NARA BALLAMINUT

**CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESCOLORAÇÃO DE
CORANTE REATIVO DIAZO POR BASIDIOMICETOS
TROPICAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT para obtenção
de título de Doutor em Biotecnologia.

**São Paulo
2016**

NARA BALLAMINUT

**CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESCOLORAÇÃO DE
CORANTE REATIVO DIAZO POR BASIDIOMICETOS
TROPICAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT para obtenção
de título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Dácio Roberto
Matheus

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Elizabete
Campos de Lima

“Versão corrigida. A versão original
eletrônica, encontra-se disponível tanto na
biblioteca do ICB quanto na biblioteca
digital de teses e dissertações da USP
(BDTD).”

**São Paulo
2016**

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Ballaminut, Nara
CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESCOLORAÇÃO DE
CORANTE REATIVO DIAZO POR BASIDIOMICETOS TROPICAIS
/ Nara Ballaminut; orientador Dácio Roberto
Matheus; coorientadora Elizabete Campos de Lima. --
São Paulo, 2016.
175 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Biodegradação. 2. Lacases. 3. MnP. 4.
Quelantes e redutores de ferro. 5. Via metabólica.
I. Matheus, Dácio Roberto, orientador. II. Campos
de Lima, Elizabete, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Nara Ballaminut

Título da Tese: Caracterização do processo de descoloração de corante reativo diazo por basidiomicetos tropicais

Orientador(a): Prof. Dr. Dácio Roberto Matheus

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

*À todos aqueles que me amaram de
alguma forma, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de mais nada, à Universidade de São Paulo, em especial ao meu orientador Dr. Dácio Roberto Matheus, por ter acreditado em mim e nos rumos da nossa pesquisa; à Secretaria de Biotecnologia, especialmente à Fábria Reis Vila Nova de Lima e Eliane de Araújo Campos Gouveia, pela disposição e paciência; e ao CNPq pela oportunidade e apoios acadêmico e financeiro para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Muito obrigada também ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, com agradecimento especial ao Núcleo de Pesquisa em Micologia, seus pesquisadores e apoio técnico, com destaque aos doutores Michel Navarro Benatti, José Ivanildo de Souza e Adriana de Mello Gugliotta. Agradeço ainda à Dra Vera Maria Valle Vitali, Dra. Vera Lúcia Ramos Bononi, à doutorada Luci Kimie Okino Silva e Dra. Ana Cristina Bolaños pelo carinho, apoio e paciência sem fim, além da amizade sincera que atravessa, e ainda atravessará, décadas em nossas vidas; à Universidade Federal do ABC, seus técnicos, pesquisadores e alunos de iniciação científica, pelo acolhimento, e à Dra. Elizabete Campos de Lima por ter participado do meu processo de amadurecimento acadêmico; ao SENAI unidade Francisco Matarazzo, em especial ao Professor Dr. Jorge Marcos Rosa e ao Programa de Apoio à Pesquisa SENAI.

Aos meus “ajudantes” Mariana Haruca Silva e Eduardo Ballaminut da Silva, que possibilitaram a finalização de cada dia de trabalho duro, com um enorme sorriso de satisfação. Ao meu amigo Alex Almeida Alcântara, que sempre fez todo o possível para que minha estadia no Laboratório de Micologia Aplicada fosse sempre uma grande alegria.

Agradeço ainda à Vera Vitali, pelo companheirismo e confiança, além das inúmeras vezes em que esteve presente em minha vida, trazendo força e acalento; ao Dácio pela amizade “paternal” que possibilitou minha evolução profissional; ao meu filhote Iago Ballaminut da Silva, que é e sempre será a razão do meu viver; à minha mãe Arlete Gomes Ballaminut, que mesmo na hora em que eu quis desistir de tudo, não deixou de acreditar no meu sucesso; aos meus filhos Iago e Letícia pela ajuda prontamente disposta nas noites em que me ajudaram, incansavelmente, a organizar meus dados brutos; e, por fim, à minha neta Maria Clara, que renova minha fé na vida todos os dias da minha existência.

Ao Eduardo, meu amigo e companheiro, marido muito amado, meu muito obrigada por estar comigo sempre, apoiando e acreditando em mim, em todos os momentos, mesmo quando eu pensei que não seria possível continuar.

Obrigada a todos que facilitaram meu caminho nessa jornada tão cheia de tropeços e dificuldades, todos aqueles que, de forma direta ou indireta, possibilitam a realização da pesquisa científica nesse país.

RESUMO

BALLAMINUT, N. **Caracterização do processo de descoloração de corante reativo diazo por basidiomicetos tropicais.** 2016. 175 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2016.

Corantes reativos têxteis, conhecidos por sua recalcitrância, podem ser degradados pelo mecanismo ligninolítico de basidiomicetos, constituído por enzimas oxidativas e hidrolíticas, e ainda compostos de baixa massa molar, embora a ação desses últimos venha sendo negligenciada em estudos de degradação. Foi nesse contexto que foi avaliada a biodegradação de CI Reactive Blue 222 por *Peniophora cinerea* CCIBt 2541, *Pleurotus ostreatus* CCIBt 2347 e *Trametes villosa* CCIBt 2628, selecionando condições ótimas para maximizar a eficiência do processo. Foram definidas concentrações ótimas de cobre e manganês, além de fonte conhecida de ácidos graxos insaturados, adicionados ao cultivo fúngico. *P. ostreatus* foi mais eficiente na descoloração quando cultivos de 25 dias, contendo 0,446 mM de sulfato de cobre e 0,821 mM de sulfato de manganês, sem adição de ácido graxo insaturado foram empregados. *T. villosa* também mostrou máxima eficiência com cultivos de 25 dias, contendo 1 mM de sulfato de cobre e de manganês, na presença de 3,75% de fonte de ácido graxo insaturado. Já *P. cinerea* foi mais eficiente quando cultivos com 18 dias, contendo 1 mM de sulfato de cobre, 0,106 mM de sulfato de manganês e 4% de fonte de ácido graxo insaturado foram empregados. Foi avaliada ainda a ação dos sistemas mediados por lacase-ABTS, lacase-RBBR e lacase-ABTS-RBBR na descoloração empregando os três basidiomicetos, em tratamentos individuais, onde a presença desses mediadores no efluente sintético favoreceu a descoloração, quando 2mM de ABTS estavam presentes, para qualquer um dos basidiomicetos estudados, embora RBBR influenciou positivamente apenas os tratamentos com *P. ostreatus* e *P. cinerea*, sendo ótima a concentração de 0,2 μ M para esse mediador. Contudo, é importante ressaltar que o processo é dinâmico, ficando sugerido que são necessárias intervenções sucessivas para maximizar a eficiência do processo, em suas diferentes fases. A degradação foi confirmada por cromatografia de camada delgada e testes de descoloração com inibição seletiva das principais enzimas mostraram que os mecanismos ligninolíticos funcionam diferentemente, de acordo com cada espécie estudada. A partir da interpretação dos resultados foi sugerido que as lacases de *P. ostreatus* oxidam o grupo cromóforo azo, ligado ao radical fenólico da molécula do corante nas primeiras 24 horas, concomitantemente à ação não enzimática de hidroxilação. Já as lacases de *P. cinerea*, capazes de oxidar Mn^{+2} e quinona, possibilitam a via de Fenton, hidroxilando assim a molécula do corante, paulatinamente, a partir das ligações mais vulneráveis. *T. villosa* inicia a descoloração fazendo uso de um mecanismo prioritariamente envolvendo a via de Fenton, promovendo a hidroxilação gradativa da molécula do corante. Conclui-se que embora a maioria de estudos desse tipo foquem na produção enzimática, associando-as à descoloração, a participação dos compostos de baixa massa molar não pode ser negligenciada, uma vez que processos *in vivo* fazem uso de componentes enzimáticos e não enzimáticos, simultaneamente, para efetivar a degradação de poluentes.

Palavras-chave: Biodegradação. Enzimas ligninolíticas. Quelantes e redutores de ferro. Via metabólica. Compostos de baixa massa molar.

ABSTRACT

BALLAMINUT, N. **Characterization of reactive disazo dye decolorization by tropical basidiomycetes.** 2016. 175 p. Thesis (Ph. D. Thesis in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Reactive textile dyes are known for their recalcitrance, can be degraded by ligninolytic mechanism of basidiomycetes, comprising oxidative and hydrolytic enzymes, as well as low molecular weight compounds, although the action of the latter have been neglected in degradation studies. In this context that was evaluated the CI Reactive Blue 222 decolorization by *Peniophora cinerea* CCIBt 2541, *Pleurotus ostreatus* CCIBt 2347 and *Trametes villosa* CCIBt 2628, selecting optimal conditions to maximize process efficiency. Copper and manganese concentrations were defined, in addition was defined a known source of unsaturated fatty acids, added into the fungal culture. *P. ostreatus* was more efficient in the decolorization when 25-day cultures, containing 0.446 mM copper sulphate and 0.821 mM manganese sulphate, without the addition of unsaturated fatty acid, were employed. *T. villosa* also showed maximum efficiency with 25-day cultures, containing 1 mM copper and manganese sulphate, in the presence of 3.75% unsaturated fatty acid source. *P. cinerea* was more efficient when cultures with 18-day cultures, containing 1 mM of copper sulphate, 0.106 mM of manganese sulphate and 4% of unsaturated fatty acid source were used. It was evaluated the action of laccase mediated systems, laccase-ABTS, laccase-RBBR, and laccase-ABTS-RBBR in decolorization employing the basidiomycetes mentioned, in individual treatments, where the presence of these mediators in the synthetic effluent favoured the decolorization, when 2 mM ABTS were present, for any of the basidiomycetes studied, although RBBR influenced positively only the treatments with *P. ostreatus* and *P. cinerea*, being optimal 0.2 μ M for this mediator. However, it is important to emphasize that the process is dynamic, and it is suggested that successive interventions are necessary to maximize the efficiency of the process, in its different phases. The degradation was confirmed by thin layer chromatography and the selective decolorization with inhibition tests of the main enzymes showed that the ligninolytic mechanisms function differently, according to each species studied. From the interpretation of the results, it was suggested that *P. ostreatus* laccases oxidize the azo chromophore group, linked to the phenolic radical of the dye molecule in the first 24 hours, concomitantly with the non-enzymatic action of hydroxylation. The *P. cinerea* laccases, capable of oxidizing Mn^{+2} and quinone, enable the Fenton pathway, thus hydrolysing the dye molecule, gradually, from the most vulnerable linkages. *T. villosa* initiates decolorization using a mechanism primarily involving the Fenton pathway, promoting the gradual hydroxylation of the dye molecule. Concludes that although most such studies focus on enzyme production, associating these with the decolorization, the share of low molecular weight compounds cannot be neglected, since *in vivo* processes make use of enzymatic and non-enzymatic components, simultaneously, to effect the pollutant degradation.

Keywords: Biodegradation. Ligninolytic enzymes. Iron chelators and reducers. Metabolic pathway. Low molecular weight compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química de CI Reactive Blue 222.....	34
Figura 2 - Biomassa de <i>Pleurotus ostreatus</i> monitorada durante contato <i>in vivo</i> com RB222 (●) e no cultivo sem corante (○).....	52
Figura 3 - (A) pH dos sistemas com <i>Pleurotus ostreatus</i> CCIBt 2347 e corante (▲) e sem corante (Δ); (B) sistemas com corante em água (○) e em meio basal (●), ambos sem fungo.....	53
Figura 4 - Descoloração do RB222 a 610 nm durante tratamento <i>in vivo</i> por <i>Pleurotus ostreatus</i> CCIBt 2347 (▲), nos seus controles abióticos com corante em água (○) e em meio basal (●).....	55
Figura 5 - Sistemas de tratamento de CI Reactive Blue 222 por <i>Pleurotus ostreatus</i> CCIBt 2347, onde (A) controle abiótico no tempo inicial e (B) sistemas com fungo e corante após 6 horas, (C) após 12 horas e (D) após 24 horas de contato.....	56
Figura 6 - Espectros de absorção de RB222 tratado com <i>Pleurotus ostreatus</i> CCIBt 2347e seus controles abióticos.....	56
Figura 7 - Curva – concentração de RB222 <i>versus</i> absorbância a 526 nm.....	57
Figura 8 - Biomassa seca por litro de cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> CCIBt 2347 (■), <i>Peniophora cinerea</i> CCIBt 2541 (□) e <i>Trametes villosa</i> CCIBt 2628 (■).....	58
Figura 9 - Espectros de absorção da fase líquida dos tratamentos de RB222 com <i>Pleurotus ostreatus</i> CCIBt 2347.....	76
Figura 10 - Descoloração de RB222, a 526 nm e 610 nm, e atividades enzimáticas produzidas por <i>Pleurotus ostreatus</i> CCIBt 2347 <i>in vivo</i> na presença de inibidores enzimáticos.....	87
Figura 11 - Descoloração de RB222, a 526 nm e 610 nm, e atividades enzimáticas produzidas por <i>Peniophora cinerea</i> CCIBt 2541 <i>in vivo</i> na presença de inibidores enzimáticos.....	88
Figura 12 - Descoloração de RB222, a 526 nm e 610 nm, e atividades enzimáticas e produzidas por <i>Trametes villosa</i> CCIBt 2628 <i>in vivo</i> na presença de inibidores enzimáticos.....	89
Figura 13 - Fase líquida dos tratamentos após 48 horas de contato <i>in vivo</i> com basidiomicetos.....	90
Figura 14 - Placa de cromatografia de camada delgada dos tratamentos com <i>Peniophora cinerea</i> CCIBt 2541, sob luz ultravioleta a 365 nm.....	91
Figura 15 - Placas de cromatografia de camada delgada dos tratamentos com <i>Pleurotus ostreatus</i> CCIBt 2347 (à esquerda) e <i>Trametes villosa</i> CCIBt 2628 (à direita), sob luz ultravioleta a 365 nm.....	92
Figura 16 - Possíveis metabólitos da degradação de RB222 após tratamentos com basidiomicetos. Metaprint2D.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Algumas das principais técnicas físico-químicas de tratamento de efluentes têxteis, coloridos por corantes orgânicos e suas limitações.	22
Tabela 2 - Variáveis avaliadas por DCCR 2 ³ para avaliação de concentrações de sulfato de cobre e sulfato de manganês, no meio de cultivo de basidiomicetos, e do tempo de incubação do cultivo desses fungos para descoloração de RB222.....	41
Tabela 3 - Bloco experimental DCCR 2 ³ para avaliação das variáveis: concentrações de sulfato de cobre e de sulfato de manganês no meio, e idade fisiológica do cultivo.	42
Tabela 4 - Variáveis avaliadas por DCCR 2 ³ para diferentes concentrações da fonte de ácido graxo, no meio de cultivo, e dos mediadores das atividades enzimáticas, ABTS e RBBR, nos tratamentos de descoloração <i>in vivo</i> de RB222 por <i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Peniophora cinerea</i>	44
Tabela 5 - Variáveis avaliadas por DCCR 2 ⁴ para diferentes concentrações da fonte de ácido graxo, no meio de cultivo, e dos mediadores das atividades enzimáticas, ABTS e RBBR, nos tratamentos de descoloração <i>in vivo</i> de RB222 por <i>Trametes villosa</i>	44
Tabela 6 - Bloco experimental DCCR 2 ³ para avaliação das variáveis: concentrações de ABTS, RBBR e da fonte de ácido graxo.	45
Tabela 7 - Bloco experimental DCCR 2 ⁴ para avaliação das variáveis: concentrações de ABTS, RBBR, da fonte de ácido graxo e de MnSO ₄	46
Tabela 8 - Sais e nutrientes constituintes do meio líquido, utilizado para cultivo de basidiomicetos a serem empregados em tratamentos de descoloração de RB222 <i>in vivo</i>	48
Tabela 9 - Atividades enzimáticas (U/L) produzidas por <i>Pleurotus ostreatus</i> CCIBt 2347 durante contato <i>in vivo</i> com RB222.	54
Tabela 10 - Descoloração <i>in vitro</i> de RB222 por extrato bruto de basidiomicetos com diferentes idades fisiológicas, em diferentes concentrações de corante.	59
Tabela 11 - Atividades enzimáticas produzidas por basidiomicetos, durante cultivo líquido em meio enriquecido, para aplicação na descoloração <i>in vitro</i>	62
Tabela 12 - Correlação entre atividades enzimáticas nos extratos brutos de basidiomicetos e descoloração <i>in vitro</i> de RB222, por grama de biomassa seca, durante cultivo líquido.	64
Tabela 13 - Descoloração a 610nm e atividades enzimáticas produzidas pelos tratamentos avaliados empregando <i>Pleurotus ostreatus</i> CCIBt 2347, apresentados com os fatores não codificados e codificados (entre parênteses).	65
Tabela 14 - Coeficiente de regressão para descoloração a 610 nm, atividade de fenoloxidasas, de lacase e MnP de <i>Pleurotus ostreatus</i> CCIBt 2347.	66
Tabela 15 - Valores estimados para a descoloração a 610 nm <i>in vivo</i> de RB222 e lacase produzida por <i>Pleurotus ostreatus</i> CCIBt 2347 durante contato <i>in vivo</i>	67
Tabela 16 - Descoloração a 610 nm e atividades enzimáticas produzidas pelos tratamentos com <i>Trametes villosa</i> CCIBt 2628, apresentados com os fatores não codificados e codificados (entre parênteses).	69
Tabela 17 - Coeficiente de regressão para descoloração a 610 nm, atividade de fenoloxidasas, de lacase e de MnP produzidas por <i>Trametes villosa</i> CCIBt 2628.	70
Tabela 18 - Descoloração a 610 nm e atividades enzimáticas produzidas pelos tratamentos com <i>Peniophora cinerea</i> CCIBt 2541, apresentados com os fatores não codificados e codificados (entre parênteses).	71
Tabela 19 - Coeficiente de regressão para descoloração a 610 nm, atividade de fenoloxidasas, de lacase e MnP produzidas por <i>Peniophora cinerea</i> CCIBt 2541.	72
Tabela 20 - Descoloração e atividades enzimáticas (U/L.dia ⁻¹) produzidas por <i>Pleurotus ostreatus</i> CCIBt 2347, seus fatores não codificados e codificados (entre parênteses). Áreas em destaque representam maiores valores.	75
Tabela 21 - Coeficiente de regressão para descoloração a 610 nm e atividades enzimáticas para <i>Pleurotus ostreatus</i> CCIBt 2347.	77
Tabela 22 - Descoloração a 610 nm, fenoloxidasas e MnP estimados para sistemas de tratamento com <i>Pleurotus ostreatus</i> CCIBt 2347 com 24 horas de contato <i>in vivo</i>	78
Tabela 23 - Descoloração a 610 nm, fenoloxidasas e MnP estimados para sistemas de tratamento com <i>Pleurotus ostreatus</i> CCIBt 2347 com 48 horas de contato <i>in vivo</i>	79
Tabela 24 - Descoloração e atividades enzimáticas (U/L . dia ⁻¹) produzidas por <i>Peniophora cinerea</i> CCIBt 2541, com seus fatores não codificados e codificados (entre parênteses). Áreas em destaque representam maiores valores.	81

Tabela 25 - Descoloração e atividades enzimáticas produzidas por <i>Trametes villosa</i> CCIBt 2628, com seus fatores não codificados e codificados (entre parênteses). Áreas em destaque representam maiores valores.	83
Tabela 26 - Coeficiente de regressão para descoloração a 526 nm e lacases de <i>Trametes villosa</i> CCIBt 2347 em 24 horas de contato <i>in vivo</i>	84
Tabela 27 - Dados estimados para descoloração a 526 nm e produção de lacase por <i>Trametes villosa</i> CCIBt 2628 após 24 horas de contato <i>in vivo</i>	85
Tabela 28 - Compostos de baixa massa molar no extrato bruto do cultivo de basidiomicetos antes do contato <i>in vivo</i> com RB222.	92
Tabela 29 - Coeficiente Pearson de correlação entre as atividades enzimáticas e a descoloração, e entre os CBMM e a descoloração, em 610 nm e 526 nm.	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS - 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonato)

ATD - Atividade Total de Descoloração

BDA - Batata Dextrose Agar

CAS - Cromo Azurol S

CBMM - Compostos de Baixa Massa Molar

CCIBt - Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica da
Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo

CI - Colour Index

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DCCR - Delineamento Central Composto Rotacional

HBT - Hidroxibenzotriazol

HDTMA - Brometo de Hexa-eciltrimetilamônio

LiP - Lignina Peroxidase

MB - Meio Basal

MnP - Peroxidase dependente do Manganês

RB222 – CI Reactive Blue 222

RBBR - Remazol Brilliant Blue R (CI Reactive Blue 19)

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

TLC - Thin Layer Chromatography (Cromatografia de Camada Delgada)

VP - Peroxidase versátil

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 <i>Corantes têxteis.....</i>	<i>16</i>
1.1.1 <i>Estrutura molecular do corante</i>	<i>16</i>
1.1.2 <i>Classificação</i>	<i>17</i>
1.1.3 <i>Fibras têxteis e modo de fixação do corante</i>	<i>17</i>
1.1.4 <i>Classes dos corantes.....</i>	<i>18</i>
1.1.4.1. <i>Corantes reativos.....</i>	<i>19</i>
1.1.4.1.1. <i>Corantes azo</i>	<i>20</i>
1.2. <i>Efluentes têxteis: características e tratamento</i>	<i>21</i>
1.3. <i>Biodegradação de corantes.....</i>	<i>23</i>
1.3.4. <i>Fungos ligninolíticos</i>	<i>23</i>
1.3.5. <i>Mecanismo ligninolítico dos basidiomicetos</i>	<i>23</i>
1.3.5.1. <i>Peroxidação lipídica e reação de Fenton</i>	<i>26</i>
1.3.5.2. <i>Compostos de Baixa Massa Molar</i>	<i>26</i>
1.4. <i>Fatores importantes de tratamentos de descoloração empregando basidiomicetos</i>	<i>28</i>
1.4.4. <i>Os gêneros de basidiomicetos: Pleurotus, Peniophora e Trametes</i>	<i>30</i>
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. <i>Experimento 1 - Crescimento fúngico, tamponamento do meio e atividades enzimáticas ligninolíticas durante descoloração de RB222 por Pleurotus ostreatus</i>	<i>36</i>
3.1.1. <i>Sistemas de cultivo</i>	<i>36</i>
3.1.2. <i>Sistema de tratamento</i>	<i>36</i>
3.1.2.1. <i>Parâmetros avaliados</i>	<i>36</i>
3.1.2.1.1. <i>Biomassa</i>	<i>37</i>
3.1.2.1.2. <i>pH.....</i>	<i>37</i>
3.1.2.1.3. <i>Atividades enzimáticas</i>	<i>37</i>
3.1.2.1.4. <i>Descoloração</i>	<i>38</i>
3.1.3. <i>Coefficiente de Extinção Molar (ϵ) de RB222 em 526nm</i>	<i>38</i>
3.2. <i>Experimento 2 - Influência da idade fisiológica de basidiomicetos e da concentração de RB222 na descoloração</i>	<i>39</i>
3.2.1. <i>Obtenção do extrato enzimático</i>	<i>39</i>
3.2.2. <i>Parâmetros avaliados.....</i>	<i>40</i>
3.2.2.1. <i>pH.....</i>	<i>40</i>
3.2.2.2. <i>Biomassa</i>	<i>40</i>
3.2.2.3. <i>Determinações enzimáticas</i>	<i>40</i>
3.2.2.3.1. <i>Atividade Ligninolítica Total in vitro.....</i>	<i>40</i>
3.3. <i>Experimento 3: Efeito da concentração de cobre e manganês, no meio de cultivo, e da idade fisiológica do cultivo na descoloração in vivo de RB222 por basidiomicetos</i>	<i>41</i>
3.3.1. <i>Delineamento experimental.....</i>	<i>41</i>
3.3.2. <i>Inóculo.....</i>	<i>42</i>

3.3.3.	<i>Sistema de cultivo</i>	42
3.3.4.	<i>Sistema de tratamento</i>	43
3.3.4.1.	Parâmetros avaliados	43
3.4.	Experimento 4: Influência de diferentes concentrações de fonte de ácido graxo conhecida e de dois mediadores do sistema enzimático ligninolítico na descoloração in vivo de RB222 por basidiomicetos	43
3.4.1.	<i>Inóculo</i>	46
3.4.2.	<i>Sistema de cultivo</i>	46
3.4.3.	<i>Sistema de tratamento</i>	47
3.4.3.1.	Parâmetros avaliados	47
3.5.	Experimento 5: Caracterização do processo de descoloração de RB222 por basidiomicetos	47
3.5.1.	<i>Sistema de cultivo</i>	47
3.5.2.	<i>Sistema de tratamento</i>	48
3.5.2.1.	Parâmetros avaliados	48
3.5.2.1.1.	Atividades enzimáticas	49
3.5.2.1.2.	Compostos de Baixa Massa Molar (CBMM)	49
3.5.2.1.3.	Teste de inibição enzimática.....	50
3.5.2.1.4.	Descoloração	50
3.5.2.1.5.	Deteção de metabólitos por cromatografia de camada delgada (Thin Layer Chromatography – TLC)	51
3.5.3.	<i>Previsão de metabólitos</i>	51
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
4.1.	Experimento 1	52
4.2.	Experimento 2	58
4.3.	Experimento 3	65
4.4.	Experimento 4	74
4.5.	Experimento 5	86
5.	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	101
	APÊNDICES	116
	Apêndice A – Análise estatística item 4.1	117
	Apêndice B – Análise estatística item 4.2	120
	Apêndice C – Análise estatística item 4.3	132
	Apêndice D – Análise estatística item 4.4	143
	Apêndice E – Análise estatística item 4.5	167

1 INTRODUÇÃO

Dentre as inúmeras atividades impactantes, atualmente conhecidas, o tratamento de efluentes é um dos principais desafios enfrentados pela gestão ambiental. A indústria têxtil emprega principalmente corantes, e a presença desses compostos nos efluentes finais está entre os problemas mais complexos enfrentados pelo setor têxtil.

1.1 Corantes têxteis

Corantes têxteis existem no mercado em extensa variedade de tipos e classes, sendo inicialmente classificados de acordo com sua natureza e origem, como: corantes naturais, aqueles que são extraídos de fonte animais e vegetais, e sintéticos. Esses últimos surgiram na segunda metade do século XIX, iniciando pela anilina, seguida por alguns corantes azo sintetizados por diazonização. Os corantes sintéticos são produzidos pela síntese química de aromáticos e possuem, dentro de suas estruturas, anéis aromáticos que contêm elétrons deslocados, além de diferentes grupos funcionais (KYZAS et al., 2013; POLAK; JAROSZ-WILKOLAZKA, 2012; ZAHARIA; SUTEU, 2012).

1.1.1 Estrutura molecular do corante

Segundo Ali (2010), desde o século XIX, mais de 100.000 diferentes corantes foram produzidos ao redor do mundo, com uma produção anual de cerca de 700.000 toneladas métricas. A cor desses compostos é devida à sua estrutura insaturada denominada cromogene-cromóforo, considerada como o aceptor de elétrons, e sua capacidade de coloração é devida ao grupo auxócromo, considerado como doador de elétrons. Essas estruturas são os componentes mais importantes da molécula do corante. O cromogene é constituído de uma estrutura aromática, geralmente baseada em anéis de benzeno, naftaleno ou antraceno, que são ligados aos cromóforos, os quais contêm ligações duplas conjugadas com os elétrons deslocados e, frequentemente, contêm heteroátomos (nitrogênio, enxofre e oxigênio) com elétrons não ligados. Os grupos auxócromos são ionizáveis, o que confere aos corantes a capacidade de ligação química com o material têxtil (ALI, 2010; KYZAS et al., 2013; ZAHARIA; SUTEU, 2012).

A configuração dos cromóforos é representada por grupos azo ($-N=N-$), azoxila ($-N=N^+-O^-$); azoamino ($-N=N-NH$); etileno ($=C=C=$), azometino ($-C=NH$, $-C=N-$); metino ($-CH=$), carbonil ($=C=O$), carbono-nitrogênio ($=C=NH$; $-CH=N-$), carbono-enxofre ($=C=S$; $\equiv CS-$; S-

C $\equiv$), nitro (-NO₂; -NO-OH) e nitroso (-N=O; =N-OH). Os grupos mais comuns de auxóchromos são os amino (-NH₂), metilamino (-NHCH₃); dimetilamino (-N(CH₃)₂); ácido sulfônico (-SO₃H); ácido carboxílico (-COOH); cloro (-Cl); metila (-CH₃); metoxila (-OCH₃); carboxila (-COOH), ciano (CN); acetila (-COCH₃); amido (-CONH₂); e hidroxila (-OH) (KYZAS et al., 2013; SARAYU; SANDHYA, 2012; ZAHARIA; SUTEU, 2012).

1.1.2 Classificação

Os corantes orgânicos são classificados, principalmente, *i)* com base na estrutura química do composto colorante, bem como *ii)* pelas características de uso e suas aplicações à fibra, sendo essa última a classificação adotada pelo Colour Index (CI) e formalmente adotada em estudos de pesquisa (GUARATINI; ZANONI, 2000; KYZAS et al., 2013; ZAHARIA; SUTEU, 2012).

1.1.3 Fibras têxteis e modo de fixação do corante

As fibras têxteis estão divididas em dois grandes grupos, as *i)* fibras naturais, de constituição baseada em cadeias poliméricas lineares de glucose (celulose) e em polímeros complexos compostos de diferentes aminoácidos (proteína), presentes na lã, seda, algodão e linho; e as *ii)* sintéticas, compostas por xantato de celulose (viscose), acetato de celulose extraído da madeira, condensado de ácido adípico e hexametileno diamina (poliamida), polímero de ácido tereftálico e etilenoglicos (poliéster) e polímero de acrilonitrila (acrílico) (GUARATINI; ZANONI, 2000; KYZAS et al., 2013; ZAHARIA; SUTEU, 2012).

A fixação do corante às essas fibras é feita geralmente em meio aquoso, envolvendo quatro tipos de interações. Em geral, as fibras têxteis podem atrair corantes para suas estruturas como resultado da força de Van der Waals, das ligações de hidrogênio e de interações hidrofóbicas, que são características da adsorção física. Especificamente as interações *i)* iônicas promovem coloração baseada em interações entre os centros positivos dos grupos amino e carboxilato presentes na fibra e a carga iônica da molécula do corante, e vice-versa. Comuns a tintura de lã, seda e poliamida. As interações de *ii)* Van der Waals apresentam colorações baseadas na aproximação máxima entre orbitais π das moléculas do corante e da fibra, ancorando firmemente a molécula do corante à fibra, sem formação de ligação propriamente dita. Características da tintura de lã e poliéster. As interações *iii)* de hidrogênio mostram coloração proveniente da ligação entre átomos de hidrogênio, covalentemente ligados no corante, com pares de elétrons livres de átomos doadores, presentes na fibra, coloração

característica de fibras acrílicas. Finalmente, a interação mais forte corante-fibra é aquela que resulta da *iv*) ligação covalente, com interação eletrostática entre o grupo reativo do corante (eletrofílico) e resíduos nucleofílicos da fibra, de cargas opostas. Tal tipo de coloração é considerada como quimiosorção, característica da tintura de fibra de algodão (GUARATINI; ZANONI, 2000; KYZAS et al., 2013; ZAHARIA; SUTEU, 2012).

1.1.4 Classes dos corantes

A classificação dos corantes, de acordo com o Colour Index, está representada pelas seguintes classes:

- a) diretos: esses corantes são solúveis em água na presença de eletrólitos, além de apresentar alta afinidade com fibras de celulose, formando interações Van der Waals com esse tipo de fibra. A maioria dos corantes dessa classe são poliazos;
- b) dispersos: são corantes insolúveis em água, aplicados em fibras hidrofóbicas, tais como poliéster, poliamida, poliacrilonitrila, polipropileno, acetato, e fibras acrílicas. Quimicamente esses corantes são predominantemente azo e antraquinônicos, tendo baixo peso molecular e contendo nitrobenzenosulfonato, que auxiliam na formação de dispersões aquosas estáveis;
- c) à cuba: são corantes insolúveis em água, mas podem ser aplicados, principalmente em fibras de celulose, convertendo-se para sua forma leuco. Em seguida, sofrem oxirredução e são solubilizados para recuperar a forma original do corante sobre a fibra. Tal processo é chamado de processo à cuba. São em sua maioria antraquinônicos e indigóides;
- d) de enxofre: são compostos insolúveis em água, que são aplicados na forma de sais de sódio por processo de redução utilizando sulfeto de sódio (Na_2S) como agente redutor, sob condições alcalinas. Após a aplicação, caracterizam-se por compostos macromoleculares contendo pontes polissulfeto ($-\text{S}_n^-$);
- e) básicos: são catiônicos e solúveis em água. São utilizados quando o brilho é mais necessário do que a resistência à luz e à lavagem;
- f) ácidos: são aniônicos e contêm grupos sulfônicos, o que os torna solúveis em água. Na coloração o corante é previamente neutralizado e se liga à fibra por meio de troca iônica, envolvendo o par de elétrons livres dos grupos amino e carboxilato da fibra protéica, na forma protonada;

- g) reativos: são corantes que formam ligações químicas covalentes com os grupos hidroxila das fibras celulósicas, com os grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas, bem como com os grupos amino das poliamidas. Os principais corantes reativos contêm grupo azo e antraquinona, como cromóforos, e clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila, como grupos reativos.

Apesar da classificação formal adotada pelo Colour Index, pode-se ainda dividir os corantes têxteis considerando apenas a estrutura geral, como aniônicos, não iônicos e catiônicos (GUARATINI; ZANONI, 2000; KYZAS et al., 2013; ZAHARIA; SUTEU, 2012).

1.1.4.1. Corantes reativos

Dentre os vários tipos de corantes têxteis existentes, a classe dos reativos apresenta aplicação expressiva no mercado mundial, devido principalmente à ampla gama de tonalidades de cores, facilidade de aplicação e baixo consumo de energia no processo. De forma semelhante, a indústria têxtil brasileira emprega, predominantemente, corantes reativos para fibras celulósicas, que respondem por 57 % do mercado (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA, 2016).

Estruturalmente, a maioria dos corantes reativos contém grupamentos azo e antraquinônicos. Funcionalmente, esses corantes formam ligação química covalente com a fibra têxtil, o que proporciona estabilidade química para o tingimento. No entanto, os corantes reativos estão dentre os principais corantes aniônicos, que correspondem também aos mais problemáticos, por serem altamente solúveis em água e não serem removidos pelo tratamento convencional dos efluentes têxteis (KYZAS et al., 2013; PEREIRA; ALVES, 2012; ZAHARIA; SUTEU, 2012).

Os corantes reativos possuem estrutura geral composta por um grupo reativo eletrofílico, os quais contêm um grupo de saída nucleófilo (grupo de saída que leva embora o par de elétrons de ligação) e um grupo de ligação. O grupo cromóforo e os grupos de solubilização em água estão ligados em sequência a partir do grupo de ligação. Alguns corantes que contêm dois ou mais grupos reativos são denominados bifuncionais, podendo ser iguais (homofuncionais) ou diferentes (heterofuncionais), conferindo à molécula a capacidade de coesão, uma vez que quanto maior a diversidade desses grupos reativos em uma molécula, mais recalcitrante esta se torna. Os grupos reativos podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de fixação. São eles: *a)* substituição nucleofílica heteroaromática, onde um grupo funcional nucleofílico ionizado da fibra é transferido para o centro eletrofílico do centro do grupo reativo; *b)* adição

nucleofílica, que ocorre quando é eliminado o grupo nucleofílico do grupo reativo da molécula, seguido pela adição de um grupo funcional da fibra têxtil; e c) formação de fosfonato, caracterizada pela formação de um éster entre a função nucleofílica da fibra e um fósforo-grupo ligado a um carbono aromático ou alifático do corante (GUARATINI; ZANONI, 2000; KYZAS et al., 2013; ZAHARIA; SUTEU, 2012; ZOLLINGER, 2003).

Os corantes reativos podem conter função sulfoxietilsulfonil, as quais formam grupos vinil-sulfona ($-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), que durante o tingimento se ligam à fibra têxtil. Embora essas ligações já estejam formadas, o grupo vinil-sulfona sofre hidrólise espontânea e, como os produtos dessa hidrólise não apresentam qualquer afinidade com as fibras, não formam ligação covalente, ficando dissolvidos no efluente de saída dessa etapa do processo (GUARATINI; ZANONI, 2000; KYZAS et al., 2013; ZAHARIA; SUTEU, 2012). Ainda segundo Zollinger (2003) cerca de 80% dos corantes reativos são azo. Afirmação confirmada por Zaharia e Suteu (2012) onze anos mais tarde, incluindo ainda dentro dessa classe os ftalocianina, formazan e antraquinônicos.

1.1.4.1.1. Corantes azo

Metade dos corantes sintéticos conhecidos são azo, que são compostos contendo grupo azo ($-\text{N}=\text{N}-$), com alta polaridade e recalcitrância, caracterizados por propriedades anfotéricas, quando suas moléculas contêm grupos ácidos adicionais (hidroxila, carboxila ou sulfoxila). Tais compostos aceitam prótons para o par de elétrons do nitrogênio, e ainda esses mesmos elétrons interagem com o sistema π -orbital deslocado. O aceptor substituinte do anel aromático ($-\text{Cl}$ ou $-\text{NO}_2$) causa decréscimo no caráter básico dos grupos amino. Já os grupos doadores ($-\text{CH}_3$ ou $-\text{OR}$), nas posições *meta* e *para*, levam a um aumento da basicidade em grupos amínicos, embora doadores substituintes na posição *orto* podem impedir a protonação e, consequentemente, diminuir a basicidade dos grupos amínicos. A presença de grupos amino na molécula aumenta o ponto de ebulição e sua solubilidade em água (GUARATINI; ZANONI, 2000; KYZAS et al., 2013; ZAHARIA; SUTEU, 2012).

Dependendo do valor de pH, o corante azo pode ser aniônico, por consequência da desprotonação do grupo ácido, pode ser catiônico, por consequência da protonação do grupo amino, ou ainda não iônico (GUARATINI; ZANONI, 2000; KYZAS et al., 2013; ZAHARIA; SUTEU, 2012).

1.2. Efluentes têxteis: características e tratamento

A descarga de efluentes coloridos no ambiente, além de indesejável, é proibida em território nacional e regulamentada pela Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente nº 357, de 17 de março de 2005, não só pela presença de cor, mas também porque muitos dos corantes liberados, e seus produtos de degradação são tóxicos, carcinogênicos ou até mesmo mutagênicos. Além disso, sem o tratamento adequado, estes compostos podem permanecer no ambiente por longos períodos, acarretando ainda mais problemas ao ambiente (AGUIAR; FERRAZ, 2011; GUARATINI; ZANONI, 2000; KUNZ et al., 2002; ZAHARIA; SUTEU, 2012).

Os efluentes altamente coloridos ou efluentes contendo corantes têm sido identificados especialmente pelo banho de tingimento de fibras de celulose, perfazendo, apenas o algodão, o equivalente a 50 % do mercado mundial de fibras celulósicas. Em particular, com uso de corantes reativos nos banhos de tingimento observa-se perdas para o efluente de 10 a 50 %, levando para o setor industrial a preocupação com as questões ambientais associadas com teor de corante residual ou a cor residual nos efluentes têxteis tratados. Assim sendo, os corantes orgânicos têxteis devem ser separados e eliminados da água residuária, por meio de métodos eficazes e viáveis, em estações de tratamento de esgoto municipal ou na própria planta industrial, após atender dois conceitos básicos do tratamento: *i*) separação de poluentes orgânicos de fase líquida do efluente, e *ii*) retirada e mineralização ou decomposição desses poluentes orgânicos, de forma parcial ou completa (ZAHARIA; SUTEU, 2012).

Processos de separação tem base na mecânica dos fluídos (sedimentação, centrifugação, filtração e flutuação) ou nas membranas sintéticas (micro, ultra e nanofiltração, osmose reversa). Adicionalmente, processos físico-químicos, tais como adsorção, precipitação química e coagulação-floculação, podem ser usados para separar o dissolvido ou emulsionado (CHEQUER et al., 2013; ZAHARIA; SUTEU, 2012). Outras diferentes técnicas para o tratamento físico e químico desses efluentes foram desenvolvidas, sendo objeto de estudo de recentes pesquisas, que buscam a remoção dos corantes desses resíduos líquidos (ARGUN et al., 2013; EL-GHENYMY et al., 2014; FERNADES RÊGO et al., 2014; FERNANDEZ et al., 2010; FERNANDO et al., 2014; HASSAN; HAMEED, 2011; KAVITHA et al., 2014; LAU et al., 2014; MOREIRA et al., 2013; NABIL et al., 2013; PAJOOTAN et al., 2014; SIDDIQUE et al., 2013; THOMAS et al., 2014; WENG et al., 2013).

Esses processos foram classificados por Fernández e colaboradores. (2010) em *i*) não-destrutivos, constituído por todos aqueles que apenas transferem o poluente de fase, sem

destruí-lo (adsorção, sedimentação, filtração, coagulação e eletrocoagulação) e *ii*) destrutivos, composto pelas técnicas que destroem a molécula do poluente, por biodegradação ou por processos oxidativos avançados. Ainda outras revisões, como Chacko e Subramanian (2011) e Zaharia e Suteu (2012), apresentam resumidamente os tratamentos mais empregados, suas vantagens e desvantagens, apresentados na **Tabela 1**, com destaque para as limitações de cada tratamento físico-químico.

Tabela 1 - Algumas das principais técnicas físico-químicas de tratamento de efluentes têxteis, coloridos por corantes orgânicos e suas limitações.

Tratamento	Limitações
Precipitação, coagulação-floculação	Separação e tratamento de aglomerados; condição seletiva de operações
Coagulação eletrocinética	Grande produção de lodo
Processo de Fenton	Geração de lodo; problemas com a disposição do lodo
Ozonização	Não aplicável para corantes dispersos; curta meia-vida do ozônio; produz corantes aromáticos
Oxidação por NaOCl	Alto custo; produz aminas aromáticas
Carvão ativado	Alto custo, elevado custo pra regeneração
Processo fotoquímico	Formação de coprodutos
Oxidação eletroquímica	Alto custo de processo, principalmente eletricidade
Membrana de filtração	Alto custo de corrida; produção de lodo concentrado; sólidos dissolvidos não são separados

Fontes - Chacko e Subramanian (2011); Zaharia e Suteu (2012).

Embora ineficientes como processos unitários, devido principalmente à diversidade de tipos e classes de corantes, que contêm grupamentos funcionais diferentes, a inviabilização da aplicação de um procedimento único no tratamento desse tipo de efluente, consideram-se esses processos como uma opção quando em associação a tratamentos biológicos, os quais vêm se mostrando uma alternativa promissora para a remoção de corantes dos efluentes do banho de tingimento (ALMEIDA; CORSO, 2014; ÁLVAREZ et al., 2013; BASHA et al., 2011; KIRAN et al., 2013; KUNZ et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2010; SABA et al., 2013; SENTHILKUMAR et al., 2012; VANHULLE et al., 2008). Entretanto, os tratamentos biológicos convencionais não se mostraram apropriados para tratar efluentes têxteis, que apresentam alta salinidade e elevado pH. Além disso, esses tratamentos apresentam baixo rendimento na biodegradação de corantes têxteis, que foram sintetizados para resistir à degradação. Adicionalmente, esses tratamentos dispendem de extensos tempos de retenção hidráulica, associados à geração de compostos tóxicos, no caso de processos anaeróbios, podendo ainda formar resíduos de lodo colorido no fundo dos tanques de tratamento, características que os torna também ineficientes, quando aplicados isoladamente. Assim sendo, vários micro-organismos, incluindo fungos, bactérias e algas, vem sendo avaliados na

descoloração e na degradação de corantes sintéticos. Tais micro-organismos apresentam diferentes capacidades, alguns com vantagens específicas em detrimento de outros (ALI, 2010; CHEQUER et al., 2013; DONLON et al., 1995; DOS SANTOS et al., 2005; HAROUN; IDRIS, 2009; IŞIK; SPONZA, 2007; ZAHARIA; SUTEU, 2012).

1.3. Biodegradação de corantes

A biodegradação de corantes é caracterizada pela quebra do grupo cromóforo, que está associada à descoloração, podendo promover o deslocamento do comprimento de onda de máxima absorção desse composto (ALI, 2010; KAUSHIK; MALIK, 2009).

1.3.4. Fungos ligninolíticos

Os fungos de podridão branca apresentam vantagem para a aplicação em tratamentos *in vivo*, devido à presença de um sistema enzimático ligninolítico extracelular e inespecífico, capaz de catalisar a degradação de diferentes compostos químicos, incluindo corantes (AGUIAR; FERRAZ, 2011; BIBI; BHATTI, 2012; DURÁN; ESPOSITO, 2000; FARACO et al., 2009; KALPANA et al., 2012; MALACHOVA et al., 2013; MOREIRA-NETO et al., 2013; MUKHERJEE et al., 2013; PAKSHIRAJAN; KHERIA, 2012). Outra vantagem apresentada por esses fungos é a eficácia no tratamento em ampla faixa de pH e de temperatura (MUKHERJEE et al., 2013), o que possibilita aplicação direta, dispensando tratamento químico prévio.

