



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI

Campus Alto Paraopeba

Engenharia de Bioprocessos

**Avaliação da produção de enzimas ligninolíticas a partir de *Ceriporiopsis subvermispora*
imobilizado em *Luffa cylindrica***

Maira Fernanda Alves Bueno

Orientadora: Prof^ª.Dr^ª. Sandra de Cássia Dias

Ouro Branco – MG

Junho/2017

**Avaliação da produção de enzimas ligninolíticas a partir de *Ceriporiopsis subvermispora*
imobilizado em *Luffa cylindrica***

Maira Fernanda Alves Bueno

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
em cumprimento às exigências do Curso de
Engenharia de Bioprocessos *Campus* Alto
Paraopeba da Universidade Federal de São
João del-Rei.

Orientadora: Sandra de Cássia Dias

Ouro Branco – MG

Junho/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI

Campus Alto Paraopeba

Engenharia de Bioprocessos

Avaliação da produção de enzimas ligninolíticas a partir de *ceriporiopsis subvermispora*
imobilizado em *Luffa cylindrica*

Maira Fernanda Alves Bueno

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Prof^ª. Dr^ª. Sandra de Cássia Dias – Orientadora

Prof^ª. M^a. Isabel Cristina Braga Rodrigues – Examinador 1

Eng^a. Paula Resende Vieira – Examinador 2

Ouro Branco, 06/07/2017

RESUMO

O *Ceriporiopsis subvermispora* é um dos fungos da podridão branca, decompositor de madeira, pertencente à família *Polyporaceae*. As principais enzimas produzidas por este fungo são a lacase (Lac), a manganês peroxidase (MnP) e a atividade de lignina peroxidase (LiP) é pouco relatada na literatura. Essas enzimas são de interesse industrial, utilizadas em indústria de papel, pré-tratamento de material lignocelulósico para liberação de celulose, biorremediação de poluentes e para a descoloração de corantes sintéticos. No entanto, a síntese destas enzimas depende do meio e do tipo de cultivo sólido, submerso e imobilizado. Fungos filamentosos crescem naturalmente aderidos sobre superfícies, e essa característica é utilizada para biorreatores, portanto, estudos que favoreçam a produtividade das enzimas ligninolíticas em larga escala são importantes. O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de enzimas ligninolíticas utilizando o fungo *Ceriporiopsis subvermispora* imobilizando em *Luffa cylindrica*. Utilizou-se o planejamento fatorial 2^2 , tendo como variáveis a forma da *L. cylindrica* triturada (-) e cúbica (+) e o seu tratamento, à vapor (-) e com NaOH (+). As atividades enzimáticas, açúcares redutores totais, concentração de células imobilizadas e retidas foram quantificadas através de métodos analíticos. O tempo de cultivo foi de 21 dias. A bucha tratada a vapor e triturada apresentou melhor resultado para a atividade enzimática de MnP, com 10,903 U_{MnP}/L . O tratamento a vapor e forma cúbica foram mais indicados para a produção de Lac com 1,383 U_{Lac}/L e também para a imobilização celular com uma concentração de células de 3,40 g/L e para a retenção com 0,170. O pico de produção destas enzimas foi no quarto dia de cultivo. Sobre a presença da atividade enzimática de LiP, os ensaios não foram conclusivos, devido ao método utilizado para sua determinação. Na análise de açúcares redutores totais, não houve-se quase interferência sobre o consumo ou a produção dos mesmos.

Palavras-chave: *Ceriporiopsis subvermispora*; *Luffa cylindrica*; enzimas ligninolíticas; planejamento fatorial; imobilização celular.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação de uma lacase, mostrando os íons cobre (T1, T2, T3). As esferas cinza representam carboidratos. Fonte: LORENCI, 2016.	8
Figura 2: Ciclo catalítico de Lacs . Oxidação de lignina pela Lac, por consequência redução de Cu^+ e inativação de sua atividade. Para a Lac estar na sua conformação nativa é necessário o íon Cu^{++} Fonte: FARIA, 2010.	9
Figura 3: Ciclo catalítico de LiPs. Fonte: Modificado de FARIA, 2010.	11
Figura 4: A estrutura geral de manganês peroxidase. As esferas vermelhas representam os íons de cálcio e a esfera marrom representa o íon de manganês. Fonte: SUNDARAMOORTHY <i>et al.</i> , 2010; SILVA, 2012.....	12
Figura 5: Ciclo catalítico de MnPs. Fonte: HOFRICHTER, 2002.	13
Figura 6: Esquema representativo dos principais suportes utilizados em imobilização celular e enzimática. Fonte: SANTOS, 2013.	15
Figura 7: Diferentes métodos de imobilização celular de microrganismos. Fonte: PILKINGTON <i>et al.</i> (1998); COVIZZI <i>et al.</i> (2007).....	16
Figura 8: Imagem de uma plantação de <i>Luffa cylindrica</i> . Fonte: EXOTIC-PLANTS, 2017..	18
Figura 9: Gráfico da produção de Lac, utilizando células de <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> imobilizado em <i>Luffa Cylindrica</i> . As amostras foram retiradas nos dias 0, 4, 8, 11, 15, 19 e 21.	28
Figura 10: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de Lac. [resposta média: U/L] em cultivo submerso do <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> submersos utilizando <i>Luffa cylindrica</i> como suporte imobilizador. Tratamento na <i>Luffa cylindrica</i> : à vapor (-) e NaOH (+); Forma da <i>Luffa cylindrica</i> : triturada (-) e cúbica (+).	30
Figura 11: Gráfico da produção de MnP, utilizando células de <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> imobilizado em <i>Luffa Cylindrica</i> . As amostras foram retiradas nos dias 0, 4, 8, 11, 15, 19 e 21.	32
Figura 12: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de MnP. [resposta média: U/L] em cultivo submerso do <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> submersos utilizando <i>Luffa cylindrica</i> como suporte imobilizador. Tratamento na <i>Luffa cylindrica</i> : a vapor (-) e NaOH (+); Forma da <i>Luffa cylindrica</i> : triturada (-) e cúbica (+).	34

Figura 13: Gráfico da curva padrão da concentração de açúcares redutores.	35
Figura 14: Gráfico da concentração de açúcares redutores, nos dias de cultivos 0, 11 e 21. Concentração de açúcares redutores (g/L) por ensaio.	35
Figura 15: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para na concentração de açúcares redutores no 11º dia de cultivo [resposta média: g/L] em cultivo submerso do <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> submersos utilizando <i>Luffa cylindrica</i> como suporte imobilizador. Tratamento na <i>Luffa cylindrica</i> : a vapor (-) e NaOH (+); Forma da <i>Luffa cylindrica</i> : triturada (-) e cúbica (+).	37
Figura 16: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para na concentração de açúcares redutores no 21º dia de cultivo [resposta média: g/L] em cultivo submerso do <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> submersos utilizando <i>Luffa cylindrica</i> como suporte imobilizador. Tratamento na <i>Luffa cylindrica</i> : a vapor (-) e NaOH (+); Forma da <i>Luffa cylindrica</i> : triturada (-) e cúbica (+).	38
Figura 17: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para na concentração de células imobilizadas no suporte [resposta média: g/L] em cultivo submerso do <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> submersos utilizando <i>Luffa cylindrica</i> como suporte imobilizador. Tratamento na <i>Luffa cylindrica</i> : a vapor (-) e NaOH (+); Forma da <i>Luffa cylindrica</i> : triturada (-) e cúbica (+).	40
Figura 18: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para na retenção de células no suporte [resposta média: (g/L)/(g/L)] em cultivo submerso do <i>Ceriporiopsis</i> <i>subvermispota</i> submersos utilizando <i>Luffa cylindrica</i> como suporte imobilizador. Tratamento na <i>Luffa cylindrica</i> : a vapor (-) e NaOH (+); Forma da <i>Luffa cylindrica</i> : triturada (-) e cúbica (+).	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química da <i>Luffa cylindrica</i>	19
Tabela 2: Planejamento experimental 2^2 para avaliar produção de enzimas ligninolíticas utilizando o <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> imobilizado em <i>Luffa cylindrica</i>	22
Tabela 3: Relação das diluições realizadas da solução de glicose a 1,0 g/L.	26
Tabela 4: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos tipo de tratamento e forma da <i>Luffa cylindrica</i> utilizada para imobilizar <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> em cultivo submerso na produção de Lacase.	29
Tabela 5: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de tratamento da <i>Luffa cylindrica</i> utilizada para imobilizar <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> em cultivo submerso na produção de MnP.	33
Tabela 6: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de tratamento da <i>Luffa cylindrica</i> utilizada para imobilizar <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> na concentração de açúcares redutores no 11º dia de cultivo.....	36
Tabela 7: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de tratamento da <i>Luffa cylindrica</i> utilizada para imobilizar <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> na concentração de açúcares redutores no 21º dia de cultivo.....	38
Tabela 8: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de tratamento da <i>Luffa cylindrica</i> na imobilização do <i>Ceriporiopsis subvermispota</i>	39
Tabela 9: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de tratamento da <i>Luffa cylindrica</i> utilizada para imobilizar <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> na, analisando a retenção de células no suporte.	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO	3
2.1	<i>Objetivo Geral</i>	3
2.2	<i>Objetivos Específicos</i>	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	4
3.1.1	Lacase (Lac)	7
3.1.2	Lignina Peroxidase (LiP)	10
3.1.3	Manganês Peroxidase (MnP)	12
3.2	<i>Imobilização de células microbianas</i>	14
3.2.1	<i>Luffa cylindrica</i>	17
3.3	<i>Planejamento fatorial</i>	19
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	<i>Bucha Luffa cylindrica</i>	22
4.1.1	Tratamento para Imobilização	23
4.1.2	Tratamento com NaOH	23
4.1.3	Tratamento a vapor	23
4.2	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	23
4.2.1	Manutenção das células	23
4.2.2	Preparo do inóculo	23
4.2.3	Fermentação	24
4.3	<i>Atividade Enzimáticas</i>	24
4.3.1	Lacase	24
4.3.2	Manganês Peroxidase	25
4.3.3	Lignina Peroxidase	25
4.3.4	Cálculo das atividades enzimáticas	25
4.4	<i>Determinação de açúcares redutores totais</i>	26
4.4.1	Metodologia de açúcares redutores totais	27
4.5	<i>Determinação de células fúngicas imobilizadas</i>	27

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	<i>Avaliação da Produção de Lacase (Lac)</i>	28
5.2	<i>Avaliação da Produção de Lignina Peroxidase (LiP)</i>	31
5.3	<i>Avaliação da Produção de Manganês Peroxidase (MnP)</i>	32
5.4	<i>Açúcares Redutores Totais (ART)</i>	35
5.5	<i>Imobilização das células em Luffa cylindrica</i>	39
6	CONCLUSÃO	44
7	PERSPECTIVAS	45
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

O *Ceriporiopsis subvermispora* é um fungo da podridão branca muito estudado e utilizado na decomposição de madeira e biopolpação, devido a sua característica de degradar lignina (MENDES, 2008; FARIA, 2010). As principais enzimas produzidas por este fungo, responsáveis pela degradação da lignina, são a lacase (Lac) e a manganês peroxidase (MnP). A atividade da lignina peroxidase (LiP) é pouco relatada na literatura.

Este fungo produz enzimas de interesse industrial, principalmente para aplicação ambiental como, tratamento de efluentes, biorremediação e descoloração de corantes sintéticos. Também pode ser empregado na indústria de papel, têxtil e pré-tratamento de material lignocelulósico. Para todos esses processos as enzimas não precisam apresentar um grau de pureza alto, sendo que o caldo proveniente da fermentação pode ser utilizado (BABIČ *et al.*, 2012; MACEDO *et al.*, 2015). No entanto, a produção destas enzimas depende da composição do meio de cultivo e do tipo de cultivo, se é sólido, submerso ou imobilizado.

Normalmente, os fungos filamentosos crescem, naturalmente, aderidos sob superfícies. Essa característica é utilizada em biorreatores com biomassa imobilizada, em biorreatores de leitos embalados, biorreatores de discos rotativos e biorreatores de biofilme (BABIČ *et al.*, 2012). Portanto, podem ser imobilizados em superfícies com biomassa vegetal, as mesmas oferecem o suporte para sua adesão e o substrato para estimular o metabolismo (BABIČ *et al.*, 2012), sendo a *Luffa cylindrica*, um exemplo deste tipo de material, pois sua estrutura apresenta lignina, celulose e hemicelulose.

A bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) apresenta estrutura natural entrelaçada, alto grau de porosidade, alto volume específico, biodegradabilidade, baixo custo, leve, cilíndrica, renovável e atóxica. Além de ser cultivada em todo território nacional e possuir estabilidade em diferentes valores de pH e em altas temperaturas (MEDRADO, 2011; LACERDA, 2015). Características que contribuem para o seu potencial de uso como suporte para imobilização celular sendo um material promissor e atrativo.

Na imobilização celular (IC) de fungos filamentosos, os suportes devem apresentar poros maiores, por crescerem formando hifas, os fungos penetrariam nestes suportes com maior facilidade, ocupando os espaços internos vazios (COVIZZI *et al.*, 2007). A *Luffa*

cylindrica, por apresentar poros grandes é um dos suportes ideais para imobilização de fungos.

No cultivo utilizando células imobilizadas deve-se ter uma apropriada transferência de substrato e O₂ no meio, favorecendo a nutrição das células. Isso é influenciado diretamente pela agitação, tempo de cultivo, concentração celular, tamanho dos poros do suporte e viscosidade do meio. Os valores de pH e temperatura também são importantes para crescimento do microrganismos, a temperatura ideal de crescimento do *C. subvermispota* é em torno de $27 \pm 2^\circ \text{C}$, pH ideal 5 a 4,5 (MENDES, 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de enzimas ligninolíticas utilizando o fungo *Ceriporiopsis subvermispota* imobilizado em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de enzimas ligninolíticas utilizando o fungo *Ceriporiopsis subvermispora* imobilizado em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*).

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de Lacase utilizando *Ceriporiopsis subvermispora* imobilizado em *Luffa cylindrica* com dois tratamentos e duas formas estruturais diferentes.
- Avaliar a produção de Lignina Peroxidase utilizando o *Ceriporiopsis subvermispora* imobilizado em *Luffa cylindrica* com dois tratamentos e duas formas estruturais diferentes.
- Avaliar a produção de Manganês Peroxidase utilizando o *Ceriporiopsis subvermispora* imobilizado em *Luffa cylindrica* com dois tratamentos e duas formas estruturais diferentes.
- Avaliar a eficiência de imobilização celular do fungo *Ceriporiopsis subvermispora* imobilizado em *Luffa cylindrica* com dois tratamentos e duas formas estruturais diferentes.
- Avaliar utilizando o planejamento fatorial o melhor tratamento e forma estrutural para obtenção de biomassa e enzimas ligninolíticas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Ceriporiopsis subvermispota*

Os fungos do gênero *Ceriporiopsis* Dom. são conhecidos como causadores de decomposição branca da madeira, pertencentes à família *Polyporaceae* (BURDSALL Jr., 1998; MENDES, 2008). Portanto, esses fungos apresentam ampla seletividade para a degradação de lignina em madeiras duras e moles (AKHTAR *et al.*, 1998; AKHTAR *et al.*, 2000; FERRAZ *et al.*, 2008; FARIA, 2010). Além de serem ótimos colonizadores da madeira, o que facilita sua imobilização nas mesmas ou em estruturas parecidas (VICENTIM, 2007).

O *C. subvermispota* é reportado na literatura como um dos mais seletivos para a degradação de lignina, onde as enzimas fúngicas removem primeiramente a lignina e os polissacarídeos não celulósicos sem uma degradação extensa da própria celulose (FERRAZ *et al.*, 2013; BABIČ *et al.*, 2012), muito estudado nesta área, apresentando bons resultados (AKHTAR *et al.*, 1998; VICENTIM, 2007; BABIČ *et al.*, 2012).

A lignina é um polímero natural, polifenólico e amorfo, altamente reticulado, e resistente à degradação biológica (MACEDO *et al.*, 2015). É indutor natural na produção de enzimas ligninolíticas no metabolismo do *C. subvermispota* (ŠUŠLA *et al.*, 2007; BABIČ *et al.*, 2012). Portanto, suportes a base de lignina estimulam a produção destas enzimas.

Esta degradação ocorre devido ao complexo oxidativo, presente no metabolismo do *C. subvermispota*. As principais enzimas envolvidas são a lacase (Lac) e manganês peroxidase (MnP), juntamente com mediadores de baixa massa molecular, quais por possuir justamente baixa massa molecular são difusíveis e podem dar início à decomposição da madeira e facilitar a penetração de enzimas degradantes de lignina (MACEDO *et al.*, 2015).

Esses compostos de baixa massa molar desorganiza a estrutura da parede celular, aumentando o tamanho dos poros já presentes nesta estrutura. O maneira exata da ação destes compostos não é completamente relatada em literatura. Sabe-se que atuam na parede celular de vegetais, além de serem cofatores de enzimas oxidativas (LiP, Lac e MnP) na degradação de lignina. Já em enzimas hidrolíticas que realizam a degradação dos polissacarídeos não há a existência dos mesmos. Alguns exemplos desses agentes de baixa massa molar são o álcool veratrílico, ácido oxálico, ácido 3-hidroxi-antranílico, entre outros (MENDES, 2008).

Normalmente, a degradação de lignina por esses fungos também é explicada devido a penetração de suas hifas na parede da célula da madeira e secreção de enzimas que atuam sobre a madeira. A hemicelulose e celulose são despolimerizadas, já a lignina é fragmentada e convertidas em substâncias solúveis susceptíveis ao metabolismo intracelular que culmina na geração de energia, CO₂ e água (FARIA, 2010). Isso explica o fato desses fungos serem boas ferramentas para a biotecnologia, uma vez que podem atuar sobre estruturas complexas como a lignina, celulose e hemicelulose fazendo a sua degradação.

