

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

# BIORREMEDIAÇÃO DE FENOL EM MEIO AQUOSO POR FUNGOS ENDOFÍTICOS DE VIDEIRA

DANIEL FLORÊNCIO FILHO

 ${\bf ITAPETINGA-BAHIA-BRASIL}$ 

**JULHO - 2018** 

## DANIEL FLORÊNCIO FILHO

# BIORREMEDIAÇÃO DE FENOL EM MEIO AQUOSO POR FUNGOS ENDOFÍTICOS DE VIDEIRA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: DSc. Silmara Almeida de Carvalho

ITAPETINGA – BAHIA - BRASIL

F632b Florêncio Filho, Daniel.

Biorremediação de fenol em meio aquoso por fungos endofíticos de videira / Daniel Florêncio Filho. Itapetinga, Ba: UESB, 2018. 54f

(Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, sob orientação da Profa. DSc. Silmara Almeida de Carvalho)

1.Lacase 2.Biodegradação 3.Poluentes I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II. Título

CDD - 363.728

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié



## UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB Recredenciada pelo Decreto Estadual Nº 9.996, de 02.05.2006 Programa de Pós-Graduação em Química



# Daniel Florêncio Filho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

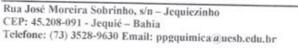
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20/07/2018.

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Silmara Almeida de Carvalho (UFMG, Belo Horizonte-MG,2009) (Orientador)

Profa. Dra. Alexilda Oliveira de Souza (UNICAMP, Campinas-SP, 2001)

Prof. Dr. Nívio Batista Santana (UESC, Ilhéus-BA, 2017)





#### **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos os que contribuíram para o êxito deste trabalho, especialmente:

À Deus por ter me iluminado e dado forças para finalizar este trabalho.

À minha mãe, Conceição, a quem amo e dedico tudo o que faço, sempre me apoiando em tudo!

Aos meus irmãos, Danilo, Maisa e Danielson, pela força que sempre me deram, amo vocês!

Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silmara Almeida de Carvalho, pela orientação e paciência.

Aos Prof. Dr. Alexilda Oliveira de Souza do Laboratório LCQM-Laboratório de Catálise e Química dos materiais e Kátia Iro Altides Mota do LABRA da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, por aceitar-me em seus laboratórios para a realização de grande parte dos experimentos deste trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora, pelas sugestões apresentadas.

À Mariana Alves, Laísa Nogueirae, em especial, à Luciana de Faria pela paciência em compartilhar conhecimentos e bons momentos no laboratório durante os trabalhos.

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia pela ajuda e parceria necessárias.

Ao Quarteto Fantástico, Diretoria, CAIC, Cortiço, Ceacrom, pelos muitos momentos de descanso e descontração.

Enfim, a todos, os meus mais sinceros agradecimentos.

Às pessoas citadas e aquelas que possa ter esquecido o meu carinho e amizade.

**MUITO OBRIGADO!** 

"Ao meu pai, maior exemplo de homem justo e humilde, Daniel Florêncio (*in memorian*), por tudo que fez por mim e pela energia a mim concedida."

**DEDICO** 

Ante Deus, somos todos igualmente sábios – e igualmente tolos.

Albert Einstein

#### **RESUMO**

FLORÊNCIO FILHO, D. **Biorremediação de fenol em meio aquoso por fungos endofíticos de videira.** Itapetinga – BA: UESB, 2018. 54 p. (Dissertação – Mestrado em Química – Química Analítica).\*

Altas cargas de poluentes são lancadas de forma indevida no meio ambiente, e isso faz com que todo o sistema que a recebe seja impactado e prejudicado. Para minimizar esses impactos, técnicas de limpeza e purificação são adotadas, porém, além de dispendiosas e de difícil adaptação ao meio impactado, geram produtos de remediação recalcitrantes, transferindo apenas o problema de fase. Estudos em áreas afetadas por essa problemática mostraram que alguns micro-organismos são resistentes à presença dos contaminantes e que alguns desses fazem o uso do poluente como fonte de nutriente para sua manutenção e sobrevivência. Sendo assim, o presente trabalho compreendeu em testar fungos filamentosos isolados de videiras, com o intuito de aplicar a biorremediação de águas poluídas com altas concentrações de fenol. Para isso, foram feitos testes de resistência desses micro-organismos, em meios sólido de crescimento - placas de meio BDA- enriquecido com o fenol com diferentes concentrações (0,200 g L<sup>-1</sup> e 0,700 g L<sup>-1</sup>). Os isolados que apresentaram resistência foram postos a crescimento em um sistema-modelo de poluente, composto de solução aquosa de fenol, de concentração 0,500 g L<sup>-1</sup>, visando à degradação do fenol e determinação de atividade enzimática da lacase, enzima do grupo da polifenol-oxidase estudada neste trabalho. Para a determinação da sua atividade foi utilizado o reagente ABTS, um mediador enzimático eficaz no aumento do potencial de oxirredução da enzima, acrescido de solução tampão acetato pH 5,0. Após a cultivo e medição da de atividade enzimática, observou-se que o isolado 01 apresentou o melhor comportamento biorremediador e de maior atividade enzimática, sendo este selecionado para análise de cinética de degradação e enzimática, termoestabilidade, pH ótimo e otimização de condições de análise por um delineamento de composto central rotacional (DCCR), onde se avaliou concentrações de NaCl e valores de pH, bem como as interações entre si. Para a degradação do fenol, o isolado mostrou eficiência no consumo do poluente, reduzindo 100% de fenol no meio, e apresentou uma atividade enzimática máxima de 0,242 ± 0,096 UI.mL<sup>-1</sup>. Nos testes de termoestabilidade obteve-se a atividade enzimática reduzida nos primeiros 10 minutos à 40°C, apresentando também maior afinidade ao pH ácido, para as faixas de pH ótimo. Os valores para a cinética enzimática foram 0,168 g L<sup>-1</sup> para  $K_m$  e 0,697g  $L^{-1}$  min $^{-1}$  para  $V_{max.}$  O DCCR reafirmou que o pH baixo do meio aumenta a atividade enzimática, que em concentrações de NaCl influenciam na atividade da enzima. Diante do exposto, foi possível concluir que o isolado selecionado foi eficiente na degradação de fenol em águas contaminadas e a sua enzima apresentou uma alta atividade no meio reacional, fazendo dela uma opção favorável e limpa, visto que os produtos da biorremediação têm a sua toxicidade reduzida e/ou eliminada.

Palavras-chave: lacase, biodegradação, poluentes.

<sup>\*</sup>Orientador: Silmara Almeida de Carvalho, D.Sc., UESB

#### **ABSTRACT**

FLORÊNCIO FILHO, D.Bioremediation of phenol in aqueous solution by endophytic vine fungi. Itapetinga – BA: UESB, 2018. 54 p. (Thesis – Master in Chemistry – Analytical Chemistry).\*

High loads of pollutants are unduly thrown into the environment, and this impact and harms the whole system. In order to minimize these impacts, cleaning and purification techniques are adopted. However, these techniques are generally expensive and difficult to adapt to the impacted environment and they generate recalcitrant remediation products, which only transfer the problem to another medium. Studies in areas affected by this problem have shown that some microorganisms are resistant to the presence of contaminants and some of them use of the pollutant as a source of nutrients for their maintenance and survival. Therefore, the present work comprised testing vine isolated filamentous fungi, in order to apply the bioremediation of polluted water with high concentrations of phenol. Thus, resistance tests of these microorganisms were performed in solid growth medium - BDA medium plates enriched with phenol at different concentrations (0.200 g L<sup>-1</sup> and 0.700 g L<sup>-1</sup>). Aiming the phenol degradation and determination of the enzymatic activity of laccase, a polyphenol group enzyme studied in this work, resistant isolates were grown in a pollutant model system composed of 0.500 g L<sup>-1</sup> aqueous phenol solution. For the determination of its activity the ABTS reagent, that is an enzymatic mediator effective in increasing the oxidation potential of the enzyme, was used and acetate buffer pH 5.0 was also added. After fermentation and enzyme activity measurement, it was observed that the isolate 01 presented the best bioremediating behavior and the highest enzymatic activity so it was selected for degradation and enzymatic kinetic analysis, thermostability, optimum pH and optimization of analysis conditions by a central rotational composite design (DCCR), which evaluated NaCl concentrations and pH values, as well as the interactions between them. For the degradation of phenol, the isolate showed efficiency in the pollutant consumption by reducing 100% of phenol in the medium, and showed a maximum enzymatic activity of  $0.242 \pm 0.096$  IU mL<sup>-1</sup>. In the thermostability tests the reduced enzymatic activity was obtained in the first 10 minutes at 40°C, and also presenting higher affinity to the acidic pH for the optimum pH ranges. The values for the enzymatic kinetics were  $K_m = 0.168 \text{ g L}^{-1}$ ; and  $V_{\text{Max}} = 0.697 \text{ g L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . The DCCR reaffirmed that the low pH of the medium increases the enzymatic activity, whereas the NaCl concentration influences the activity of the enzyme. Finally, it was possible to conclude that the selected isolate was efficient in the degradation of phenol in contaminated water and its enzyme has a high activity in the reaction medium, by making it a favorable and clean option, since the bioremediation products have their toxicity reduced and / or eliminated.

**Keywords:** laccase, biodegradation, pollutants.

<sup>\*</sup>Adviser: Silmara Almeida de Carvalho, D.Sc., UESB

# LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Propriedades físico-químicas do fenol    23
Tabela 4.1. Matriz de delineamento de composto central rotacional para o estudo d
otimização de atividade de lacase.
<b>Tabela 5.1.</b> Delineamento experimental aplicado, apresentando a combinação da variáveis independentes (pH e % NaCl) e valores médios de atividade enzimática d lacase em sistema-modelo de contaminante de fenol após 20 dias de fermentação 4-
<b>Tabela 6.</b> Dados da seleção primária para teste de crescimento de isolados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) com enriquecimento de fenol nas concentrações de 20 mg L <sup>-1</sup> e 700 mg L <sup>-1</sup>

# LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Análise da degradação de Carbofurano e Fenol-carbofurano por CLAE
<b>Figura 2.2.</b> Estrutura dos principais esqueletos fenólicos
<b>Figura 2.3.</b> Quadro de teores máximos de fenóis totais permitidos em água
<b>Figura 2.4.</b> Rota metabólica de degradação de fenol por bactéria
<b>Figura 2.5.</b> Mecanismo de degradação de fenol por Polifenol oxidase fúngica
<b>Figura 2.6.</b> Esquema genérico do sítio ativo da Lacase
<b>Figura 2.7.</b> Ciclo de degradação do fenol pela Lacase
Figura 2.8. Estrutura molecular do radical ABTS
<b>Figura 4.1.</b> Curva de calibração de concentrações de fenol
Figura 5.1. Crescimento do isolado 01 na seleção primária em placa de PDA adicionado
de (a) 200 mg L <sup>-1</sup> e (b) 700 mg L <sup>-1</sup>
<b>Figura 5.2.</b> Seleção do melhor isolado biorremediante
Figura 5.3. Perfil de degradação de fenol de concentração 0,500 g L <sup>-1</sup> por tempo de
fermentação pelo isolado 01 selecionado
<b>Figura 5.4.</b> Atividade enzimática de lacase durante o tempo de fermentação
Figura 5.5. Gráfico de dispersão da atividade enzimática de Lacase em relação ao
tempo para uma faixa de cinco tratamentos térmicos
<b>Figura 5.6.</b> Atividade enzimática de lacase sob a variação de potencial hidrogeniônico
Figura 5.7. : Perfil de degradação do isolado 01 frente a diferentes concentrações de
fanol 40

# LISTA DE FIGURAS

Figura	<b>5.8.</b>	Determinação	dos	parâmetros	$K_{\text{m}}$	e	$V_{\text{m\'ax}}$	aplicando	0	método	de
quantifi	cação	linear duplo red	cíproc	co de Linewe	aver-	Bu	rk		••••		. 41
Figura	<b>5.9.</b> S	superfície de Re	spost	a em função	das v	ari	áveis	independer	ntes	da ativid	lade
enzimát	ica de	e lacase, produz	zida p	elo isolado	01, n	a d	legrad	ação de fe	nol	em siste	ma-
modelo,	em fi	unção dos níveis	s de p	H e porcenta	gem	de l	NaCl a	adicionado	(%	NaCl)	. 43
<b>T</b>	<b>=</b> 40 :	<b>D</b> . 1 D			~				. •		
Figura	5.10.	Diagrama de Pa	reto <sub>l</sub>	para a otimiz	ação	da	ativida	ide enzimá	tıca	de lacase	e na
biorrem	ediacâ	ăo de fenol									. 44

