característica; e na imagem 2) e 3) a sobreposição das folhas, com espaços entre elas (↑1), também é possível observar as bordas irregulares das folhas (↑2). Na linha B, verifica-se na imagem 1) e 2) como após o CVD a estrutura foliar se manteve, agora com espaços mais uniformes e a aglomeração de estruturas de carbono (↑), observasse um recobrimento parcial da vermiculita mais especificamente nas bordas das folhas, na imagem 3) observasse os filamentos de carbono(↑).*

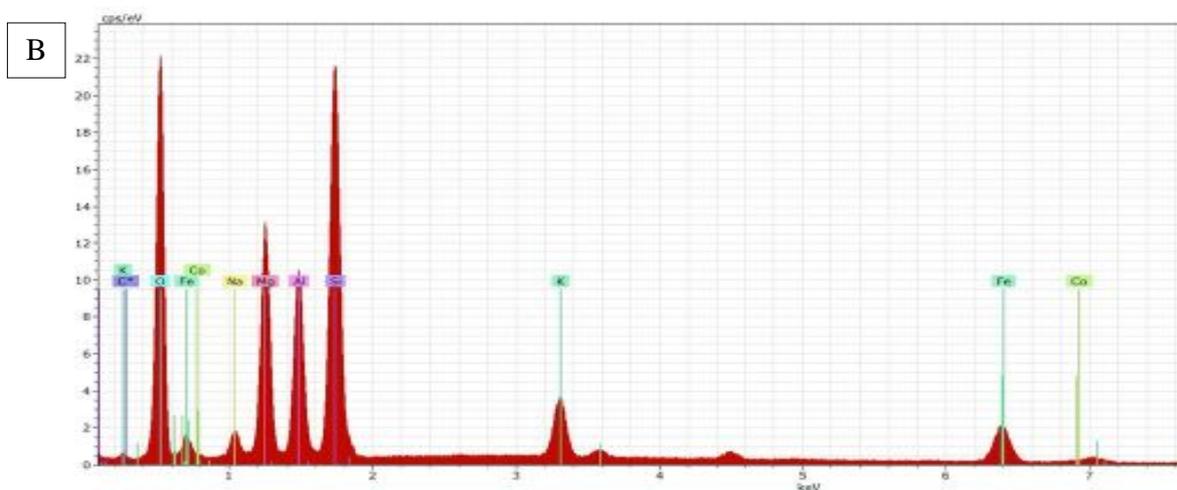
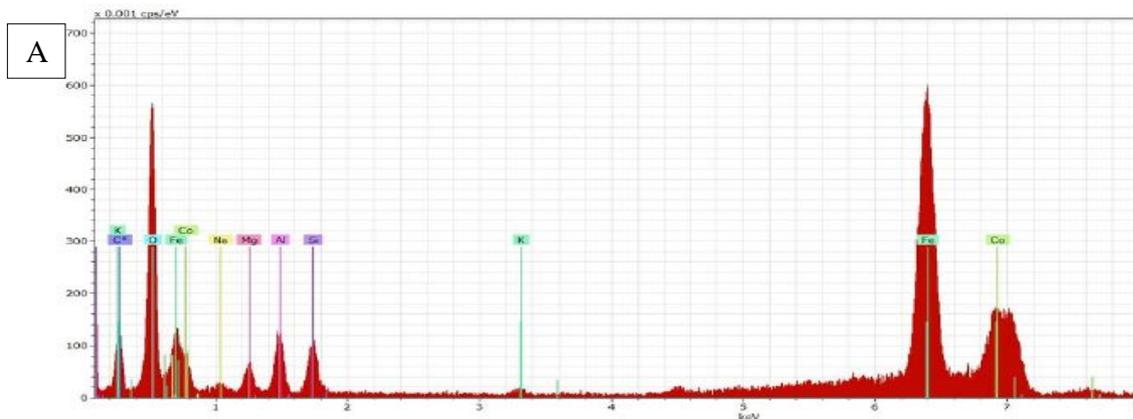
Pela microscopia eletrônica de varredura da vermiculita sem NTC (Figura 10 A) como da vermiculita Ref. 17062015 (Figura 10 B) é possível observar todas as características próprias do material conforme já tinha sido descrito por Saldanha, 2014 e Purceno et al., (2011). No entanto, na vermiculita Ref. 17062015 (Figura 10 B) observa-se um recobrimento parcial da vermiculita, mais especificamente nas bordas das folhas, sendo que este tipo de recobrimento é importante para a obtenção de compósitos anfifílicos, ou seja, compósitos com uma parte hidrofílica (vermiculita) e outra hidrofóbica (nanotubos de carbono); o fato de que a maior quantidade dos nanotubos se encontra nas bordas

provavelmente é devido a que é ali onde se encontra o ferro exposto, o qual é reduzido a ferro metálico durante o processo CVD segundo o proposto por Tristao, J.C., et al., (2010) e Saldanha (2014).

A seguir, se apresentam as figuras, onde é possível visualizar as imagens da MEV (Figura 11) e o espectrograma da vermiculita impregnada com sais de ferro e cobalto (Figura 12).



*Figura 11 Eletromicrografia de varredura da vermiculita com ferrita de cobalto, também é apresentado o local onde foi feito a análise do espectro de energia dispersiva EDS para a imagem 4 (↑)*



*Figura 12 Espectrograma EDS da vermiculita impregnada com sais de ferro e cobalto sinaladas na Imagem 4 da figura 11. Em A: localização sinalada na figura 11 como (↑1); e em B: a localização sinalada na figura 11 como (↑2)*

Nas imagens 1 e 2 (Figura 11), observam-se grãos com estrutura diferente sendo uns com aspecto liso e outros mais granulares, que pode ser melhor visualizado na imagem 3, sendo que a estrutura foliar da vermiculita não é observada até aqui.

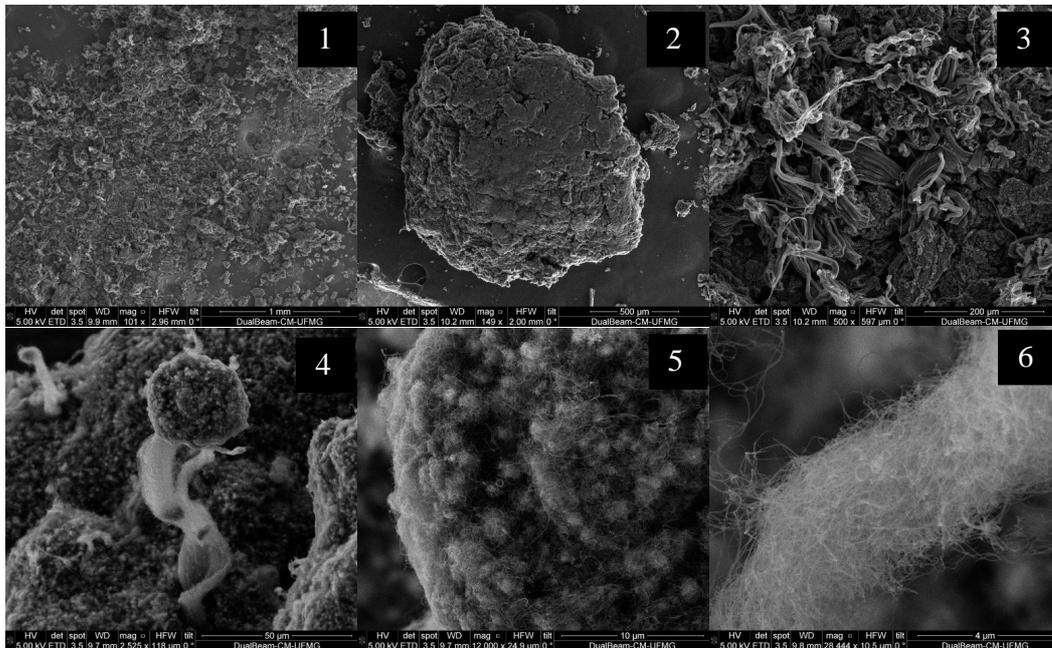
Na imagem 4 (Figura 11), observa-se, nitidamente, a presença de estruturas heterogêneas; na estrutura mais granular (↑1) desta imagem foi realizado uma análise EDS. O gráfico EDS da imagem 4, localização (↑1), representado em A (Figura 12), evidenciou a presença de picos baixos correspondentes a elementos como o potássio, sódio, magnésio, alumínio e silício e com picos maiores o oxigênio, ferro e cobalto. Na mesma imagem, foi mudada a região para uma de forma laminar sobre a que se fez a análise EDS, representado na

localização ( $\uparrow$ 2) em B (figura 12); o gráfico desta região nos permite observar picos associados ao oxigênio, magnésio, alumínio e silício. Ainda, estão presentes, picos baixos associados ao potássio, ferro, cobalto e sódio.

As micrografias da vermiculita com sais de ferro e cobalto (Figura 11), indicaram que os materiais obtidos apresentam morfologia heterogênea na forma de aglomerados de partículas amorfas, e outras com uma estrutura mais laminar. A composição destas fases foi revelada pela análise EDS, assim: a parte granular ou amorfa apresenta picos altos de ferro, cobalto e oxigênio, que coincidem com os componentes adicionados durante a impregnação; sendo que esta morfologia já tinha sido descrita por Camilo, (2006) para a síntese de partículas magnéticas. O que difere da composição da estrutura laminar, onde os picos altos coincidem com os elementos que constituem a vermiculita como magnésio, alumínio e silício, também descritos por Saldanha, (2014).

A composição destes materiais já havia sido descrita de forma individual nos diferentes estudos, mas não foram estudados de forma conjunta como aparecem nas imagens.

A seguir, as imagens MEV da vermiculita Ref. 24062015 (Figura 13) e medida EDS (Figura 14).



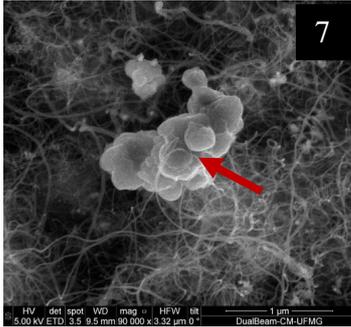


Figura 13 Electromicrografia MEV da vermiculita Ref. 24062015, também é apresentado o local onde foi feito a análise do espectro de energia dispersiva EDS para a imagem 7 (↑)

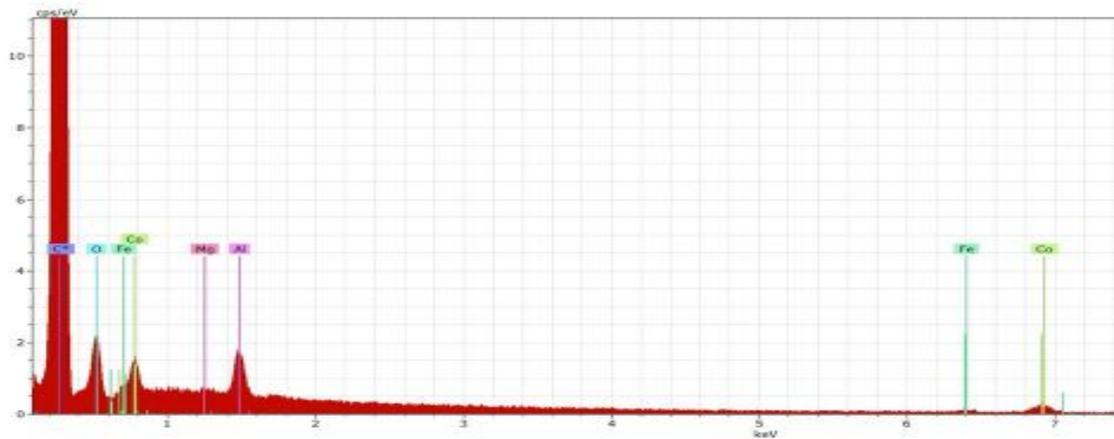


Figura 14 Espectrograma EDS da vermiculita Ref. 24062015, localização sinalada na figura 13 como (↑)

Nas imagens 1 e 2 (Figura 13) observam-se grãos de distintos tamanhos, na imagem 3 nota-se o brotamento de NTC com formas e dimensões diferentes, na imagem 4, é possível observar agregados e filamentos de NTC onde as suas estruturas podem ser melhor visualizadas nas imagens 5 e 6.

Na imagem 7 (Figura 13) indica-se (↑) o local onde foi feito o EDS. A estrutura apontada apresenta aspecto similar à vermiculita, e, ao redor, observam-se filamentos de NTC. No gráfico podem ser observados picos associados ao carbono, oxigênio, cobalto, alumínio e ferro, sendo estes últimos picos mais baixos que o pico associado ao carbono.

Para o caso da vermiculita Ref. 24062015, que é um novo material até agora não descrito, se observa a morfologia tubular típica de nanotubos de carbono com uma distribuição heterogênea sobre o suporte, sendo que os NTC se encontram com diferentes diâmetros e comprimentos.

Na micrografia 6 das Imagens MEV da vermiculita Ref. 24062015 (Figura13) é possível observar filamentos de NTC com estrutura diferente dos observados na vermiculita Ref.17062015 (Figura11), isto corresponde ao uso dos sais de ferro e cobalto que atuam como catalisadores para o crescimento dos NTC. No entanto, mais estudos devem ser feitos sobre este material já que nanopartículas de ferrita de cobalto como compostos magnéticos tem sido propostas, no entanto, não é conhecido o comportamento da impregnação da vermiculita com este tipo de material visando a posterior deposição de estruturas de carbono.