Quando o *C. subvermispora* é cultivado utilizando diferentes fontes de carbono, pode-se induzir enzimas do complexo celulolítico (endoglucanase, β -glicosidase e exoglucanase), hemicelulolítico (xilanases, β -xilosidase) e ligninolítico (manganês peroxidase, lacase e lignina peroxidase) e de proteases (FARIA, 2010). O cultivo em estado sólido deste fungo utilizando a casca de arroz, como suporte para imobilização produziu celulase, xilanase, lacase, fenoloxidasas totais e celobiose desidrogenase (PRICHULA *et al.*, 2010).

MAGALHÃES (2005) investigou a presença das enzimas hidrolíticas produzidas pelo *C. subvermispora* em biorreatores contendo cavacos de *Pinus taeda*, por 30 dias, a 27° C. A produção das enzimas variou no cultivo em biorreator obtendo-se xilanase, mananase, endoglucanase, β -glicosidase e baixas atividades de β -xilosidase.

Em relação às enzimas ligninolíticas, o *C. subvermispora* produz, principalmente, lacases (Lacs) e manganês peroxidases (MnPs). Enzimas envolvidas na mineralização da lignina, e decomposição da madeira, atuando em conjunto com compostos de baixa massa molar (RUTTIMANJOHNSON *et al.*, 1993; FERRAZ; CÓRDOVA; MACHUCA, 2003; RUTTIMANJOHNSON *et al.*, 1993; AGUIAR; FERRAZ, 2008; FARIA 2010). Já a produção de lignina peroxidase (LiP), normalmente, não é relatada nos trabalhos publicados (FARIA, 2010). Porém, TANAKA *et al.* (2009), descreveram pela primeira vez a atividade de LiP, em um cultivo de doze semanas em cavacos de *Fagus crenata*. Na segunda semana observaram a presença da LiP, tendo uma melhor produção na terceira semana. Após a terceira semana, começou a diminuir rapidamente até a oitava semana de cultivo. A celobiose desidrogenase (CDH), também, é produzida pelo *C. subvermispora*. Esta enzima, aparentemente, está associada aos sistemas celulolítico e oxidativo de fungos basidiomicetos, ascomicetos e em algumas bactérias (HENRIKSSON; JOHANSSON; PETTERSSON, 2000b; ZÁMOCKÝ *et al.*, 2006; FARIA, 2010).

As isoformas das enzimas MnP e Lac, do *C. subvermispora*, são codificadas por três e dois genes, respectivamente, com seus respectivos alelos (LOBOS *et al.*, 1994; KARAHANIAN *et al.*, 1998; LARONDO *et al.*, 2001, 2003; FARIA, 2010). De acordo com FARIA (2010) a regulação da expressão gênica é determinada por sítios encontrados em algumas regiões nos genes de MnP (*mnp*) que possuem elementos proximais comuns como: TATA *box*, sítios AP1 e AP2, bem como sítios para regulação da transcrição por metais (MRE), cAMP (CRE), compostos xenobióticos (XRE) e choque térmico (HSE), e para os genes de Lac (*lcs*) a regulação ocorre por elementos promotores TATA *box*, sítios CAAT e MREs e elementos ACE1.

Para a expressão da MnP o Mn^{2+} causa uma regulação diferencial no gene *mnp* (1 e 2) em *C. subvermispora*. É sugerido que o íon metálico tem participação ativa na modificação transcricional de RNAm (*mnp*) (FARIA, 2010). No entanto, esse fungo produz MnP na presença e na ausência de Mn^{2+} , porém na ausência deste íon a síntese de MnP é intracelular, e quando há adição do íon ocorre favorecimento da secreção da enzima (MANCILLA *et al.*, 2010; FARIA, 2010).

MANUBENS *et al.* (2007) avaliou-se o efeito do Mn^{2+} na produção de lac extracelular, observaram que em altas concentrações de Mn^{2+} a transcrição de RNAm (*lcs*), da lacase foi diminuída, já em baixas concentrações foram obtidos altas expressão do gene *lcs*, isso foi confirmando pelas análises de “*Northern blot*”. Porém, quando havia a presença do Cu^{2+} ou Ag^{+} , teve-se alta transcrição de RNAm (*lcs*), somente em culturas que tinha ausência de Mn^{2+} . Neste estudo também observou que o Mn^{2+} estimula o crescimento do micélio do fungo.

Outra questão interessante, é o efeito de cobre na expressão de genes da Lac, o qual também é regulador na transcrição de RNAm (*lcs*), isso foi confirmado através de análises “*Northern blot*” realizadas a partir de cultivos de *C. subvermispora*. Na ausência de Cu^{2+} não foram localizados transcritos para RNAm (*lcs*), enquanto na sua presença ocorreu o oposto (KARAHANIAN *et al.*, 1998; FARIA, 2010).

Portanto, cobre é importante para transcrição de RNAm (*lcs*), desta forma, como já mencionado na literatura os genes *mnp* (1 e 2) de *C. subvermispora* também foram transcritos quando a cultura foi suplementada com Cu^{2+} . Logo, isso evidencia que cobre pode exercer

regulação diferencial tanto para Lac quanto para MnP (ÁLVAREZ *et al.*, 2009; FARIA 2010).

O *Ceriporiopsis subvermispora* tem muitas aplicações industriais, principalmente em pré-tratamento de material lignocelulósico, para liberação de lignina e celulose, nas indústrias de papel e têxtil, tratamento de efluentes, biorremediação de poluentes e degradação de organopoluentes (BABIČ *et al.*, 2012).

Alguns estudos relatam que o sistema ligninolítico do *C. subvermispora* não produz lignina peroxidase em culturas sólidas e líquidas, necessitando de estratégias para sua produção (SALAS *et al.*, 1995; ENOKI *et al.*, 1999; LOBOS *et al.*, 2001; HOFRICHTER, 2002; HAKALA *et al.*, 2004; SOUZA-CRUZ *et al.*, 2004; MAGALHÃES, 2005).

Como descrito o *C. subvermispora* produz diferentes enzimas. Sendo que a produção *in vitro* destas enzimas é dependente da composição meio de cultivo, do tipo de fermentação, estado líquido, sólido, submerso ou imobilizado. É interessante dizer que em estado sólido, por melhor imitar seu hábitat natural, pode favorecer resultados positivos (MENDES; FARIA, 2010).

Os fungos filamentosos possuem característica natural para aderir às superfícies, portanto, isto pode ser utilizado em vários tipos de biorreatores como em biomassa imobilizada, em biorreatores de leitos embalados, biorreatores de discos rotativos e reatores de biofilme (BABIČ *et al.*, 2012).

Ao realizar seu cultivo em meio líquido e com agente imobilizante, promove a transferência de substrato e O₂ no meio de cultivo facilitando sua nutrição. E claro, que isso será influenciado pela agitação, aeração, tempo de cultivo. Essas variáveis são importantes para que ocorra uma transferência de massa eficiente. Os valores de pH e temperatura bem controlados são essenciais para crescimento do microrganismos, sua temperatura ideal de crescimento é em torno de 27 ± 2° C, pH ideal 5 a 4,5 e agitação 100 a 150 rpm (MENDES, 2008 ; FARIA, 2010).

3.1.1 Lacase (Lac)

A lacase (Lac) foi descrita pela primeira vez em 1883 por YOSHIDA que extraiu a enzima de exudato da árvore de *Rhus vernicifera*, uma árvore de laca japonesa. Em 1896,

BERTRAND e LABORDE consideraram as lacases como enzimas produzidas por fungos (VISWANATH *et al.*, 2014; LORENCI, 2016).

Estas enzimas pertencem ao grupo das oxidases azuis de cobre, denominadas multicobre oxidases azuis, que catalisam a oxidação de fenóis, aminas aromáticas, e outros compostos aromáticos, realizando a redução do oxigênio molecular à água (LORENCI, 2016). A lacase tem massa molar na faixa de 50 a 130 kDa (ALVES, 2011) e contém íons de cobre no seu sítio ativo. Onde, dois destes são responsáveis por fazer a transferência de elétrons durante as reações redox (FAN *et al.*, 2014). Um dos centros é mononuclear e possui o cobre tipo 1 (T1), já o outro centro é tri-nuclear e possui um cobre do tipo 2 (T2) e dois do tipo 3 (T3), que podem ser visualizados na Figura 1 (HAKULINEN; ROUVINEN, 2015; LORENCI, 2016).

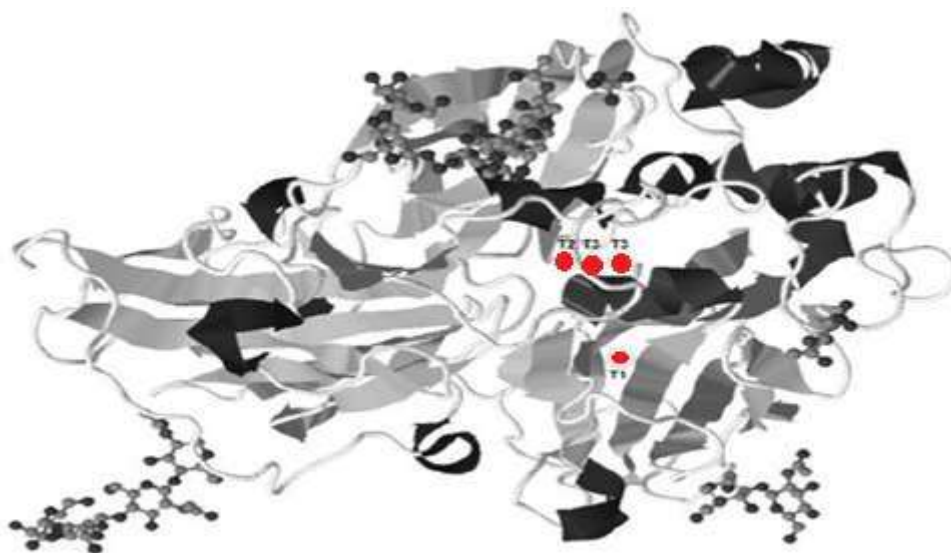


Figura 1: Representação de uma lacase, mostrando os íons cobre (T1, T2, T3). As esferas cinza representam carboidratos. Fonte: LORENCI, 2016.

O cobre T1 é responsável pela coloração azul da lacase, com a banda de absorção em torno de 600 nm (FAN *et al.*, 2014) e perto dele ocorrem as oxidações dos substratos (LORENCI, 2016). Portanto, a partir das oxidações acontece a transferência de elétrons para o centro tri-nuclear, onde se tem a redução de dioxigênio para moléculas de água (HAKULINEN; ROUVINEN, 2015; LORENCI, 2016).

Em conjunto com três moléculas de histidinas, o cobre T2 atua na atividade catalítica e redox (LORENCI, 2016). E por fim, o cobre T3 realiza a ativação do O₂ para transporte e oxigenação, também em conjunto com três histidinas (MESSERSCHMIDT, 1990; GIL *et al.*,

2009; LORENCI, 2016).

É importante dizer que podem haver pequenas alterações em lacases produzidas por diferentes espécies, pois podem ter distintas características catalíticas, mesmo que o local catalítico tenha sido conservado evolutivamente (LORENCI, 2016). Podendo apresentar variabilidade tanto na sua estrutura proteica quanto nos glicídios (ALVES, 2011).

Mesmo tendo seus sítios catalíticos bem descritos na literatura, ainda não se sabe de forma precisa, como a lacase atua na degradação da lignina. Porém é uma enzima produzida por, praticamente, todos os fungos de decomposição branca, e em alguns deles é a única enzima presente, como o *Pycnoporus cinnabarinus* (CARDOSO, 2009).

Essa enzima é muito importante em processos biotecnológicos, uma vez que pode atuar sobre a estrutura de diversos compostos químicos, semelhantes à lignina, tais como, pesticidas, corantes, herbicidas, que necessitam de serem degradados, antes de serem descartados no meio ambiente (ALVES, 2011).

A determinação da atividade enzimática da Lac pode ser feita em espectrofotômetro e isso é possível devido à sua característica de oxidar compostos, pois tem elevado potencial redox, como na presença de mediadores adequados, como ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzo-tiazol-6-sulfônico), 1-hidróxibenzotriazol e ácido 3-hidróxiantranílico, como mostrado na Figura 2 (MESTER; TIEN, 2000; FARIA, 2010).

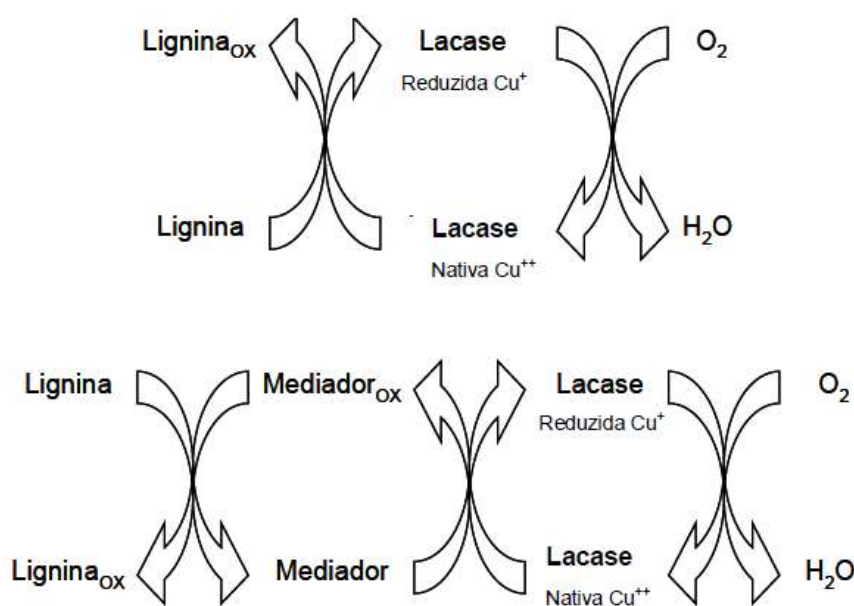


Figura 2: Ciclo catalítico de Lacs . Oxidação de lignina pela Lac, por consequência redução de Cu^+ e inativação de sua atividade. Para a Lac estar na sua conformação nativa é necessário o íon Cu^{++} Fonte: FARIA, 2010.

Alguns estudos relataram que a expressão dos genes que codificam a síntese da Lac não é dependente da ausência de nutrientes. As enzimas são expressas constitutivamente em muitos basidiomicetos, apresentando uma baixa expressão, porém quando se tem a adição de indutores, como o 2,5-xilidina, ao meio de cultivo esta expressão é aumentada (COLLINS; DOBSON, 1997; FARIA, 2010).

As Lacs são enzimas de ampla distribuição ocorrendo em bactérias, plantas, insetos e fungos. Sendo utilizadas, na indústria têxtil, de alimentos, de papel, tratamento de efluentes, farmacêutica, imunoquímica e até mesmo em biossensores. A sua massa molar, pH e temperatura ótima, especificidade de substrato, são dependentes da fonte, do procedimento e da etapas de purificação (LORENCI, 2016).

3.1.2 Lignina Peroxidase (LiP)

A primeira descrição das LiP foi em 1983, quando TIEN e KIRK realizaram um estudo para degradação de lignina em culturas de *Phanerochaete chrysosporium*. Essas enzimas são glicoproteínas globulares com massa molar variando de 38 a 42 kDa, com ponto isoeletrico de 3,2 a 4,0 e pH ótimo próximo de 3,0 (FARIA, 2010).

A sua estrutura apresenta oito pontes dissulfeto, dois sítios de ligação de Ca^{2+} , dois domínios, o distal (C-terminal) e proximal (N-terminal) (GONÇALVES, 2010). São hemoproteínas monoméricas, o Fe (III) do grupo heme é situado entre estes domínios. O íon férrico é pentacoordenado com quatro nitrogênios tetrapirrol e um resíduo de histidina (HAMMEL; CULEN, 2008; FARIA, 2010). Um dos sítios que se liga a H_2O_2 , é formado por um resíduo de arginina e histidina (GONÇALVES, 2010).

Alguns autores relatam que pelo menos um dos sítios de ligação ao substrato está localizado na superfície da enzima, e compreende resíduos de aminoácidos aromáticos e não polares. Essa enzima catalisa diversos substratos, desde pequenas moléculas aromáticas não fenólicas até lignina, por isso um de seus sítios de ligação deve estar na sua superfície (CAMERON; TIMOFEEVSKI; AUST, 2000; GONÇALVES, 2010).

As LiPs são enzimas chave no processo de degradação de lignina, têm potencial redox acima de 1,4 V, na presença de H_2O_2 (WONG, 2009). Ela promove a clivagem oxidativa de ligações C-C e C-O-C em estruturas aromáticas não fenólicas, diferencial em relação a outras peroxidases (WONG, 2009). Ao realizar essa oxidação, produz radicais livres catiônicos

arílicos que convergem para oxidação de alcoóis benzílicos, hidroxilação, desmetilação, abertura de anéis aromáticos e dimerização ou polimerização entre fenóis (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; GANÇALVES, 2010).

Como a LiP requer H_2O_2 para a atividade catalítica, o metabolismo dos microrganismos necessita produzir o peróxido de hidrogênio por diferentes vias metabólicas. A expressão dessas vias depende dos nutrientes do meio de cultivo e das condições de cultivo (CONESSA; PUNT; van den HONDEL, 2002; GOLÇAVES, 2010).

No seu ciclo catalítico, a oxidação começa pelo Fe^{3+} para Fe^{4+} pela ação de um aceptor de elétrons, H_2O_2 , que atua como substrato na reação com a enzima nativa. A partir desta oxidação é gerado o composto I oxidado, radical catiônico da LiP deficiente de dois elétrons. Pela redução do composto I, por transferência de um elétron, é formado o composto II, neste o ferro continua como Fe^{4+} , mas não como um radical livre, um agente redutor que pode ser um substrato como o álcool veratrílico. Na última etapa, a redução é realizada por um elétron proveniente de um segundo substrato, a enzima retorna à sua forma nativa, e completa o ciclo catalítico, Figura 3 (FARIA, 2010). Na ausência do substrato redutor, o composto II é oxidado pelo H_2O_2 dando origem ao composto III, uma forma da LiP com limitada capacidade catalítica gerada na presença de H_2O_2 em excesso (HAMMEL; CULEN, 2008; MARTINEZ, 2002; CORREIA *et al.*, 2011; WONG, 2009).