1.3.5. Mecanismo ligninolítico dos basidiomicetos

O mecanismo ligninolítico desses fungos inclui três enzimas, consideradas por Wong (2009) como principais: Lignina Peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14), capaz de oxidar compostos fenólicos e não fenólicos de alto potencial redox; Peroxidase dependente do Manganês (MnP, EC 1.11.1.13), capaz de oxidar compostos fenólicos na presença de Mn^{+2} , e ainda oxidar um segundo mediador para efetivar a quebra de compostos não fenólicos; e Lacase (EC 1.10.3.2), capaz de oxidar compostos fenólicos simultaneamente à redução do oxigênio molecular a água. Ainda, segundo Aguiar e Ferraz (2011), essas enzimas ligninolíticas podem ser ordenadas de acordo com suas capacidades oxidativas: LiPs > MnPs > Lacases.

A LiP e a MnP são heme peroxidases, capazes de oxidar substratos por transferência de elétrons *multi-step*, com formação de radical catiônico intermediário. A LiP catalisa a despolimerização oxidativa H_2O_2 -dependente, de forma relativamente inespecífica quanto aos substratos,

fenólicos e não fenólicos, sendo que os mais rapidamente catalisados são os fenólicos. MnP é capaz de abstrair elétrons apenas de estruturas fenólicas, diferentemente da LiP, que é capaz de oxidar fenólicos e não fenólicos, indistintamente. Nos dois casos, a enzima é ativada pela oxidação por peróxido de hidrogênio, formando um *oxo*-complexo deficiente em dois elétrons. A redução desse complexo até a enzima nativa ocorre em duas etapas, com a abstração de um elétron de cada vez. No caso da LiP, a redução dos compostos intermediários pode ocorrer por meio da oxidação dos substratos, fenólicos e não fenólicos, levando à formação de radicais cátion. Nessa enzima existe um resíduo de triptofano na cadeia protéica, o qual atua como elo de transferência de elétrons com substratos aromáticos que não podem ter um contato direto com o grupo heme oxidado da enzima. Já a MnP depende do Mn^{2+} para a redução de um dos compostos intermediários, oxidando o Mn^{+2} para Mn^{+3} . Já o outro composto intermediário pode ser reduzido pela oxidação direta de uma estrutura fenólica ou de um átomo de Mn^{2+} , sendo esse íon o elo preferencial de transferência de elétrons, visto que a MnP não possui o resíduo de triptofano, comumente encontrado na LiP, sendo essa a principal diferença entre as duas enzimas (AGUIAR; FERRAZ, 2011; CHACKO; SUBRAMANIAM, 2011; WONG, 2009).

O Mn^{+3} formado é então dissociado da enzima e estabilizado pela formação de complexos com α -hidroxiácidos, como oxalato e malonato, os quais são ótimos quelantes e são secretados naturalmente pelo fungo. Outras funções fisiológicas estão associadas a estes quelantes, incluindo o aumento da atividade enzimática, pela sua capacidade de facilitar a dissociação de Mn^{+3} a partir da enzima. A oxidação do ácido oxálico por Mn^{+3} produz um radical formato (HCO^{-2}), que reage com dioxigênio para formar superóxido O^{-2} e, subsequentemente, H_2O_2 . O complexo Mn^{+3} -quelante atua como um oxidante difusível de substratos fenólicos, oxidando um elétron do substrato para produzir um radical fenoxila intermediário, o qual sofre rearranjos, clivagens de ligações e degradação não enzimática, produzindo assim vários outros produtos. O quelante Mn^{+3} gerado pode catalisar a oxidação de substratos fenólicos, incluindo fenóis simples, aminas e corantes, contudo é um oxidante suave sob condições fisiológicas, tendo seu espectro de ação limitado a oxidação de estruturas fenólicas e, por si só, não é capaz de oxidar compostos não fenólicos. Para esses substratos, a oxidação de Mn^{+3} envolve a formação de radicais reativos na presença de um segundo mediador. O Mn^{+3} também participa da peroxidação de lipídeos, para catalisar a clivagem da ligação C_{α} - C_{β} e de estruturas não-fenólicas da lignina, respectivamente. O mecanismo envolve a captação de hidrogênio a partir do carbono benzílico (C_{α}), através de radicais peroxilipídicos,

seguido da adição de O₂ para formar radical peroxi e subsequente degradação não enzimática (WONG, 2009).

As lacases são enzimas oxidoredutases multicobre, contendo quatro átomos de cobre, que abstraem elétrons de fenóis, em função da redução do Cu⁺² a Cu⁺¹, reduzindo O₂ a H₂O. A estequiometria é de quatro moléculas de substrato redutor para cada oxigênio molecular, envolvendo a transferência total de quatro elétrons. O primeiro passo da redução é a catálise do substrato pela redução de um cobre, Tipo 1 (T1), que é o receptor primário, transferindo os elétrons para os demais cobres, T2 e T3, resultando na redução total da enzima. As lacases catalisam a subtração de um elétron a partir de grupos hidroxifenólicos para formar radicais fenoxi, que geralmente sofrem polimerização por acoplamento. Essa reação é acompanhada por desmetilação e formação de quinona, resultando em clivagem do anel aromático (POLAK; JAROSZ-WILKOLAZKA, 2012; SINGH et al., 2015; WONG, 2009).

Sistemas mediados por LiP e MnP são capazes de oxidar não fenólicos; no entanto, alguns fungos de podridão branca não produzem essas duas enzimas, mas produzem lacase como a enzima predominante e ainda são capazes de degradar lignina de forma eficiente. Isso porque a lacase é capaz de oxidar compostos não fenólicos, porém na presença de um mediador, que pode ser sintético, como o caso do ABTS (2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolino-6-sulfonato)) ou natural, como são o ácido benzóico e o íon Mn⁺² (AGUIAR; FERRAZ, 2011; SINGH et al., 2015; WONG, 2009). Esses mediadores, conhecidos como compostos de baixa massa molar, podem ser empregados conjuntamente na mesma reação catalisada por lacase, uma vez que tal combinação pode aumentar as taxas de oxidação, comparado com as taxas obtidas separadamente com cada sistema mediador. Segundo Arantes e Milagres (2009) um mediador é uma molécula de baixa massa molar, que atua como carreador de elétrons, e sua oxidação pode ocorrer pela transferência de elétrons via direta ou via transferência de átomos de hidrogênio, sendo que essa última via é imprescindível para que a peroxidação lipídica com lacase ocorra (CAÑAS; CAMARERO, 2010; POLAK; JAROSZ-WILKOLAZKA, 2012).

Ainda em sua revisão, Cañas e Camarero (2010) comentam que o mediador redox ideal deve ser pequeno, capaz de gerar radicais estáveis, na sua forma oxidada, que não inativem a enzima, e ainda ser capaz de ser reciclado sem degenerar. Adicionalmente, do ponto de vista ambiental e industrial, deve ser menos agressivo e de baixo custo.

1.3.5.1. Peroxidação lipídica e reação de Fenton

A peroxidação lipídica consiste na incorporação do oxigênio molecular a um ácido graxo insaturado para produzir um hidroperóxido (R-OOH), como produto primário inicial. Tal mecanismo gerador de radicais livres tem como principal produto o radical peroxila ($\cdot\text{OOR}$), o qual apresenta potencial de oxidação suficientemente elevado para oxidar compostos não fenólicos. Durante a biodegradação, a peroxidação lipídica pode ser mediada por radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e hidroperoxila ($\cdot\text{OOH}$), e ainda metais de transição Fe^{+2} e Cu^{+2} . Contudo Fe^{+3} e Fe^{+3} -complexado podem iniciar a peroxidação lipídica, desde que um agente redutor esteja presente para reduzir Fe^{+3} para Fe^{+2} . O íon Mn^{+3} gerado pela MnP também pode mediar a peroxidação lipídica, quando complexado com ácidos orgânicos, possibilitando um aumento da taxa de peroxidação. Ainda lacases podem mediar esse processo, quando em um complexo Lacase-Fenol- Mn^{+2} . Ficam assim evidentes as diferenças na mediação desse processo por essas duas enzimas, uma vez que lacase não requer a presença de peróxido de hidrogênio, nem de ácidos orgânicos para completar sua ação mediadora, diferente da MnP (AGUIAR; FERRAZ, 2011; ARANTES; MILAGRES, 2007; HAMMEL et al., 2002; SREBOTNIK; BOISSON, 2005; TEN HAVE; TEUNISSEN, 2001).

Um processo iniciador da peroxidação de lipídeos é a reação de Fenton, que é baseada na reação entre H_2O_2 e Fe^{+2} , em meio ácido, para formar espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente $\cdot\text{OH}$, que é o mais forte oxidante que pode ocorrer em meio aquoso. Dessa forma, fica evidente a importância do íon ferro para os fungos de podridão branca, uma vez que, além de estar diretamente envolvido na produção de ROS, faz parte do sítio ativo das peroxidases. Esse íon é geralmente retirado do substrato ligninocelulósico pelo fungo, sendo encontrado predominantemente na forma oxidada e insolúvel (Fe^{+3}), o que gera demanda por quelantes para solubilizá-lo e reduzi-lo. Tais quelantes podem ainda mediar a reação de Fenton, juntamente com o sistema mediado por lacase, o que amplia a oxidação do composto alvo na biodegradação (AGUIAR; FERRAZ, 2011; ARANTES; MILAGRES, 2007; HAMMEL et al., 2002; SREBOTNIK; BOISSON, 2005; TEN HAVE; TEUNISSEN, 2001).

1.3.5.2. Compostos de Baixa Massa Molar

Os compostos de baixa massa molar (CBMM), produzidos naturalmente por fungos de podridão branca, identificados e relacionados à degradação dos componentes da madeira, foram descritos em estudos recentes (ARANTES et al., 2011; ARANTES; MILAGRES, 2009;

2010; HAMMEL et al., 2002; HORTA et al., 2011; KAPICH. et al., 2010; MOLDES et al., 2012). São eles:

- a) ácido 3-hidroxi-antranílico: é um metabólito produzido por *Pycnoporus cinnabarinus*, que sob forma de radical, é capaz de mediar a atividade de lacase na degradação de não fenólicos;
- b) ácidos carboxílicos: dentre as inúmeras funções listadas para o ácido oxálico, um ácido dicarboxílico metabólito fúngico, é capaz de reduzir intermediários para início da degradação não enzimática da madeira, quelar Ca^{+2} e Mn^{+3} , e ainda mediar naturalmente a atividade de MnP, na presença de Mn^{+3} , e LiP, na presença de álcool veratrílico;
- c) ácidos graxos insaturados: a peroxidação de ácidos graxos insaturados produz radicais livres, principalmente radical peroxila, que são capazes de oxidar estruturas não fenólicas da lignina;
- d) álcool veratrílico (álcool 3,4-dimetoxibenzílico): metabólito secundário produzido e acumulado no meio de cultura de fungos de podridão branca produtores de LiP, capaz de mediar essa atividade enzimática;
- e) compostos aromáticos clorados: podem ser produzidos por fungos, como é o caso do 2-cloro-1,4-dimetoxibenzeno, e atuar na mediação de LiP. Contudo, na ausência dessa enzima, esses compostos podem atuar como substratos de outra enzima oxidase, para produzir peróxido de hidrogênio;
- f) espécies reativas de oxigênio (ROS): são aos radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), peroxila ($\cdot\text{OOR}$) e hidroperoxila ($\cdot\text{OOH}$). Hidroxila é produzido pela reação de Fenton e é considerado o mais forte oxidante que pode ocorrer nos sistemas aquosos. Já os radicais peroxila e hidroperoxila são resultantes da oxidação de polímeros da madeira pelo radical hidroxila, e também da peroxidação lipídica por MnP. Esses dois últimos são oxidantes mais seletivos;
- g) compostos quelantes e redutores de Fe^{+3} : são compostos aromáticos, por exemplo ácido hidroxifenilacético, ácido hidroxibenzóico e hidroxibenzeno, ou ainda quinonas, capazes de reduzir Fe^{+3} , concomitantemente com a geração de radicais hidroxila, sendo assim considerados mediadores da reação de Fenton;
- h) peptídeos: são glicopeptídeos, e também peptídeos, capazes de quelar Fe^{+3} para reduzir a Fe^{+2} , seguindo a reação de Fenton. Possuem afinidade com Fe^{+2} , formando um complexo capaz de catalisar reações oxidoreduativas, produzindo peróxido de

hidrogênio, além de também serem capazes de reduzir o peróxido formado a radicais hidroxila, via reação de Fenton.

O modo de ação desses compostos na biodegradação da madeira, segundo Aguiar e Ferraz (2011) consiste em atuar diretamente na oxidação da parede celular vegetal ou ainda como mediadores das enzimas oxidativas, viabilizando assim o acesso das enzimas ao substrato. Apesar de haver relatos da importância do papel desses compostos de baixa massa molar na degradação da lignina desde a década de 1980, como mencionado nos estudos de Evans et al. (1994) e de Kirk e Farrell (1987) que esses compostos receberam maior atenção em estudos relacionados à degradação (AGUIAR; FERRAZ, 2011; ARANTES et al., 2009; HAMMEL et al., 2002; MOLDES et al., 2012; TEN HAVE; TEUNISSEN, 2001) o entanto tais estudos não mencionam a sinergia existente entre as enzimas ligninolíticas e a ação oxidativas desses compostos, assunto discutido por Arantes e Milagres (2007), em estudo de degradação de Azure B por fungos de podridão branca., em estudo de degradação de Azure B por fungos de podridão branca.

1.4. Fatores importantes de tratamentos de descoloração empregando basidiomicetos

O desenvolvimento de biotecnologia eficiente requer a aplicação de espécies selecionadas cuidadosamente e de condições favoráveis ao processo. Valores significativos de biomassa e componentes celulares podem ser obtidos por otimização de condições de cultivo, por isso em planejamento de sistemas de tratamento é importante estimular a produção das enzimas ligninolíticas, adicionando compostos considerados indutores e/ou estimuladores ao cultivo dos fungos. Uma vez que estudos relatam que a presença de co-substratos, como fontes de carbono e nitrogênio, favorece a descoloração e ainda estimula a produção enzimática (ALI, 2010; ANDRADE et al., 2013; FUKUDA et al., 2009; GAHLOUT et al., 2013; LEVIN et al., 2010; SARAYU; SANDHYA, 2012). Nesse contexto, uma variedade de substratos é avaliada como fonte de carbono e nitrogênio, visando a minimização dos custos dos processos, como por exemplo, amido, glicerol, farelo de arroz e de trigo, licor de maceração de milho, extrato de levedura, glúten de milho, oxalato de amônio, entre outros, variando os melhores substratos e suas concentrações, de acordo com os espécimes estudados. Outros indutores são os metais, uma vez que participam do ciclo catalítico dessas enzimas, como é o caso do cobre e do manganês, amplamente estudados em sistemas de cultivo de basidiomicetos (AKDOGAN et al., 2014; BALDRIAN; GABRIEL, 2002; FONSECA et al., 2010; LORENZO et al., 2006;

KARP et al., 2012; KAUSHIK; MALIK, 2009; KIRAN et al., 2012; KOYANI et al., 2013; MOREIRA et al., 2000; TINOCO et al., 2011; WONG, 2009). Além disso, é sabido que MnP tem sua expressão regulada pela presença de Mn^{+2} no meio de cultivo, e ainda a presença de ácidos orgânicos e de Mn^{+2} têm efeito estimulatório na produção de MnP (BONNARME; JEFFRIES, 1990; MESTER; FIELD, 1997).

Contudo, mesmo diante de tão amplo espectro de ação degradativa e ainda da inespecificidade do sistema ligninocelulolítico, nem todos os fungos são capazes de produzir todas as enzimas do mecanismo enzimático supracitado em sistemas de tratamento biológicos, havendo predominância das lacases na maioria das vezes (BARRASA et al., 2009; BIBI; BHATTI, 2012; MOREIRA et al., 2014; PAPADOPOULOU et al., 2013). Dessa forma, fica comprometida a eficiência do tratamento já que muitos corantes com grupo funcional azo não são substratos de lacase, demonstrando recalcitrância, mesmo em condições otimizadas, o que ainda mostra a necessidade do uso de mediadores, para proporcionar o ataque enzimático nesses casos (CAÑAS; CAMARERO, 2010; KUMAR et al., 2012; HU et al., 2009; NOUSIAINEN et al., 2014; SHANKAR; SHIKHA, 2015).

Outro fator importante na otimização desses sistemas de tratamento é o uso de substrato ligninocelulósico no cultivo, não só devido à indução das enzimas ligninolíticas, mas também porque os substratos ligninocelulósicos podem favorecer a produção de lacases amarelas, capazes de oxidar estruturas não fenólicas diretamente, ampliando assim o espectro de ação do sistema de tratamento (AGUIAR; FERRAZ, 2011; CHEN et al., 2014; IQBAL; EDYVEAN, 2005; LI et al., 2014; MAZMANCI; UNYAYAR, 2005; SAAB et al., 2013; SARATALE et al., 2011).

Deve-se também considerar sistemas *in vitro* e *in vivo*, que é objetivo de estudo de vários pesquisadores (HADIBARATA et al., 2012a; OSMAN et al., 2010; ZHAO et al., 2007; ZILLE et al., 2003). Contudo, é importante lembrar que sistemas *in vivo* oferecem vantagens em relação aos sistemas *in vitro*, uma vez que *in vivo* ocorre a peroxidação lipídica, via importante da biodegradação, além de apresentar baixo custo (AGUIAR; FERRAZ, 2011; CAÑAS; CAMARERO, 2010).

Existem ainda os fatores que podem afetar a biodegradação dos corantes, como por exemplo as condições ambientais de pH e temperatura. Além disso, é importante lembrar que estabelecer as condições ótimas para o processo deve anteceder sua caracterização, uma vez que nas condições otimizadas o processo atinge a máxima eficiência. De forma a completar estudos desse tipo, deve-se ainda verificar a presença de produtos da degradação, para

confirmar a quebra da molécula tratada e também obter informações sobre a toxicidade de seus produtos (ALI, 2010).

1.4.4. Os gêneros de basidiomicetos: *Pleurotus*, *Peniophora* e *Trametes*

Os gêneros de basidiomicetos *Peniophora*, *Trametes* e *Pleurotus* vem sendo avaliados em tratamentos com corantes de grupo funcional azo. Shankar e Shikha (2015) estudando a descoloração com *Peniophora* sp., avaliou o efeito dos metais Cd^{+2} , Co^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} , Na^{+} e dos mediadores de lacase, 1-hidroxibenzotriazol (HBT) e ABTS, na descoloração de corantes nitro e azo. Seus resultados mostraram que 1 mM de ABTS foi a melhor condição para a descoloração desses corantes, onde Metil Orange, um corante monoazo, apresentou um máximo de descoloração de 42 % e Amido Black, um corante diazo, atingiu um máximo de 25 % de descoloração. Em outro estudo empregando *P. cinerea* CCIBt 2541, Moreira et al. (2014) avaliaram o sistema lacase-siringaldeído- Mn^{+2} -oxalato na descoloração dos corantes têxteis CI Reactive Blue 19 e Red 271, mostrando ser esse um sistema promissor para tratamentos desse tipo. Em 2016, Bonugli-Santos et al. em estudo envolvendo esse mesmo gênero de basidiomiceto, aplicado na descoloração de corante azo, mostraram que MnP tem papel fundamental na descoloração e biodegradação de Reactive Black 5. Contudo, apesar da eficiência de *Peniophora* na descoloração de corantes sintéticos, tal potencialidade não está bem documentada para diferentes espécies desse gênero (SHANKAR; SHIKHA, 2015).

Basidiomicetos do gênero *Trametes* vem sendo bastante estudados e os resultados estão bem documentados pela literatura, como é o caso do estudo de Bibi e Bhatti (2012), que avaliaram a descoloração de corantes de função azo e antraquinona, empregando *Trametes hirsuta*, *Pycnoporus* sp. e *Irpex* sp., sob diferentes condições de cultivo. Esses autores observaram que, sob condições estacionárias, *T. hirsuta* descoloriu o corante antraquinônico em 50 % após 24 horas, atingindo 80 % após 5 dias de incubação, mostrando taxas 2 a 5 vezes maior do que aquelas observadas com os demais fungos avaliados. Contudo, como é sabido da dificuldade em se degradar corantes azo, os corantes azo avaliados não descoloriram mais que 40 % e *Trametes* apresentou maior descoloração do corante monoazo Reactive Orange 16 em relação aos demais fungos estudados, confirmando assim sua potencial capacidade oxidativa. Em outro estudo com várias espécies de *Trametes*, Chenaux et al. (2014) avaliaram a descoloração de corante Acid Red 27, corante fenólico monoazo, sob períodos prolongados (acima de 24 horas) e os resultados confirmam a capacidade oxidativa desse gênero de basidiomicetos, indicando ainda a lacase como a principal enzima envolvida na descoloração.

Si et al. (2013), em estudo de descoloração de corante diazo não fenólico Congo Red, observaram que dentre as 42 espécies testadas, *Trametes pubescens* apresentou os melhores resultados, confirmando ainda a degradação por identificação de metabólitos. Essa mesma capacidade biodegradativa foi confirmada por Adnan et al. (2014) em estudo com *Trametes gibbosa* sp. na descoloração de Reactive Black 5. Adicionalmente, lacase purificada de *Trametes polyzona* foi eficiente em descolorir corantes de função azo, com e sem estruturas fenólicas na molécula do corante, confirmando assim a capacidade desse gênero de basidiomiceto em tratamentos desse tipo (CHAIRIN et al., 2013).

Uma espécie de *Pleurotus* (*P. eryngii*) foi avaliada por Hadibarata et al. (2013) na descoloração de Reactive Black 5, um corante reativo diazo contendo estrutura fenólica, em diferentes condições, onde foi observada descoloração acima de 90 %. Outros pesquisadores, como Papadopoulou et al. (2013), também avaliaram *Pleurotus*, juntamente com outros fungos, na descoloração de diferentes corantes de função azo e antraquinona, e observaram que as melhores taxas de descoloração foram obtidas pelas espécies desse gênero, contudo os resultados mostram recalcitrância nos tratamentos contendo corantes de função azo. Ainda Kiran et al. (2012), em estudo comparativo de descoloração de Reactive Blue 222 por *P. ostreatus* e *Phanerochaete chrysosporium*, mostraram que *Pleurotus* apresentou melhores resultados de descoloração. Já Barreto et al. (2012) avaliaram a cinética de descoloração de três corantes azo, empregando *P. ostreatus*, e observaram baixas taxas de descoloração para esses corantes considerados recalcitrantes.

Recentemente Moreira Neto et al. (2011) e Moreira Neto et al. (2013) avaliaram a capacidade de espécies desses gêneros de basidiomicetos em descolorir o corante reativo antraquinônico CI Reactive Blue 19, onde *Peniophora cinerea*, *Pleurotus ostreatus* e *Trametes villosa* foram selecionadas por apresentarem potencial biotecnológico para degradação desse corante têxtil em alta salinidade, pH elevado, associado a um tempo de retenção hidráulica reduzido. Em continuidade, Santos (2016) avaliou tratamentos de descoloração de corantes reativos de função azo, não fenólicos, em misturas no banho de tingimento, empregando esses três basidiomicetos imobilizados em biorreatores, a tentativa de estabelecer um processo biotecnológico. Contudo, ainda é necessário caracterizar o processo, visto que parte dos estudos não comprova a degradação, comprometendo-se apenas com a diminuição da cor no efluente. É nesse contexto que o presente estudo avaliou parâmetros que interferem no processo de descoloração de um corante reativo diazo, de uso frequente pela indústria têxtil, procurando

inferir os componentes envolvidos nos diferentes mecanismos de degradação do corante pelas espécies estudadas.

2. OBJETIVOS

Na busca pelo aprimoramento do tratamento de efluentes têxteis empregando basidiomicetos, esse trabalho teve por objetivo caracterizar o processo de descoloração de um corante reativo diazo, por fungos ligninolíticos, avaliando as características fisiológicas, concomitantemente ao tratamento de descoloração, além de identificar a possível biodegradação desse corante. Os objetivos específicos foram:

- a) determinar atividades enzimáticas ligninolíticas e detectar compostos de baixa massa molar, quelantes e redutores de ferro, presentes em sistemas de cultivo de basidiomicetos, na presença e ausência de corante;
- b) identificar a melhor idade fisiológica dos sistemas de cultivo para aplicação em tratamento de descoloração;
- c) avaliar concentração de corante para aplicação nos sistemas de tratamento;
- d) avaliar a influência de diferentes concentrações de sulfato de cobre e de manganês, adicionados ao meio de cultivo, na produção das enzimas ligninolíticas e na descoloração;
- e) avaliar concentração de fonte de ácido graxo conhecida que favoreça não apenas a produção das enzimas ligninolíticas, mas também a descoloração;
- f) avaliar o papel de diferentes concentrações e combinações de dois mediadores das atividades enzimáticas na descoloração do corante;
- g) avaliar o emprego de ferramentas estatísticas para delineamento experimental e análises de dados em processos de otimização;
- h) avaliar método de baixo custo para a detecção de metabólitos formados durante o processo de descoloração;
- i) correlacionar os componentes envolvidos no processo de descoloração, a fim de estabelecer possíveis rotas metabólicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os fungos *Peniophora cinerea* (CCIBt 2541), *Pleurotus ostreatus* (CCIBt 2347) e *Trametes villosa* (CCIBt 2628), coletados nas América Central e América do Sul, em regiões caracterizadas como tropicais, pertencentes à Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica (CCIBt), selecionados previamente por Moreira Neto et al. (2011). As culturas fúngicas foram mantidas em meio sólido BDA (Batata Dextrose Agar), sob refrigeração a $5 \pm 0,2$ °C.

O corante têxtil utilizado foi CI Reactive Blue 222 (RB222) (Golden Tecnologia, São Paulo, SP, Brasil), da classe dos reativos. Esse corante foi avaliado em solução aquosa, denominada nesse estudo como efluente sintético, o qual foi preparado em temperatura ambiente com água deionizada. A estrutura química do corante estudado está apresentada na **Figura 1**.

Figura 1 - Estrutura química de CI Reactive Blue 222.

Fonte - próprio autor (MetaPrint2D).

Todos os dados foram analisados por programa estatístico (MINITAB, 2016), onde valores percentuais foram transformados previamente às análises estatísticas, empregando a equação descrita a seguir (VIEIRA; HOFFMANN, 1989).

$$\text{Valor transformado} = \arcsen (\text{raiz } (\% / 100))$$

Onde:

$\arcsen$ = arco seno

% = valor de descoloração porcentual

As médias obtidas nos experimentos 1, 2 e 5 foram comparadas pelo teste de Tukey, sempre protegidas por análise de variância (ANOVA), onde $\alpha \leq 0,1$.

Foi feita análise de correlação entre as atividades enzimáticas e a descoloração, nos experimentos 2, 3, 4 e 5, empregando o coeficiente de correlação de Pearson (p), onde a interpretação se deu com base nos valores obtidos, sendo que positivos corresponderam a correlação positiva e negativos à correlação negativa, de acordo com as faixas: de 0,00 a 0,19 = correlação bem fraca; de 0,20 a 0,39 = correlação fraca; de 0,40 a 0,69 = correlação moderada; de 0,70 a 0,89 = correlação forte; de 0,90 a 1,00 = correlação muito forte.

Os experimentos 3 e 4 tiveram planejamento experimental baseado no Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), para avaliação das variáveis e seus fatores. Os blocos experimentais foram compostos por tratamentos fatoriais (+1 e -1), pontos axiais (+ α e - α) e um ponto central, avaliado em replicatas. Os valores de α foram calculados pelo programa estatístico e a partir dos dados reais obtidos foi feita análise de superfície de resposta, originando equações quadráticas para prever valores para as variáveis que apresentaram apoio de seus modelos matemáticos pela análise de variância. Tais equações foram constituídas por uma constante, os coeficientes dos termos lineares e dos termos quadráticos, mais a interação dos coeficientes (CUNICO et al., 2008; PRATHEEBAA et al., 2013; RODRIGUES; IEMMA, 2014), expressas pela equação geral: [Resposta predita = constante + Σ coeficientes lineares . fatores + Σ coeficientes quadráticos . fatores + Σ interação dos coeficientes . fatores]. Foi também empregado o Otimizador de Resposta do programa estatístico, visando identificar as configurações de variáveis que otimizassem uma resposta desejada.

3.1. Experimento 1 - Crescimento fúngico, tamponamento do meio e atividades enzimáticas ligninolíticas durante descoloração de RB222 por Pleurotus ostreatus

Pleurotus ostreatus foi avaliado como basidiomiceto modelo na descoloração *in vivo* de RB222, onde os sistemas de cultivo líquido que respeitaram uma relação fase líquida:ar de 1:6,6 (v/v).

3.1.1. Sistemas de cultivo

Foram preparados frascos contendo meio basal (MB), previamente esterilizado por via úmida a 121 °C, 1,5 atm de pressão, durante 20 minutos. O MB foi constituído de 0,049 g/L CuSO₄, 0,2 g/L K₂HPO₄, 0,05 g/L MgSO₄, 0,016 g/L MnSO₄, 12 g/L sacarose e 0,56 g/L ureia (0,056 %), em água ultra pura (comunicação pessoal)¹, onde 10 discos de inóculo ($\varnothing = 0,7$ cm; $\approx 3,9$ cm²), constituído de micélio fúngico em crescimento exponencial, cultivado em Batata Dextrose Ágar (BDA), foram introduzidos. Os frascos foram incubados a 28 ± 2 °C, por 10 dias.

3.1.2. Sistema de tratamento

Foram constituídos pelos sistemas de cultivo, com 10 dias de idade fisiológica, acrescidos de 25 mL de efluente sintético com RB222, atingindo concentração final de 0,03 %. Foram preparados frascos individuais para cada tempo, avaliados em triplicata. Os controles bióticos, onde o efluente sintético foi substituído por água, e controles abióticos, sistemas não inoculados, foram avaliados em duplicata. Os frascos permaneceram incubados a 28 ± 2 °C por até 72 horas.

3.1.2.1. Parâmetros avaliados

Foram determinados no tempo inicial, antes da adição do corante, o aumento de biomassa, o pH e as atividades enzimáticas ligninolíticas. Após a adição do corante foram avaliados os mesmos parâmetros descritos acima e também a descoloração a 610 nm ($\lambda_{\text{máx}}$ de RB222), em 6, 12, 24, 48 e 72 horas de contato *in vivo* com o corante.

¹ Informação fornecida por Vera Maria Valle Vitali, no Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, em janeiro de 2016

3.1.2.1.1. Biomassa

A biomassa foi separada da fase líquida por filtração, em membrana de Nylon 0,45 μm , previamente seca e pesada, até peso constante. A quantidade (g) foi dada pela diferença de peso entre a biomassa úmida e seca, até obtenção de peso constante. A secagem se deu em estufa de secagem (Mod 320- SE, Fanem Ltda., Brasil) a 105 °C, por 24 horas. Todos os demais parâmetros foram avaliados no filtrado.

3.1.2.1.2. pH

Foi determinado em alíquotas de 15 mL, em temperatura ambiente, empregando pH-metro previamente calibrado (Docu-pHmeter, Sartorius AG, Germany).

3.1.2.1.3. Atividades enzimáticas

Foram determinadas as atividades oxidativas de:

- a) fenoloxidasas: determinada pela oxidação do ABTS ($A_{420\text{nm}}$, $\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,8, na presença de H_2O_2 na mistura reacional, de acordo com Ballaminut e Matheus (2007), onde uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μMol de ABTS por minuto;
- b) lacases: determinada pela oxidação do ABTS ($A_{420\text{nm}}$, $\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,8, na ausência de H_2O_2 , eliminado da mistura reacional pela adição de 6000 U/mL de catalase bovina, de acordo com Ballaminut e Matheus (2007), onde uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μMol de ABTS por minuto;
- c) peroxidases totais: dada pela diferença entre as atividades de fenoloxidasas e lacases, conforme Eggert et al. (1996);
- d) peroxidase dependente do manganês (MnP): dada pela oxidação do vermelho de fenol em 610 nm ($A_{610\text{nm}}$, $\epsilon = 65.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), em tampão succinato de sódio 0,02 M, pH 4,5, de acordo com Kuwahara et al. (1984), onde uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μMol de substrato por minuto;
- e) lignina peroxidase (LiP): dada pela oxidação do álcool veratrílico, na presença de H_2O_2 a 310 nm ($A_{310\text{nm}}$, $\epsilon = 9.300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) em tampão tartarato de sódio 0,25 M, pH 3,0, de acordo com Kirk e Farrel (1987), onde uma unidade

enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μMol de substrato por minuto;

- f) peroxidase versátil (VP): dada pela oxidação do sulfato de manganês, na presença H_2O_2 a 238 nm ($A_{238\text{nm}}$, $\epsilon = 6.500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), segundo o descrito por Rodriguez et al. (2004), onde uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μMol de substrato por minuto;
- g) atividade total de descoloração (ATD): avaliada pela oxidação do corante RB222, em 526 nm. O cálculo foi feito empregando a equação descrita por Zeraik et al. (2008).

$$U/L = \text{Absorbância} / \epsilon \cdot 1/V_{\text{extrato(mL)}} \cdot \text{diluição} \cdot 1/t_{(\text{min})} \cdot 10^6$$

3.1.2.1.4. Descoloração

A avaliação da descoloração do corante foi calculada a partir da leitura das absorbâncias no comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) do corante de estudo, 610nm (Espectrofotômetro 600S, FEMTO, Brasil) e calculada empregando a equação descrita por Moreira Neto et al. (2013).

$$D\% = ((A_0 - A) \cdot 100) / A_0$$

Sendo:

D% = descoloração porcentual

A_0 = absorbância no tempo inicial de análise

A = absorbância no tempo final de análise

A partir da observação de descoloração, foram feitas leituras de todas as absorbâncias do espectro entre 100 e 1100nm, a fim de compor o espectro de absorção de cada amostra desejada.

3.1.3. Coeficiente de Extinção Molar (ϵ) de RB222 em 526nm

O Coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{526\text{nm}}$) do corante RB222 foi obtido experimentalmente pela quantificação do corante no efluente sintético por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC DAD Série 20AT, Shimadzu Corporation, Japão). Os efluentes testados tinham concentração entre 0,01 % e 0,05 % e as absorbâncias empregadas foram aquelas observadas em 526 nm. As condições cromatográficas foram:

coluna analítica C18; eluição isocrática; fase móvel constituída de tampão fosfato de sódio monobásico 25 mM, pH 3,0 e metanol, na proporção de 2:3 (v/v); temperatura do forno de 30 °C; fluxo de 1 mL/min; volume de injeção de 10 µL e tempo de análise de 8 minutos. O coeficiente angular da reta, obtida por regressão linear, correspondeu ao coeficiente de extinção molar.

3.2. Experimento 2 - *Influência da idade fisiológica de basidiomicetos e da concentração de RB222 na descoloração*

Foram avaliados os três basidiomicetos, *Pleurotus ostreatus*, *Peniophora cinerea* e *Trametes villosa*, na descoloração *in vitro* de diferentes concentrações de corante (0,03 % = 3,0E-02%, 0,0003 = 3,0E-04% e 0,00003 % = 3,0E-05%), a fim de padronizar a concentração de estudo, que permitisse promover maiores taxas de descoloração de RB222, pelo sistema enzimático extracelular produzido pelos basidiomicetos em diferentes idades fisiológicas. Ainda, com vistas a estimular a peroxidação lipídica e a formação de espécies reativas, foi adicionada ao meio de cultivo uma fonte conhecida de ácido graxo insaturado.

3.2.1. *Obtenção do extrato enzimático*

Na tentativa de favorecer o processo de descoloração de RB222, foi substituída a fonte de nitrogênio (ureia), previamente padronizada por Vitali (comunicação pessoal)². Essa substituição se deu devido à *a*) possibilidade de interferência da ureia no processo de degradação de corantes de função azo, uma vez que esse composto é utilizado na diazonização, etapa do processo de síntese desses corantes; e à *b*) facilitação da atividade catalítica da MnP, que emprega oxalato como quelante de Mn^{+2} , uma vez que essa enzima reage com o complexo oxalato- Mn^{+2} em vez de reagir com Mn^{+2} livre, visando assim promover a produção dessa atividade enzimática nos cultivos avaliados (WONG, 2009; ZOLLINGER, 2003).

Foram então preparados cultivos, respeitando uma relação fase líquida:ar de 1:5 (v/v), onde o meio líquido continha 2% de extrato de malte, acrescido dos mesmos sais e fonte de carbono descritos para o MB descrito acima, 0,1 % de oxalato de amônio, como fonte de nitrogênio, de acordo com Kiran et al. (2012), e 2,5 % de emulsão de óleo de soja : Tween 20 (9:1, v/v), como fonte de ácido graxo, conforme Matheus e Bononi

² Informação fornecida por Vera Maria Valle Vitali, no Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, em janeiro de 2016

(2002). Esse meio líquido foi previamente esterilizado por via úmida, após resfriamento 5 discos ($\varnothing=0,9$ cm) de crescimento micelial com 7 dias foram introduzidos. Esse inóculo foi preparado com adição de 1 % de pó de serragem de leguminosa em meio BDA, visando estimular o sistema ligninolítico (Ballaminut et al., 2014a).

Os frascos de cultivo, preparados em triplicata, foram então incubados a 28 ± 2 °C, por até 30 dias, com monitoramento periódico durante incubação, onde o extrato bruto do cultivo foi separado por filtração a vácuo, seguido de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos, a 20 °C (Centrifuga Mod. 5804 R, Eppendorf AG, Hamburg), conforme descrito por Ballaminut et al. (2009).

3.2.2. Parâmetros avaliados

Foram determinados no tempo inicial, antes da adição de corante, e nos tempos 3, 7, 10, 14, 21 e 30 dias de incubação, os seguintes parâmetros:

3.2.2.1. pH

Determinado no extrato bruto, de acordo com o descrito no Experimento 1.

3.2.2.2. Biomassa

Determinada por peso seco em termobalança (ID50, Marte Científica, Brasil) à 105 °C por 40 minutos.

3.2.2.3. Determinações enzimáticas

Foram determinadas fenoloxidasas, lacase, peroxidases totais, MnP, LiP e VP de acordo com o descrito no Experimento 1.

3.2.2.3.1. Atividade Ligninolítica Total *in vitro*

Os basidiomicetos foram avaliados individualmente, empregando tubos de ensaio, contendo 990µL de extrato bruto do cultivo, onde cada concentração foi avaliada por um tubo Teste e um tubo Controle. Os Controles tiveram as enzimas desativadas por calor (banho-maria a 100 °C, por 10 minutos), antes da adição de corante. Então todos os tubos receberam solução de corante (10µL), atingindo concentrações finais de 0,03%, 0,0003% e 0,00003%, cada dupla de tubos. Os tubos foram então incubados por 2 horas, a 28 ± 2 °C, em seguida os Testes tiveram suas enzimas também desativadas por calor. Após resfriamento, foi determinada a absorbância, a 610nm, de cada tubo (Spectrophotometer Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) e a descoloração foi calculada

empregando a equação $\text{Descoloração \%} = ((\text{Absorbância}_{\text{Controle}} - \text{Absorbância}_{\text{Teste}}) \cdot 100) / \text{Absorbância}_{\text{Controle}}$.

3.3. Experimento 3: *Efeito da concentração de cobre e manganês, no meio de cultivo, e da idade fisiológica do cultivo na descoloração in vivo de RB222 por basidiomicetos*

Foram avaliadas diferentes concentrações de cobre (CuSO_4) e de manganês (MnSO_4), no estímulo das atividades enzimáticas ligninolíticas e da descoloração do corante RB222, pelos três basidiomicetos. Concentrações mínimas e máximas foram estabelecidas com base na literatura recente (AKPINAR; UREK, 2012; KARP et al., 2012; KIRAN et al., 2012). Concomitantemente, diferentes tempos de incubação do inóculo fúngico foram avaliados, empregando as três espécies de basidiomicetos isoladamente.

3.3.1. Delineamento experimental

O planejamento experimental foi feito com base no Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) 2^3 , para avaliação das variáveis e seus fatores (**Tabela 2**). O bloco experimental foi composto por 8 tratamentos fatoriais (+1 e -1), 6 pontos axiais ($+\alpha$ e $-\alpha$ em um dos eixos e zero para os outros 2 fatores) e um ponto central, avaliado em triplicata. Os valores de α do DCCR foram calculados pelo programa estatístico.

Tabela 2 - Variáveis avaliadas por DCCR 2^3 para avaliação de concentrações de sulfato de cobre e sulfato de manganês, no meio de cultivo de basidiomicetos, e do tempo de incubação do cultivo desses fungos para descoloração de RB222.

CuSO_4 [mM]	MnSO_4 [mM]	Idade Fisiológica [dias]	Valor α
0,307 *	0,106	7	-1,68
0,446	0,285 *	11	-1
0,654	0,553	18	0
0,861	0,821	25	1
1	1	29	1,68

* = valores empregados no meio basal previamente padronizado por Moreira Neto et al. (2011).

As combinações de variáveis originaram 17 tratamentos, apresentados na **Tabela 3**, onde cada tratamento foi avaliado em um único frasco, e os dados foram analisados por programa estatístico.

Tabela 3 - Bloco experimental DCCR 2³ para avaliação das variáveis: concentrações de sulfato de cobre e de sulfato de manganês no meio, e idade fisiológica do cultivo.

Tratamento	Valor α		
	CuSO ₄	MnSO ₄	Idade Fisiológica
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15a	0	0	0
15b	0	0	0
15c	0	0	0

3.3.2. Inóculo

O inóculo foi preparado em culturas sólidas, conforme descrito anteriormente no Experimento 2 e as culturas foram incubadas a 28 ± 2 °C, durante 7 dias.

3.3.3. Sistema de cultivo

Foram preparados frascos de cultivo respeitando uma relação fase líquida: ar de 1:5 (v/v), onde dez discos de inóculo ($\varnothing = 0,9$ cm) foram introduzidos no meio líquido, de constituição descrita no Experimento 2, variando as concentrações de sulfato de cobre e sulfato de manganês, conforme apresentado na **Tabela 2**. Os frascos foram então incubados a 28 ± 2 °C, por diferentes tempos (**Tabela 2**) e a configuração de fatores para cada tratamento está apresentada na **Tabela 3**.

3.3.4. Sistema de tratamento

O efluente sintético com RB222 foi adicionado aos tratamentos, atingindo concentração final de 0,03 %. Os tratamentos permaneceram incubados a 28 ± 2 °C por 24 horas.

3.3.4.1. Parâmetros avaliados

Os tratamentos foram monitorados no tempo inicial, imediatamente após a adição de corante, e após 24 horas de contato *in vivo*, a partir da determinação das atividades enzimáticas e da descoloração, conforme descrito no Experimento 1.

3.4. Experimento 4: *Influência de diferentes concentrações de fonte de ácido graxo conhecida e de dois mediadores do sistema enzimático ligninolítico na descoloração in vivo de RB222 por basidiomicetos*

Foram avaliados os três basidiomicetos, onde diferentes concentrações da fonte de ácido graxo utilizada nos experimentos anteriores foram avaliadas, com objetivo de selecionar a concentração que favorecesse a máxima descoloração *in vivo*. Ao efluente sintético com RB222, foram introduzidas diferentes concentrações de ABTS e de Remazol Brilliant Blue R (RBBR) em diferentes combinações. A seleção das concentrações da fonte de ácido graxo e dos mediadores foi feita com base na literatura (AGUIAR et al., 2010; RODRÍGUEZ COUTO et al., 2005; SHANKAR; SHIKHA, 2015; TAVARES et al., 2008; WONG; YU, 1999)

Para o delineamento experimental dos sistemas contendo *P. ostreatus* e *P. cinerea* foi utilizado DCCR 2³ (**Tabela 4**), composto por 8 tratamentos fatoriais (+1 e -1), 6 pontos axiais (+ α e - α em um dos eixos e zero para os outros 2 fatores) e um ponto central, avaliado em triplicata (**Tabela 6**). Para *T. villosa* foram avaliadas as mesmas variáveis citadas acima, incluindo concentrações de sulfato de manganês, uma vez que o experimento anterior não mostrou uma resposta precisa para a presença desse metal no meio de cultivo. Foi empregado o DCCR 2⁴ (**Tabela 5**), composto por 16 tratamentos fatoriais (+1 e -1), 8 pontos axiais (+ α e - α) e um ponto central, avaliado em quatruplicata (**Tabela 7**). Todos os valores de α foram calculados pelo programa estatístico.

Tabela 4 - Variáveis avaliadas por DCCR 2³ para diferentes concentrações da fonte de ácido graxo, no meio de cultivo, e dos mediadores das atividades enzimáticas, ABTS e RBBR, nos tratamentos de descoloração *in vivo* de RB222 por *Pleurotus ostreatus* e *Peniophora cinerea*.

ABTS [mM]	RBBR [μM]	Fonte de Ácido Graxo [%]	Valor α
0	0	0	-1,68
0,4	0,04	1	-1
1	0,1	2,5	0
1,6	0,16	4	1
2	0,2	5	1,68

Tabela 5 - Variáveis avaliadas por DCCR 2⁴ para diferentes concentrações da fonte de ácido graxo, no meio de cultivo, e dos mediadores das atividades enzimáticas, ABTS e RBBR, nos tratamentos de descoloração *in vivo* de RB222 por *Trametes villosa*.