#### LISTA DE ABREVIATURAS

°C Graus Celsius  $gL^{-1}$ Gramas por litro mg L<sup>-1</sup> Miligramas por litro Porcento % pН

Potencial hidrogeniônico

**PPO** Polifenol oxidases

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência **CLAE** 

**EM** Espectrômetro de massas

**NaCl** Cloreto de sódio Rotações por minuto rpm Batata-Dextrose-Ágar **BDA** 

**DCCR** Delineamento de composto central rotacional

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>Sulfato de amônio

> Constante de dissociação ácida pKa

g mol<sup>-1</sup> Gramas por mol

 $H_2O$ Água Cu Cobre

> $O_2$ Gás oxigênio

**ABTS** 2,2´- azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

V volts

Constante de Michaelis-Menten  $K_{\rm m}$  $V_{\text{m\'ax}}$ Velocidade máxima de reação

 $V_{o}$ Velocidade inicial

**SMC** Sistema-modelo de contaminante **SSE** Solução de suspensão de esporos

NaHCO<sub>3</sub> Bicarbonato de sódio

> mililitros mL

PA Pureza analítica UV Ultravioleta

**RFC** Reagente de Folin- Ciocalteau

μL microlitro

mmol L<sup>-1</sup> Milimol por litro

> $[S_o]$ Concentração inicial de substrato

m/v Proporção massa-volume

UI mL-1 Unidade internacional enzimática por mililitro

Atividade da enzima lacase  $A_{Lac}$ 

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇAO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1. Biorremediação	13
2.2. Micro-organismos Biorremediadores	18
2.3. Fenol	19
2.4. Enzimas Polifenol oxidases (PPO's)	21
2.5. Parâmetros e constantes enzimáticas	26
3. OBJETIVO	27
3.1. Objetivo Geral	27
3.2. Objetivos Específicos.	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Micro-organismos isolados	28
4.2. Métodos de Analise.	28
4.2.1. Seleção primaria de isolados.	28
4.2.2. Seleção secundária de isolados	28
4.2.3. Perfil de degradação de fenol	29
4.2.4. Potencial de atividade enzimática de lacase	30
4.2.5. Termoestabilidade enzimática	31
4.2.6. Otimização de pH para atividade enzimática	31
4.2.7. Perfil de degradação de fenol aplicando condições ótimas de fermentação	o.31
4.2.8. Determinação das constantes de Michaelis-Menten $(K_m)$ e da velocidade máxima de reação $(V_{máx})$	
4.2.9. Delineamento e otimização experimental	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Seleção primaria de isolados	34
5.2. Seleção secundária de isolados	34
5.3. Perfil de degradação de fenol	36
5.4. Potencial de atividade enzimática de lacase	37
5.5. Termoestabilidade enzimática	38
5.6. pH ótimo para atividade enzimática	39
5.7. Perfil de degradação ótimo e resistência enzimática frente ao poluente	40
5.8. Determinação das constantes enzimáticas de lacase	41
5.9. Otimização da atividade enzimática de lacase	42

# SUMÁRIO

6. CONCLUSÃO	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

## 1. INTRODUÇÃO

O crescente processo de modernização e criação de indústrias trouxeram, além da melhoria na qualidade de vida da humanidade, diversos problemas relacionados à imensa produção de resíduos. Mesmo com a existência de órgãos responsáveis por fiscalizar o descarte de resíduos industriais, ainda é difícil encontrar solução adequada para esses problemas. Na atualidade, diferentes pesquisas vêm buscando atenuar os danos causados pelo descarte inadequado de resíduos ao meio ambiente.

Efluentes de várias indústrias, comoa têxtil, petrolífera, de plástico, dentre outras, descartam diversos compostos químicos com diferentes potenciais poluentes e acarreta a bioacumulação de contaminantes nos recursos naturais hídricos. A indústria utiliza processos físico-químicos para o processo de remoção dos poluentes descartados, tais como eletrólise, floculação, etc., sendo esses dispendiosos e requerentes de alto gasto energético, ressaltando que a maioria desses processos necessita etapa de tratamento para a retirada do produto gerado a partir de etapas antecessoras.

Dentre os compostos de alto grau de toxicidade, encontram-se os compostos fenólicos poluentes, que por ser utilizado em diversos processos como, por exemplo, na clarificação da polpa de papel, se faz presente em altas concentrações em diversas águas residuais. Contudo, foi visto, em análises de ambientes contaminados, que espécies de microorganismos como bactérias e diversos gêneros de fungos conseguem resistir às altas cargas de poluentes e utilizam os mesmos como fontes de nutrientes para o seu desenvolvimento e manutenção, ajudando indiretamente para a redução da concentração de compostos nocivos no meio poluído. Visando a biodisponibilidade dos micro-organismos na natureza, buscam-se rotas alternativas, menos dispendiosas e agressivas para a redução dos impactos ambientais causados pelo despejo e acidentes ambientais.

As transformações que esses micro-organismos são capazes de realizar a partir de um substrato são denominadas biotransformação. Quando a biotransformação é utilizada para remover ou reduzir poluentes ambientais, passa a ser tratada como biorremediação (GAYLARDE, BELLINASO, MANFIO, 2005). Dentre esses micro-organismos, os fungos filamentosos têm sido estudados, uma vez que apresentam potencial para diversas aplicações na área ambiental, realizando biodegradação de contaminantes tóxicos do solo, biodeterioração de resíduos plásticos, atuando como bioindicadores em estações de tratamento de água.

Com a presença dos compostos fenólicos, micro-organismos sintetizam enzimas

responsáveis para a degradação dos mesmos, sendo uma delas a lacase, pertencente ao grupo das polifenol oxidases. A lacase é responsável por catalisar a oxidação de compostos fenólicos, através da redução do oxigênio atmosférico em água. Na presença de mediadores de baixo peso molecular, como o radical ABTS, o seu potencial oxirredutor é melhorado, fazendo com que a mesma consiga oxidar compostos fenólicos de forma mais eficiente.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi aplicar a técnica de biorremediação de compostos fenólicos em sistemas-modelo, utilizando fenol como poluente, aplicando fungos filamentosos endofíticos isolados de viderias.

### 2. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 2.1. Biorremediação

As indústrias ao redor do mundo vêm descartando continuamente ao longo de muitas décadas uma extensa variedade de rejeitos contendo substâncias químicas diversas como metais-traço, corantes, hidrocarbonetos e fenóis aos cursos de córregos, rios, etc., reduzindo a oxigenação, bem comoa entrada de raios solares. Muitas destas substâncias apresentam elevada toxicidade, causando danos diretos às espécies que habitam nesse meio ambiente (RODRIGUES *et al.*, 2011; BATISTA *et al.*, 2016; SOUZA, 2009; LIMA *et al.*, 2011; MARCO-URREA *et al.*,2015).

A remoção destes poluentes geralmente ocorre através do emprego de processos físicos e químicos tais como precipitação, coagulação, floculação, eletrolise, incineração, aterro, lavagem, entre outros (SOUZA *et al*, 2008; ANDRADE, JARDIM, 2010), tendo a eficiência desses processos reduzida por apenas transferir o problema da fase aquosa para uma segunda fase, necessitando de um posterior tratamento para a sua retirada e descarte devido, caso contrário a problemática não é solucionada. Em análise a meios contaminados, foi visto que muitas substâncias nocivas podem ter a toxicidade diminuída ou eliminada pela ação de micro-organismo adaptados. A aplicação de micro-organismos, adaptados ou não, com vistas a reduzir as concentrações de poluentes, a partir do seu consumo como fonte de nutriente, é chamada de biorremediação, tendo como característica gerar produtos com a toxicidade mínima ao meio ambiente onde o micro-organismo é aplicado (LITCHFIELD, 2005).

Alguns relatos na literatura informam que áreas contaminadas costumam apresentar bactérias ou fungos agindo na sua degradação, como exemplo algumas linhagens de *Penicillium* sp presentes em solo contaminados por fenóis e outros hidrocarbonetos aromáticos em concentrações superiores a 1500 mg L<sup>-1</sup>. Muitos fungos apresentam capacidade de sobreviverem meio com fenol como única fonte de carbono (CONCEIÇÃO *et al.*, 2005; CROGNALE *et al.*, 2012). Assim como compostos orgânicos, metais como o cobre podem ser quatro vezes mais absorvido por biomassa de *Aspergillus niger* em relação aos filtros comerciais como Filtrasorb 400 (SOUZA *et al.*, 2008), destacando-se a alta eficiência de remoção do contaminante por agentes biorremediadores. Vermelho congo pode ser degradado em 99,9% pelo fungo *Alternaria alternata* em meio com 600 mg L<sup>-1</sup> (CHAKRABORTY *et al.*, 2013).

As bactérias halófilas são capazes de biorremediar o fenol, entretanto, alguns fungos que toleram a presença de sal no meio a ser remediado apresentam uma eficiência maior ao

serem empregados para a remediação. Lodo ativado industrial, em condições ótimas de pH e temperatura apresentaram potencial de degradação superior a 99% de fenol em concentração de 500 mg L<sup>-1</sup> num prazo de 24 horas em águas salinas (JIANG*et al.*, 2015).

Santos e Linardi (2004) descreveram que micro-organismos utilizados para o processo de degradação além de serem ativados, precisam ser resistentes a esse poluente, visto que compostos fenólicos são altamente tóxicos para muitos deles. Apesar da biodegradação ter sido pioneira com uso de bactérias, muita atenção tem sido dada à atividade de biodegradação usando fungos em ambientes contaminados (ATAGANA, 2004), devido à resistência desses micro-organismos a maiores faixas de variações de fatores externos, tais como pH, oxigenação, salinidade, temperatura e altas cargas de poluentes (ZANIN *et al.*, 2014).

Os processos biológicos de tratamento de água utilizando micro-organismos vivos têm sido vistos como promissores, ressaltando pontos positivos como: baixo custo devido ao pouco consumo de energia, boa eficiência e sem risco de poluição secundária (JIANG *et al.*, 2015; LIMA, OLIVEIRA & CRUZ, 2011). Para que o processo de biorremediação ocorra, características como afinidade e solubilidade do analito em estudo influenciam no processo de biodegradação, dando destaque, também, à composição do meio, como fontes disponíveis de carbono e nitrogênio, temperatura e pH. Dellamatrice (2005) verificou o aumento na eficiência de degradação com enzimas fúngicas, quando há saturação com O<sub>2</sub>, no lugar de ar atmosférico. O grupo de enzimas Polifenol-oxidases (PPO's), produzidas pelos microorganismos quando submetidos à presença de compostos fenólicos, utilizam o oxigênio para a formação de um filme micelial marrom, de extrema importância para a formação do corpo de frutificação, convertendo oxigênio atmosférico à água, simultaneamente oxidando substâncias como compostos fenólicos (SOUSA, 2014).

Existem muitas pesquisas relacionadas à biorremediação, utilizando bactérias como agentes de tratamento eficazes na degradação de poluentes. Entretanto, os trabalhos abordando biorremediação por fungos filamentosos são raros. Santos e colaboradores (2003) estudaram o potencial de degradação de fenol em efluentes industriais utilizando células imobilizadas de *Graphium sp.* em pérolas de polímero sintetizado. Tais pérolas foram adicionadas a frascos erlenmeyers contendo solução salina enriquecida com fenol em concentrações crescentes e incubadas sob agitação. Foi observado também que o meio quando enriquecido por glicose tinha a sua taxa de consumo de fenol diminuída. porém não anulava a atividade enzimática. Observou-se que o percentual de fenol degradado no meio foi influenciado pela concentração inicial da solução de cultivo.

O fungo *Fusarium sp.* foi utilizado para caracterizar os seus mecanismos de degradação de fenol. Para isso, os ensaios foram preparados com cultura mineral estéril sendo adicionada uma alíquota da suspensão de esporos. Após 10 dias de inoculação adicionou-se uma solução estéril de fenol a uma concentração de 420 mg L<sup>-1</sup>, avaliando também a influencia de pH, adição de fonte de carbono e a influencia da temperatura. Para este estudo, foi observado que as duas linhagens de cepa *Fusarium* sp. testadas conseguiram biorremediar totalmente fenol de forma eficiente, porém sugere-se que o aumento da temperatura e faixa de pH básica indica o aumento da eficiência na degradação do composto para ambas as linhagens (CAI, LI E ZHANG, 2007). Um segundo estudo descrito por Zhou e colaboradores (2016) analisou a degradação de fenol aplicando a bactéria *Sulfobacillus acidophilus TPY*. O microorganismo foi inoculado em varias soluções de fenol para avaliar a sua tolerância frente ao analito. Após isso, o inoculo foi adicionado a um meio suplementado de fenol sob agitação e temperaturas constantes. Como resultado, o micro-organismo conseguiu degradar fenol em diferentes concentrações. Concentrações de 2-metilfenol e 3-metilfenol foram submetidas à biodegradação pelo mesmo micro-organismo, tendo também as suas concentrações reduzidas.