## **6.2 Tratamentos e Testes**

### **6.2.1 Descoloração do corante Azul de Remazol Brilhante R (RBBR) na avaliação da produção de peroxidases em cultura sólida**

O Índice enzimático é uma determinação semiquantitativa que pode ser muito útil para determinar se as espécies fúngicas, que vão ser utilizadas, possuem a capacidade de produzir, ou não, uma determinada enzima (ou enzimas). No entanto, nem sempre os resultados obtidos neste tipo de metodologia podem ser tomados como referência, já que o tipo de cultura e o uso de indutores pode levar a uma maior produção ou mesmo a uma inibição da produção (NILADEVI; PREMA,2008).

O menor índice enzimático foi obtido para o fungo GM117, após 5 dias de crescimento. Isto indica que o GM117 é um bom produtor de peroxidases, em contraste com o PLO9 que mostra um índice maior entre os isolados testadas (Tabela 4 ). Assim, temos índices de 0,71 para o GM117, 0,83 para o PLO13 e 1 para o PLO9.

		<b>Diametro Colônia mm</b>	<b>Diametro Halo mm</b>	<b>IE= Colônia/mm Halo</b>	<b>mm Media do índice enzimático das três placas</b>
GM117	1	30	40	0,75	0,71
	2	24	40	0,60	
	3	36	47	0,77	
PLO9	1	47	45	1,04	1,00
	2	36	40	0,90	
	3	38	36	1,06	
PLO13	1	23	30	0,77	0,83
	2	42	50	0,84	
	3	46	52	0,88	

*Tabela 4 Diâmetro de colônia, diâmetro de halo e índice enzimático para atividade de peroxidases em teste em placa dos isolados PLO9, PLO13 e GM117 após 5 dias de crescimento.*

Para um melhor entendimento e visualização do halo, produto da descoloração, foi feita uma imagem ilustrativa com uma placa teste de BDA com o corante RBBR (Figura 15). Nesta imagem, pode ser observado o crescimento fúngico no centro da placa com uma cor rosa escuro (delimitado na imagem pela cor amarela Fig, 15 B). Também, visualiza-se um halo formado ao redor do crescimento – sendo este último, um pouco mais translúcido do que a área de crescimento, – produto da difusão das enzimas no meio (delimitada pela cor verde na imagem Fig 15 B). Assim, para as isolados em teste, este halo produto da descoloração não aconteceu no mesmo período de tempo de incubação, mudando de tamanho segundo a espécie.

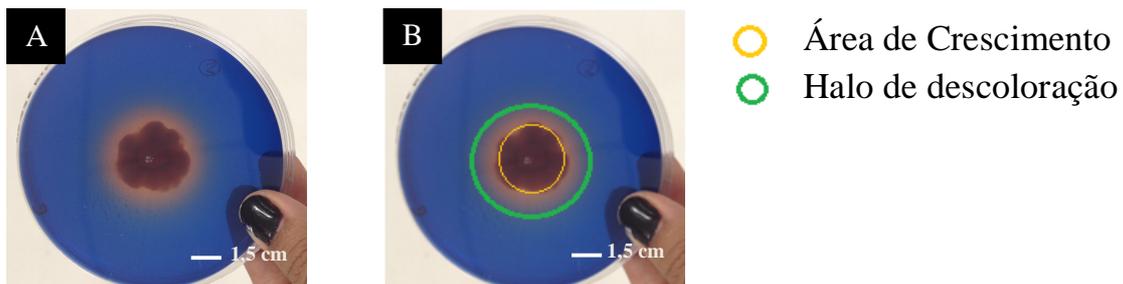
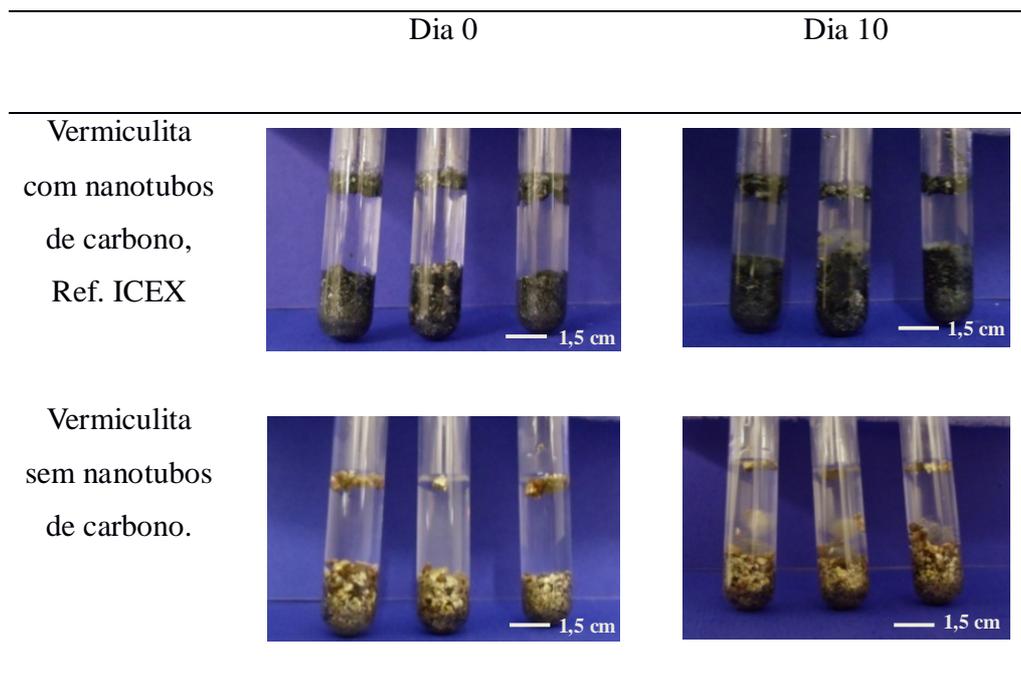


Figura 15 Imagem ilustrativa da descoloração do corante RBRR em placa.

## 6.2.2 Imobilização e produção enzimática

### 6.2.2.1 Avaliação inicial da imobilização e crescimento de PLO9, PLO13 e GM117 em vermiculita Ref. ICEX.

Na avaliação inicial da imobilização e crescimento de PLO9, PLO13 e GM117, expostas a vermiculita sem NTC (Cor amarela ou dourada) e vermiculita Ref.: ICEX (Cor negro) foi possível verificar a turbidez no meio, presuntivo da adaptação e crescimento das espécies expostas aos diferentes tipos de vermiculita, (Figura 16) tomadas dos tubos nos dias zero e dez de crescimento.



*Figura 16* Imagens representativas do crescimento fungico nas vermiculitas Ref. ICEX e sem NTC em tubos de vidro, nos dias zero e dez de crescimento em caldo batata

Os resultados foram similares para as três linhagens, indicando que os materiais usados como suporte não inibiram o crescimento dos fungos testados.

O crescimento das espécies fúngicas nos diferentes materiais foi corroborado pelas imagens da microscopia ótica (Figura 17), nas quais pode-se visualizar as estruturas da vermiculita com nanotubos de carbono como estruturas de cor preto e de cor amarelada para a vermiculita sem nanotubos de carbono; nos dois casos observa-se a presença de hifas e micélios corados com azul nas bordas devido á coloração azul de algodão em lactofenol, sendo que para as vermiculitas com NTC observam-se estruturas agrupadas com hifas formando micélios estruturados ao redor do material, diferente das vermiculita sem NTC, onde crescimento é solto.

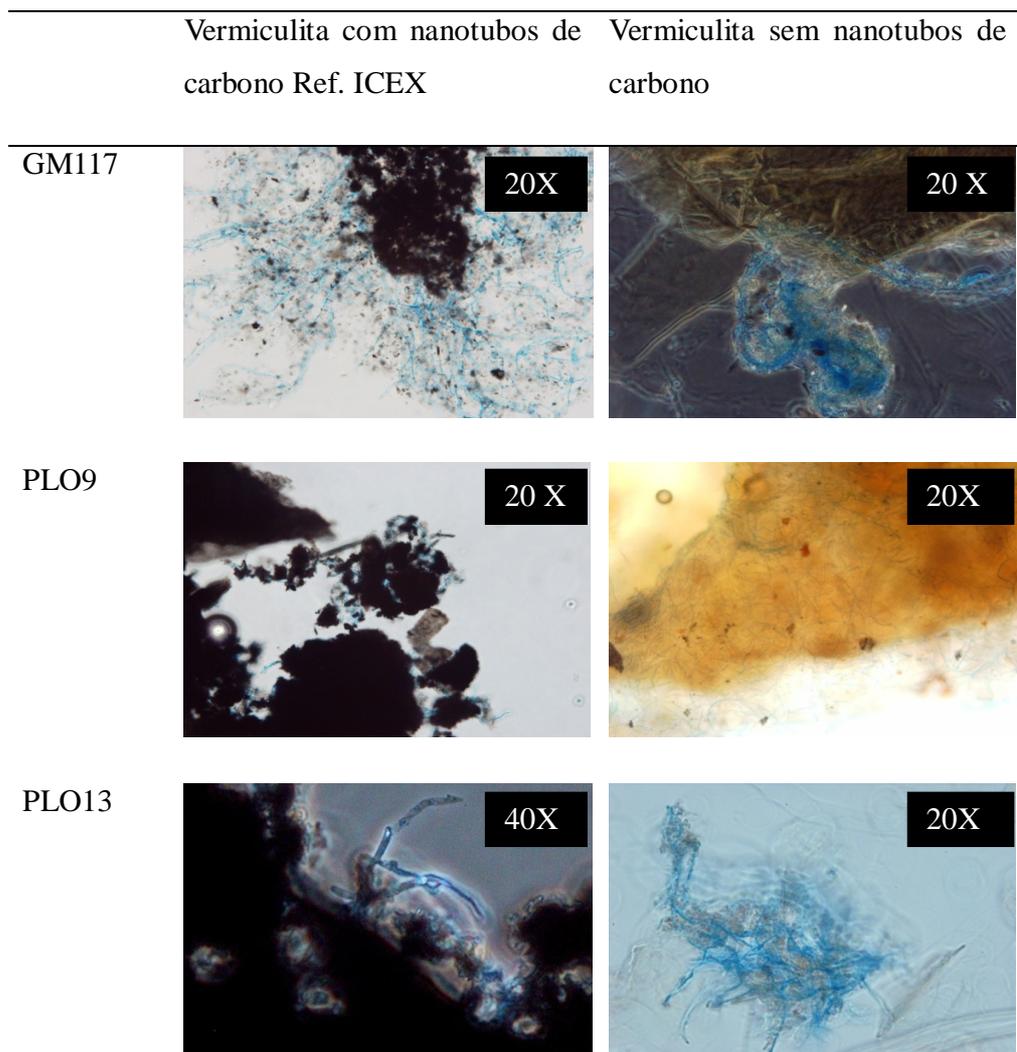


Figura 17 Micrografias do crescimento das três linhagens, sobre vermiculita Ref. ICEX e vermiculita sem NTC, no microscópio Olympus BX41

**6.2.2.2 Avaliação inicial da produção de lignina peroxidase por parte das espécies PLO9, PLO13 e GM117 em caldo batata imobilizados na vermiculita Ref. ICEX**

As espécies fúngicas produziram a lignina peroxidase em caldo batata quando crescidos na presença da vermiculita Ref. ICEX. O melhor produtor foi o isolado GM117, seguido do PLO9 e por último o PLO13 (Figura 18).

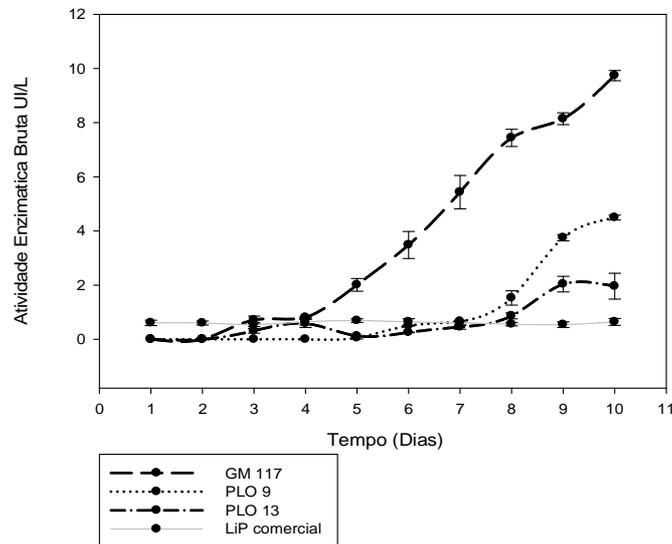


Figura 18 Atividade enzimática de lignina peroxidase em caldo batata vermiculita Ref. ICEX

Como se observa na figura 18, o melhor produtor foi o isolado GM117 com uma atividade enzimática bruta média de 9,65 UI/L, seguido do PLO9 com uma atividade média de 4,45 UI/L e por último o PLO13 com um atividade média de 2,02 UI/L, a lignina peroxidase usada como controle positivo teve uma atividade enzimática bruta média de 0,56 UI/L; isto para os dez dias de crescimento. De todos os dados foi subtraído o valor do controle abiótico aqui considerado como controle negativo (sem inoculo fúngico).