ABTS [mM]	RBBR [μM]	Fonte de Ácido Graxo [%]	MnSO ₄ [mM]	Valor α
0	0	0	0,5	-2
0,5	0,05	1,25	0,75	-1
1	0,1	2,5	1	0
1,5	0,15	3,75	1,25	1
2	0,2	5	1,5	2

Tabela 6 - Bloco experimental DCCR 2³ para avaliação das variáveis: concentrações de ABTS, RBBR e da fonte de ácido graxo.

Frasco	ABTS [mM]	RBBR [μ M]	Fonte de Ácido Graxo [%]
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15a	0	0	0
15b	0	0	0
15c	0	0	0

Tabela 7 - Bloco experimental DCCR 2⁴ para avaliação das variáveis: concentrações de ABTS, RBBR, da fonte de ácido graxo e de MnSO₄.

Frasco	ABTS [mM]	RBBR [μ M]	Ácido Graxo [%]	MnSO ₄ [mM]
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	-1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	-1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	-2	0	0	0
18	2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	2
25a	0	0	0	0
25b	0	0	0	0
25c	0	0	0	0
25d	0	0	0	0

3.4.1. Inóculo

O inóculo foi preparado em culturas sólidas, conforme descrito no Experimento 2 e as culturas foram incubadas a 28 ± 2 °C, durante 7 dias.

3.4.2. Sistema de cultivo

Foram preparados conforme descrito no Experimento 2, onde frascos de cultivo respeitaram uma relação fase líquida: ar de 1:5 (v/v) e as quantidades de CuSO₄ e de

MnSO₄ foram definidas: *P. ostreatus* recebeu 0,446 mM de CuSO₄ e 0,821 mM de MnSO₄; *P. cinerea* recebeu 1mM de CuSO₄ e 0,106 mM de MnSO₄. *T. villosa* recebeu 1 mM de CuSO₄ e quantidades variáveis de MnSO₄ (**Tabela 5**). Todos os sistemas de cultivo foram incubados a 28 ± 2 °C, por intervalos de tempos diferentes: *P. ostreatus* 25 dias; *P. cinerea* 18 dias; *T. villosa* 25 dias.

3.4.3. Sistema de tratamento

Após tempos de incubação específicos, os sistemas de cultivo receberam efluente sintético com RB222, atingindo concentração final de 0,03%, contendo os mediadores descritos, em diferentes combinações de concentrações (**Tabela 4 e Tabela 5**).

3.4.3.1. Parâmetros avaliados

Os sistemas de tratamento foram monitorados no tempo inicial, após 24 e 48 horas de contato *in vivo*, pelas atividades enzimáticas de fenoloxidasas, lacase e MnP, e pela descoloração *in vivo*, a 526 nm e 610 nm, conforme descritos no Experimento 1.

A partir da observação da descoloração, foram feitas leituras de todas as absorbâncias do espectro entre 100 e 1100nm, a fim de compor o espectro de absorção das amostras desejadas.

3.5. Experimento 5: Caracterização do processo de descoloração de RB222 por basidiomicetos

Foram avaliados sistemas de tratamento, em fatorial completo com triplicatas para cada condição, os quais foram preparados utilizando os três basidiomicetos, avaliados individualmente.

3.5.1. Sistema de cultivo

Os cultivos foram preparados respeitando uma relação fase líquida:ar de 1:3,3 (v/v), onde o meio líquido foi constituído pelos sais e nutrientes descritos na **Tabela 8**. O meio foi esterilizado por via úmida a 121 °C, 1,5 atm de pressão, durante 20 minutos. Após resfriamento discos de inóculo ($\varnothing = 0,9$ cm), preparado conforme descrito no Experimento 2, foram introduzidos na proporção 1 disco/10 mL de meio. As culturas de *P. cinerea* foram incubadas por 18 dias, já *P. ostreatus* e *T. villosa* permaneceram incubados por 25 dias, a 28 ± 2 °C.

Tabela 8 - Sais e nutrientes constituintes do meio líquido, utilizado para cultivo de basidiomicetos a serem empregados em tratamentos de descoloração de RB222 *in vivo*.

Componente	<i>Pleurotus ostreatus</i> (quantidade/unidade)	<i>Peniophora cinerea</i> (quantidade/unidade)	<i>Trametes villosa</i> (quantidade/unidade)	Referência
Sulfato de cobre (CuSO ₄)	0,071 g/L	0,160 g/L	0,160 g/L	Dados não publicados
Fosfato básico de potássio (K ₂ HPO ₄)	0,2 g/L	0,2 g/L	0,2 g/L	Moreira Neto et al., 2011
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	0,05 g/L	0,05 g/L	0,05 g/L	Moreira Neto et al., 2011
Sulfato de manganês (MnSO ₄)	0,143 g/L	0,018 g/L	0,087 g/L	Dados não publicados
Sacarose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	12 g/L	12 g/L	12 g/L	Vitali (comunicação pessoal) ³
Oxalato de amônio (NH ₄) ₂ C ₂ O ₄)	1 g/L	1 g/L	1 g/L	Kiran et al., 2012
Extrato de malte	20 g/L	20 g/L	20 g/L	Dados não publicados
Emulsão óleo:Tween 20	na	4 %	3,75 %	Dados não publicados

na = não se aplica.

3.5.2. Sistema de tratamento

Após incubação, os sistemas de cultivo receberam efluente com RB222, atingindo concentração final de 0,03 %. O efluente sintético foi preparado com adição dos mediadores, em concentrações específicas para cada basidiomiceto: 2 mM de ABTS para os três basidiomicetos, mais 0,2 µM de RBBR para *P. ostreatus* e *P. cinerea*.

Foram preparados *i*) controles bióticos, onde o corante foi substituído por água; *ii*) controles abióticos com fungo morto, onde a biomassa crescida foi morta por esterilização por via úmida a 121 °C, 1,5 atm de pressão, por 30 minutos, antes de receber o efluente sintético; e *iii*) controles abióticos, sistemas não inoculados⁴.

3.5.2.1. Parâmetros avaliados

Foram determinados as atividades enzimáticas e os CBMM quelantes e redutores de Fe⁺³ antes da adição de efluente sintético, e após adição de efluente sintético, foram determinadas as atividades enzimáticas e a descoloração de RB222 *in vivo*.

³ Informação fornecida por Vera Maria Valle Vitali, no Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, em janeiro de 2016

⁴ Apenas *P. ostreatus* e *T. villosa* tiveram controle abiótico com fungo morto em avaliação.

3.5.2.1.1. Atividades enzimáticas

Foram determinadas as atividades de fenoloxidases, lacase e de MnP, de acordo com o descrito nos experimentos anteriores.

3.5.2.1.2. Compostos de Baixa Massa Molar (CBMM)

Para a separação dos CBMM, o extrato bruto foi filtrado e congelado, em seguida foi liofilizado (Liofilizador Thermo Savant, Modelo Micro Modulo, Thermo Electron Corporation, USA). Após liofilização os extratos foram ressuspensos em água ultrapura, concentrando-os 10 vezes. Os extratos foram então purificados parcialmente por ultrafiltração, empregando membranas de corte de 5 kDa (VIVASPIN 15, Sartorius AG, Germany), em centrífuga (Centrifuga Mod. 5804 R, Eppendorf AG, Hamburg) por 30 minutos, a 10.000 rpm, a 10 °C (ARANTES; MILAGRES, 2007).

Todo material de laboratório empregado nesse ensaio foi tratado com imersão em HCl 6 N por 12 horas, seguida por enxágue com água deionizada, para remoção de traços de ferro.

Para a detecção da presença de compostos com atividade quelante de Fe^{3+} foi utilizado o Método universal CAS (Cromo Azurol S), descrito por Schwyn e Neilands (1987), que é baseado na competição por ferro entre o complexo férrico do corante indicador CAS e do quelante produzido pelos fungos. Esse método consistiu-se no preparo de um corante complexo indicador, composto por 6 mL de uma solução de brometo de hexa-deciltrimetilamônio (HDTMA) 10 mM, 1,5 mL de solução de cloreto férrico (1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 10 mM HCl) mais 7,5 mL de solução CAS (Cromo Azurol S) 2 mM. A essa solução foram adicionados 4,307 g de piperazina anidra dissolvida em água deionizada e o pH foi ajustado para 5,6 pela adição de HCl concentrado, então o volume foi completado para 100 mL com água ultrapura. O reagente CAS complexado com Fe^{3+} na solução possui uma intensa cor azul, com absorvidade molar $\epsilon_{630\text{nm}}=100.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

O ensaio foi avaliado por espectrofotometria, com leituras pontuais da absorbância, em 630 nm. A mistura de reação continha 500 μL de amostra e 500 μL de reagente CAS. O branco substituiu a amostra por meio de cultura não-inoculado e o aparelho foi zerado com água deionizada. A mistura de reação permaneceu em repouso por uma hora, antes da leitura da absorbância, e os resultados foram expressos como porcentagem de compostos quelantes, presentes na amostra capazes de complexar Fe^{3+} em relação ao

branco. A porcentagem de quelantes produzidas foi calculada de acordo com a Equação 4:

$$\% \text{ CAS} = [(\text{Absorbância}_{\text{branco}} - \text{Absorbância}_{\text{amostra}}) / \text{Absorbância}_{\text{branco}}] \cdot 100$$

Os ensaios para verificação da presença de atividade redutora de ferro foram avaliados por espectrofotometria, onde a mistura de reação foi constituída por 375 μL de amostra ultrafiltrada, 400 μL de solução tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5 e 50 μL de FeCl_3 20 mM. Após 30 minutos, no escuro, foram adicionados 100 μL de NaF 50 mM para paralisar a reação e, em seguida 125 μL de ferrozina 10 mM. A absorbância foi avaliada em 562 nm. Os resultados foram expressos pela quantidade de Fe^{2+} formado ($\epsilon_{562\text{nm}} = 27.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) do aparelho, substituiu-se a amostra e a ferrozina por água deionizada. Um controle, contendo água no lugar da amostra, foi preparado, para descontar a quantidade de íons Fe^{2+} formados durante o equilíbrio natural $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ em água (ARANTES et al., 2011; ARANTES; MILAGRES, 2007; MILAGRES et al., 1999; STOOKEY, 1970).

3.5.2.1.3. Teste de inibição enzimática

Foram realizados com adição de azida sódica, como inibidor da atividade de lacase, de acordo com Johannes e Majcherczyk (2000), em concentrações de 0,1 a 3 mM, dependendo de cada espécie, até que a atividade enzimática não pudesse mais ser detectada. A inibição de MnP foi feita pela adição de cloreto de cádmio, de acordo com Sundaramoorthy et al. (2005), em concentrações de 1 a 4,7 mM, dependendo de cada espécie fúngica, até que a atividade enzimática não pudesse mais ser detectada. As inibições foram testadas combinadas e isoladamente.

Apenas após a inibição das atividades enzimáticas o efluente sintético com RB222 e mediadores foi introduzido nos sistemas de tratamento.

3.5.2.1.4. Descoloração

Avaliada a 610 nm e 526 nm, de acordo com o descrito nos experimentos anteriores.

3.5.2.1.5. Detecção de metabólitos por cromatografia de camada delgada (Thin Layer Chromatography – TLC)

Foi padronizado um método TLC, empregando placas de sílica gel G em alumínio UV₂₅₄, 20x20cm (Boeco, Merck Millipore Corporation, Alemanha), onde as fases móveis testadas foram constituídas por diferentes combinações:

- álcool metílico PA e água ultra pura 3:2 (v/v);
- álcool metílico PA e tampão fosfato de sódio monobásico 25 mM, pH 3,0 3:2 (v/v);
- acetato de etila PA e álcool metílico PA 1:1 (v/v);
- acetato de etila PA e álcool metílico PA 1:1,5 (v/v);
- acetato de etila PA e álcool metílico PA 2:1 (v/v);
- acetato de etila PA e álcool metílico PA 2:3 (v/v);
- acetato de etila PA e álcool etílico PA 2:3 (v/v);
- ácido acético e álcool metílico PA 2:3 (v/v);
- acetato de etila PA, álcool metílico PA e álcool etílico 2:1:1 (v/v/v);
- acetato de etila PA, álcool metílico PA e ácido acético glacial 1:1:0,5 (v/v/v);
- acetato de etila PA, álcool metílico PA e ácido acético glacial 1:1,5:0,5 (v/v/v).

As demais condições foram selecionadas empregando a fase móvel selecionada e a visualização das corridas nas placas foi feita em Câmara Escura Transiluminadora (SPPencer SP930-35, Hipperquímica Comercial Científica Ltda, Brasil) em 254 nm e 365 nm (KURADE et al., 2015; WATHARKAR et al., 2013).

3.5.3. Previsão de metabólitos

Os possíveis metabólitos foram simulados por programa de predição de metabólitos (METAPRINT2D. 2010).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados de cada ensaio desse estudo foram apresentados na mesma sequência experimental descrita anteriormente, no Material e Métodos, identificados pelo número de cada experimento.

4.1. Experimento 1

O aumento da biomassa durante contato *in vivo* com o corante (**Figura 2**) não apresentou diferença estatística entre os sistemas com e sem corante ($p = 0,367$; APÊNDICE A), nem entre os tempos de incubação ($p = 0,464$; APÊNDICE A), mostrando que nesse intervalo não há grande variação de biomassa, sem interferência da presença do corante.

Figura 2 - Biomassa de *Pleurotus ostreatus* monitorada durante contato *in vivo* com RB222 (●) e no cultivo sem corante (○).

O monitoramento do pH dos filtrados apresentou pequena diminuição na presença de meio basal, tanto nos sistemas sem corante quanto em combinação com RB222, diferindo significativamente dos sistemas com corante em água sem fungo ($p = 0,002$, APÊNDICE A), com valor máximo de 6,74 (**Figura 3**). Já os sistemas com corante em meio basal com e sem fungo atingiram valor máximo de 6,16, embora não tenha sido observada diferença estatística entre os tempos avaliados ($p = 0,390$; APÊNDICE A). O pH ficou mantido na faixa de 4,10 a 6,86, corroborando com os valores de pH ótimos observados para descoloração de diferentes corantes por fungos em outros trabalhos (BIBI; BHATTI, 2012; KAUSHIK; MALIK, 2009; MIELGO et al., 2003). Kiran et al. (2012) em estudo de descoloração desse mesmo corante observou que tanto *P. ostreatus*

como *Phanerochaete chrysosporium* apresentaram pH ótimo para descoloração de 4,5. Dessa forma, fica entendido que não há necessidade de tamponamento do pH dos sistemas durante processo de descoloração, já que o fungo é capaz de mantê-lo dentro de uma faixa específica de pH.

Figura 3 - (A) pH dos sistemas com *Pleurotus ostreatus* CCIBt 2347 e corante (▲) e sem corante (Δ); (B) sistemas com corante em água (○) e em meio basal (●), ambos sem fungo.

As atividades enzimáticas, apresentadas na **Tabela 9**, podem ter sido inibidas pela presença do corante, uma vez que apresentaram diferença significativa dos sistemas com fungo sem corante ($p < 0,01$; APÊNDICE A), que apresentaram maiores valores. Entretanto, não foi observada diferença estatística entre os tempos avaliados para fenoloxidas ($p = 0,726$), lacase ($p = 0,592$) nem para peroxidases totais ($p = 0,762$) (APÊNDICE A).

As fenoloxidas observadas nos sistemas sem corante foram em média 4,5 vezes maior que aquela observada nos sistemas com corante, bem como as lacases e as peroxidases totais foram em média 2,5 e 15,5 vezes maior nos sistemas sem cor, respectivamente, sendo que os valores máximos ocorreram após 48 horas. Os sistemas com corante apresentaram maior produção de enzimas no tempo inicial, diminuindo nos demais tempos, embora com boa recuperação após 72 horas (**Tabela 9**). Não foram detectadas MnP, VP e LiP em nenhum dos extratos avaliados.

Tabela 9 - Atividades enzimáticas (U/L) produzidas por *Pleurotus ostreatus* CCIBt 2347 durante contato *in vivo* com RB222.

Tempo de contato <i>in vivo</i> (horas)	Sistemas				Atividade Enzimática
	Com corante		Sem corante		
	Média	DP	Média	DP	
0	20,295	9,289	33,336	20,298	Fenoloxidasas
6	20,166	10,275	34,339	7,530	
12	13,863	7,009	22,456	4,583	
24	5,023	8,361	23,829	31,342	
48	3,071	0,985	53,245	35,795	
72	18,880	22,589	32,564	7,203	
0	10,577	6,172	23,999	11,131	Lacases
6	13,684	6,182	23,382	5,784	
12	13,991	5,557	12,516	3,034	
24	5,387	7,214	10,263	12,986	
48	4,316	2,868	29,632	16,697	
72	11,133	14,182	17,633	3,765	
0	9,718	4,329	9,337	9,167	Peroxidasas Totais
6	6,482	4,201	10,958	1,746	
12	0,611	0,530	9,939	1,550	
24	0,379	0,618	13,566	18,356	
48	0,628	0,585	23,613	19,098	
72	7,748	8,447	14,932	3,438	

DP = desvio padrão; áreas em destaque representam maiores valores.

A descoloração observada nos sistemas com fungo foi maior que aquela observada nos seus sistemas sem fungo, com diferença altamente significativa ($p = 0,000$; APÊNDICE A). Os maiores valores foram observados após 48 horas, atingindo 90 %, sendo que os sistemas coloridos sem fungo não ultrapassaram 10 % de descoloração. Houve também diferença altamente significativa entre os tempos avaliados ($p = 0,001$; APÊNDICE A), sendo maior após 24 horas (**Figura 4**). Apesar da descoloração não ter atingido 100 % a 610 nm, tal resultado apresentou vantagens em relação a outros estudos semelhantes, como é o caso do trabalho de Osma et al. (2010), que avaliando a biodegradação do corante RBBR por lacase de *Trametes pubescens* imobilizada, observaram apenas 44 % de descoloração após 42 horas de contato. Kiran et al. (2013) em tratamento químico conjugado ao biológico de RB222, testando *P. ostreatus* e *Phanerochaete chrysosporium* também não obtiveram descoloração maior que 60 % em 24 horas de tratamento.

Figura 4 - Descoloração do RB222 a 610 nm durante tratamento *in vivo* por *Pleurotus ostreatus* CCIBt 2347 (▲), nos seus controles abióticos com corante em água (○) e em meio basal (●).

Letras iguais significam igualdade estatística; controles sem diferença estatística.

A descoloração a 610 nm mostrou-se eficiente e parece ter sido resultado de biossorção, uma vez que o micélio fúngico tornou-se colorido, mas também parece estar associada à transformação da molécula do corante, já que houve mudança de cor da fase líquida. Após 12 horas a fase líquida tornou-se arroxeada e após 24 horas tornou-se rubra, conforme mostra a **Figura 5**. Zaharia et al. (2012) comentam que corantes sintéticos possuem estruturas aceptoras de elétrons e doadoras de elétrons, sendo assim ionizáveis, portanto diante de moléculas tão reativas, possivelmente, a oxidação do corante, provocada pelo mecanismo ligninolítico do fungo, pode ter dado origem a uma conformação diferente daquela observada na molécula inicial do corante, a qual resultou na mudança da cor na região do visível, revelando um novo $\lambda_{\text{máx}}$, a 526 nm, região de absorção do vermelho.

Figura 5 - Sistemas de tratamento de CI Reactive Blue 222 por *Pleurotus ostreatus* CCIBt 2347, onde (A) controle abiótico no tempo inicial e (B) sistemas com fungo e corante após 6 horas, (C) após 12 horas e (D) após 24 horas de contato.

Foi feita varredura das absorbâncias dos filtrados a cada tempo avaliado, possibilitando a construção dos seus espectros de absorção. Na **Figura 6** estão apresentados os espectros dos sistemas com e sem fungo, em todos os tempos testados, onde observou-se mudança do $\lambda_{\text{máx}}$, confirmando deslocamento hipsocrômico no espectro de absorção do corante.

Figura 6 - Espectros de absorção de RB222 tratado com *Pleurotus ostreatus* CCIBt 2347e seus controles abióticos.

Os sistemas de tratamento avaliados apresentaram deslocamento hipsocrômico nas primeiras 6 horas de contato (**Figura 6**). Outros estudos de descoloração também mostram o deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$, como é o caso de Zille et al. (2003), em avaliação de lacase de *T. villosa* na descoloração de corantes ácidos observaram o deslocamento do

$\lambda_{\text{máx}}$, embora após 24 horas de contato. Bibi e Bhatti (2012), em estudo de descoloração de corantes diversos por fungos, observaram que o corante RBBR, após tratamento com *Trametes hirsuta* também apresentou deslocamento hipsocrômico do $\lambda_{\text{máx}}$. De acordo com Kaushik e Malik (2009) a descoloração do corante ocorre quando o centro cromóforo do corante é clivado, podendo provocar assim o deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$.

Com a constatação de que o $\lambda_{\text{máx}}$ do corante passou a ser 526 nm, esse comprimento de onda foi utilizado para obtenção do coeficiente de extinção molar (ϵ) de RB222, proporcionando assim o uso desse coeficiente para complementar o entendimento do processo. O cálculo foi feito a partir da construção de curva de calibração com as absorbâncias em função da concentração do corante, em mol/L, onde o coeficiente angular da reta, obtida por regressão linear, correspondeu ao coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 853.541 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (**Figura 7**).

Figura 7 - Curva – concentração de RB222 *versus* absorbância a 526 nm.

Corante preparado em água ultra pura; dados obtidos por HPLC-DAD.

A atividade total de descoloração (ATD) manteve-se constante durante todo período de incubação, sem diferença significativa entre os tempos avaliados, cerca de 0,8 U/L, entretanto após 72 horas foi observada tendência a um aumento, mostrando que o processo de descoloração *in vivo* poderia ter continuidade após esse período.

P. ostreatus mostrou-se promissor em aplicações biotecnológicas desse tipo, corroborando com os resultados do estudo de Zhao et al. (2007), que confirmaram a capacidade de biodegradação de corantes azo por uma espécie *P. ostreatus*, e ainda outros estudos, que empregando também a espécie *P. ostreatus* e suas enzimas comprovam a capacidade desse basidiomiceto em biodegradar diversos corantes

(KUMAR et al., 2012; LU et al., 2008; ZHAO et al., 2006). Sugere-se ainda que os demais ensaios desse estudo utilizem controles abióticos meio de cultivo ao invés de água.

4.2. Experimento 2

A biomassa produzida nos cultivos aumentou a partir do 7 ° dia de incubação (**Figura 15**), sendo maior aos 21 dias para *P. cinerea* e 30 dias para *P. ostreatus* e *T. villosa*, com diferença significativa entre os tempos, para os três fungos ($p \leq 0,03$; APÊNDICE B). Foram *T. villosa* e *P. cinerea* que apresentaram maiores quantidades de biomassa, com mais de 30 g/L, já *P. ostreatus* produziu o máximo de 23 g de biomassa por litro de cultivo. Tais dados mostram que os metabolismos de crescimento desses basidiomicetos, nas condições aqui avaliadas, permaneceram ativos durante todo tempo de incubação. Em outro estudo Moreira Neto et al. (2013) com meio mínimo para o cultivo dessas mesmas linhagens de basidiomicetos, foi observada biomassa, aos 7 dias de incubação, de 0,778 g/L para *P. ostreatus*, 0,96 g/L para *T. villosa* e 1,35 g/L para *P. cinerea*, bem como essa mesma linhagem de *P. cinerea* produziu 2,26 g/L de biomassa no estudo de Silvério et al. (2013). Entretanto, no estudo aqui apresentado, nessa mesma idade fisiológica, essas mesmas linhagens produziram 14, 26 e 21 g/L, respectivamente, mostrando melhor capacidade de crescimento que o observado pelos autores supracitados, em virtude das condições terem favorecido maior crescimento.

Figura 8 - Biomassa seca por litro de cultivo de *Pleurotus ostreatus* CCIBt 2347 (■), *Peniophora cinerea* CCIBt 2541 (□) e *Trametes villosa* CCIBt 2628 (▒).

Letras iguais significam igualdade estatística.

A descoloração, avaliada *in vitro* pela aplicação de extrato bruto, não foi significativa para nenhuma das concentrações de corante testadas com *P. ostreatus* ($p > 0,1$; APÊNDICE B). *P. cinerea* apresentou descoloração significativa apenas na menor concentração ($p = 0,000$; APÊNDICE B), sendo máxima quando extratos de 30 dias foram empregados. *T. villosa* apresentou descoloração significativa (APÊNDICE B) nas três concentrações avaliadas, sendo máxima com extratos de 30 dias (Tabela 10).

Tabela 10 - Descoloração *in vitro* de RB222 por extrato bruto de basidiomicetos com diferentes idades fisiológicas, em diferentes concentrações de corante.

Fungo	Concentração de corante (%)									Tempo (dias)
	0,03			0,003			0,00003			
	Média	DP	Tukey	Média	DP	Tukey	Média	DP	Tukey	
<i>P. ostreatus</i>	5,35	4,68	a	8,24	5,91	a	5,15	7,28	a	0
	0,00	0,00	a	2,80	1,30	a	0,00	0,00	a	3
	2,11	11,35	a	4,79	2,85	a	0,00	0,00	a	7
	0,00	0,00	a	1,26	9,89	a	4,14	7,07	a	10
	0,00	0,00	a	9,36	3,88	a	0,00	0,00	a	14
	0,00	0,00	a	10,31	10,70	a	17,30	7,30	a	21
	96,61	34,18	a	13,20	41,57	a	15,67	39,62	a	30
<i>P. cinerea</i>	20,49	18,59	a	7,26	4,37	a	12,59	1,64	ab	0
	15,23	29,99	a	0,00	0,00	a	4,21	3,43	bc	3
	1,67	22,52	a	0,87	11,67	a	0,00	0,00	c	7
	19,52	23,81	a	11,35	27,59	a	5,77	7,01	bc	10
	0,00	0,00	a	3,65	3,22	a	4,91	2,88	bc	14
	9,59	70,49	a	3,86	2,15	a	0,00	00,00	c	21
	0,00	0,00	a	0,29	44,04	a	25,29	12,21	a	30
<i>T. villosa</i>	0,00	0,00	ab	9,83	8,31	ab	25,74	19,43	a	0
	0,00	0,00	ab	0,98	14,70	ab	7,27	3,10	ab	3
	0,00	0,00	ab	0,00	0,00	b	0,00	0,00	b	7
	0,00	0,00	b	3,19	13,22	ab	10,63	9,30	ab	10
	0,35	13,95	ab	7,66	6,66	ab	5,36	3,42	ab	14
	0,00	0,00	b	6,46	3,90	ab	5,08	8,53	ab	21
	27,66	13,52	a	17,04	3,72	a	14,82	4,23	ab	30

Letras iguais significam igualdade estatística na comparação dos três basidiomicetos simultaneamente, em cada concentração avaliada; DP = desvio padrão; Tukey = comparação de médias por Tukey; áreas em destaque representam maiores valores.

O pH dos extratos dos três fungos apresentou pequeno aumento no 30 ° dia de incubação, com diferença altamente significativa entre os tempos ($p = 0,000$; APÊNDICE B), sendo que os maiores valores atingiram $5,96 (\pm 0,13)$ em extratos de *P. ostreatus*, $5,49 (\pm 0,10)$ em *P. cinerea* e $5,46 (\pm 0,11)$ em *T. villosa*. Contudo, a faixa de

pH manteve-se entre 3,87 e 5,96 para os três fungos, assim sendo, pode-se afirmar que o pH nesses sistemas de cultivo permanece na faixa entre 4,0 e 6,0, durante os 30 dias avaliados, corroborando assim com os demais dados aqui apresentados e confirmando o tamponamento do sistema pelo próprio sistema biológico.

Pleurotus ostreatus apresentou as maiores atividades de fenoloxidasas (248 U/L), lacases (223 U/L) e MnP (142 U/L) em extratos de 30 dias, com diferença altamente significativa entre os tempos ($p = 0,000$), já suas peroxidases totais não apresentaram diferença estatística (APÊNDICE B). *P. cinerea* produziu os máximos de fenoloxidasas (656 U/L) e de lacases (821 U/L) após 14 dias de incubação, com diferença significativa entre os tempos ($p < 0,05$), embora não tenha apresentado diferença estatística para suas peroxidases totais ou MnP (APÊNDICE B). *T. villosa* produziu o máximo de fenoloxidasas (509 U/L), lacases (474 U/L) e MnP (16 U/L) em extratos de 30 dias, com diferença estatística entre os tempos ($p \leq 0,05$), embora sem diferir estatisticamente para as peroxidases totais (APÊNDICE B) (**Tabela 11**). Não foram detectadas LiP e VP em nenhum dos extratos avaliados.

Shankar e Shikha (2012) em estudo com *Peniophora* sp. também observaram que a maior produção de lacase ocorreu após 22 dias de incubação, corroborando assim com os dados aqui apresentados, os quais mostraram maiores valores dessa atividade enzimática em períodos de incubação a partir dos 14 dias. Alberts et al. (2009) em estudo de descoloração de corante Poly-R 478 observou que *P. ostreatus* e *Peniophora* sp. apresentaram as maiores atividades de lacase em comparação com outros basidiomicetos, do mesmo modo que o aqui observado.

Aguiar et al. (2010) comentam em seu estudo com *Ceriporiopsis subvermispora*, que 2,6 % de óleo de soja nas culturas possibilitou aumento da atividade de MnP, bem como no presente estudo foi confirmado o favorecimento da produção de MnP, detectada em todos os extratos. Outros estudos, avaliando sistemas de cultivo com os mesmos gêneros de basidiomicetos observaram altas quantidades de MnP em extratos de *Peniophora* sp., por Bonugli-Santos et al. (2012), bem como *P. ostreatus*, por Salame et al. (2013), e ainda nesse último os autores observaram a capacidade de descoloração de corante monoazo pela MnP testada.

Em mini revisão recente, Knop et al. (2015) comenta a potencialidade de aplicações das peroxidases de *P. ostreatus*, confirmando assim a ampla gama de usos para essa enzima, incluindo degradação de moléculas orgânicas. Moreira Neto et al. (2013) em estudo semelhante, empregando meio mínimo para o crescimento dos

basidiomicetos, observou que apenas essa mesma linhagem de *T. villosa* CCIBt 2628 produziu MnP, diferente do que foi aqui observado, onde as condições de cultivo favoreceram a expressão dessa enzima pelos três basidiomicetos. Já outro estudo realizado com essas mesmas linhagens de *Peniophora cinerea* CCIBt 2541 e *Trametes villosa* CCIBt 2628, em fermentação sólida, Machado et al. (2005) observaram que esses dois basidiomicetos são capazes de produzir MnP durante descoloração de CI Reactive Blue 19, desde que em condições favoráveis. Martinez et al. (1996) comentam ainda que, em meio líquido, o tipo de fonte de nitrogênio pode favorecer ou não a produção dessa enzima, uma vez que *Pleurotus eryngii* cultivado na presença de tartarato de amônio não produziu MnP, mas na presença de peptona produziu 3 U/mL dessa enzima. Já Kiran et al. (2012) em estudo com *P. ostreatus* observaram que em meio líquido, na presença de 10 % de Tween 80 associado a 0,1 % de oxalato de amônio, esse basidiomiceto foi capaz de produzir cerca de 100 U/mL de MnP, corroborando com o estímulo para produção dessa enzima, igualmente ao aqui observado.

Tabela 11 - Atividades enzimáticas produzidas por basidiomicetos, durante cultivo líquido em meio enriquecido, para aplicação na descoloração *in vitro*.

Tempo (dias)	<i>P. ostreatus</i>		Tukey	<i>P. cinerea</i>		Tukey	<i>T. villosa</i>		Tukey	Atividade Enzimática [U/L]
	Média	DP		Média	DP		Média	DP		
0	0,00	0,00	c	0,00	0,00	b	0,00	0,00	b	Fenoloxidasas
3	0,00	0,00	c	25,21	23,54	b	60,34	28,13	ab	
7	0,00	0,00	c	263,04	109,09	ab	203,05	23,38	ab	
10	0,00	0,00	c	467,63	118,84	ab	158,24	197,29	ab	
14	45,91	47,08	c	656,23	315,71	a	397,56	264,99	ab	
21	172,60	31,67	b	595,73	114,83	a	41,05	42,68	b	
30	248,17	18,52	a	579,88	388,13	a	509,81	353,84	a	
0	0,00	0,00	c	0,00	0,00	b	0,00	0,00	b	Lacases
3	0,00	0,00	c	75,93	32,50	b	48,46	24,04	ab	
7	0,00	0,00	c	294,47	48,82	ab	161,95	129,62	ab	
10	0,00	0,00	c	426,27	148,32	ab	211,08	162,44	ab	
14	26,93	16,16	c	821,67	417,40	a	407,44	319,31	ab	
21	136,33	24,09	b	466,86	45,44	ab	68,68	78,45	ab	
30	223,47	39,56	a	627,83	385,39	a	474,83	323,53	a	
0	0,00	0,00	a	0,00	0,00	a	0,00	0,00	a	Peroxidasas Totais
3	0,00	0,00	a	0,00	0,00	a	11,88	4,09	a	
7	0,00	0,00	a	0,00	0,00	a	41,10	117,63	a	
10	0,00	0,00	a	41,36	71,85	a	0,00	0,00	a	
14	18,98	63,14	a	0,00	0,00	a	0,00	0,00	a	
21	36,27	12,42	a	128,87	76,79	a	0,00	0,00	a	
30	24,69	27,86	a	0,00	0,00	a	34,98	83,42	a	
0	0,00	0,00	b	0,00	0,00	a	0,00	0,00	b	MnP
3	0,00	0,00	b	0,00	0,00	a	0,00	0,00	b	
7	0,00	0,00	b	0,23	0,40	a	0,00	0,00	b	
10	0,00	0,00	b	1,73	2,99	a	0,00	0,00	b	
14	7,14	5,26	b	10,76	7,67	a	1,41	2,45	b	
21	82,12	62,47	a	21,05	7,51	a	0,00	0,00	b	
30	142,73	37,93	a	56,65	79,67	a	16,37	9,70	a	

Letras iguais significam igualdade estatística; DP = desvio padrão; Tukey = médias comparadas por Tukey; áreas em destaque representam maiores valores.

Foi feita análise de correlação entre as atividades enzimáticas (U/g de biomassa) em função da descoloração do corante RB222 (% de descoloração/g de biomassa . L⁻¹), onde foram obtidos o coeficiente de Pearson (p) e sua a probabilidade (p) (APÊNDICE B), tais dados estão apresentados na **Tabela 12**. A descoloração de 0,03% de corante apresentou correlação positiva forte (p = 0,719) com lacases de *P. ostreatus* e correlação positiva moderada (p = 0,691) com as MnP de *P. ostreatus*. A descoloração da

concentração mais baixa de corante (0,00003 %) apresentou correlação positiva moderada ($p = 0,534$) com as lacases desse mesmo basidiomiceto. *T. villosa* apresentou correlação positiva fraca ($p = 0,377$) entre suas MnP e a descoloração de 0,03 % de RB222. Da mesma forma, Ballaminut et al. (2014b) em estudo com *Lentinus crinitus* na degradação de pentaclorofenol em solo, com adição de 2,5 % dessa mesma fonte de ácido graxo, observaram que lacase e MnP foram produzidas durante cultivo desse basidiomiceto, sendo que seus máximos coincidiram com as máximas degradações observadas, sugerindo que essas atividades enzimáticas podem estar diretamente envolvidas no processo degradativo, embora não tenham feito análise de correlação.

A descoloração de 0,03 % de corante apresentou correlação negativa moderada com lacases de *P. cinerea* ($p = - 0,400$) e a descoloração nas concentrações mais baixas apresentaram correlação com as MnP de *P. cinerea*: negativa moderada ($p = - 0,650$) com a descoloração de 0,0003 % e positiva moderada ($p = 0,413$) com 0,00003 %. Tais dados sugerem inibição das atividades enzimáticas pela presença de corante, uma vez que foi observada correlação negativa nas mais altas concentrações testadas, sendo esse efeito inibitório um fator já mencionado em revisões recentes que falam de processos de descoloração por micro-organismos (ALI, 2010; KAUSHIK; MALIK, 2009).

Tabela 12 - Correlação entre atividades enzimáticas nos extratos brutos de basidiomicetos e descoloração *in vitro* de RB222, por grama de biomassa seca, durante cultivo líquido.

Fungo	Atividade Enzimática	Coefficiente de Pearson	Valor P	Correlação
0,03 % RB222				
<i>P. ostreatus</i>	Lacase	0,719	0,000	positiva forte
	MnP	0,691	0,001	positiva moderada
<i>P. cinerea</i>	Lacase	-0,400	0,081	negativa moderada
	MnP	-0,217	0,359	sem correlação
<i>T. villosa</i>	Lacase	0,200	0,384	sem correlação
	MnP	0,377	0,092	positiva fraca
0,0003 % RB222				
<i>P. ostreatus</i>	Lacase	0,314	0,165	sem correlação
	MnP	0,204	0,376	sem correlação
<i>P. cinerea</i>	Lacase	-0,301	0,196	sem correlação
	MnP	-0,650	0,002	negativa moderada
<i>T. villosa</i>	Lacase	-0,131	0,572	sem correlação
	MnP	0,200	0,385	sem correlação
0,00003 % RB222				
<i>P. ostreatus</i>	Lacase	0,534	0,013	positiva moderada
	MnP	0,264	0,247	sem correlação
<i>P. cinerea</i>	Lacase	0,005	0,984	sem correlação
	MnP	0,413	0,070	positiva moderada
<i>T. villosa</i>	Lacase	-0,334	0,139	sem correlação
	MnP	-0,038	0,872	sem correlação

Áreas em destaque representam correlação significativa.

A caracterização do inóculo fúngico aqui descrita possibilita uso dos resultados para aplicação em estudos de descoloração *in vivo*, embora seja necessário avaliar ainda outras atividades enzimáticas, uma vez que há evidências de que existem enzimas associadas ao micélio fúngico, que podem interferir no processo biotecnológico e que pela remoção da biomassa, no estudo aqui apresentado, não puderam ser avaliadas. Li et al. (2014) em estudo de descoloração de corantes, incluindo Congo Red, um corante diazo, observaram pequena diferença entre a descoloração *in vitro* e *in vivo*, comentando entretanto a vantagem no tratamento *in vivo*, principalmente quanto a mediação enzimática de forma eficiente. Ainda outros autores comentam a possibilidade desse mecanismo de mediação (RODRIGUEZ et al., 1999; SVOBODOVA et al., 2008).

Confirmando essa premissa Hadibarata et al. (2013) observaram que *Pleurotus eryngii* foi capaz de descolorir 0,003 % CI Reactive Black 5 *in vivo* na presença de Tween 80, sendo essa a maior concentração de corante testada por esses autores. Ainda

é importante lembrar que estudos semelhantes empregam concentrações menores de 0,03 % de corantes (MOREIRA NETO et al., 2011; SHAHID et al., 2013; CHAIRIN et al., 2013; HADIBARATA et al., 2012b; JIANG et al., 2013; MOREIRA NETO et al., 2014; SI, et al., 2013; SVOBODOVA et al., 2008), sendo esse um diferencial do presente estudo.

4.3. Experimento 3

Os tratamentos empregando *P. ostreatus* apresentaram alta descoloração associada a produção de atividades enzimáticas, onde os dados observados em 24 horas estão descritos na **Tabela 13**. A máxima descoloração observada foi de 92,62 %, quando as máximas atividades de fenoloxidasas (395,09 U/L) e de lacases (422,87 U/L) foram observadas. Contudo quando ocorreu a máxima atividade de MnP (134,39 U/L) a descoloração foi de apenas 7,27 %. Não foi detectada LiP nem VP em nenhum dos extratos avaliados.

Tabela 13 - Descoloração a 610nm e atividades enzimáticas produzidas pelos tratamentos avaliados empregando *Pleurotus ostreatus* CCIBt 2347, apresentados com os fatores não codificados e codificados (entre parênteses).

Tratamento	Fatores			Descoloração (%)	Fenoloxidasas (U/L.dia ⁻¹)	Lacases (U/L.dia ⁻¹)	MnP (U/L.dia ⁻¹)
	Cu ⁺² (mM)	Mn ⁺² (mM)	Idade (dias)				
1	0,446 (-1)	0,285 (-1)	11 (-1)	2,00	0,00	0,00	0,00
2	0,861 (+1)	0,285 (-1)	11 (-1)	2,56	44,68	29,40	0,00
3	0,446 (-1)	0,821 (+1)	11 (-1)	0,00	4,21	9,72	0,00
4	0,861 (+1)	0,821 (+1)	11 (-1)	0,58	0,00	0,00	0,00
5	0,446 (-1)	0,285 (-1)	25 (+1)	0,00	297,09	225,33	13,26
6	0,861 (+1)	0,285 (-1)	25 (+1)	0,00	324,87	215,30	6,82
7	0,446 (-1)	0,821 (+1)	25 (+1)	63,63	332,59	223,78	9,83
8	0,861 (+1)	0,821 (+1)	25 (+1)	47,70	334,90	213,75	8,79
9	0,307 (-1,68)	0,553 (0)	18 (0)	4,83	169,92	136,35	128,64
10	1 (+1,68)	0,553 (0)	18 (0)	5,05	165,29	138,90	8,56
11	0,654 (0)	0,106 (-1,68)	18 (0)	7,27	155,11	130,80	134,39
12	0,654 (0)	1 (+1,68)	18 (0)	50,75	364,38	220,39	47,27
13	0,654 (0)	0,553 (0)	7 (-1,68)	2,57	0,00	0,00	0,00
14	0,654 (0)	0,553 (0)	29 (+1,68)	92,62	395,09	422,87	19,56
15a	0,654 (0)	0,553 (0)	18 (0)	5,05	236,36	207,19	50,29
15b	0,654 (0)	0,553 (0)	18 (0)	7,44	179,10	135,58	34,32
15c	0,654 (0)	0,553 (0)	18 (0)	3,10	194,69	159,81	36,82

Áreas em destaque representam os maiores valores.

A partir dos dados reais obtidos foi feita análise de superfície de resposta (APÊNDICE C), originando equações quadráticas para cada variável avaliada. Os

coeficientes de regressão obtidos para os tratamentos com *P. ostreatus* estão listados na **Tabela 14**, onde manganês mostrou efeito significativo no termo linear para descoloração, fenoloxidasas e lacases e no termo quadrático para fenoloxidasas e lacases ($p < 0,1$).

A idade fisiológica mostrou efeito significativo no termo linear para a descoloração, fenoloxidasas e lacases ($p < 0,05$) e no termo quadrático apenas para a descoloração e fenoloxidasas ($p < 0,1$). Houve efeito significativo apenas para a interação entre manganês e a idade fisiológica na descoloração ($p = 0,016$). Os modelos matemáticos obtidos se ajustam para a predição de valores para os fatores significativos.

Tabela 14 - Coeficiente de regressão para descoloração a 610 nm, atividade de fenoloxidasas, de lacase e MnP de *Pleurotus ostreatus* CCIBt 2347.

Fator	Descoloração		Fenoloxidasas		Lacase		MnP	
	Coeficiente de Regressão	Valor p	Coeficiente de Regressão	Valor p	Coeficiente de Regressão	Valor p	Coeficiente de Regressão	Valor p
Constante	0,82	0,088 *	-333,725	0,004 ***	-626,156	0,002 ***	254,373	0,817
Cu ⁺² (L)	2,31	0,944	420,735	0,894	919,287	0,824	-619,067	0,247
Cu ⁺² (Q)	-1,35	0,396	-330,06	0,154	-499,968	0,084	399,294	0,413
Mn ⁺² (L)	-2,48	0,021 **	239,819	0,089 **	681,38	0,054 **	-406,761	0,192
Mn ⁺² (Q)	0,732	0,442	-304,92	0,044 **	-413,967	0,027 **	269,845	0,360
Idade (L)	-0,1261	0,005 ***	21,5579	0,047 **	23,5901	0,019 **	13,7686	0,766
Idade (Q)	0,00282	0,099*	-0,392552	0,097 *	-0,299032	0,264	-0,330861	0,491
Cu ⁺² x Mn ⁺²	-0,2	0,869	146,066	0,467	-256,274	0,298	24,5894	0,955
Cu ⁺² x Idade	-0,0237	0,684	-4,19276	0,604	-6,29986	0,518	-1,38491	0,938
Mn ⁺² x Idade	0,1372	0,016 **	-3,17258	0,612	-7,74043	0,317	-0,209255	0,988

(L) = fator linear; (Q) = fator quadrático; * = diferença estatística com probabilidade de 90%; ** = diferença estatística com probabilidade de 95%; *** = diferença estatística com probabilidade de 99%.

A análise de variância dos modelos matemáticos obtidos para cada variável apoiou a capacidade de predizer resultados para a descoloração ($p = 0,027$) e para a produção de lacases ($p = 0,082$), no entanto não apoiou a predição de dados para fenoloxidasas ($p = 0,171$) e para MnP ($p = 0,672$), indicando que esses fatores não apresentaram efeito significativo para a descoloração. Assim sendo, foram estimados os dados para as variáveis que apresentaram significância. Os valores estimados para *P. ostreatus* mostraram descoloração máxima (acima de 90 %) quando a concentração de manganês estava acima de 0,821 mM, combinada com qualquer concentração de cobre e empregando cultivos de 25 e 29 dias. A máxima atividade de lacases foi de cerca de 120 U/L empregando cultivos de 25 e 29 dias, quando 0,654 mM de cobre e 0,285 mM de manganês estavam presentes no meio de cultivo (**Tabela 15**).