O crescimento de um conjunto de micro-organismos específicos, composto por bactéria Lactobacillus plantarum; levedura Candida utilis e Actinomicetos Streptomyces albus; e o fungo Aspergillus oryzae, foi analisado de forma paralela à degradação de fenol. Alíquota do concentrado destes micro-organismos eficientes (ME-1) foi adicionada ao meio de cultura estéril enriquecido com concentrações crescentes de fenol. O aumento da biomassa mostrou-se crescente enquanto as concentrações de fenol decresciam, sendo notada a total degradação do fenol em todas as concentrações. As taxas de degradação do poluente diminuíram devido efeito inibidor de elevadas concentrações fenol ao (SIVASUBRAMANIAN E NAMASIVAYAM, 2013). Kumar e colaboradores (2017) analisaram a degradação de fenol utilizando o fungo Candida tropicalis NPD1401 como agente biodegradador livre e imobilizado. A determinação de fenol foi obtida através de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (CLAE-EM), sendo também avaliado como parâmentro de consumo de fenol o aumento da biomassa. As respostas obtidas foram que células do micro-organismo NPD1401 livres e imobilizadas conseguiram reduzir os teores de fenol, sendo este micro-organismo único no estudo resistente a concentrações superiores a 1000 mg L<sup>-1</sup> de fenol.

A atividade do fungo *Penicillium chrysogenum* foi testada utilizando meio de cultivo, acrescido de 3 concentrações diferentes de suplementação, sendo adicionadas a cada meio quantidades de NaCl, incubada sob agitação. A determinação de quantidade de fenol

residual foi feita por CLAE e obteve-se a total remoção do analito como resposta do estudo. Para concentrações superiores, o tempo necessário para a sua total remoção foi maior, sendo mais eficiente a degradação na presença de maior quantidade de sal. Por CLAE, foi possível observar o decaimento do sinal do analito e, como consequência, a formação de uma espécie de hidroquinona como produto de biotransformação, que após o fim da fermentação também teve o seu sinal extinto (LEITÃO, DUARTE E OLIVEIRA, 2007). Experimento com banho termostático com base agitadora foi utilizado para realizar os ensaios de degradação de fenol. Frascos contendo meios específicos para crescimento das bactérias *Pseudomonas e Bacilllus* foram enriquecidos com fenol. Foram monitorados os crescimentos das biomassas por densidade óptica e em paralelo a determinação de fenol residual no meio por metodologia 4-amino-antipirina. A redução da concentração inicial do analito, em uma faixa de 50 mg L<sup>-1</sup> a 1200 mg L<sup>-1</sup>, foi observada após o processo de fermentação, obtendo sua total remoção após 36 horas. (HASAN E JABEEN, 2015).

Para biodegradar fenol, Dos Passos e colaboradores (2008) utilizaram uma nova linhagem do gênero *Aspergillus sp.*, isolado de solo contaminado por óleo. Para isso, foi sintetizado um sistema-modelo de água residual em que o micro-organismo foi cultivado em três diferentes meios (fenol, fenol+glicose e glicose). Após crescimento, foi tomada uma alíquota e aplicada ao meio a ser remediado, sendo o fenol a única fonte de carbono disponível. Tendo resultados satisfatórios para este experimento, foram estudadas condições de biodegradação com planejamento experimental, variando a concentração de glicose e velocidade de agitação, sendo elas 500 mg L<sup>-1</sup> de glicose e agitação de 200 rpm, aumentando a degradação de fenol em 6 vezes das condições iniciais.

Na pesquisa conduzida por Seo e colaboradores (2007), referente à degradação de pesticidas (carbofurano e fenol-carbofurano) utilizando o fungo *Mucor rumannianus*, submetido a crescimento em caldo enriquecido com cada contaminante, sob agitação e temperatura constantes, observou-se sinais de massa/carga sugestivos à presença de metabólitos secundários (Figura 2.1) produzidos pelo micro-organismo a partir do consumo dos contaminantes estudados. Esses sinais indicam que o micro-organismo utiliza o contaminante para a produção de metabólitos, possivelmente buscando o aumento da sua resistência frente ao meio tóxico saturado.

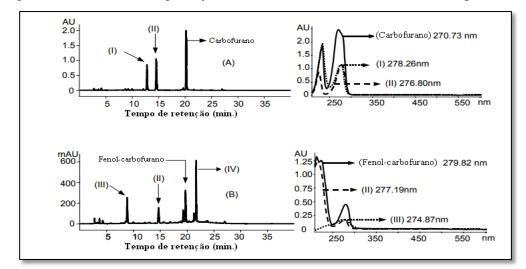


Figura 2.1: Análise da degradação de Carbofurano e Fenol-carbofurano por CLAE.

Onde: (I), (II) e (III) = sinais de metábolitos produzidos e ainda não identificados.

Fonte: SEO e colaboradores (2007)

O cultivo da bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* foi feito no próprio efluente estudado com adição de meio especifico de crescimento da mesma, para enriquecimento do caldo fermentado. Posterior a essa etapa, esse meio foi suplementado com concentrações de fenol para teste de resistência microbiana ao poluente, obtendo maior quantidade de biomassa com fenol a altas concentrações. Essa biomassa foi fermentada no mesmo meio, porém com quantidade máxima de fenol e, após o crescimento, foi repicado em placas de BDA com fenol. O inóculo adicionado ao meio a ser biorremediado, tendo o fenol como única fonte de carbono, visto que anteriormente havia suplementação do meio BDA como outra fonte de carbono. As condições ótimas para a remoção de fenol pelo micro-organismo foram de temperatura de 30°C e pH 8,0, tendo o percentual de degradação máximo no valor de 91,6% da concentração inicial de 800 mg L<sup>-1</sup> de fenol, sendo esse micro-organismo também resistente a concentrações próximas de1700 mg L<sup>-1</sup> de fenol(SEO *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2016).

Salar, Purewal e Bhatti (2016) utilizaram o delineamento de composto central rotacional (DCCR) para a determinação de condições ótimas de extração de fenólicos com *Aspergillusawamori MTCC-548*, sendo avaliadas a temperatura e o tempo de fermentação como variáveis independentes (k=2). Ao analisar a superfície de resposta gerada a partir dos resultados, foi observado que as melhores condições de fermentação foram aquelas com 8 dias de fermentação à temperatura aproximada a 44,5 °C.

Annadurai, Ling e Lee (2008) otimizaram, por delineamento de composto central

rotacional (DCCR), a degradação de fenol em paralelo ao crescimento de biomassa da bactéria *Pseudomonas putida*, onde foram estudadas a composição do meio para a determinação da condição ideal que proporcionasse a maior degradação de fenol. Em discussão aos resultados do trabalho, foram geradas superfícies de respostas indicando as interações ótimas de composição para degradação e crescimento de micro-organismo. Analisando as regiões das superfícies de resposta geradas, foi possível concluir que as condições ótimas de composição de nutrientes do meio para o aumento da degradação de fenol por *Pseudomonas putida* foram de 0,750 g L<sup>-1</sup> para glicose; 0,150 g L<sup>-1</sup> para extrato de levedura; 0,250 g L<sup>-1</sup> de NaCl; e 1 g L<sup>-1</sup> para (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, gerando um bom modelo de meio com coeficiente de correlação de 0,9988 obtido.

## 2.2. Micro-organismos Biorremediadores

Os micro-organismos biorremediadores, em condições naturais, são capazes de aproveitar fontes energéticas disponíveis em uma grande variedade de resíduos que contenham uma fonte de carboidratos, tais como resíduos vegetais e agrícolas, de destilaria, de madeireiras (BASSO, GALLO & BASSO, 2010). Essas fontes energéticas são primordialmente consumidas para a produção de metabólitos primários (proteínas, lipídios, etc). Além dos metabólitos primários, necessários para o desenvolvimento do micro-organismo e sua proliferação, há a produção de uma diversidade de metabólitos secundários como ácidos orgânicos, lactanas, estatinas, dentre muitas outras substâncias químicas de classificações variadas e que podem apresentar propriedades bioativas diversas como antibióticos, agentes redutores de colesterol, antitumorais e imunossupressores. (PUNT, 2002; SMEDSGAARD; NIELSEN, 2004).

Estudos recentes também indicam a aplicação de micro-organismos em produção de álcool combustível através do bagaço de cana-de-açúcar, madeiras e papéis (*Trichoderm areesei*) (BASSO, GALLO & BASSO, 2010); produção de antibióticos (PEREIRA&OLIVEIRA, 2016; HE *et al.*, 2002);degradação do benzeno, naftaleno, floureno e biosorção de metais traços e radioativos(MARCHAND, 2017; WU, 2017); estudos de genética, por crescerem e se reproduzirem com grande rapidez (LIMA, 2018); e fabricação de detergentes biodegradáveis (SILVA, 2014), dentre diversos outros papéis.

Bactérias como *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Rhodococcus*, são capazes de utilizar o fenol como única fonte de carbono e energia para eliminar completamente substâncias tóxicas, viabilizando a biodegradação de fenol, entretanto, a aplicação de fungos para a remediação de ambientes poluídos por compostos aromáticos e

metais-traço vem conquistando interesse de estudo, visto que esse grupo de micro-organismos é resistente a meios sobrecarregados de xenobióticos, não perdendo a sua eficiência de degradação (JIANG, 2015).

#### **2.3. Fenol**

Devido ao crescimento das atividades industriais, os rejeitos produzidos e descartados inadequadamente têm causado sérios danos ao ambiente onde são lançados. Dentre os principais poluentes encontra-se o fenol, substância presente em efluentes têxteis, cerâmicos, de plástico, petroquímico, farmacêutico, de perfume, etc.. Este componente químico apresenta estrutura simples, porém, a sua alta toxicidade o caracteriza como causador de sérios problemas ambientais (JIANG, 2015; SILVA *et al.*, 2009).

Os fenóis (Figura 2.2), grupo dos principais poluentes do setor petroquímico tem efeito nocivo direto no homem, por conta da sua alta toxicidade, mesmo em baixa concentração (1 mg mL<sup>-1</sup>),pois este atua como carcinogênico e mutagênico (ZHANG, 2012). De acordo com PINHEIRO e colaboradores (2010), a concentração máxima permitida pela legislação brasileira para lançamento em afluentes é de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de fenóis totais, como descrito no quadroda Figura 2.3 fornecida pela CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (2015). A Resolução da CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente –nº 357/2005 (alterada pela resolução 410/2009 e 430/2011) estabelece uma nova concentração máxima permitida de 0,003 mg L<sup>-1</sup> de fenóis totais em água de consumo humano (BRASIL, 2011). Quando em contato com a água tratada, o composto sofre halogenação pelo cloro utilizado no sistema de tratamento, potencializando assim, a sua toxicidade, o que intensifica a preocupação sobre altas concentrações encontradas neste meio (CUNHA E AGUIAR, 2014).

OH OH OH  $R_2$   $R_3$   $R_4$   $R_5$   $R_6$   $R_7$   $R_8$   $R_8$   $R_8$   $R_8$   $R_8$   $R_8$   $R_8$   $R_8$   $R_9$   $R_9$  R

Figura 2.2: Estrutura dos principais esqueletos fenólicos

Onde: (a) Flavonol; (b) tocoferol; (c) Ácidos hidroxibenzóicos; (d) Ácidos hidroxicinâmicos; (e) Fenol ou ácido fênico; e (f) Taninos.

Fonte: ANGELO E JORGE (2006) com adaptações.

Figura 2.3: Quadro de teores máximos de fenóis totais permitidos em água.

ento para o consumo humano; proteção de comunidades recreação de contato primário; irrigação de hortaliças. mento para o consumo humano; irrigação de culturas cerealíferas e forrageiras; pesca amadora; recreação de	Totais <sup>a</sup> 0,003 mg L <sup>-1</sup> 0,01 mg L <sup>-1</sup>
recreação de contato primário; irrigação de hortaliças. mento para o consumo humano; irrigação de culturas cerealíferas e forrageiras; pesca amadora; recreação de	
mento para o consumo humano; irrigação de culturas cerealiferas e forrageiras; pesca amadora; recreação de	0,01 mg L <sup>-1</sup>
cerealiferas e forrageiras; pesca amadora; recreação de	0,01 mg L <sup>-1</sup>
contato secundário; dessedentação de animais.	
de contato primário; proteção de comunidades aquáticas;	0,06 mg L <sup>-1</sup>
aquicultura e pesca.	
de contato primário; proteção de comunidades aquáticas;	0,003 mg L <sup>-1</sup>
ura e pesca; abastecimento para o consumo humano;	
irrigação.	
	0,5 mg L <sup>-1</sup>
r fontes poluidoras que lançam resíduos em corpos de	

Fonte: CETESB (2015).