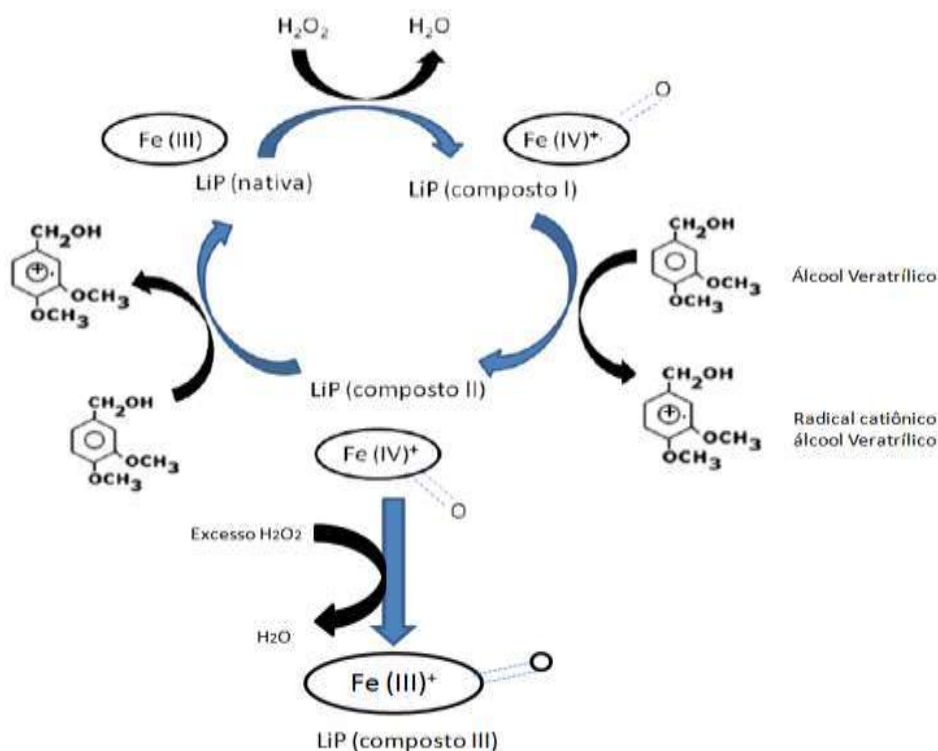


Figura 3: Ciclo catalítico de LiPs. Fonte: Modificado de FARIA, 2010.

O álcool veratrílico (AV) também conhecido como álcool 3,4-dimetoxibenzílico, é uma substância produzida e secretada por muitos fungos ligninolíticos. Esse composto oxidado pela LiP, atua como seu indutor e estabilizador, para evitar a inativação por excesso de H_2O_2 no meio (GANÇALVES, 2010). Como observado na Figura 3, o álcool veratrílico é formando na primeira redução pelo composto I, e existe como um complexo com o composto II, que é cataliticamente ativo por uma segunda molécula de AV para formar um aldeído. O AV converte o composto III na enzima nativa via formação de AV^{+} , atuando como mediador redox, oxidando substratos que LiP não poderia oxidar diretamente (FARIA, 2010).

Além disso, o álcool veratrílico aumenta a atividade enzimática da LiP e por consequência, a degradação de lignina (FARIA, 2010). Atua como um mediador redox em reações catalisadas pela LiP, formando o radical álcool veratrílico ($AV^{\cdot+}$) (HATAKKA, 2001; FARIA, 2010). Além disso, pode atuar como co-substrato dirigindo oxidações monoelétrônicas em núcleos aromáticos não fenólicos, formando radicais catiônicos, os quais agem em oxidações não enzimáticas posteriores (MESTER;JONG; FIELD, 1995; POINTING, 2001; GANÇALVES, 2010).

3.1.3 Manganês Peroxidase (MnP)

A MnP foi identificada em 1996 em *Phanerochaete chrysosporium* (MARTINEZ *et al.*, 1996). Essa enzima é uma glicoproteína, dependente de peróxido de hidrogênio, íons manganês, α -cetoácidos como lactato (SILVA, 2012; FILHO, 2008). São heme-proteínas expressas em diferentes formas de isoenzimas, sua massa molar é de 38 a 62,5 kDa, ponto isoelétrico de 3,2 a 4,0 (HOFRICHTER, 2002; FARIA, 2010; GONCALVES, 2010). A Figura 4 mostra a estrutura tridimensional desta enzima.

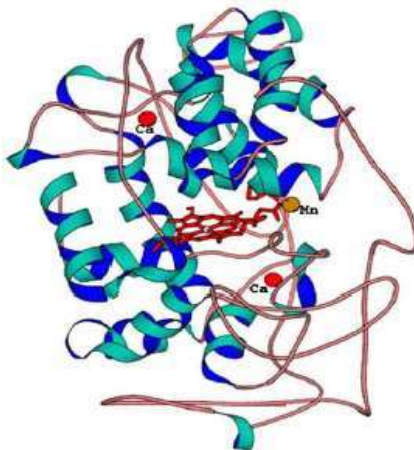


Figura 4: A estrutura geral de manganês peroxidase. As esferas vermelhas representam os íons de cálcio e a esfera marrom representa o íon de manganês. Fonte: SUNDARAMOORTHY *et al.*, 2010; SILVA, 2012.

De acordo com a Figura 5, o Mn^{3+} originado durante o ciclo catalítico é quelatado por ácidos orgânicos (oxalato, malonato, malato, lactato, tartarato), os quais são produzidos e secretados pelo próprio fungo. Os radicais fenoxila e amino na presença de oxigênio molecular, são formados através dos compostos fenólicos da lignina, sendo que os íons quelados agem como mediadores redox. Estes íons são de massa molecular pequena e catalisam a oxidação utilizando somente um elétron (GONÇALVES, 2010).

De acordo com GONÇALVES (2010) os ácidos orgânicos e oxigênio são responsáveis pela liberação de íons superóxidos, é uma das etapas que possibilitam a abertura de anéis aromáticos. Os ânions superóxidos reagem com radicais aril resultantes da ação de complexos Mn^{3+} /ácido orgânico. A formação de um eter-peróxido instável desencadeia a fissão da estrutura aromática. Alguns compostos orgânicos sulfurados e ácidos graxos insaturados também podem desempenhar papel importante, atuando como co-substratos, agindo sobre a lignina após conversão enzimática em radicais reativos.

Essa enzima tem alto potencial de degradação, atuando em estruturas semelhantes a lignina, como substâncias húmicas organopoluentes, incluindo xenobióticos persistente. Portanto, a MnP possui diversas aplicações industriais, devido a sua inespecificidade (SILVA, 2012).

3.2 Imobilização de células microbianas

Os estudos com imobilização de células surgiram da observação do crescimento de microrganismos sobre diferentes superfícies no ambiente, como em caules de árvores, cascas de frutas, entre outros (MORÃO, 2011). Portanto a IC (Imobilização celular) consiste na retenção física de células em uma região definida, sendo mantidas sobre viabilidade tanto em processos de operação contínua quanto em descontínua, pode-se fazer a reutilização das mesmas em processos posteriores (KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000; MORÃO, 2011; SANTOS, 2013). Há dois tipos de leitos para imobilização microbiana os que aprisionam fisicamente as células, e os que as células são aderidas à superfície (ELIZEI *et al.*, 2014).

A IC é uma alternativa para a condução de bioprocessos, pois as células ficam retidas em uma matriz e podem ser utilizadas inúmeras vezes (CANILHA *et al.*, 2006; ELIZEI *et al.*, 2014). Durante a fermentação o estado morfológico do microrganismo influencia a síntese dos

metabólicos gerados, por exemplo, enzimas de interesse comercial. Uma das alternativas para aumentar rendimento e tentar diminuir tempo de produção é a IC (COVIZZI *et al.*, 2007).

A IC pode facilitar a recuperação do produto de interesse na fase de *downstream*, e ajudar na manutenção dos fermentadores, uma vez que não apresenta problemas de adesão e obstrução celular nos eletrodos e tubos (MOREIRA *et al.*, 1998; KOURKOUTAS *et al.*, 2004; BERGMAIER; CHAMPAGNE; LACROIX, 2005; COVIZZI *et al.*, 2007).

Além disso, pesquisas utilizando novos materiais para IC permitem que os processos fermentativos com células imobilizadas sejam realizados em condições mais extremas, como em diversos valores de pH e agitação. Dessa maneira, é possível trabalhar em condições mais tóxicas para células, por exemplo, em tratamento de efluentes contaminados com fenóis e derivados (JUNTER; JOUENNE, 2004; WANG *et al.*, 2005; COVIZZI *et al.*, 2007).

Há diferentes tipos de suportes para imobilização de células, exemplificados na Figura 6 (SANTOS, 2013).

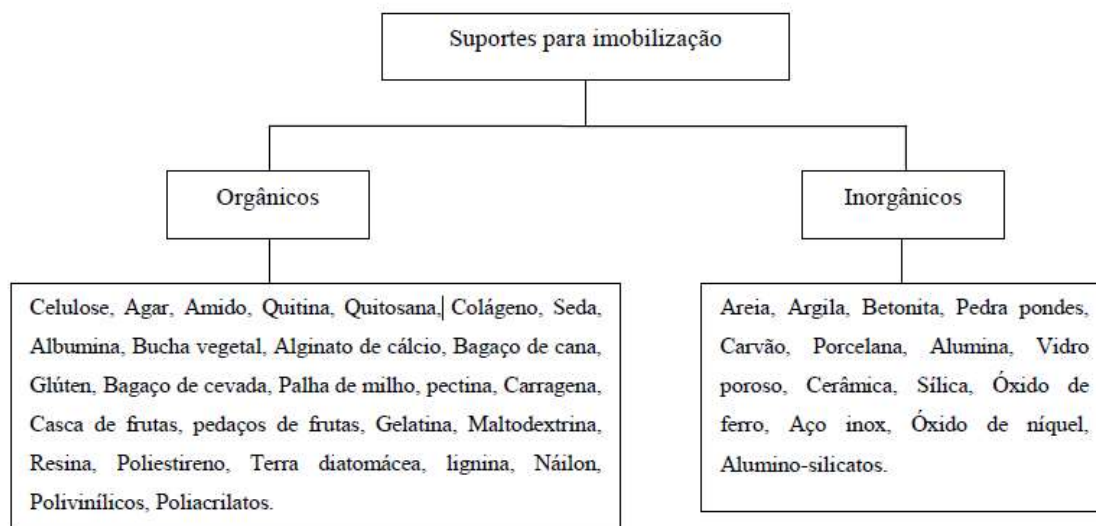


Figura 6: Esquema representativo dos principais suportes utilizados em imobilização celular e enzimática.

Fonte: SANTOS, 2013.

Para COVIZZI *et al.* (2007) há técnicas clássicas de IC e essas podem ser divididas em duas classes: as naturais, as quais incluem a formação de biofilmes e a adesão/adsorção microbiana em suportes sintéticos ou naturais; e as artificiais, que incluem a encapsulação em matrizes como alginato de cálcio ou uso de agentes ligantes. A Figura 7 ilustra os diferentes métodos de IC.

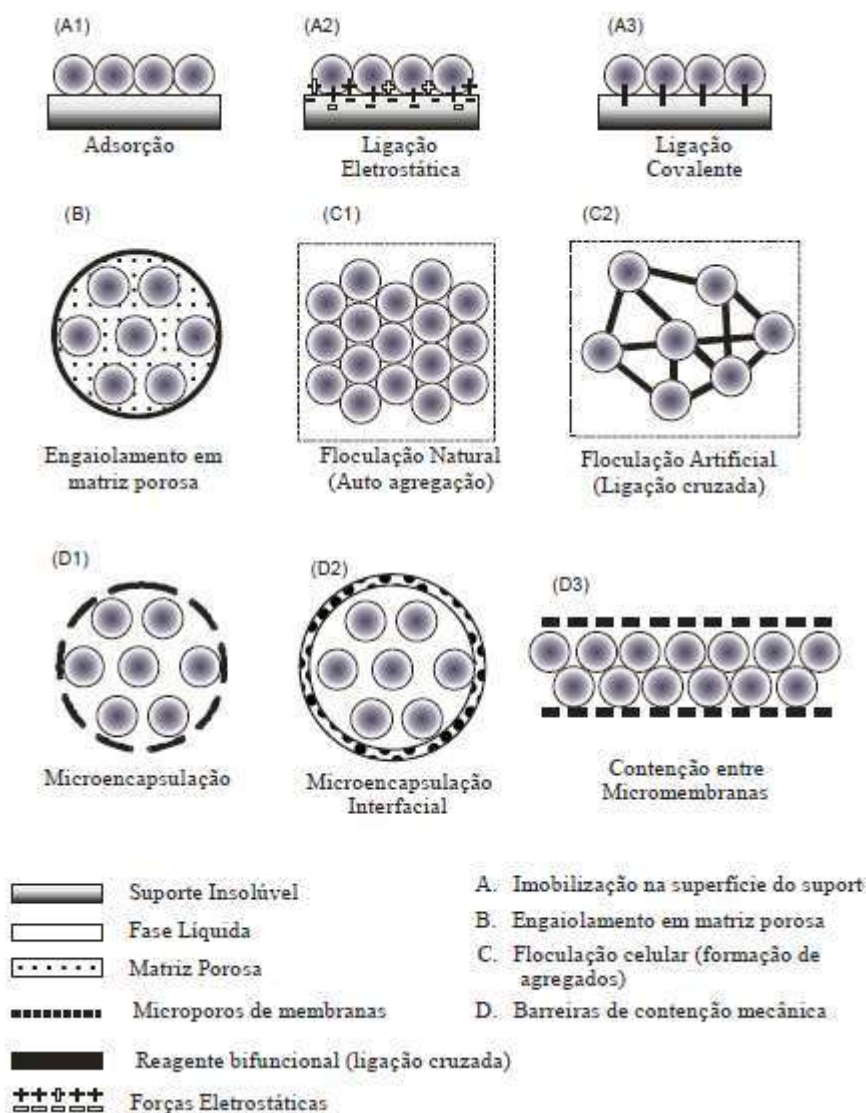


Figura 7: Diferentes métodos de imobilização celular de microrganismos. Fonte: PILKINGTON *et al.* (1998); COVIZZI *et al.* (2007).

A principal desvantagem da IC é dificuldade na transferência de massa que afeta a fisiologia e a cinética de crescimento celular. A matriz celular utilizada pode romper devido o crescimento celular, a geração de gases, isto ocorre por causa da limitação de transferência de oxigênio, a qual pode ser minimizada dependendo da matriz, como em matriz de poros um pouco maior, ou com maior quantidade de poros. Porém, o método apresenta mais vantagens, como já visto, do que desvantagens (COVIZZI *et al.*, 2007).

O tamanho do poro, a quantidade de poros e o grau de hidrofobicidade da matriz interferem na adesão celular. A escolha da matriz é de acordo com o microrganismo utilizado e com o produto de interesse (COVIZZI *et al.*, 2007). É possível construir diferentes tipos de

IC para processo fermentativos, tornando-os economicamente viáveis e com boa produtividade.

Os fungos filamentosos tem uma morfologia complexa com estruturas celulares diferentes em cada etapa do seu ciclo de vida. São microrganismos eucarióticos amplamente utilizados em processos fermentativos industriais, principalmente na produção de enzimas comerciais. Para sua IC empregam-se suportes porosos. A IC de fungos filamentosos requer, poro de maior tamanho, pois as células em crescimento (hifas) penetram no suporte com maior facilidade, ocupando os espaços internos vazios (COVIZZI *et al.*, 2007).

Diferentes materiais podem ser utilizados para realizar a IC, para imobilização de fungos normalmente se utiliza espuma de poliuretano (FARIA, 2010), madeiras (BABIČ *et al.*, 2012) alginato (ELIZEI *et al.*, 2014), entre outros. Alguns materiais são sintéticos e não biodegradáveis causando problemas no meio ambiente após sua utilização, sendo necessário realizar o descarte corretamente. Outros são tóxicos, não sendo utilizados na indústria de alimentos, por exemplo. Por isso, o estudo de materiais alternativos, renováveis, biodegradáveis, de baixo custo, fácil disponibilidade é importante (MORÃO, 2011).

Deste modo, a bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) é um material atrativo, pois é cultivado em todo território nacional, é leve, cilíndrica, porosa, tem estrutura entrelaçada, apresentando boas características não somente para imobilização de fungos filamentosos, mas para IC em geral. Além disso, é um composto natural, resistente a variação de pH e a altas temperaturas (MEDRADO, 2011; BARROSO *et al.*, 2014).

3.2.1 *Luffa cylindrica*

Luffa cylindrica mais conhecida como bucha vegetal, pertence a família das Cucurbitáceas, é um tipo de trepadeira herbácea que atinge 10 metros ou mais de comprimento, possui flores com coloração amarelo intenso e folhas grandes, o fruto é verde, cilíndrico, sendo que o seu tamanho pode variar de 15 a 50 cm e o diâmetro de 8 a 10 cm (Figura 8). Há síntese de semente nos frutos, o que facilita sua proliferação (OBOH; ALUYOR, 2009; MEDRADO, 2011).



Figura 8: Imagem de uma plantação de *Luffa cylindrica*. Fonte: EXOTIC-PLANTS, 2017.

Cultivada em todo território brasileiro, pois cresce bem em climas tropicais devido a sua grande plasticidade em relação ao clima (BARROSO *et al.*, 2014).

A bucha, fruto da *Luffa cylindrica*, é composta por uma rede de fibras finas, resistentes, elásticas, macias (COELHO, 2007; MEDRARO, 2011), apresenta estrutura leve e cilíndrica (LACERDA, 2015). É formada principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é um polissacarídeo linear formado por várias unidades de glicose, o principal elemento da parede celular da fibra (COELHO, 2007; MEDRARO, 2011). Já a hemicelulose é um polissacarídeo com cadeias curtas e ramificadas, composto de diferentes unidades de açúcares. A lignina é um polímero orgânico complexo, amorfo que oferece firmeza e rigidez ao conjunto de fibras formado por celulose e hemicelulose (ALVES, 2005; MEDRARO, 2011). A Tabela 1 apresenta a composição química da bucha vegetal.