Tabela 15 - Valores estimados para a descoloração a 610 nm *in vivo* de RB222 e lacase produzida por *Pleurotus ostreatus* CCIBt 2347 durante contato *in vivo*.

Contato <i>in vivo</i> :													
Descoloração <i>in vivo</i>						Lacases [U/L]							
Cu ⁺² (mM)													
0,307 0,446 0,654 0,861 1,000						0,307 0,446 0,654 0,861 1,000							
Idade fisiológica (dias)	7	17,7	29,2	37,8	33,7	24,4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,106	Mn ⁺² (mM)
		4,5	11,7	18,2	15,1	8,5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,285	
		0,1	1,1	3,9	2,4	0,3	0,00	0,00	10,4	5,4	0,00	0,553	
		2,7	0,1	0,4	0,0	0,7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,821	
		3,9	0,4	0,1	0,0	1,4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,000	
	11	2,6	7,9	12,2	8,4	3,2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,106	
		0,2	2,6	5,4	2,9	0,3	0,00	0,00	27,7	31,8	10,4	0,285	
		0,3	0,4	1,9	0,6	0,2	0,00	16,7	49,6	39,4	8,5	0,553	
		0,2	0,6	2,2	0,7	0,1	0,00	0,00	12,0	0,00	0,00	0,821	
		0,0	2,0	4,5	2,3	0,1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,000	
	18	0,9	0,0	0,2	0,3	3,8	0,00	2,2	49,8	54,2	33,1	0,106	
		0,2	0,3	0,8	0,0	2,1	0,3	49,8	87,9	82,8	55,3	0,285	
		1,3	4,5	6,2	2,4	0,0	31,5	71,5	95,2	75,9	38,9	0,553	
		13,8	21,4	24,5	16,7	7,8	3,2	33,7	43,1	9,6	0,00	0,821	
		33,5	43,2	46,9	37,4	24,6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,000	
	25	0,6	0,0	0,0	1,7	8,4	2,2	51,9	90,4	85,6	58,4	0,106	
		2,0	4,7	4,8	0,8	0,5	46,4	89,8	118,7	104,5	70,9	0,285	
		28,3	35,4	35,6	23,7	11,5	63,1	97,0	111,5	83,1	40,0	0,553	
		78,2	84,1	84,3	73,8	58,5	20,3	44,6	44,9	2,3	0,00	0,821	
		99,4	100,0	100,0	98,3	91,8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,000	
	29	0,3	1,4	1,0	0,3	5,0	20,9	67,2	100,4	90,4	59,7	0,106	
		13,3	17,9	16,6	7,1	0,9	59,6	99,5	123,2	103,7	66,6	0,285	
		65,2	71,1	69,5	55,0	37,6	68,0	98,4	107,7	74,1	27,4	0,553	
		99,8	98,9	99,3	99,6	94,4	16,9	37,7	32,8	0,00	0,00	0,821	
		73,0	67,2	68,8	81,6	93,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,000	

Áreas em destaque representam valores máximos, quanto mais escuros maior o valor.

Na análise de correlação entre a descoloração e as enzimas produzidas por *P. ostreatus*, o coeficiente de Pearson para fenoloxidasas foi de 0,516 ($p = 0,034$), apresentando correlação positiva moderada significativa. Para lacase o coeficiente foi de 0,571 ($p = 0,017$), apresentando também correlação positiva moderada significativa. Já MnP apresentou coeficiente de -0,006 ($p = 0,983$), mostrando não ter correlação com a descoloração observada. Com base nos dados preditos, exibidos na **Tabela 15**, e a análise de correlação, é possível observar que quando ocorrem as maiores taxas de descoloração pode não haver produção de lacase, confirmando que, apesar dessa enzima

estar correlacionada com a descoloração de RB222 por esse fungo, é sabido que o processo de descoloração é promovido por um mecanismo ligninolítico complexo, contendo enzimas e compostos de baixa massa molar, não sendo possível atribuir apenas à lacase a responsabilidade pela descoloração observada, embora a correlação observada nos permita inferir que esta enzima tem importante participação na descoloração do corante.

A análise pelo otimizador de resposta visando maximizar a descoloração, sugeriu a seguinte configuração ótima: 0,51 mM de cobre empregando cultivos de 29 dias de incubação. Embora a ferramenta sugira usar a concentração de 1 mM de manganês, este elemento não mostrou ter efeito significativo na descoloração dentro do intervalo de concentração analisado, podendo se utilizar qualquer concentração entre 0,106 e 1 mM de Mn^{+2} . Foi feita também a otimização de resposta para a atividade de lacases, uma vez que a descoloração mostrou correlação com a produção dessa enzima, e a configuração sugerida foi de 0,65 mM de cobre empregando cultivo de 27,89 dias de incubação, para qualquer concentração de manganês. Da mesma forma, Karp et al. (2012), em estudo de caracterização de lacases de *P. ostreatus*, comentam a indução da atividade de lacase pela presença de 150 μM de sulfato de cobre, associado a outros componentes testados. Kiran et al. (2012) estudando a descoloração de RB222 por *P. ostreatus*, também observaram que 1mM de sulfato de cobre favoreceu não apenas a produção de lacase (38,2 U/mL), mas também a descoloração (96,16 %), sendo observados os maiores valores na presença desse sal. Fica evidente ainda que uma característica importante do processo é a dinâmica, uma vez que as condições que favorecem a máxima descoloração a 610 nm nem sempre coincidem com as condições que favorecem as máximas produções das enzimas ligninolíticas.

Os tratamentos constituintes do bloco experimental empregando *T. villosa* apresentaram descoloração associada a produção de atividades enzimáticas, e os dados observados em 24 horas de contato *in vivo* estão apresentados na **Tabela 16**. A máxima descoloração observada foi de 38,41 %, quando havia pouca atividade de lacase (36,11 U/L) e nenhuma atividade de MnP. Também não foram detectadas atividades de LiP e VP em nenhum dos extratos avaliados.

Tabela 16 - Descoloração a 610 nm e atividades enzimáticas produzidas pelos tratamentos com *Trametes villosa* CCIBt 2628, apresentados com os fatores não codificados e codificados (entre parênteses).

Tratamento	Fatores			Descoloração (%)	Fenoloxidasas (U/L.dia ⁻¹)	Lacases (U/L.dia ⁻¹)	MnP (U/L.dia ⁻¹)
	Cu ⁺² (mM)	Mn ⁺² (mM)	Idade (dias)				
1	0,446 (-1)	0,285 (-1)	11 (-1)	0,10	11,96	62,43	1,82
2	0,861 (+1)	0,285 (-1)	11 (-1)	5,34	396,79	217,61	0,00
3	0,446 (-1)	0,821 (+1)	11 (-1)	13,07	150,17	135,35	0,00
4	0,861 (+1)	0,821 (+1)	11 (-1)	9,48	115,29	261,60	0,85
5	0,446 (-1)	0,285 (-1)	25 (+1)	0,00	140,75	77,32	0,00
6	0,861 (+1)	0,285 (-1)	25 (+1)	0,00	195,39	195,39	0,00
7	0,446 (-1)	0,821 (+1)	25 (+1)	0,00	311,60	251,41	0,00
8	0,861 (+1)	0,821 (+1)	25 (+1)	38,41	411,14	36,11	0,00
9	0,307 (-1,68)	0,553 (0)	18 (0)	1,21	855,62	516,40	8,03
10	1 (+1,68)	0,553 (0)	18 (0)	20,48	357,44	355,43	6,29
11	0,645 (0)	0,106 (-1,68)	18 (0)	11,57	645,27	598,35	12,05
12	0,654 (0)	1 (+1,68)	18 (0)	9,91	761,79	562,85	0,00
13	0,654 (0)	0,553 (0)	7 (-1,68)	7,54	54,63	37,12	0,00
14	0,654 (0)	0,553 (0)	29 (+1,68)	0,00	14,04	181,73	0,00
15a	0,654 (0)	0,553 (0)	18 (0)	10,53	734,32	515,16	6,97
15b	0,654 (0)	0,553 (0)	18 (0)	14,72	625,51	475,04	0,00
15c	0,654 (0)	0,553 (0)	18 (0)	15,50	121,92	103,40	0,00

Áreas em destaque representam valores máximos, quanto mais escuros maior o valor.

A partir dos dados reais obtidos foi feita análise de superfície de resposta (APÊNDICE C), os coeficientes de regressão obtidos para os tratamentos com *Trametes villosa* estão listados na **Tabela 17**, onde observou-se efeito significativo das concentrações de cobre no termo linear ($p = 0,054$), bem como a idade fisiológica no termo linear ($p = 0,100$) para descoloração, não se ajustando para os demais fatores, nem tampouco para as atividades de fenoloxidasas, lacases e MnP, exceto a concentração de manganês que mostrou alguma significância no termo quadrático para MnP ($p = 0,113$).

Tabela 17 - Coeficiente de regressão para descoloração a 610 nm, atividade de fenoloxidasas, de lacase e de MnP produzidas por *Trametes villosa* CCIBt 2628.

Fator	Descoloração		Fenoloxidasas		Lacase		MnP	
	Coeficiente de Regressão	Valor <i>p</i>	Coeficiente de Regressão	Valor <i>p</i>	Coeficiente de Regressão	Valor <i>p</i>	Coeficiente de Regressão	Valor <i>p</i>
Constante	-0,1	0,005 ***	-25,6938	0,131	-1391,49	0,146	4,82002	0,437
Cu ⁺² (L)	0,3	0,054 **	-1005,13	0,484	1709,37	0,998	27,3965	0,160
Cu ⁺² (Q)	-0,95	0,440	1059,52	0,395	-283,221	0,833	2,24054	0,973
Mn ⁺² (L)	-0,26	0,133	475,473	0,758	571,048	0,205	-77,7132	0,336
Mn ⁺² (Q)	-0,354	0,628	-172,057	0,814	3,60795	0,996	70,3525	0,113 *
Idade (L)	0,0289	0,263	41,9507	0,472	103,536	0,885	-0,0418314	0,956
Idade (Q)	-0,00219	0,100 *	-1,17186	0,346	-3,11897	0,046	0,0166236	0,803
Cu ⁺² x Mn+2	0,93	0,411	-802,571	0,479	-2040,7	0,130	-4,40028	0,943
Cu ⁺² x Idade	0,0485	0,301	-5,41417	0,905	-11,6712	0,816	-0,494374	0,843
Mn ⁺² x Idade	0,018	0,611	16,3114	0,645	27,54	0,487	-0,383222	0,843

(L) = fator linear; (Q) = fator quadrático; (Q) = fator quadrático; * = diferença estatística com probabilidade de 90%; ** = diferença estatística com probabilidade de 95%; *** = diferença estatística com probabilidade de 99%.

As equações de regressão para estimar os dados das variáveis avaliadas para *T. villosa* não predizem resultados com níveis de confiança significativo, uma vez que a análise de variância não apoia os modelos matemáticos para descoloração ($p = 0,238$), para fenoloxidasas ($p = 0,821$), lacase ($p = 0,356$) e MnP ($p = 0,629$). No entanto, a solução apresentada pelo otimizador de resposta, para maximizar a descoloração nos tratamentos empregando esse fungo, mostrou a seguinte configuração de fatores: 1 mM de cobre, 1 mM de manganês e 21,6667 dias.

Foi feita análise de correlação entre a descoloração e as atividades enzimáticas produzidas por esse basidiomiceto, onde o coeficiente de Pearson (p) para fenoloxidasas foi de 0,241 ($p = 0,351$), para lacase foi de 0,036 ($p = 0,892$) e para MnP 0,091 ($p = 0,729$), sem mostrar correlação dessas atividades com a descoloração observada.

Diante da impossibilidade em se estimar dados para os tratamentos com esse basidiomiceto, considerou-se a configuração onde ocorreu a maior descoloração real (38,41 %), onde 0,861 mM de cobre e 0,821 mM de manganês estavam presentes, com 25 dias.

A **Tabela 18** apresenta a descoloração e produção de atividades enzimáticas, em 24 horas, observadas nos tratamentos com *P. cinerea*. A máxima descoloração foi de 31,65 %, quando 961,34 U/L de fenoloxidasas, 491,86 U/L de lacases e 8,68 U/L de

MnP estavam presentes nos sistemas. LiP e VP não foram detectadas em nenhum dos extratos avaliados.

Tabela 18 - Descoloração a 610 nm e atividades enzimáticas produzidas pelos tratamentos com *Peniophora cinerea* CCIBt 2541, apresentados com os fatores não codificados e codificados (entre parênteses).

Tratamento	Fatores			Descoloração (%)	Fenoloxidasas (U/L.dia ⁻¹)	Lacases (U/L.dia ⁻¹)	MnP (U/L.dia ⁻¹)
	Cu ⁺² (mM)	Mn ⁺² (mM)	Idade (dias)				
1	0,446 (-1)	0,285 (-1)	11 (-1)	0,00	395,48	186,74	3,09
2	0,861 (+1)	0,285 (-1)	11 (-1)	10,55	649,13	532,91	2,38
3	0,446 (-1)	0,821 (+1)	11 (-1)	8,70	853,31	639,87	4,65
4	0,861 (+1)	0,821 (+1)	11 (-1)	10,46	769,04	596,81	8,18
5	0,446 (-1)	0,285 (-1)	25 (+1)	0,00	1147,93	893,59	33,94
6	0,861 (+1)	0,285 (-1)	25 (+1)	0,00	1466,78	825,07	30,89
7	0,446 (-1)	0,821 (+1)	25 (+1)	0,00	753,53	773,21	10,53
8	0,861 (+1)	0,821 (+1)	25 (+1)	7,73	658,39	466,70	8,79
9	0,307 (-1,68)	0,553 (0)	18 (0)	31,65	961,34	491,86	8,68
10	1 (+1,68)	0,553 (0)	18 (0)	16,19	993,91	810,25	20,17
11	0,645 (0)	0,106 (-1,68)	18 (0)	13,45	895,60	932,17	55,15
12	0,645 (0)	1 (+1,68)	18 (0)	25,42	776,14	659,00	3,35
13	0,645 (0)	0,553 (0)	7 (-1,68)	5,66	588,70	409,99	0,00
14	0,645 (0)	0,553 (0)	29 (+1,68)	16,23	624,59	600,36	8,94
15a	0,645 (0)	0,553 (0)	18 (0)	14,57	1125,55	753,92	21,34
15b	0,645 (0)	0,553 (0)	18 (0)	22,80	686,78	749,67	9,85
15c	0,645 (0)	0,553 (0)	18 (0)	25,25	1152,41	958,41	7,27

Os coeficientes de regressão (APÊNDICE C) para os fatores testados com *P. cinerea* estão apresentados na **Tabela 19**, onde o manganês no termo quadrático ($p = 0,103$) e as interações com esse metal ($p < 0,05$) apresentaram significância para fenoloxidasas, bem como manganês no termo linear também apresentou significância para lacases ($p = 0,082$). No entanto, os modelos matemáticos para todas as variáveis avaliadas com esse basidiomiceto não apresentaram efeito significativo, não podendo ser empregados para estimar dados, uma vez que não foram apoiados pela análise de variância ($p > 0,1$).

Tabela 19 - Coeficiente de regressão para descoloração a 610 nm, atividade de fenoloxidasas, de lacase e MnP produzidas por *Peniophora cinerea* CCIBt 2541.

Fator	Descoloração		Fenoloxidasas		Lacase		MnP	
	Coeficiente de Regressão	Valor <i>p</i>	Coeficiente de Regressão	Valor <i>p</i>	Coeficiente de Regressão	Valor <i>p</i>	Coeficiente de Regressão	Valor <i>p</i>
Constante	-1,37	0,010 ***	-2717,44	0,007 ***	-966,411	0,517	-21,2818	0,608
Cu ⁺² (L)	1,76	0,719	4151,5	0,395	3251,32	0,831	62,8981	0,605
Cu ⁺² (Q)	-1,14	0,524	-2666,04	0,115	-1841,29	0,367	-74,6597	0,588
Mn ⁺² (L)	1,33	0,380	6052,41	0,374	-889,132	0,082 **	-187,645	0,219
Mn ⁺² (Q)	-0,95	0,381	-1667,4	0,103 *	-205,005	0,863	82,5701	0,331
Idade (L)	0,948	0,680	32,9622	0,946	57,4278	0,464	6,7005	0,902
Idade (Q)	-0,0026	0,166	-0,697079	0,650	-0,596813	0,762	-0,126458	0,365
Cu ⁺² x Mn ⁺²	-0,04	0,979	-3994,93	0,022 **	700,272	0,702	148,416	0,259
Cu ⁺² x Idade	-0,0073	0,911	71,7127	0,236	-72,8555	0,341	-1,89178	0,712
Mn ⁺² x Idade	-0,0012	0,982	-100,083	0,052 **	5,31532	0,926	-1,46969	0,711

(L) = fator linear; (Q) = fator quadrático; (Q) = fator quadrático; * = diferença estatística com probabilidade de 90%; ** = diferença estatística com probabilidade de 95%; *** = diferença estatística com probabilidade de 99%.

A análise de correlação entre a descoloração e as atividades enzimáticas não apresentou significância para fenoloxidasas (Pearson = - 0,122; *p* = 0,641), nem para lacases (Pearson = - 0,087; *p* = 0,74) ou para MnP (Pearson = - 0,265; *p* = 0,304). Contudo, a análise otimização de resposta foi feita apenas para a descoloração, a qual sugeriu a seguinte configuração de fatores: 0,706 mM de cobre, 0,6749 mM de manganês, empregando cultivo de 17 dias. Diferentemente, a máxima descoloração real (31,65 %) foi observada na presença de 0,307 mM de cobre e 0,553 mM de manganês, coincidindo contudo com a idade fisiológica (18 dias). Shankar e Shikha (2015) avaliaram lacase bruta de *Peniophora* sp. na descoloração de corantes sintéticos e observaram maiores atividades de lacases quando 1mM de cobre e de manganês estavam presentes. No entanto, esses mesmos autores observaram maiores descolorações quando 0,5 a 1 mM de cobre, com 0,5 ou 10 mM de manganês estavam presentes no meio.

A literatura confirma que os metais diretamente envolvidos no ciclo catalítico das principais enzimas ligninolíticas podem regular sua expressão, quando adicionados ao meio de cultivo, como é o caso do Mn⁺² e do Cu⁺², podendo ainda maximizar suas produções (AKPINAR; UREK, 2012; HU et al., 2009; LORENZO et al., 2006; PALMIERI et al., 2000; TEN HAVE; TEUNISSEN, 2001; WONG, 2009). Baldrian e Gabriel (2002) acrescentam ainda que a presença de Cu⁺² pode afetar positivamente a

atividade e a estabilidade da lacase de *P. ostreatus*. Outros estudos também mostraram indução e/ou favorecimento da descoloração de diferentes corantes na presença desses metais (KAUSHIK; MALIK, 2009; KIRAN et al., 2012; MOREIRA et al., 2000). O manganês (Mn^{+2}) também apresenta funções múltiplas no cultivo de fungos, tendo seu papel como indutor de MnP bem fundamentado na literatura (KAUSHIK; MALIK, 2009; TEN HAVE; TEUNISSEN, 2001; WONG 2009), bem como mediador do processo de descoloração de RB222 por *P. ostreatus* e por *Phanerochaete chrysosporium*, favorecendo maiores taxas de descoloração e maior produção enzimática (KIRAN et al., 2012). Lorenzo et al. (2006) em outro estudo comenta que 3,5 mM de Cu^{+2} favoreceram a atividade de lacases (8277 U/L), bem como a presença de Mn^{+2} (1 mM) favoreceu a produção de 938U/L dessa mesma enzima, por *Trametes versicolor* em avaliação de descoloração de índigo carmine, sendo a produção de lacase e suas isoenzimas um fator importante do processo.

Outro fator importante avaliado aqui é o efeito da idade fisiológica do cultivo para aplicação em processos biotecnológicos, uma vez que diferentes estudos vem mostrando que os fungos respondem diferentemente a cada situação (BALLAMINUT; MATHEUS, 2007; MAZMANCI; UNYAYAR, 2005). Ballaminut et al. (2014b) comentam que a melhor idade fisiológica para a degradação do poluente em fermentação sólida de *Lentinus crinitus* não está vinculada à máxima colonização do substrato, nem à maior produção enzimática, mas sim ao melhor momento favorável a promover a degradação do poluente de interesse, associado à presença das enzimas ligninolíticas, não necessariamente seus máximos valores. Moreira Neto et al. (2011) estudando as mesmas espécies aqui estudadas, avaliaram sistemas de descoloração de CI Reactive Blue 19, empregando cultivo de 7 e 9 dias de incubação, onde ambos foram considerados aptos para uso nos tratamentos. Entretanto, os cultivos foram avaliados somente até os nove dias de incubação, momento em que os maiores valores de descoloração ocorreram, evidenciando assim a necessidade em se obter mais detalhes sobre o momento ótimo para início do tratamento *in vivo*, além dos 9 dias de incubação. Foi nesse contexto, e frente aos dados obtidos, considerando os dados reais e preditos, além da análise de correlação, que foram selecionadas as configurações consideradas ótimas para os fatores:

- a) *P. ostreatus* emprega cultivo com 25 dias, contendo 0,446 mM de cobre e 0,821 mM de manganês;

- b) *T. villosa* emprega cultivo com 25 dias, contendo 1 mM de cobre e de manganês;
- c) *P. cinerea* emprega cultivo com 18 dias, contendo 1 mM de cobre e 0,106 mM de manganês.

4.4. Experimento 4

As descolorações e as atividades enzimáticas produzidas por *P. ostreatus* estão apresentadas na **Tabela 20**, onde a máxima descoloração a 610 nm foi de 92,98 %, em 24 horas, juntamente com 28,90 % de descoloração a 526 nm, quando foram produzidas 348,02 U/L de fenoloxidasas, 4,91 U/L de MnP e 331,05 U/L de lacases, sendo esse o máximo de lacases observado nos tratamentos. Nessa mesma condição ocorreu a máxima descoloração a 610 nm após 48 horas (99,79 %), acompanhada de 59,82 % de descoloração a 526 nm, quando 333,36 U/L de fenoloxidasas, 4,91 U/L de MnP e 319,62 U/L de lacases foram produzidos.

Tabela 20 - Descoloração e atividades enzimáticas (U/L.dia⁻¹) produzidas por *Pleurotus ostreatus* CCIBt 2347, seus fatores não codificados e codificados (entre parênteses). Áreas em destaque representam maiores valores.

Tratamento	Fatores			Descoloração _{410nm}		Descoloração _{520nm}		Fenoloxidas		Lacases		MnP	
	ABTS (mM)	RBBR (µM)	Ácido graxo (%)	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
1	0,4 (-1)	0,04 (-1)	1 (-1)	79,38	97,66	9,89	26,52	262,37	429,05	295,55	354,20	0,55	0,55
2	1,6 (+1)	0,04 (-1)	1 (-1)	54,20	89,97	29,47	56,33	302,49	321,01	141,99	175,17	0,00	0,00
3	0,4 (-1)	0,16 (+1)	1 (-1)	64,08	95,80	30,27	63,61	291,69	304,04	222,24	275,49	8,00	8,00
4	1,6 (+1)	0,16 (+1)	1 (-1)	67,61	97,90	30,79	64,04	366,54	301,72	182,89	275,49	12,00	12,00
5	0,4 (-1)	0,04 (-1)	4 (+1)	47,42	76,49	41,90	70,66	287,06	277,03	223,78	222,24	38,91	21,23
6	1,6 (+1)	0,04 (-1)	4 (+1)	36,02	74,28	0,00	47,72	260,82	232,27	194,46	154,33	5,42	3,37
7	0,4 (-1)	0,16 (+1)	4 (+1)	44,97	77,99	36,67	63,99	297,86	278,57	227,64	240,76	0,00	0,00
8	1,6 (+1)	0,16 (+1)	4 (+1)	58,46	87,51	43,76	72,72	290,92	287,06	216,07	224,56	0,00	0,00
9	0 (-1,68)	0,1 (0)	2,5 (0)	44,36	72,65	28,28	49,48	297,86	233,82	230,73	178,10	0,00	0,00
10	2 (+1,68)	0,1 (0)	2,5 (0)	37,01	67,69	26,55	50,31	239,99	226,87	197,55	190,29	0,00	0,00
11	1 (0)	0 (-1,68)	2,5 (0)	66,24	87,17	32,11	52,67	321,79	305,12	207,58	219,31	0,00	0,00
12	1 (0)	0,2 (+1,68)	2,5 (0)	85,14	98,78	16,58	36,56	402,04	393,40	290,15	323,17	0,00	0,00
13	1 (0)	0,1 (0)	0 (-1,68)	92,98	99,79	28,90	59,82	348,02	333,36	331,05	319,62	4,91	4,91
14	1 (0)	0,1 (0)	5 (+1,68)	37,02	48,06	23,19	31,00	111,12	114,98	70,22	76,86	0,00	0,00
15a	1 (0)	0,1 (0)	2,5 (0)	47,74	80,29	22,89	42,55	329,50	313,76	260,05	253,57	0,00	0,00
15b	1 (0)	0,1 (0)	2,5 (0)	49,90	72,44	35,84	56,63	325,64	255,11	182,11	168,07	0,00	0,00
15c	1 (0)	0,1 (0)	2,5 (0)	38,45	64,85	23,82	44,45	260,82	244,46	168,22	197,70	0,00	0,00

Kaushik e Malik (2009) comentam que a descoloração de corante ocorre quando o centro cromóforo do corante é clivado, provocando a mudança do $\lambda_{\text{máx}}$, fato constatado já no Experimento inicial desse estudo. Sugere-se então que, após clivagem do primeiro grupo azo, o $\lambda_{\text{máx}}$ passou a ser em 526 nm, conforme mostra a o espectro de absorção dos tratamentos (**Figura 9**).

Zhao et al. (2007), avaliando a descoloração de corantes azo, também por *P. ostreatus*, comentam que a quebra da ligação azo (N=N) dos corantes ocorre pelo mecanismo oxidativo, formando os primeiros metabólitos identificados como sulfonatos aromáticos, sulfonatos hidroxí-aromáticos e quinonas. Adicionalmente, Lu et al. (2008) comentam que corantes azo sulfonados podem sofrer a quebra oxidativa do grupo cromóforo logo no início do processo de descoloração com *P. ostreatus*. Nesse contexto pode-se inferir que RB222 parece ter sofrido quebra da ligação azo nas primeiras 24 horas de contato, resultante da ação das lacases de *P. ostreatus* CCIBt 2347, o que conferiu mudança de cor de azul para o vermelho (526 nm). Contudo, foi observada também descoloração a 526 nm (**Tabela 20**), podendo ser esse fenômeno resultante da quebra do segundo grupo azo da molécula do corante.

Figura 9 - Espectros de absorção da fase líquida dos tratamentos de RB222 com *Pleurotus ostreatus* CCIBt 2347.

A análise de variância (APÊNDICE D) apoiou os modelos matemáticos para a descoloração a 610nm ($p = 0,008$), bem como para as atividades de MnP ($p = 0,044$) e de fenoloxidasas ($p = 0,069$) após 24 horas. Houve efeito significativo também para a descoloração a 610nm ($p = 0,022$) e para lacases ($p = 0,091$), após 48 horas. Os

coeficientes de regressão para os fatores cujos modelos matemáticos foram significativos estão apresentados na **Tabela 21**, onde foi observado efeito significativo do RBBR e do ácido graxo sobre a descoloração, indicando ainda haver interação ABTS x RBBR. Os mesmos fatores interferiam de maneiras desiguais nas atividades enzimáticas.

Tabela 21 - Coeficiente de regressão para descoloração a 610 nm e atividades enzimáticas para *Pleurotus ostreatus* CCIBt 2347.

Fator	Tempo 24 horas						Tempo 48 horas			
	Descoloração _{610nm}		Fenoloxidasas		MnP		Descoloração _{610nm}		Lacase	
	Coeficiente de Regressão	Valor <i>p</i>	Coeficiente de Regressão	Valor <i>p</i>	Coeficiente de Regressão	Valor <i>p</i>	Coeficiente de Regressão	Valor <i>p</i>	Coeficiente de Regressão	Valor <i>p</i>
Constante	1,711	0,000 ***	298,000	0,000 ***	-0,500	0,892	1,802	0,000 ***	579,000	0,001 ***
ABTS (L)	-0,149	0,342	82,800	0,357	-11,700	0,365	-0,306	0,908	-109,000	0,789
ABTS (Q)	-0,090	0,276	-53,900	0,187	4,250	0,394	0,070	0,578	-5,700	0,902
RBBR (L)	-7,760	0,147	-1529,000	0,130	35,000	0,575	-7,150	0,097 *	-3751,000	0,529
RBBR (Q)	28,130	0,008 ***	3634,000	0,357	425,000	0,394	38,000	0,016 **	14985,000	0,012 ***
Ácido Graxo (L)	-0,320	0,001 ***	57,000	0,049 **	5,190	0,178	-0,322	0,001 ***	-95,500	0,017 **
Ácido Graxo (Q)	0,032	0,036 **	-18,510	0,016 ***	1,466	0,091	0,032	0,135	5,310	0,483
ABTS x RBBR	1,977	0,065 **	392,000	0,399	126,700	0,056 **	1,030	0,490	539,000	0,344
ABTS x Ácido Graxo	0,036	0,354	-13,500	0,465	-4,760	0,069 **	0,028	0,632	23,700	0,301
RBBR x Ácido Graxo	0,332	0,388	301,000	0,129	-92,800	0,004 ***	-0,100	0,866	150,000	0,502

(L) = fator linear; (Q) = fator quadrático; * = diferença estatística com probabilidade de 90%; ** = diferença estatística com probabilidade de 95%; *** = diferença estatística com probabilidade de 99%.

Aplicando a equação de regressão originada, com os coeficientes de regressão e os fatores não codificados, foi possível estimar valores para a descoloração a 610 nm, nos dois tempos avaliados, bem como atividades enzimáticas que apresentaram efeito significativo (**Tabela 22** e **Tabela 23**).

Tabela 22 - Descoloração a 610 nm, fenoloxidasas e MnP estimados para sistemas de tratamento com *Pleurotus ostreatus* CCIBt 2347 com 24 horas de contato *in vivo*.

	Desc [%] em 610nm					Fenoloxidasas [U/L]					MnP [U/L]					Ácido Graxo [%]				
	0,0E+00	4,0E-04	1,0E-03	1,6E-03	2,0E-03	0,0E+00	4,0E-04	1,0E-03	1,6E-03	2,0E-03	0,0E+00	4,0E-04	1,0E-03	1,6E-03	2,0E-03	0,0E+00	4,0E-04	1,0E-03	1,6E-03	2,0E-03
0,00	98,05	98,13	98,26	98,37	98,45	298,00	297,39	296,47	295,56	294,96	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	97,81	97,72	97,59	97,45	97,36	340,33	339,87	339,18	338,49	338,04	6,16	6,13	6,10	6,06	6,04	6,16	6,13	6,10	6,06	6,04
	80,02	79,80	79,46	79,13	78,91	324,81	324,50	324,04	323,58	323,27	21,64	21,56	21,44	21,32	21,25	21,64	21,56	21,44	21,32	21,25
	64,66	64,42	64,05	63,68	63,44	251,45	251,29	251,06	250,82	250,67	43,72	43,58	43,38	43,18	43,05	43,72	43,58	43,38	43,18	43,05
	61,12	60,88	60,52	60,17	59,93	120,25	120,24	120,23	120,22	120,22	62,10	61,93	61,67	61,41	61,24	62,10	61,93	61,67	61,41	61,24
0,40	99,56	99,60	99,65	99,70	99,73	322,50	321,95	321,13	320,31	319,77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	95,73	95,62	95,46	95,29	95,18	358,07	357,68	357,08	356,49	356,10	0,25	0,25	0,25	0,24	0,24	0,25	0,25	0,25	0,24	0,24
	76,89	76,68	76,37	76,06	75,85	335,81	335,56	335,19	334,83	334,58	12,88	12,82	12,73	12,64	12,59	12,88	12,82	12,73	12,64	12,59
	63,07	62,85	62,53	62,20	61,99	255,70	255,60	255,46	255,32	255,23	32,10	31,99	31,81	31,64	31,53	32,10	31,99	31,81	31,64	31,53
	60,90	60,69	60,38	60,08	59,87	117,75	117,80	117,88	117,97	118,03	48,58	48,43	48,20	47,98	47,83	48,58	48,43	48,20	47,98	47,83
1,00	99,03	98,98	98,91	98,84	98,79	326,90	326,45	325,77	325,09	324,64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	88,13	87,99	87,78	87,57	87,43	352,35	352,05	351,60	351,15	350,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	66,92	66,74	66,46	66,18	66,00	319,96	319,81	319,58	319,36	319,21	2,29	2,26	2,22	2,18	2,15	2,29	2,26	2,22	2,18	2,15
	55,32	55,14	54,88	54,62	54,44	229,73	229,73	229,72	229,72	229,73	17,23	17,14	17,02	16,89	16,81	17,23	17,14	17,02	16,89	16,81
	55,24	55,08	54,83	54,59	54,43	81,65	81,80	82,02	82,25	82,40	30,85	30,73	30,55	30,37	30,25	30,85	30,73	30,55	30,37	30,25
1,60	89,57	89,46	89,29	89,12	89,01	292,50	292,14	291,60	291,06	290,71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	71,77	71,62	71,39	71,16	71,01	307,82	307,61	307,30	306,99	306,79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	49,65	49,50	49,28	49,06	48,91	265,31	265,25	265,16	265,08	265,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	41,00	40,87	40,68	40,49	40,37	164,95	165,04	165,18	165,32	165,42	5,41	5,36	5,28	5,20	5,15	5,41	5,36	5,28	5,20	5,15
	43,05	42,93	42,76	42,59	42,48	6,75	6,99	7,35	7,72	7,97	16,18	16,09	15,95	15,82	15,73	16,18	16,09	15,95	15,82	15,73
2,00	75,47	75,34	75,14	74,95	74,82	248,00	247,70	247,26	246,82	246,52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	55,02	54,88	54,68	54,48	54,34	256,58	256,43	256,21	256,00	255,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	34,56	34,45	34,28	34,12	34,01	207,31	207,32	207,32	207,33	207,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	28,49	28,40	28,27	28,14	28,05	100,20	100,36	100,59	100,83	100,99	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	31,71	31,63	31,51	31,39	31,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,10	8,03	7,92	7,82	7,75	8,10	8,03	7,92	7,82	7,75

Áreas em realçadas destacam valores máximos, quanto mais escuro maior o valor.

Tabela 23 - Descoloração a 610 nm, fenoloxidasas e MnP estimados para sistemas de tratamento com *Pleurotus ostreatus* CCIBt 2347 com 48 horas de contato *in vivo*.

	ABTS [mM]	Desc [%] em 610nm					RBBR [μ M]					Lacase [U/L]					Ácido Graxo [%]				
		0,0E+00	4,0E-04	1,0E-03	1,6E-03	2,0E-03	0,0E+00	4,0E-04	1,0E-03	1,6E-03	2,0E-03	0,0E+00	4,0E-04	1,0E-03	1,6E-03	2,0E-03	0,00	1,25	2,50	3,75	5,00
0,00		99,90	99,90	99,91	99,92	99,93	579,00	577,50	575,26	573,04	571,56										
		99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	488,81	487,37	485,22	483,09	481,67										
		97,36	97,29	97,19	97,08	97,01	373,44	372,09	370,08	368,07	366,75										
		90,66	90,50	90,27	90,03	89,87	281,96	280,70	278,82	276,96	275,72										
		88,63	88,46	88,20	87,94	87,76	234,25	233,05	231,26	229,49	228,31										
0,40		99,99	99,99	100,00	100,00	99,99	534,49	533,08	531,26	528,87	527,48										
		99,89	99,89	99,88	99,87	99,84	453,78	452,43	450,22	448,40	447,07										
		95,54	95,45	95,31	95,17	94,75	352,63	351,36	350,08	347,61	346,36										
		88,03	87,86	87,61	87,36	86,58	275,37	274,20	272,82	270,71	269,56										
		86,59	86,42	86,16	85,89	85,28	237,14	236,03	234,26	232,72	231,63										
1,00		100,00	100,00	100,00	100,00	99,98	464,30	463,02	461,26	459,20	457,94										
		99,18	99,15	99,12	99,08	98,85	397,81	396,59	395,22	392,95	391,75										
		91,35	91,22	91,04	90,86	89,42	317,99	316,86	315,08	313,49	312,37										
		83,10	82,93	82,66	82,40	80,32	262,06	261,02	259,82	257,92	256,90										
		82,94	82,77	82,52	82,26	80,82	238,05	237,07	235,26	233,15	231,63										
1,60		99,93	99,93	99,92	99,92	99,80	390,01	388,85	387,26	385,42	384,29										
		97,15	97,09	97,01	96,93	96,01	337,74	336,64	335,22	333,39	332,32										
		85,40	85,25	85,03	84,81	81,39	279,25	278,24	277,08	275,26	274,28										
		77,33	77,15	76,88	76,62	72,42	244,65	243,73	242,82	241,02	240,13										
		78,89	78,73	78,48	78,23	75,50	234,86	234,00	233,26	231,47	230,64										
2,00		99,75	99,74	99,72	99,70	99,25	338,20	337,13	336,26	335,26	334,29										
		95,17	95,10	94,99	94,88	93,05	295,41	294,40	293,22	291,41	290,42										
		81,42	81,27	81,04	80,81	75,36	251,14	250,22	249,08	247,50	246,60										
		74,17	73,99	73,73	73,47	67,27	230,76	229,93	228,82	227,48	226,67										
		76,99	76,83	76,59	76,35	72,42	230,45	229,68	228,26	227,41	226,66										

Áreas em destaque representam valores máximos, quanto mais escuro maior o valor.

A descoloração a 610 nm mostrou correlação positiva forte com a atividade de lacases, tanto em 24 horas (Pearson = 0,691, valor $p = 0,002$) quanto em 48 horas (Pearson = 0,835, valor $p = 0,000$), bem como mostrou correlação positiva moderada (Pearson = 0,537, valor $p = 0,026$) com as fenoloxidasas, em 24 horas, e correlação positiva forte (Pearson = 0,824, valor $p = 0,000$) com as fenoloxidasas, em 48 horas (APÊNDICE D). A descoloração a 526 nm não apresentou correlação com nenhuma das

enzimas testadas ($p \geq 0,136$) e MnP não apresentou correlação com a descoloração ($p > 0,1$), em nenhum dos comprimentos de onda ou tempos avaliados.

Diante da correlação entre a descoloração de RB222 e as lacases de *Pleurotus ostreatus* CCIBt 2347, e com base no estudo de Bourbonnais e Paice (1990), pode-se afirmar que lacase na presença de mediadores torna-se apta a clivar a ligação C α -C β também de compostos não fenólicos, uma vez que foi observada descoloração a 526 nm, comprimento de onda possivelmente referente ao metabólito contendo segundo grupo azo, ligado ao radical não fenólico. Tal mecanismo pode ter ocorrido pela presença do ABTS, onde a lacase oxida esse substrato abstraindo 4 elétrons do composto, quando os Cu⁺² do seu centro ativo são reduzidos a Cu⁺. Nesse caminho a lacase retorna ao seu estado original, reduzindo o oxigênio molecular a água, e o composto oxidado, que é um radical cátion ativo, é automaticamente decomposto em produtos mais simples. Se esses radicais catiônicos tiverem tempo de vida longo o suficiente, podem abstrair elétrons de outros compostos ricos em elétrons, como é o caso dos corantes sintéticos. Ou ainda pela presença do RBBR, que apresenta mecanismo um pouco diferente, envolvendo o transporte de elétrons via radical-H, que é capaz de abstrair elétrons dos compostos não fenólicos (ALMANSA et al., 2004; CAÑAS; CAMARERO, 2010; WONG; YU, 1999; WONG 2009).

As configurações dos fatores obtidas pelo otimizador de respostas (APÊNDICE D), onde foram avaliadas as condições ótimas para maximizar a descoloração em 610 nm, após 24 e 48 horas, são: 2 mM de ABTS, 0,2 μ M de RBBR, sem adição de ácido graxo. No entanto, não foi avaliada a maximização da produção de lacases, uma vez que é sabido que lacase e MnP possuem isoenzimas, as quais desempenham papéis diferentes, podendo nem sempre coincidir a maior atividade com a maior descoloração, já que possuem diferentes propriedades catalíticas (JIANG et al., 2013; LORENZO et al., 2006; MARTINEZ et al., 1996; MOLDES et al., 2004; MOLDES; SANROMAN, 2006).

Os dados obtidos nos tratamentos com *P. cinerea* estão apresentados na **Tabela 24**. A máxima descoloração a 610 nm ocorreu após 48 horas (53,72 %), acompanhada por 46,40 % de descoloração a 526 nm, onde estavam presentes 556,37 U/L de fenoloxidasas e 422,10 U/L de lacases, sem MnP.

Tabela 24 - Descoloração e atividades enzimáticas (U/L . dia⁻¹) produzidas por *Peniophora cinerea* CCIBt 2541, com seus fatores não codificados e codificados (entre parênteses). Áreas em destaque representam maiores valores.

Tratamento	Fatores			Descoloração _{610nm}		Descoloração _{520nm}		Fenoloxidasas		Lacases		MnP	
	ABTS (mM)	RBBR (μM)	Ácido graxo (%)	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
1	0,4 (-)	0,04 (-)	1 (-)	11,70	40,92	0,00	28,23	605,76	653,60	666,72	644,34	0,00	0,00
2	1,6 (+)	0,04 (-)	1 (-)	31,45	41,61	25,39	30,66	616,56	806,39	684,47	649,74	0,00	0,00
3	0,4 (-)	0,16 (+)	1 (-)	0,00	27,84	0,00	27,94	725,37	787,10	655,15	665,95	0,00	0,00
4	1,6 (+)	0,16 (+)	1 (-)	29,27	30,56	22,09	26,19	516,25	642,03	526,28	558,69	0,00	0,00
5	0,4 (-)	0,04 (-)	4 (+)	10,81	46,94	0,00	39,25	601,90	699,90	575,66	567,95	0,00	0,00
6	1,6 (+)	0,04 (-)	4 (+)	24,88	38,20	19,41	27,27	525,51	463,00	515,47	479,98	0,00	0,00
7	0,4 (-)	0,16 (+)	4 (+)	14,79	39,33	0,00	21,06	633,54	715,34	574,89	605,76	0,00	0,00
8	1,6 (+)	0,16 (+)	4 (+)	31,96	53,72	36,39	46,40	561,00	556,37	489,24	422,10	0,00	0,00
9	0 (-1,68)	0,1 (0)	2,5 (0)	42,17	42,17	20,89	20,89	508,53	523,96	447,57	508,53	0,00	0,00
10	2 (+1,68)	0,1 (0)	2,5 (0)	42,31	42,31	41,32	41,32	779,38	992,36	982,33	940,66	30,22	50,75
11	1 (0)	0 (-1,68)	2,5 (0)	15,90	15,90	27,49	27,49	871,21	1167,53	1094,22	1413,69	15,71	16,74
12	1 (0)	0,2 (+1,68)	2,5 (0)	26,96	26,96	38,53	38,53	973,07	1006,25	856,55	828,77	0,00	0,00
13	1 (0)	0,1 (0)	0 (-1,68)	0,00	13,56	0,00	0,00	1636,71	2013,28	2115,91	2369,02	0,00	0,00
14	1 (0)	0,1 (0)	5 (+1,68)	42,72	42,72	25,21	25,21	1041,75	1061,81	864,27	871,98	16,91	45,00
15a	1 (0)	0,1 (0)	2,5 (0)	41,16	41,16	33,99	33,99	557,14	647,43	466,86	621,19	0,00	0,00
15b	1 (0)	0,1 (0)	2,5 (0)	47,69	47,69	0,00	0,00	2518,72	3310,45	2810,41	3058,12	0,00	0,00
15c	1 (0)	0,1 (0)	2,5 (0)	0,00	37,75	45,62	45,62	1449,19	1585,00	890,50	926,77	0,00	0,00

A análise de variância (APÊNDICE D) não apoiou os modelos matemáticos obtidos para os tratamentos com *Peniophora cinerea*, assim sendo os coeficientes de regressão obtidos não foram empregados para estimar valores. Contudo, foi possível avaliar a correlação entre a descoloração e as atividades enzimáticas, a partir dos valores reais, onde a descoloração a 526 e a 610 nm apresentaram correlação negativa moderada tanto com a atividade de fenoloxidasas (Pearson = - 0,413, $p = 0,100$), em 24 horas como com a MnP em 48 horas (Pearson = - 0,404, $p = 0,107$), respectivamente. Apresentou também correlação negativa moderada entre a descoloração a 526 nm e a atividade de fenoloxidasas em 48 horas (Pearson = - 0,419, $p = 0,094$), bem como com lacases em 48 horas (Pearson = - 0,459, $p = 0,064$).