O composto apresenta um caráter de acidez fraca, porém um alto valor de pKa, o que justifica a sua alta ionização. Solúvel frente a solventes orgânicos como água, etanol e clorofórmio, o composto apresenta ponto de ebulição de 181,8 °C (MORITA E ASSUMPÇÃO, 2007), o que dificulta a possibilidade de remoção por aquecimento, visto que para este processo haveria a necessidade de um alto gasto energético. As propriedades físico-químicas do fenol estão destacadas na Tabela 2.1. Os dados foram compilados de um

comunicado técnico fornecido pela CETESB (2015).

Tabela 2.1: Propriedades físico-químicas do fenol

1	FENOL
рН	6,0
pKa	9,9
Solubilidade	$0.083 \text{ g} / 1 \text{ g H}_2\text{O}$
Peso Molecular	94,11 g mol <sup>-1</sup>
Temperatura de Ebulição	181,8°C

Fonte: CETESB, 2015

O fenol quando absorvido pelo corpo humano por inalação, pode promover irritações nas vias aéreas, danificando o sistema respiratório, gerando convulsões que, quando agravadas, induzem ao óbito e em contato com o sistema digestivo pode levar à formação de úlceras (ALMEIDA*et al.*, 2011).O descarte de rejeitos com altas concentrações de fenol em ambientes com micro-organismos presentes os forçam a se adaptarem e tentarem utilizá-lo como substrato para manutenção e resistência. Para que isso ocorra, o micro-organismo passa a produzir enzimas específicas para biorremediar (JACQUES*et al.*, 2007) esse substrato, por meio de transformação ou degradação, gerando metabólitos, podendo estes apresentar atividades de interesse científico.

#### 2.4. Enzimas Polifenol oxidases (PPO's)

A alta toxicidade dos fenóis junto a sua alta persistência e a grande presença em rejeitos industriais faz com que formas de minimização de impactos causados por esses compostos sejam estudadas (ZANIN *et al.*, 2014). O interesse por uso de micro-organismos produtores de enzimas PPO's é devido à baixa toxicidade das suas enzimas no meio, visto que as mesmas ocorrem naturalmente, podendo fazer parte de outras rotas metabólicas. Algumas dessas rotas metabólicas já foram estudadas, e o primeiro passo para todas elas envolve a hidroxilação do fenol pela polifenol oxidase, tanto para as de fonte bacteriológica (Figura 2.4), gerando ácidos orgânicos no fim da sua rota (ZHOU *et al.*, 2016), quanto para a fúngica (Figura 2.5) que gera quinonas como produtos (WHITAKER, 1994).

MARTÍNKOVÁ e CHMATÁL (2016) relataram que a cianeto hidratase e a tirosinase, enzimas ecologicamente benignas produzidas por fungos filamentosos, conseguem degradar totalmente fenol presente nos sistemas hídricos contaminados por coque – rejeito industrial de alta carga orgânica - oriundo de mineradora, como segunda etapa de tratamento

de efluentes, comprovando a eficiência de enzimas produzidas pelos micro-organismos na degradação dos poluentes.

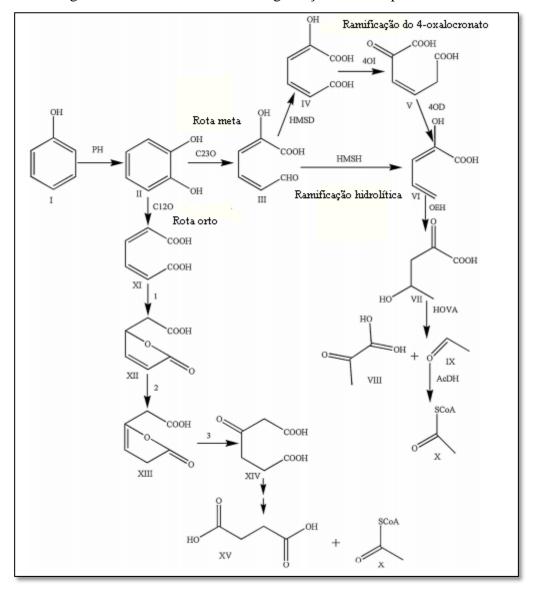


Figura 2.4: Rota metabólica de degradação de fenol por bactéria.

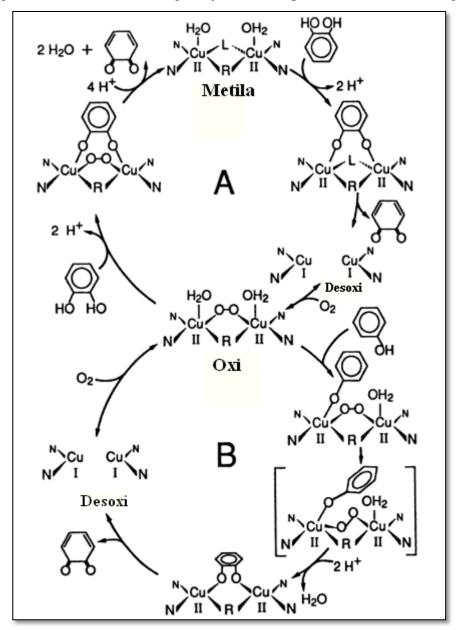
I, fenol; II catecol; III, semialdeído 2-hidroximucónico; IV, ácido 2-hidroximucónico; V, 4-oxalocrotonato; VI, 2-oxopent-4-dienoato; VII, 4-hidroxi-2-oxovalerato; VIII, piruvato; IX, acetaldeído; X, acetil-CoA; XI, muconatocis-cis; XII, (+) - muconolactona; XIII, enol-lactona de 3-oxoadipato; XIV, 3-oxoadipato; XV, ácido succínico.

PH, fenol hidroxilase; C23O, catecol-2,3-dioxigenase; HMSD, 2-hidroximucônicosemialdeídodesidrogenase; HMSH, 2-hidroximucônicosemialdeídohidrolase; 4OI, 4-oxalocrotonato isomerase; 4OD, 4-oxalocrotonato de descarboxilase; OEH, hidratase de 2-oxopent-4-dienoato; HOVA, aldolase de 4-hidroxi-2-oxovalerato; AcDH, acetaldeídodesidrogenase; C12O,

catecol 1,2-dioxigenase; 1, cicloisomerasemuconada; 2, muconolactonaisomerase; 3, 3-oxoadipato enol-lactonase.

Fonte: ZHOU e colaboradores, 2016.

Figura 2.5: Mecanismo de degradação de fenol por Polifenol oxidasefúngica



Onde: A = o-difenol e B = monofenol;

Fonte: WHITAKER, 1994.

Lacase e tirosinase são algumas das principais enzimas que representam as PPO's. O metabolismo da tirosinase faz com que haja a redução das estruturas fenólicas, por meio de mecanismos distintos, o que faz a tirosinase gerar quinonas com conformação *orto* e *para*, enquanto as lacases convertem o substrato em *meta*- e *para-quinonas*(ROSSATO, 2001).

A lacase (EC 1.10.3.2) é uma das enzimas do grupo das polifenoloxidases (Figura

2.6) produzidas principalmente por fungos basidiomicetes - conhecidos popularmente por cogumelos e orelhas de pau, característicos da degradação de madeira em decomposição, e por algumas espécies de fungos filamentosos, como por exemplo fungos de podridão marrom e preta. São do grupo das cuproproteinas azuis, uma glicoproteína que possui quatro átomos de cobre as sua estrutura central, capaz de oxidar compostos fenólicos totais, entre monofenóis e polifenóis. Existente e disponível na natureza mais de 60 tipos de lacase, o que as diferem são características como a termoestabilidade e atividade cinética de cada enzima deste grupo (ROSSATO, 2001).

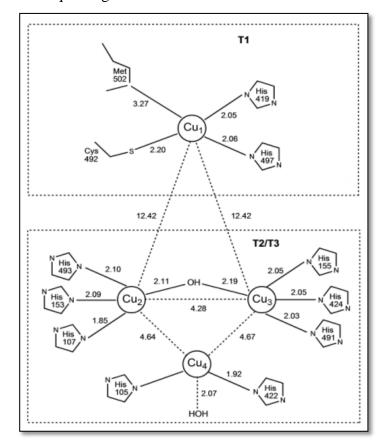


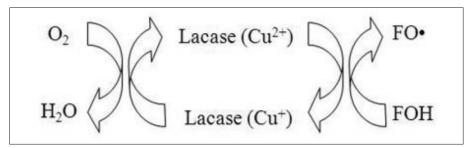
Figura 2.6: Esquema genérico da estrutura do sítio ativo da lacase.

Fonte: BATISTELA, 2011.

A lacase tem o papel natural de despolimerização da lignina em que a primeira etapa dessa reação ocorre pela oxidação de um elétron de grupos fenólicos, presentes na estrutura da lignina, gerando fenoxirradicais (VILELLA, 2006). Proteínas tendo um átomo de cobre no seu núcleo, conhecidas como cuproproteínas, são capazes de catalizar reações de oxirredução a partir da interconverção do seu estado de oxidação entre Cu<sup>2+</sup> e Cu<sup>+</sup>, como apresentado na Figura 2.7, que descreve o esquema cíclico de oxirredução dos átomos de cobre da estrutura enzimática da lacase. De forma mais direta, as lacases atuam oxidando as estruturas fenólicas

a quinonas pelo sequestro de um elétron e retorna a sua forma inicial reduzindo O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O(FARIA, 2010; MULLER, 2008; AGUIAR E FERRAZ, 2011).

Figura 2.7: Ciclo de degradação do fenol pela lacase.



Onde FOH= Fenol; FO•=Radical fenólico.

Fonte: AGUIAR E FERRAZ,2011

As quinonas são grupos de metabólitos secundários formados biogeneticamente por reações oxidativas a partir de xenobióticos presentes no meio (indutores) como, por exemplo, compostos fenólicos. Quinonas têm sido alvo de grande interesse por atuarem como antitumorais e anticancerígenas, promovendo apoptose celular (SOUSA, 2013).

Para determinar a presença de lacase no meio em processo de biorremediação, há a necessidade da dosagem de atividade enzimática, sendo utilizada a reação com ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etileno-tiazole-6-sulfônico)) (Figura 2.8), um agente com alto potencial oxidante que funciona como mediador e co-oxidante, podendo interagir com a enzima, alterando o estado de oxidação da hidroxila (MESTER E TIEN *aput* MAJCHERCZYK, 2000). O uso de mediadores nas reações de oxirredução da lacase tem como justificativa o seu baixo potencial eletroquímico padrão, variando entre 0,4 v e 0,8 v, sendo este potencial independente da fonte e forma de produção da lacase, e, com adição de mediadores de baixo peso molecular ao meio reacional, faz com que ocorra o aumento da sua atividade oxirredutora, possibilitando uma maior atuação da atividade enzimática frente ao fenol (ARANTES E MILAGRES, 2009; CRISTÓVÃO, 2010), bem como possibilitando parâmetros cinéticos que caracterizam a atividade da enzima.

Figura 2.8: Estrutura molecular do radical ABTS

$$\begin{array}{c|c} & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\$$

Fonte: Sigma-Aldrich

#### 2.5. Parâmetros e constantes enzimáticas

A cinética de atividade enzimática mostra qual o comportamento enzimático frente ao substrato disponível. Os principais parâmetros estudados são  $K_m$  e  $V_{máx}$ . Estes parâmetros são definidos para mostrar a saturação da enzima frente ao substrato, apresentando também em que ponto a velocidade torna-se constante, ou seja, independe da concentração de substrato, neste caso, o fenol. A constante de Michaelis-Menten,  $K_m$ , é a concentração de substrato em que a velocidade inicial  $(V_0)$  se iguala a metade de velocidade máxima. Esta constante é utilizada para medir o quão rápida será a reação a partir do aumento da concentração de substrato. Pertence a cada enzima um valor de  $K_m$  específico para cada substrato, podendo este valor ser alterado pelo efeito de inibidores na reação enzimática (SIQUEIRA *et al.*, 2011).

A  $V_{\text{M\'ax}}$  é a velocidade máxima inical necessária para que todos os sítios ativos enzimáticos estejam ocupados. A partir da equação da reta obtida no tratamento dos dados da análise, sugere-se que quanto menor o valor de  $K_m$  encontrado, maior será a interação entre a enzima e o substrato (WHITAKER, 1994).