Tabela 1: Composição química da *Luffa cylindrica*.

Constituintes	Conteúdo (%)
Celulose	60
Hemicelulose	30
Lignina	10
Total	100

Fonte: OBOH; ALUYOR, 2009; MEDRADO, 2011.

Devido à sua estrutura natural entrelaçada e altamente porosa, alto volume específico, biodegradabilidade, baixo custo, renovável e atóxica, a bucha vegetal tem potencial de uso como suporte para imobilização celular (MEDRADO, 2011; LACERDA, 2015).

De acordo com LACERDA (2015) *Luffa cylindrica* pode ser usada em diversos valores de pH, devido à sua resistência e posteriormente ser lavada, autoclavada e usada novamente, para imobilizar outras células. Deste que não seja degradada durante o processo (MARÃO, 2011).

A *Luffa cylindrica* já foi utilizada como suporte imobilizante para *Saccharomyces cerevisiae* na produção de etanol (OGBONNA *et al.*, 1994), *Proteus vulgaris* para descoloração de corantes (SARATALE *et al.*, 2011), *Bacillus firmus* para produção de dextrina (PAZZETTO *et al.*, 2011), *Fusarium moniliforme* para biossíntese de ácido giberélico (MELEIGY; KHALAF, 2009), *Scenedesmus obliquus* para a biosorção de Cd (CHEN *et al.*, 2014), *Aspergillus terreus* para produção de sapogenol de soja B (AMIN; MOHAMED, 2012), *Thermomucor indicae* na produção de lipases (FERRAREZI *et al.*, 2014).

3.3 Planejamento fatorial

Um planejamento experimental é realizado, com o objetivo de variar as entradas de um processo, de maneira que avalie as prováveis mudanças sofridas pela variável resposta, analisando sua alteração e o motivo pelo qual ocorreu. Desta forma, o planejamento visa definir uma sequência de coletas de determinados dados experimentais para que se possam atingir objetivos definidos previamente. Para realizar um planejamento com duas ou mais variáveis que influenciam o processo, é indicado o planejamento fatorial, sendo eficiente, simples e útil. Esse método permite avaliar, simultaneamente, o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais. Estudando o efeito de

diversos fatores sobre uma determinada variável de interesse (PERALTA-ZAMORA *et al.*, 2005; CUNICO *et al.*, 2008; BARROS NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010).

Para sua execução é necessário que todos os níveis do fator de estudo sejam especificados. Para que o mesmo seja completo, deve-se determinar e incluir todas as combinações dos níveis do fator. E com base nas respostas obtidas, avaliar qual foi o efeito proveniente dessa combinação (BARROS NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010).

Um fator é cada variável a ser controlada no sistema em estudo. Os níveis são as condições de operação dos fatores investigados nos experimentos, e são identificados por nível baixo (-) e nível alto (+). Já o efeito é a mudança ocorrida na resposta quando se muda do nível baixo (-) para o nível alto (+) (CUNICO *et al.*, 2008).

Esse tipo de planejamento pode ser representado por b^k em que “ k ” representa o número de fatores e “ b ” o número de níveis escolhidos. Por exemplo, um planejamento fatorial 2^2 , apresenta 2 variáveis avaliadas em dois níveis. Neste caso, apenas 4 ensaios são necessários para avaliar todas as combinações possíveis (CUNICO *et al.*, 2008).

Na realização do planejamento 2^2 , os ensaios são realizados e as respostas obtidas em todas as quatro combinações são registradas. A lista das combinações é conhecida como matriz de planejamento. É importante realizar os ensaios em duplicatas de forma aleatória, produzindo um total de oito respostas, podendo realizar o erro experimental ou o desvio padrão de uma resposta individual. Sendo que a extensão desse erro é importante para decidir se existem ou não efeitos significativos (BARROS NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010).

O efeito principal é definido como a diferença média obtida na resposta, sendo a resposta média para o nível (+) e a resposta média para o nível (-), ele pode ser dado pela equação 1 (CUNICO *et al.*, 2008; BARROS NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010).

$$Efeito\ principal = 2 \times \left(\frac{\sum y^+ - \sum y^-}{b^a} \right) \quad (Eq. 1)$$

Em que:

y = média dos efeitos individuais da medida;

b^a = número total de experimentos no planejamento.

Para o experimento fatorial 2^2 , a equação do efeito principal pode ser resumida, como a equação 2.

$$Efeito\ principal = \left(\frac{\sum y^+ - \sum y^-}{2} \right) \quad (Eq. 2)$$

Os efeitos de interação são a metade da diferença entre os efeitos principais de uma variável nos níveis de outra. Sendo que se considera os sinais já atribuídos às variáveis envolvidas, como se fosse uma operação matemática de multiplicação (CUNICO *et al.*, 2008).

O erro padrão é o erro na determinação dos efeitos, sendo o mesmo, tanto para os efeitos principais quanto para os de interação, e é representado dado pela equação 3 (CUNICO *et al.*, 2008).

$$Erro\ Padrão\ do\ Efeito = \frac{s}{\sqrt{2^{k-1}}} \quad (Eq. 3)$$

Em que:

s = erro na medida (desvio padrão);

k = número de fatores experimentais no planejamento experimental (CUNICO *et al.*, 2008).

Para o caso do planejamento fatorial 2^2 , a equação 3 pode ser simplificada como na equação 4.

$$Erro\ Padrão\ do\ Efeito = \frac{s}{\sqrt{2}} \quad (Eq. 4)$$

Os resultados são visualizados e interpretados graficamente. Neste caso, as respostas obtidas para os experimentos são mostradas como função das variáveis estudadas (CUNICO *et al.*, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Na realização do experimento, o planejamento fatorial 2² foi utilizado para verificar a influência da *Luffa cylindrica* tratada e a modificação da sua forma na produção de enzimas ligninolíticas pelo *Ceriporiopsis subvermispora*. Os ensaios foram feitos em duplicadas. As variáveis analisadas foram a forma da bucha (triturada ou pequenos cubos) e o tratamento da bucha (a vapor ou tratada com NaOH a 1 mol/L), Tabela 2.

Tabela 2: Planejamento experimental 2² para avaliar produção de enzimas ligninolíticas utilizando o *Ceriporiopsis subvermispora* imobilizado em *Luffa cylindrica*.

Ensaio	Variável A	Nível	Variável B	Nível
1	Vapor	-	Triturada	-
2	NaOH	+	Triturada	-
3	Vapor	-	Cúbica	+
4	NaOH	+	Cúbica	+
5	Controle	*	*	*
6	Controle	*	*	*
7	Controle	*	*	*

*Controle, não foi utilizado o *Ceriporiopsis subvermispora* imobilizado em *Luffa cylindrica*, somente o microrganismo.

Variável A é o tipo de tratamento e a variável B é a forma utilizada.

4.1 Bucha *Luffa cylindrica*

Para realização do experimento foi utilizada a *Luffa cylindrica* madura e seca. A bucha foi doada por Ramon Nortier de uma propriedade particular situada no distrito de Monsenhor Izidro em Ouro Branco/MG. As sementes e a casca das buchas foram retiradas. As buchas foram lavadas com água potável com finalidade de retirar resíduos, e enxaguadas com água destilada, posteriormente foram secas ao ar livre por 48 horas.

Uma parte das buchas foi triturada utilizando o moinho de facas, apresentando uma granulometria acima de 32 mesh. Outra parte foi cortada em cubos com área de aproximadamente 0,1 m².

A seguir ambas as formas, triturada e cúbica, foram mantidas em água a 100°C durante 30 minutos. Decorrido este tempo, as buchas foram secas em estufa a 60° C durante 24 horas.

4.1.1 Tratamento para Imobilização

4.1.2 Tratamento com NaOH

O tratamento com NaOH foi realizado de acordo com adaptação da metodologia de COELHO (2007). 5 gramas de bucha foram transferidas para 250 mL de NaOH a 1 mol/L e mantidas durante 2 horas com agitação leve. Posteriormente, a mistura foi filtrada, as buchas foram lavadas com água destilada várias vezes, para eliminar o NaOH, até que a água de lavagem apresentasse pH neutro. Em seguida, as buchas foram secas a 60° C durante 24 horas.

4.1.3 Tratamento a vapor

O tratamento a vapor utilizou a metodologia de COELHO (2007) com algumas adaptações. As buchas foram colocadas em béqueres e submetidos ao tratamento com vapor, em autoclave, a 1,3 Kgf/cm², a 25° C durante 40 minutos.

4.2 *Ceriporiopsis subvermispora*

4.2.1 Manutenção das células

O *Ceriporiopsis subvermispora*, cepa L1487-SS3, foi cedido pelo professor André Aguiar Mendes da Universidade Federal de Itajubá/MG. Para a manutenção da cepa, o microrganismo foi repicado em placas de Petri, com meio constituído de 2% (m/v) de extrato de malte, 0,2% (m/v) de extrato de levedura e 2% (m/v) de ágar. As placas são incubadas em estufa bacteriológica a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 7 dias. Decorrido este tempo, elas foram armazenadas a 4°C durante 15 dias. Um novo repique é feito a cada 15 dias (MENDES, 2008).

4.2.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado utilizando uma cultura de *C. subvermispora* mantida durante 7 dias a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Três círculos de 1,6 cm de diâmetro foram retirados da placa e transferidos para erlenmeyers de 1000 mL contendo 250 mL do meio de inóculo, composto por 2% (m/v) de extrato de malte, 0,2% (m/v) de extrato de levedura e 0,1% (m/v) de dextrose. Os inóculos foram preparados em duplicadas, incubados em estufa bacteriológica a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 15 dias. Os meios de cultivo foram previamente autoclavados a 121°C durante 15 minutos.

Decorrido os 15 dias de cultivo, a camada de células obtida foi filtrada em funil de Buchner e lavada delicadamente com água destilada esterilizada. Em seguida, as células e esporos foram transferidos para tubos do tipo *falcon*® de 50 mL contendo 35% de esferas de vidro e aproximadamente 30 mL de água. A seguir, os tubos foram agitados no vortex, para obtenção da suspensão celular. Em seguida, a suspensão foi retirada e utilizada como inóculo.

Se utiliza a suspensão obtida como inóculo ao longo dos experimentos, portanto, 2 mL da solução serão filtrados com auxílio de um filtro de papel. Sendo que o filtro foi previamente seco em estufa a 80°C durante 24 horas, obtendo peso constante. O material retido será mantido a 105°C até que se obtenha peso constante. Isso foi realizado afim de se obter a massa de micélios inicial que foi inoculada no experimento.

Os procedimentos de manipulação *C. subvermispora* foram realizados no interior de uma câmara asséptica de fluxo laminar.

4.2.3 Fermentação

O meio de produção foi composto por 5,0 g/L de glicose; 1,0 g/L de KH_2PO_4 ; 0,25 g/L de CaCl_2 ; 1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05 g/L de NaCl ; 0,011 g/L de MnSO_4 , pH entre 4,5 e 5,0. Em erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 50 mL de meio de produção e 1 g de bucha vegetal, de acordo com a Tabela 2, e autoclavados a 121°C por 15 minutos.

Em cada erlenmeyer foi adicionado 1 mL do inóculo. Os erlenmeyers foram incubados em shaker a 120 rpm, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 21 dias. Amostras foram retiradas no dia da inoculação (0º dia), no 4º, 8º, 11º, 15º, 19º e 21º dias de cultivo e utilizadas para quantificação de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase.

4.3 Atividade Enzimáticas

4.3.1 Lacase

A atividade da enzima lacase foi determinada pela oxidação do substrato sintético ABTS (2,2'- azino-bis-etilbentiazolina) (BOURBONNAIS *et al.*, 1988). A mistura de reação foi composta por 225 µL de tampão citrato-fosfato de sódio 50 mM (pH 5,0), 75 µL de água destilada e 75 µL de ABTS 1 mM foram adicionados a 375 µL do extrato enzimático. A leitura foi realizada a 420 nm ($\epsilon_{420\text{ nm}} = 36000\text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) em intervalos de 10 segundos durante 5 minutos. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de

enzima que oxida 1 μ mol de ABTS por minuto. Para o branco, o extrato enzimático foi substituído por água destilada.

4.3.2 Manganês Peroxidase

A atividade de MnP foi medida através da oxidação do vermelho fenol, utilizando metodologia adaptada de LUNDELL *et al.* (1990). A mistura da reação foi composta por 50 μ L de MnSO_4 1 mM, 50 μ L de H_2O_2 2 mM, 100 μ L de ácido oxálico 10 mM, 200 μ L de albumina 1% (m/v), 600 μ L do extrato enzimático e 100 μ L de vermelho fenol 0,1% (m/v). A mistura é incubada durante 10 minutos, decorrido este tempo, 40 μ L de NaOH 6,5 M são adicionados para interromper a reação. A absorbância foi registrada a 610 nm ($\epsilon_{610\text{ nm}} = 22000\text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (KUWAHARA *et al.*, 1984; MENDES, 2008). Para o branco, substituiu-se o extrato enzimático por água destilada. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para gerar 1 μ mol de Mn^{3+} por minuto.

4.3.3 Lignina Peroxidase

Para realizar a determinação da atividade de LiP, fez-se uma adaptação do método descrito por MENDES (2008). As reações foram conduzidas em tubos, onde foram adicionados 250 μ L de extrato enzimático, 250 μ L de H_2O_2 2 mM, 625 μ L de tampão succinato de sódio 50 mM (pH 4,5) e 125 μ L de corante azul de metileno 320 mM. Após 10 minutos, a reação foi interrompida incubando os tubos durante 5 minutos em banho-maria a 90°C. A leitura da absorbância foi realizada a 651 nm ($\epsilon = 48800\text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (ARCHIBALD, 1992; MENDES, 2008). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que necessária para degradar 1 μ mol de azul de metileno por minuto. Foram utilizados dois brancos, um branco foi preparado substituindo o corante por água destilada este branco foi utilizado para retirar a interferência do meio de cultura. No segundo branco, o extrato enzimático foi substituído por água destilada, seu valor foi subtraído da absorbância dos testes, sendo utilizado para analisar se houve ou não degradação do corante.

4.3.4 Cálculo das atividades enzimáticas

O cálculo da atividade enzimática das enzimas ligninolíticas, Lac, MnP e LiP, uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μ mol de substrato por minuto. A atividade enzimática foi expressa em U/L do caldo enzimático e os cálculos realizados a partir da equação 5, derivada da Lei de Beer-Lambert (BREXÓ, 2013; BARATO, 2014):

$$\frac{U}{L} = \frac{\Delta Abs \times V \times 10^6}{\epsilon \times R \times t} \quad (\text{Eq. 5})$$

Em que:

ΔAbs = variação da absorbância ($Abs_{final} - Abs_{inicial}$);

V = volume total da reação (L);

10^6 = conversão de mols do ϵ em μmols

ϵ = coeficiente de absorção molar ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$);

R = quantidade de caldo enzimático (L);

t = tempo de reação (min);

1 Unidade Internacional (U) = 1 micromol/minuto/litro = $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$.

4.4 Determinação de açúcares redutores totais

A curva padrão de glicose foi construída utilizando a metodologia descrita em VILELA (2013) com algumas modificações. Essa curva foi preparada a partir de uma solução estoque de glicose 1,0 g/L, que foi empregada para preparar as soluções com concentração de 0,1 a 1,0 g/L, como mostrado na Tabela 3.

A 100 μL das soluções diluídas de glicose foram adicionados 100 μL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Essa mistura foi mantida a $100 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5 minutos. Em seguida as amostras foram resfriadas, utilizando banho de gelo e adicionados de 800 μL de água destilada. A absorbância foi medida a 540 nm. Os valores de absorbância medidos e as concentrações das soluções foram usados para a construção da curva padrão.

Tabela 3: Relação das diluições realizadas da solução de glicose a 1,0 g/L.

[] de glicose (g/L)	V de solução de glicose (μL)	V de solução de H_2O (μL)
0,10	1,00	9,00
0,20	2,00	8,00
0,30	3,00	7,00
0,40	4,00	6,00
0,50	5,00	5,00
0,60	6,00	4,00
0,70	7,00	3,00
0,80	8,00	2,00
0,90	9,00	1,00
1,00	10,00	0,00

4.4.1 Metodologia de açúcares redutores totais

Para efetuar a quantificação dos açúcares redutores presentes no extrato enzimático, a 100 µL do caldo enzimático foram adicionados 100 µL do reagente DNS. Em seguida, a mistura foi mantida em banho-maria a $100 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5 minutos. Após este tempo a mistura foi resfriada em banho de gelo, e adicionados 800 µL de água destilada. A absorbância foi registrada a 540 nm. No branco substituiu-se o extrato enzimático por 100 µL de água destilada (VASCONCELOS *et al.*, 2013).

4.5 Determinação de células fúngicas imobilizadas

Para se determinar a massa de células imobilizadas no suporte, realizou-se uma análise gravimétrica por diferença da massa seca do suporte antes e após o contato com as células no meio de fermentação. Após 21 dias de cultivo, o suporte foi retirado, agitado e lavado com água destilada para remover as células que não foram imobilizadas ou as que estavam mortas. O suporte foi colocado a 60°C durante 24 horas em uma estufa, até obter massa constante. Decorrido este tempo, a massa foi registrada e a concentração de células imobilizadas foi obtida utilizando a equação 6. A retenção de células no suporte foi calculada utilizando a equação 7: (COELHO, 2007).

$$C_{él_{imb}} = \left(\frac{m_f - m_i}{V} \right) \quad (\text{Eq. 6})$$

Em que:

$C_{él_{imb}}$ = concentração de células imobilizadas (g/L);

m_f = massa de suporte após a cultivo (g);

m_i = massa de suporte inicial (g);

V = volume do meio líquido cultivo (L).

$$\lambda = \left(\frac{m_{Cél}}{m_{Sup}} \right) \quad (\text{Eq. 7})$$

Em que:

λ = retenção de células no suporte

$m_{Cél}$ = massa de células imobilizadas no suporte (g);

m_{Sup} = massa de suporte (g).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de produção de enzimas com o *Ceriporiopsis subvermispota*, pode-se observar, que durante o cultivo houve produção das enzimas Lac e MnP, até o microrganismo chegar em fase de declínio, onde há escassez de nutrientes e excesso de metabólitos secundários, que são tóxicos ao microrganismo. Estes metabólitos, podem ser agentes redutores e se ligar ao DNS. O estudo foi realizado em batelada e houve reposição de meio.