A atividade da lignina peroxidase a partir dos crescidos sobre a vermiculita Ref. ICEX, em caldo batata indicam a capacidade das espécies fúngicas de crescer e, como indicativo do desenvolvimento, produzir enzimas durante os 10 dias de crescimento. Foi notado que a ordem das espécies produtoras era similar à do teste feito em placa, ou seja, em primeiro lugar o *Ganoderma spp.* seguido dos isolados de *Pleurotus spp.*

### 6.2.2.3 Cultivo das espécies fúngicas para a produção de Lignina peroxidase em diferentes meios de cultura immobilizados na vermiculita Ref.:17062015

Foi determinada a atividade enzimática para avaliar a produção de lignina peroxidase nos extratos provenientes dos isolados fúngicos PLO9, PLO13 e GM117, crescidos nos diferentes meios de cultura sobre a vermiculita Ref.:17062015, por um período de 10 a 13 dias (sempre tentando manter a coleta pelo maior período possível, a fim de melhor definir o comportamento da curva de produção). Os resultados obtidos se apresentam como atividade enzimática para lignina peroxidase de GM117 (Figura 19), para PLO9 (Figura 20), já para PLO13, foi notado em testes prévios que a atividade enzimática aumenta quando o caldo batata tem a torta de pinhão manso como indutor, aqui se-apresenta os resultados obtidos nos três meios de cultura restantes (Figura 21).

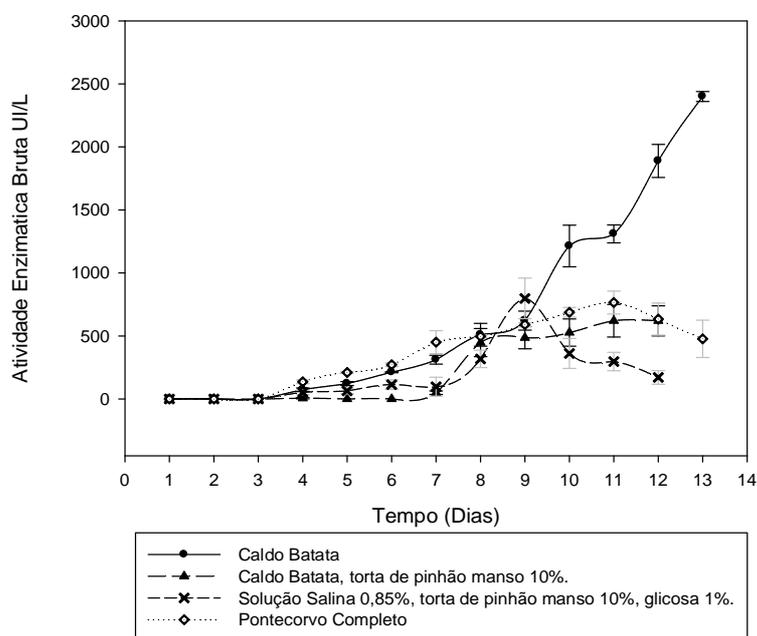
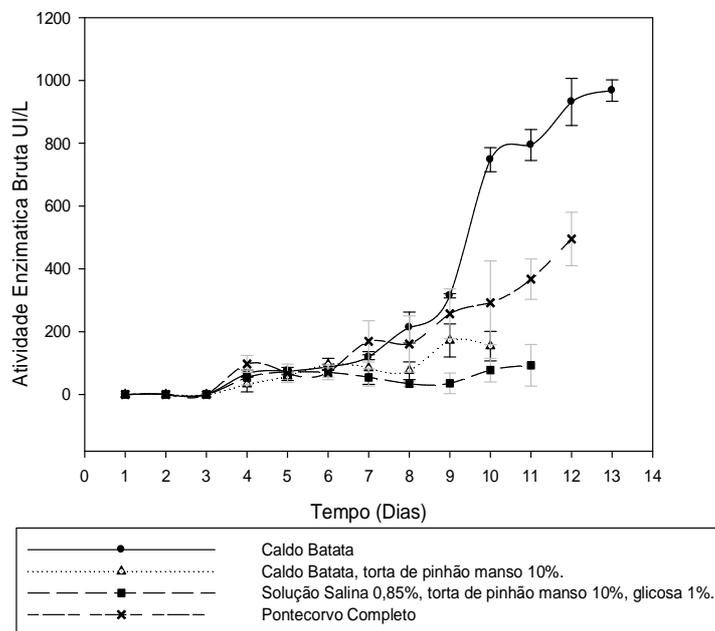


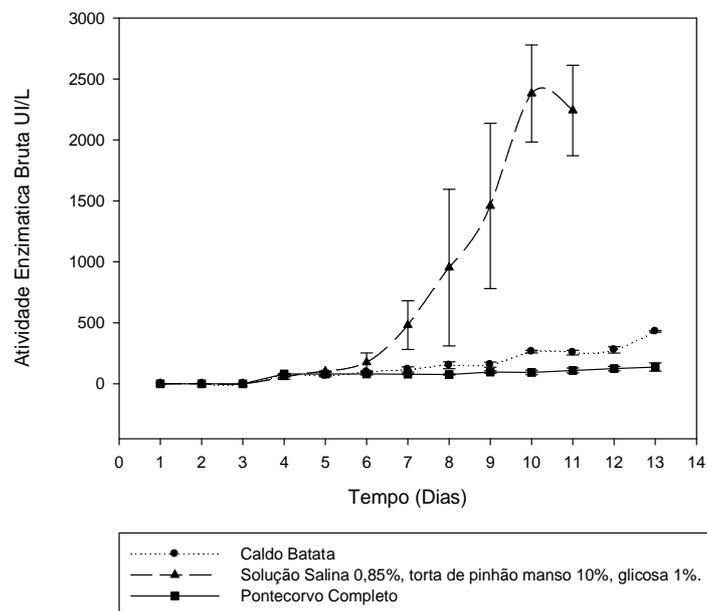
Figura 19 Atividade enzimática de lignina peroxidase do GM117 inoculados em diferentes meios de cultura com vermiculita Ref. 17062015

Na figura 19, é possível constatar uma atividade enzimática bruta aumentada para GM117 quando é usado o meio caldo batata apresentando uma atividade de 2392 UI/L; observa-se como com aproximadamente 485 UI/L de atividade enzimática bruta no meio mineral Pontecorvo para o dia 13 de crescimento passaria a ser o segundo melhor meio mais com uma atividade muito reduzida, para este também se observa uma queda da atividade após o dia 11 de crescimento.



*Figura 20 Atividade enzimática de lignina peroxidase do PLO9 inoculados em diferentes meios de cultura com vermiculita Ref. 17062015*

Como é observado na Figura 20 para o PLO9, a produção enzimática é maior quando crescido em caldo batata, apresentando uma atividade enzimática de aproximadamente 956 UI/L, o segundo melhor meio de cultura pela atividade enzimática apresentada é o meio mineral Pontecorvo com 510 UI/L, sendo que o início da produção de forma ativa se dá após o dia 6 de crescimento.



*Figura 21 Atividade enzimática de lignina peroxidase do PLO13 inoculado em diferentes meios de cultura com vermiculita Ref. 17062015*

O PLO13 tinha apresentado atividade enzimática aumentada quando exposto a meios de cultura com torta de pinhão manso como indutor, sendo que isto pode ser observado na figura 21, onde o meio de solução salina com torta apresentou um atividade média de aproximadamente 2229 UI/L. Esta espécie apresenta uma baixa atividade bruta nos outros meio de cultura líquidos aqui utilizados.

Com o teste feito com GM117, PLO9 e PLO13 nos diferentes meios de cultura com um tempo de duração das culturas de dez dias foi evidenciado que o GM117 é um bom produtor em meios naturais como o caldo batata. No entanto, também se destaca o crescimento e produção enzimática em meios minerais como o Pontecorvo, já que por ser um meio quimicamente definido, mudanças na sua composição nos poderia levar a elucidar as necessidades nutricionais específicas desta espécie nas condições aqui propostas e assim facilitar um posterior escalonamento. Nota-se, que tanto no caldo batata como no Pontecorvo o início da produção se dá no dia 3, diferente do caldo batata com torta de pinhão manso e da solução salina com torta, onde o início se dá no dia 7, isto é um

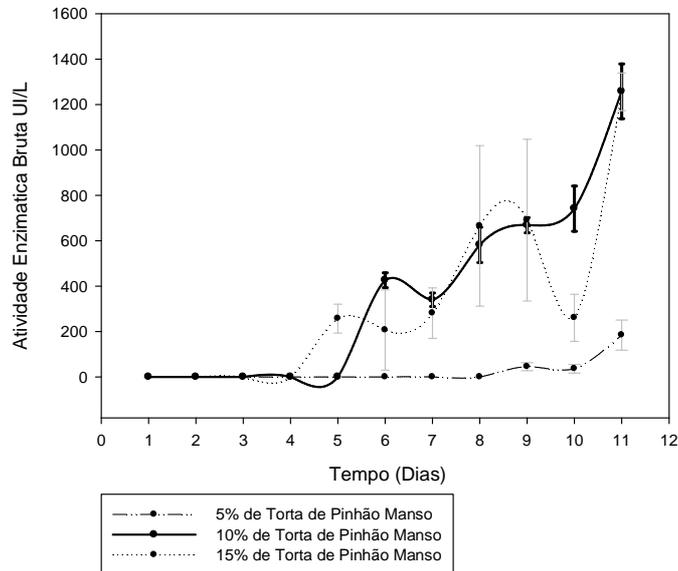
indicativo de como a presença da torta de pinhão manso induz uma ativação tardia da produção enzimática para esta espécie.

Para PLO9 o melhor meio foi o caldo batata, sendo que o caldo batata com torta é o segundo melhor meio onde, possivelmente, a torta exerce um papel diferente no metabolismo de esta espécie.

Já para o PLO13 o comportamento foi completamente diferente, já que a torta de pinhão manso desempenha um papel diferente, atuando como um indutor da produção enzimática refletida na atividade enzimática aqui avaliada. O crescimento de PLO13 e produção enzimática de LiP em caldo batata com torta de pinhão manso como indutor da atividade, gera grande interesse já que viabiliza o uso de resíduos agroindustriais na fermentação submersa (SmF).

#### ***6.2.2.4 Avaliação da produção de lignina peroxidase em caldo batata com torta de pinhão manso como indutor em diferentes porcentagens***

Como foi observada a notória atividade enzimática para lignina peroxidase quando o PLO13 foi crescido na presença da torta de pinhão manso, se optou por avaliar a produção enzimática usando o indutor em porcentagens entre 5% 10% e 15%, usando como suporte a vermiculita Ref.17062015 em caldo batata (Figura 22).



*Figura 22 Atividade enzimática de lignina peroxidase do PLO13 em caldo batata com 5% 10% e 15% de torta de pinhão manso com vermiculita Ref. 17062015*

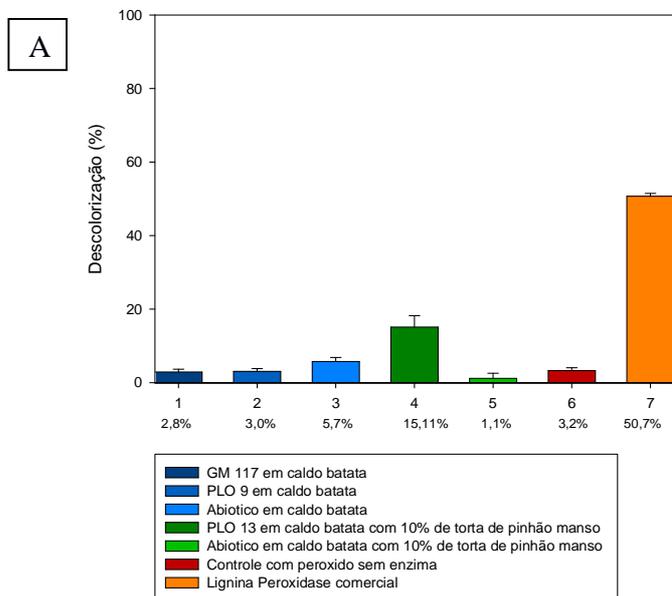
A partir da figura 22 é possível observar como o uso de diferentes porcentagens de torta de pinhão manso, podem influenciar na produção enzimática, aumentando consideravelmente a atividade enzimática bruta. Nota-se que para as porcentagens de 10% e 15% se apresenta a maior atividade enzimática com um comportamento variável com o decorrer do tempo, partindo parcialmente do mesmo tempo de início de produção da enzima.

Assim, para a maior porcentagem de torta de pinhão manso usada, 15%, se observou uma amplitude maior entre os dados, estes dados são diferentes dos apresentados na porcentagem de 10%, que mostra um comportamento com menos amplitude entre os dados e apresenta picos menos pronunciados durante a crescente produção enzimática, isto é coerente com uma produção constante de enzimas como resposta à presença do indutor, sendo assim o 10% a melhor porcentagem a ser usada por seus efeitos positivos sobre a indução da produção enzimática.