Em que pese o modelo matemático não suportar significativamente a estimativa de configurações ótimas de descoloração, observando-se os dados reais obtidos, vê-se que a configuração dos fatores capaz de maximizar a descoloração, nos dois comprimentos de onda, é de 1,6 mM de ABTS, 0,16 μ M de RBBR e 4,0 % de fonte de ácido graxo.

Diante de correlações negativas entre descoloração e enzimas ligninolíticas, pode-se sugerir uma rota metabólica para a descoloração por ação não enzimática, com participação, principalmente, das espécies reativas de oxigênio (ROS) formadas pela peroxidação de ácidos graxos insaturados, $\cdot\text{OH}$, o qual é considerado um dos mais poderosos oxidantes, além de $\text{ROO}\cdot$ e $\cdot\text{OOH}$, radicais secundários resultantes da oxidação de polímeros por $\cdot\text{OH}$. Os radicais $\cdot\text{OH}$ atacam moléculas orgânicas por abstração ou adição de um átomo de hidrogênio de duplas ligações, gerando novos intermediários oxidados de baixa massa molar, ou ainda CO_2 e H_2O , no caso da mineralização (HAMMEL et al., 2002; WATANABE et al., 2000).

A descoloração e as atividades enzimáticas produzidas pelos tratamentos com *T. villosa* estão apresentados na **Tabela 25**. A máxima descoloração foi de 88,87 % a 610 nm, em 48 horas, acompanhada de 70,98 % de descoloração a 526 nm, na presença de 426,73 U/L de fenoloxidasas e 381,98 U/L de lacases, sem produzir MnP.

Tabela 25 - Descoloração e atividades enzimáticas produzidas por *Trametes villosa* CCIBt 2628, com seus fatores não codificados e codificados (entre parênteses). Áreas em destaque representam maiores valores.

Tratamento	Fatores			Descoloração _{526nm}		Descoloração _{520nm}		Fenoloxídases		Lacases		MnP		
	ABTS (mM)	RBR (µM)	Ácido graxo (%)	MnSO ₄ (mM)	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
1	0,5 (-)	0,05 (-)	1,25 (-)	0,750 (-)	44,15	66,75	17,29	35,35	487,54	461,61	273,17	310,36	0,00	0,00
2	1,5 (+)	0,05 (-)	1,25 (-)	0,750 (-)	68,53	83,73	49,19	55,58	465,32	462,23	267,61	388,15	0,00	0,00
3	0,5 (-)	0,15 (+)	1,25 (-)	0,750 (-)	55,52	78,12	27,53	50,26	361,60	449,11	279,65	382,75	0,00	0,00
4	1,5 (+)	0,15 (+)	1,25 (-)	0,750 (-)	33,25	58,53	24,04	43,05	397,72	392,32	341,69	432,60	0,00	0,00
5	0,5 (-)	0,05 (-)	3,75 (+)	0,750 (-)	66,00	79,17	60,76	66,34	410,68	411,76	319,93	379,97	0,00	0,00
6	1,5 (+)	0,05 (-)	3,75 (+)	0,750 (-)	64,12	66,69	53,45	54,55	732,31	787,10	854,24	841,12	0,00	0,74
7	0,5 (-)	0,15 (+)	3,75 (+)	0,750 (-)	59,88	68,15	36,60	43,49	558,38	505,44	528,28	572,73	0,00	0,00
8	1,5 (+)	0,15 (+)	3,75 (+)	0,750 (-)	51,35	69,94	34,10	48,34	715,34	690,64	696,82	709,16	0,00	0,00
9	0,5 (-)	0,05 (-)	1,25 (-)	1,25 (+)	59,64	79,83	48,00	59,73	642,80	804,85	680,30	922,14	0,00	0,00
10	1,5 (+)	0,05 (-)	1,25 (-)	1,25 (+)	65,61	72,20	34,42	34,42	454,51	547,11	318,85	479,98	0,00	0,00
11	0,5 (-)	0,15 (+)	1,25 (-)	1,25 (+)	72,51	85,24	44,42	57,06	544,03	620,42	571,03	675,21	0,18	0,00
12	1,5 (+)	0,15 (+)	1,25 (-)	1,25 (+)	45,74	57,32	20,99	29,28	907,48	729,23	609,62	587,24	0,00	0,00
13	0,5 (-)	0,05 (-)	3,75 (+)	1,25 (+)	77,88	77,09	53,28	53,28	495,41	468,40	423,65	365,77	0,00	0,00
14	1,5 (+)	0,05 (-)	3,75 (+)	1,25 (+)	77,79	88,87	62,38	70,98	548,66	426,73	366,54	381,98	0,27	0,00
15	0,5 (-)	0,15 (+)	3,75 (+)	1,25 (+)	60,71	76,89	43,45	55,70	391,24	327,19	257,74	287,06	0,00	0,00
16	1,5 (+)	0,15 (+)	3,75 (+)	1,25 (+)	52,42	70,64	36,26	51,27	530,91	494,64	509,30	471,49	0,00	0,00
17	0 (-2)	0,1 (0)	2,5 (0)	1 (0)	52,03	68,40	31,74	43,91	504,67	454,51	271,63	279,34	0,00	0,00
18	2 (+2)	0,1 (0)	2,5 (0)	1 (0)	69,17	82,74	58,49	68,51	277,03	263,14	270,08	256,19	0,00	0,00
19	1 (0)	0 (-2)	2,5 (0)	1 (0)	58,49	52,39	46,47	46,47	471,49	428,28	362,68	383,52	0,00	0,00
20	1 (0)	0,2 (+2)	2,5 (0)	1 (0)	45,12	58,73	34,79	44,45	411,30	410,53	352,65	395,09	0,00	0,00
21	1 (0)	1 (0)	0 (-2)	1 (0)	40,10	50,92	0,00	1,33	604,99	598,04	459,91	446,02	0,00	0,00
22	1 (0)	0,1 (0)	5 (+2)	1 (0)	32,24	44,88	31,28	38,92	415,93	476,12	443,71	432,91	0,00	0,00
23	1 (0)	0,1 (0)	2,5 (0)	0,5 (-2)	40,45	59,11	36,86	48,32	361,91	327,96	367,31	388,15	0,00	0,00
24	1 (0)	0,1 (0)	2,5 (0)	1,5 (+2)	78,21	82,46	71,73	74,22	376,57	467,63	483,06	450,65	0,00	0,00
25a	1 (0)	0,1 (0)	2,5 (0)	1 (0)	51,32	68,63	47,52	57,56	452,20	558,69	510,07	567,95	0,00	0,00
25b	1 (0)	0,1 (0)	2,5 (0)	1 (0)	75,51	79,99	48,49	52,68	486,92	658,23	562,55	679,07	0,00	0,00
25c	1 (0)	0,1 (0)	2,5 (0)	1 (0)	55,77	54,94	49,76	49,76	404,35	561,77	549,43	652,83	0,00	0,00
25d	1 (0)	0,1 (0)	2,5 (0)	1 (0)	33,29	41,68	23,00	28,57	380,43	202,18	357,28	437,54	0,00	0,00

A análise de variância (APÊNDICE D) apoiou apenas o modelo matemático para a lacase ($p = 0,028$) e para a descoloração a 526 nm ($p = 0,021$), em 24 horas. Os coeficientes de regressão obtidos para esses modelos estão apresentados na **Tabela 26**.

Tabela 26 - Coeficiente de regressão para descoloração a 526 nm e lacases de *Trametes villosa* CCIBt 2347 em 24 horas de contato *in vivo*.

Fator	Descoloração _{526nm}		Lacase	
	Coeficiente de Regressão	Valor <i>p</i>	Coeficiente de Regressão	Valor <i>p</i>
Constante	0,074	0,000 ***	-1504	0,000 ***
ABTS (L)	0,354	0,565	459	0,739
ABTS (Q)	0,062	0,574	-193	0,085 **
RBBR (L)	1,08	0,053 **	2049	0,858
RBBR (Q)	1,8	0,872	-9155	0,392
Ácido Graxo (L)	0,472	0,003 ***	351	0,893
Ácido Graxo (Q)	-0,0602	0,004 ***	-2,2	0,897
Mn ⁺² (L)	-0,692	0,097 *	2363	0,249
Mn ⁺² (Q)	0,634	0,163	-153	0,717
ABTS x RBBR	-1,55	0,258	1381	0,295
ABTS x Ácido Graxo	0,0002	0,997	134,3	0,020 ***
ABTS x Mn ⁺²	-0,291	0,288	-530	0,057 **
RBBR x Ácido Graxo	-0,475	0,383	118	0,820
RBBR x Mn ⁺²	0,16	0,952	-1800	0,49
Ácido Graxo x Mn ⁺²	-0,044	0,683	-489	0

(L) = fator linear; (Q) = fator quadrático; * = diferença estatística com probabilidade de 90%; ** = diferença estatística com probabilidade de 95%; *** = diferença estatística com probabilidade de 99%.

Os coeficientes e seus fatores não codificados foram empregados para estimar dados para a descoloração a 526 nm, após 24 horas, onde seu máximo (96,90 %) foi observado quando 2 mM de ABTS, 3,75 % de ácido graxo e 0,5 mM de manganês estavam presentes. Contudo, sem coincidir com a máxima produção de lacase (**Tabela 27**), confirmando o resultado da análise estatística, que não correlacionou a descoloração com as atividades enzimáticas ($p > 0,1$; APÊNDICE D).

Tabela 27 - Dados estimados para descoloração a 526 nm e produção de lacase por *Trametes villosa* CCIBt 2628 após 24 horas de contato *in vivo*.

		Desc [%] em 526nm					Lacase [U/L]						
		RBBR [μM]											
		0,0E+00	5,0E-04	1,0E-03	1,5E-03	2,0E-03	0,0E+00	5,0E-04	1,0E-03	1,5E-03	2,0E-03		
ABTS [mM]	0,00	1,28	0,77	0,03	4,01	20,12	89,48	69,34	46,57	21,31	0,00	0,00	Ácido Goxo [%]
		12,08	12,85	19,52	34,50	59,15	76,10	60,32	41,93	21,04	0,00	1,25	
		35,21	34,98	42,47	58,03	79,55	61,60	50,18	36,16	19,64	0,69	2,50	
		44,22	42,59	48,85	62,92	82,37	45,98	38,92	29,27	17,12	2,52	3,75	
		34,85	31,98	36,61	49,26	69,47	29,23	26,53	21,25	13,47	3,24	5,00	
	0,50	0,00	0,00	0,40	4,39	17,98	77,80	58,89	37,37	13,35	0,00	0,00	
		20,90	18,90	23,32	35,42	56,46	68,11	53,56	36,41	16,77	0,00	1,25	
		46,99	43,09	47,09	58,98	77,32	57,30	47,11	34,33	19,06	1,33	2,50	
		56,20	50,90	53,51	63,87	80,28	45,36	39,53	31,12	20,22	6,85	3,75	
		46,64	39,98	41,17	50,26	66,98	32,30	30,83	26,79	20,26	11,25	5,00	
	1,00	2,44	1,19	1,97	6,19	18,26	60,83	43,14	22,86	0,09	0,00	0,00	
		34,30	28,56	30,15	39,34	56,84	54,83	41,50	25,60	7,19	0,00	1,25	
		61,97	54,49	54,83	62,95	77,65	47,70	38,74	27,20	13,17	0,00	2,50	
		70,69	62,21	61,17	67,74	80,60	39,45	34,85	27,68	18,02	5,88	3,75	
		61,65	51,36	48,89	54,35	67,37	30,08	29,83	27,04	21,75	13,97	5,00	
	1,50	11,04	6,32	6,07	10,07	21,02	38,55	22,09	3,06	0,00	0,00	0,00	
		52,22	42,39	40,48	46,42	60,27	36,24	24,14	9,48	0,00	0,00	1,25	
		78,47	68,56	65,43	69,72	80,50	32,80	25,06	14,77	1,98	0,00	2,50	
		85,55	75,60	71,41	74,25	83,29	28,24	24,86	18,94	10,52	0,00	3,75	
		78,22	65,64	59,70	61,45	70,63	22,55	23,53	21,98	17,94	11,38	5,00	
	2,00	27,45	17,39	14,32	17,03	26,61	10,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
		72,65	59,90	54,35	56,66	66,61	12,35	1,48	0,00	0,00	0,00	1,25	
		92,91	83,45	77,93	78,68	85,44	12,60	6,09	0,00	0,00	0,00	2,50	
		96,90	88,86	83,04	82,67	87,92	11,73	9,57	4,90	0,00	0,00	3,75	
		92,77	81,10	72,86	71,16	76,46	9,72	11,93	11,63	8,83	3,50	5,00	
		0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50		
Mn ⁺⁺ [mM]													

Áreas em destaque representam maiores valores, quanto mais escuro maior o valor.

A partir da análise estatística de otimização de resposta, para as variáveis que apresentaram significância (APÊNDICE D), e dos resultados obtidos pelos tratamentos reais, a configuração de fatores, selecionada para maximizar a descoloração por *T. villosa*, foi de 2 mM de ABTS, 0,5 mM de manganês e 3,75 % de ácido graxo, na ausência de RBBR.

Apesar de a lacase não apresentar correlação com a descoloração, é importante lembrar o que Böhmer et al. (1998) já comentavam que o sistema mediado por lacase pode participar da degradação de compostos concomitantemente com a peroxidação lipídica. Fato confirmado ainda por Srebotnik e Boisson (2005), que sugerem que lacase/fenol/Mn⁺² funcionam como um sistema mediador natural para a peroxidação lipídica *in vivo*, em fungos que expressem lacase predominantemente.

Observando os valores máximos de cada variável avaliada, pode-se confirmar que uma única configuração de fatores não irá contemplar a otimização de todas as variáveis, uma vez que o processo é dinâmico, capaz de apresentar necessidades distintas a cada fase do processo, para cada variável, mostrando que estudos posteriores poderão contar

com intervenções sucessivas, para garantir a otimização do processo em suas diferentes fases.

4.5. Experimento 5

A descoloração a 526 nm promovida por *P. ostreatus* (**Figura 10**) não apresentou diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,1$; APÊNDICE E), no entanto apresentou as maiores taxas de descoloração a 610 nm, 88 % nos sistemas com inibidor de MnP e 73 % nos sistemas com corante sem inibidores, que não diferiram entre si, mas diferiram dos demais tratamentos com inibidores e controles abióticos ($p = 0,049$; APÊNDICE E) em 48 horas. Nestas condições havia de 577 U/L a 752 U/L de lacases presentes nos extratos, contudo, em 24 horas, esses mesmos sistemas de tratamento, juntamente com os sistemas com corante e fungo morto, apresentaram maior descoloração a 610 nm (de 40 a 74 %) diferindo estatisticamente dos demais tratamentos ($p = 0,015$; APÊNDICE E). Observando tais dados é possível confirmar que a bioossorção pode ser um fenômeno significativo nas primeiras 24 horas de contato. A adição de azida sódica inibiu fenoloxidasas e lacases, diminuindo as taxas de descoloração observadas. Houve produção de MnP em todos os sistemas *in vivo* antes da adição de corante, embora essa atividade tenha sido inibida pela presença do corante no sistema. Por sua vez, Novotný et al. (2004), estudando a biodegradação de corantes diferentes por *Irpex lacteus*, observaram a inibição da síntese de MnP pela presença de RBBR e azul de bromofenol nos sistemas.

Figura 10 - Descoloração de RB222, a 526 nm e 610 nm, e atividades enzimáticas produzidas por *Pleurotus ostreatus* CCIBt 2347 *in vivo* na presença de inibidores enzimáticos.

Legenda: CBio = sistemas sem corante; Tratamento = sistemas com corante sem inibidores; NaN3 = sistemas com corante e adição de azida sódica (inibidor de lacase); CdCl2 = sistemas com corante e adição de cloreto de cádmio (inibidor de MnP); NaN3/CdCl2 = sistemas com corante e adição de inibidores (inibidores de lacase e MnP); Sem fungo = sistemas com corante sem biomassa; Fungo morto = sistemas com corante e biomassa morta. Letras iguais significam igualdade estatística: minúsculas para a descoloração a 610 nm em 24 horas e maiúsculas para a descoloração a 610 nm em 48 horas; descoloração a 526 nm sem diferença estatística.

Peniophora cinerea (Figura 11) também apresentou maiores taxas de descoloração a 610 nm nos sistemas com inibidor de MnP (30 %), em 48 horas. A 526 nm, a descoloração nesses mesmos sistemas foi de 27 % em 24 horas de 39 % e em 48 horas, diferindo dos demais tratamentos ($p \leq 0,1$; APÊNDICE E). Nesses sistemas haviam de 510 U/L a 705 U/L de lacases, sendo essa a enzima principal produzida por esses tratamentos, embora pareça não estar envolvido na descoloração. A adição de azida sódica não inibiu totalmente a atividade de fenoloxidasas e de lacases desse basidiomiceto, após 24 horas, assim sendo a cada coleta foi adicionada solução de inibidor até que a atividade fosse eliminada dos extratos. Contrariamente, a atividade de MnP foi totalmente inibida nos extratos que receberam cloreto de cádmio. Entretanto, a descoloração parece não ter sido afetada pela presença ou ausência dessas enzimas nos extratos.

Figura 11 - Descoloração de RB222, a 526 nm e 610 nm, e atividades enzimáticas produzidas por *Peniophora cinerea* CCIBt 2541 *in vivo* na presença de inibidores enzimáticos.

Legenda: CBio = sistemas sem corante; Tratamento = sistemas com corante sem inibidores; NaH3 = sistemas com corante e adição de azida sódica (inibidor de lacase); CdCl2 = sistemas com corante e adição de cloreto de cádmio (inibidor de MnP); NaH3/CdCl2 = sistemas com corante e adição de inibidores (inibidores de lacase e MnP); Sem fungo = sistemas com corante sem biomassa; Fungo morto = sistemas com corante e biomassa morta. Letras iguais significam igualdade estatística: minúsculas para a descoloração a 526 nm em 48 horas, minúsculas itálicas para a descoloração a 526 nm em 48 horas e maiúsculas para a descoloração a 610 nm em 48 horas; descoloração a 610 nm em 24 horas não apresentaram diferença estatística.

Trametes villosa (**Figura 12**) não apresentou diferença estatística entre os sistemas avaliados para descoloração, incluindo os controles abióticos, em qualquer comprimento de onda ($p > 0,1$; APÊNDICE E). A principal enzima produzida foi lacase, em média 289 U/L, exceto nos sistemas abióticos, podendo a descoloração nesses últimos ser resultante tanto de fenômeno biossortivo bem como de processos não enzimáticos, promovidos pelos compostos existentes nos extratos contendo biomassa crescida morta. Contudo, nos sistemas *in vivo* não se pode descartar a hipótese de ação enzimática. A adição de azida sódica foi capaz de inibir eficientemente a atividade de lacases, contudo foi necessária a adição desse inibidor também em 24 horas de incubação, até a eliminação dessa atividade nesses extratos, uma vez que é sabido que lacases apresentam diferentes isoenzimas com características químicas distintas (JIANG et al., 2013; LORENZO et al., 2006; MARTINEZ et al., 1996; MOLDES et al., 2004;

MOLDES; SANROMAN, 2006), a quais podem ter respondido de forma diferente à presença da azida sódica. Não se observou atividade de MnP em nenhuma condição avaliada para *T. villosa*, fato decorrente da aplicação da configuração de fatores ótima para a descoloração, não coincidindo com a configuração favorável a produção dessa enzima, conforme já observado nos Experimentos anteriores.

Figura 12 - Descoloração de RB222, a 526 nm e 610 nm, e atividades enzimáticas e produzidas por *Trametes villosa* CCIBt 2628 *in vivo* na presença de inibidores enzimáticos.

Legenda: CBio = sistemas sem corante; Tratamento = sistemas com corante sem inibidores; NaN3 = sistemas com corante e adição de azida sódica (inibidor de lacase); CdCl2 = sistemas com corante e adição de cloreto de cádmio (inibidor de MnP); NaN3/CdCl2 = sistemas com corante e adição de inibidores (inibidores de lacase e MnP); Sem fungo = sistemas com corante sem biomassa; Fungo morto = sistemas com corante e biomassa morta.

Os sistemas com *P. ostreatus* apresentaram mudança de cor na região do visível, já *P. cinerea* e *T. villosa* apresentaram diminuição da absorbância nos $\lambda_{\text{máx}}$, embora os sistemas tenham permanecido azuis, conforme mostra a **Figura 13**.

Figura 13 - Fase líquida dos tratamentos após 48 horas de contato *in vivo* com basidiomicetos.

Legenda: $D\%_{610nm}$ = descoloração percentual a 610 nm; $D\%_{526nm}$ = descoloração percentual a 526 nm.

Para confirmar a biodegradação envolvida no processo, um método TLC empregando fase móvel, majoritariamente constituída por metanol, foi utilizada. Plácido et al. (2016), que em estudo de degradação de corantes azóicos e ftalocianina por *Leptosphaeria* sp., comentam que quando empregado o solvente metanol é possível observar maior número de R_F nesse tipo análise com corantes.

A fase móvel selecionada foi a que empregou acetato de etila PA : metanol PA (1 :1,5, v/v) (Synth, Labsynth, Brasil), e a corrida se deu sob temperatura controlada, 20 ± 2 °C, com tempo máximo de 40 minutos.

As placas contendo as corridas de sistemas tratados por *P. cinerea* apresentou dois novos R_F , sendo um $R_F = 0,64$ em 48 horas, nos sistemas coloridos com inibidor de lacase e de MnP, e outro $R_F = 0,60$, em 24 e 48 horas, nos sistemas coloridos com inibidor de MnP (**Figura 14**). Os sistemas com *P. ostreatus* também apresentaram um novo $R_F = 0,49$, nos sistemas coloridos sem inibidores em 48 horas, bem como os sistemas com *T. villosa* apresentou um novo $R_F = 0,27$, nos sistemas coloridos sem MnP em 24 horas, contudo, após 48 horas esse metabólito não foi detectado (**Figura 15**).

Figura 14 - Placa de cromatografia de camada delgada dos tratamentos com *Peniophora cinerea* CCIBt 2541, sob luz ultravioleta a 365 nm.

Legenda: Corridas de (A) RB222 [0,3 %]; (B) tratamentos com *Peniophora cinerea* CCIBt 2541 com corante e inibição de MnP no tempo inicial, após (C) 24 horas e (D) após 48 horas; (F) sistemas com corante e inibição de lacase e MnP no tempo inicial, após (G) 24 horas e (H) após 48 horas; e (E) meio de cultivo contendo RB222 [0,03%]; área circulada R_F do corante RB222.

Figura 15 - Placas de cromatografia de camada delgada dos tratamentos com *Pleurotus ostreatus* CCIBt 2347 (à esquerda) e *Trametes villosa* CCIBt 2628 (à direita), sob luz ultravioleta a 365 nm.

Legenda: *P. ostreatus* (A) sistemas com corante sem fungo; (B) tratamentos com corante sem inibição enzimática, em 48 horas; (C) com corante e inibição de MnP, em 48 horas; e (D) com corantes e inibição de lacase, em 48 horas; (E) sistemas com corante e fungo morto; *T. villosa* (F) tratamentos com corante sem inibidores em 24 horas e (G) em 48 horas; (H) com corante e inibição de MnP em 24 horas e (I) em 48 horas; (E) sistemas com corante e fungo morto.

Para ampliar a compreensão do mecanismo degradativo desses fungos na degradação do corante avaliado, foram quantificados os compostos de baixa massa molar quelantes e redutores de Fe^{+3} , apresentados na **Tabela 28**, responsáveis por preconizar vias não enzimáticas importantes.

Tabela 28 - Compostos de baixa massa molar no extrato bruto do cultivo de basidiomicetos antes do contato *in vivo* com RB222.

Fungo	Atividade Redutora de Fe^{+3} ($\mu\text{Mol Fe}^{+2}/\text{L}$)		Compostos Quelantes de Fe^{+3} (%)	
	Média	DP	Média	DP
<i>Peniophora cinerea</i>	1,112	0,906	5,35	0,80
<i>Pleurotus ostreatus</i>	0,642	0,473	78,67	3,34
<i>Trametes villosa</i>	1,522	1,400	21,49	30,29

A análise de correlação das atividades enzimáticas e dos CBMM com a descoloração, nos dois comprimentos de onda, está apresentada na **Tabela 29**. Houve correlação negativa moderada das lacases de *P. cinerea* com a descoloração, em ambos comprimentos de onda ($p < 0,09$). Lacases de *P. ostreatus* apresentou correlação positiva moderada com a descoloração a 610 nm ($p = 0,003$), bem como os CBMM redutores de Fe^{+3} de *P. ostreatus* apresentaram correlação negativa muito forte com a descoloração a 526 nm ($p = 0,065$) e positiva muito forte com CBMM quelantes de Fe^{+3} ($p = 0,008$). Lacases e CBMM de *T. villosa* não apresentaram correlação com a descoloração (APÊNDICE E).

Tabela 29 - Coeficiente Pearson de correlação entre as atividades enzimáticas e a descoloração, e entre os CBMM e a descoloração, em 610 nm e 526 nm.

Componente oxidante	Fungo	Descoloração _{610nm}			Descoloração _{526nm}		
		Coeficiente Pearson	Valor p	Correlação	Coeficiente Pearson	Valor p	Correlação
Lacases	<i>Peniophora cinerea</i>	-0,516	0,041	negativa moderada	-0,438	0,090	negativa moderada
MnP		-0,236	0,378	sc	-0,110	0,684	sc
CBMM redutores Fe^{+3}		sc	sc	sc	-0,607	0,585	sc
CBMM quelantes Fe^{+3}		sc	sc	sc	0,692	0,513	sc
Lacases	<i>Pleurotus ostreatus</i>	0,658	0,003	positiva moderada	0,073	0,774	sc
CBMM redutores Fe^{+3}		-0,947	0,207	sc	-0,995	0,065	negativa muito forte
CBMM quelantes Fe^{+3}		0,904	0,281	sc	1,000	0,008	positiva muito forte
Lacases	<i>Trametes villosa</i>	0,035	0,889	sc	0,189	0,452	sc
CBMM redutores Fe^{+3}		0,528	0,646	sc	-0,790	0,420	sc
CBMM quelantes Fe^{+3}		-0,430	0,717	sc	0,716	0,492	sc

Legenda: sc = sem correlação.

De forma geral, *P. ostreatus* descoloriu o corante por ação predominante de suas lacases, uma vez que apresentou formação de metabólito na presença de lacases e não produziu MnP durante contato *in vivo*. Houve correlação negativa muito forte da descoloração a 526 nm com os CBMM redutores de Fe^{+3} (Pearson = - 0,995, $p = 0,065$; APÊNDICE E) e positiva muito forte com os CBMM quelantes de Fe^{+3} (Pearson = 1,000, $p = 0,008$; APÊNDICE E). Assim sendo, é sugerido que lacases podem ter atuado conjuntamente com os CBMM, uma vez que Arantes e Milagres (2007) já comentavam interação da atividade redutora de ferro com lacases e MnP de *Lentinula edodes*, *Trametes versicolor* e *Perenniporia medullapanis* em estudo de descoloração de Azure B.

Lacases descolorem corantes azo por meio de um mecanismo não específico de radicais livres, onde os Cu^{+2} do seu centro reativo retiram elétrons dos substratos fenólicos. Após oxidado, esse substrato torna-se um radical cátion ativo, capaz de retirar elétrons de outro composto não fenólico, retornando ao seu estado original em seguida. A partir dessa oxidação, o composto não fenólico passa a ter um radical fenólico, facilitando assim o ataque catalítico. Então, um ataque nucleofílico do carbono do anel fenólico, recém-formado, ligado ao grupo azo, produz sulfonatos aromáticos e quinonas. Os radicais formados pela oxidação de um elétron do corante por lacase podem então reagir com as quinonas formadas, para serem oxidados novamente, podendo ainda ocorrer acoplamento cruzado entre as espécies reativas, formando ligações C-C e C-O entre as moléculas fenólicas, onde um elétron é removido do radical hidroxila, gerando um radical alcóxila (radical lipídico- $\text{O}^\cdot$). Tais radicais, quando livres formam dímeros nas posições *orto* e *para* com o grupo hidroxila. Dessa forma, os radicais fenólicos podem ser oxidados ainda por produtos oligoméricos (CHACKO; SUBRAMANIAM, 2011; MOTA et al., 2015; THOMAS et al., 2014; ZHAO et al., 2007; ZHAO; HARDIN, 2007; WONG; YU, 1999). Todas essas sequências de reações caracterizam o mecanismo degradativo de basidiomicetos com participação predominante de lacases, como é o caso do *P. ostreatus*. O ataque nucleofílico por água no carbono do anel fenólico ligado ao grupo azo produz ácido benzenesulfônico e naftoquinona e esse último pode ainda reagir com a lacase formando naftodiol. Diferentemente, outros corantes, como o diazo não fenólico Congo Red, tem como metabólitos da quebra o naftaleno-amina, bifenilamina, bifenil e diazônio-naftaleno, uma vez que seguem rotas diferentes daquelas observadas na degradação dos corantes fenólicos (MOTA et al., 2015; SI et al., 2013).

Ainda nesse contexto, García-Montaña et al. (2008) comentam que o ataque oxidativo inicia preferencialmente no grupo azo, ligado ao radical fenólico, liberando N^2 para a atmosfera. Assim sendo, uma via hipotética do ataque de RB222 por *P. ostreatus* seria a oxidação do carbono do radical fenólico ligado ao azo, pelo Cu^{+2} da lacase. A partir daí forma-se uma quinona ligada ao outro grupo. O segundo ataque pode ter acontecido por hidroxilação do radical cíclico ligado ao grupo azo, permitindo assim o ataque do segundo grupo azo pela lacase, ou até mesmo pela ação da hidroxila no naftaleno ou benzeno ligado ao radical monoclorotriazina (GARCIA-MONTAÑA et al. 2008).

P. cinerea descolore RB222 sem participação direta de MnP, produzindo metabólito nessa condição, e ainda sua produção de lacases está correlacionada de forma negativa moderada com a descoloração. Assim sendo, é importante ressaltar que Moreira *et al.* (2014) comprovaram a existência de 8 isoenzimas de lacase, com diferentes propriedades, produzidas por essa mesma linhagem de *P. cinerea* CCIBt 2541. Os autores comentam a capacidade dessas lacases em oxidar diretamente Mn^{+2} , isoladamente ou quando combinadas com mediador e oxalato. No entanto, apesar desses autores comprovarem a eficiência de sistemas combinados de lacases de *P. cinerea* na descoloração de corante antraquinônico, os resultados não mostraram grande eficiência na descoloração do corante reativo de função azo CI Reactive Red 271. Do mesmo modo, os resultados aqui apresentados não atingiram altas taxas de descoloração, embora tenha sido possível comprovar a degradação pela formação de metabólito, não é possível relacioná-la apenas à ação das enzimas avaliadas, já que os sistemas coloridos com inibição de lacase, conjuntamente com a inibição da MnP, apresentaram descoloração do corante. Ainda nesse contexto, é importante lembrar que os fungos de podridão branca são dotados de mecanismos oxidativos não enzimáticos, mediados pelos CBMM, sendo os compostos redutores de Fe^{+3} , os que desempenham papel chave no processo de degradação, gerando radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) via reação de Fenton. Essa espécie reativa de oxigênio é um poderoso oxidante, o mais forte em meio aquoso, que reage rapidamente com moléculas orgânicas, seja abstraindo hidrogênio de estruturas alifáticas, ou adicionando-os em aromáticos (AGUIAR *et al.*, 2010; ARANTES; MILAGRES, 2009; HAMMEL *et al.*, 2002). Considerando ainda o estudo de Clarke *et al.* (2010), esses autores comentam a degradação do corante Acid Orange 7 na presença de excesso de Mn^{+3} , sugerindo uma possível rota oxidativa resultante da redução desse Mn^{+3} , o que gera sucessivamente quinona, capaz de reduzir Fe^{+3} para Fe^{+2} . A simultânea geração de peróxido de hidrogênio possibilita o início da reação de Fenton, sugere-se aqui então uma possível via metabólica para *P. cinerea*, onde segundo Garcia-Montañó *et al.* (2008) o ataque preferencial acontece pelo grupo azo ligado ao radical fenólico, sendo possivelmente essa a primeira quebra da molécula.

Os CBMM quelantes e redutores de Fe^{+3} nos inóculos de *P. cinerea* foram observados em quantidades muito menores do que o observado em estudos semelhantes com outros fungos (ARANTES *et al.*, 2011; ARANTES; MILAGRES, 2007). Contudo, Paranhos (2011) avaliando essa mesma linhagem de *P. cinerea* CCIBt 2541 observou 4 μM de Fe^{+3} reduzido em culturas de 21 dias, confirmando que tal basidiomiceto produz

poucos redutores de ferro em cultivo líquido. Ainda Nidheesh et al. (2013), em sua revisão sobre processo de Fenton na degradação de corantes, comentam que existe uma concentração de Fe^{+2} , sugerida por Wang et al. (2010) como ótima, de 2 mM. Entretanto, mesmo com essa baixa quantidade de compostos redutores de ferro detectados, quando 5 % de quelantes de ferro estão presentes, a degradação de RB222 teve início em até 48 horas de contato *in vivo* (32 % a 610 nm). Em estudo semelhante, onde essa mesma linhagem de *P. cinerea* CCIBt 2541 foi avaliada na descoloração do Azul Brilhante H-GR, Paranhos (2011) comentam que a descoloração atingiu um máximo de 38 % em 72 horas de contato, ainda esse mesmo autor, em 2007, bem como Melo (2009) comentaram que existe predominância dos CBMM na descoloração de corantes reativos por essa linhagem de *P. cinerea*. Fica assim sugerida a ação dos CBMM no processo com *P. cinerea*, tendo o $\cdot\text{OH}$, possivelmente, papel predominante, baseado na afirmativa de Nidheesh et al. (2013) de que esses radicais geram novos intermediários com baixa massa molar. Zhao et al. (2007) no estudo de degradação de Orange II, um corante monoazo fenólico sulfonado, por *P. ostreatus*, comentaram a formação de ácido 4-hidroxi-benzosulfônico e 1,2-dihidroxinaftaleno pela oxidação de Fenton. O princípio desse mecanismo inclui a redução de quinona extracelular para hidroquinona, a qual reage com Fe^{+3} para formar Fe^{+2} e um radical semiquinona. Essa semiquinona reduz O_2 para $\cdot\text{OOH}$ e a quinona original, esse ciclo gera um sistema de Fenton completo, uma vez que $\cdot\text{OOH}$ é uma fonte de H_2O_2 . Contudo, as hidroquinonas precisam ter potencial de redução suficientemente negativo para reduzir Fe^{+3} quando complexado com oxalato. É proposto então que catecóis, os quais são produzidos por alguns fungos e agem não somente como redutor de Fe^{+3} , mas também como quelante de Fe^{+3} (HAMMEL et al., 2002), possam estar entre os CBMM quantificados. No entanto para que seja possível afirmar essa hipótese seriam necessárias análises complementares de caracterização dos CBMM.

A degradação de RB222 por *T. villosa* foi confirmada pelo surgimento de um metabólito em 24 horas, que foi degradado em 48 horas. De modo análogo, Enayatizamir et al. (2011), em estudo de descoloração de Reactive Black 5 por *Phanerochaete chrysosporium*, avaliaram a degradação por TLC e seus resultados mostraram o surgimento de um metabólito, que foi degradado após 48 horas. Da mesma forma, Lu et al. (2008), em avaliação da descoloração de CI Mordant Violet 5, CI Acid Orange 7 e CI Acid Orange 8 por *P. ostreatus*, observaram por HPLC e CE-MS que, após 1 dia os corantes CI Mordant Violet 5 e CI Acid Orange 8 desapareceram e

metabólitos foram formados, sendo um deles o 1,2-naftoquinona, o qual foi degradado no terceiro dia de tratamento. O mesmo foi observado com CI Acid Orange 7, contudo a formação desse metabólito ocorreu no segundo dia de tratamento, desaparecendo no quinto dia. Ainda Kanagaraj et al. (2015), em estudo de degradação do corante diazo não fenólico por lacase bacteriana, avaliam a presença de metabólitos por cromatografia de camada delgada (TLC) e observaram R_F maiores do que observados no controle contendo corante não degradado.

T. villosa apresentou uma via metabólica bem diferente das supracitadas, sem correlação direta com as enzimas ligninolíticas determinadas, nem com os CBMM quantificados. No entanto, vale ressaltar o comentado por Arantes e Milagres (2009), que os complexos enzimáticos produzidos por fungos de degradação de madeira incluem sistemas hidrolíticos e oxidativos, abrangendo muitas outras enzimas, não quantificadas nesse estudo. Ainda é importante lembrar, que no estágio inicial da degradação, os fungos secretam glicopeptídeos de baixa massa molar, que reduzem Fe^{+3} e complexam Fe^{+2} . Esse complexo, segundo Arantes e Milagres (2009), catalisa a oxirredução entre O_2 e um doador de elétrons, produzindo peróxido de hidrogênio, que em seguida é reduzido gerando $^{\cdot}OH$, via reação de Fenton. É sabido também que os sistemas contendo $^{\cdot}OH$, podem mediar a quebra de ligações monoclorotriazina-HN-radical, desestabilizando assim molécula do corante e favorecendo a descoloração, fato mencionado por García-Montaña et al. (2008) em estudo de degradação de corante azo por processos oxidativos avançados. Zille et al. (2005) já comentavam, em estudo de degradação de corantes azo por lacase de *T. villosa*, que a oxidação química de um corante monoazo fenólico contendo grupo sulfonil inicia pela oxidação do grupo fenólico com a participação de um elétron, gerando um radical fenoxila, seguido pela oxidação de um íon carbônio. Nesse contexto sugere-se aqui uma possível rota metabólica para *T. villosa* via CBMM, onde o papel predominante pode ter acontecido pela ação de hidroxilas formadas pela reação de Fenton, embora não possa ser negligenciada a ação das suas lacases.

Dessa forma, são sugeridos alguns metabólitos preditos, descritos na **Figura 16**. O programa simula diferentes reações, no entanto a esquematização ilustra apenas as possíveis reações oxidativas e de hidroxilação.

Figura 16 - Possíveis metabólitos da degradação de RB222 após tratamentos com basidiomicetos. Metaprint2D.

Independente da rota metabólica, sugere-se que a primeira quebra tenha ocorrido no grupo azo ligado ao radical fenólico, uma vez que essa é a ligação mais instável da molécula, a partir daí cada fungo atuou de forma específica na quebra das demais ligações.

5. CONCLUSÕES

- Conclui-se que os três basidiomicetos estão aptos a participar de processos de descoloração desse corante diazo fenólico, confirmando a inespecificidade de seus mecanismos degradativos. Fica ainda evidente que o processo é dinâmico, capaz de expressar diferentes especificidades durante as etapas do processo, de acordo com *i)* a espécie de basidiomiceto empregada, *ii)* o tempo de incubação pré-contato e durante contato *in vivo* e *iii)* as condições nutricionais, incluindo mediadores enzimáticos, o que sugere a necessidade de intervenções sucessivas, a fim de maximizar a descoloração em todas as etapas do processo;
- As três espécies de basidiomicetos expressam lacase, como principal enzima ligninolítica, que, juntamente com outras enzimas e compostos quelantes e redutores de ferro, constituem mecanismos degradativos eficientes para descolorir concentração elevada desse corante recalcitrante (0,03 %);
- Concentrações de sulfato de cobre, sulfato de manganês e fonte de ácido graxo influenciam não apenas a produção das enzimas ligninolíticas, mas também a descoloração, mostrando que esses são fatores importantes para se otimizar, na busca pela eficiência de processos desse tipo. A idade fisiológica do cultivo também mostra-se um importante fator a ser considerado para cultivos empregando esses basidiomicetos;
- *P. ostreatus* apresenta maior eficiência na descoloração empregando cultivo de 25 dias, contendo 0,446 mM de sulfato de cobre e 0,821 mM de sulfato de manganês, sem adição de ácido graxo insaturado. *T. villosa* também mostra máxima eficiência quando emprega cultivo com 25 dias, contendo 1 mM de sulfato de cobre e de manganês, na presença de 3,75% de fonte de ácido graxo insaturado. Já *P. cinerea* mostra máxima eficiência empregando cultivo com 18 dias, contendo 1 mM de sulfato de cobre e 0,106 mM de sulfato de manganês, na presença de 4% de fonte de ácido graxo insaturado;
- A presença de mediadores no efluente sintético influencia positivamente a descoloração, quando 2mM de ABTS são adicionados, para qualquer um dos basidiomicetos estudados. Já o RBBR influencia positivamente apenas os tratamentos com *P. ostreatus* e *P. cinerea*, na concentração de 0,2 µM;

- As ferramentas estatísticas mostram-se apropriadas para analisar a eficiência desse tipo de processo, possibilitando ainda esclarecimentos sobre as vias de processos;
- Cromatografia de Camada Delgada apresenta-se como técnica eficaz para detectar metabólitos, o que pode viabilizar pesquisas biotecnológicas com descobertas importantes minimizando custos de análise;
- *P. ostreatus* é capaz de degradar RB222 nas primeiras 24 horas de contato *in vivo*, provocando deslocamento hipsocrômico do comprimento de onda de máxima absorção, com participação ativa das lacases, associadas à ação não enzimática dos CBMM.
- *P. cinerea* é capaz de iniciar a descoloração de RB222 sem a ação direta de lacases e MnP, uma vez que os compostos de baixa massa molar presentes em seus extratos de cultivo apresentam participação ativa no processo.
- *T. villosa* é capaz de iniciar a descoloração de RB222, também fazendo uso de um mecanismo misto, enzimático e não enzimático.
- Por fim, conclui-se que embora a grande maioria dos estudos desse tipo foquem erroneamente em máximas produções enzimáticas, negligenciando a ação de CBMM e vias adjacentes do processo *in vivo*, fica comprovado que o mecanismo ligninolítico pode atingir sua máxima eficiência em configurações diferentes daquelas preconizadas até então.

REFERÊNCIAS*

- ADNAN, L. et al. Biodegradation of bis-azo dye Reactive Black 5 by white-rot fungus *Trametes gibbosa* sp. WRF 3 and its metabolite Characterization. **Water Air and Soil Pollution**, Cham, v. 225, n. 10, p. 1-11, 2014. ISSN 0049-6979.
- AGUIAR, A. et al. Behavior of *Ceriporiopsis subvermispora* during *Pinus taeda* biotreatment in soybean-oil-amended cultures. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, n. 7, p. 588-593, 2010. ISSN 0964-8305.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729-1738, 2011. ISSN 01004042.
- AKDOGAN, H. A.; TOPUZ, M. C.; URHAN, A. A. Studies on decolorization of Reactive Blue 19 textile dye by *Coprinus plicatilis*. **Journal of Environmental Health Science Engineering**, v. 12, n. 1, 2014. ISSN 2052336X.
- AKPINAR, M.; UREK, R. Production of ligninolytic enzymes by solid-state fermentation using *Pleurotus eryngii*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 42, n. 6, p. 582-597, 2012. ISSN 1082-6068.
- ALBERTS, J. F. et al. Degradation of aflatoxin B(1) by fungal laccase enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 1, p. 47, 2009.
- ALI, H. Biodegradation of Synthetic Dyes-A Review. **Water Air and Soil Pollution** 213: 251-273 p. 2010.
- ALMANSA, E. et al. Influence of structure on dye degradation with laccase mediator systems. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 22, n. 5-6, p. 315-324, 2004. ISSN 1024-2422.
- ALMEIDA, E. J. R.; CORSO, C. R. Comparative study of toxicity of azo dye Procion Red MX- 5B following biosorption and biodegradation treatments with the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. **Chemosphere**, 2014. ISSN 0045-6535.
- ÁLVAREZ, M. S. et al. Novel physico-biological treatment for the remediation of textile dyes-containing industrial effluents. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 689-95, Oct 2013. ISSN 1873-2976. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23985354>>. Acesso em: 15 out. 2016.
- ANDRADE, M. V. F. et al. Azo Dye Degradation by *Phanerochaete chrysosporium* in the Medium Enriched with Nitrogen in the Presence of Primary Co-Substrate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 5, p. 867-874, 2013. ISSN 1516-8913.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ARANTES, V. et al. Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin/Heidelberg, v. 38, n. 4, p. 541-555, 2011. ISSN 1367-5435.

ARANTES, V.; MILAGRES, A., M. F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1586-1595, 2009. ISSN 0100-4042.

ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. The synergistic action of ligninolytic enzymes (MnP and Laccase) and Fe^{3+} -reducing activity from white-rot fungi for degradation of Azure B. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 1, p. 17-22, 2007. ISSN 01410229.

_____. Effect of pH and oxalic acid on the reduction of Fe^{3+} by a biomimetic chelator and on Fe^{3+} desorption/adsorption onto wood: Implications for brown-rot decay. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 4, p. 478-483, 2009. ISSN 0964-8305.

ARGUN, M. E.; GÜCLÜ, D.; KARATAS, M. Adsorption of Reactive Blue 114 dye by using a new adsorbent: Pomelo peel. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 2013. ISSN 1226086X.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA. Usos de corantes, pigmentos e branqueadores ópticos Disponível em <http://abiquim.org.br/corantes/cor_aplicacoes.asp>. Acesso em: 15 out. 2016.

BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 206, n. 1, p. 69-74, 2002. ISSN 0378-1097.

BALLAMINUT, N. et al. Avaliação de substratos lignolíticos em inóculo de basidiomicetos para descoloração de corantes. In: Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 3., 2014a, Santos. **Resumos**. Santos: Mendes Convention Center, 2014a. Área 2, protocolo 643. Disponível em <<http://www.cbrg.net.br/cd/area-microorganismos.html>>. Acesso em 15 fev. 2017.

BALLAMINUT, N. et al. Physiological Characterization of fungal inoculum for biotechnological remediation of soils. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 4, p. 561-570, 08/2014 2014b. ISSN 1516-8913. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1516-89132014000400561&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em 15 out. 2016.

BALLAMINUT, N.; MATHEUS, D. R. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 248-252, 2007. ISSN 1517-8382.

BALLAMINUT, N.; YAMANAKA, R.; MACHADO, K. M. G. Interference of a commercial catalase preparation in laccase and peroxidase activities. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 5, p. 1193-1198, 2009. ISSN 1516-8913.

BARRASA, J.; MARTÍNEZ, A.; MARTÍNEZ, M. Isolation and selection of novel basidiomycetes for decolorization of recalcitrant dyes. **Folia Microbiologica**, Dordrecht, v. 54, n. 1, p. 59-66, 2009. ISSN 0015-5632.

BARRETO, W. et al. A kinetic study of the biodegradation of textile dye mixtures by *Pleurotus ostreatus* fungus. **Monatshefte für Chemie**, Vienna, v. 143, n. 10, p. 1389-1395, 2012. ISSN 0026-9247.

BASHA, C. A. et al. Degradation studies for textile reactive dye by combined electrochemical, microbial and photocatalytic methods. **Separation and Purification Technology**, p.303-309. 2011

BIBI, I.; BHATTI, H. N. Enhanced biodecolorization of reactive dyes by basidiomycetes under static conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 8, p. 2078-2090, 2012. ISSN 0273-2289.

BONNARME, P.; JEFFRIES, T. W. Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 210, 1990. ISSN 0099-2240.

BONUGLI-SANTOS, R.; DURRANT, L.; SETTE, L. The production of ligninolytic enzymes by marine-derived basidiomycetes and their biotechnological potential in the biodegradation of recalcitrant pollutants and the treatment of textile effluents. **Water Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 223, n. 5, p. 2333-2345, 2012. ISSN 0049-6979.

BONUGLI-SANTOS, R. et al. Enhanced textile dye decolorization by marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 using integrated statistical design. **Environmental Science and Pollution Research**, Berlin/Heidelberg, v. 23, n. 9, p. 8659-8668, 2016. ISSN 0944-1344.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Oxidation of non- phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS Letters**, v. 267, n. 1, p. 99-102, 1990. ISSN 00145793.

BÖHMER, S.; MESSNER, K.; SREBOTNIK, E. Oxidation of phenanthrene by a fungal laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and unsaturated lipids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 244, n. 1, p. 233-238, 1998. ISSN 0006-291X.

CAÑAS, A. I.; CAMARERO, S. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco- friendly processes. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 6, p. 694-705, 2010. ISSN 0734-9750.

CHACKO, J. T.; SUBRAMANIAM, K. Enzymatic degradation of azo dyes – a review. **International Journal of Environmental Sciences** 1: 1250-1260 p. 2011.

CHAIRIN, T. et al. Biodegradation of bisphenol a and decolorization of synthetic dyes by laccase from white rot fungus, *Trametes polyzona*. (Report). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 2, p. 539, 2013. ISSN 0273-2289.

CHEN, Q. et al. A multiscale study on the structural and mechanical properties of the luffa sponge from *Luffa cylindrica* plant. **Journal of Biomechanics**, 47: 1332 p. 2014.

CHENAUX, P.; LALJI, N.; LEFEBVRE, D. *Trametes meyenii* possesses elevated dye degradation abilities under normal nutritional conditions compared to other white rot fungi. **AMB Express**, Berlin/Heidelberg, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2014.

CHEQUER, F. M. D. et al. Textile dyes: dyeing process and environmental impact. In: GÜNAY, M. (Ed.). **Eco-Friendly textile dyeing and finishing**. InTech, 2013. DOI: 10.5772/53659. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/eco-friendly-textile-dyeing-and-finishing/textile-dyes-dyeing-process-and-environmental-impact>>. Acesso em: 15 out. 2016.

CLARKE, C. E. et al. Oxidative decolorization of acid azo dyes by a Mn oxide containing waste. **Environmental Science and Technology**, v. 44, p. 1116-1122, 2010. ISSN 1520-5851.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. Resolução nº 357, de 2005. **Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2016.

CUNICO, M. W. M. et al. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**. Curitiba, Paraná, v. 9, n. 1, p. 23-32, 2008.

DONLON, B. A. et al. Toxicity of N-substituted aromatics to acetoclastic methanogenic activity in granular sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 3889-3893, 1995. ISSN 00992240.

DOS SANTOS, A. B. et al. The transformation and toxicity of anthraquinone dyes during thermophilic (55 degrees C) and mesophilic (30 degrees C) anaerobic treatments. **Journal of Biotechnology**, v. 115, n. 4, p. 345-353, 2005. ISSN 0168-1656.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 28, n. 2, p. 83-99, 2000. ISSN 09263373.

EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K. E. L. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1151-1158, 1996. ISSN 00992240.

EL-GHENYMY, A. et al. Decolorization and mineralization of Orange G azo dye solutions by anodic oxidation with a boron-doped diamond anode in divided and undivided tank reactors. **Electrochimica Acta**, v. 130, p. 568-576, 2014. ISSN 0013-4686.

ENAYATZAMIR, K. et al. Decolouration of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* immobilised into alginate beads. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 17, n. 1, p. 145-153, 2010. ISSN 09441344.

EVANS, C. S. et al. Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2-3, p. 235-240, 1994. ISSN 01686445.

FARACO, V. et al. Bio- remediation of colored industrial wastewaters by the white- rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and their enzymes. **Biodegradation**, v. 20, n. 2, p. 209-220, 2009. ISSN 0923-9820.

FERNADES RÊGO, F. E. et al. Application of electro-Fenton process as alternative for degradation of Novacron Blue dye. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 2, p. 875-880, 6// 2014. ISSN 2213-3437. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213343714000451>>. Acesso em: 15 out. 2016.

FERNANDEZ, C.; LARRECHI, M. S.; CALLAO, M. P. An analytical overview of processes for removing organic dyes from wastewater effluents. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, 29: 1202-1211 p. 2010.

FERNANDO, E.; KESHAVARZ, T.; KYAZZE, G. Complete degradation of the azo dye Acid Orange-7 and bioelectricity generation in an integrated microbial fuel cell, aerobic two-stage bioreactor system in continuous flow mode at ambient temperature. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 155-162, 2014. ISSN 0960-8524.

FONSECA, M. I. et al. Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 6, p. 534-539, 2010. ISSN 0141-0229.

FUKUDA, E. et al. Fungal cell wall polysaccharides: purification and characterization. **Semina Ciências Agrárias** 30: 117-133 p. 2009.

GAHLOUT, M.; GUPTE, S.; GUPTE, A. Optimization of culture condition for enhanced decolorization and degradation of azo dye reactive violet 1 with concomitant production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma cupreum* AG-1. **3 Biotech**, Berlin/Heidelberg, v. 3, n. 2, p. 143-152, 2013. ISSN 2190-572X.

GARCÍA-MONTAÑO, J. et al. Degradation pathways of the commercial reactive azo dye Procion Red H-E7B under solar-assisted photo-fenton reaction. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 17, p. 6663-6670, 2008. ISSN 0013936X.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000. ISSN 01004042.

HADIBARATA, T. et al. Microbial decolorization of an azo dye reactive black 5 using white-rot fungus *Pleurotus eryngii* F032. **International Journal of Environment and Pollution**, Dordrecht, v. 224, n. 6, p. 1-9, 2013. ISSN 0049-6979.

HADIBARATA, T.; YUSOFF, A.; KRISTANTI, R. Acceleration of anthraquinone-type dye removal by white-rot fungus under optimized environmental conditions. **International Journal of Environment and Pollution**, Dordrecht, v. 223, n. 8, p. 4669-4677, 2012a. ISSN 0049-6979.

_____. Decolorization and metabolism of anthraquinone-type dye by laccase of white-rot fungi *Polyporus* sp. S133. **International Journal of Environment and Pollution**, Dordrecht, v. 223, n. 2, p. 933-941, 2012b. ISSN 0049-6979.

HAMMEL, K. E. et al. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 445-453, 2002. ISSN 01410229.

HAROUN, M.; IDRIS, A. Treatment of textile wastewater with an anaerobic fluidized bed reactor. **Desalination**, v. 237, n. 1-3, p. 357-366, 2009. ISSN 00119164.

HASSAN, H.; HAMEED, B. H. Oxidative decolorization of Acid Red 1 solutions by Fe-zeolite Y type catalyst. **Desalination**, v. 276, n. 1-3, p. 45-52, 2011. ISSN 00119164.

HORTA, M. A. et al. Linoleic acid peroxidation initiated by Fe³⁺-reducing compounds recovered from *Eucalyptus grandis* biotreated with *Ceriporiopsis subvermispora*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 164-171, 2011. ISSN 0964-8305.

HU, M. et al. Laccase- mediator system in the decolorization of different types of recalcitrant dyes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 45-51, 2009. ISSN 1367-5435.

IQBAL, M.; EDYVEAN, R. G. J. *Loofa sponge* immobilized fungal biosorbent: A robust system for cadmium and other dissolved metal removal from aqueous solution. **Chemosphere**, v. 61, n. 4, p. 510-518, 2005. ISSN 0045-6535.

IŞIK, M.; SPONZA, D. T. Fate and toxicity of azo dye metabolites under batch long-term anaerobic incubations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 934-939, 2007. ISSN 01410229.

JIANG, M.; TEN, Z.; DING, S. J. Decolorization of synthetic dyes by crude and purified laccases from *Coprinus comatus* grown under different cultures: the role of major isoenzyme in dyes decolorization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 2, p. 660-672, 2013. ISSN 0273-2289.

JOHANNES, C.; MAJCHERCZYK, A. Laccase activity tests and laccase inhibitors. **Journal of Biotechnology**, v. 78, n. 2, p. 193-199, 2000. ISSN 0168-1656.

KALPANA, D. et al. Biodecolorization and biodegradation of reactive Levafix Blue E-RA granulate dye by the white rot fungus *Irpex lacteus*. **Journal of Environmental Management**, 111: 142-149 p. 2012.

KANAGARAJ, J.; SENTHILVELAN, T.; PANDA, R. Biodegradation of azo dyes in industrial effluent: an eco-friendly way toward green technology. **Clean Techn Environ Policy**, Berlin/Heidelberg, v. 17, n. 2, p. 331-341, 2015. ISSN 1618-954X.

KAPICH, A. N. et al. Oxidizability of unsaturated fatty acids and of a non- phenolic lignin structure in the manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 2, p. 136-140, 2010. ISSN 0141-0229.

KARP, S. G. et al. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 735-739, 2012. ISSN 0960-8524.

KAUSHIK, P.; MALIK, A. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. **Environment International**, v. 35, n. 1, p. 127-141, 2009. ISSN 0160-4120.

KAVITHA, S. R. et al. Fluorescence quenching and photocatalytic degradation of textile dyeing waste water by silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 127, p. 115-121, 2014. ISSN 1386-1425.

KIRAN, S.; ALI, S.; ASGHER, M. Degradation and mineralization of azo dye Reactive Blue 222 by sequential Photo-Fenton's oxidation followed by aerobic biological treatment using white rot fungi. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 90, n. 2, p. 208-15, Feb 2013. ISSN 1432-0800. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23272326>>. Acesso em: 15 out. 2016.

KIRAN, S. et al. Comparative study on decolorization of Reactive Dye 222 by white rot fungi *Pleurotus ostreatus* IBL-02 and *Phanerochaete chrysosporium* IBL-03: **Academic Journals**, 6: 3639-3650 p. 2012.

KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, 41: 465-501 p. 1987.

KNOP, D.; YARDEN, O.; HADAR, Y. The ligninolytic peroxidases in the genus *Pleurotus* : divergence in activities, expression, and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin/Heidelberg, v. 99, n. 3, p. 1025-1038, 2015. ISSN 0175-7598.

KOYANI, R. D. et al. Contribution of lignin degrading enzymes in decolourisation and degradation of reactive textile dyes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 77, p. 1-9, 2013. ISSN 09648305.

KUMAR, V. V. et al. Biochemical characterization of three phase partitioned laccase and its application in decolorization and degradation of synthetic dyes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 74, n. 1-2, p. 63-72, 2012. ISSN 1381-1177.

KUNZ, A. et al. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova.**, 25: 78-82 p. 2002.

KUNZ, A.; REGINATTO, V.; DURAN, N. Combined treatment of textile effluent using the sequence *Phanerochaete chrysosporium*-ozone. **Chemosphere**, v. 44, n. 2, p. 281-287, 2001. ISSN 0045-6535.

KURADE, M. B. et al. Bacterial- yeast consortium as an effective biocatalyst for biodegradation of sulphonated azo dye Reactive Red 198. **RSC Advances**, v. 5, n. 29, p. 23046-23056, 2015. ISSN 20462069.

KUWAHARA, M. et al. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, n. 2, p. 247-250, 1984. ISSN 0014-5793.

KYZAS, G. Z. et al. Decolorization of dyeing wastewater using polymeric absorbents - an overview. In: GÜNEY, M. (Ed.). **Eco-Friendly textile dyeing and finishing**: InTech, 2013. DOI: 10.5772/52817. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/eco-friendly-textile-dyeing-and-finishing/decolorization-of-dyeing-wastewater-using-polymeric-absorbents-an-overview>>. Acesso em: 15 out. 2016.

LAU, Y.-Y. et al. Coagulation- flocculation of azo dye Acid Orange 7 with green refined laterite soil. **Chemical Engineering Journal**, v. 246, p. 383-390, 2014. ISSN 1385-8947.

LEVIN, L.; MELIGNANI, E.; RAMOS, A. M. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4554-4563, 2010. ISSN 09608524.

LI, H. et al. *In vivo* and *in vitro* decolorization of synthetic dyes by laccase from solid state fermentation with *Trametes* sp SYBC-L4. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 12, p. 2597-2605, 2014. ISSN 1615-7591.

LORENZO, M.; MOLDES, D.; SANROMAN, M. A. Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes. **Chemosphere**, v. 63, n. 6, p. 912-917, 2006. ISSN 0045-6535.

LU, Y. et al. Determination of the degradation products of selected sulfonated phenylazonaphthol dyes treated by white rot fungus *Pleurotus ostreatus* by capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, n. 1-2, p. 223, 2008. ISSN 0021-9673.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 246-252, 2005. ISSN 1517-8382.

MALACHOVA, K. et al. Biodegradation and detoxification potential of rotating biological contactor (RBC) with *Irpex lacteus* for remediation of dye-containing wastewater. **Water Research**, v. 47, n. 19, p. 7143-8, Dec 2013. ISSN 1879-2448. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24210510>>. Acesso em: 15 out. 2016.

MARTINEZ, M. J. et al. Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. **European Journal of Biochemistry**, v. 237, n. 2, p. 424-432, 1996. ISSN 0014-2956.

MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R. C/N Ratio and vegetable oil to mineralize 14Chexachlorobenzene by white-rot-fungi. In: Gavaskar, A. R., Chen, A. S. C. (eds.). **Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds**. Monterey, CA, Paper 2B-10. 2002.

MAZMANCI, M. A.; UNYAYAR, A. Decolourisation of Reactive Black 5 by *Funalia trogii* immobilised on *Luffa cylindrica* sponge. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 337-342, 2005. ISSN 1359-5113.

MELO, J. P. **Avaliação da degradação de corantes têxteis reativos da indústria têxtil por quelantes de ferro produzidos por fungos basidiomicetos**. 2009. 134 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas).Universidade Santo Amaro, São Paulo, 2009.

MESTER, T.; FIELD, J. A. Optimization of manganese peroxidase production by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. **FEMS Microbiology Letters**, v. 155, n. 2, p. 161-168, 1997. ISSN 0378-1097.

METAPRINT2D. Metabolic site predictor. Sam Adams, Centre for Molecular Science Informatics, University of Cambridge. Disponível em <<http://www-metaprint2d.ch.cam.ac.uk/metaprint2d-react/about.html>>. Acesso em 15 out. 2016.

MIELGO, I. et al. Oxidative Degradation of Azo Dyes by Manganese Peroxidase under Optimized Conditions. **Biotechnology Progress**, USA, v. 19, n. 2, p. 325-331, 2003. ISSN 8756-7938.

MILAGRES, A. M. F.; MACHUCA, A.; NAPOLEÃO, D. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 37, n. 1, p. 1-6, 1999. ISSN 0167-7012.

MINITAB. Windows User. Versão 17.3.1. Minitab Inc. 2016.

MOLDES, D.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á. Role of laccase and low molecular weight metabolites from *Trametes versicolor* in dye decolorization. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

MOLDES, D.; LORENZO, M.; SANROMÁN, M. Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 4, p. 327-330, 2004. ISSN 0141-5492.

MOLDES, D.; SANROMAN, M. A. Amelioration of the ability to decolorize dyes by laccase: relationship between redox mediators and laccase isoenzymes in *Trametes versicolor*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1197-1204, 2006. ISSN 0959-3993.

MOREIRA, F. C. et al. Decolorization and mineralization of Sunset Yellow FCF azo dye by anodic oxidation, electro-Fenton, UVA photoelectro-Fenton and solar photoelectro-

Fenton processes. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 142, p. 877-890, 2013. ISSN 0926-3373.

MOREIRA, M. T. et al. Evaluation of different fungal strains in the decolourisation of synthetic dyes. **Biotechnology Letters**, New York, v. 22, n. 18, p. 1499-1503, 2000. ISSN 0141-5492.

MOREIRA NETO, S. L. et al. Decolorization of salt-alkaline effluent with industrial reactive dyes by laccase-producing basidiomycetes strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 283-290, 2013. ISSN 0266-8254.

MOREIRA NETO, S. L. et al. Novel salt and alkali tolerant neotropical basidiomycetes for dye decolorisation in simulated textile effluent. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 2665-2673, 2011. ISSN 0959-3993.

MOREIRA NETO, S. L.; MILAGRES, A. M. F.; MUSSATTO, S. Reactive dyes and textile effluent decolorization by a mediator system of salt-tolerant laccase from *Peniophora cinerea*. **Separation and Purification Technology**, v. 135, p. 183-189, 2014. ISSN 1383-5866.

MOTA, T. et al. Decolourization of Congo Red by *Ganoderma lucidum* Laccase: Evaluation of Degradation Products and Toxicity. **Water Air Soil Pollution**, Cham, v. 226, n. 10, p. 1-11, 2015. ISSN 0049-6979.

MUKHERJEE, S. et al. Potential use of polyphenol oxidases (PPO) in the bioremediation of phenolic contaminants containing industrial wastewater. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, 12: 61-73 p. 2013.

NABIL, G. M.; EL-MALLAH, N. M.; MAHMOUD, M. E. Enhanced decolorization of reactive black 5 dye by active carbon sorbent-immobilized-cationic surfactant (AC-CS). **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 2013. ISSN 1226086X.

NIDHEESH, P.; GANDHIMATHI, R.; RAMESH, S. Degradation of dyes from aqueous solution by Fenton processes: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, Berlin/Heidelberg, v. 20, n. 4, p. 2099-2132, 2013. ISSN 0944-1344.

NOUSIAINEN, P. et al. Phenolic mediators enhance the manganese peroxidase catalyzed oxidation of recalcitrant lignin model compounds and synthetic lignin. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, p. 137-149, 2014. ISSN 1087-1845.

NOVOTNÝ, Č. et al. Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions. **International Biodeterioration and Biodegradation**, p.215-223. 2004

OLIVEIRA, L. H. S. et al. Descoloração de corantes sintéticos por basidiomicetos tropicais brasileiros. **Naturalia**, p.85-99. 2010

OSMA, J. F.; TOCA-HERRERA, J. L.; RODRIGUEZ-COUTO, S. Transformation pathway of Remazol Brilliant Blue R by immobilised laccase. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8509-8514, 2010. ISSN 0960-8524.

PAJOOTAN, E.; ARAMI, M.; RAHIMDOKHT, M. Discoloration of wastewater in a continuous electro- Fenton process using modified graphite electrode with multi-walled carbon nanotubes/surfactant. **Separation and Purification Technology**, v. 130, p. 34, 2014. ISSN 1383-5866.

PAKSHIRAJAN, K.; KHERIA, S. Continuous treatment of coloured industry wastewater using immobilized *Phanerochaete chrysosporium* in a rotating biological contactor reactor. **Journal of Environmental Management**, 101: 118-123 p. 2012.

PALMIERI, G. et al. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 920-924, 2000. ISSN 0099-2240.

PAPADOPOULOU, K. et al. Optimization of fungal decolorization of azo and anthraquinone dyes via Box-Behnken design. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 77, p. 31-38, 2013. ISSN 0964-8305.

PARANHOS, A. P. S. **Avaliação da produção de quelantes de ferro por fungos basidiomicetos e degradação de corantes da indústria têxtil**. 2007. 122 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas). Universidade Santo Amaro, São Paulo, 2007.

PARANHOS, A. P. S. **Estudo dos compostos de baixa massa molar, redutores de ferro, produzidos por basidiomicetos com potencialidade em descolorir corantes da indústria têxtil**. 2011. 141 f. Dissertação (Mestrado em Botânica). Instituto de Botânica da Secretaria do Estado de Meio Ambiente, São Paulo, 2011.

PEREIRA, L.; ALVES, M. Dyes - Environmental impact and remediation. In: Malik, A.; Grohmann, E. (Ed.). **Environmental Protection Strategies for Sustainable Development**. Springer, Netherlands, 2012. cap. 4, p.111-162. ISBN 978-94-007-1591-2. DOI: dx.doi.org/10.1007/978-94-007-1591-2.

PLÁCIDO, J. et al. Degradation and detoxification of synthetic dyes and textile industry effluents by newly isolated *Leptosphaerulina* sp. from Colombia. **Bioresources and Bioprocessing**, Berlin/Heidelberg, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2016.

POLAK, J.; JAROSZ-WILKOLAZKA, A. Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 1295-1307, 2012. ISSN 1359-5113.

PRATHEEBAA, P.; PERIASAMY, R.; PALVANNAN, T. Factorial design for optimization of laccase production from *Pleurotus ostreatus* IMI 395545 and laccase mediated synthetic dye decolorization. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 236-245, 2013. ISSN 0972-5849.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 3. ed. Campinas: Cárita, 2014. 336 p.

RODRIGUEZ, E. et al. Degradation of phenolic and non- phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 909-916, 2004. ISSN 0038-0717.

RODRIGUEZ, E.; PICKARD, M. A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. **Current Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 27-32, 1999. ISSN 0343-8651.

RODRÍGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M.; GÜBITZ, G. M. Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsuta*. **Chemosphere**, v. 58, n. 4, p. 417-422, 2005. ISSN 00456535.

SAAB, H. B. et al. *Luffa cylindrica* and phytosterols bioconversion: from shake flask to jar bioreactor. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 40: 1315-1320 p. 2013.

SABA, B. et al. Reactive black- 5 azo dye treatment in suspended and attach growth sequencing batch bioreactor using different co-substrates. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 556-562, 2013. ISSN 0964-8305.

SALAME, T. M. et al. Redundancy among manganese peroxidases in *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 7, p. 2405, 2013.

SANTOS, G. D. O. F. D. **Avaliação do tratamento de efluentes do banho de tingimento de indústria têxtil por fungos basidiomicetos em biorreatores**. 2016. 174 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

SARATALE, G. D. et al. Fixed- bed decolorization of Reactive Blue 172 by *Proteus vulgaris* NCIM- 2027 immobilized on *Luffa cylindrica* sponge. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 3, p. 494-503, 2011. ISSN 0964-8305.

SARAYU, K.; SANDHYA, S. Current technologies for biological treatment of textile wastewater – a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 167, n. 3, p. 645-661, 2012. ISSN 0273-2289.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987. ISSN 0003-2697.

SENTHILKUMAR, S. et al. Electrochemical oxidation and aerobic biodegradation with isolated bacterial strains for dye wastewater: Combined and integrated approach. **Electrochimica Acta**, v. 77, p. 171-178, 2012. ISSN 0013-4686.

SHAHID, A. et al. Biodegradation of textile dyes by fungi isolated from North Indian field soil. **Environment Asia**, v. 6, n. 2, p. 51-57, 2013. ISSN 1906-1714.

SHANKAR, S.; SHIKHA, S. Laccase Production and Enzymatic Modification of Lignin by a Novel *Peniophora* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 4, p. 1082-1094, 2012. ISSN 0273-2289.

_____. Effect of Metal Ions and Redox Mediators on Decolorization of Synthetic Dyes by Crude Laccase from a Novel White rot Fungus *Peniophora* sp. (NFCCI-2131). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Boston, v. 175, n. 1, p. 635-647, 2015. ISSN 0273-2289. Errata em: **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Boston, v. 175, n. 1, p. 648, 2015.

SI, J.; CUI, B.; DAI, Y. Decolorization of chemically different dyes by white- rot fungi in submerged cultures. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1099-1108, 2013. ISSN 1590-4261.

SIDDIQUE, M.; FAROOQ, R.; PRICE, G. J. Synergistic effects of combining ultrasound with the Fenton process in the degradation of Reactive Blue 19. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 3, p. 1206-1212, 2013. ISSN 1350-4177.

SILVÉRIO, S. et al. Laccase production by free and immobilized mycelia of *Peniophora cinerea* and *Trametes versicolor* : a comparative study. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin/Heidelberg, v. 36, n. 3, p. 365-373, 2013. ISSN 1615-7591.

SINGH, R. L.; SINGH, P. K.; SINGH, R. P. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes – a review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 104, p. 21-31, 2015. ISSN 0964-8305.

SREBOTNIK, E.; BOISSON, J.-N. Peroxidation of linoleic acid during the oxidation of phenols by fungal laccase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 5, p. 785-789, 2005. ISSN 0141-0229.

STOOKEY, L. L. Ferrozine - A new spectrophotometric reagent for iron. **Analytical Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 779-781, 1970. ISSN 00032700.

SUNDARAMOORTHY, M. et al. High-resolution crystal structure of manganese peroxidase: substrate and inhibitor complexes. **Biochemistry**, v. 44, n. 17, p. 6463, 2005. ISSN 0006-2960.

SVOBODOVA, K. et al. Implication of mycelium- associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 3, p. 463-471, 2008. ISSN 0960-8524.

TAVARES, A. et al. Optimisation of reactive textile dyes degradation by laccase-mediator system. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 12, p. 1609-1615, 2008. ISSN 0268-2575.

TEN HAVE, R.; TEUNISSEN, P. J. M. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white- rot fungi. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 11, p. 3397-3413, 2001. ISSN 00092665.

THOMAS, S. et al. Oxidative degradation of Acid Red 1 in aqueous medium. **Chemical Engineering Journal**, v. 244, p. 473-482, 2014. ISSN 1385-8947.

TINOCO, R. et al. Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 531-540, 2011. ISSN 1367-5435.

VANHULLE, S. et al. Decolorization, cytotoxicity, and genotoxicity reduction during a combined ozonation/fungal treatment of dye-contaminated wastewater. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 2, p. 584, 2008. ISSN 0013-936X.

WANG, C.-T. et al. COD removal from real dyeing wastewater by electro-Fenton technology using an activated carbon fiber cathode. **Desalination**, v. 253, n. 1, p. 129-134, 2010. ISSN 0011-9164.

WATANABE, T. et al. Formation of acyl radical in lipid peroxidation of linoleic acid by manganese dependent peroxidase from *Ceriporiopsis subvermispora* and *Bjerkandera adusta*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 13, p. 4222-4231, 2000. ISSN 00142956.

WATHARKAR, A. D. et al. Enhanced phytotransformation of Navy Blue RX dye by *Petunia grandiflora* Juss. with augmentation of rhizospheric *Bacillus pumilus* strain PgJ and subsequent toxicity analysis. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 246-254, 2013. ISSN 0960-8524.

WENG, C. H. et al. Rapid decoloration of Reactive Black 5 by an advanced Fenton process in conjunction with ultrasound. **Separation and Purification Technology**, v. 117, p. 75, 2013. ISSN 1383-5866.

WONG, D. W. S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 157: 174-209 p. 2009.

WONG, Y.; YU, J. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. **Water Research**, v. 33, n. 16, p. 3512-3520, 1999. ISSN 0043-1354.

ZAHARIA, C.; SUTEU, D. Textile organic dyes – characteristics, polluting effects and separation/elimination procedures from industrial effluents – a critical overview. In: PUZYN, T. e MOSTRAG-SZLICHTYNG, A. (Ed.). **Organic pollutants ten years after the stockholm convention - environmental and analytical update**: In Tech, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/organic-pollutants-ten-years-after-the-stockholm-convention-environmental-and-analytical-update/textile-organic-dyes-characteristics-polluting-effects-and-separation-elimination-procedures-from-in>>. Acesso em: 15 out. 2016.

ZERAIK, A. E. et al. Development of a spot test for peroxidase activity monitoring during a purification procedure. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 731-734, 2008. ISSN 0100-4042.

ZHAO, X.; HARDIN, I. R. HPLC and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*. **Dyes and Pigments**, v. 73, n. 3, p. 322-325, 2007. ISSN 0143-7208.

ZHAO, X. et al. Study of biodegradation products from azo dyes in fungal degradation by capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1159, n. 1-2, p. 217-224, 2007. ISSN 00219673.

ZHAO, X. H.; HARDIN, I. R.; HWANG, H. M. Biodegradation of a model azo disperse dye by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 57, n. 1, p. 1-6, 2006. ISSN 0964-8305.

ZILLE, A. et al. Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent. **Biotechnology Letters**, New York, v. 25, n. 17, p. 1473-1477, 2003. ISSN 0141-5492.

ZILLE, A. et al. Degradation of azo dyes by *Trametes villosa* laccase over long periods of oxidative conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6711, 2005. ISSN 0099-2240

ZOLLINGER, H. **Colour chemistry: syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments**. 3. ed. Switzerland: Wiley-VHC. 2003. 637p.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Análise estatística item 4.1

Modelo Linear Generalizado: pH *versus* Sistema (Corante); Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Corante	Fixo	4	0; 1; 2; 3 (0 = controle abiótico com água; 1 = controle abiótico com MB; 2 = controle biótico; 3 = sistema de tratamento)
Tempo	Fixo	6	0; 6; 12; 24; 48; 72

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Corante	3	4,909	1,6363	5,93	0,002
Tempo	5	1,476	0,2953	1,07	0,390
Erro	45	12,420	0,2760		
Falta de ajuste	15	5,860	0,3907	1,79	0,086
Erro puro	30	6,560	0,2187	*	*
Total	53	18,805			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,525358	33,95%	22,21%	4,35%

Comparações Pareadas de Tukey: Resposta = pH, Termo = Corante

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Corante	N	Média	Agrupamento
3	12	6,12167	A
0	12	6,10417	A
2	18	5,57222	B
1	12	5,43000	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Biomassa *versus* Tempo; Tratamento

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	6	0; 6; 12; 24; 48; 72
Tratamento	Fixo	2	0; 1 (0 = sistema sem corante; 1 = sistema com corante)

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	5	0,001960	0,000392	0,96	0,464
Tratamento	1	0,000347	0,000347	0,85	0,367
Erro	23	0,009423	0,000410		
Falta de ajuste	5	0,003079	0,000616	1,75	0,175
Erro puro	18	0,006344	0,000352	*	*
Total	29	0,011729			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,0202409	19,66%	0,00%	0,00%

Modelo Linear Generalizado: Fenoloxidasas *versus* Tempo; Tratamento

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	6	0; 6; 12; 24; 48; 72
Tratamento	Fixo	2	0; 1 (0 = sistema sem corante; 1 = sistema com corante)

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	5	717,7	143,5	0,56	0,726

Continuação

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tratamento	1	2807,1	2807,1	11,04	0,003
Erro	23	5846,1	254,2		
Falta de ajuste	5	1396,7	279,3	1,13	0,380
Erro puro	18	4449,4	247,2	*	*
Total	29	9370,8			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
15,9430	37,61%	21,34%	0,00%

Comparações Pareadas de Tukey: Resposta = Fenoloxidasas, Termo = Tratamento

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tratamento	N	Média	Agrupamento
0	12	33,2948	A
1	18	13,5497	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Lacase *versus* Tempo; Tratamento

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	6	0; 6; 12; 24; 48; 72
Tratamento	Fixo	2	0; 1 (0 = sistema sem corante; 1 = sistema com corante)

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	5	305,4	61,08	0,75	0,592
Tratamento	1	680,6	680,64	8,40	0,008
Erro	23	1864,7	81,07		
Falta de ajuste	5	499,3	99,86	1,32	0,301
Erro puro	18	1365,4	75,85	*	*
Total	29	2850,7			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
9,00403	34,59%	17,53%	0,00%

Comparações Pareadas de Tukey: Resposta = Lacase, Termo = Tratamento

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tratamento	N	Média	Agrupamento
0	12	19,5708	A
1	18	9,8479	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Peroxidases Totais *versus* Tempo; Tratamento

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	6	0; 6; 12; 24; 48; 72
Tratamento	Fixo	2	0; 1 (0 = sistema sem corante; 1 = sistema com corante)

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	5	157,9	31,59	0,52	0,762
Tratamento	1	644,8	644,78	10,53	0,004
Erro	23	1408,9	61,26		
Falta de ajuste	5	388,5	77,69	1,37	0,281
Erro puro	18	1020,4	56,69	*	*
Total	29	2211,6			

Continuação

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
7,82662	36,30%	19,68%	0,00%

Comparações Pareadas de Tukey: Resposta = Peroxidases, Termo = Tratamento

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tratamento	N	Média	Agrupamento
0	12	13,7241	A
1	18	4,2608	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: ATD versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	6	0; 6; 12; 24; 48; 72

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	5	0,000080	0,000016	2,19	0,124
Erro	12	0,000087	0,000007		
Total	17	0,000167			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,0026969	47,70%	25,91%	0,00%

Modelo Linear Generalizado: Descoloração versus Tempo; Tratamento

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Time D%	Fixo	5	6; 12; 24; 48; 72
Treat D%	Fixo	3	0; 1; 2 (0 = controle aiótico com água; 1 = controle abiótico com MB; 2 = sistemas de tratamento)

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	4	0,3575	0,08938	6,57	0,001
Tratamento	2	7,9844	3,99222	293,66	0,000
Erro	28	0,3807	0,01359		
Falta de ajuste	8	0,2035	0,02543	2,87	0,027
Erro puro	20	0,1772	0,00886	*	*
Total	34	8,7226			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,116597	95,64%	94,70%	93,19%

Comparações Pareadas de Tukey: Resposta = Descoloração, Termo = Tempo

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tempo	N	Média	Agrupamento
24	7	0,552294	A
48	7	0,487382	A
72	7	0,485810	A
12	7	0,312845	B
6	7	0,303509	B

Comparações Pareadas de Tukey: Resposta = Descoloração, Termo = Tratamento

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tratamento	N	Média	Agrupamento
2	15	1,06866	A
0	10	0,17054	B
1	10	0,04590	C

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

APÊNDICE B – Análise estatística item 4.2

Modelo Linear Generalizado: Biomassa *Pleurotus ostreatus* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	520,3	86,71	4,85	0,007
Erro	14	250,1	17,86		
Total	20	770,3			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
4,22628	67,54%	53,63%	26,96%

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tempo	N	Média	Agrupamento
21	3	23,4460	A
30	3	21,4113	A
14	3	14,6253	A B
7	3	14,0267	A B
10	3	14,0253	A B
0	3	10,6593	B
3	3	8,6300	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Biomassa *Peniophora cinerea* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	937,6	156,26	3,31	0,030
Erro	14	660,4	47,17		
Total	20	1597,9			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
6,86795	58,67%	40,96%	7,02%

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tempo	N	Média	Agrupamento
21	3	32,3073	A
10	3	24,9120	A B
14	3	24,5560	A B
7	3	21,2953	A B
30	3	14,3293	B
3	3	13,4847	B
0	3	13,4733	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Biomassa *Trametes villosa* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	701,3	116,89	3,52	0,024
Erro	14	464,7	33,19		
Total	20	1166,0			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
5,76112	60,15%	43,07%	10,33%

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tempo	N	Média	Agrupamento
14	3	30,6640	A
21	3	29,7600	A
30	3	29,2893	A
7	3	26,3247	A B
10	3	22,3893	A B
3	3	18,8653	A B
0	3	14,2220	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Descoloração RB222 3E-02% por *P. ostreatus* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	1,047	0,17453	1,95	0,141
Erro	14	1,250	0,08929		
Total	20	2,297			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,298822	45,58%	22,26%	0,00%

Modelo Linear Generalizado: Descoloração RB222 3E-04% por *P. ostreatus* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	0,1690	0,02817	0,77	0,608
Erro	14	0,5139	0,03671		
Total	20	0,6830			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,191598	24,75%	0,00%	0,00%

Modelo Linear Generalizado: Descoloração RR222 3E-05% *P. ostreatus* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	0,3923	0,06538	1,43	0,270
Erro	14	0,6389	0,04563		
Total	20	1,0311			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,213618	38,04%	11,49%	0,00%

Modelo Linear Generalizado: Descoloração RB222 3E-02% por *P. cinerea* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	0,5619	0,09365	0,71	0,649
Erro	14	1,8535	0,13240		
Total	20	2,4154			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,363863	23,26%	0,00%	0,00%

Modelo Linear Generalizado: Descoloração RB222 3E-04% por *P. cinerea* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	0,09833	0,01639	0,38	0,879
Erro	14	0,60313	0,04308		
Total	20	0,70146			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,207559	14,02%	0,00%	0,00%

Modelo Linear Generalizado: Descoloração RR222 3E-05% por *P. cinerea* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	0,5689	0,09481	9,19	0,000
Erro	14	0,1445	0,01032		
Total	20	0,7134			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,101588	79,75%	71,07%	54,43%

Continuação

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tempo	N	Média	Agrupamento
30	3	0,520221	A
0	3	0,362254	A B
14	3	0,217677	B C
10	3	0,204743	B C
3	3	0,194772	B C
21	3	0,046830	C
7	3	0,000000	C

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Descoloração RB222 3E-02% por *T. villosa* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	0,5587	0,09312	2,45	0,079
Erro	14	0,5332	0,03808		
Total	20	1,0919			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,195148	51,17%	30,24%	0,00%

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tempo	N	Média	Agrupamento
30	3	0,546841	A
7	3	0,270012	A B
3	3	0,182611	A B
14	3	0,177994	A B
0	3	0,074025	A B
10	3	0,051892	B
21	3	0,049090	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Descoloração RB222 3E-04% por *T. villosa* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	0,3142	0,05236	2,48	0,076
Erro	14	0,2955	0,02110		
Total	20	0,6096			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,145275	51,53%	30,76%	0,00%

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tempo	N	Média	Agrupamento
30	3	0,424064	A
0	3	0,301771	A B

Continuação

Tempo	N	Média	Agrupamento
14	3	0,254780	A B
21	3	0,246870	A B
10	3	0,223420	A B
3	3	0,139876	A B
7	3	0,000000	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Descoloração RR222 3E-05% por *T. villosa* versus Tempo D

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	0,4020	0,06700	2,79	0,053
Erro	14	0,3363	0,02402		
Total	20	0,7383			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,154985	54,45%	34,93%	0,00%

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tempo	N	Média	Agrupamento
0	3	0,516272	A
30	3	0,392957	A B
10	3	0,273640	A B
3	3	0,269050	A B
14	3	0,223395	A B
21	3	0,172277	A B
7	3	0,054314	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: pH *P. ostreatus* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	3,0607	0,51011	23,12	0,000
Erro	14	0,3089	0,02206		
Total	20	3,3695			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,148533	90,83%	86,91%	79,38%

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tempo	N	Média	Agrupamento
30	3	5,95667	A
14	3	5,68667	A B
21	3	5,63000	A B
10	3	5,33000	B C
3	3	4,99333	C D
7	3	4,97667	C D

Continuação

Tempo	N	Média	Agrupamento
0	3	4,91000	D

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: pH *P. cinerea* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	5,3553	0,89255	49,76	0,000
Erro	14	0,2511	0,01794		
Total	20	5,6065			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,133933	95,52%	93,60%	89,92%

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tempo	N	Média	Agrupamento
30	3	5,48667	A
21	3	5,08667	B
0	3	4,95333	B C
14	3	4,84000	B C
3	3	4,71667	C
10	3	4,09000	D
7	3	3,94667	D

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: pH *T. villosa* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	5,1372	0,85620	29,63	0,000
Erro	14	0,4045	0,02890		
Total	20	5,5417			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,169986	92,70%	89,57%	83,58%

Comparações Pareadas de Tukey:

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tempo	N	Média	Agrupamento
30	3	5,46333	A
21	3	4,99000	B
14	3	4,88000	B
0	3	4,87667	B
3	3	4,70333	B
10	3	4,15333	C
7	3	3,87333	C

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Fenoloxidasas *P. ostreatus* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	187117	31186,1	61,27	0,000
Erro	14	7126	509,0		
Total	20	194242			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
22,5606	96,33%	94,76%	91,75%

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tempo	N	Média	Agrupamento
30	3	248,168	A
21	3	172,596	B
14	3	45,914	C
3	3	0,000	C
7	3	0,000	C
0	3	-0,000	C
10	3	-0,000	C

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Lacase *P. ostreatus* versus Tempo D

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	143656	23942,7	69,65	0,000
Erro	14	4813	343,8		
Total	20	148469			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
18,5410	96,76%	95,37%	92,71%

Comparações Pareadas de Tukey: Resposta = Lacase_PO, Termo = Tempo D

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tempo	N	Média	Agrupamento
30	3	223,475	A
21	3	136,328	B
14	3	26,931	C
3	3	0,000	C
7	3	0,000	C
10	3	-0,000	C
0	3	-0,000	C

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Peroxidasas *P. ostreatus* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Continuação

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	4999	833,2	1,61	0,217
Erro	14	7255	518,2		
Total	20	12254			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
22,7646	40,80%	15,42%	0,00%

Modelo Linear Generalizado: MnP *P. ostreatus* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	58432	9738,7	12,70	0,000
Erro	14	10739	767,1		
Total	20	69171			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
27,6957	84,48%	77,82%	65,07%

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tempo	N	Média	Agrupamento
30	3	142,727	A
21	3	82,122	A
14	3	7,141	B
3	3	0,000	B
7	3	0,000	B
10	3	-0,000	B
0	3	-0,000	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Fenoloxidas *P. cinerea* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	1361045	226841	5,47	0,004
Erro	14	580162	41440		
Total	20	1941208			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
203,569	70,11%	57,30%	32,75%

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tempo	N	Média	Agrupamento
14	3	656,225	A
21	3	595,727	A
30	3	579,882	A
10	3	467,630	A B

Continuação

Tempo	N	Média	Agrupamento
7	3	263,035	A B
3	3	25,208	B
0	3	0,000	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Lacase *P. cinerea* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	1529845	254974	5,10	0,006
Erro	14	700511	50037		
Total	20	2230356			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
223,688	68,59%	55,13%	29,33%

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tempo	N	Média	Agrupamento
14	3	821,671	A
30	3	627,828	A
21	3	466,858	A B
10	3	426,269	A B
7	3	294,468	A B
3	3	75,932	B
0	3	0,000	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Peroxidases *P. cinerea* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	125327	20888	0,92	0,510
Erro	14	317971	22712		
Total	20	443298			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
150,706	28,27%	0,00%	0,00%

Modelo Linear Generalizado: MnP *P. cinerea* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	7810	1301,7	1,41	0,279
Erro	14	12942	924,4		
Total	20	20752			

Continuação

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
30,4041	37,64%	10,91%	0,00%

Modelo Linear Generalizado: Fenoloxidas *T. villosa* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	664227	110704	3,26	0,032
Erro	14	475009	33929		
Total	20	1139236			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
184,199	58,30%	40,44%	6,19%

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tempo	N	Média	Agrupamento
30	3	509,814	A
14	3	397,563	A B
7	3	203,051	A B
10	3	158,243	A B
3	3	60,344	A B
21	3	41,053	B
0	3	0,000	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Lacase *T. villosa* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	600707	100118	2,73	0,057
Erro	14	513105	36650		
Total	20	1113812			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
191,443	53,93%	34,19%	0,00%

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tempo	N	Média	Agrupamento
30	3	474,832	A
14	3	407,440	A B
10	3	211,077	A B
7	3	161,947	A B
21	3	68,678	A B
3	3	48,461	A B
0	3	0,000	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Peroxidases *T. villosa* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	60953	10159	0,94	0,498
Erro	14	151559	10826		
Total	20	212511			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
104,046	28,68%	0,00%	0,00%

Modelo Linear Generalizado: MnP *T. villosa* versus Tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	7	0; 3; 7; 10; 14; 21; 30

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tempo	6	674,5	112,42	7,86	0,001
Erro	14	200,3	14,31		
Total	20	874,8			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
3,78248	77,10%	67,29%	48,48%