5.1 Avaliação da Produção de Lacase (Lac)

A Figura 9 apresenta a atividade específica da lacase produzida durante o cultivo. A atividade enzimática específica da Lac foi calculada utilizando a equação 5.

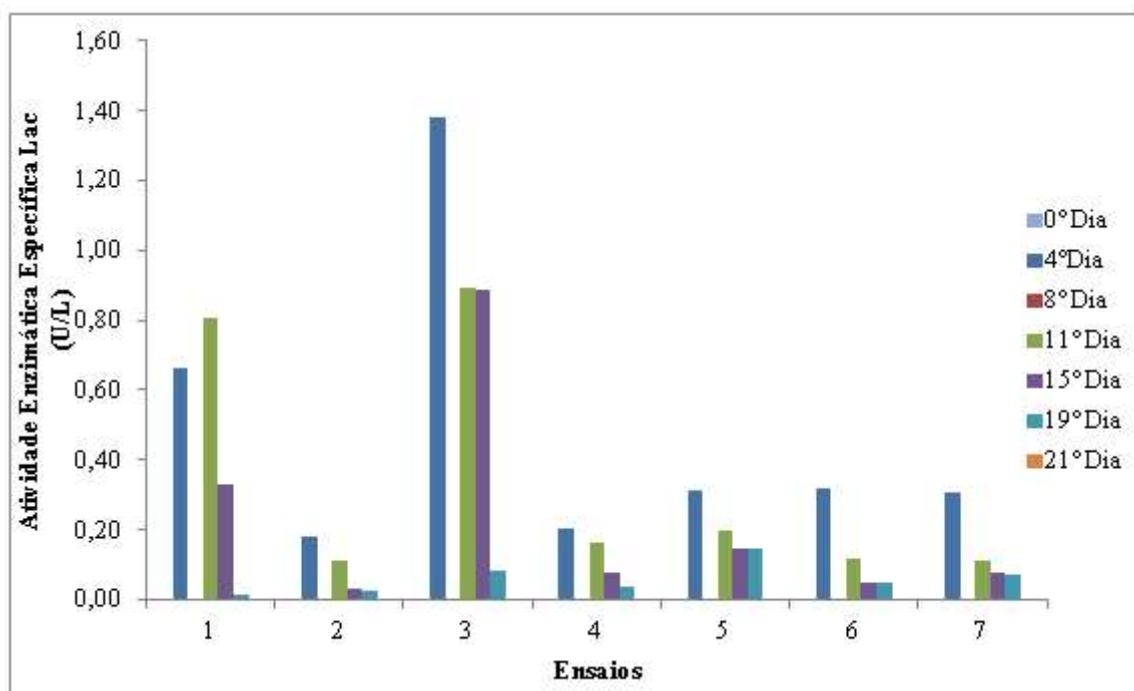


Figura 9: Gráfico da produção de Lac, utilizando células de *Ceriporiopsis subvermispota* imobilizado em *Luffa Cylindrica*. As amostras foram retiradas nos dias 0, 4, 8, 11, 15, 19 e 21.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 9, o pico de produção de Lac foi no quarto dia, no oitavo dia não foi observada atividade enzimática da lacase. Entretanto a atividade enzimática foi observada no décimo primeiro dia. Este fato por ser explicado, devido o metabolismo do fungo de degradar preferencialmente lignina e após degradar hemicelulose e celulose (MENDES, 2008; GONÇALVES, 2010; FARIA 2010). O que pode ter ocorrido é produção de alguma das hemicelulases e celulosas, não detecta no estudo, por isso houve queda na produção das enzimas oxidativas.

A maior produção de Lac foi no terceiro ensaio, com a bucha tratada a vapor e com forma cúbica, com seu melhor pico de produção no quarto dia com 1,383 U_{Lac}/L, como demonstrado na Figura 9.

A maior produção de Lac foi observada no quarto dia de cultivo. A produção da enzima neste dia foi utilizada para calcular a influência dos fatores tipo de tratamento e forma da bucha vegetal, utilizando o planejamento fatorial (Tabela 4).

Tabela 4: Resultados do planejamento fatorial 2² para o estudo dos efeitos tipo de tratamento e forma da *Luffa cylindrica* utilizada para imobilizar *Ceriporiopsis subvermisporea* em cultivo submerso na produção de Lacase.

Experimento	Variáveis			Respostas		
	A	B	A x B	R ₁ U _{Lac} /L	R ₂ U _{Lac} /L	R U _{Lac} /L
1	-	-	+	0,667	0,656	0,661±0,006
2	+	-	-	0,122	0,233	0,178±0,056
3	-	+	-	1,411	1,356	1,383±0,028
4	+	+	+	0,200	0,211	0,206±0,006

A = tipo tratamento, (-) tratamento a vapor e (+) tratamento com NaOH; B = forma, (-) triturada e (+) cúbica.

* As incertezas indicadas são correspondentes ao erro desvio padrão dos efeitos.

Efeitos principais:

Tratamento (A): $[(-0,661+0,178-1,383+0,206)/2] = -0,832$.

Forma (B): $[(-0,661-0,178+1,383+0,206)/2] = +0,375$.

Efeitos de segunda ordem: Tratamento (A) x Forma (B): $[(+0,661-0,178-1,383+0,206)/2] = -0,347$.

Na Tabela 4, a única diferença entre os ensaios 1 e 2 é o tipo de tratamento da bucha. Desta forma, a diferença observada na resposta $(-0,661 + 0,178 = -0,483)$ indicou que houve diminuição na produção da Lac cerca de 0,483 U_{Lac}/L quando o tratamento (A) muda do nível inferior (-) para o superior (+), mantendo-se fixo, a forma da bucha (B). De maneira similar para os ensaios 3 e 4, quando a forma da bucha (B) é mantida fixa, o efeito $(-1,383 + 0,206 = -1,177)$, mostra uma diminuição na produção da enzima de 1,177 U_{Lac}/L, quando a forma foi alterada do nível inferior (-) para o superior (+). O efeito global apresentado pela variável A foi obtido por meio da média aritmética dos efeitos supracitados $\{[(-0,483 - 1,177)/2] = -0,832\}$.

O efeito global da variável B, é realizado de mesma forma $\{[-0,839 + 1,589]/2\} = 0,375$. Esta resposta indica-se que quando B passa do nível inferior (-) para o superior (+) a resposta aumentou 0,375 U_{Lac}/L. Estes resultados, permitem concluir que ambas as variáveis influenciaram a produção de Lac. Porém o tratamento da bucha foi mais significativo do que a

forma. Sendo o tratamento à vapor mais indicado do que o com NaOH. A maior produção de lacase foi observada no terceiro ensaio que utilizou a bucha cúbica tratada à vapor.

A interpretação destes resultados é facilitada pela representação gráfica das respostas obtidas para os experimentos. Figura 10.

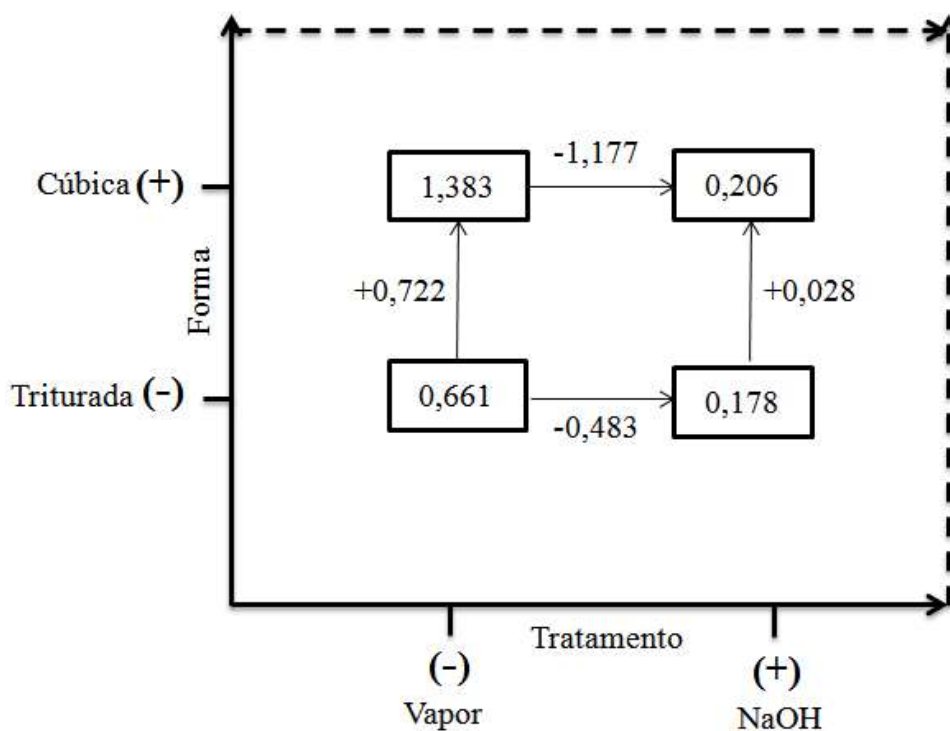


Figura 10: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2² para a produção de Lac. [resposta média: U/L] em cultivo submerso do *Ceriporiopsis subvermispota* submersos utilizando *Luffa cylindrica* como suporte imobilizador. Tratamento na *Luffa cylindrica*: à vapor (-) e NaOH (+); Forma da *Luffa cylindrica*: triturada (-) e cúbica (+).

Analisando a Figura 10, observa-se que o melhor ensaio foi o que utilizou a bucha tratada a vapor e cúbica. Aumenta-se a produção da enzima da bucha tratada a vapor e triturada (-,-) para a vapor e cúbica (-,+), cerca de 0,722 U_{Lac}/L. Já bucha tratada a vapor e cúbica (-,+) para tratada com NaOH e cúbica (+,+) houve uma diminuição de 1,177 U_{Lac}/L. Da bucha tratada a vapor e triturada (-,-) para o a tratada com NaOH e triturada (+,-) também há uma diminuição, porém de 0,483 U_{Lac}/L. Mas da bucha tratada com NaOH e triturada (+,-) para a tratada com NaOH e cúbica (+,+) ocorreu aumento de 0,028 U_{Lac}/L. Isso significa que o tratamento utilizando NaOH, não foi positivo para a produção de Lac. E que a forma cúbica favoreceu a produção da Lac.

É relatado na literatura que quando o *C. subvermispota* está aderido sobre uma superfície, a produção de Lac é, consideravelmente, maior do que MnP. Em um estudo utilizando como suporte imobilizante a madeira faia mostrou-se que o tipo de suporte

interfere na produção de ambas as enzimas (BABÍČ *et al.*, 2012). Porém, a Lac tem maior produção quando a forma do suporte é pré-definida (BABÍČ *et al.*, 2012).

Na composição do meio não se adicionou cobre, o qual é indutor da produção de Lac, isso foi realizando com objetivo de verificar o quanto a bucha iria influenciar nesta produção, já que tem na sua composição tem lignina, que é indutor natural da síntese das enzimas ligninolíticas (ŠUŠLA *et al.*, 2007; BABÍČ *et al.*, 2012).

O cobre atua como regulador dos genes na transcrição de RNAm (*lcs*), isso foi confirmado através de análises “*Northern blot*” realizadas a partir de cultivos de *C. subvermispota*, em que na ausência Cu^{2+} não foram localizados transcritos para RNAm (*lcs*), enquanto na sua presença ocorreu o oposto (KARAHANIAN *et al.*, 1998; FARIA, 2010). Os genes *mnp* (1 e 2) de *C. subvermispota* também foram transcritos quando a cultura foi suplementada com Cu^{2+} . Portanto o cobre pode exercer regulação diferencial tanto para Lac quanto para MnP (ÁLVAREZ *et al.*, 2009; FARIA 2010). Mesmo sem a adição de cobre, *L. cylindrica* utilizada como suporte imobilizador foi um estimulante para a síntese de Lac.

5.2 Avaliação da Produção de Lignina Peroxidase (LiP)

A metodologia utilizada para identificar a atividade LiP, no presente trabalho apresentou baixa sensibilidade. Uma vez que, a adaptação da mesma descrita no item 4.3, mostrou-se muito variável em respeito do segundo branco. O método original, não realizava a paralisação da reação, a degradação ou não do corante era monitorada durante 10 min a partir do decréscimo da absorção em 651 nm e somente havia um branco, onde tinha-se a substituição do corante azul de metileno por água, que era o primeiro branco também utilizado no trabalho para zerar o equipamento.

Por isso, os ensaios não foram conclusivos quanto à atividade enzimática de LiP no microrganismo *Ceriporiopsis subvermispota* imobilizado em *Luffa cylindrica*. A produção desta enzima pelo *Ceriporiopsis subvermispota* é controversa. Como em TANAKA *et al.* (2009) encontrou a síntese de LiP, em um cultivo utilizado cavacos de *Fagus crenata*, a produção foi detectada a partir da segunda semana de cultivo, mas com melhor pico na terceira semana, o tempo de duração do cultivo foi de doze semanas. Já FARIA (2010), não se encontrou a presença de LiP, utilizando meio definido e complexo em cultivo submerso, superfície e imobilizado, com 21 dias de incubação.

5.3 Avaliação da Produção de Manganês Peroxidase (MnP)

Utilizando a equação 5, foi possível calcular a atividade enzimática específica da MnP, e a partir disto, gerar o gráfico abaixo, Figura 11.

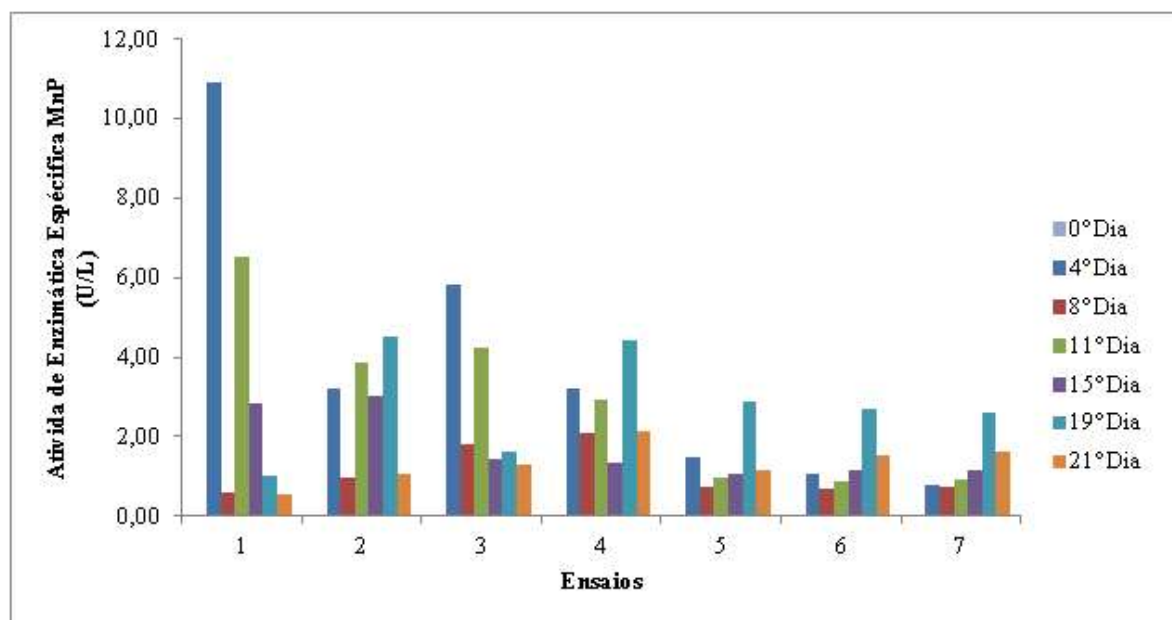


Figura 11: Gráfico da produção de MnP, utilizando células de *Ceriporiopsis subvermispora* imobilizado em *Luffa Cylindrica*. As amostras foram retiradas nos dias 0, 4, 8, 11, 15, 19 e 21.

A maior produção de MnP foi no ensaio 1, no quarto dia de cultivo, 10,903U_{MnP}/L. No oitavo dia também houve uma queda considerável na produção de MnP, o mesmo foi observado para a Lac.

A composição do meio foi mais favorável a produção de MnP do que de Lac, devido a adição do íon de manganês, pois não ocorre a produção de MnP extracelularmente sem a sua presença. O Mn²⁺ causa uma regulação diferencial no gene *mnp* (1 e 2) em *C. subvermispora*, sendo sugerido que o íon metálico tem participação ativa na modificação transcricional de RNAm (*mnp*) (FARIA, 2010). No entanto, esse fungo produz MnP tanto na presença de Mn²⁺, quanto na ausência, porém apenas na presença deste íon ocorre a , excreção da enzima (MANCILLA *et al.*, 2010; FARIA, 2010). Não foi feita análise da produção de enzima intracelular.

No estudo de FARIA (2010), realizou-se três tipos de o cultivo com *C. subvermispora*: submerso, em superfície e imobilizado, em meio complexo e meio definido. A produção de Lac foi maior que a de MnP no cultivo submerso e imobilizado utilizando meio complexo. Já

a produção de MnP foi favorecida no cultivo imobilizado utilizando meio definido. E atividade de LiP não foi detectada.

A tabela 5, apresenta os resultados obtidos no planejamento fatorial para a produção da MnP.

Tabela 5: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de tratamento da *Luffa cylindrica* utilizada para imobilizar *Ceriporiopsis subvermispora* em cultivo submerso na produção de MnP.

Experimento	Variáveis			Respostas		
	A	B	A x B	R ₁ U _{MnP} /L	R ₂ U _{MnP} /L	R U _{MnP} /L
1	-	-	+	12,307	9,500	10,903±1,403
2	+	-	-	3,109	3,282	3,195±0,086
3	-	+	-	5,994	5,648	5,821±0,173
4	+	+	+	3,204	3,170	3,187 ±0,017

A = tipo tratamento, (-) tratamento a vapor e (+) tratamento com NaOH; B = forma, (-) triturada e (+) cúbica.