***6.2.2.5 Confirmação da produção de peroxidases nos extratos com maior atividade enzimática para lignina peroxidase, pela descoloração do corante Azul Brilhante de Remazol R (RBBR)***

As alíquotas das amostras fungicas com a maior atividade enzimática, crescidos sobre a vermiculita sem NTC e vermiculita Ref. 17062015 nos respectivos meios de cultura onde se apresentou esta atividade, foram usados para fazer o teste de descoloração do corante Azul Brilhante de Remazol R (RBBR) com uma concentração estoque de 0,2g/l. Foram selecionadas as concentrações de 40, 50 mg/L do corante RBBR, sendo as mais altas para fazer a descoloração por parte das alíquotas dos nossos extratos (Figuras 23 e 24)

Porcentagem de descolorização do RBBR (40mg/L)  
por parte dos estratos proveniente das especies fungicas em vermiculita sem NTC



Porcentagem de descolorização do RBBR (40mg/L)  
por parte dos estratos proveniente das especies fungicas em vermiculita com NTC

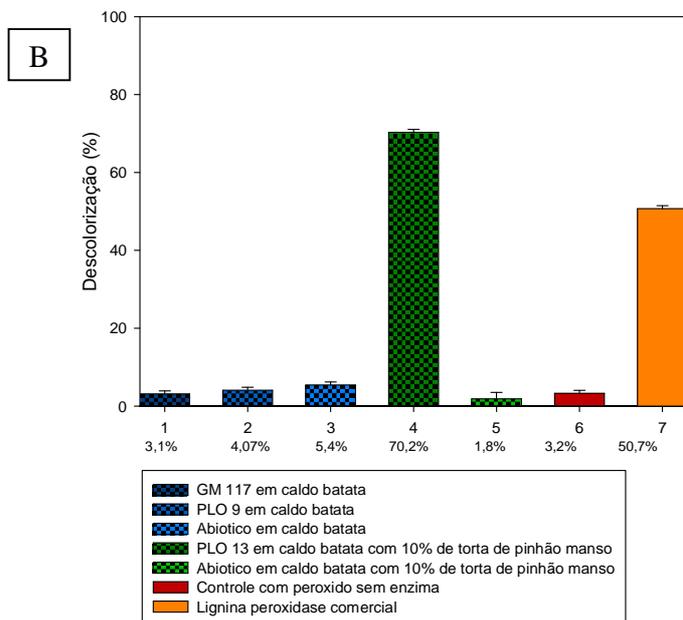


Figura 23 Descoloração do Azul Brillhante de Remazol R (RBBR) 40 mg/L por parte dos extratos enzimáticos provenientes de crescimentos sem NTC (indicado pela letra A) e com NTC vermiculita Ref. 17062015 (indicado pela letra B) nos meios onde se apresento a maior atividade enzimática.

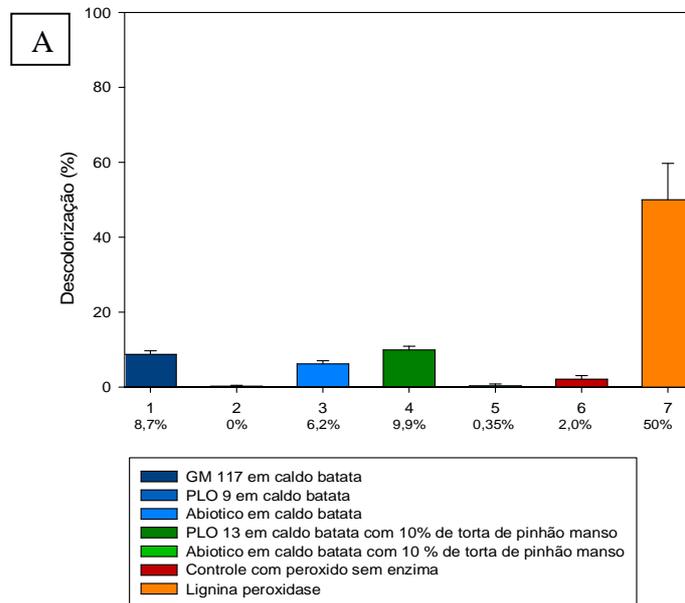
Observa-se na figura 23 para o GM117 e PLO9, tanto na vermiculita sem NTC (A), quanto com NTC (B), que não houve uma porcentagem de descoloração representativa e não se apresentou uma diferença significativa entre as amostras sem e com NTC. Também pode ser observada a importância da presença dos controles negativos (nas barras 3 e 5), já que estas servem como referência para indicar que a descoloração é mínima na ausência da enzima nos respectivos meios de cultura.

Ressalta-se a barra 4 da figura 23 B, que indica um valor médio de 70,2% (DS 0,755) de capacidade de descoloração do PLO13, quando crescido em caldo batata com torta de pinhão manso, usando como suporte a vermiculita com NTC. Isto contrasta com a barra 4 da figura da esquerda com uma média de 15,11% (DS 3,1), onde foi usada a vermiculita sem NTC no mesmo meio de cultura.

Um controle com peróxido sem enzima foi feito (barra 6 em ambas figuras), apresentando uma porcentagem de descoloração muito baixa. Evidenciando-se que acontece uma descoloração mínima não biológica.

Por outro lado, o controle positivo com lignina peroxidase comercial confirma uma descoloração eficiente pela atividade da enzima no método usado.

Porcentagem de descolorização do RBBR (50 mg/L)  
por parte dos estratos provenientes das espécies fungicas em vermiculita sem NTC



Porcentagem de descolorização do RBBR (50mg/L)  
por parte dos estratos proveniente das espécies fungicas em vermiculita com NTC

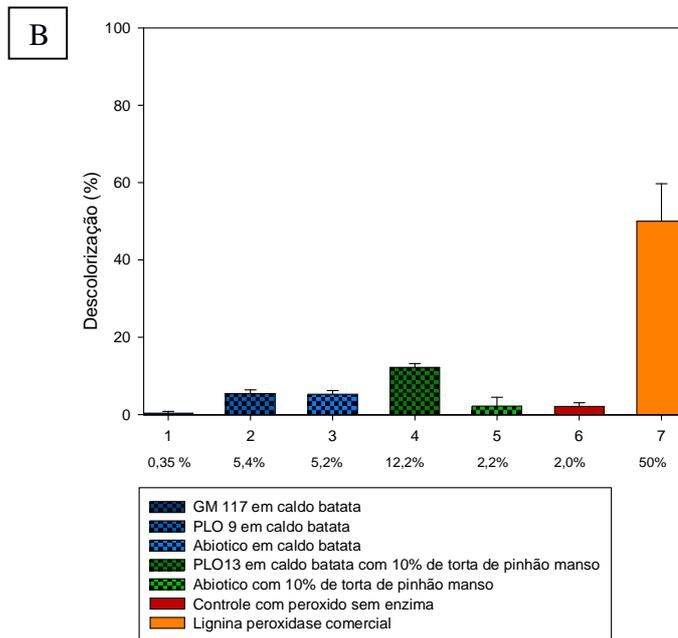


Figura 24 Descoloração do Azul Brillhante de Remazol R (RBBR) 50 mg/L por parte dos extratos enzimáticos provenientes de crescimentos sem NTC (indicado pela letra A) e com NTC vermiculita Ref. 17062015 (indicado pela letra B) nos meios onde se apresenta a maior atividade enzimática.

Na figura 24 um comportamento diferente foi observado quando se aumenta a concentração do corante para 50mg/L, onde o GM117 e PLO9 tiveram um comportamento variável nessas condições. Assim, o GM117 apresenta uma média de descoloração de 8,7% em vermiculita sem NTC (Fig. 24 A) e de 0,35% em vermiculita com NTC (Fig. 24 B). No entanto, o PLO9 não apresentou descoloração em vermiculita sem NTC, havendo uma porcentagem de descoloração de 5,4% em vermiculita com NTC. Todos esses valores estão muito próximos aos do controle negativo ou abiótico, por tanto considera-se não significantes.

Já para o extrato do PLO13, observa-se uma descoloração média de 9,9% para vermiculita sem NTC, e uma média de 12,2% para as amostras com NTC, mesmo com porcentagens baixas pode se ter apresentado uma saturação do corante impedindo a apropriada atividade enzimática. No entanto tal comportamento de descoloração quando usada uma concentração de 50 mg/L, foi semelhante ao da concentração de 40 mg/L, onde a porcentagem de descoloração foi maior no material com NTC.

A avaliação da capacidade de descoloração das espécies fúngicas mostrou-se como um dado importante para verificar a necessidade de indução das espécies a uma produção enzimática superior. Por exemplo, o GM117 e o PLO9 com uma atividade bruta inferior a 1000UI/L, mostram-se ineficientes na descoloração enzimática, já no caso do PLO13, é provável que a presença da torta de pinhão manso como indutor leve a uma atividade enzimática bruta de 1250 UI/L, capaz de descolorir até 70% do corante Azul Brillhante de Remazol R numa concentração de 40 mg/L para os extratos de culturas onde se teve vermiculita com NTC.

#### ***6.2.2.6 Cultivo da melhor espécie fúngica produtora da enzima Lignina peroxidase na vermiculita Ref. 24062015***

Já que a melhor espécie produtora foi o PLO13 (crescido em caldo batata com torta de pinhão manso 10%), este foi selecionado para o crescimento usando a vermiculita Ref. 24062015. No entanto, neste caso, não foi possível avaliar a atividade para lignina peroxidase, isto porque os extratos se apresentaram muito saturados de NTC, obstruindo os filtros usados, fazendo impossível a coleta do extrato.

O fato de ter grande quantidade de NTC no material prejudicou a execução do teste da produção de LiP, já que a constante agitação necessária para crescimento das espécies promove o desprendimento de NTC e impossibilita qualquer medição posterior de atividade enzimática.

Ressalta-se que é possível que o uso de quantidades menores de vermiculita Ref. 24062015 poderiam levar a melhores resultados, já que a quantidade aqui usada foi muito alta, isto pelo aumento da relação área superfície deste material comparada com a vermiculita Ref. 17062015. Infelizmente, a repetição do teste foi impossibilitada por limitações na obtenção do material. Sugere-se que, em estudos posteriores, seja usado um método de produção do suporte que permita a obtenção de uma quantidade suficiente de um mesmo lote, que oportunize o desenvolvimento de todos os testes, como o usado para a produção da vermiculita Ref. 17062015.

### **6.2.3 Determinação do Crescimento**

#### ***6.2.3.1 Determinação do crescimento de PLO9, PLO13 E GM117 no meio onde se apresentou a mais alta atividade enzimática de lignina peroxidase sobre a vermiculita Ref. 17062015***

A determinação da biomassa fúngica para o GM117 e para o PLO9 foi feita em caldo batata, e para o PLO13 em caldo batata com 10% de torta de pinhão manso. Estes meios foram escolhidos porque apresentaram a maior atividade enzimática para lignina peroxidase, todos imobilizados sobre vermiculita Ref. 17062015.

#### **Ergosterol, N-Heptano Vs HPLC**

Uma curva padrão foi determinada com ergosterol comercial (Ergosterol  $\geq 95.0\%$  Sigma Aldrich, PM 386,7 g/mol) a partir de uma solução estoque de 1mg/ml. A partir desta curva foram obtidas as concentrações de ergosterol para cada uma das amostras obtidas na fração do n- heptano.

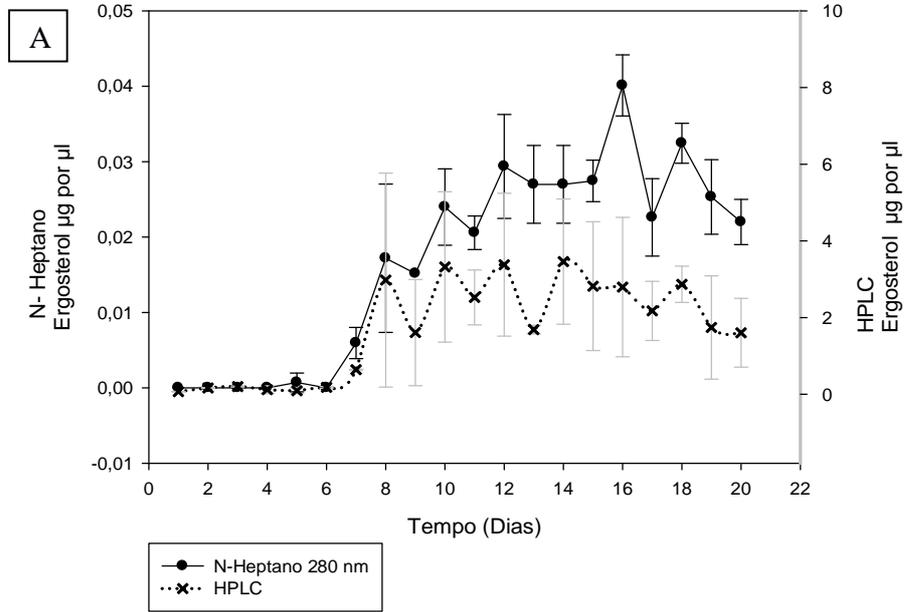
Para o caso do ergosterol avaliado por HPLC, uma curva foi feita usando concentrações baixas (a partir de 50 ng) do ergosterol padrão (Ergosterol  $\geq 95.0\%$  Sigma Aldrich, PM 386,7 g/mol), isto por causa da sensibilidade do método. Para a obtenção da concentração,

os dados da área sobre a curva do ergosterol padrão, foram interpolados para os valores obtidos de cada uma das amostras analisadas no HPLC.