#### 3. OBJETIVO

### 3.1. Objetivo Geral

Aplicar técnica de biorremediação utilizando fungos filamentosos, para degradação de fenol utilizando sistema-modelo de poluente.

## 3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliaras condições de biorremediação de fenol utilizando fungos filamentosos endofíticos;
- ✓ Otimizar as condições de biorremediação de fenol;
- ✓ Determinar o perfil de degradação de fenol em meio aquoso;
- ✓ Quantificara atividade enzimática da enzima lacase para obter parâmetros fundamentais que caracterizam o comportamento enzimático.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1. Micro-organismos isolados

Foram utilizadas 54 isolados de fungos filamentosos endofíticos isolados de videiras da região de Diamantina – MG, pertencentes à coleção do Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia (LPNBio) do Centro de Pesquisas em Química - CEPEQ, *campus* de Itapetinga, Bahia.

#### 4.2. Métodosde Análise

## 4.2.1. Seleção primária de isolados

Fungos filamentosos foram submetidos a crescimento em placas contendo meio sólido enriquecido com fenol. O analito utilizado para o meio foi o fenol cristal PA da marca Synth (validade: 04/2020), sendo sua massa adicionada diretamente ao preparo do meio de cultivo. Este teste foi realizado para a exclusão de isolados que não resistissem à toxicidade do poluente para a manutenção do crescimento da colônia. Cada isolado foi inoculado em placas de concentrações mínima e máxima, 200 mg L<sup>-1</sup>e 700 mg L<sup>-1</sup>de fenol,respectivamente.

Preparou-se o meio de cultivo Batata, Dextrose e Ágar (BDA) da marca Acumedia (validade: 12/2020) enriquecido em quantidades correspondentes às concentrações de fenol supracitadas.

O meio foi esterilizado e acondicionado em placas de Petri previamente esterilizada, ambos em autoclave vertical da marca Prismatec© modelo CS (Itu, Brasil), a 121 °C e 01atm. Após a inoculação, as placas foram incubadas por 5 dias a temperatura ambiente ( $T \approx 27$ °C) para o desenvolvimento das colônias.

#### 4.2.2. Seleção secundária de isolados

um sistema de análise de biorremediação do fenol *in vitro* foi criado, em que se estabeleceu uma solução de fenol PA marca Synth (validade: 04/2020) na concentração de 500 mg L<sup>-1</sup>, sendo esta utilizada como sistema-modelo de contaminante (SMC). Essa solução foi utilizada como substrato para todas as análises a seguir.

Os isolados pré-selecionados foram repicados em meio BDA e submetidos a crescimento por sete dias para o preparo de solução de suspensão de esporos. Utilizaram-se três tubos de ensaio com meio sólido inclinado de cada isolado para que a solução final alcançasse a concentração de aproximadamente 10<sup>8</sup> esporos mL<sup>-1</sup>. Os tubos foram lavados com 100 mL de água estéril para cada isolado, sendo a superfície do meio de cultura devidamente friccionada com palitos de madeira estéreis promovendo a soltura dos esporos na

solução. Frascos tipo erlenmeyer de 125 mL foram preenchidos com 50 mL da solução do sistema-modelo de contaminante (SMC), esterilizada em autoclave vertical, resfriada à temperatura ambiente, para a adição de 20 mL da solução de suspensão de esporos (SSE), correspondendo uma proporção de 5:2 (SMC:SSE) v/v. Cada isolado selecionado foi testado e analisado em triplicata. As amostras foram incubadas sob temperatura controlada de 30°C, a 150 rpm em incubadora com plataforma de agitação orbital da marca Quimis® modelo Q816M20 (Hangzhou Zhejiang, China), durante o período de 25 dias.

### 4.2.3. Perfil de degradação de fenol

Alíquotas do meio de fermentação (descrito no item 4.2.2) foram tomadas para análise de cinética de degradação a cada 05 dias. Para a identificação da presença de fenol utilizou-se como teste qualitativo a metodologia de determinação de compostos fenólicos totais, descrita por Wettasinghe e Shahidi (1999), utilizando o Reagente de Folin-Ciocauteau (RFC) marca Haloquímica (validade 01/2009). Para tal análise foi utilizada 0,250 mL do meio de fermentação com adição de 0,250 mL do RFC e 0,500 mL de solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) marca Dinâmica(validade 05/2020).O volume foi completado para 5 mL com água destilada e submetido à agitação. Após 25 minutos em repouso e sob o abrigo de luz, as amostras foram lidas em espectrofotômetro UV-Visível da marca Shimadzu® (Kioto, Japão) modelo UV-1800.

Uma curva analítica foi construída em espectrofotômetro nas concentrações de 0,300, 0,400,0,500, 0,800, 0,900 e 1,000 g L<sup>-1</sup>, em triplicata, utilizando fenol cristal PA, sendo os seus resultados expressos em forma de um gráfico (Figura 4.1) correlacionando absorbância e concentrações de fenol (g L<sup>-1</sup>).

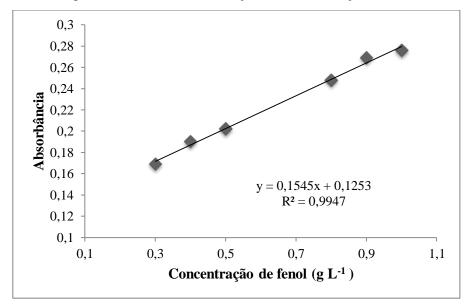


Figura 4.1: Curva de calibração de concentrações de fenol

#### 4.2.4. Potencial de atividade enzimática de lacase

O isolado 01, selecionado como sendo melhor agente biorremediante, foi utilizado para a continuidade dos estudos. A atividade de lacase total produzida pelo isolado foi determinada com base na reação da oxidação do reagente ABTS-ácido 2,2'-azino-bis (3-etil benzotiazolino-6-sulfônico), marca Sigma (validade 08/2022). A reação foi realizada pela adição de 100 μL do caldo fermentado a 800 μL de tampão acetato de sódio 170 mmol L<sup>-1</sup> (pH 5,0) e 100 μL de solução de ABTS em concentração 5 mmol L<sup>-1</sup>. Toda a reação foi conduzida à temperatura ambiente (T≈27°C). A leitura foi feita em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 420nm após 5 minutos de reação (BOURBONNAIS E PAICE, 1990; BUSWELL et al.,1995 adaptado por DUARTE, 2009). Todos os posteriores ensaios utilizando atividade enzimática de lacase foi utilizado o tempo de melhor resposta enzimática de 20 dias de fermentação. Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizada a equação abaixo:

$$A = \frac{\Delta E \cdot 10^6}{\varepsilon_{420} \cdot \Delta T}$$
 Equação 4.1

Em que A = atividade da lacase (UImL<sup>-1</sup>);  $\Delta E$  = crescimento do comprimento de onda;  $\varepsilon_{420}$  = absortividade molar (36000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>); e  $\Delta T$  sendo o tempo (min.) necessário para a reação ocorrer.

#### 4.2.5. Termoestabilidade enzimática

Para o ensaio de termoestabilidade, uma alíquota de 10 mL da amostra biorremediada foi submetida ao método de variação de temperatura descrita por França-Santos e colaboradores (2009) com adaptações da faixa de temperatura. A variação ocorreu a cada 10°C, numa faixa entre 40°C e 70°C em que as amostras foram submetidas a aquecimento em cada temperatura, variando o tempo de permanência entre 0 e 30 minutos para que a cada 10 minutos de tratamento térmico fosse dosada a atividade enzimática residual de lacase (Item 4.2.4).

## 4.2.6. Determinação de pH ótimo para atividade enzimática

Buscando a determinação do pH ótimo da atividade enzimática, a amostra a ser biorremediada, foram testados os pHs 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0com adição de solução tampão acetato 200 mM. Essa faixa foi escolhida, pois a metodologia aplicada para determinar a atividade da lacase neste trabalho foi executada com adição de tampão acetato 200 mM pH 5,0, o que faz deste pH o ponto central da análise de pH ótimo. Em todas as amostras foram adicionados 12mL de solução tampão acetato 200 mM nos pHs descritos acima. Em seguida, foram submetidas à agitação com temperatura controlada, como descrito no Item 4.2.3. Para a determinação da atividade enzimática da lacase também se seguiu a metodologia já aplicada, descrita no Item 4.2.4.

#### 4.2.7. Perfil de degradação de fenol aplicando condições ótimas de fermentação

Para a construção do perfil de degradação, foi utilizada a metodologia descrita por Sivasubramanian e Namasivayam (2013) onde o isolado foi inoculado em pH e temperatura ideais para crescimento e produção enzimática, variando as concentrações de fenol presente no meio numa faixa de 0,05 g L<sup>-1</sup> e 2,0 g L<sup>-1</sup>. Os valores das concentrações residuais de fenol foram convertidas a percentual e expressas em gráfico, avaliando a resistência do microorganismo frente a diferentes concentrações do analito.

# 4.2.8. Determinação das constantes de Michaelis-Menten $(K_m)$ e da velocidade máxima de reação $(V_{m\acute{a}x})$

O cálculo da constante de Michaelis foi obtidoatravés Equação 4.2a, em que égerada uma curva de saturação da enzima versus a concentração de substrato de caráter hiperbólico, dificultando a análise dos resultadosetornando os parâmetros avaliados sucetíveis a consideráveis variações ( $K_m$  e  $V_{máx}$ ). A segunda fórmula descreveu o método de quantificação

linear conhecida como o *duplo recíproco* de Lineweaver-Burk (Equação 4.2b) para inibição em que os valores de concentração e atividade enzimática são invertidos, dando origem a um gráfico linear, em que a extrapolação dos pontos nos eixos permite o cálculo das variáveis. Segue abaixo equação que representa o comportamento do gráfico:

$$V = \frac{V.\max \cdot [S_o]}{K_m + [S_o]}$$
 Equação 4.2 a

$$\frac{1}{V} = \frac{K_{\text{m}}}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S_o]} + \frac{1}{V_{max}}$$
 Equação 4.2 b

#### 4.2.9. Delineamento e otimização experimental

Para o delineamento experimental, seguiu-se o modelo  $2^k$ , onde k=2, representando as duas variáveis independentes, gerando quatro ensaios; adição de três ensaios de ponto central (PC), que representam as condições iniciais e usuais da analise, junto com mais quatro ensaios axiais, condições essas que tendem a  $-\infty$  a  $+\infty$ , simulando condições extremas de analise. Asduas variáveis, pH e % de NaCl, foram estudadas, em que se adotou o delineamento de composto central rotacional (DCCR), de ordem  $2^2$ . Para o cálculo dos valores dos níveis superiores e inferiores axiais foi utilizada a Equação 4.3, em função da quantidade de variáveis independentes (k=2):

$$\infty = (2^{k})^{1/4} = 1,41$$
 Equação 4.3

As variáveis independentes estudadas, juntamente com as suas respostas, foram tratadas no software Statistica® versão 10.0 (STATSOFT). Após as análises, os dados foram ajustados com aplicação da Superfície de Resposta, demonstrando o comportamento de cada variável cruzamento das respostas obtidas. Através dela, pôde-se obter um modelo de condições que gerou maior atividade enzimática, considerado como modelo ótimo. Cada ensaio foi analisado em duas repetições e a leitura da atividade enzimática de cada repetição foi feita em triplicata. Após teste de resistência (Item 4.2.7), foram adicionadas às amostras porcentagens de cloreto de sódio (NaCl), sal este que compõe aproximadamente 90% da salinidade marinha, ambiente foco a ser biorremediado pelo presente estudo. A concentração de sal foi variada durante a otimização da produção enzimática. Os fatores e níveis estudados foram descritos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Matriz de delineamento de composto central rotacional para o estudo da otimização de atividade de lacase.

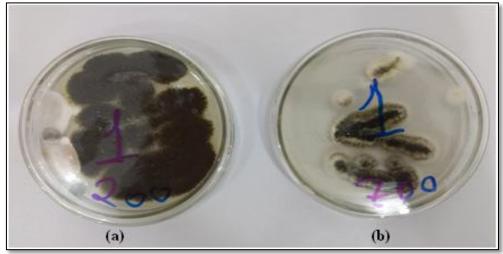
	Fatores				
Variáveis independentes	-1,41	-1,0	0	+1,0	+1,41
рН	2,18	3,0	5,0	7,0	7,82
% NaCl (m/v)	1,0	2,75	3,5	4,25	6,0

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

# 5.1. Seleção primária de isolados

Após a inoculação dos 54 isolados em placas com meio enriquecido por solução de fenol nas concentrações de 200 mg L<sup>-1</sup> e 700 mg L<sup>-1</sup>(Figura 5.1), foi avaliado qualitativamente o crescimento dos isolados que conseguiram se desenvolver frente às duas concentrações de fenol adicionadas, onde notou-se o crescimento regular de colônias de 14 isolados, nas duas concentrações de fenol de forma simultânea, visto que os demais isolados cresceram apenas nas placas com concentração de fenol de 200 mg L<sup>-1</sup>. Vale salientar que, os isolados 27 e 46 não conseguiram se desenvolver na presença do fenol, indicando que o poluente em questão é tóxico para o crescimento e manutenção dos mesmos. O comportamento de inibição do crescimento dos isolados era esperado, pois o fenol já foi utilizado como base para antifúngicos comerciais, sendo extinto por sua alta toxicidade. Os demais resultados da seleção primária estão dispostos na Tabela 6 (Apêndice A), contendo resultados positivo e negativo sobre o crescimento de cada isolado.