* As incertezas indicadas são correspondentes ao erro desvio padrão dos efeitos.

Efeitos principais:

Tratamento (A): $[(-10,903+3,195-5,821+3,187)/2] = -5,171$.

Forma (B): $[(-10,903-3,195+5,821+3,187)/2] = -2,56$.

Efeitos de segunda ordem: Tratamento (A) x Forma (B): $[(+10,903-3,195-5,821+3,187)/2] = 2,537$.

Analisando a Tabela 5, quando se fixa a variável B, forma triturada da bucha, ensaios 1 e 2, o efeito da variável A ($-10,903 + 3,195 = -7,708$) indica que a produção de MnP diminui 7,708 U_{MnP}/L, quanto o tratamento (A) muda do nível inferior (-) para o superior (+). Nos ensaios 3 e 4, mantêm-se a forma cúbica fixa, variável B, tendo o segundo efeito da variável A ($-5,821 + 3,187 = -2,634$), indicando que teve-se diminuição da produção de MnP de -2,634 U_{MnP}/L quando o tratamento foi alterada do nível inferior (-) para o superior (+). O efeito global da variável A é $\{[(-7,708 - 2,634)/2] = -5,171\}$.

Da mesma forma, faz-se para encontrar o efeito principal da variável B (-2,545), esta resposta indica que se B passa do nível inferior (-) para o superior (+) a resposta sofre uma diminuição de 2,545 U_{MnP}/L. Portanto, ambas as variáveis influenciam na produção de MnP, porém o tratamento foi mais expressivo do que a forma. Mesmo assim, o ensaio 1 apresentou melhores resultados, tendo que a melhor condição para a síntese de MnP com a forma triturada e o tratamento a vapor. E o sinal positivo (+2,537) do efeito de segunda ordem, significa que a junção dessas variáveis foram vantajosas para a produção de MnP.

A a representação gráfica das respostas obtidas para os experimentos realizados em função das variáveis estudadas está apresentada na Figura 13.

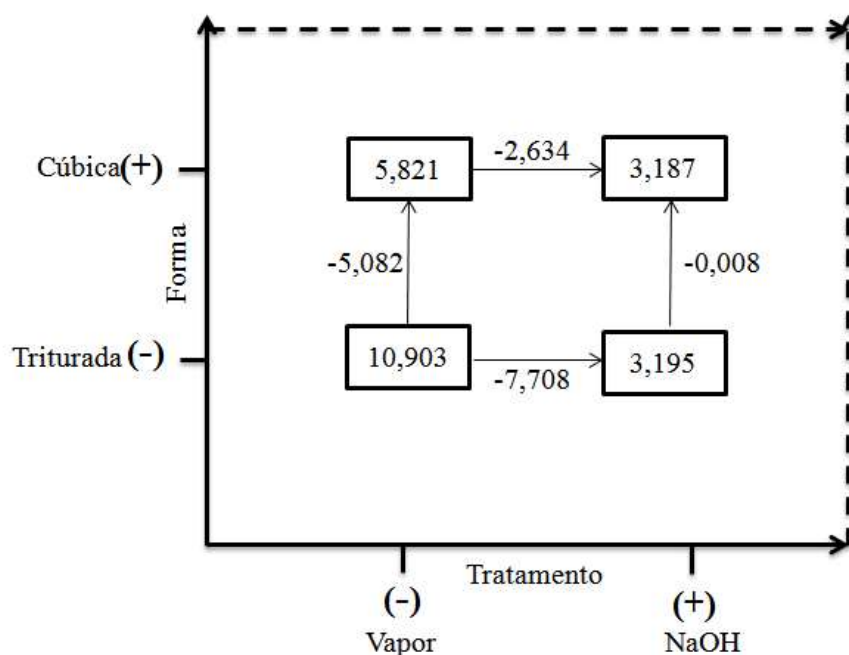


Figura 12: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de MnP. [resposta média: U/L] em cultivo submerso do *Ceriporiopsis subvermispora* submersos utilizando *Luffa cylindrica* como suporte imobilizador. Tratamento na *Luffa cylindrica*: a vapor (-) e NaOH (+); Forma da *Luffa cylindrica*: triturada (-) e cúbica (+).

De acordo com a Figura 12, a produção da MnP diminuiu 5,082 U_{MnP}/L do tratamento a vapor e triturada (-,-) para a tratamento a vapor e cúbica (-,+). Mostrando que bucha triturada favoreceu a produção da MnP. Do tratamento a vapor e triturada (-,-) para o tratamento com NaOH e triturada (+,-) observou-se uma diminuição de de 7,708 U_{MnP}/L . Logo, o tratamento a vapor se sobressaiu sobre o com NaOH. Esses resultados mostram que a bucha na forma triturada foi melhor para a produção de MnP, diferente do resultado de Lac, onde a bucha na forma cúbica apresentou a maior produção.

BABIČ *et al.* (2012) observaram a produção de Lac e MnP por *C. subvermispora* em cultivos em meios submersos utilizando suporte para imobilização em cubos de pinheiro, cubos de faia e em poliuretano durante 14 dias. A madeira faia apresentou melhor produtividade de Lac. E para a produção de MnP, a melhor condição foi utilizando somente meio definido otimizado com composição de 10 g/L de glicose, 1 g/L de tartarato de amônio e 0,05 g/L polissorbato 80 (tween 80), sem imobilização. As atividades enzimáticas mais baixas foram obtidas com a espuma de poliuretano. Isso implica que a composição do

suporte imobilizante interfere na produção de enzimas, uma vez que, neste estudo encontrou-se maior produtividade de MnP do que de Lac utilizando *L. cylindrica*.

5.4 Açúcares Retutores Totais (ART)

A partir da equação da reta da Figura, 14, foi possível obter a concentração de açúcares redutores no meio de cultivo, Figura 15.

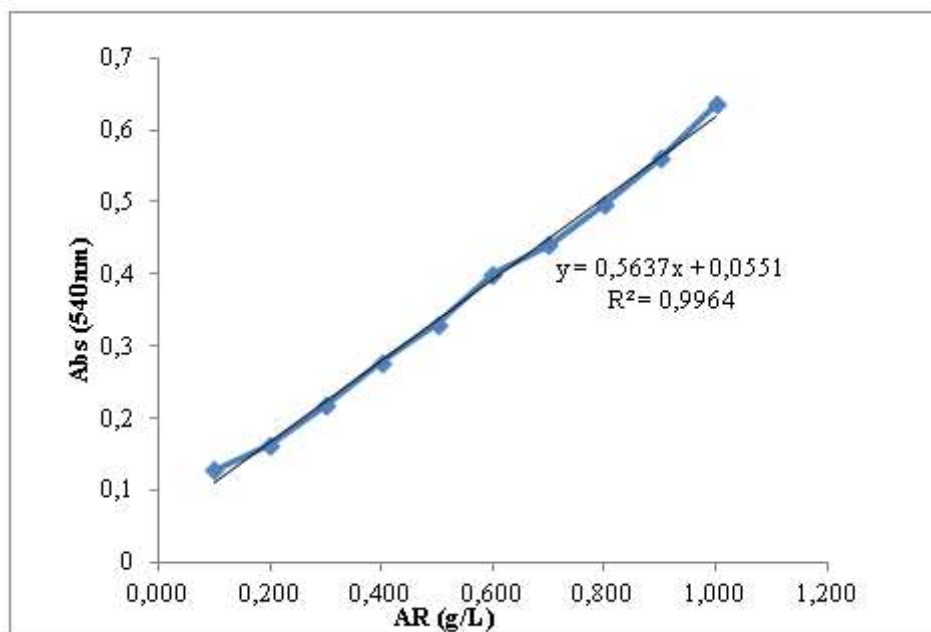


Figura 13: Gráfico da curva padrão da concentração de açúcares redutores.

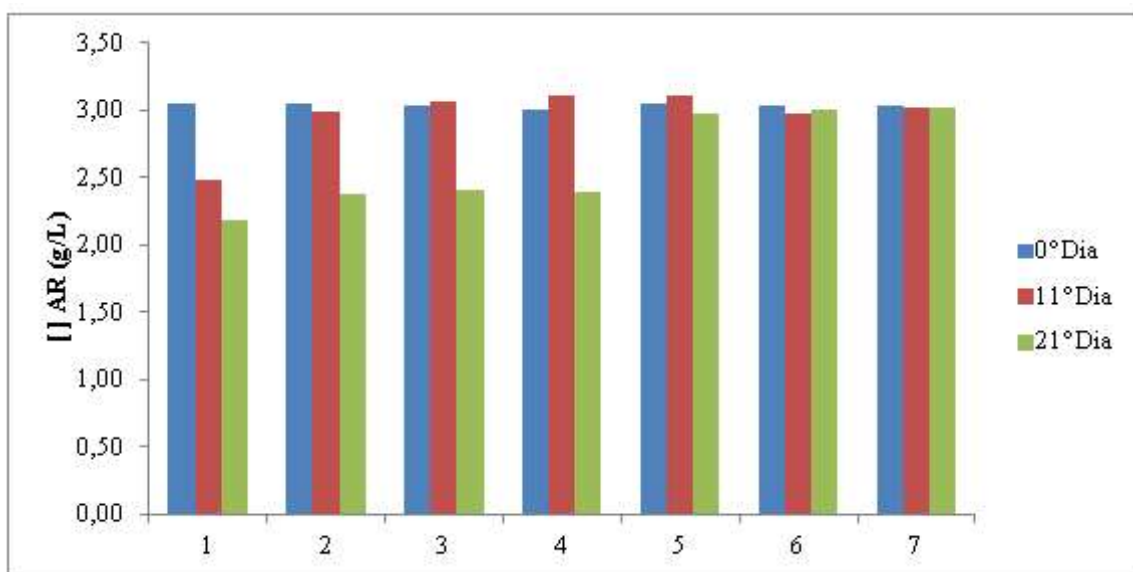


Figura 14: Gráfico da concentração de açúcares redutores, nos dias de cultivos 0, 11 e 21. Concentração de açúcares redutores (g/L) por ensaio.

Ao analisar a Figura 14, não foi observado diminuição da concentração de açúcares redutores nos dias décimo primeiro e vigésimo primeiro. A concentração de açúcares

reduzidos no quarto e oitavo dia não foi quantificada, por falta de amostra. A quantificação de açúcares redutores no oitavo dia de cultivo seria fundamental pois, neste dia houve queda significativa na produção de Lac e de MnP.

O método de quantificação utilizou o reagente DNS. O reagente DNS é reduzido a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, na presença de açúcares redutores e o grupo aldeído do açúcar redutor é oxidado a ácido aldônico. Portanto, este reagente se liga a monossacarídeos, glicose e frutose, compostos que possuem grupo carbonílico e cetônico livres, capazes de se oxidarem na sua presença em soluções alcalinas (SILVA, 2003). Deste modo, como no meio havia a presença de metabólitos secundários, talvez estes também tenham sido oxidados, por isso, quase não se teve alterações significativas na presença de açúcares redutores totais.

Na Tabela 6 está a representação experimental fatorial 2^2 do décimo primeiro dia. De acordo com o resultado apresentado não houve diferença significativa entre experimentos.

Tabela 6: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de tratamento da *Luffa cylindrica* utilizada para imobilizar *Ceriporiopsis subvermispora* na concentração de açúcares redutores no 11º dia de cultivo.

Experimento	Variáveis			Respostas		
	A	B	A x B	R ₁ [] AR (g/L)	R ₂ [] AR (g/L)	R [] AR (g/L)
1	-	-	+	2,295	2,661	2,478±0,183
2	+	-	-	2,912	3,075	2,994±0,082
3	-	+	-	3,086	3,038	3,062±0,024
4	+	+	+	3,090	3,112	3,101±0,011

A = tipo tratamento, (-) tratamento a vapor e (+) tratamento com NaOH; B = forma, (-) triturada e (+) cúbica.

* As incertezas indicadas são correspondentes ao erro desvio padrão dos efeitos.

Efeitos principais:

Tratamento (A): $[(-2,478+2,994-3,062+3,101)/2] = + 0,277$.

Forma (B): $[(-2,478-2,994+3,062+3,101)/2] = + 0,346$.

Efeitos de segunda ordem: Tratamento (A) x Forma (B): $[(+2,478-2,994-3,062+3,101)/2] = - 0,238$.

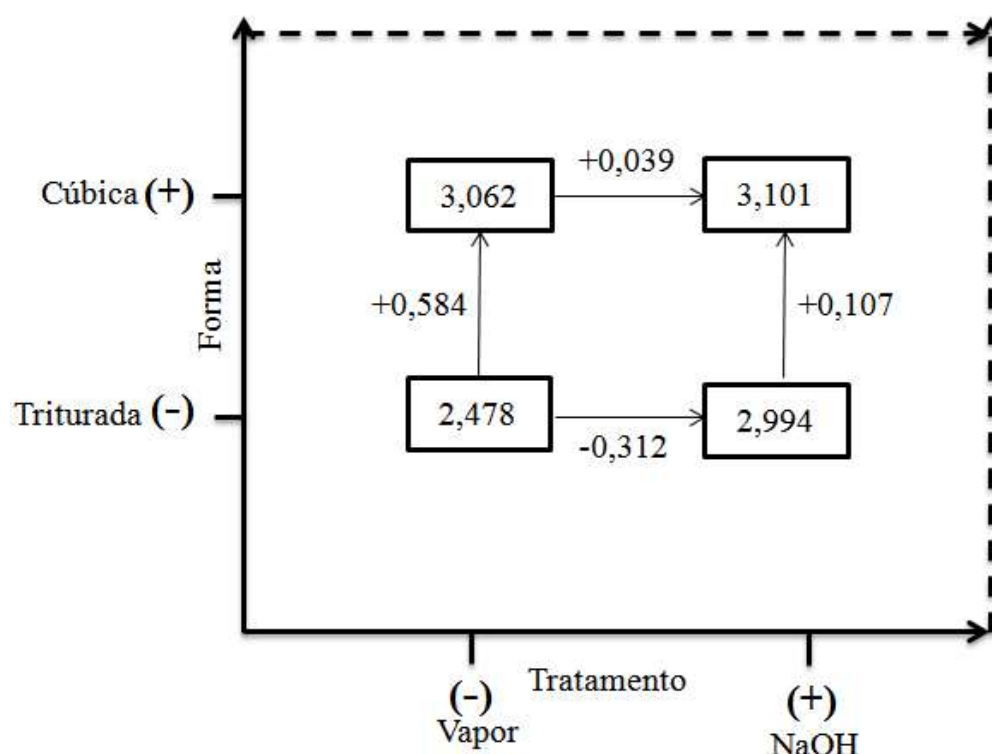


Figura 15: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para na concentração de açúcares redutores no 11º dia de cultivo [resposta média: g/L] em cultivo submerso do *Ceriporiopsis subvermispora* submersos utilizando *Luffa cylindrica* como suporte imobilizador. Tratamento na *Luffa cylindrica*: a vapor (-) e NaOH (+); Forma da *Luffa cylindrica*: triturada (-) e cúbica (+).

De acordo com a Figura 15, do tratamento a vapor e triturada (-,-) para o tratamento com NaOH e triturada (-,+) houve um aumento da concentração de açúcares redutores de 0,584 g/L, indicado um consumo no ensaio 1. Do tratamento a vapor e triturada (-,-) para o a vapor e cúbica (+,-) teve uma diminuição de 0,312 g/L. Do tratamento a vapor e cúbica (+,-) para tratada com NaOH e cúbica (+,+) também houve aumento de 0,107 g/L. E do tratamento com NaOH e triturada (-,+) para o tratada com NaOH e cúbica (+,+), acrescentou 0,039 de açúcares redutores. Pelo efeito de segunda ordem (- 0,238), não tem-se uma correlação positiva para a produção ou consumo de açúcares redutores. O tipo de tratamento e a forma não influenciaram de maneira considerável o consumo e ou produção de açúcares totais redutores, observando o erro experimental.

A Tabela 7 e a Figura 16 apresentam o resultado do planejamento fatorial 2^2 , do vigésimo primeiro dia de cultivo, o último dia de cultivo.

Tabela 7: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de tratamento da *Luffa cylindrica* utilizada para imobilizar *Ceriporiopsis subvermispota* na concentração de açúcares redutores no 21º dia de cultivo.

Experimento	Váriaveis			Respostas		
	A	B	A x B	R ₁ [] AR (g/L)	R ₂ [] AR (g/L)	R [] AR (g/L)
1	-	-	+	2,426	1,937	2,181±0,244
2	+	-	-	2,460	2,299	2,380±0,081
3	-	+	-	2,057	2,742	2,400±0,343
4	+	+	+	2,593	2,192	2,392±0,200

A = tipo tratamento, (-) tratamento a vapor e (+) tratamento com NaOH; B = forma, (-) triturada e (+) cúbica.

* As incertezas indicadas são correspondentes ao erro desvio padrão dos efeitos.

Efeitos principais:

Tratamento (A): $[(-2,181+2,380-2,400+2,392)/2] = + 0,095$.

Forma (B): $[(-2,181-2,380+2,400+2,392)/2] = + 0,115$.

Efeitos de segunda ordem: Tratamento (A) x Forma (B): $[(+2,181-2,380-2,400+2,392)/2] = - 0,103$.