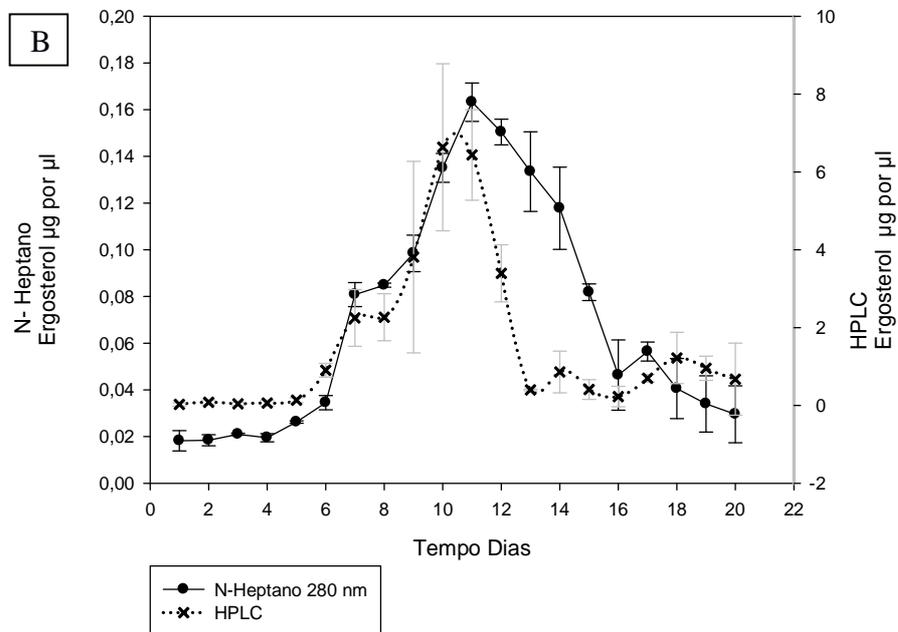
O tempo de retenção do ergosterol nas condições usadas nos tratamentos, compatível com o tempo de retenção do material de referência comercial que para com o tipo de coluna foi de 4 min.

Foi feita a determinação da concentração de ergosterol tanto na fração heptânica como por HPLC (Fig. 25) para o GM117, PLO9 e PLO13 para 20 dias de crescimento.

Ergosterol: GM117 em caldo batata  
Vermiculita Com NTC



Ergosterol: PLO9 em caldo batata  
Vermiculita Com NTC



Ergosterol: PLO13 em caldo batata com torta de pinhão manso  
Vermiculita Com NTC

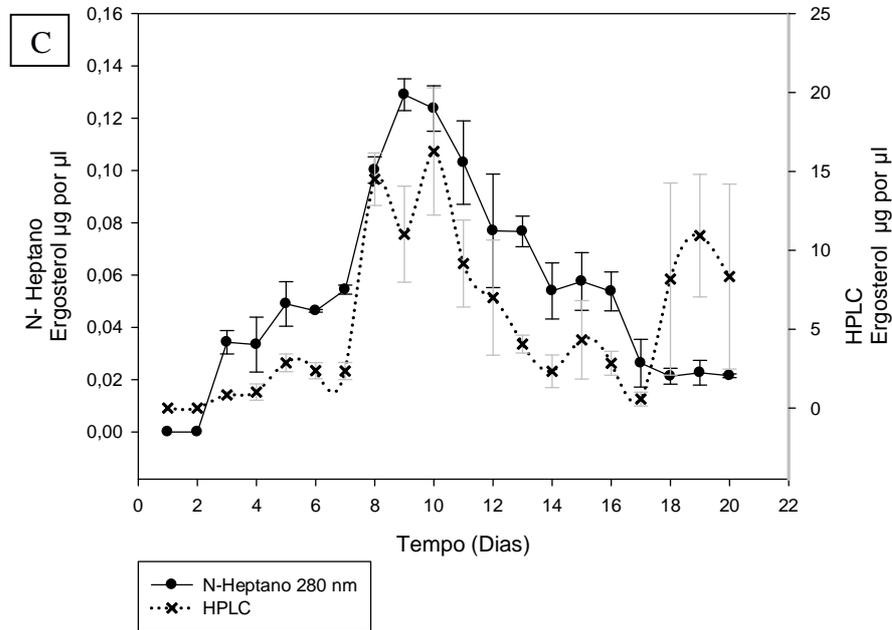


Figura 25 Concentração de ergosterol na fração heptânica e por HPLC nas amostras de GM117, PLO9 e PLO13, crescidas em vermiculita Ref. 17062015 nos meios onde se apresenta a melhor atividade enzimática.

Em todos os gráficos da figura 25 (Fig. 25 A, B, C) se observa uma fase *lag* ou de adaptação sendo mais curta para o PLO13 (Fig. 25C) do que para GM117 (Fig. 25A) e PLO9 (Fig. 25B), seguido de uma fase *log* entre os dias 6 a 8 para GM117 (Fig. 25A) e 4 a 8 para PLO9 (Fig. 25B); já no gráfico do PLO13 (Fig. 25C), reparam-se dois aumentos um entre o dia 2 a 3 e outro entre os dias 6 a 9.

Mesmo que não seja observada uma fase *estacionária* mantida no tempo, evidencia-se tanto para o PLO9 (Fig. 25B) como para PLO13 (Fig. 25C) picos entre os dias 8 a 12 onde se encontram as máximas concentrações de ergosterol. Diferente do GM117 (Fig. 25A) onde os resultados têm um comportamento variável com o decorrer do tempo, sem uma queda tão representativa como acontece com as espécies de PLO9 (Fig. 25B) e PLO13 (Fig. 25C) os onde este declínio é constante.

Para PLO13 (Fig. 25C) se observa uma concentração maior de ergosterol por HPLC do que para PLO9 (Fig. 25B) e muito mais do que para GM117 (Fig. 25A).

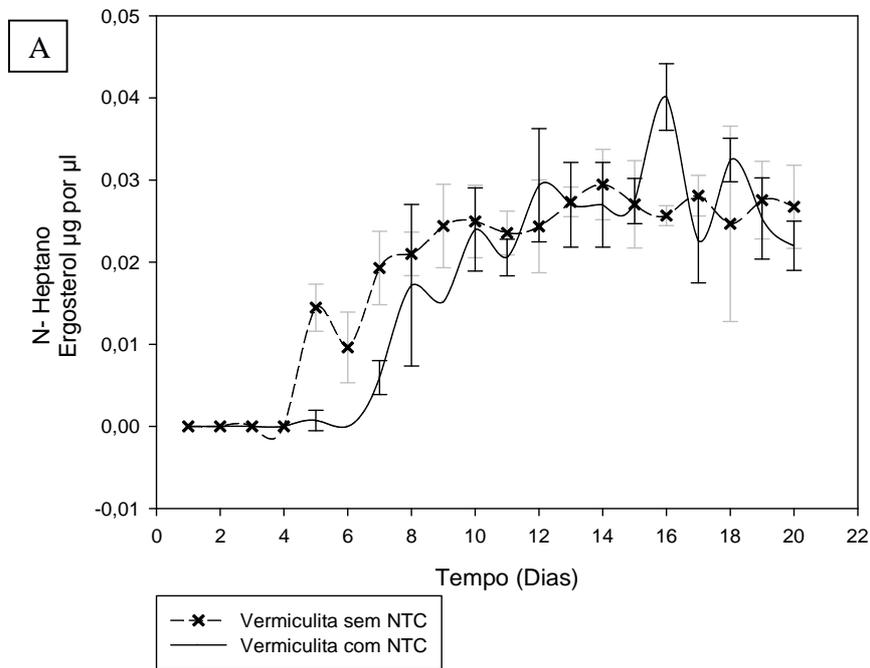
Nota-se, de modo geral, que mesmo que a determinação n-heptano e por HPLC sejam métodos diferentes para detecção e quantificação do teor de ergosterol como indicador do aumento de biomassa fúngica, os resultados em ambos procedimentos apresentaram um comportamento muito parecido com o decorrer do tempo, permitindo se observar as diferentes fases da curva de crescimento.

Cabe ressaltar que a variação entre os dados é maior nos resultados obtidos na cromatografia de alta definição, isto por ser uma metodologia mais sensível. A amplitude dos dados em ambas metodologias também pode responder ao tamanho do inóculo, que foi independente para cada uma das repetições e à resposta independente de este ao meio de cultura.

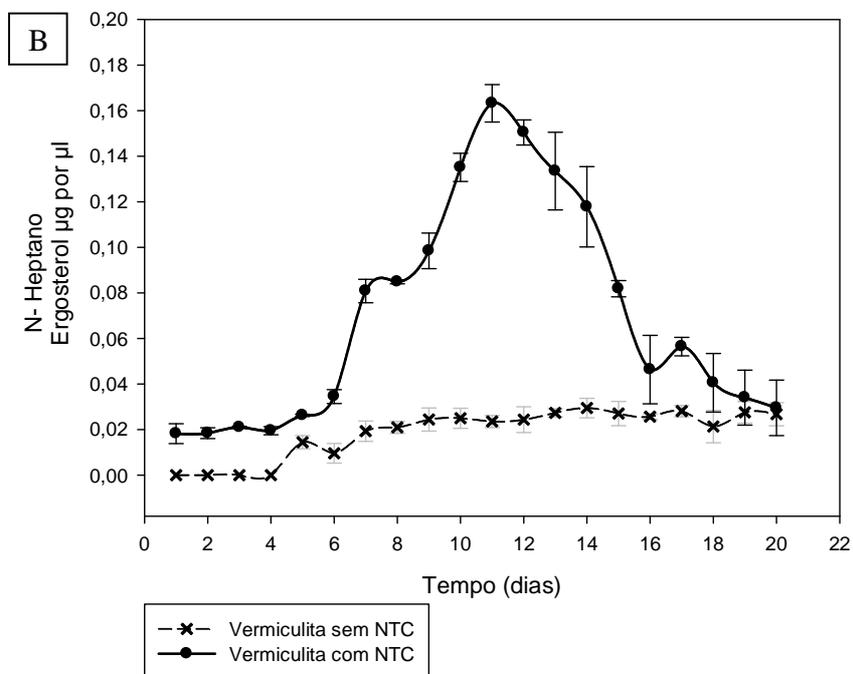
Tanto a determinação de ergosterol por n-heptano como por HPLC são bons indicadores de biomassa fúngica metabolicamente ativa, sendo que o procedimento por heptano é mais rápido e precisa de menos materiais, reagentes e aparelhos que são de uso cuidadoso como assim acontece com o HPLC; que em contrapartida, é uma metodologia mais sensível e específica, fatores muito importantes para a determinação de ergosterol exposto a nanomateriais onde os resultados não tem sido avaliados em trabalhos anteriores e podem ser mascarados pela presença de NTC.

Os dados da concentração de ergosterol na fração heptânica, crescidas em vermiculita Ref. 17062015 foram comparados com os obtidos na vermiculita sem NTC para as espécies de GM117, PLO9 e PLO13 (Figura 26), isto foi feito nos mesmos meios de cultura nas mesmas condições já descritas.

Ergosterol: GM 117 em caldo batata  
Vermiculita sem e com NTC



Ergosterol: PLO9 em caldo batata  
Vermiculita sem e com NTC



Ergosterol: PLO13 em caldo batata com torta de pinhão manso  
Vermiculita sem e com NTC

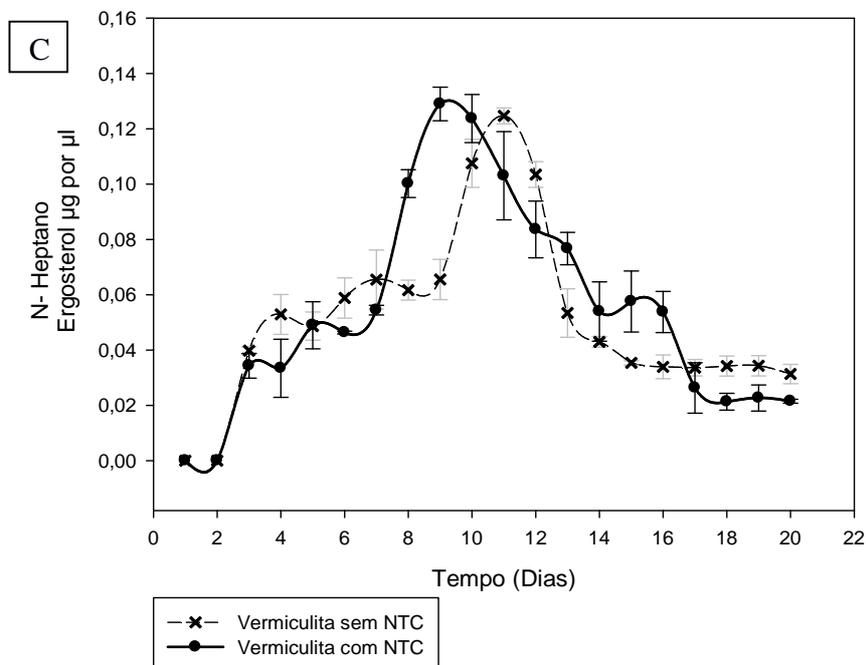


Figura 26 Concentração de ergosterol na fração heptânica de GM117, PLO9 e PLO13; todas em vermiculita sem NTC e vermiculita Ref. 170625 com NTC, nos meios onde se apresenta a melhor atividade enzimática

De forma global os gráficos da Figura 26 apresentam resultados da concentração de ergosterol para todas as espécies com um comportamento muito parecido tanto sem NTC quanto com NTC. Assim, para GM117 (Fig. 26A) se observam valores dentro da mesma escala de concentração de ergosterol, com uma amplitude muito parecida entre os dados e com o mesmo comportamento flutuante no decorrer do tempo, sendo que o início da fase *log* na vermiculita com NTC acontece 3 dias depois do que a vermiculita sem NTC. O PLO9 (Fig. 26B) tem uma escala muito diferente, mas o comportamento da curva é muito parecido. Para PLO13 (Fig. 26C) a curva tem o mesmo comportamento, salientando que gráfico do ergosterol a partir da vermiculita sem NTC apresenta um deslocamento para a direita, com o mesmo tempo na fase *Lag* e o mesmo comportamento já descrito para a fase *Log* e a fase de *declínio*.