Figura 5.1: Crescimento do isolado 01 na seleção primária em placa de meio BDA adicionado de (a) 200 mg L<sup>-1</sup> e (b) 700 mg L<sup>-1</sup>.



Fonte: próprio autor

### 5.2. Seleção secundária de isolados

Os isolados resistentes concomitantemente às duas concentrações de fenol em meio sólido foram submetidos à fermentação submersa tendo como composição do meio uma solução aquosa de fenol na concentração de 500 mg L<sup>-1</sup>, analito estudado e utilizado como única fonte de carbono para crescimento dos isolados, sendo a concentração escolhida a partir

da média entre as concentrações já utilizadas na seleção primária, simulando um processo de biodegradação. Após o processo fermentativo de 25 dias, os valores de concentração de fenol residual foram obtidos e agrupados, gerando um gráfico (Figura 5.2), que expressa o perfil de comportamento dos isolados frente ao sistema-modelo de poluente. Os isolados selecionados neste presente estudo resistiram ao meio contaminado com concentração inicial de 500 mg L<sup>-1</sup> de fenol.

ZANIN e colaboradores (2013) estudaram o comportamento do *Aspergillus flavus* como agente biodegradante de fenóis em águas residuais de postos de combustíveis a uma concentração inicial de 10 mg L<sup>-1</sup> com adição de fontes externas de nutriente, obtendo-se como resultado uma concentração final de 6,7 mg L<sup>-1</sup> de fenol num período de 4 dias.

Dentre os 14 isolados escolhidos na seleção primária, 05 isolados conseguiram se desenvolver em meio líquido tendo o fenol como único nutriente. Foi observado que os isolados 37 e 47 mostraram um comportamento de atividade semelhante, com base nos valores de concentração de fenol residual encontrados, sugerindo que ambas tenham conseguido degradar a mesma quantidade de fenol no meio. Essas considerações foram observadas a partir dos valores semelhantes de concentração iniciais e finais. O isolado5 mostrou uma baixa eficiência na degradação de fenol nos primeiros 5 dias e após isso se mantiveram estáveis os valores encontrados para a concentração de fenol. Sugere-se a esse comportamento a baixa resistência deste micro-organismo ao poluente.

Em destaque, tem-se os resultados dos isolados1 e 11, tendo eles os melhores resultados na biodegradação do contaminante. Os isolados citados mostraram-se com alta eficiência de metabolizar o contaminante, fazendo com que o valor da sua concentração final encontrada fosse reduzido a 0,0% e 0,6% respectivamente. Os valores encontrados são referentes à atividade degradativa de fenol por estes isolados fúngicos como única fonte de nutriente para desenvolvimento do isolado.

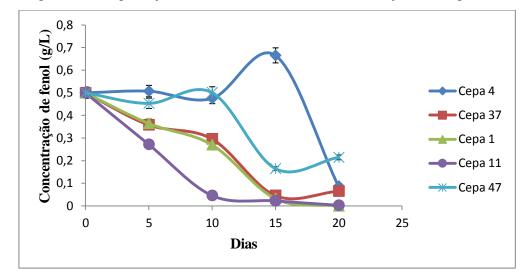


Figura 5.2: Degradação de meio adicionado de concentração 0,500 g L<sup>-1</sup> de fenol.

N=2 em triplicata.

# 5.3. Perfil de degradação de fenol

O isolado selecionado foi submetido novamente à degradação de fenol em concentração utilizada na seleção secundária, onde foi possível observar que o perfil de degradação visualizado na análise anterior (item 5.2) foi mantido e evidenciou a mesma eficiência para a redução de concentração de contaminante no meio, sendo totalmente exaurida. Na Figura 5.3foi possível observar o decaimento da concentração, no decorrer dos dias de fermentação, tendo como resultado final um caldo fermentado com concentração de 0,0032±0,005 g L<sup>-1</sup> de fenol total residual.

To 0,6

To 0,5

To 0,5

To 0,5

To 0,6

To 0,5

To 0,6

To 0,5

To 0,6

To 0,6

To 0,6

To 0,6

To 0,6

To 0,6

To 0,5

To 0,5

To 0,6

To 0,7

To 0,6

To 0,7

Figura 5.3: Perfil de degradação de fenol de concentração 0,500 g L<sup>-1</sup> em função do tempo de fermentação pelo isolado01 selecionado.

Controle: todos os reagentes, exceto micro-organismo.

#### 5.4. Atividade enzimática de lacase

A atividade de lacase foi determinada utilizando o agente oxidante ABTS (descrita no item 4.2.4), tendo unidade de medida UI mL<sup>-1</sup>, foi encontrado neste experimentos os valores de atividade mínima e máxima de lacase em 0,0240UI mL<sup>-1</sup> e 0,2423 UI mL<sup>-1</sup> respectivamente. O comportamento da atividade enzimática encontra-se na curva de atividade enzimática apresentada no gráfico da Figura 5.4.

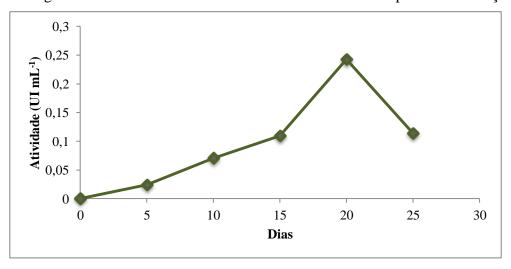


Figura 5.4: Atividade enzimática de lacase durante o tempo de fermentação.

N=2 em triplicata.

A partir desses dados verificou-se que a atividade média encontrada foi de  $A_{lac}$ = 0,133 UI mL<sup>-1</sup>. Faria (2010) encontrou  $A_{lac}$  máxima de 0,022±0,001 UI mL<sup>-1</sup>, utilizando

xilidina como substrato na produção da enzima pelo fungo *Ceriporiopsis subvermispora*. Este valor é inferior ao encontrado nesse estudo e se aproxima ao valor encontrado no 5º dia de fermentação deste trabalho, reafirmando o grande potencial do isolado em estudo na produção enzimática para a oxidação do poluente. Baptista e colaboradores (2012) encontraram atividade enzimática para lacase de 0,00194 UI mL<sup>-1</sup> pelo fungo *Penicillium commune* fermentado em meio Sabouraud, evidenciando que os valores encontrados neste trabalho são superiores a análises de remediação utilizando meios suplementados por fontes externas de nutrientes.

#### 5.5. Termoestabilidade enzimática

A Figura 5.5 mostra a diminuição da atividade enzimática após a submissão da amostra a partir da primeira temperatura do tratamento térmico (40°C), em que foi possível visualizar um comportamento de redução da sua atividade, sendo apontada a alta sensibilidade térmica, que pode ser indicativo de inicio de degradação, seguido da desnaturação da estrutura enzimática. Visto que o processo de fermentação para a produção enzimática da lacase, buscando a biorremediação do fenol, foi conduzido à temperatura de 30°C, observou-se que o maior valor de atividade de lacase foi registrado na mesma temperatura utilizada no seu processo de produção pelo isolado 01. Pacheco e Soares (2014) estudaram a estabilidade térmica da lacase utilizada na degradação de efluentes de indústria papeleira, onde revelaram que na faixa de 40°C a atividade enzimática reduziu cerca de 70%, e quando submetida à temperatura de 50°Cocorreu o total desnaturamento da estrutura enzimática, dados que se assemelham aos resultados obtidos nesse estudo.

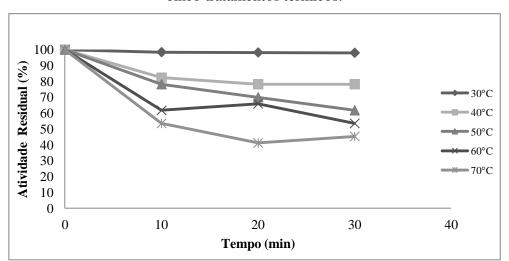


Figura 5.5: Atividade enzimática de lacase em relação ao tempo para uma faixa de cinco tratamentos térmicos.

Liu e colaboradores (2016) estudaram a o efeito da temperatura na atividade da *Acinetobacter calcoaceticus*, do grupo das Gamma proteobactérias, isolada de água residual da indústria de petróleo, visando encontrar o valor ótimo no processo de degradação de fenol, em que foi verificado que o aumento da temperatura em uma faixa de 20°C a 35°C proporcionou à *Acinetobacter calcoaceticus*o aumento de desempenho do potencial de degradação, entretanto, quando submetidos a temperaturas superiores a essa faixa, foi desencadeada a perda dessa característica. As características encontradas no estudo conduzido são coincidentes aos valores encontrado no presente estudo, justificando o comportamento de melhor atividade enzimática encontradas na faixa de temperatura de 30°C.

#### 5.6. pH ótimo para atividade enzimática

Foi avaliado entre uma faixa de pH o favorecimento maior sobre a produção da enzima pelo fungo filamentoso em meio ácido, sendo os resultados de atividades enzimáticas expressos na Figura 5.6. Isso foi mostrado no ensaio de atividade enzimática em que se observou uma maior intensidade de atividade de lacase no pH 3,0. Isso reafirmou o caráter ácido do analito, bem como a necessidade de uso de tampão em faixa de pH 5,0 para a quantificação de atividade enzimática, mostrando a sua afinidade a ambientes ácidos. Com isso, foi realizado como atividade posterior em DCCR para correlacionar os dados obtidos nas análises de melhor temperatura e pH, buscando encontrar a condição ideal com vistas a promover a produção enzimática no meio biorremediado.

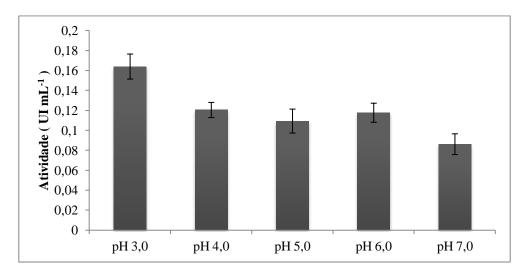


Figura 5.6: Atividade enzimática de lacase sob a variação de pH.

N= 2 em triplicata.

### 5.7. Perfil de degradação ótimo e resistência enzimática frente ao poluente

O isolado 01 foi testado frente à variação de concentração de fenol, seguindo método descrito no item 4.2.3, porém, nas condições otimizadas, em temperatura ótima 30°C e o pH ótimo 3,0. Foi construída figura com o percentual de degradação de fenol com o aumento da concentração do mesmo (Figura 5.7), onde foi possível perceber que nas concentrações crescentes de fenol de 0,05 g L<sup>-1</sup> até 0,750 g L<sup>-1</sup> houve a total remoção de fenol pelo isolado 01em estudo.

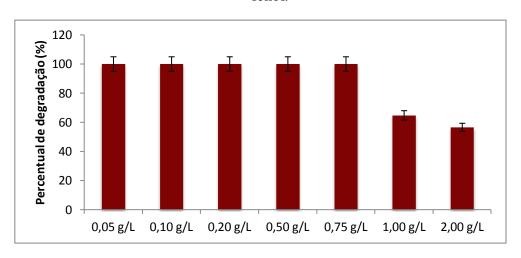


Figura 5.7: Perfil de degradação do isolado 01 frente a diferentes concentrações de fenol.

N=2 em triplicata.