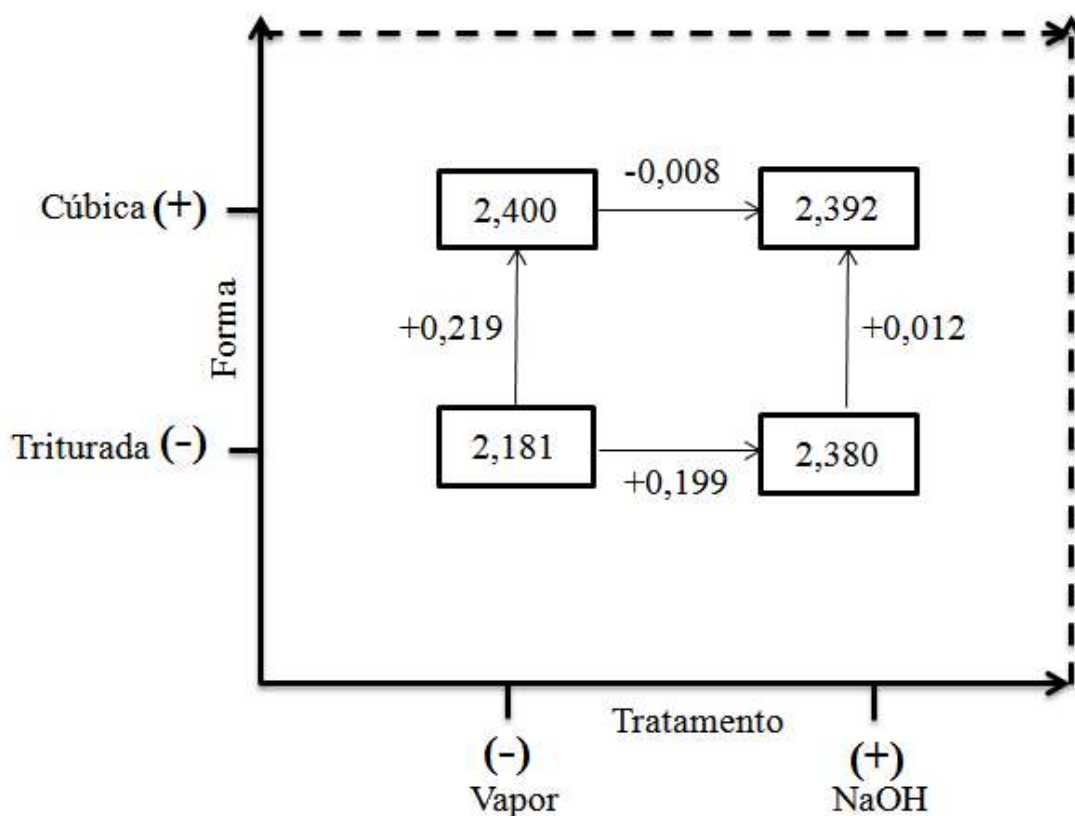


Figura 16: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para na concentração de açúcares redutores no 21º dia de cultivo [resposta média: g/L] em cultivo submerso do *Ceriporiopsis subvermispota* submersos utilizando *Luffa cylindrica* como suporte imobilizador. Tratamento na *Luffa cylindrica*: a vapor (-) e NaOH (+); Forma da *Luffa cylindrica*: triturada (-) e cúbica (+).

Não foi possível observar melhor condição para a produção e ou consumo de açúcares redutores, considerando o erro experimental. Isto pode ser explicado, pelo fato do DNS ser capaz de se ligar a grupo carbonílico e cetônico livres, não sendo somente específico a açúcares redutores, mas também a substâncias que tenham esses ligantes a suas extremidades.

5.5 Imobilização das células em *Luffa cylindrica*

Os fungos filamentosos possuem potencial natural pra aderirem às superfícies. Portanto, esta característica pode ser utilizada com sucesso em vários tipos de biorreatores com biomassa imobilizada. Isso pode favorecer uma maior produtividade de enzimas (BABIČ *et al.*, 2012), por isso é interessante estudar o fungo *C. subvermispora* em um suporte .

Para analisar a concentração de células imobilizadas no suporte, utilizou-se a equação 6, obtendo os resultados contidos na Tabela 8. A Figura 17 apresenta o resultado dos experimentos do planejamento experimental fatorial 2².

Tabela 8: Resultados do planejamento fatorial 2² para o estudo dos efeitos do tipo de tratamento da *Luffa cylindrica* na imobilização do *Ceriporiopsis subvermispora*.

Experimento	Váriaveis			Respostas		
	A	B		R ₁ g/L	R ₂ g/L	R g/L
1	-	-	+	0,60	1,00	0,80±0,20
2	+	-	-	0,60	1,60	1,10±0,50
3	-	+	-	3,20	3,60	3,40±0,20
4	+	+	+	2,60	3,00	2,80±0,20

A = tipo tratamento, (-) tratamento a vapor e (+) tratamento com NaOH; B = forma, (-) triturada e (+) cúbica.

* As incertezas indicadas são correspondentes ao erro desvio padrão dos efeitos.

Efeitos principais:

Tratamento (A): $[(-0,80+1,10-3,40+2,80)/2] = - 0,15$.

Forma (B): $[(-2,181-2,380+2,400+2,392)/2] = + 2,15$.

Efeitos de segunda ordem: Tratamento (A) x Forma (B): $[(+2,181-2,380-2,400+2,392)/2] = - 0,45$.

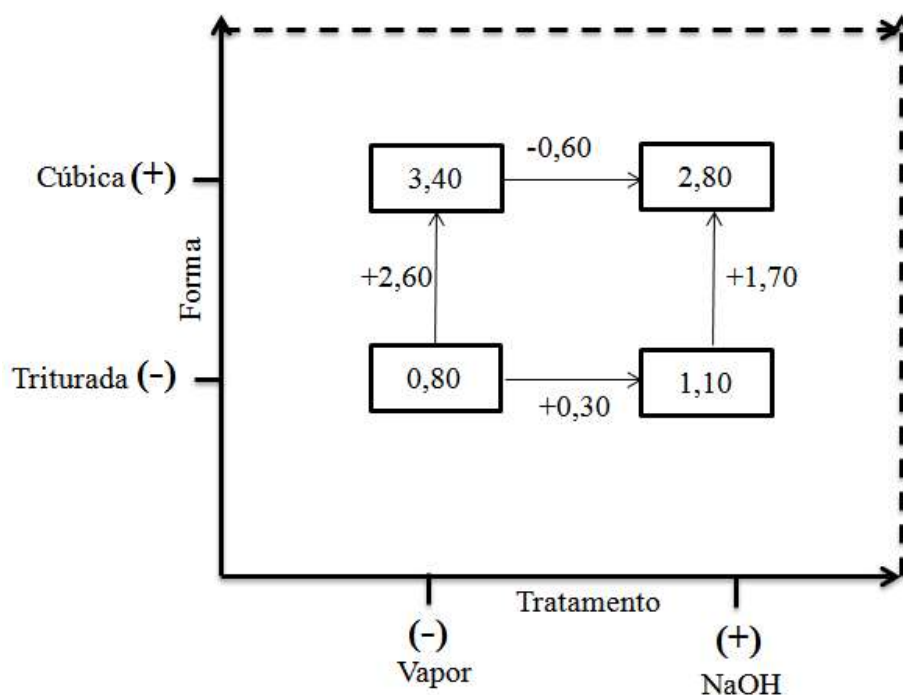


Figura 17: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para na concentração de células imobilizadas no suporte [resposta média: g/L] em cultivo submerso do *Ceriporiopsis subvermispora* submersos utilizando *Luffa cylindrica* como suporte imobilizador. Tratamento na *Luffa cylindrica*: a vapor (-) e NaOH (+); Forma da *Luffa cylindrica*: triturada (-) e cúbica (+).

Nos efeitos principais o tratamento a vapor foi 0,15 g/L melhor que o com NaOH. Com relação a forma da bucha, a forma a cúbica foi mais significativa, 2,15 vezes em relação a triturada. Isto também revela que o efeito da forma da bucha foi mais expressivo que do tratamento.

Observando a figura 17, do tratamento a vapor e triturada (-,-) para o tratamento a vapor e cúbica (-,+), aumento-se a concentração de células imobilizadas em 2,60 g/L. Também elevou-se a concentração em 0,30 g/L do ponto (-,-) para o (+,-), mas com número muito menor em relação ao primeiro. O que traduz que a forma cúbica foi melhor que a triturada. Isso também é confirmando quando tem-se um aumento de 1,70 g/L quanto a forma passa do nível inferior (-) para o superior (+).

Agora do tratamento a vapor e cúbica (-,+), para o tratamento com NaOH e cúbica (+,+) houve decréscimo de 0,60g/L, o que reforça que o tratamento a vapor é mais indicado do que utilizando NaOH. Por isso, o tratamento a vapor e forma cúbica são mais adequados para a concentração de células imobilizadas.

A utilização de células imobilizadas aumenta o rendimento e diminuir o tempo de produção de enzimas, elevando a produtividade (COVIZZI *et al.*, 2007). Este fato foi verificado no presente trabalho, pois o melhor dia de produção das enzimas Lac e MnP foram no quarto dia de cultivo.

A partir da equação 7, foi possível efetuar o cálculo da retenção de células no suporte que é representado por um número adimensional, Tabela 9 e a Figura 18.

Tabela 9: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de tratamento da *Luffa cylindrica* utilizada para imobilizar *Ceriporiopsis subvermispura* na, analisando a retenção de células no suporte.

Experimento	Variáveis			Respostas		
	A	B		R ₁	R ₂	R
1	-	-	+	0,030	0,050	0,040±0,010
2	+	-	-	0,030	0,080	0,055±0,025
3	-	+	-	0,160	0,180	0,170±0,010
4	+	+	+	0,130	0,150	0,140±0,010

A = tipo tratamento, (-) tratamento a vapor e (+) tratamento com NaOH; B = forma, (-) triturada e (+) cúbica.

* As incertezas indicadas são correspondentes ao erro desvio padrão dos efeitos.

Efeitos principais:

Tratamento (A): $[(-0,40+0,055-0,170+0,140)/2] = -0,063$.

Forma (B): $[(-0,40-0,055-0,170+0,140)/2] = +0,108$.

Efeitos de segunda ordem: Tratamento (A) x Forma (B): $[(+0,40-0,055-0,170+0,140)/2] = -0,023$.

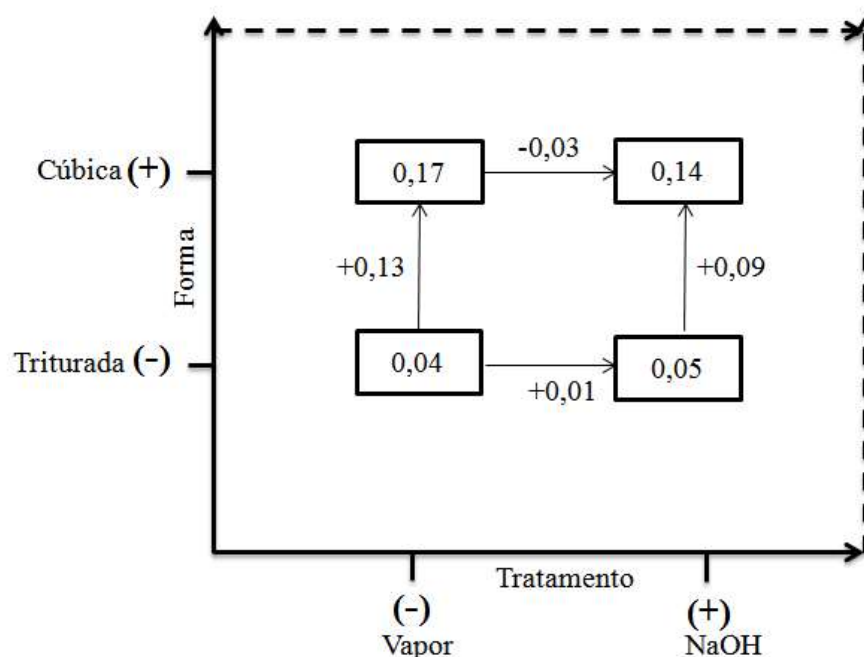


Figura 18: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para na retenção de células no suporte [resposta média: (g/L)/(g/L)] em cultivo submerso do *Ceriporiopsis subvermispura* submersos utilizando

Luffa cylindrica como suporte imobilizador. Tratamento na *Luffa cylindrica*: a vapor (-) e NaOH (+); Forma da *Luffa cylindrica*: triturada (-) e cúbica (+).

A partir dos dados obtidos para a retenção de célula, percebe-se que o tratamento o efeito global da variável A apresentou sinal negativo (-0,063), o que significa que o tratamento a vapor foi mais eficaz que o com NaOH. Para a variável B, o sinal apresentado foi positivo (+0,108), portanto a estrutura cúbica foi mais significativa. Quanto para concentração de células e para a retenção a forma foi mais expressiva que o tratamento.

Isto é confirmado pela representação geométrica, Figura 18, do tratamento a vapor e a forma triturada (-,-) para o tratamento a vapor e a forma cúbica (-,+) o aumento de células retidas no foi de 0,13. Do mesmo modo, quando se fixa o tratamento, do ponto (+,-) para o ponto (+,+), também há acréscimo de 0,09. E quando o ponto (-,+) passa para (+,+) há uma diminuição de -0,03. Portanto, essas variáveis demonstram que o ensaio mais apropriado foi o 3, forma cúbica e o tratamento a vapor. Apontando o mesmo resultado obtido anteriormente, logo para a imobilização celular o ensaio 3, é o melhor.

Como sabe-se o tamanho do poro da forma imobilizante interfere na adesão celular, para fungos filamentosos, quando os poros são maiores facilita a penetração de suas hifas no suporte, desta forma ocupam os espaços vazios (COVIZZI *et al.*, 2007). Isto explica porque a forma cúbica foi o melhor suporte, sendo também mais estática que a triturada, facilitando o crescimento fúngico. E o tratamento a vapor facilitou a interação do suporte imobilizante com o fungo.

Destaca-se também que não houve degradação da *Luffa cylindrica*, pois a massa final do suporte foi maior que a inicial. Pode explicar o ocorrido, devido a da estrutura da bucha vegetal ser entrelaçada, o que dificulta a desorganização da parede celular pelos compostos de baixa massa molar excretados pelo fungo, sendo um ótimo suporte para imobilização de fungos filamentosos.

Mesmo realizando o experimento em duplicata, sempre haverá uma alteração nos dados de um em relação ao outro, pois uma maior quantidade de células pode ser adicionada a um erlenmeyer. É difícil de controlar tudo que ocorre dentro de cada experimento, pode haver diferença de temperatura dentro de uma estufa. As respostas obedeceram a uma tendência, porém com determinado erro experimental (CARREIRA, 2012). Mesmo assim foi comprovada, a capacidade do sistema de planejamento fatorial em

avaliar as interações possíveis, permitindo eliminar o carácter aleatório associado à escolha do caminho univariado (CUNICO *et al.*, 2008).

6 CONCLUSÃO

A partir dos dados citados e relatados, conclui-se que para a produção de MnP, o melhor tratamento da *Luffa cylindrica* foi o a vapor e a forma triturada. Para a produção de Lac a forma cúbica e o tratamento a vapor foi o mais indicado, porém não houve produção considerável, pois a produção de MnP foi cerca de dez vezes maior que a de Lac, isso pode ser explicado pelo meio de cultivo utilizado, pois não havia indutores de Lac. Não foi possível obter informações sobre a atividade da LiP, uma vez que o método de análise não foi confiável. As variáveis analisadas, tratamento e forma da bucha vegetal, praticamente não interferiram significativamente na concentração de açúcares redutores nos dias analisados.

Para a imobilização celular, o tratamento e a forma mais adequadas foram o a vapor e a cúbica. O planejamento experimental fatorial 2^2 foi satisfatório uma vez que apresentou uma boa confiabilidade nos dados retratados.

Desta forma, torna-se interessante utilizar o *Ceriporiopsis subvermispora* imobilizado em *Luffa cylindrica* em biorreatores, facilitando a produção de enzimas ligninolíticas, para uso industrial.

7 PERSPECTIVAS

Para próximos estudos, pode-se otimizar o meio de cultura para produção de enzimas ligninolíticas utilizando a *Luffa cylindrica* como suporte imobilizante. Realizar estudos genéticos, para melhor compreender o metabolismo do fungo, e a expressão de suas enzimas.

Na otimização do meio pode-se trabalhar com uma correlação entre a concentração de nitrogênio e glicose. Pois, esses componentes são essenciais para o metabolismo do *Ceriporiopsis subvermispota*, uma vez que, atuam como reguladores na produção de enzimas (BABIČ *et al.*, 2012). Por exemplo, uma quantidade limitante de nitrogênio 0,2 g/L causa baixos níveis de expressão quanto de Lac como de MnP, em comparação com um meio que tenha concentração suficiente de fonte de nitrogênio (2,0g/L) (BABIČ *et al.*, 2012). No presente estudo não teve-se a presença de nitrogênio, com objetivo de avaliar o quanto a imobilização do *Ceriporiopsis subvermispota* em *Luffa cylindrica* influenciou na produção das enzimas ligninolíticas.

Já para a fonte de carbono, se optou adicionar a glicose, porque, o mesmo fato que ocorre com o nitrogênio também acontece para a glicose. O fungo sintetiza níveis elevados de ambas as enzimas, 500 U/L de MnP e 400 U/L de Lac, respectivamente, em duas e três semanas de cultivo a 30 °C, com elevadas concentrações de glicose (10 g/L) (BABIČ *et al.*, 2012). Caso ao contrário, a produtividade diminui.

Por isso torna-se interessante variar as concentração de glicose e nitrogênio no meio de cultivo. Além disso, pode-se também trabalhar com diferentes concentrações de cobre e manganês, os quais são indutores da síntese enzimática do *Ceriporiopsis subvermispota*, otimizando as concentrações ideais.