A seguir se apresentam os gráficos das curvas de crescimento VS a atividade enzimática em vermiculita sem nanotubos de carbono A1, B1, C1 e com NTC Ref. 17062015 nomeados de A2, B2, C2; sendo as letras A para GM117, B para PLO9 e C para PLO13 (Figura 27). Adicionalmente, foi comparada a quantidade média de massa para cada uma das espécies, tanto na vermiculita sem NTC quanto com NTC e a sua correspondente média da atividade enzimática para o dia 10 de crescimento (Tabela 5).

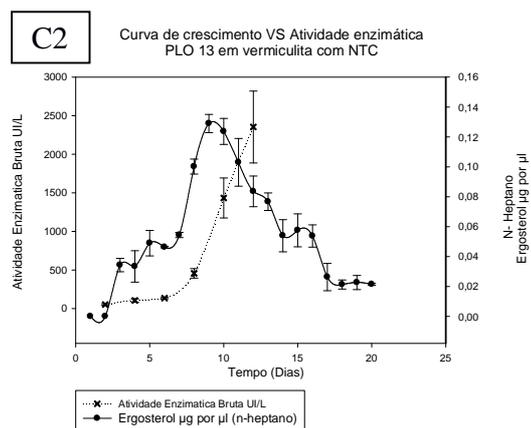
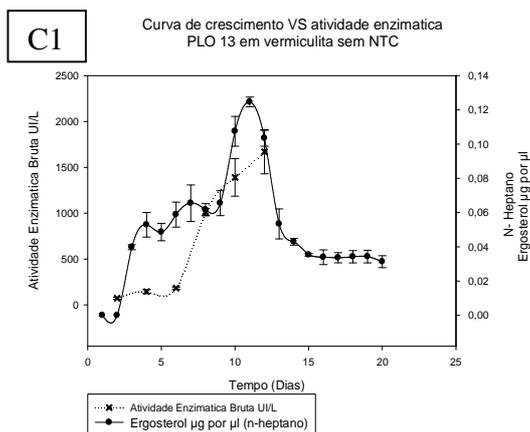
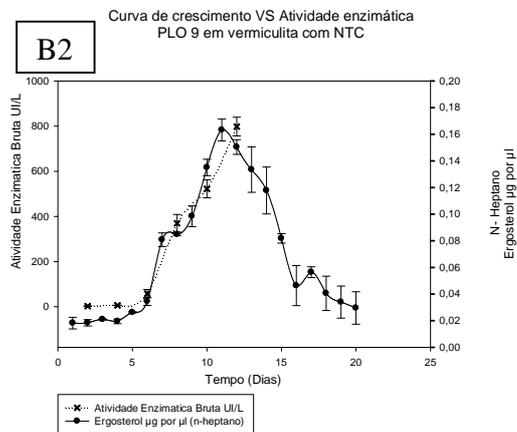
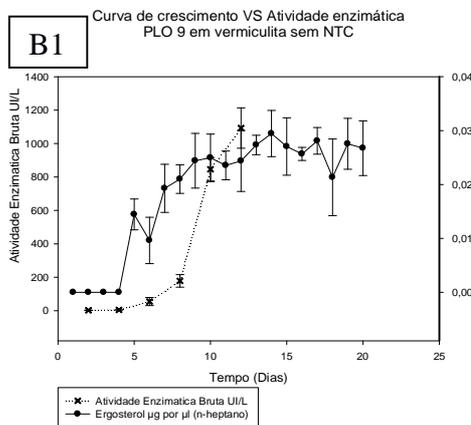
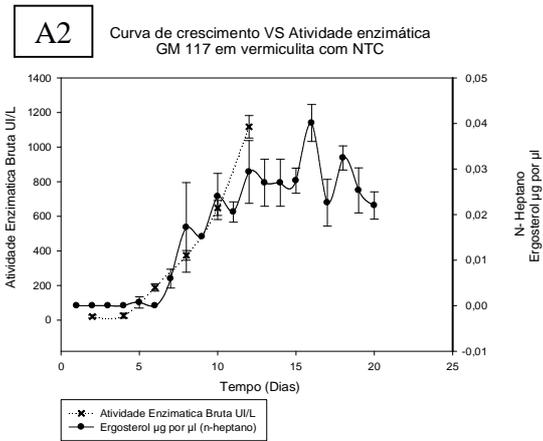
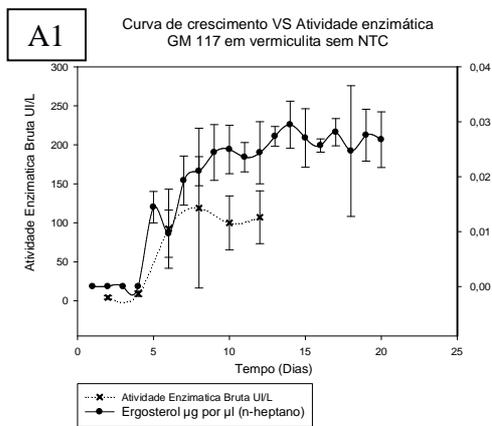


Figura 27 Gráficos das curvas de crescimento VS a atividade enzimática em vermiculita sem nanotubos de carbono A1, B1, C1 e com NTC vermiculita Ref. 17062015 A2, B2, C2; sendo que as letras A é para GM117, B é para PLO9 e C para PLO13.

Espécie	Tipo de vermiculita	de Media da quantidade de massa em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Desvio Padrão)	Media da atividade enzimática bruta em UI/L (Desvio Padrão)
GM117	Sem NTC	0,025 (0,004)	99,9 (34,53)
	Com NTC	0,024 (0,005)	648,3 (43,28)
PLO9	Sem NTC	0,025 (0,004)	846,2 (70,48)
	Com NTC	0,135 (0,006)	522,2 (39,8)
PLO13	Sem NTC	0,107 (0,008)	1390 (204,78)
	Com NTC	0,123 (0,008)	1433 (259,40)

*Tabela 5 Comparação da quantidade média de massa para cada uma das espécies tanto na vermiculita sem NTC quanto com NTC, com a correspondente média da atividade enzimática, com 10 dias de crescimento. (Estes dados foram baseados nos gráficos anteriores (Fig. 27))*

Nos gráficos A1 sem NTC e A2 com NTC para GM117 (Fig. 27), observa-se que o início da produção enzimática se dá onde inicia a fase *Log*, mantendo-se até o fim desta. A atividade observada quando usada a vermiculita com NTC é maior do que sem NTC e seu comportamento é exponencial desde o início da produção. Comparando a quantidade média de massa e a atividade enzimática (Tabela 5), pode-se observar que, com quantidades de massa muito semelhantes (0,024  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de ergosterol), a atividade enzimática para lignina peroxidase é muito maior quando usa-se a vermiculita com NTC.

Para PLO9, nota-se que, no gráfico B1 (Fig. 27), sem NTC, o aumento na produção enzimática inicia-se no dia 8, enquanto a fase *Log* inicia-se no dia 4, quer dizer, na produção tem-se um deslocamento à direita de quatro dias, sendo que o pico máximo encontra-se no dia 12, último dia de coleta para a medição da atividade, o qual não descarta que esta se mantenha nessa faixa. Diferente do comportamento no gráfico B2 da mesma

figura (Fig. 27), onde tanto a atividade enzimática e a concentração de ergosterol tem um comportamento de sobreposição. Assim, no dia 6 se inicia a fase *Log* e a atividade enzimática se desenvolve durante toda a fase até chegar ao ponto máximo no dia 12 de crescimento. Estes dados mostram como a mudança no tipo de matriz, pode levar a uma produção enzimática em diferentes estágios da curva de crescimento. Fato que foi confirmado na Tabela 5, já que para esta espécie quando imobilizada na vermiculita com NTC houve maior quantidade de massa com uma média de 0,135  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de ergosterol, com uma atividade enzimática de aproximadamente 324 UI/L menos do que quando usada a vermiculita sem NTC.

No gráfico C1 para PLO13 (Fig. 27), observa-se que a atividade enzimática só inicia no dia 6 no meio de um segundo pico de crescimento, um primeiro pico de crescimento aconteceu entre os dias 1 e 2. A atividade aumentou gradativamente alcançando o ponto máximo da atividade enzimática no dia 12, quando a concentração de ergosterol inicia o declínio. Enquanto isso, no gráfico C2, observa-se claramente como o início da atividade enzimática se dá bem no início do segundo pico de crescimento, especificamente no dia 8. Observa-se também, como o pico máximo de atividade enzimática, aqui o último avaliado, ocorre quando a concentração de ergosterol está em declínio. Já na tabela 5, se observa que a quantidade de massa se correlaciona com a produção da enzima, sendo maior a quantidade de massa e a atividade, quando imobilizados em vermiculita com NTC Ref.17062015.

O comportamento diferente notado para PLO13, onde tanto para vermiculita sem como para com NTC, se observou que a produção enzimática se apresenta no segundo pico de crescimento. O primeiro pico de crescimento pode ser explicado como o momento onde houve um consumo das fontes imediatas de carbono e nitrogênio, e a segunda se daria, quando acontece a degradação e posterior consumo de lignina para obter as fontes de energia que promovem o posterior crescimento, esta informação já é relatada na literatura por Moldes (2003). Assim, o indutor “torta de pinhão manso” aqui teria um efeito positivo.

O fato da atividade enzimática acontecer durante a fase exponencial é importante para o setor industrial, já que a manutenção de esta fase por um longo período de tempo, poderia nos levar a uma produção enzimática constante.

### 6.2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de energia Dispersiva (EDS) para avaliar a imobilização das espécies fúngicas à vermiculita Ref.: 17062015

O meio onde obteve-se a maior atividade enzimática para GM117 e PLO9 foi o caldo batata, enquanto para o PLO13 foi o caldo batata com 10% de torta de pinhão manso. Assim, nestes meios, a imobilização foi avaliada usando a microscopia eletrônica de varredura, usando como suporte a vermiculita sem NTC e com NTC Ref.: 17062015.

A preparação por metalização planetária foi usada nas amostras crescidas sobre vermiculita sem NTC. Este passo nos permitiu uma melhor visualização, como se observa nas imagens da fileira A (Figuras 28, 29 e 30). Assim a seguir, se apresentam as imagens de MEV de GM117 (Figura 28), PLO9 (Figura 29) e PLO13 (Figura 30). Imobilizados na vermiculita sem NTC na fileira A e com NTC Ref. 17062015 na fileira B, todas com 10 dias de crescimento.

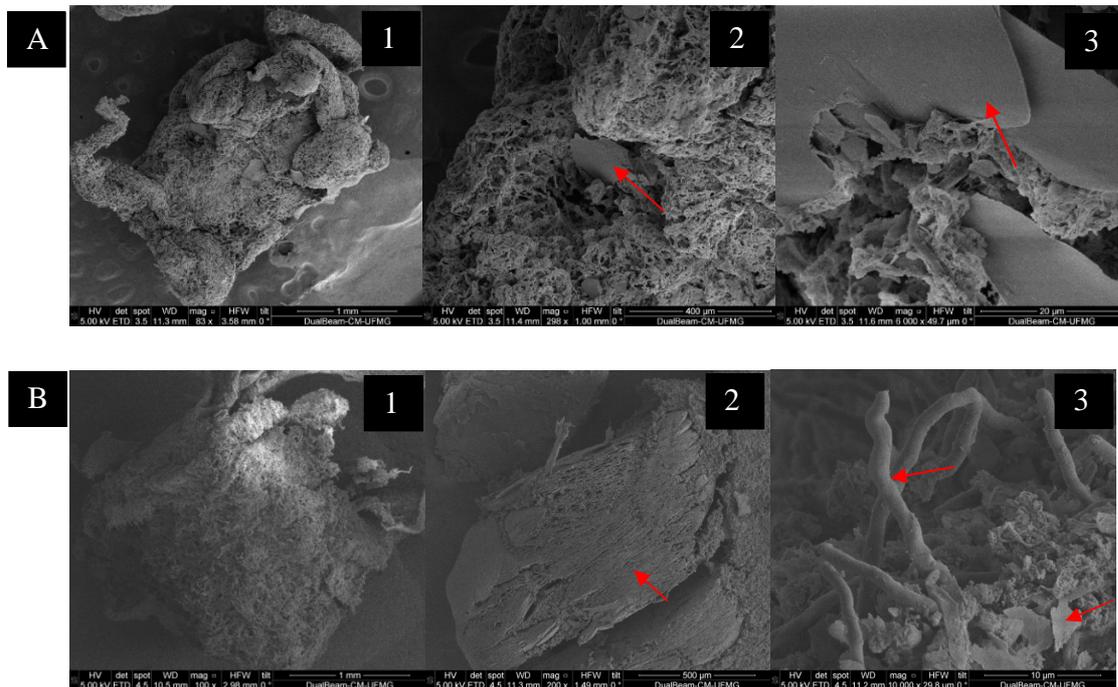


Figura 28 Electromicrografia do GM117 vermiculita sem nanotubos de carbono (línea superior A) e com nanotubos de carbono (línea inferior B).