Ao analisar os resultados descritos no gráfico e correlacionando às informações descritas na literatura, pôde-se sugerir que o isolado 01, escolhido para o processo de

biorremediação de fenol em efluentes, conseguiu resistir e degradar totalmente concentrações inferiores a 0,750 g L<sup>-1</sup> de fenol, sendo que as concentrações superiores testadas ocasionaram no decaimento do percentual de degradação, sugerindo a inibição da atividade fúngica pelas altas concentrações do poluente em meio pobre de nutrientes. Sivasubramanian e Namasivayam (2013) obtiveram resultados em que o seu conjunto micro-organismos eficientes (ME-1), composto por *Lactobacillus plantarum*; *Candida utilis* e *Actinomicetos Streptomycesalbus*; e *Aspergillus oryzae*, ativados a um pH 3,5, apresentou um perfil de degradação semelhante ao do isolado 01 em estudo, reduzindo meio Ramsay enriquecido, em concentrações de fenol variando entre 0,250 g L<sup>-1</sup> a 1,0 g L<sup>-1</sup>, onde obteve total remoção em meio enriquecido com fenol, salientando a eficiência do isolado 01, visto que o seu potencial biorremediador se aproxima aos resultados encontrados utilizando o *pool* de 4 micro-organismos distintos associados.

#### 5.8. Determinação das constantes enzimáticas de lacase

Para a determinação de coeficientes de cinética enzimática foram utilizadas soluções aquosas de fenol, nas concentrações de 0,05 g  $L^{-1}$  a 2,0 g  $L^{-1}$ , submetidos à degradação nas melhores condições de pH e temperatura. Os sinais de atividade obtidos foram submetidos a tratamento para a conversão e obtenção dos valores de  $K_m$  e  $V_{máx}$  (Figura 5.8).

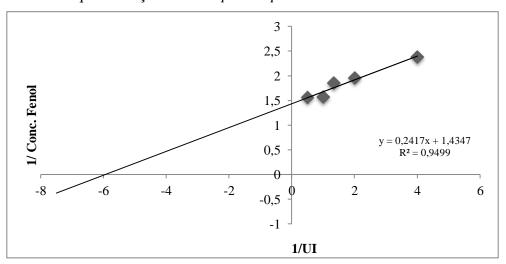


Figura 5.8: Determinação dos parâmetros  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  aplicando o método de quantificação linear *duplo recíproco* de Lineweaver-Burk.

Os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  encontrados foram de 0,168g  $L^{-1}$  e 0,697 g  $L^{-1}$  min<sup>-1</sup> respectivamente. Esses valores foram considerados bons por serem alcançados a partir do processo fermentativo de produção enzimática, sob condições severas ao micro-organismo,

utilizando o fenol como única fonte de nutriente, baseado nos resultados obtidos na seleção secundária. Espera-se que, com o enriquecimento do meio a ser biorremediado, com a adição de fontes, em quantidades ótimas de carbono e nitrogênio, a produção e atividade enzimáticas aumentem, melhorando a eficiência de biorremediação. Porém o diferencial do presente trabalho foi o estímulo do crescimento e atividade enzimática em meio pobre de suplementação para o desenvolvimento do micro-organismo, o que ocorreu com êxito.

#### 5.9. Otimização da atividade enzimática de lacase

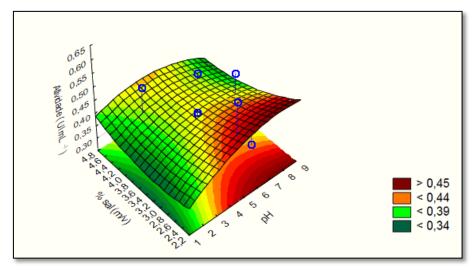
Foi plotada uma superfície de resposta (Figura 5.9) para expressar graficamente o comportamento experimental, a partir dos resultados expressos na Tabela 5.1, bem como o diagrama de Pareto (Figura 5.10), mostrando as respostas e interações entre as variáveis analisadas.

Tabela 5.1: Delineamento experimental aplicado, apresentando a combinação das variáveis independentes (pH e % NaCl) e valores médios de atividade enzimática de lacase em sistemamodelo de contaminante de fenol após 20 dias de fermentação.

Ensaios	рН	% NaCl (m/v)	Atividade média (UI mL <sup>-1</sup> ) *
1	3,0	2,75	0,3463
2	7,0	2,75	0,4962
3	3,0	4,25	0,3203
4	7,0	4,25	0,4223
5	2,18	3,5	0,3352
6	7,82	3,5	0,4815
7	5,0	1,0	0,5889
8	5,0	6,0	0,3241
9	5,0	3,5	0,4241
9	5,0	3,5	0,4093
9	5,0	3,5	0,4148

\*N=2, em triplicata.

Figura 5.9: Superfície de Resposta em função das variáveis independentes da atividade enzimática de lacase, produzida pelo isolado 01, na degradação de fenol em sistemamodelo, em função dos níveis de pH e porcentagem de NaCl adicionados (%NaCl).



A partir do gráfico da superfície de resposta gerado foi possível observar que as condições de pH e porcentagem de sal (% m/v) são inversamente proporcionais para a obtenção de melhores respostas. Foi possível observar que a região de coloração mais intensa, indicando maior intensidade na resposta, ocorreu quando o valor de pH foi máximo enquanto o valor de porcentagem de sal foi mínimo. Caso houvesse o aumento da faixa de variação analisada seria possível notar a presença do aumento da intensidade de sinal na outra extremidade da superfície de resposta, mostrando sinais inversos: o sinal se intensificaria quando o pH fosse mínimo e a porcentagem de sal fosse máxima O modelo de superfície de resposta gerou valores críticos de análise para a obtenção de ótima atividade enzimática, determinando para tal condição o pH 5,3 e percentual de sal 4,07 (m/v). Esses resultados predisseram que as variáveis sofreram interações entre si, logo foi gerado o diagrama de Pareto (Figura 5.10) para comprovação de tal análise.

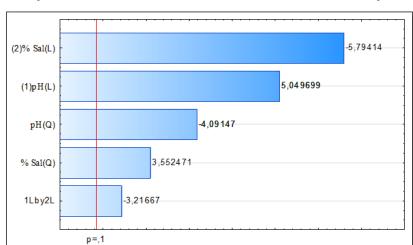


Figura 5.10: Diagrama de Pareto mostrando a significância das variáveis testadas para a otimização da atividade enzimática de lacase na biorremediação de fenol.

O diagrama de Pareto mostrou que todas as variáveis são significativas, tanto no modelo linear quanto quadrático, que há interação entre ambas e as respostas obtidas expressas no diagrama, afirmaram que, o sistema de fermentação do isolado em estudo, com adição de porcentagens de NaCl e diferentes pHs, não se adequou aos modelos matemáticos linear (L) e quadrático (Q). Como analisados na superfície de resposta, os valores das variáveis independentes estudadas foram inversamente proporcionais para a obtenção de boa variável resposta (atividade enzimática). Seria possível o ajuste das faixas de análise para buscar as condições ótimas de análise, mas os dados obtidos não se adequaram aos modelos multivariados. Foi sugerida a fixação variável de porcentagem de sal pensando no processo de biorremediação utilizando como base para o meio de fermentação a água marinha, para em uma posterior aplicação de forma mais confiável ao ambiente a ser tratado, bem como sendo uma amostra genuína e bastante representativa por conter, além do seu composto majoritário (NaCl, aprox. 3,5% m/v), outros componentes presentes que podem ser utilizados pelo microorganismo como diferentes fontes.

### 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que o isolado 01 teve a capacidade de produzir a enzima lacase de forma eficiente e com boa atividade enzimática para a degradação de fenol. Notou-se que a concentração de sal, pH e temperatura foram variáveis importantes no processo. O referido isolado foi eficiente na aplicação de biodegradação e biorremediação de compostos fenólicos poluentes em águas residuais, eliminando o fenol presente em sua totalidade para meios de concentração máxima de 0,750 g L<sup>-1</sup> de fenol. A biorremediação é uma técnica eficaz em degradação de poluentes, o isolado empregado mostrou-se resistente, salientando a busca, bem como a importância, de se estudar novas espécies de microorganismos eficientes, no tocante à remediação de meios carregados de substancias tóxicas, e, portanto, com potencial para ser aplicado na remoção de compostos fenólicos poluentes.

### REFERÊNCIASBIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, p. 1729-1738, 2011.
- ALMEIDA, M. C.; Morégula, A. A.; Marrocos, P. C. L.; de Souza, S. M. M.; de Farias, M. T. Concentração de fenol em resíduos de laboratórios de análises clínicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 431-437, 2011.
- ANDRADE, J. de A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I.C.S.F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Ecletica Química*, v.35, n.3, p.17-43, 2010.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos Uma breve revisão. **Rev. Instituto Adolfo Lutz**, v. 66 (1), p. 1-9, 2007.
- ANNADURAI, G.; LING, L. Y.; LEE, J-F. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance phenol degradation by *Pseudomonas putida*. **Journal of Hazardous Materials**, Taiwan, v. 152, p. 171-178, 2008.
- ARANTES, V. MILAGRES, A. M. F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1586-1595, 2009.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos:Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. **Editora da Unicamp**, 401p, Campinas, 2001.
- BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.45, n.11, p.1282-1289, 2010.
- BAPTISTA, N. M. Q.; SANTOS, A. C.; ARRUDA, F. V. F.; GUSMÃO, N. B. Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos. **Scientia Plena**, Recife, v.8, n. 019904, 7p, 2012.
- BATISTA, B. L.; BARIÃO, C. V.; SOUZA, J. M. O.; PAULELLI, A. C. C.; ROCHA, B. A.; OLIVEIRA, A. R. M.; SEGURA, F. R.; BRAGA, G. U. L.; TANANI, L.; ZESKA-KRESS, M. R.; BARBOSA JR., F. A low-cost and environmentally-friendly potential procedure for inorganic-As remediation based on the use of fungi isolated from rice rhizosphere. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 4, p. 891–898, 2016.
- BATISTELA, D. M. Estudo da atividade e estabilidade de lacase em líquidos iônicos. **Dissertação de Mestrado,** Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- BOURBONNAIS, R.; LEECH, D.; PAICE, M. G. Electrochemical analyses of the interaction of lacase mediators with lignin model compounds. **Biochimica et Biophysica Acta**,v.1379 p.381–390, 1998
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Oxidation of non-phenolics substrates. An expanded roles for laccases in lignin biodegradation. **FEBBS Letters**, v. 267, n. 1, p. 99-102, 1990.

- BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and lactase production by Lentinula (Lentinus) edodes. **FEMS Microbiology Letters**, Hong Kong, v. 128, p. 81-88, 1995.
- BRASIL. ANVISA Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, 02 de junho de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Brasília: 2003.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente MMA. **Conselho Nacional Do Meio Ambiente-CONAMA.** Resolução N° 357, datado 17 de março de 2005; DOU N° 053, De 18/03/2005, Págs. 58-63.
- CAI, W.; LI, J.; ZHANG, Z. The characteristics and mechanisms of phenol biodegradation by Fusarium sp...**Journal of Hazardous Materials**, Zhejiang, v. 148, p. 38–42, 2007.
- CHAKRABORTY, S.; BASAK, B.; DUTTA, S.; BHUNIA, B.; DEY, A. Decolorization and biodegradation of congo red dye by a novel white rot fungus Alternaria alternata CMERI F6. *Bioresource Technology*, v. 147, p. 662–666, 2013.
- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). **Secretaria do Estado de Meio Ambiente**, São Paulo. 2015. Disponível em <a href="http://www.cetesb.sp.gov.br">http://www.cetesb.sp.gov.br</a>. Acesso em: maio de 2018.
- CONCEIÇÃO, D.M.; ANGELIS, D.A.; BIDOIA, E.D.; ANGELIS, D. F. Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.72, n.1, p.99-106, 2005.
- CRISTÓVÃO, R. O. Degradation of dye-containing textile effluents by enzymatic catalysis. **Tese de Doutorado**, Universidad do Porto, Cidade do Porto, 2010.
- CROGNALE, S.; PESCIAROLI, L.; PETRUSCCIOLI, M.; D'ANNIBALE, A. Phenoloxidase-producing halotolerant fungi from olive brine wastewater. *Process Biochemistry*, v. 47, n. 9, p. 1433–1437, 2012.
- CRUZ, A. P. G. Avaliação do efeito da extração e da microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- CUNHA, F. S.; AGUIAR, A. P.Métodos para Remoção de Derivados Fenólicos de Efluentes Aquosos. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 4, p.844-865, 2014.
- DELLAMATRICE, P. M. Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da estação de tratamento de águas residuárias de Americana, SP. **Tese de doutorado**. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- DOS PASSOS, C. T.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de Aspergillus sp. isolada de um solo contaminado do sul do Brasil. **Química Nova**, Rio Grande, v. 32, n. 4, p. 950-954, 2009.
- DUARTE, L. T. Produção e caracterização da atividade de tirosinase no extrato bruto de *Pycnoporussanguineus CCT-4518*. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