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tempo	N	Média	Agrupamento
30	3	16,3713	A
14	3	1,4142	B
0	3	0,0000	B
3	3	0,0000	B
7	3	0,0000	B
10	3	-0,0000	B
21	3	-0,0000	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Análise de Correlação *Pleurotus ostreatus***Lacase versus descoloração 3E-02% RB222**

Correlação de Pearson = 0,719

Valor-P = 0,000

Lacase versus descoloração 3E-04% RB222

Correlação de Pearson = 0,314

Valor-P = 0,165

Lacase versus descoloração 3E-05% RB222

Correlação de Pearson = 0,534

Valor-P = 0,013

MnP versus descoloração 3E-02% RB222

Correlação de Pearson = 0,691

Valor-P = 0,001

*Continuação***MnP versus descoloração 3E-04% RB222**

Correlação de Pearson = 0,204

Valor-P = 0,376

MnP versus descoloração 3E-05% RB222

Correlação de Pearson = 0,264

Valor-P = 0,247

Análise de Correlação *Peniophora cinerea***Lacase versus descoloração 3E-02% RB222**

Correlação de Pearson = -0,400

Valor-P = 0,081

Lacase versus descoloração 3E-04% RB222

Correlação de Pearson = -0,301

Valor-P = 0,196

Lacase versus descoloração 3E-05% RB222

Correlação de Pearson = 0,005

Valor-P = 0,984

MnP versus descoloração 3E-02% RB222

Correlação de Pearson = -0,217

Valor-P = 0,359

MnP versus descoloração 3E-04% RB222

Correlação de Pearson = -0,650

Valor-P = 0,002

MnP versus descoloração 3E-05% RB222

Correlação de Pearson = 0,413

Valor-P = 0,070

Análise de Correlação *Trametes villosa***Lacase versus descoloração 3E-02% RB222**

Correlação de Pearson = 0,200

Valor-P = 0,384

Lacase versus descoloração 3E-04% RB222

Correlação de Pearson = -0,131

Valor-P = 0,572

Lacase versus descoloração 3E-05% RB222

Correlação de Pearson = -0,334

Valor-P = 0,139

MnP versus descoloração 3E-02% RB222

Correlação de Pearson = 0,377

Valor-P = 0,092

MnP versus descoloração 3E-04% RB222

Correlação de Pearson = 0,200

Valor-P = 0,385

MnP versus descoloração 3E-05% RB222

Correlação de Pearson = -0,038

Valor-P = 0,872

APÊNDICE C – Análise estatística item 4.3

Pleurotus ostreatus

Regressão de Superfície de Resposta: Descoloração RB222 por *P. ostreatus* versus Cu+2; Mn+2; Tempo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	1,91224	0,212471	4,66	0,027
Linear	3	1,15583	0,385276	8,45	0,010
Cu+2	1	0,00024	0,000238	0,01	0,944
Mn+2	1	0,39902	0,399022	8,75	0,021
Tempo	1	0,75657	0,756569	16,59	0,005
Quadrado	3	0,28994	0,096647	2,12	0,186
Cu+2*C+2	1	0,03725	0,037248	0,82	0,396
Mn+2*Mn+2	1	0,03023	0,030227	0,66	0,442
Tempo*Tempo	1	0,16485	0,164854	3,61	0,099
Interação com 2 Fatores	3	0,46647	0,155489	3,41	0,082
Cu+2*Mn+2	1	0,00133	0,001335	0,03	0,869
Cu+2*Tempo	1	0,00821	0,008212	0,18	0,684
Mn+2*Tempo	1	0,45692	0,456922	10,02	0,016
Erro	7	0,31928	0,045611		
Falta de ajuste	5	0,31437	0,062873	25,60	0,038
Erro puro	2	0,00491	0,002456	*	*
Total	16	2,23152			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,213568	85,69%	67,30%	0,00%

Coefficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	0,244	0,123	1,98	0,088		
Cu+2	-0,0084	-0,0042	0,0578	-0,07	0,944	1,00
Mn+2	0,3420	0,1710	0,0578	2,96	0,021	1,00
Tempo	0,4709	0,2355	0,0578	4,07	0,005	1,00
Cu+2*C+2	-0,1151	-0,0576	0,0637	-0,90	0,396	1,15
Mn+2*Mn+2	0,1037	0,0519	0,0637	0,81	0,442	1,15
Tempo*Tempo	0,2422	0,1211	0,0637	1,90	0,099	1,15
Cu+2*Mn+2	-0,0258	-0,0129	0,0755	-0,17	0,869	1,00
Cu+2*Tempo	-0,0641	-0,0320	0,0755	-0,42	0,684	1,00
Mn+2*Tempo	0,4780	0,2390	0,0755	3,17	0,016	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

Descoloração = 0,82 + (2,31*C+2) - (2,48*Mn+2) - (0,1261*Tempo) - (1,35*C+2*C+2) + (0,732*Mn+2*Mn+2) + (0,00282*Tempo*Tempo) - (0,2*C+2*Mn+2) - (0,0237*C+2*Tempo) + (0,1372*Mn+2*Tempo)

Regressão de Superfície de Resposta: Fenoloxidasas *P. ostreatus* versus Cu+2; Mn+2; Tempo

Estimated Regression Coefficients for Fenoloxidasas using coded units

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	72,384	16,978	4,263	0,004
Cu+2	-1,103	7,978	-0,138	0,894
Mn+2	-15,718	7,978	-1,970	0,089
Tempo	19,196	7,978	2,406	0,047
Cu+2*C+2	-14,040	8,789	-1,598	0,154
Mn+2*Mn+2	-21,587	8,789	-2,456	0,044
Tempo*Tempo	-16,829	8,789	-1,915	0,097
Cu+2*Mn+2	8,016	10,419	0,769	0,467
Cu+2*Tempo	-5,662	10,419	-0,543	0,604
Mn+2*Tempo	-5,527	10,419	-0,530	0,612

Continuação

S = 29,4689 PRESS = 43829,2

R-Sq = 72,94% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 38,15%

Analysis of Variance for Fenoloxidasas

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	16384,8	16384,8	1820,5	2,10	0,171
Linear	3	8415,4	8415,4	2805,1	3,23	0,091
Square	3	6954,6	6954,6	2318,2	2,67	0,129
Interaction	3	1014,9	1014,9	338,3	0,39	0,764
Residual Erro	7	6078,9	6078,9	868,4		
Lack-of-Fit	5	5420,2	5420,2	1084,0	3,29	0,249
Pure Error	2	658,7	658,7	329,4		
Total	16	22463,7				

Estimated Regression Coefficients for Fenoloxidasas using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	-333,725
Cu+2	420,735
Mn+2	239,819
Tempo	21,5579
Cu+2*Cv+2	-330,060
Mn+2*Mn+2	-304,920
Tempo*Tempo	-0,392552
Cu+2*Mn+2	146,066
Cu+2*Tempo	-4,19276
Mn+2*Tempo	-3,17258

Regressão de Superfície de Resposta: Lacase *P. ostreatus* versus Cu+2; Mn+2; Tempo

Estimated Regression Coefficients for Lacase using coded units

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	95,222	20,381	4,672	0,002
Cu+2	2,209	9,577	0,231	0,824
Mn+2	-22,172	9,577	-2,315	0,054
Tempo	28,990	9,577	3,027	0,019
Cu+2*Cv+2	-21,268	10,551	-2,016	0,084
Mn+2*Mn+	-29,306	10,551	-2,778	0,027
Tempo*Tempo	-12,820	10,551	-1,215	0,264
Cu+2*Mn+2	-14,064	12,507	-1,124	0,298
Cu+2*Tempo	-8,508	12,507	-0,680	0,518
Mn+2*Tempo	-13,485	12,507	-1,078	0,317

S = 35,3756 PRESS = 42580,1

R-Sq = 79,27% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 52,62%

Analysis of Variance for Lacase

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	33503	33503	3722,6	2,97	0,082
Linear	3	18242	18242	6080,5	4,86	0,039
Square	3	11645	11645	3881,8	3,10	0,098
Interaction	3	3616	3616	1205,4	0,96	0,461
Residual Error	7	8760	8760	1251,4		
Lack-of-Fit	5	4063	4063	812,6	0,35	0,853
Pure Error	2	4697	4697	2348,4		
Total	16	42263				

Estimated Regression Coefficients for Lacase using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	-626,156
Cu+2	919,287

Continuação

Estimated Regression Coefficients for Lacase using data in uncoded units

Mn+2	681,318
Tempo	23,5901
Cu+2*Cu+2	-499,968
Mn+2*Mn+2	-413,967
Tempo*Tempo	-0,299032
Cu+2*Mn+2	-256,274
Cu+2*Tempo	-6,29986
Mn+2*Tempo	-7,74043

Regressão de Superfície de Resposta: MnP *P. ostreatus* versus Cu+2; Mn+2; Tempo

Estimated Regression Coefficients for MnP using coded units

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	9,0695	37,69	0,241	0,817
Cu+2	-22,3823	17,71	-1,264	0,247
Mn+2	-25,5453	17,71	-1,442	0,192
Tempo	5,4803	17,71	0,309	0,766
Cu+2*Cu+2	16,9856	19,51	0,871	0,413
Mn+2*Mn+2	19,1034	19,51	0,979	0,360
Tempo*Tempo	-14,1844	19,51	-0,727	0,491
Cu+2*Mn+2	1,3494	23,13	0,058	0,955
Cu+2*Tempo	-1,8703	23,13	-0,081	0,938
Mn+2*Tempo	-0,3646	23,13	-0,016	0,988

S = 65,4218 PRESS = 226811

R-Sq = 48,66% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 0,00%

Analysis of Variance for MnP

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	28392,9	28392,9	3154,77	0,74	0,672
Linear	3	16149,4	16149,4	5383,15	1,26	0,360
Square	3	12199,9	12199,9	4066,63	0,95	0,467
Interaction	3	43,6	43,6	14,54	0,00	1,000
Residual Error	7	29960,1	29960,1	4280,01		
Lack-of-Fit	5	29888,4	29888,4	5977,68	166,83	0,006
Pure Error	2	71,7	71,7	35,83		
Total	16	58353,0				

Estimated Regression Coefficients for MnP using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	254,373
Cu+2	-619,067
Mn+2	-406,761
Tempo	13,7687
Cu+2*Cu+2	399,294
Mn+2*Mn+2	269,845
Tempo*Tempo	-0,330861
Cu+2*Mn+2	24,5894
Cu+2*Tempo	-1,38491
Mn+2*Tempo	-0,209255

Otimização da Resposta para Descoloração por *P. ostreatus*

Parâmetros

Resposta Meta Inferior Alvo Superior Peso Importância

Descoloração Máximo 0 1,57 1 1

Solução

Solução	Cu+2	Mn+2	Tempo	Ajuste	Composta
1	0,51	1	29	2,11673	1

Continuação

Predição de Múltiplas Respostas

Variável Configuração

Cu+2 0,51**Mn+2 1****Tempo 29**

EP do

Resposta	Ajuste	Ajustado	IC de 95%	IP de 95%
Descoloração	2,117	0,353	(1,283; 2,951)	(1,142; 3,092)

Otimização da Resposta para Lacase produzida por *P. ostreatus*

Parâmetros

Resposta Meta Inferior Alvo Superior Peso Importância

Lacase Máximo -23,15 422,87 1 1

Solução

Lacase Desirability

Solução	Cu+2	Mn+2	Tempo	Ajuste	Composta
1	0,65	0,358848	27,8889	125,198	0,332605

Predição de Múltiplas Respostas

Variável Configuração

Cu+2 0,65**Mn+2 0,358848****Tempo 27,8889**

EP do

Resposta	Ajuste	Ajustado	IC de 95%	IP de 95%
Lacase	125,2	27,5	(60,2; 190,2)	(19,3; 231,1)

*Peniophora cinerea***Regressão de Superfície de Resposta: Descoloração RB222 por *P. cinerea* versus Cu+2; Mn+2; Tempo**

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	0,226628	0,025181	0,43	0,881
Linear	3	0,070349	0,023450	0,40	0,757
Cu+2	1	0,008202	0,008202	0,14	0,719
Mn+2	1	0,051303	0,051303	0,88	0,380
Tempo	1	0,010845	0,010845	0,19	0,680
Quadrado	3	0,155421	0,051807	0,89	0,494
Cu+2*Cv+2	1	0,026285	0,026285	0,45	0,524
Mn+2*Mn+2	1	0,051106	0,051106	0,87	0,381
Tempo*Tempo	1	0,139941	0,139941	2,39	0,166
Interação 2 Fatores	3	0,000858	0,000286	0,00	0,999
Cu+2*Mn+2	1	0,000045	0,000045	0,00	0,979
Cu+2*Tempo	1	0,000780	0,000780	0,01	0,911
Mn+2*Tempo	1	0,000033	0,000033	0,00	0,982
Erro	7	0,409478	0,058497		
Falta de ajuste	5	0,399384	0,079877	15,83	0,060
Erro puro	2	0,010094	0,005047	*	*
Total	16	0,636107			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,241861	35,63%	0,00%	0,00%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	0,490	0,139	3,52	0,010		
Cu+2	0,0490	0,0245	0,0655	0,37	0,719	1,00
Mn+2	0,1226	0,0613	0,0655	0,94	0,380	1,00

Continuação

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Tempo	-0,0564	-0,0282	0,0655	-0,43	0,680	1,00
Cu+2*Cv+2	-0,0967	-0,0484	0,0721	-0,67	0,524	1,15
Mn+2*Mn+2	-0,1348	-0,0674	0,0721	-0,93	0,381	1,15
Tempo*Tempo	-0,2231	-0,1116	0,0721	-1,55	0,166	1,15
Cu+2*Mn+2	-0,0047	-0,0024	0,0855	-0,03	0,979	1,00
Cu+2*Tempo	-0,0198	-0,0099	0,0855	-0,12	0,911	1,00
Mn+2*Tempo	-0,0041	-0,0020	0,0855	-0,02	0,982	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

Descoloração = -1,37 + (1,76*Cv+2) + (1,33*Mn+2) + (0,0948*Tempo) - (1,14*Cv+2*Cv+2) - (0,95*Mn+2*Mn+2) - (0,00260*Tempo*Tempo) - (0,04*Cv+2*Mn+2) - (0,0073*Cv+2*Tempo) - (0,0012*Mn+2*Tempo)

Regressão de Superfície de Resposta: Fenoloxidasas *P. cinerea* versus Cu+2; Mn+2; Tempo

Estimated Regression Coefficients for Fenoloxidasas using coded units

Term	Coef	SE Coef	T	P	
Constant	465,103	121,80	3,818	0,007	***
Cu+2	-51,846	57,23	-0,906	0,395	
Mn+2	-54,324	57,23	-0,949	0,374	
Tempo	-4,022	57,23	-0,070	0,946	
Cu+2*Cv+2	-113,411	63,05	-1,799	0,115	
Mn+2*Mn+2	-118,059	63,05	-1,872	0,103	
Tempo*Tempo	-29,885	63,05	-0,474	0,650	
Cu+2*Mn+2	-219,231	74,75	-2,933	0,022	***
Cu+2*Tempo	96,844	74,75	1,296	0,236	
Mn+2*Tempo	-174,358	74,75	-2,333	0,052	***

S = 211,413 PRESS = 2000555

R-Sq = 76,52% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 46,33%

Analysis of Variance for Fenoloxidasas

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	1019474	1019474	113275	2,53	0,117
Linear	3	77166	77166	25722	0,58	0,649
Square	3	239576	239576	79859	1,79	0,237
Interaction	3	702732	702732	234244	5,24	0,033 ***
Residual Error	7	312868	312868	44695		
Lack-of-Fit	5	210420	210420	42084	0,82	0,629
Pure Error	2	102448	102448	51224		
Total	16	1332342				

Estimated Regression Coefficients for Fenoloxidasas using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	-2717,44
Cu+2	4151,50
Mn+2	6052,41
Tempo	32,9622
Cu+2*Cv+2	-2666,04
Mn+2*Mn+2	-1667,64
Tempo*Tempo	-0,697079
Cu+2*Mn+2	-3994,93
Cu+2*Tempo	71,7127
Mn+2*Tempo	-100,083

Regressão de Superfície de Resposta: Lacase *P. cinerea* versus Cu+2; Mn+2; Tempo

Estimated Regression Coefficients for Lacase using coded units

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	106,909	156,88	0,681	0,517

Continuação

Term	Coef	SE Coef	T	P
Cu+2	-16,374	73,71	-0,222	0,831
Mn+2	-149,682	73,71	-2,031	0,082 *
Tempo	-57,156	73,71	-0,775	0,464
Cu+2*Cv+2	-78,327	81,21	-0,964	0,367
Mn+2*Mn+2	-14,513	81,21	-0,179	0,863
Tempo*Tempo	-25,586	81,21	-0,315	0,762
Cu+2*Mn+2	38,429	96,27	0,399	0,702
Cu+2*Tempo	-98,388	96,27	-1,022	0,341
Mn+2*Tempo	9,260	96,27	0,096	0,926

S = 272,294 PRESS = 3379620

R-Sq = 49,76% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 0,00%

Analysis of Variance for Lacase

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	514013	514013	57113	0,77	0,650
Linear	3	353942	353942	117981	1,59	0,275
Square	3	70130	70130	23377	0,32	0,814
Interaction	3	89941	89941	29980	0,40	0,755
Residual Error	7	519006	519006	74144		
Lack-of-Fit	5	414096	414096	82819	1,58	0,431
Pure Error	2	104910	104910	52455		
Total	16	1033020				

Estimated Regression Coefficients for Lacase using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	-966,411
Cu+2	3251,32
Mn+2	-889,132
Tempo	57,4278
Cu+2*Cv+2	-1841,29
Mn+2*Mn+2	-205,005
Tempo*Tempo	-0,596813
Cu+2*Mn+2	700,272
Cu+2*Tempo	-72,8555
Mn+2*Tempo	5,31532

Regressão de Superfície de Resposta: MnP *P. cinerea* versus Cu+2; Mn+2; Tempo

Estimated Regression Coefficients for MnP using coded units

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	5,8103	10,816	0,537	0,608
Cu+2	2,7513	5,082	0,541	0,605
Mn+2	-6,8613	5,082	-1,350	0,219
Tempo	0,6482	5,082	0,128	0,902
Cu+2*Cv+2	-3,1760	5,599	-0,567	0,588
Mn+2*Mn+2	5,8455	5,599	1,044	0,331
Tempo*Tempo	-5,4214	5,599	-0,968	0,365
Cu+2*Mn+2	8,1447	6,637	1,227	0,259
Cu+2*Tempo	-2,5548	6,637	-0,385	0,712
Mn+2*Tempo	-2,5604	6,637	-0,386	0,711

S = 18,7731 PRESS = 18608,1

R-Sq = 50,71% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 0,00%

Analysis of Variance for MnP

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	2537,7	2537,7	281,97	0,80	0,631
Linear	3	751,4	751,4	250,46	0,71	0,576

Continuação

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Square	3	1151,0	1151,0	383,67	1,09	0,414
Interaction	3	635,3	635,3	211,78	0,60	0,635
Residual Error	7	2467,0	2467,0	352,43		
Lack-of-Fit	5	2295,0	2295,0	458,99	5,34	0,165
Pure Error	2	172,0	172,0	86,01		
Total	16	5004,7				

Estimated Regression Coefficients for MnP using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	-21,2818
Cu+2	62,8981
Mn+2	-187,645
Tempo	6,70050
Cu+2*Cv+2	-74,6597
Mn+2*Mn+2	82,5701
Tempo*Tempo	-0,126458
Cu+2*Mn+2	148,416
Cu+2*Tempo	-1,89178
Mn+2*Tempo	-1,46969

Otimização da Resposta para Descoloração por *P. cinerea*

Parâmetros					
Resposta	Meta	Inferior	Alvo	Superior	Peso Importância
Descoloração	Máximo	0	1,57	1	1
Solução					
Descoloração	Desirability				
Solução	Cu+2	Mn+2	Tempo	Ajuste	Composta
1	0,706	0,674909	17	0,508975	0,324188
Predição de Múltiplas Respostas					
Variável	Configuração				
Cu+2	0,706				
Mn+2	0,674909				
Tempo	17				
	EP do				
Resposta	Ajuste	Ajustado	IC de 95%	IP de 95%	
Descoloração	0,509	0,131	(0,199; 0,819)	(-0,142; 1,160)	

Trametes villosa

Regressão de Superfície de Resposta: Descoloração RB222 por *T. villosa* versus Cu+2; Mn+2; Tempo

Análise de Variância					
Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	0,432407	0,048045	1,74	0,238
Linear	3	0,267526	0,089175	3,23	0,091
Cu+2	1	0,147164	0,147164	5,34	0,054
Mn+2	1	0,079505	0,079505	2,88	0,133
Tempo	1	0,040858	0,040858	1,48	0,263
Quadrado	3	0,101726	0,033909	1,23	0,368
Cu+2*Cv+2	1	0,018497	0,018497	0,67	0,440
Mn+2*Mn+2	1	0,007055	0,007055	0,26	0,628
Tempo*Tempo	1	0,099278	0,099278	3,60	0,100
Interação 2 Fatores	3	0,063154	0,021051	0,76	0,549
Cu+2*Mn+2	1	0,021023	0,021023	0,76	0,411
Cu+2*Tempo	1	0,034308	0,034308	1,24	0,301
Mn+2*Tempo	1	0,007824	0,007824	0,28	0,611
Erro	7	0,192968	0,027567		
Falta de ajuste	5	0,189761	0,037952	23,66	0,041
Erro puro	2	0,003208	0,001604	*	*
Total	16	0,625375			

Continuação

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,166033	69,14%	29,47%	0,00%

Coefficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	0,3793	0,0957	3,96	0,005		
Cu+2	0,2077	0,1039	0,0449	2,31	0,054	1,00
Mn+2	0,1527	0,0763	0,0449	1,70	0,133	1,00
Tempo	-0,1094	-0,0547	0,0449	-1,22	0,263	1,00
Cu+2*Cv+2	-0,0811	-0,0406	0,0495	-0,82	0,440	1,15
Mn+2*Mn+2	-0,0501	-0,0251	0,0495	-0,51	0,628	1,15
Tempo*Tempo	-0,1879	-0,0940	0,0495	-1,90	0,100	1,15
Cu+2*Mn+2	0,1025	0,0513	0,0587	0,87	0,411	1,00
Cu+2*Tempo	0,1310	0,0655	0,0587	1,12	0,301	1,00
Mn+2*Tempo	0,0625	0,0313	0,0587	0,53	0,611	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

Descoloração = -0,10 + (0,3*Cv+2) - (0,26*Mn+2) + (0,0289*Tempo) - (0,95*Cv+2*Cv+2) - (0,354*Mn+2*Mn+2) - (0,00219*Tempo*Tempo) + (0,93*Cv+2*Mn+2) + (0,0485*Cv+2*Tempo) + (0,0180*Mn+2*Tempo)

Regressão de Superfície de Resposta: Fenoloxidasas *T. villosa* versus Cu+2; Mn+2; Tempo

Estimated Regression Coefficients for Fenoloxidasas using coded units

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	164,327	96,09	1,710	0,131 *
Cu+2	-33,332	45,15	-0,738	0,484
Mn+2	14,448	45,15	0,320	0,758
Tempo	34,348	45,15	0,761	0,472
Cu+2*Cv+2	45,071	49,74	0,906	0,395
Mn+2*Mn+2	-12,181	49,74	-0,245	0,814
Tempo*Tempo	-50,239	49,74	-1,010	0,346
Cu+2*Mn+2	-44,043	58,97	-0,747	0,479
Cu+2*Tempo	-7,312	58,97	-0,124	0,905
Mn+2*Tempo	28,417	58,97	0,482	0,645

S = 166,784 PRESS = 1350910

R-Sq = 40,14% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 0,00%

Analysis of Variance for Fenoloxidasas

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	130563	130563	14507	0,52	0,821
Linear	3	34106	34106	11369	0,41	0,752
Square	3	74051	74051	24684	0,89	0,493
Interaction	3	22406	22406	7469	0,27	0,846
Residual Error	7	194718	194718	27817		
Lack-of-Fit	5	170433	170433	34087	2,81	0,283
Pure Error	2	24285	24285	12142		
Total	16	325281				

Estimated Regression Coefficients for Fenoloxidasas using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	-25,6938
Cu+2	-1005,13
Mn+2	475,473
Tempo	41,9507
Cu+2*Cv+2	1059,52
Mn+2*Mn+2	-172,057
Tempo*Tempo	-1,17186

Continuação

Estimated Regression Coefficients for Fenoloxidasas using data in uncoded units

Cu+2*Mn+2	-802,571
Cu+2*Tempo	-5,41417
Mn+2*Tempo	16,3114

Regressão de Superfície de Resposta: Lacase *T. villosa* versus Cu+2; Mn+2; Tempo

Estimated Regression Coefficients for Lacase using coded units

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	173,992	106,45	1,634	0,146 *
Cu+2	0,125	50,02	0,003	0,998
Mn+2	-69,935	50,02	-1,398	0,205
Tempo	-7,492	50,02	-0,150	0,885
Cu+2*Cv+2	-12,048	55,11	-0,219	0,833
Mn+2*Mn+2	0,255	55,11	0,005	0,996
Tempo*Tempo	-133,714	55,11	-2,426	0,046 **
Cu+2*Mn+2	-111,988	65,33	-1,714	0,130 *
Cu+2*Tempo	-15,761	65,33	-0,241	0,816
Mn+2*Tempo	47,978	65,33	0,734	0,487

S = 184,773 PRESS = 1774545

R-Sq = 63,34% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 16,20%

Analysis of Variance for Lacase

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	412906	412906	45878	1,34	0,356
Linear	3	67501	67501	22500	0,66	0,603
Square	3	224672	224672	74891	2,19	0,177
Interaction	3	120733	120733	40244	1,18	0,384
Residual Error	7	238987	238987	34141		
Lack-of-Fit	5	224576	224576	44915	6,23	0,144 *
Pure Error	2	14411	14411	7205		
Total	16	651893				

Estimated Regression Coefficients for Lacase using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	-1391,49
Cu+2	1709,37
Mn+2	571,048
Tempo	103,536
Cu+2*Cv+2	-283,221
Mn+2*Mn+2	3,60795
Tempo*Tempo	-3,11897
Cu+2*Mn+2	-2040,70
Cu+2*Tempo	-11,6712
Mn+2*Tempo	27,5400

Regressão de Superfície de Resposta: MnP *T. villosa* versus Cu+2; Mn+2; Tempo

Estimated Regression Coefficients for MnP using coded units

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-4,36754	5,304	-0,823	0,437
Cu+2	3,91727	2,492	1,572	0,160
Mn+2	-2,57477	2,492	-1,033	0,336
Tempo	0,14158	2,492	0,057	0,956
Cu+2*Cv+2	0,09531	2,746	0,035	0,973
Mn+2*Mn+2	4,98053	2,746	1,814	0,113 *
Tempo*Tempo	0,71268	2,746	0,260	0,803
Cu+2*Mn+2	-0,24148	3,255	-0,074	0,943
Cu+2*Tempo	-0,66762	3,255	-0,205	0,843
Mn+2*Tempo	-0,66763	3,255	-0,205	0,843

Continuação

S = 9,20685 PRESS = 3813,26

R-Sq = 50,78% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 0,00%

Analysis of Variance for MnP

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	612,24	612,241	68,027	0,80	0,629
Linear	3	300,11	300,110	100,037	1,18	0,384
Square	3	304,53	304,532	101,511	1,20	0,378
Interaction	3	7,60	7,598	2,533	0,03	0,992
Residual Error	7	593,36	593,362	84,766		
Lack-of-Fit	5	463,82	463,822	92,764	1,43	0,460
Pure Error	2	129,54	129,540	64,770		
Total	16	1205,60				

Estimated Regression Coefficients for MnP using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	4,82002
Cu+2	27,3965
Mn+2	-77,7132
Tempo	-0,0418314
Cu+2*Cv+2	2,24054
Mn+2*Mn+2	70,3525
Tempo*Tempo	0,0166236
Cu+2*Mn+2	-4,40028
Cu+2*Tempo	-0,494374
Mn+2*Tempo	-0,383222

Otimização da Resposta para Descoloração por *T. villosa*

Parâmetros

Resposta	Meta	Inferior	Alvo	Superior	Peso	Importância
Descoloração	Máximo	0	1,57		1	1

Solução

Descoloração Desirability

Solução	Cu+2	Mn+2	Tempo	Ajuste	Composta
1	1	1	21,6667	0,672397	0,428279

Predição de Múltiplas Respostas

Variável Configuração

Cu+2 1**Mn+2 1****Tempo 21,6667**

EP do

Resposta	Ajuste	Ajustado	IC de 95%	IP de 95%
Descoloração	0,672	0,266	(0,043; 1,302)	(-0,069; 1,414)

Análise de Correlação

Fenoloxidasas *P. cinerea* versus descoloração

Correlação de Pearson = -0,122

Valor-P = 0,641

Lacases *P. cinerea* versus descoloração

Correlação de Pearson = -0,087

Valor-P = 0,740

MnP *P. cinerea* versus descoloração

Correlação de Pearson = -0,265

Valor-P = 0,304

Fenoloxidasas *P. ostreatus* versus descoloração

Correlação de Pearson = 0,516

Valor-P = 0,034

Lacases *P. ostreatus* versus descoloração

Correlação de Pearson = 0,571

Valor-P = 0,017

MnP *P. ostreatus* versus descoloração

Correlação de Pearson = -0,006

Valor-P = 0,983

Fenoloxidasas *T. villosa* versus descoloração

Correlação de Pearson = 0,241

Valor-P = 0,351

Lacases *T. villosa* versus descoloração

Correlação de Pearson = 0,036

Valor-P = 0,892

MnP *T. villosa* versus descoloração

Correlação de Pearson = 0,091

Valor-P = 0,729

APÊNDICE D – Análise estatística item 4.4

Peniophora cinerea

Regressão de Superfície de Resposta: %Descoloração RB222 (526nm) por *P. cinerea* em 24 horas versus ABTS; RBBR; Ácido Graxo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	0,74012	0,082235	0,89	0,576
Linear	3	0,53480	0,178265	1,92	0,214
ABTS	1	0,45681	0,456813	4,93	0,062
RBBR	1	0,00899	0,008993	0,10	0,764
Ácido Graxo	1	0,06899	0,068990	0,74	0,417
Quadrado	3	0,19486	0,064953	0,70	0,581
ABTS*ABTS	1	0,07359	0,073589	0,79	0,402
RBBR*RBBR	1	0,09010	0,090103	0,97	0,357
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1	0,01276	0,012759	0,14	0,722
Interação com 2 Fatores	3	0,01046	0,003487	0,04	0,989
ABTS*RBBR	1	0,00291	0,002907	0,03	0,864
ABTS*Ácido Graxo	1	0,00094	0,000936	0,01	0,923
RBBR*Ácido Graxo	1	0,00662	0,006617	0,07	0,797
Erro	7	0,64846	0,092637		
Falta de ajuste	5	0,39015	0,078031	0,60	0,719
Erro puro	2	0,25830	0,129151	*	*
Total	16	1,38857			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,304363	53,30%	0,00%	0,00%

Coefficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	0,223	0,175	1,27	0,243		
ABTS	0,3659	0,1830	0,0824	2,22	0,062	1,00
RBBR	0,0513	0,0257	0,0824	0,31	0,764	1,00
Ácido Graxo	0,1422	0,0711	0,0824	0,86	0,417	1,00
ABTS*ABTS	0,1618	0,0809	0,0908	0,89	0,402	1,15
RBBR*RBBR	0,1790	0,0895	0,0908	0,99	0,357	1,15
Ácido Graxo*Ácido Graxo	-0,0674	-0,0337	0,0908	-0,37	0,722	1,15
ABTS*RBBR	0,038	0,019	0,108	0,18	0,864	1,00
ABTS*Ácido Graxo	0,022	0,011	0,108	0,10	0,923	1,00
RBBR*Ácido Graxo	0,058	0,029	0,108	0,27	0,797	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

%D 24h 526nm = 0,305 - 0,234*ABTS - 5,97*RBBR + 0,079*Ácido Graxo + 0,228*ABTS*ABTS + 25,3*RBBR*RBBR - 0,0152*Ácido Graxo*Ácido Graxo + 0,54*ABTS*RBBR + 0,012*ABTS*Ácido Graxo + 0,32*RBBR*Ácido Graxo

Regressão de Superfície de Resposta: %Descoloração RB222 (526nm) por *P. cinerea* em 48 horas versus ABTS; RBBR; Ácido Graxo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	0,301834	0,033537	0,34	0,930
Linear	3	0,086692	0,028897	0,30	0,827
ABTS	1	0,080021	0,080021	0,82	0,395
RBBR	1	0,001659	0,001659	0,02	0,900
Ácido Graxo	1	0,005011	0,005011	0,05	0,827
Quadrado	3	0,201895	0,067298	0,69	0,586
ABTS*ABTS	1	0,106916	0,106916	1,10	0,330
RBBR*RBBR	1	0,106916	0,106916	1,10	0,330

Continuação

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1	0,106916	0,106916	1,10	0,330
Interação com 2 Fatores	3	0,013247	0,004416	0,05	0,986
ABTS*RBBR	1	0,008228	0,008228	0,08	0,780
ABTS*Ácido Graxo	1	0,004419	0,004419	0,05	0,837
RBBR*Ácido Graxo	1	0,000600	0,000600	0,01	0,940
Erro	7	0,681529	0,097361		
Falta de ajuste	5	0,681529	0,136306	*	*
Erro puro	2	0,000000	0,000000	*	*
Total	16	0,983363			
Sumário do Modelo					
S	R2	R2(aj)	R2(pred)		
0,312028	30,69%	0,00%	0,00%		

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	-0,029	0,180	-0,16	0,876		
ABTS	-0,1532	-0,0766	0,0845	-0,91	0,395	1,00
RBBR	-0,0221	-0,0110	0,0845	-0,13	0,900	1,00
Ácido Graxo	0,0383	0,0192	0,0845	0,23	0,827	1,00
ABTS*ABTS	0,1950	0,0975	0,0931	1,05	0,330	1,15
RBBR*RBBR	0,1950	0,0975	0,0931	1,05	0,330	1,15
Ácido Graxo*Ácido Graxo	0,1950	0,0975	0,0931	1,05	0,330	1,15
ABTS*RBBR	0,064	0,032	0,110	0,29	0,780	1,00
ABTS*Ácido Graxo	0,047	0,024	0,110	0,21	0,837	1,00
RBBR*Ácido Graxo	-0,017	-0,009	0,110	-0,08	0,940	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

%D 48h 526nm = 1,044 - 0,836*ABTS - 6,35*RBBR - 0,224*Ácido Graxo + 0,275*ABTS*ABTS + 27,5*RBBR*RBBR + 0,0440*Ácido Graxo*Ácido Graxo + 0,91*ABTS*RBBR + 0,027*ABTS*Ácido Graxo - 0,10*RBBR*Ácido Graxo

Regressão de Superfície de Resposta: %Descoloração RB222 (610nm)por *P. cinerea* em 24 horas versus ABTS; RBBR; Ácido Graxo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	0,47859	0,053177	0,65	0,733
Linear	3	0,28835	0,096118	1,17	0,386
ABTS	1	0,11599	0,115987	1,42	0,273
RBBR	1	0,00000	0,000003	0,00	0,996
Ácido Graxo	1	0,17236	0,172364	2,10	0,190
Quadrado	3	0,12023	0,040075	0,49	0,701
ABTS*ABTS	1	0,03234	0,032344	0,39	0,550
RBBR*RBBR	1	0,00593	0,005928	0,07	0,796
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1	0,04919	0,049185	0,60	0,464
Interação com 2 Fatores	3	0,07001	0,023338	0,28	0,835
ABTS*RBBR	1	0,01482	0,014818	0,18	0,683
ABTS*Ácido Graxo	1	0,02253	0,022534	0,27	0,616
RBBR*Ácido Graxo	1	0,03266	0,032661	0,40	0,548
Erro	7	0,57362	0,081945		
Falta de ajuste	5	0,21676	0,043352	0,24	0,912
Erro puro	2	0,35686	0,178428	*	*
Total	16	1,05221			
Sumário do Modelo					
S	R2	R2(aj)	R2(pred)		
0,286261	45,48%	0,00%	0,00%		

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
-------	--------	------	------------	---------	---------	-----

Continuação

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	0,492	0,165	2,98	0,020		
ABTS	0,1844	0,0922	0,0775	1,19	0,273	1,00
RBBR	-0,0009	-0,0004	0,0775	-0,01	0,996	1,00
Ácido Graxo	0,2248	0,1124	0,0775	1,45	0,190	1,00
ABTS*ABTS	0,1073	0,0536	0,0854	0,63	0,550	1,15
RBBR*RBBR	-0,0459	-0,0230	0,0854	-0,27	0,796	1,15
Ácido Graxo*Ácido Graxo	-0,1323	-0,0661	0,0854	-0,77	0,464	1,15
ABTS*RBBR	0,086	0,043	0,101	0,43	0,683	1,00
ABTS*Ácido Graxo	-0,106	-0,053	0,101	-0,52	0,616	1,00
RBBR*Ácido Graxo	0,128	0,064	0,101	0,63	0,548	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

%Desc 24h 610nm= 0,201 - 0,120*ABTS - 1,73*RBBR + 0,213*Ácido Graxo + 0,151*ABTS*ABTS - 6,5*RBBR*RBBR - 0,0299*Ácido Graxo*Ácido graxo + 1,21*ABTS*RBBR - 0,060*ABTS*Ácido Graxo + 0,72*RBBR*Ácido Graxo

Regressão de Superfície de Resposta: % Descoloração RB222 (610nm) por *P. cinerea* em 48 horas versus ABTS; RBBR; Ácido Graxo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	0,44498	0,049442	0,44	0,873
Linear	3	0,05966	0,019888	0,18	0,908
ABTS	1	0,05404	0,054040	0,48	0,509
RBBR	1	0,00550	0,005498	0,05	0,831
Ácido Graxo	1	0,00012	0,000125	0,00	0,974
Quadrado	3	0,34647	0,115491	1,04	0,434
ABTS*ABTS	1	0,10453	0,104531	0,94	0,365
RBBR*RBBR	1	0,10453	0,104531	0,94	0,365
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1	0,29953	0,299528	2,69	0,145
Interação com 2 Fatores	3	0,03884	0,012948	0,12	0,948
ABTS*RBBR	1	0,00095	0,000952	0,01	0,929
ABTS*Ácido Graxo	1	0,02172	0,021724	0,19	0,672
RBBR*Ácido Graxo	1	0,01617	0,016169	0,14	0,715
Erro	7	0,78075	0,111536		
Falta de ajuste	5	0,78075	0,156151	*	*
Erro puro	2	0,00000	0,000000	*	*
Total	16	1,22573			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,333970	36,30%	0,00%	0,00%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	-0,029	0,192	-0,15	0,885		
ABTS	-0,1259	-0,0629	0,0904	-0,70	0,509	1,00
RBBR	-0,0401	-0,0201	0,0904	-0,22	0,831	1,00
Ácido Graxo	-0,0060	-0,0030	0,0904	-0,03	0,974	1,00
ABTS*ABTS	0,1929	0,0964	0,0996	0,97	0,365	1,15
RBBR*RBBR	0,1929	0,0964	0,0996	0,97	0,365	1,15
Ácido Graxo*Ácido Graxo	0,3265	0,1632	0,0996	1,64	0,145	1,15
ABTS*RBBR	0,022	0,011	0,118	0,09	0,929	1,00
ABTS*Ácido Graxo	0,104	0,052	0,118	0,44	0,672	1,00
RBBR*Ácido Graxo	0,090	0,045	0,118	0,38	0,715	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

% Desc 48h 610nm = 1,425 - 0,828*ABTS - 7,36*RBBR - 0,480*Ácido*Graxo + 0,272*ABTS*ABTS + 27,2*RBBR*RBBR + 0,0737*Ácido Graxo*Ácido Graxo + 0,31*ABTS*RBBR + 0,059*ABTS*Ácido Graxo + 0,51*RBBR*Ácido Graxo

Regressão de Superfície de Resposta: MnP tempo inicial de *P. cinerea* versus ABTS; RBBR; Ácido Graxo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	665,68	73,964	0,46	0,860
Linear	3	430,64	143,546	0,90	0,488
ABTS	1	12,23	12,232	0,08	0,790
RBBR	1	204,20	204,204	1,28	0,295
Ácido Graxo	1	214,20	214,202	1,34	0,285
Quadrado	3	235,04	78,346	0,49	0,700
ABTS*ABTS	1	23,82	23,819	0,15	0,711
RBBR*RBBR	1	84,92	84,916	0,53	0,489
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1	93,44	93,440	0,59	0,469
Interação com 2 Fatores	3	0,00	0,000	0,00	1,000
ABTS*RBBR	1	0,00	0,000	0,00	1,000
ABTS*Ácido Graxo	1	0,00	0,000	0,00	1,000
RBBR*Ácido Graxo	1	0,00	0,000	0,00	1,000
Erro	7	1117,27	159,610		
Falta de ajuste	5	1117,27	223,454	*	*
Erro puro	2	0,00	0,000	*	*
Total	16	1782,95			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
12,6337	37,34%	0,00%	0,00%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	Coef	EP de	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	0,84	7,28	0,12		0,911		
ABTS	1,89	0,95	3,42		0,28	0,790	1,00
RBBR	-7,74	-3,87	3,42		-1,13	0,295	1,00
Ácido Graxo	7,92	3,96	3,42		1,16	0,285	1,00
ABTS*ABTS	-2,91	-1,46	3,77		-0,39	0,711	1,15
RBBR*RBBR	5,50	2,75	3,77		0,73	0,489	1,15
Ácido Graxo*Ácido Graxo	5,77	2,88	3,77		0,77	0,469	1,15
ABTS*RBBR	0,00	0,00	4,47		0,00	1,000	1,00
ABTS*Ácido Graxo	-0,00	-0,00	4,47		-0,00	1,000	1,00
RBBR*Ácido Graxo	0,00	0,00	4,47		0,00	1,000	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

MnP tempo inicial = $10,9 + 9,8*ABTS - 220*RBBR - 3,8*Ácido\ Graxo - 4,1*ABTS*ABTS + 776*RBBR*RBBR + 1,30*Ácido\ Graxo*Ácido\ Graxo + 0*ABTS*RBBR + 0,00*ABTS*Ácido\ Graxo + 0,0*RBBR*Ácido\ Graxo$

Regressão de Superfície de Resposta: MnP em 24 horas de *P. cinerea* versus ABTS; RBBR; Ácido Graxo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	1499,65	166,627	1,05	0,486
Linear	3	576,12	192,041	1,21	0,375
ABTS	1	575,57	575,568	3,62	0,099
RBBR	1	0,00	0,000	0,00	1,000
Ácido Graxo	1	0,56	0,556	0,00	0,954
Quadrado	3	923,52	307,840	1,94	0,212
ABTS*ABTS	1	582,00	581,998	3,67	0,097
RBBR*RBBR	1	51,96	51,962	0,33	0,585
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1	38,87	38,866	0,24	0,636
Interação com 2 Fatores	3	0,00	0,000	0,00	1,000
ABTS*RBBR	1	0,00	0,000	0,00	1,000
ABTS*Ácido Graxo	1	0,00	0,000	0,00	1,000
RBBR*Ácido Graxo	1	0,00	0,000	0,00	1,000
Erro	7	1111,59	158,799		

Continuação

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Falta de ajuste	5	1111,59	222,318	*	*
Erro puro	2	0,00	0,000	*	*
Total	16	2611,24			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
12,6015	57,43%	2,70%	0,00%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de		Valor-P	VIF
			Coef	Valor T		
Constante	0,64	7,26	0,09	0,932		
ABTS	12,99	6,49	3,41	1,90	0,099	1,00
RBBR	-0,00	-0,00	3,41	-0,00	1,000	1,00
Ácido Graxo	0,40	0,20	3,41	0,06	0,954	1,00
ABTS*ABTS	14,39	7,20	3,76	1,91	0,097	1,15
RBBR*RBBR	-4,30	-2,15	3,76	-0,57	0,585	1,15
Ácido Graxo*Ácido Graxo	-3,72	-1,86	3,76	-0,49	0,636	1,15
ABTS*RBBR	-0,00	-0,00	4,46	-0,00	1,000	1,00
ABTS*Ácido Graxo	-0,00	-0,00	4,46	-0,00	1,000	1,00
RBBR*Ácido Graxo	0,00	0,00	4,46	0,00	1,000	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

MnP em 24h = -1,6 - 29,7*ABTS + 121 RBBR + 4,3*Ácido Graxo + 20,3*ABTS*ABTS - 607*RBBR*RBBR - 0,84*Ácido Graxo*Ácido Graxo - 0*ABTS*RBBR + 0,00*ABTS*Ácido Graxo - 0,0*RBBR*Ácido Graxo