Nas imagens A (linha superior) e B (linha inferior) observa-se como o GM117 consegue crescer tanto na presença quanto na ausência de NTC. Nas imagens A1 e B1 pode-se observar como o micélio forma uma estrutura globular quase parecida com uma semente de tamanho variável. Já nas imagens A2 e A3 é possível observar folhas de vermiculita, enquanto na imagem B2 observa-se um corte da vermiculita da estrutura globular onde já não é possível observar os espaços interlamelares. Na imagem B3 observam-se as hifas salientes do material, nota-se frações de vermiculita desfolhada assim como agregados na superfície das hifas.

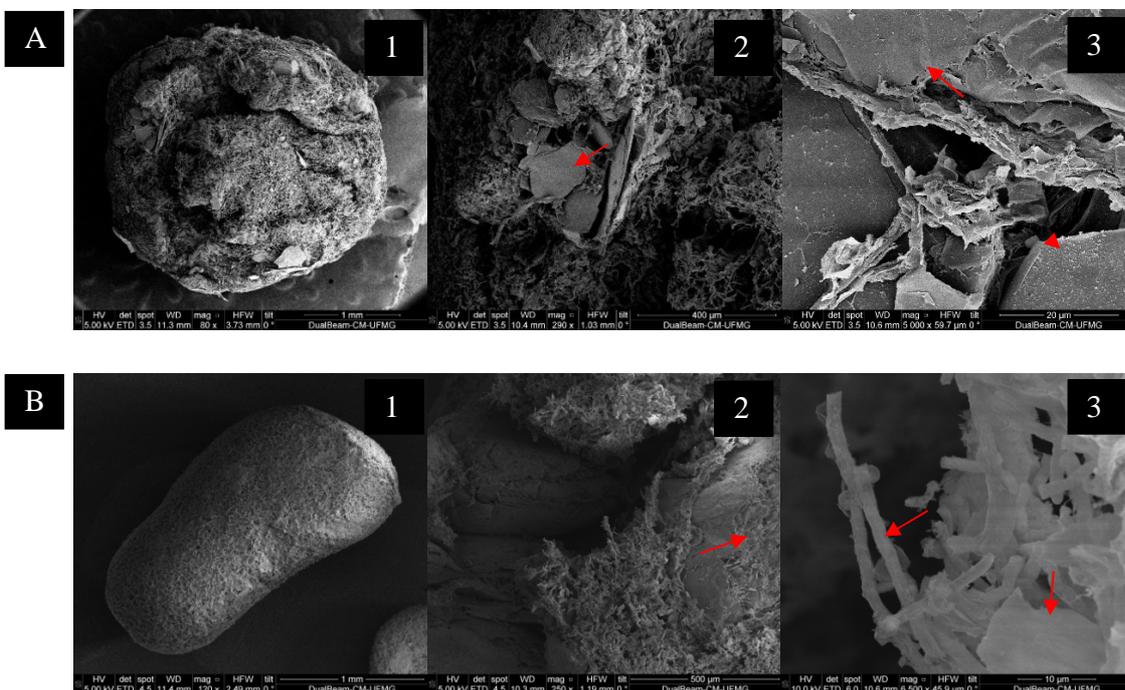


Figura 29 Electromicrografia do PLO9 vermiculita sem nanotubos de carbono (línea superior A) e com nanotubos de carbono (línea inferior B).

Nas imagens da figura 29 para PLO9 tanto imagem A1 e B1 observa-se a mesma estrutura esférica, porém mais apertada para ambos os casos. Na imagem A2 e A3 observam-se lamelas de vermiculita expostas entre o micélio. Já na figura B2 observa-se o surgimento de hifas entre os espaços interlamelares e aderida à superfície da vermiculita. Na imagem B3 observa-se com baixa qualidade as hifas e as folhas da vermiculita.

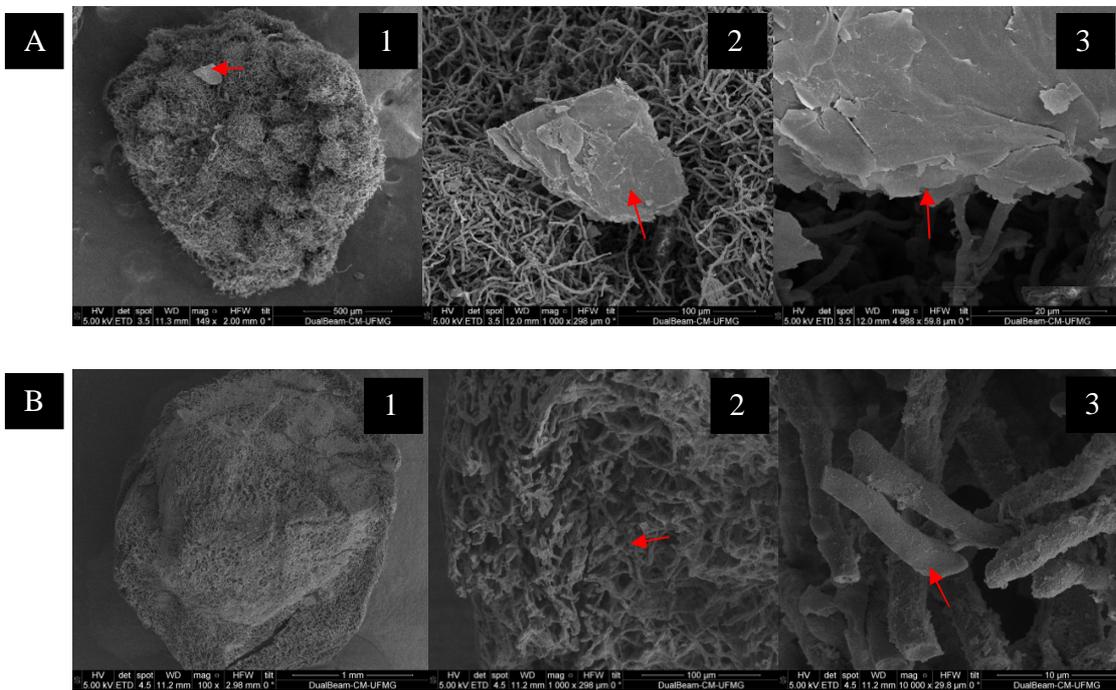


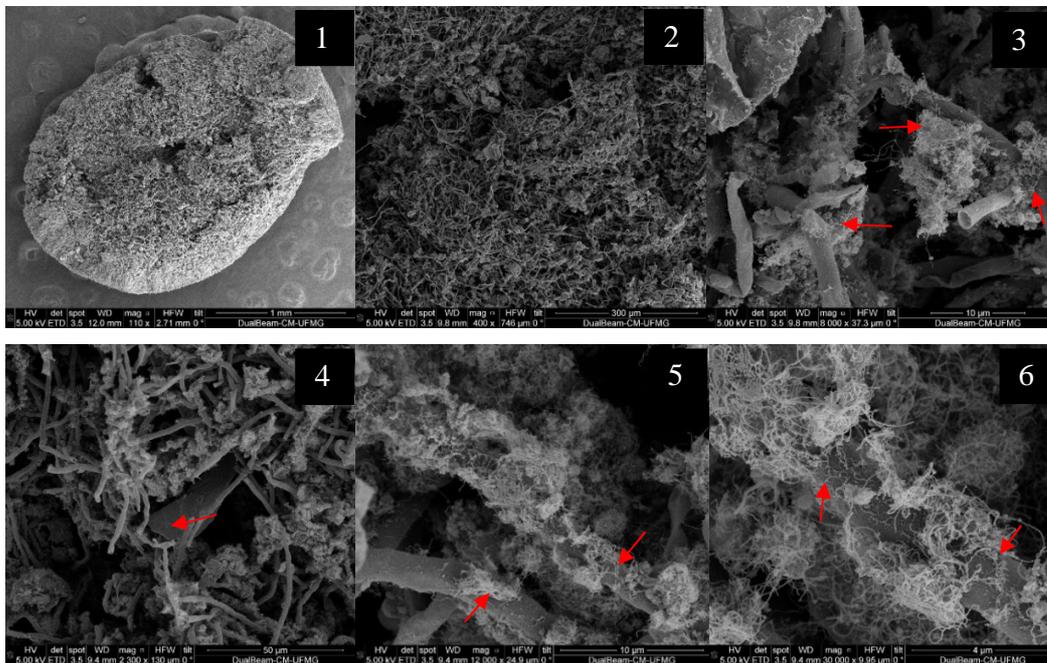
Figura 30 Electromicrografia do PLO13 vermiculita sem nanotubos de carbono (línea superior A) e com nanotubos de carbono (línea inferior B).

Na figura 30 para PLO13 observa-se a mesma estrutura globular já descrita para os dois casos (A1 e B1), com um depósito de vermiculita sobre o micélio como é observado na imagem A2 e A3. Já na imagem B2 e B3 observa-se o micélio e o corpo das hifas, mas não se observa vermiculita, o qual não significa que não faça parte da estrutura.

De forma geral, as imagens de microscopia evidenciam um crescimento das espécies fúngicas expostas a vermiculita sem e com nanotubos de carbono, sendo que, para todos os casos, sempre houve a formação de uma estrutura globular decorrente da agitação rotativa durante o crescimento.

**6.2.3.3 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a imobilização da melhor espécie produtora, usando a vermiculita Ref.: 24062015**

A melhor espécie produtora foi o PLO13, crescido em caldo batata com torta de pinhão manso 10%, este foi selecionado para o crescimento e avaliação da aderência da espécie fúngica ao suporte vermiculita Ref. 24062015 através da MEV. A seguir, se apresentam as imagens condensadas (Figura 31), sendo que, estas foram tomadas após 10 dias de crescimento.



*Figura 31 Electromicrografia de PLO13 após dez dias de crescimento em caldo batata com torta de pinhão manso em vermiculita impregnada de ferrita de cobalto e com NTC após CVD*

Na imagem 1 da figura 31 se observa a, já descrita, forma globular observada em figuras anteriores. Na imagem 3 da figura, nota-se a presença de micélio associado a estruturas de nanotubos de carbono. Na imagem 4, se observa uma folha de vermiculita, agregados de NTC e hifas, já nas ilustrações 5 e 6 se observam as hifas cobertas de NTC. Assim nas imagens do MEV do crescimento do PLO13 na vermiculita com ferrita e NTC, foi possível observar a presença do micélio e com um aumento maior das hifas cobertas com NTC.

## 7. CONCLUSÕES

- O crescimento e produção de lignina peroxidase dos isolados GM117, PLO9, e PLO13 não foi inibido pelo tratamento de vermiculita com nanotubos de carbono.
- Os crescimentos feitos usando a torta de pinhão manso como indutor aumentaram a produção de LiP que conservou sua capacidade de descolorir soluções do corante RBBR.
- A produção de LiP por isolados fungicos testados dá-se, predominantemente, na *fase Log* de crescimento, o que significa que a manutenção desta faixa poderia levar a uma grande produção em escala industrial.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGHABOZORG, H. R.; KISH,S.S; RASHIDI, A. M. Solubility of functionalized carbon nanotubes in different solvents. **Journal Of Applied Chemical Researches: Winter**, v.3 n 12, p.29-33., 2010.

AITKEN, M. D.; MASSEY, I. J.; CHEN, T. P.; HECK, P. E. Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants. **Water Research**, 28, 1879–1889., 1994.

AITKEN, M. D.; IRVINE, R. L. . Stability testing of ligninase and Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology And Bioengineering**, 34,1251–1260., 1989.

ANDRINO A, MORTE A, HONRUBIA M. Caracterización y cultivo de tres cepas de *pleurotus eryngii* (fries) quélet sobre sustratos basados en residuos agroalimentarios. **Anales De Biologia** 33: 53-66., 2011

ATIEH, Muataz Ali et al. Effect of carboxylic functional group functionalized on carbon nanotubes surface on the removal of lead from water. **Bioinorganic chemistry and applications**, v. 2010, 2011.

BADDOUR, C. AND C. BRIENS. Carbon nanotube synthesis: A review. **International Journal Of Chemical Reactor Engineering**., 2005

BAPTISTA, N. M. Q. et al. Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos. **SCIENTIA PLENA**, v. 8, p. 1–7, 2012.

CAMILO, R. L. **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE FERRITA DE COBALTO RECOBERTAS POR 3-AMINOPROPILTRIETOXISSILANO PARA USO COMO MATERIAL HÍBRIDO EM NANOTECNOLOGIA**. 209 p. Tese (Doutorado) -Universidade de São Paulo., 2006.

CARVALHO, M. A. **ATIVIDADE DE LIGNINASES E CELULASES DE LINHAGENS DE *Lentinula edodes* ( Berk .)**. [s.l.] Universidade Federal de Lavras., 2011.

CARVALHO, W. et al. Revisão: Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Quim. Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191–2195., 2009.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Oxford, v. 42, p. 225.,1989.

CHEN QI-HE, SVEN KRÜGENER & THOMAS HIRTH &. **Biochem Biotechnology** 165: 700–718., 2011.

COCONI-LINARES, N. et al. High-yield production of manganese peroxidase, lignin peroxidase, and versatile peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 98, n. 22, p. 9283–94, nov., 2014.