- ESPOSITO, E.; CANHOS, V. P.; DURDN, N. Screening of lignin-degrading fungi for removal of color from kraft mill wastewater with no additional extra carbon-source. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.13, n.8, p.571-576, 1991.
- FARIA, R. A. Estudo da produção de enzimas lignolíticas por *Ceriporiopsissubvermispora*. **Dissertação de mestrado**. Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.
- FRANÇA-SANTOS, A.; ALVES, R. S.; LEITE, N. S.; FERNANDES, R. P. M. Estudos bioquímicos da enzima bromelina do Ananascomosus (abacaxi). **Scientia Plena**, São Cristóvão, v. 5, n. 11, 2009.
- GAYLARDE, C.C.; BELLINASO, M. de L.; MANFIO, G.P. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, n. 34, p.36-43, 2005.
- HASAN, S. A.; JABEEN, S. Degradation kinetics and pathway of phenol by Pseudomonas and Bacillus species. **Biotechnology, Biotechnological Equipment**, Karachi , v. 29(1), p. 45–53, 2015.
- HE, H.; YANG, H. Y.; BIGELIS, R.; SOLUM, E. H.; GREENSTEIN, M.; CARTER, G. T. Pyrrocidines A and B, new antibiotics produced by a filamentous fungus. **Tetrahedron Letters**, New York, v.43, p.1633–1636, 2002.
- H.I. ATAGANA. Biodegradation of phenol, o-cresol, m-cresol and p-cresol by indigenous soil fungi in soil contaminated with creosote. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, p. 851–858, 2004.
- JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.
- JIANG, Y.; YANG, K.; WANG, H.; SHANG, Y.; YANG, X. Characteristics of phenol degradation in saline conditions of a halophilic strain JS3 isolated from industrial activated sludge. **Marine Pollution Bulletin.**v.99, p. 230–234, 2015.
- KUMAR, S.; NEERAJ; MISHRA, V. K.; KR. KARN, S. Biodegradation of phenol by free and immobilized Candida tropicalis NPD1401.**African Journal of Biotechnology**, Dehradun, v. 17(3), p. 57-64, 2017.
- LEITÃO, A. L.; DUARTE, M. P. E OLIVEIRA, J. S. (2007). Degradation of phenol by a halotolerant strain Penicilliumchrysogenum. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Lisboa, v. 59, p. 220-225, 2007.
- LIMA, D.F.; OLIVEIRA, O.M.C.; CRUZ, M.J.M. Utilização dos fungos na biorremediação de substratos contaminados por petróleo: estado da arte. *Cadernos de Geociências*, v. 8, n. 2, 2011.
- LIMA, M. T. N. S.; SANTOS, L. B.; BASTOS, R. W.; NICOLI, J. R.; TAKAHASHI, J. A. Antimicrobialactivityandacetylcholinesteraseinhibitionbyextractsfromchromatinmodulatedfun gi. **Brazilian Journal of Microbiology**, Belo Horizonte, v.49, p.169–176, 2018.

- LITCHFIELD, C. Thirty years and counting: bioremediation in its prime? **Bio Science**.v. 55, n. 3, p. 273- 279, 2005.
- LIU, Z.; XIE, W.; LI, D.; PENG, Y.; LI, Z.; LIU, S. Biodegradation of phenol by bacteria strain *acinetobacter calcoaceticus* pa isolated from phenolic wastewater. **Internacional Journal of Environmental Research and Public Health**, Maoming, v. 13, n. 300, p. 1-8,2016.
- MARCHAND, C.; ST-ARNAUD, M.; HOGLAND, W.; BELL, T. H.; HIJRI, M. Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Suécia, v. 116, p.48-57, 2017.
- MARCO-URREA, E.; GARCIA-ROMERA, I.; ARANDA, E. Potential of non-ligninolytic fungi in bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons. *New Biotechnology*, v. 32, n. 6, p.620-629, 2015.
- MATTIETTO, R.A.; MATTA, V. M. Utilização de um delineamento composto central rotacional para avaliação microbiológica de polpas de açaí pasteurizadas. **Trabalho completo em anais de evento**. 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Química, ISSN 2178-3659, p.3208-3213, Búzios, 2012.
- MESTER, T.; TIEN, M. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 46, p. 51-59, 2000.
- MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. Manual de soluções, reagentes e solventes: Padronização, preparação e purificação. **Editora Bluscher,** 2ª edição, 726 p., 2007.
- MULLER, L. BIOSSENSOR A BASE DE LACASE (PYCNOPORUS SANGUINEUS) PARA ANÁLISE AMBIENTAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.
- PEREIRA, E. L.; OLIVEIRA, A. F. A. A PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS POR PROCESSOS FERMENTATIVOS AERÓBIOS. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 14, n. 2, p. 1058-1078, 2016.
- PINHEIRO, Z. B.; RODRIGUES, K.; PESSOA-WANDERLEY, C. R.; ARAÚJO, R. S.; MARINHO, G. Remoção biológica de fenol por uso de reator contínuo com inóculo de Aspergillus niger. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.15, n.1, p. 47-52, 2010.
- PUNT, P.J., et al. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnology*, v. 20, n. 5,p. 200-206, 2002.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n. 5, p.771-780, 2004.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos. **Editora Casa do Pão**, 618p., Campinas, 2005.
- RODRIGUES, K; SILVA, K.M.L.; SILVA, G.M.M.; LIMA, P.C.C; WANDERLEY, C.R.P.;

- SILVA G.M.S. Remocao de corante por uso de Aspergillus niger AN400 em reator de bateladas sequenciais. **Química Nova**, vol 34, n. 7, p.1119-1123, 2011.
- ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N. e KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesses ambiental. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.
- SALAR, R.K.; PUREWAL, S. S.; BHATTI, M. S. Optimization of extraction conditions and enhancement of phenolic content and antioxidant activity of pearl millet fermented with *Aspergillus awamori MTCC-548*. **Resource-Efficient Technologies**, Índia, v. 2, p. 148–157, 2016.
- SANTOS, V.L.; LINARDI, V.R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents—identification and degradation potential. **Process Biochemistry**, v.39, p.1001–1006, 2004.
- SANTOS, V. L.; HEILBUTH, N. M.; BRAGA, D. T.; LINARDI, V.R. Phenol degradation by a Graphium sp. FIB4 isolated from industrial effluents. **Journal Basic Microbiology**, n. 43, v. 3, p. 238–248, 2003.
- SARAMAGO, S. P.; STEFFEN JUNIOR, V.; SILVA, J. D.; SARAMAGO, S. F. P. Planejamento de experimentos e otimização de sistemas mistos. **Revista FAMAT**, v. 11, n. 11, p. 231-245, 2008.
- SEO, J.; JEON, J.; KIM, S-D.; KANG, S.; HAN, J.; HUR, H-G. Fungal biodegradation of carbofuran and carbofuran phenol by the fungus *Mucor ramannianus*: identification of metabolites. **Water Science & Technology**, Gwangju, v. 55, n. 1–2, p. 163-167, 2007.
- SILVA, N. R. A.; LUNA, M. A. C.; SANTIAGO, A. L. C. M. A.; FRANCO, L. O.; SILVA, G. K. B.; SOUZA, P. M.; OKADA, K.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; SILVA, C. A. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biosurfactant-and-Bioemulsifier Produced by a Promising Cunninghamellaechinulata Isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil. International Journal of Molecular Sciences, Recife, v.15, p.15377-15395, 2014.
- SIQUEIRA, A. J. S.; AZEVEDO, A. M. P.; MATTOS-DUTRA, A.; FIN, C. A.; LANDO, V. R.; ROTTA, L. N.; WINK, M. R.; BJERK, R. L.; FERRACINI, M. S. Determinação do Km e V Max: revisão e uma nova proposta. **Ciência em Movimento**, Ano XIII, n. 27, p. 47-52, 2011.
- SIVASUBRAMANIAN, S.; NAMASIVAYAM, S. K. R. Evaluation of phenol degradation by effective microorganism (EM) technology with EM-1. **African Journal of Microbiology Research**, Tamil Nadu, v. 7(32), p. 4117-4122, 2013.
- SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. *Journal of Experimental Botany*, n. 56, p. 273-286, 2005.
- SOUSA, E. T. Quinonas no ar atmosférico : determinação, concentrações e correlação entre as fases vapor e particulada. **Tese de doutorado**. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.
- SOUSA, M. A. C., Atividade de peroxidases, lectina e de β-glucano durante as fases de cultivo

- de *Lentinulaedodes*(Berk.) Pegler. **Tese de doutorado**, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- SOUZA, A.F.; ROSADO, F.R. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, v.2, n.1, p.121-139, 2009.
- SOUZA, J.I.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A. ESCHOENLEIN, N.C.; Biossorção de cobre, manganês e cádmio por biomassas de *Saprolegnia subterrânea* (Dissmann) R. L. Seym. E *Pytthium torulosum* Coker&P.Patt. (Oomycetes). *Acta BotanicaBrasilica*, v. 22, n. 1, p.217-223, 2008.
- SUGUMARAN, M.; GIGLIO, L.; KUNDZICZ, H.; SAUL, S.; SEMENSI, V. Studies on the enzyme involved in puparial cuticle sclerotization in Drosophila melanogaster. **Archives Insect biochemistry Physiological**, Paris, v.19, p.271- 283, 1992.
- VILELLA, S. M. Imobilização de lacase e seu uso na biotransformação de efluentes de indústrias papeleiras. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- WHITAKER, J. R. Principles of Enzymology for the Food Sciences. **Editora Davis**, Universidade daCalifornia, 625 p., 1994.
- WU, M.; LI, W.; DICK, W. A.; YE, X.; CHEN, K.; KOST, D.; CHEN, L. Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum contaminated soil and microbial population and activity determination. **Chemosphere**, USA, v.169, p.124-130, 2017.
- ZANIN, E.; SILVA, I. E. C.; LOPES, T. J.; CANCELIER, A.; COSTELI, M. C.; SILVA, A. Estudo da degradação de compostos fenólicos presente em águas residuárias de postos de combustíveis utilizando fungos filamentosos (Aspergillus Flavus). **REGET**, v. 18 n. 1, p.279-287, 2014.
- ZHOU, W.; GUO, W.; XINHUA, H. Z. Phenol degradation by Sulfobacillus acidophilus TPY via the meta-pathway. **Microbiological Research**, Changsha, v. 190, p. 37–45, 2016.

 $\label{eq:Apendice} A - Tabela 6: Dados da seleção primária para teste de crescimento de isolados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) com enriquecimento de fenol nas concentrações de 200 mg <math display="inline">L^{\text{-}1}$  e 700 mg  $L^{\text{-}1}.$ 

# Crescimento qualitativo

Micro-organismo isolado	200 mg L <sup>-1</sup> de fenol	700 mg L <sup>-1</sup> de fenol
LPN-01	Positivo	Positivo
LPN-02	Positivo	Negativo
LPN-03	Positivo	Positivo
LPN-04	Positivo	Negativo
LPN-05	Positivo	Negativo
LPN-06	Positivo	Negativo
LPN-07	Positivo	Positivo
LPN-08	Positivo	Negativo
LPN-09	Positivo	Negativo
LPN-10	Positivo	Positivo
LPN-11	Positivo	Positivo
LPN-12	Positivo	Negativo
LPN-13	Positivo	Negativo
LPN-14	Positivo	Positivo
LPN-15	Positivo	Negativo
LPN-16	Positivo	Negativo
LPN-17	Positivo	Negativo

LPN-18	Positivo	Negativo
LPN-19	Positivo	Negativo
LPN-20	Positivo	Negativo
LPN-21	Positivo	Negativo
LPN-22	Positivo	Negativo
LPN-23	Positivo	Negativo
LPN-24	Positivo	Negativo
LPN-25	Positivo	Positivo
LPN-26	Positivo	Positivo
LPN-27	Negativo	Negativo
LPN-28	Positivo	Negativo
LPN-29	Positivo	Negativo
LPN-30	Positivo	Negativo
LPN-31	Positivo	Negativo
LPN-32	Positivo	Positivo
LPN-33	Positivo	Negativo
LPN-34	Positivo	Negativo
LPN-35	Positivo	Negativo
LPN-36	Positivo	Positivo
LPN-37	Positivo	Positivo
LPN-38	Positivo	Negativo

LPN-39	Positivo	Negativo
LPN-40	Positivo	Negativo
LPN-41	Positivo	Negativo
LPN-42	Positivo	Negativo
LPN-43	Positivo	Negativo
LPN-44	Positivo	Negativo
LPN-45	Positivo	Negativo
LPN-46	Negativo	Negativo
LPN-47	Positivo	Positivo
LPN-48	Positivo	Positivo
LPN-49	Positivo	Negativo
LPN-50	Positivo	Negativo
LPN-51	Positivo	Negativo
LPN-52	Positivo	Negativo
LPN-53	Positivo	Negativo
LPN-54	Positivo	Negativo