Um outro ponto que pode ser estudado é a possibilidade de construir um biorreator utilizando o *Ceriporiopsis subvermispota* imobilizado em *Luffa cylindrica*. Por isso é interessante otimizar o meio para a produção das enzimas ligninolíticas, sendo possível o reduzir custos operacionais, como de separação e purificação de enzimas, uma vez que, fungos expressam a maioria de sua enzimas extracelular.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. **Relevance of extractives and wood transformation products on the biodegradation of *Pinus taeda* by *Ceriporiopsis subvermispora***. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 61, p. 182-188, 2008.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. **Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas**. Quím. Nova. São Paulo, v. 34, n. 10, p. 1729-1738, 2011.
- AKHTAR, M.; BLANCHETTE, R. A.; MYERS, G.; KIRK, T. K. **An overview of biomechanical pulping research**. In: YOUNG, R. and AKHTAR, M. Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. New York: John Wiley, 1998. p. 309-383.
- AKHTAR, M.; SCOTT G. M.; SWANEY R. E.; SHIPLEY D. F. **Biomechanical pulping: a mill-scale evaluation**. Resources Conservation Recycling, v. 28, p. 241-252, 2000.
- ÁLVAREZ, J. M.; CANESSA P.; MANCILLA R. A.; POLANCO R.; SANTIBÁÑEZ P. A. VICUÑA R. **Expression of genes encoding laccase and manganese-dependent peroxidase in the fungus *Ceriporiopsis subvermispora* is mediated by an ACE1-like copperfist transcription factor**. Fungal Genetics and Biology, v. 46, p. 104-111, 2009.
- ALVES, A. L. **Produção, purificação e caracterização de uma lacase de *Phlebia rufa* (Pers.) M. P. Christ**. Dissertação (Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2011.
- AMIN, H. A. S.; MOHAMED, S. S. **Immobilization of *Aspergillus terreus* on loofa sponge for soyasapogenol B production from soybean saponin**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 78, p. 85-90, 2012.
- ARCHIBALD, F.S. **A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye Azure B**. Applied and Environmental Microbiology, v. 58, p. 3110-3116, 1992.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. **Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi**. FEMS Microbiology Reviews, v. 29, p. 719-739, 2005.
- BABIČ, J.; PAVKO, A. **Production of ligninolytic enzymes by *Ceriporiopsis subvermispora* for decolourization of synthetic dyes**. Acta Chim. Slov. 2007, 54, 730-734.
- BARATO, M. B. **Fungos derivados da Antártica: biodiversidade e produção de enzimas lignocelulóticas a baixas e médias temperaturas**. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2014.
- BARROS NETO B.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. **Como fazer experimentos- Aplicações na ciência e na indústria**. 2010.
- BERGMAIER, D.; CHAMPAGNE, C. P.; LACROIX, C. **Growth and exopolysaccharide production during free and immobilized cell chemostat culture of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M**. Journal of Applied Microbiology, Oxford, v. 98, n. 2, p. 272-284, 2005.

BREXÓ, R. P. **Produção de enzimas ligninolíticas, glioxal oxidase e proteases por fungos marinhos.** 2013. 51 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2013.

BURDSALL, Jr., H.S. **Taxonomy of industrially important white-rot fungi.** In: Young, R. e Akhtar, M., Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. New York: John Wiley & Sons, 1998, p. 259-272.

CAMERON, M. D.; TIMOFEEVSKI, S.; AUST, S. D. **Enzimology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 54, p. 751-758, 2000.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J.B.A. **Biocatalizadores imobilizados: uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos.** *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, n.36, n.6, p.48-57. 2006.

CARDOSO, M. L. **Estudo da produção *in vitro* de enzimas ligninocelulolíticas por fungo basidiomiceto cultivado sob fermentação sólida de resíduos vegetais.** 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Feira de Santana-BA, 2009.

CARREIRA, J. A. **Enriquecimento de dados: uma pré-etapa em relação à limpeza de dados.** 2012. 76 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2012.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. **Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira.** Química Nova, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.

CHEN, B.; CHEN, C.; GUO, W.; CHANG, H.; CHEN, W.; LEE, D.; HUANG, C.; REN, N.; CHANG, J. **Fixed-bed biosorption of cadmium using immobilized *Scenedesmus obliquus* CNW-N cells on loofa (*Luffa cylindrica*) sponge.** Bioresource Technology, v. 160, p. 175-181, 2014.

COELHO, T. C. **Avaliação das condições de imobilização de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) visando a produção de xilitol.** 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena-SP, 2007.

COLLINS P.; DOBSON A.W. **Regulation of Laccase Gene Transcription in *Trametes versicolor*.** Applied and Environmental Microbiology, v. 63, p. 3444-3450, 1997.

CONESSA, A.; PUNT, P. J.; van den HONDEL, C. A. M. J. J. **Fungal peroxidases: molecular aspects and applications.** J. Biotechnol., v. 93, p. 143- 158, 2002.

CORREIA, D. S., SANTOS, F. H. R.; SOARES, L. H. B.; CORREIA, M. E. F. **Enzimas oxidativas microbianas envolvidas na biodegradação da lignocelulose: produção, características bioquímicas e importância biotecnológica.** Documentos, 284. Embrapa Agrobiologia, 2011.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. **Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas**. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 28, n.2, p. 143-160, jul./dez., 2007.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. **Planejamento Fatorial: Uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica**. Visão Acadêmica, v. 9, n. 1, 2008. ISSN 1518-8361.

ELIZEI, V. G.; CHALFOUN, S. M.; BOTELHO, D. M. dos S. ; REBELLES, P. P. R. **Imobilização de fungos filamentosos com potencial para uso agroindustrial**. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo, vol.81, n.2, pp.165-172, junho 2014.

ENOKI, M.; WATANABE, T.; NAKAGAME, S.; KOLLER, K.; MESSNER, K.; HONDA, Y.; KUWAHARA, M. **Extracellular lipid peroxidation of selective white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora***. *FEMS Microbiology Letters*. v. 180, p. 205-211, 1999.

ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. (org.) **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004, 510 p.

EXOTIC-PLANTS. *Luffa cylindrica*. 2017. Disponível em: <<http://www.exotic-plants.de/seeds/ethnobotanicals/Luffa-cylindrica.php>>. Acessado em 20 de mai. de 2017.

FAN, X.; ZHOU, Y.; XIAO, Y.; XU, Z.; BIAN, Y. B. **Cloning, expression and phylogenetic analysis of a divergent laccase multigene family in *Auricularia auricula-judae***. *Microbiological Research*, v. 169, n. 5-6, p. 453–462, 2014. Elsevier GmbH.

FARIA, R. A. **Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por *Ceriporiopsis subvermispora***. 2010. 102 p. Dissertação (Mestre em Ciências - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. 2010.

FERRAREZI, A. L.; OHE, T. H. K.; BORGES, J. P.; BRITO, R. R.; SIQUEIRA, M. R.; VENDRAMINI, P. H.; QUILLES JR, J. C.; NUNES, C. C. C.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O.; BOSCOLO, M.; DA SILVA, R.; GOMES, E. **Production and characterization of lipases and immobilization of whole cell of the thermophilic *Thermomucor indicae* seudaticae N31 for transesterification reaction**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 107, p. 106-113, 2014.

FERRAZ, A.; GUERRA, A.; MENDONÇA, R.; MASARIN, F.; VICENTIM, M. P.; AGUIAR, A.; PAVAN P. C. **Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping**. *Enzyme and Microbial Technology* v. 43, p. 178-185, 2008.

FERRAZ, A.; CÓRDOVA, A.M.; MACHUCA, A. **Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis***. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p. 59-65, 2003.

FILHO, J. M. M. A. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

GONÇALVES, A. Z. L. **Produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos por fermentação em estado sólido utilizando resíduos sólidos agroindustriais, visando potencial aplicação na produção animal.** 2010. 117 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2010.

HAKALA, T. K.; MAIJALA, P.; KONN, J.; HATAKKA, A. **Evaluation of novel wood-rotting polypores and corticioid fungi for decay and biopulping of Norway spruce (*Picea abies*) wood.** Enzyme and Microbial Technology, v. 34, p. 255-263, 2004.

HAKULINEN, N.; ROUVINEN, J. **Three-dimensional structures of laccases.** Cellular and molecular life sciences : CMLS, v. 72, n. 5, p. 857–868, 2015.

HAMMEL, K. E.; CULLEN, D. **Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis.** Current Opinion in Plant Biology, v. 11, p. 349–355, 2008.

HENRIKSSON, G.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. **A critical review of cellobiose dehydrogenases.** Journal of Biotechnology, v. 78, p. 93-113, 2000.

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

JUNTER, G. A.; JOUENNE, T. **Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome in leader or the cart before the horse.** *Biotechnology Advances*, New York, v. 22, n. 8, p. 633-658, 2004.

KARAHANIAN, E.; CORSINI, G.; LOBOS, S.; VICUÑA R. **Structure and expression of a laccase gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1443, p. 65- 74, 1998.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. **Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential.** Journal of molecular catalysis. v.10, p.157-176, 2000.

KOURKOUTAS, Y.; MCERLEAN, C.; KANELAKI, M.; HACK, C. J.; Marchant, R.; Banat, I. M.; Koutinas, A. A. **High-temperature wine making using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Clifton, v. 112, n. 1, p. 25-35, 2004.

KIRK, T.K.; CULLEN, D. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry.** Young, R.A., Akhtar, M., Eds.; Wiley: New York, NY, USA, 1998; pp. 273–308.

LACERDA, M. F. A. R. **Degradação de hormônio sintético por meio de lacases fúngicas imobilizadas em fibras de *Luffa cylindrica*.** 2015. 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, 2015.

LARRONDO, L. F.; LOBOS, S.; STEWART, P.; CULLEN D.; VICUNÃ, R. **Isoenzyme Multiplicity and Characterization of Recombinant Manganese Peroxidases from *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium*.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 5, p. 2070-2075, 2001.

- LARRONDO, L. F.; AVILA, M.; SALAS, L.; CULLEN, D.; VICUNÃ, R. **Heterologous expression of laccase cDNA from *Ceriporiopsis subvermispota* yields copperactivated apoprotein and complex isoform patterns.** Microbiology, v. 149, p. 1177-1182, 2003.
- LOBOS, S.; LARRAÍN, J.; SALAS, L.; CULLEN, D.; VICUNÃ, R. **Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*.** Microbiology, v. 140, p. 2691-2698, 1994.
- LOBOS, S.; TELLO, M.; POLANCO, R.; LARRONDO, L. F.; MANUBENS, A.; SALAS, L.; VICUNÃ, R. **Enzymology and molecular genetics of the ligninolytic system of the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*.** Current Science, v. 81, p. 992-997, 2001.
- LORENCI, L. R. C. G. **Produção e pré-purificação de enzima lacase e sua utilização na polpação enzimática dos resíduos da palma.** 2016. 62 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Curitiba- PR, 2016.
- LUNDELL, T.; LEONOWICZ, A.; ROGALSKI, J.; HATAKKA, A. **Formation and action of lignin-modifying enzymes in cultures of *Phlebia radiata* supplemented with veratric acid.** Applied and Environmental Microbiology, v. 56, p. 2623-2629, 1990.
- MACEDO, M. L. H.; LÓPEZ, J. A.; RIBEIRO, M. L. RIBEIRO; PEDRAZZOLI JR, J.; MELLO, M. P. de. **Gene expression of *Ceriporiopsis subvermispota* during wood degradation.** Science and Technology. Journal of Food, Agriculture & Environment v.13 (2), pp. 232-237, 2015.
- MACIEL, M. J.; SILVA, A.C.; RIBEIRO, H.C.T. **Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review.** Electron. J. Biotechnol. 2010, 13, doi:10.2225/vol13-issue6-fulltext-2.
- MAGALHÃES, P. O. **Purificação de hemicelulases e uma β -glicosidade de *Ceriporiopsis subvermispota* produzidas em condições de biopolpação.** 2005. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena – SP, 2005.
- MANUBENS, A.; CANESSA, P.; FOLCH, C.; AVILA, M.; SALAS, L. VICUNÃ, R. **Manganese affects the production of laccase in the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*.** FEMS Microbiological Letters, v. 275, p. 139-145, 2007.
- MARTÍNEZ, A. T. **Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases.** Enzyme and Microbial Technology, v. 30, p. 425-444, 2002.
- MARTINEZ, M. J., RUIZ-DUENAS, F. J., CUILLEN, F., MARTINEZ, A. T. 1996. **Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*.** European Journal of Biochemistry 237: 424-432.
- MEDRADO, L. C. L. **Adsorção de íons cromo (VI) proveniente de efluentes de curtumes em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) modificada com ácido cítrico.** 2011. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química Industrial) - Química Industrial, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis. 2011.

MELEIGY, S. A.; KHALAF, M. A. **Biosynthesis of gibberellic acid from milk permeate in repeated batch operation by a mutant *Fusarium moniliforme* cells immobilized on loofa sponge.** Bioresource Technology, v. 100, p. 374-379, 2009.

MENDES, A. A. **Importância dos medidores de baixa massa molar na biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis subvermispora*.** 2008. 121 p. Tese (Doutorado - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.

MESSERSCHMIDT, A. **The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin modelling and structural relationships.** European Journal of Biochemistry, v. 187, n. 2, p. 341 –352, 1990.

MESTER, T.; JONG, E.; FIELD, J. A. **Manganese regulation of veratryl alcohol in white rot fungi and its indirect effect on lignin peroxidase.** Applied and Environmental Microbiology, v. 61, n.5, p. 1881 - 1887, 1995.

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.

MORÃO, L. G. **Estudo de biossorção e testes de imobilização usando *Luffa cylindrica* como adsorvente e *Saccharomyces cerevisiae* como agente imobilizado visando analisar a capacidade de remoção de corantes azóicos em solução.** 2011. 65 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2011.

MOREIRA, M. T.; PALMA, C.; FEIJOO, O.; LEMA, J. M. **Strategies for the continuous production of ligninolytic enzymes in fixed and fluidised bed bioreactors.** *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 1, n. 66, p. 27-39, 1998.

OGBONNA, J. C.; LIU, Y.; LIU, Y.; TANAKA, H. **Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge as a carrier for microbial cell immobilization.** Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 78, n. 6, p. 437-442, 1994.

OBOH, I. O.; ALUYOR, E. O. ***Luffa cylindrica* an emerging cash crop.** Nigéria, 2009. African Journal of Agricultural Research, v. 4 (8), pp. 684-688.

PAZZETTO, R.; DELANI, T. C. O.; FENELON, V. C.; MATIOLI, G. **Cyclodextrin production by *Bacillus firmus* strain 37 cells immobilized on loofa sponge.** Process Biochemistry, v. 46, p. 46-51, 2011.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. **Por que otimização multivariada?** Engenharia Sanitária e Ambiental. v.10, n.2, p.106-110, 2005.

POINTING, S. B. **Feasibility of bioremediation by white-rot fungi.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 57, p. 20 - 33, 2001.

PRICHULA, J.; MACHADO A. da S.; CRUZ S. P.; AYUB A. Z. **Biodegradação de casca de arroz POR *Ceriporiopsis subvermispora* em cultivos em estado sólido.** Salão de Iniciação Científica (22. : 2010 out. 18-22 : Porto Alegre, RS). Livro de resumos. Porto Alegre : UFRGS, 2010. <http://hdl.handle.net/10183/46201>.

RÜTTIMANN-JOHNSON, C.; SALAS, L.; VICUÑA, R.; KIRK K. T. **Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispora***. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 1792-1797, 1993.

SALAS, C.; LOBOS, S.; LARRAÍN, J.; SALAS, L.; CULLEN, D.; VICUÑA, R. **Properties of laccase isoenzymes produced by the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora***. *Biotechnology Applied Biochemistry*, v. 21, p. 323-333, 1995.

SANTOS, V. A. Q. **Avaliação de suportes para a imobilização de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 visando à produção de etanol e levana**. 2013. 115 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências dos Alimentos) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2013.

SARATALE, G. D.; SARATALE, R. G.; CHANG, J. S.; GOVINDWAR, S. P. **Fixed bed decolorization of Reactive Blue 172 by *Proteus vulgaris* NCIM-2027 immobilized on *Luffa cylindrica* sponge**. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 65, p. 494-503, 2011.

SILVA, D. C. V. d. **Seleção de fungos de sedimento do rio Capibaribe contaminado com efluentes têxteis quanto à capacidade de produzir enzimas do complexo fenoloxidase e de descolorir corantes**. 2012. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas, Recife-PE, 2012.

SILVA, R. DO N; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D'A. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. **Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel**. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 23, n. 3, p. 337-341, Dec. 2003.

SOUZA-CRUZ, P. B. S. **Estudo das Enzimas Produzidas por *Ceriporiopsis subvermispora* (Pilát) Gilbn e Ryv. Durante a Biodegradação de *Pinus taeda* L.** 2002. 56 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena/Departamento de Biotecnologia, Lorena.

SUNDARAMOORTHY, M., GOLD, M. H., POULOS, T. L. 2010. **Ultrahigh (0.93 Å) Resolution structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: implications for the catalytic mechanism**. *Journal of Inorganic Biochemistry* 104: 683–690.

ŠUŠLA, M.; NOVOTNÝ, Č.; SVOBODOVÁ, K. **The implication of *Dichomitus squalens* laccase isoenzymes in dye decolorization by immobilized fungal cultures**. *Bioresour. Technol.* 2007, 98, 2109–2115.

TANAKA, H.; KOIKE, K.; ITAKURA, S.; ENOKI, A. **Degradation of wood and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora***. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 45, p. 384-390, 2009.

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

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. **Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos**. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 88 - Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, 2013.

VICENTIM, M.P.; FERRAZ, A. **Enzyme production and chemical alterations of *Eucalyptus grandis* wood during biodegradation by *Ceriporiopsis subvermispora* in cultures supplemented with Mn^{2+} , corn steep liquor and glucose.** Enzyme and Microbial Technology, v. 40, p. 645–652, 2007.

VILELA, E. D. S. **Análise da produção de celulases e beta glicosidase produzidas por *Streptomyces sp.*** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

VISWANATH, B.; RAJESH, B.; JANARDHAN, A.; KUMAR, A. P.; NARASIMHA, G. **Fungal Laccases and Their Applications in Bioremediation.** Enzyme Research, v. 2014, p. 1–21, 2014.

WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. **Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations.** Biotechnology Advances, New York, v. 23, n. 2, p. 115-129, 2005.

WONG, D. W. S. **Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 157, p. 174 – 209, 2009.

ZÁMOCKÝ, M.; LUDWIG, R.; PETERBAUER, C.; HALLBERG, B. M.; DIVNE C.; NICHOLLS P.; HALTRICH D. **Cellobiose dehydrogenase: a flavocytochrome from wood-degrading, phytopathogenic and saprotrophic fungi.** Current Protein & Peptide Science, v.7, p. 255- 280, 2006.