COLONNA, S.; GAGGERO, N.; RICHELMI, C.; PASTA, P. Recent biotechnological developments in the use of peroxidases. **Tibtech.**, 17, p. 163-168.,1999

COUTO, S. R.; TOCA-HERRERA, J. L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 6, p. 558–69., 2007.

DABDOUB MIGUEL J. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria.,**QUIM. NOVA**, Vol. 32, No. 3, p. 776-792., 2009

DE JONG, E.; FIELD J.A.; DE BONT. J.A.M. Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. **Fems Microbiol Ver**, 13: p. 153– 88., 1994.

DE RIDDER-DUINE, A. S. et al. Evaluation of a simple, non-alkaline extraction protocol to quantify soil ergosterol. **Pedobiologia**, v. 50, n. 4, p. 293–300, set. 2006.

DESTÉFANO, R. H. R. **DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE METARHIZIUM ANISOPLIAE EM LARVAS DE DIATRAEA SACCHARALIS POR PRIMERS ESPECÍFICOS**. 87 p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, 2003.

DUFRESNE, A., et al. Processing and characterization of carbon nanotube/poly(styrene-co-butyl acrylate) nanocomposites. **Journal Of Materials Science**,37(18): p. 3915-3923., 2002

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, 28, 83–99., 2002.

DRESSELHAUS, M.S., et al., Raman spectroscopy of carbon nanotubes. **Physics Reports**,. 409 (2)., 2005

ELIZEI, V. G. et al. Imobilização de fungos filamentosos com potencial para uso agroindustrial. **Arquivos Do Instituto Biológico**, v. 81, n. 2, p. 165–172, abr. 2014.

ENDO, M., ET AL. The Production And Structure Of Pyrolytic Carbon Nanotubes (Pcnts). **Journal Of Physics And Chemistry Of Solids**,.v. 54, n. 12, p. 1841-1848., 1993

FERNANDEZ et al. Immobilising ligninolytic fungus for removing reactive black 5 dye. **Revista Colombiana De Biotecnología**, vol. XI, núm. 1, julio, 2009, pp. 59-72.

FU, Y.; VIRARAGHAVAN. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. **Biores Technol.**, 79, 251–262., 2001.

GALVÃO, J. G. et al. Uso do fungo *Fusarium oxysporum* Como Indicador De Ametrina , Através Da Medida De Biomassa , Using the fungi *fusarium oxysporum* as bioindicator of ametrine by measuring biomass and ergosterol. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 4, p. 840-845, 2003.

GIL, L. M.; MANJARRES-PINZON, K.; RODRIGUEZ-SANDOVAL, E. Influence The Addition Of Nitrogen Source On Production Of Ligninases. v. 10, n. 1, p. 173–181, 2012.

GONG, K., YAN, Y., ZHANG, M., XIONG, S., MAO, L. Eletrochemistry and electroanalytical applications of carbon nanotubes: A review. **Analytic Sciences**,. v. 21 p. 1383-1393., 2005.

GÜL, Ü. D. Treatment of dyeing wastewater including reactive dyes (Reactive Red RB , Reactive Black B , Remazol Blue ) and Methylene Blue by fungal biomass. **Water SA**, v. 39, n. 5, p. 593-598, 2013.

GUO, T., ET AL. Catalytic Growth Of Single-Walled Nanotubes By Laser Vaporization. **Chemical Physics Letters**,.243(1-2): p. 49-54., 2005.

HARVEY, P.J.; SCHOEMAKER, H.E.; PALMER, J.M. Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. **Febs Lett**, 195, 242–246., 1986.

IJIMA,S., Helical Microtubulos of Grafhtic carbon. **Nature**,. V. 354, p.56-58., 1991

JANUSZ, G. et al. Enzyme and Microbial Technology Fungal laccase , manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 1, p. 1–12, 2013.

JAQUELINE, M. et al. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota : **A Review**. v. 13, n. Figure 1, p. 1–13, 2010.

JOO SS, RYU IW, PARK JK, *et al.* Molecular cloning and expression of a laccase from *Ganoderma lucidum*, and its antioxidative properties. **Mol. Cells**. V. 25, p. 112–8., 2008.

JOSHI, K. A.; PROUZA, M; KUM, M; WANG., TANG, J.; HADDON, R.;CHEN, W.; MULCHANDANI, A. V- Type nerv agent detection using a carbon nanotube-based amperometric enzyme electrode. **Anal. Chem**. V. 78, p. 331-336., 2006.

KANDELBAUER, A.; MAUTE, O.; KESSLER, R.W.; ERLACHER, A.; GUBITZ, G.B. Study of Dye Decolorization in an Immobilized Laccase Enzyme Reactor Using Online Spectroscopy. **Biotechnology And Bioengineering**, 87, 552-563., 2004.

KAHRAMAN, S.S.; GURDAL, I.H. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. **Bioresour. Technol.**, 82, p. 215-217., 2002.

KARAM, J.; NICELL, J.A. Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. **J. Chem. Tech. Biotechnol**. V.69, P. 141-153., 1997

KERSTEN, D. C. AND P. J. Enzymology and Molecular Biology of Lignin Degradation. **Biochemistry and Molecular Biology**, p. 28, 2004.

KIRK T. KENT. Enzimatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **ANN. Rev. Microbiol.** 1987.41:465-505., 1987.

LEE, Y.; KWON, O.; YOON. Immobilization of horseradish peroxidases on multiwall carbon nanotubos and its electrochemical properties. **Biotech. Letters.**, v. 28, p. 39-43., 2006.

LEONOWICZ, A.; CHO, N.; LUTEREK, J.; WILKOLAZKA, A.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; MATUSZEWSKA, A. Et al. Fungal laccase: properties and activity on lignin. **J Basic Microbiol**, V 41, P. 185– 227., 2001.

LI, S. et al. Technology Prospecting on Enzymes : Application, Marketing and Engineering. **Chemical Industr.** n. September, 2012.

LUO, H.; SHI, Z.; LI, N.; GU, ZHUANG, Q. Investigation of the electrochemical and electrocatalytic behavior of single – wall carbon nanotubos film on a glassy carbon electrode. **Anal. Chem.**,v., 73, p. 915 – 920., 2001.

MAGANHOTTO, C. M.; MELO, I. S. DE; ROBERTO, P. **Produção de enzimas ligninolíticas por fungos isolados de solos sob cultivo de arroz irrigado.** Jaguariúna, SP: [s.n.].

MARTINEZ, A. T. Molecular Biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. **Enzyme And Microbial Technology**, V 30, P 425-444., 2002.

MENDONÇA M.J E COLS. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A Review. **Electronic Journal Of Biotechnology** ISSN: 0717-3458 <http://www.ejbiotechnology.info> DOI: 10.2225/vol13-issue6-fulltext-2., 2010.

MENDOZA. Estudio de enzimas ligninolíticas producidas por *pleurotus ostreatus* y *lentinula edodes* usando diferentes inductores. Proyecto de maestria Universidad autónoma de Madrid., 2009.

MENEZES, C. R. DE; BARRETO, A. R. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 2, p. 1365-1391, 2015.

MG, L. Atividade de ligninases e celulases de linhagens de *Lentinula Edodes* (Berk). 2011.

MOLDES, D. et al. Study of the degradation of dyes by MnP of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a fixed-bed bioreactor. **Chemosphere**, v. 51, n. 4, p. 295–303, abr. 2003.

MOLDES, D. et al. Study of the degradation of dyes by MnP of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a fixed-bed bioreactor. **Chemosphere**, v. 51, n. 4, p. 295–303, abr. 2003.

NILADEVI, K. N.; PREMA, P. Effect of inducers and process parameters on laccase production by *Streptomyces psammoticus* and its application in dye decolourization. **Bioresource technology**, v. 99, n. 11, p. 4583–9, jul. 2008.

OLIVEIRA, B. L. DE. Síntese de nanotubos de carbono ( NTC ) por deposição química de vapor empregando Fe / caco 3 e Fe / NTC como catalisador.,Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em engenharia química , coppe [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

ORTH, A. N. N. B.; ROYSE, D. J.; TIEN, M. Ubiquity of Lignin-Degrading Peroxidases Wood-Degrading Fungi Various. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 12, p. 4017-4023, 1993.

PG, A. D. P. et al. Compósitos anfílicos magnéticos baseados em nanotubos e nanofibras de carbono e vermiculita para adsorção de Etinilestradiol . Resultados e Discussão. v. 26, n. 1c, p. 2009, 2009.

PURCENO, A. D. et al. Carbon nanostructures-modified expanded vermiculites produced by chemical vapor deposition from ethanol. **Applied Clay Science**, v. 54, n. 1, p. 15–19, nov. 2011.

QI-HE, C. et al. Co-cultured production of lignin-modifying enzymes with white-rot fungi. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 165, n. 2, p. 700–18, set. 2011.

RAMÍREZ, J. G. V. **BIODEGRADACIÓN DE SUSTRATOS HIDROFÓBICOS UTILIZANDO HONGOS FILAMENTOSOS Y RECUPERACIÓN DE HIDROFOBINAS**. 146 p. Tese (Doutorado) - Universidad Autónoma Metropolitana, 2009.

REDDY, C.A. (1995). The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Curr Opin Biotechnol* 6:320–328.

REGINA M et al. (2009). Atividade de enzimas oxidativas do *Lentinula edodes* em substratos agroindustriais. **Ciências Agrárias, Londrina**, v. 30, n. 4, p. 881-888, out./dez. 2009.

RIGAS F, PAPADOPOULOU K, DRITSA V, DOULIA D. Bioremediation of a soil contaminated by lindane utilizing the fungus *Ganoderma australe* via response surface methodology. **Journal of hazardous Materials**, v. 140, n. 1, p. 325-332, 2007

RIGAS, F.; DRITSA, V. Decolourisation of a polymeric dye by selected fungal strains in liquid cultures. **Enzyme and microbial technology**, v. 39, n. 1, p. 120-124, 2006.

RODRÍGUEZ COUTO, S.; TOCA HERRERA, J. L. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 5, p. 500–13, 2006.

RODRIGUES J M, DIAS M, ALBINO S, PEREIRA, KASUYA M C. Lignocellulolytic Enzyme Production Of *Pleurotus Ostreatus* Growth In Agroindustrial Wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, 1508-1515, ISSN 1517-8382., 2012.

SALDANHA, A. L. M. **Produção em escala piloto de compósitos à base de vermiculita e nanofibras de carbono.** 146 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 2014.

SANODIYA BS, THAKUR GS, BAGHEL RK, PRASAD GB, BISEN PS. *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10 (8): pp. 717–42., 2009.

SANDLER, J. et al. Development of a dispersion process for carbon nanotubes in an epoxy matrix and the resulting electrical properties. *Polymer*, v. 40, n. 21, p. 5967-5971, 1999.

SANTOS, J. R. A. et al. Dynamic interaction between fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 56, n. 5, p. 2553–8, maio 2012.

SCHOEMAKER, H.E.; LUNDELL, T.K.; HATAKKA, A.I.; PIONTEK, K. The oxidation of veratryl alcohol, dimeric lignin models and lignin by lignin peroxidase the redox cycle revisited. *FEMS Microbiol Rev*, 13: 321–32., 1994.

SCHOEMAKER, H. E.; PIONTEK, K. On the interaction of lignin peroxidase with lignin. *Pure Applied chemistry*, V. 68, P. 2089–2096., 1996.

SISSI WACHTEL-GALOR, JOHN YUEN, JOHN A. BUSWELL, AND IRIS F. F. BENZIE. Book: Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. Chapter 9 ,*Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi). **A Medicinal Mushroom.** Sivakumar, V.M., et al., 2010.

SUDHA H. PADMA N. Optimization of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and Lac production from *Ganoderma lucidum* under solid state fermentation of pineapple leaf. **BioResources**; V.8, P. 250., 2013.

TANS, S.J., A.R.M. Verschueren, and C. Dekker, Room-temperature transistor based on a single carbon nanotube. *Nature*, V. 393, p. 49-52., 1998.

TIEN, M.; KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* **Burds. Science.**, V. 221, p. 661–3., 1983.

TSENG, Y.C., et al. Monolithic integration of carbon nanotube devices with silicon MOS technology. **Nano Letters**, V 4, p. 123-127., 2004.

VALLI, K.; WARIISHI, H.; GOLD, M.H. Oxidation of monomethoxylated aromatic compounds by lignin peroxidase: role of veratryl alcohol in lignin biodegradation. **Biochemistry.**, V. 29, p. 8535–8539., 1990.

WARD, J.W., B.Q. WEI, AND P.M. AJAYAN. Substrate effects on the growth of carbon nanotubes by thermal decomposition of methane. **Chemical Physics Letters**, 376(5-6): p. 717-725., 2003.

WELINDER, K. G.; MAUROZ, J. M.; NRSKOV-LAURITSEN, L. Structure of plant and fungal peroxidases. **Biochemical Society Transactions**, v. 20, n. 1084, p. 337–340, 1992.

YUEN JW, GOHEL MD. Anticancer effects of *Ganoderma lucidum*: a review of scientific evidence. **Nutr Cancer** 53 (1): pp. 11–7., 2005.

ZURITA, G. M. **ESTUDIO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS PRODUCIDAS POR PLEUROTUS OSTREATUS Y LENTINULA EDODES USANDO DIFERENTES INDUCTORES**. 44 p. Dissertação (Mestrado) - Universidad Autonoma de Madrid, 2012.