Regressão de Superfície de Resposta: MnP em 48 horas de *P. cinerea* versus ABTS; RBBR; Ácido Graxo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	3376,24	375,14	0,42	0,886
Linear	3	2338,41	779,47	0,88	0,497
ABTS	1	491,59	491,59	0,55	0,481
RBBR	1	231,86	231,86	0,26	0,625
Ácido Graxo	1	1614,96	1614,96	1,82	0,220
Quadrado	3	1037,83	345,94	0,39	0,764
ABTS*ABTS	1	40,30	40,30	0,05	0,837
RBBR*RBBR	1	7,41	7,41	0,01	0,930
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1	892,60	892,60	1,01	0,349
Interação com 2 Fatores	3	0,00	0,00	0,00	1,000
ABTS*RBBR	1	0,00	0,00	0,00	1,000
ABTS*Ácido Graxo	1	0,00	0,00	0,00	1,000
RBBR*Ácido Graxo	1	0,00	0,00	0,00	1,000
Erro	7	6216,90	888,13		
Falta de ajuste	5	6216,90	1243,38	*	*
Erro puro	2	0,00	0,00	*	*
Total	16	9593,14			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
29,8015	35,19%	0,00%	0,00%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de		Valor-P	VIF
			Coef	Valor T		
Constante	2,0	17,2	0,12	0,910		
ABTS	12,00	6,00	8,07	0,74	0,481	1,00
RBBR	-8,24	-4,12	8,07	-0,51	0,625	1,00
Ácido Graxo	21,76	10,88	8,07	1,35	0,220	1,00
ABTS*ABTS	3,79	1,89	8,89	0,21	0,837	1,15
RBBR*RBBR	-1,62	-0,81	8,89	-0,09	0,930	1,15

Continuação

Termo	Efeito	Coef	Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Ácido Graxo*Ácido Graxo	17,82	8,91	8,89	1,00	0,349	1,15
ABTS*RBBR	-0,0	-0,0	10,5	-0,00	1,000	1,00
ABTS*Ácido Graxo	-0,0	-0,0	10,5	-0,00	1,000	1,00
RBBR*Ácido Graxo	0,0	0,0	10,5	0,00	1,000	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

MnP em 48h = 8,8 - 0,6*ABTS - 23*RBBR - 12,8*Ácido Graxo + 5,3*ABTS*ABTS - 229*RBBR*RBBR + 4,02*Ácido Graxo*Ácido Graxo - 0*ABTS*RBBR + 0,0*ABTS*Ácido Graxo - 0*RBBR*Ácido Graxo

Regressão de Superfície de Resposta: Lacase tempo inicial de *P. cinerea* versus ABTS; RBBR; Ácido Graxo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	2043735	227082	0,32	0,944
Linear	3	509803	169934	0,24	0,868
ABTS	1	56668	56668	0,08	0,787
RBBR	1	66	66	0,00	0,993
Ácido Graxo	1	453070	453070	0,63	0,453
Quadrado	3	1527871	509290	0,71	0,576
ABTS*ABTS	1	1114635	1114635	1,56	0,252
RBBR*RBBR	1	808205	808205	1,13	0,323
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1	73963	73963	0,10	0,757
Interação com 2 Fatores	3	6061	2020	0,00	1,000
ABTS*RBBR	1	96	96	0,00	0,991
ABTS*Ácido Graxo	1	3220	3220	0,00	0,948
RBBR*Ácido Graxo	1	2744	2744	0,00	0,952
Erro	7	5013661	716237		
Falta de ajuste	5	1232092	246418	0,13	0,970
Erro puro	2	3781569	1890785	*	*
Total	16	7057397			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
846,308	28,96%	0,00%	0,00%

Coefficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	1429	488	2,93	0,022		
ABTS	129	64	229	0,28	0,787	1,00
RBBR	-4	-2	229	-0,01	0,993	1,00
Ácido Graxo	-364	-182	229	-0,80	0,453	1,00
ABTS*ABTS	-630	-315	252	-1,25	0,252	1,15
RBBR*RBBR	-536	-268	252	-1,06	0,323	1,15
Ácido Graxo*Ácido Graxo	-162	-81	252	-0,32	0,757	1,15
ABTS*RBBR	7	3	299	0,01	0,991	1,00
ABTS*Ácido Graxo	40	20	299	0,07	0,948	1,00
RBBR*Ácido Graxo	37	19	299	0,06	0,952	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

Lacase tempo inicial = - 125 + 1819*ABTS + 14477*RBBR + 17*Ácido Graxo - 889*ABTS*ABTS - 75675*RBBR*RBBR - 37*Ácido Graxo*Ácido Graxo + 98*ABTS*RBBR + 23*ABTS*Ácido Graxo + 209*RBBR*Ácido Graxo

Regressão de Superfície de Resposta: Lacase em 24 horas de *P. cinerea* versus ABTS; RBBR; Ácido Graxo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	2356923	261880	0,50	0,838
Linear	3	559428	186476	0,35	0,788
ABTS	1	11935	11935	0,02	0,885

Continuação

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
RBBR	1	98979	98979	0,19	0,678
Ácido Graxo	1	448514	448514	0,85	0,387
Quadrado	3	1771234	590411	1,12	0,404
ABTS*ABTS	1	1500225	1500225	2,84	0,136
RBBR*RBBR	1	581873	581873	1,10	0,329
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1	27867	27867	0,05	0,825
Interação com 2 Fatores	3	26261	8754	0,02	0,997
ABTS*RBBR	1	17293	7293	0,03	0,861
ABTS*Ácido Graxo	1	6610	6610	0,01	0,914
RBBR*Ácido Graxo	1	2358	2358	0,00	0,949
Erro	7	3693734	527676		
Falta de ajuste	5	1121605	224321	0,17	0,949
Erro puro	2	2572129	1286065	*	*
Total	16	6050657			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
726,413	38,95%	0,00%	0,00%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de		Valor T	Valor-P	VIF
			Coef	Valor T			
Constante	1410	419	3,37	0,012			
ABTS	59	30	197	0,15	0,885	1,00	
RBBR	-170	-85	197	-0,43	0,678	1,00	
Ácido Graxo	-363	-181	197	-0,92	0,387	1,00	
ABTS*ABTS	-731	-365	217	-1,69	0,136	1,15	
RBBR*RBBR	-455	-228	217	-1,05	0,329	1,15	
Ácido Graxo*Ácido Graxo	-100	-50	217	-0,23	0,825	1,15	
ABTS*RBBR	-93	-46	257	-0,18	0,861	1,00	
ABTS*Ácido Graxo	-57	-29	257	-0,11	0,914	1,00	
RBBR*Ácido Graxo	34	17	257	0,07	0,949	1,00	

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

Lacase em 24h = - 170 + 2324*ABTS + 12239*RBBR + 4*Ácido Graxo - 1031*ABTS*ABTS - 64210*RBBR*RBBR - 22,5*Ácido Graxo*Ácido Graxo - 1312*ABTS*RBBR - 32*ABTS*Ácido Graxo + 194*RBBR*Ácido Graxo

Regressão de Superfície de Resposta: Lacase em 48 horas *P. cinerea* versus ABTS; RBBR; Ácido Graxo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	3720591	413399	0,41	0,892
Linear	3	945670	315223	0,31	0,814
ABTS	1	6660	6660	0,01	0,937
RBBR	1	70708	70708	0,07	0,798
Ácido Graxo	1	868303	868303	0,87	0,383
Quadrado	3	2772983	924328	0,92	0,478
ABTS*ABTS	1	2356998	2356998	2,35	0,169
RBBR*RBBR	1	1112786	1112786	1,11	0,327
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1	215773	215773	0,22	0,657
Interação com 2 Fatores	3	1937	646	0,00	1,000
ABTS*RBBR	1	250	250	0,00	0,988
ABTS*Ácido Graxo	1	1501	1501	0,00	0,970
RBBR*Ácido Graxo	1	186	186	0,00	0,990
Erro	7	7006667	1000952		
Falta de ajuste	5	2364229	472846	0,20	0,934
Erro puro	2	4642439	2321219	*	*
Total	16	10727258			

Continuação

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
1000,48	34,68%	0,00%	0,00%

Coefficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	1735	576	3,01	0,020		
ABTS	44	22	271	0,08	0,937	1,00
RBBR	-144	-72	271	-0,27	0,798	1,00
Ácido Graxo	-505	-252	271	-0,93	0,383	1,00
ABTS*ABTS	-916	-458	298	-1,53	0,169	1,15
RBBR*RBBR	-629	-315	298	-1,05	0,327	1,15
Ácido Graxo*Ácido Graxo	-277	-139	298	-0,46	0,657	1,15
ABTS*RBBR	-11	-6	354	-0,02	0,988	1,00
ABTS*Ácido Graxo	-27	-14	354	-0,04	0,970	1,00
RBBR*Ácido Graxo	-10	-5	354	-0,01	0,990	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

Lacase em 48h = - 396 + 2676*ABTS + 16844*RBBR + 164*Ácido Graxo - 1292*ABTS*ABTS - 88796*RBBR*RBBR - 63*Ácido Graxo*Ácido Graxo - 158*ABTS*RBBR - 15*ABTS*Ácido Graxo - 54*RBBR*Ácido Graxo

Pleurotus ostreatus

Regressão de Superfície de Resposta: %Descoloração RB222 (610nm) por *P. ostreatus* em 24 horas versus ABTS; RBBR; Ácido Graxo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	0,545717	0,060635	7,39	0,008
Linear	3	0,295233	0,098411	12,00	0,004
ABTS	1	0,008523	0,008523	1,04	0,342
RBBR	1	0,021798	0,021798	2,66	0,147
Ácido Graxo	1	0,264912	0,264912	32,31	0,001
Quadrado	3	0,196195	0,065398	7,98	0,012
ABTS*ABTS	1	0,011461	0,011461	1,40	0,276
RBBR*RBBR	1	0,111700	0,111700	13,62	0,008
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1	0,054647	0,054647	6,66	0,036
Interação com 2 Fatores	3	0,054289	0,018096	2,21	0,175
ABTS*RBBR	1	0,039270	0,039270	4,79	0,065
ABTS*Ácido Graxo	1	0,008081	0,008081	0,99	0,354
RBBR*Ácido Graxo	1	0,006938	0,006938	0,85	0,388
Erro	7	0,057400	0,008200		
Falta de ajuste	5	0,049849	0,009970	2,64	0,297
Erro puro	2	0,007552	0,003776	*	*
Total	16	0,603118			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,0905542	90,48%	78,25%	34,41%

Coefficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	0,7432	0,0522	14,25	0,000		
ABTS	-0,0500	-0,0250	0,0245	-1,02	0,342	1,00
RBBR	0,0799	0,0400	0,0245	1,63	0,147	1,00
Ácido Graxo	-0,2787	-0,1393	0,0245	-5,68	0,001	1,00
ABTS*ABTS	-0,0639	-0,0319	0,0270	-1,18	0,276	1,15
RBBR*RBBR	0,1994	0,0997	0,0270	3,69	0,008	1,15
Ácido Graxo*Ácido Graxo	0,1394	0,0697	0,0270	2,58	0,036	1,15
ABTS*RBBR	0,1401	0,0701	0,0320	2,19	0,065	1,00

Continuação

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
ABTS*Ácido Graxo	0,0636	0,0318	0,0320	0,99	0,354	1,00
RBBR*Ácido Graxo	0,0589	0,0294	0,0320	0,92	0,388	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

%Desc 610nm 24h = 1,711 - 0,149*ABTS - 7,76*RBBR - 0,3202*Ácido Graxo - 0,0901*ABTS*ABTS + 28,13*RBBR*RBBR + 0,0315*Ácido Graxo*Ácido Graxo + 1,977*ABTS*RBBR + 0,0359*ABTS*Ácido Graxo + 0,332*RBBR*Ácido Graxo

Regressão de Superfície de Resposta: %Descoloração RB222 (610nm) por *P. ostreatus* em 48 horas versus ABTS; RBBR; Ácido Graxo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	0,91856	0,102063	5,04	0,022
Linear	3	0,67893	0,226310	11,18	0,005
ABTS	1	0,00029	0,000289	0,01	0,908
RBBR	1	0,07439	0,074389	3,67	0,097
Ácido Graxo	1	0,60425	0,604252	29,85	0,001
Quadrado	3	0,22320	0,074400	3,68	0,071
ABTS*ABTS	1	0,00689	0,006886	0,34	0,578
RBBR*RBBR	1	0,20424	0,204242	10,09	0,016
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1	0,05767	0,057673	2,85	0,135
Interação com 2 Fatores	3	0,01644	0,005479	0,27	0,845
ABTS*RBBR	1	0,01075	0,010752	0,53	0,490
ABTS*Ácido Graxo	1	0,00506	0,005061	0,25	0,632
RBBR*Ácido Graxo	1	0,00062	0,000622	0,03	0,866
Erro	7	0,14171	0,020244		
Falta de ajuste	5	0,11870	0,023740	2,06	0,358
Erro puro	2	0,02301	0,011504	*	*
Total	16	1,06027			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,142282	86,63%	69,45%	9,71%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	0,7785	0,0820	9,50	0,000		
ABTS	0,0092	0,0046	0,0385	0,12	0,908	1,00
RBBR	0,1477	0,0738	0,0385	1,92	0,097	1,00
Ácido Graxo	-0,4209	-0,2104	0,0385	-5,46	0,001	1,00
ABTS*ABTS	0,0495	0,0247	0,0424	0,58	0,578	1,15
RBBR*RBBR	0,2696	0,1348	0,0424	3,18	0,016	1,15
Ácido Graxo*Ácido Graxo	0,1432	0,0716	0,0424	1,69	0,135	1,15
ABTS*RBBR	0,0733	0,0367	0,0503	0,73	0,490	1,00
ABTS*Ácido Graxo	0,0503	0,0252	0,0503	0,50	0,632	1,00
RBBR*Ácido Graxo	-0,0176	-0,0088	0,0503	-0,18	0,866	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

% Desc 610nm 48h = 1,802 - 0,306*ABTS - 7,15*RBBR - 0,322*Ácido Graxo + 0,070*ABTS*ABTS + 38,0*RBBR*RBBR + 0,0323*Ácido Graxo*Ácido Graxo + 1,03*ABTS*RBBR + 0,0284*ABTS*Ácido Graxo - 0,100*RBBR*Ácido Graxo

Regressão de Superfície de Resposta: %Descoloração de RB222 (em 526nm) por *P. ostreatus* em 24 horas versus ABTS; RBBR; Ácido Graxo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	0,199447	0,022161	0,62	0,753
Linear	3	0,042572	0,014191	0,40	0,759
ABTS	1	0,012004	0,012004	0,34	0,580

Continuação

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
RBBR	1	0,029881	0,029881	0,84	0,391
Ácido Graxo	1	0,000688	0,000688	0,02	0,894
Quadrado	3	0,003478	0,001159	0,03	0,991
ABTS*ABTS	1	0,000083	0,000083	0,00	0,963
RBBR*RBBR	1	0,003216	0,003216	0,09	0,773
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1	0,000789	0,000789	0,02	0,886
Interação com 2 Fatores	3	0,153397	0,051132	1,43	0,313
ABTS*RBBR	1	0,034883	0,034883	0,98	0,356
ABTS*Ácido Graxo	1	0,099275	0,099275	2,78	0,140
RBBR*Ácido Graxo	1	0,019239	0,019239	0,54	0,487
Erro	7	0,250221	0,035746		
Falta de ajuste	5	0,237572	0,047514	7,51	0,122
Erro puro	2	0,012650	0,006325	*	*
Total	16	0,449668			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,189066	44,35%	0,00%	0,00%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	0,551	0,109	5,06	0,001		
ABTS	-0,0593	-0,0297	0,0512	-0,58	0,580	1,00
RBBR	0,0936	0,0468	0,0512	0,91	0,391	1,00
Ácido Graxo	-0,0142	-0,0071	0,0512	-0,14	0,894	1,00
ABTS*ABTS	-0,0054	-0,0027	0,0564	-0,05	0,963	1,15
RBBR*RBBR	-0,0338	-0,0169	0,0564	-0,30	0,773	1,15
Ácido Graxo*Ácido Graxo	-0,0167	-0,0084	0,0564	-0,15	0,886	1,15
ABTS*RBBR	0,1321	0,0660	0,0668	0,99	0,356	1,00
ABTS*Ácido Graxo	-0,2228	-0,1114	0,0668	-1,67	0,140	1,00
RBBR*Ácido Graxo	0,0981	0,0490	0,0668	0,73	0,487	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

%D 526nm em 24h = 0,466 + (0,094*ABTS) - (1,51*RBBR) + (0,085*Ácido Graxo) - (0,008*ABTS*ABTS) - (4,8*RBBR*RBBR) - (0,0038*Ácido Graxo*Ácido Graxo) + (1,86*ABTS*RBBR) - (0,1258*ABTS*Ácido Graxo) + (0,554*RBBR*Ácido Graxo)

Regressão de Superfície de Resposta: %Descoloração de RB222 (em 526nm) por *P. ostreatus* em 48 horas versus ABTS; RBBR; Ácido Graxo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	0,075713	0,008413	0,28	0,961
Linear	3	0,018303	0,006101	0,20	0,892
ABTS	1	0,008473	0,008473	0,28	0,613
RBBR	1	0,005509	0,005509	0,18	0,683
Ácido Graxo	1	0,004321	0,004321	0,14	0,717
Quadrado	3	0,027694	0,009231	0,30	0,821
ABTS*ABTS	1	0,023759	0,023759	0,78	0,405
RBBR*RBBR	1	0,010655	0,010655	0,35	0,572
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1	0,005453	0,005453	0,18	0,684
Interação com 2 Fatores	3	0,029716	0,009905	0,33	0,806
ABTS*RBBR	1	0,001715	0,001715	0,06	0,819
ABTS*Ácido Graxo	1	0,003098	0,003098	0,10	0,758
RBBR*Ácido Graxo	1	0,024903	0,024903	0,82	0,395
Erro	7	0,212002	0,030286		
Falta de ajuste	5	0,208813	0,041763	26,19	0,037
Erro puro	2	0,003189	0,001595	*	*
Total	16	0,287715			

Continuação

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,174029	26,32%	0,00%	0,00%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	0,550	0,100	5,49	0,001		
ABTS	0,0498	0,0249	0,0471	0,53	0,613	1,00
RBBR	0,0402	0,0201	0,0471	0,43	0,683	1,00
Ácido Graxo	-0,0356	-0,0178	0,0471	-0,38	0,717	1,00
ABTS*ABTS	0,0919	0,0460	0,0519	0,89	0,405	1,15
RBBR*RBBR	0,0616	0,0308	0,0519	0,59	0,572	1,15
Ácido Graxo*Ácido Graxo	0,0440	0,0220	0,0519	0,42	0,684	1,15
ABTS*RBBR	-0,0293	-0,0146	0,0615	-0,24	0,819	1,00
ABTS*Ácido Graxo	-0,0394	-0,0197	0,0615	-0,32	0,758	1,00
RBBR*Ácido Graxo	-0,1116	-0,0558	0,0615	-0,91	0,395	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

%D 526nm 48 horas = 0,529 (0,121*ABTS) + (0,59*RBBR) + (0,024*Ácido Graxo) + (0,130*ABTS*ABTS) + (8,7*RBBR*RBBR) + (0,0099*Ácido Graxo*Ácido Graxo) - (0,41*ABTS*RBBR) - (0,0222*ABTS*Ácido Graxo) - (0,630*RBBR*Ácido Graxo)

Regressão de Superfície de Resposta: MnP de *P. ostreatus* no tempo inicial versus ABTS; RBBR; Ácido Graxo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	1610,30	178,922	1,44	0,324
Linear	3	691,66	230,553	1,85	0,226
ABTS	1	130,51	130,514	1,05	0,340
RBBR	1	262,08	262,081	2,10	0,190
Ácido Graxo	1	299,06	299,063	2,40	0,165
Quadrado	3	67,39	22,462	0,18	0,906
ABTS*ABTS	1	35,69	35,685	0,29	0,609
RBBR*RBBR	1	35,69	35,685	0,29	0,609
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1	35,69	35,685	0,29	0,609
Interação com 2 Fatores	3	851,25	283,751	2,28	0,167
ABTS*RBBR	1	181,64	181,642	1,46	0,267
ABTS*Ácido Graxo	1	222,61	222,605	1,79	0,223
RBBR*Ácido Graxo	1	447,00	447,005	3,59	0,100
Erro	7	872,33	124,619		
Falta de ajuste	5	872,33	174,467	*	*
Erro puro	2	0,00	0,000	*	*
Total	16	2482,63			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
11,1633	64,86%	19,69%	0,00%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	-0,53	6,43	-0,08	0,936		
ABTS	-6,19	-3,09	3,02	-1,02	0,340	1,00
RBBR	-8,77	-4,38	3,02	-1,45	0,190	1,00
Ácido Graxo	9,36	4,68	3,02	1,55	0,165	1,00
ABTS*ABTS	3,56	1,78	3,33	0,54	0,609	1,15
RBBR*RBBR	3,56	1,78	3,33	0,54	0,609	1,15
Ácido Graxo*Ácido Graxo	3,56	1,78	3,33	0,54	0,609	1,15
ABTS*RBBR	9,53	4,77	3,95	1,21	0,267	1,00
ABTS*Ácido Graxo	-10,55	-5,28	3,95	-1,34	0,223	1,00

Continuação

Termo	Efeito	Coef	Coef	Valor T	Valor-P	VIF
RBBR*Ácido Graxo	-14,95	-7,48	3,95	-1,89	0,100	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

MnP tempo inicial = -3,3 - 13,8*ABTS - 98*RBBR + 13,5*Ácido Graxo + 5,03*ABTS*ABTS + 503*RBBR*RBBR + 0,80*Ácido Graxo*Ácido Graxo + 134*ABTS*RBBR - 5,96*ABTS*Ácido Graxo - 84,4*RBBR*Ácido Graxo

Regressão de Superfície de Resposta: MnP de *P. ostreatus* em 24 horas versus ABTS; RBBR; Ácido Graxo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	1077,10	119,678	3,87	0,044
Linear	3	109,14	36,381	1,18	0,385
ABTS	1	29,05	29,052	0,94	0,365
RBBR	1	10,71	10,712	0,35	0,575
Ácido Graxo	1	69,38	69,378	2,24	0,178
Quadrado	3	124,50	41,500	1,34	0,336
ABTS*ABTS	1	25,49	25,494	0,82	0,394
RBBR*RBBR	1	25,49	25,494	0,82	0,394
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1	118,42	118,421	3,83	0,091
Interação com 2 Fatores	3	843,46	281,153	9,09	0,008
ABTS*RBBR	1	161,19	161,191	5,21	0,056
ABTS*Ácido Graxo	1	142,21	142,214	4,60	0,069
RBBR*Ácido Graxo	1	540,05	540,054	17,47	0,004
Erro	7	216,42	30,917		
Falta de ajuste	5	216,42	43,284	*	*
Erro puro	2	0,00	0,000	*	*
Total	16	1293,52			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
5,56035	83,27%	61,76%	0,00%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	-0,45	3,20	-0,14	0,892		
ABTS	-2,92	-1,46	1,51	-0,97	0,365	1,00
RBBR	1,77	0,89	1,51	0,59	0,575	1,00
Ácido Graxo	-4,51	-2,25	1,51	-1,50	0,178	1,00
ABTS*ABTS	3,01	1,51	1,66	0,91	0,394	1,15
RBBR*RBBR	3,01	1,51	1,66	0,91	0,394	1,15
Ácido Graxo*Ácido Graxo	6,49	3,25	1,66	1,96	0,091	1,15
ABTS*RBBR	8,98	4,49	1,97	2,28	0,056	1,00
ABTS*Ácido Graxo	-8,43	-4,22	1,97	-2,14	0,069	1,00
RBBR*Ácido Graxo	-16,43	-8,22	1,97	-4,18	0,004	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

MnP 24 horas = - 0,5 - 11,7*ABTS + 35*RBBR + 5,19*Ácido Graxo + 4,25*ABTS*ABTS + 425*RBBR*RBBR + 1,466*Ácido Graxo*Ácido Graxo + 126,7*ABTS*RBBR - 4,76*ABTS*Ácido Graxo - 92,8*RBBR*Ácido Graxo

Regressão de Superfície de Resposta: MnP de *P. ostreatus* em 48 horas versus ABTS; RBBR; Ácido Graxo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	169,830	18,8700	1,46	0,317
Linear	3	79,167	26,3891	2,04	0,197
ABTS	1	5,818	5,8182	0,45	0,524
RBBR	1	36,675	36,6746	2,83	0,136
Ácido Graxo	1	36,675	36,6746	2,83	0,136

Continuação

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Quadrado	3	8,264	2,7546	0,21	0,885
ABTS*ABTS	1	4,376	4,3762	0,34	0,579
RBBR*RBBR	1	4,376	4,3762	0,34	0,579
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1	4,376	4,3762	0,34	0,579
Interação com 2 Fatores	3	82,399	27,4664	2,12	0,186
ABTS*RBBR	1	9,924	9,9235	0,77	0,410
ABTS*Ácido Graxo	1	9,924	9,9235	0,77	0,410
RBBR*Ácido Graxo	1	62,552	62,5521	4,83	0,064
Erro	7	90,636	12,9480		
Falta de ajuste	5	90,636	18,1272	*	*
Erro puro	2	0,000	0,0000	*	*
Total	16	260,466			
Sumário do Modelo					
S	R2	R2(aj)	R2(pred)		
3,59833	65,20%	20,46%	0,00%		

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	EP de		Valor T	Valor-P	VIF
		Coef	Coef			
Constante	-0,19	2,07	-0,09	0,931		
ABTS	-1,306	-0,653	0,974	-0,67	0,524	1,00
RBBR	-3,279	-1,639	0,974	-1,68	0,136	1,00
Ácido Graxo	3,279	1,639	0,974	1,68	0,136	1,00
ABTS*ABTS	1,25	0,62	1,07	0,58	0,579	1,15
RBBR*RBBR	1,25	0,62	1,07	0,58	0,579	1,15
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1,25	0,62	1,07	0,58	0,579	1,15
ABTS*RBBR	2,23	1,11	1,27	0,88	0,410	1,00
ABTS*Ácido Graxo	-2,23	-1,11	1,27	-0,88	0,410	1,00
RBBR*Ácido Graxo	-5,59	-2,80	1,27	-2,20	0,064	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

MnP em 48 horas = - 1,70 - 4,62*ABTS - 15,3*RBBR + 4,11*Ácido Graxo + 1,76*ABTS*ABTS + 176*RBBR*RBBR + 0,282*Ácido Graxo*Ácido Graxo + 31,4*ABTS*RBBR - 1,26*ABTS*Ácido Graxo - 31,6*RBBR*Ácido Graxo

Regressão de Superfície de Resposta: Lacase de *P. ostreatus* no tempo inicial versus ABTS; RBBR; Ácido Graxo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	24687,9	2743,10	0,58	0,777
Linear	3	5728,4	1909,46	0,41	0,753
ABTS	1	1615,5	1615,48	0,34	0,576
RBBR	1	2263,8	2263,85	0,48	0,510
Ácido Graxo	1	1849,1	1849,06	0,39	0,550
Quadrado	3	7770,9	2590,31	0,55	0,663
ABTS*ABTS	1	634,0	633,99	0,14	0,724
RBBR*RBBR	1	7341,6	7341,62	1,57	0,251
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1	35,1	35,14	0,01	0,933
Interação com 2 Fatores	3	11188,6	3729,52	0,80	0,534
ABTS*RBBR	1	250,4	250,39	0,05	0,824
ABTS*Ácido Graxo	1	9970,8	9970,84	2,13	0,188
RBBR*Ácido Graxo	1	967,3	967,34	0,21	0,663
Erro	7	32823,8	4689,11		
Falta de ajuste	5	31659,8	6331,97	10,88	0,086
Erro puro	2	1163,9	581,97	*	*
Total	16	57511,7			

Continuação

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
68,4771	42,93%	0,00%	0,00%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	EP de		Valor T	Valor-P	VIF
		Coef	Coef			
Constante	183,0	39,5	4,64	0,002		
ABTS	-21,8	-10,9	18,5	-0,59	0,576	1,00
RBBR	-25,8	-12,9	18,5	-0,69	0,510	1,00
Ácido Graxo	-23,3	-11,6	18,5	-0,63	0,550	1,00
ABTS*ABTS	15,0	7,5	20,4	0,37	0,724	1,15
RBBR*RBBR	51,1	25,6	20,4	1,25	0,251	1,15
Ácido Graxo*Ácido Graxo	3,5	1,8	20,4	0,09	0,933	1,15
ABTS*RBBR	-11,2	-5,6	24,2	-0,23	0,824	1,00
ABTS*Ácido Graxo	70,6	35,3	24,2	1,46	0,188	1,00
RBBR*Ácido Graxo	22,0	11,0	24,2	0,45	0,663	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

Lacase tempo inicial = 456 - 145*ABTS - 1811*RBBR - 64,1*Ácido Graxo + 21,2*ABTS*ABTS + 7212*RBBR*RBBR + 0,80*Ácido Graxo*Ácido Graxo - 158*ABTS*RBBR + 39,9*ABTS*Ácido Graxo + 124*RBBR*Ácido Graxo

Regressão de Superfície de Resposta: Lacase de *P. ostreatus* em 24 horas versus ABTS; RBBR; Ácido Graxo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	74674	8297,2	1,57	0,281
Linear	3	61518	20506,1	3,89	0,063
ABTS	1	13592	13592,1	2,58	0,152
RBBR	1	14143	14143,1	2,68	0,145
Ácido Graxo	1	33783	33783,1	6,41	0,039
Quadrado	3	1092	364,0	0,07	0,975
ABTS*ABTS	1	187	186,6	0,04	0,856
RBBR*RBBR	1	70	69,6	0,01	0,912
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1	702	701,9	0,13	0,726
Interação com 2 Fatores	3	12064	4021,4	0,76	0,550
ABTS*RBBR	1	11909	11909,4	2,26	0,177
ABTS*Ácido Graxo	1	58	58,4	0,01	0,919
RBBR*Ácido Graxo	1	96	96,5	0,02	0,896
Erro	7	36904	5272,1		
Falta de ajuste	5	25389	5077,8	0,88	0,607
Erro puro	2	11516	5757,8	*	*
Total	16	111579			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
72,6090	66,93%	24,40%	0,00%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	EP de		Valor T	Valor-P	VIF
		Coef	Coef			
Constante	225,1	41,8	5,38	0,001		
ABTS	-63,1	-31,6	19,7	-1,61	0,152	1,00
RBBR	64,4	32,2	19,7	1,64	0,145	1,00
Ácido Graxo	-99,5	-49,8	19,7	-2,53	0,039	1,00
ABTS*ABTS	-8,1	-4,1	21,7	-0,19	0,856	1,15
RBBR*RBBR	5,0	2,5	21,7	0,11	0,912	1,15
Ácido Graxo*Ácido Graxo	-15,8	-7,9	21,7	-0,36	0,726	1,15
ABTS*RBBR	77,2	38,6	25,7	1,50	0,177	1,00
ABTS*Ácido Graxo	5,4	2,7	25,7	0,11	0,919	1,00

Continuação

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
RBBR*Ácido Graxo	6,9	3,5	25,7	0,14	0,896	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

Lacase em 24 horas = 407 - 147*ABTS - 787*RBBR - 22,6* Ácido Graxo - 11,5*ABTS*ABTS + 702*RBBR*RBBR - 3,57*Ácido Graxo*Ácido Graxo + 1089*ABTS*RBBR + 3,0*ABTS*Ácido Graxo + 39*RBBR*Ácido Graxo

Regressão de Superfície de Resposta: Lacase de *P. ostreatus* em 48 horas versus ABTS; RBBR; Ácido Graxo

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	72462,9	8051,4	2,84	0,091
Linear	3	29062,1	9687,4	3,41	0,082
ABTS	1	219,0	219,0	0,08	0,789
RBBR	1	1246,1	1246,1	0,44	0,529
Ácido Graxo	1	27597,0	27597,0	9,73	0,017
Quadrado	3	35527,9	11842,6	4,17	0,055
ABTS*ABTS	1	46,1	46,1	0,02	0,902
RBBR*RBBR	1	31691,7	31691,7	11,17	0,012
Ácido Graxo*Ácido Graxo	1	1553,3	1553,3	0,55	0,483
Interação com 2 Fatores	3	7873,0	2624,3	0,93	0,477
ABTS*RBBR	1	2918,1	2918,1	1,03	0,344
ABTS*Ácido Graxo	1	3537,4	3537,4	1,25	0,301
RBBR*Ácido Graxo	1	1417,5	1417,5	0,50	0,502
Erro	7	19858,0	2836,9		
Falta de ajuste	5	17441,1	3488,2	2,89	0,277
Erro puro	2	2416,9	1208,5	*	*
Total	16	92321,0			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
53,2622	78,49%	50,83%	0,00%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	184,9	30,7	6,02	0,001		
ABTS	-8,0	-4,0	14,4	-0,28	0,789	1,00
RBBR	19,1	9,6	14,4	0,66	0,529	1,00
Ácido Graxo	-89,9	-45,0	14,4	-3,12	0,017	1,00
ABTS*ABTS	-4,1	-2,0	15,9	-0,13	0,902	1,15
RBBR*RBBR	106,2	53,1	15,9	3,34	0,012	1,15
Ácido Graxo*Ácido Graxo	23,5	11,8	15,9	0,74	0,483	1,15
ABTS*RBBR	38,2	19,1	18,8	1,01	0,344	1,00
ABTS*Ácido Graxo	42,1	21,0	18,8	1,12	0,301	1,00
RBBR*Ácido Graxo	26,6	13,3	18,8	0,71	0,502	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

Lacase em 48 horas = 579 - 109*ABTS - 3751*RBBR - 95,5*Ácido Graxo - 5,7*ABTS*ABTS + 14985*RBBR*RBBR + 5,31*Ácido Graxo*Ácido Graxo + 539*ABTS*RBBR + 23,7*ABTS*Ácido Graxo + 150*RBBR*Ácido Graxo

Trametes villosa
Regressão de Superfície de Resposta: %Descoloração RB222 por *T. villosa* em 24 horas (610nm) versus ABTS; RBBR; AG; Mn+2

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	0,324844	0,023203	1,25	0,345
Linear	4	0,171327	0,042832	2,31	0,113

Continuação

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
ABTS	1	0,000037	0,000037	0,00	0,965
RBBR	1	0,063166	0,063166	3,41	0,088
AG	1	0,011068	0,011068	0,60	0,453
Mn+2	1	0,097057	0,097057	5,24	0,039
Quadrado	4	0,084174	0,021043	1,14	0,383
ABTS*ABTS	1	0,021108	0,021108	1,14	0,305
RBBR*RBBR	1	0,001205	0,001205	0,07	0,803
AG*AG	1	0,025569	0,025569	1,38	0,261
Mn+2*Mn+2	1	0,018775	0,018775	1,01	0,333
Interação com 2 Fatores	6	0,069343	0,011557	0,62	0,709
ABTS*RBBR	1	0,057767	0,057767	3,12	0,101
ABTS*AG	1	0,000000	0,000000	0,00	0,998
ABTS*Mn+2	1	0,002912	0,002912	0,16	0,698
RBBR*AG	1	0,007214	0,007214	0,39	0,543
RBBR*Mn+2	1	0,000437	0,000437	0,02	0,880
AG*Mn+2	1	0,001012	0,001012	0,05	0,819
Erro	13	0,240892	0,018530		
Falta de ajuste	10	0,143736	0,014374	0,44	0,855
Erro puro	3	0,097157	0,032386	*	*
Total	27	0,565736			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,136126	57,42%	11,56%	0,00%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	0,8275	0,0681	12,16	0,000		
ABTS	-0,0025	-0,0012	0,0278	-0,04	0,965	1,00
RBBR	-0,1026	-0,0513	0,0278	-1,85	0,088	1,00
AG	0,0429	0,0215	0,0278	0,77	0,453	1,00
Mn+2	0,1272	0,0636	0,0278	2,29	0,039	1,00
ABTS*ABTS	0,0593	0,0297	0,0278	1,07	0,305	1,14
RBBR*RBBR	0,0142	0,0071	0,0278	0,25	0,803	1,14
AG*AG	-0,0653	-0,0326	0,0278	-1,17	0,261	1,14
Mn+2*Mn+2	0,0559	0,0280	0,0278	1,01	0,333	1,14
ABTS*RBBR	-0,1202	-0,0601	0,0340	-1,77	0,101	1,00
ABTS*AG	0,0002	0,0001	0,0340	0,00	0,998	1,00
ABTS*Mn+2	-0,0270	-0,0135	0,0340	-0,40	0,698	1,00
RBBR*AG	-0,0425	-0,0212	0,0340	-0,62	0,543	1,00
RBBR*Mn+2	-0,0105	-0,0052	0,0340	-0,15	0,880	1,00
AG*Mn+2	-0,0159	-0,0080	0,0340	-0,23	0,819	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

%Desc 610nm 24h = 0,561 + 0,108*ABTS + 2,08*RBBR + 0,181*AG - 0,43*Mn+2 + 0,119*ABTS*ABTS + 2,8*RBBR*RBBR - 0,0209*AG*AG + 0,448*Mn+2*Mn+2 - 2,40*ABTS*RBBR + 0,0001*ABTS*AG - 0,108*ABTS*Mn+2 - 0,340*RBBR*AG - 0,42*RBBR*Mn+2 - 0,025*AG*Mn+2

Regressão de Superfície de Resposta: %Descoloração RB222 por *T. villosa* em 48 horas (610nm) versus ABTS; RBBR; AG; Mn+2

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	0,69460	0,049614	0,83	0,635
Linear	4	0,20796	0,051990	0,87	0,509
ABTS	1	0,00042	0,000418	0,01	0,935
RBBR	1	0,13583	0,135828	2,27	0,156
AG	1	0,05396	0,053959	0,90	0,360
Mn+2	1	0,01776	0,017756	0,30	0,595
Quadrado	4	0,31363	0,078406	1,31	0,318

Continuação

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
ABTS*ABTS	1	0,23630	0,236302	3,95	0,069
RBBR*RBBR	1	0,00044	0,000442	0,01	0,933
AG*AG	1	0,04086	0,040859	0,68	0,424
Mn+2*Mn+2	1	0,09234	0,092335	1,54	0,236
Interação com 2 Fatores	6	0,17301	0,028836	0,48	0,811
ABTS*RBBR	1	0,00822	0,008221	0,14	0,717
ABTS*AG	1	0,09021	0,090210	1,51	0,241
ABTS*Mn+2	1	0,01057	0,010570	0,18	0,681
RBBR*AG	1	0,03864	0,038641	0,65	0,436
RBBR*Mn+2	1	0,00883	0,008831	0,15	0,707
AG*Mn+2	1	0,01654	0,016542	0,28	0,608
Erro	13	0,77867	0,059897		
Falta de ajuste	10	0,56460	0,056460	0,79	0,661
Erro puro	3	0,21407	0,071356	*	*
Total	27	1,47327			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,244739	47,15%	0,00%	0,00%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	0,361	0,122	2,95	0,011		
ABTS	0,0083	0,0042	0,0500	0,08	0,935	1,00
RBBR	0,1505	0,0752	0,0500	1,51	0,156	1,00
AG	-0,0948	-0,0474	0,0500	-0,95	0,360	1,00
Mn+2	-0,0544	-0,0272	0,0500	-0,54	0,595	1,00
ABTS*ABTS	0,1985	0,0992	0,0500	1,99	0,069	1,14
RBBR*RBBR	-0,0086	-0,0043	0,0500	-0,09	0,933	1,14
AG*AG	0,0825	0,0413	0,0500	0,83	0,424	1,14
Mn+2*Mn+2	0,1241	0,0620	0,0500	1,24	0,236	1,14
ABTS*RBBR	-0,0453	-0,0227	0,0612	-0,37	0,717	1,00
ABTS*AG	0,1502	0,0751	0,0612	1,23	0,241	1,00
ABTS*Mn+2	0,0514	0,0257	0,0612	0,42	0,681	1,00
RBBR*AG	0,0983	0,0491	0,0612	0,80	0,436	1,00
RBBR*Mn+2	0,0470	0,0235	0,0612	0,38	0,707	1,00
AG*Mn+2	0,0643	0,0322	0,0612	0,53	0,608	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

% Desc 610nm 48h = 3,00 - 1,201*ABTS - 1,09*RBBR - 0,472* AG - 2,74*Mn+2 + 0,397*ABTS*ABTS - 1,7*RBBR*RBBR + 0,0264*AG*AG + 0,992*Mn+2*Mn+2 - 0,91*ABTS*RBBR + 0,1201*ABTS*AG + 0,206*ABTS*Mn+2 + 0,786*RBBR*AG + 1,88* RBBR*Mn+2 + 0,103*AG*Mn+2

Regressão de Superfície de Resposta: %Descoloração RB222 (em 526nm) por *T. villosa* após 24 horas versus ABTS; RBBR; AG; Mn+2

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	0,77760	0,055543	3,22	0,021
Linear	4	0,37932	0,094830	5,49	0,008
ABTS	1	0,00600	0,006005	0,35	0,565
RBBR	1	0,07821	0,078212	4,53	0,053
AG	1	0,24002	0,240025	13,90	0,003
Mn+2	1	0,05508	0,055081	3,19	0,097
Quadrado	4	0,33584	0,083959	4,86	0,013
ABTS*ABTS	1	0,00574	0,005739	0,33	0,574
RBBR*RBBR	1	0,00047	0,000470	0,03	0,872
AG*AG	1	0,21204	0,212043	12,28	0,004
Mn+2*Mn+2	1	0,03770	0,037700	2,18	0,163
Interação com 2 Fatores	6	0,06244	0,010407	0,60	0,724

Continuação

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
ABTS*RBBR	1	0,02412	0,024120	1,40	0,258
ABTS*AG	1	0,00000	0,000000	0,00	0,997
ABTS*Mn+2	1	0,02116	0,021161	1,23	0,288
RBBR*AG	1	0,01409	0,014092	0,82	0,383
RBBR*Mn+2	1	0,00006	0,000064	0,00	0,952
AG*Mn+2	1	0,00300	0,003005	0,17	0,683
Erro	13	0,22441	0,017262		
Falta de ajuste	10	0,16901	0,016901	0,92	0,603
Erro puro	3	0,05539	0,018465	*	*
Total	27	1,00200			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,131385	77,60%	53,49%	0,00%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	0,7035	0,0657	10,71	0,000		
ABTS	0,0316	0,0158	0,0268	0,59	0,565	1,00
RBBR	-0,1142	-0,0571	0,0268	-2,13	0,053	1,00
AG	0,2000	0,1000	0,0268	3,73	0,003	1,00
Mn+2	0,0958	0,0479	0,0268	1,79	0,097	1,00
ABTS*ABTS	0,0309	0,0155	0,0268	0,58	0,574	1,14
RBBR*RBBR	0,0088	0,0044	0,0268	0,16	0,872	1,14
AG*AG	-0,1880	-0,0940	0,0268	-3,50	0,004	1,14
Mn+2*Mn+2	0,0793	0,0396	0,0268	1,48	0,163	1,14
ABTS*RBBR	-0,0777	-0,0388	0,0328	-1,18	0,258	1,00
ABTS*AG	0,0003	0,0001	0,0328	0,00	0,997	1,00
ABTS*Mn+2	-0,0727	-0,0364	0,0328	-1,11	0,288	1,00
RBBR*AG	-0,0594	-0,0297	0,0328	-0,90	0,383	1,00
RBBR*Mn+2	0,0040	0,0020	0,0328	0,06	0,952	1,00
AG*Mn+2	-0,0274	-0,0137	0,0328	-0,42	0,683	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

%D 526nm 24h = 0,074 + 0,354*ABTS + 1,08*RBBR + 0,472*AG - 0,692*Mn+2 + 0,062*ABTS*ABTS + 1,8*RBBR*RBBR - 0,0602*AG*AG + 0,634*Mn+2*Mn+2 - 1,55*ABTS*RBBR + 0,0002*ABTS*AG - 0,291*ABTS*Mn+2 - 0,475*RBBR*AG + 0,16*RBBR*Mn+2 - 0,044*AG*Mn+2

Regressão de Superfície de Resposta: %Descoloração RB222 (em 526nm) por *T. villosa* após 48 horas versus ABTS; RBBR; AG; Mn+2

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	0,518870	0,037062	1,31	0,314
Linear	4	0,224072	0,056018	1,99	0,156
ABTS	1	0,002911	0,002911	0,10	0,753
RBBR	1	0,194910	0,194910	6,91	0,021
AG	1	0,000004	0,000004	0,00	0,991
Mn+2	1	0,026248	0,026248	0,93	0,352
Quadrado	4	0,140098	0,035025	1,24	0,341
ABTS*ABTS	1	0,105480	0,105480	3,74	0,075
RBBR*RBBR	1	0,000216	0,000216	0,01	0,932
AG*AG	1	0,000490	0,000490	0,02	0,897
Mn+2*Mn+2	1	0,038955	0,038955	1,38	0,261
Interação com 2 Fatores	6	0,154700	0,025783	0,91	0,515
ABTS*RBBR	1	0,005039	0,005039	0,18	0,679
ABTS*AG	1	0,104432	0,104432	3,70	0,076
ABTS*Mn+2	1	0,001183	0,001183	0,04	0,841
RBBR*AG	1	0,001778	0,001778	0,06	0,806
RBBR*Mn+2	1	0,004803	0,004803	0,17	0,687

Continuação

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
AG*Mn+2	1	0,037465	0,037465	1,33	0,270
Erro	13	0,366656	0,028204		
Falta de ajuste	10	0,261081	0,026108	0,74	0,686
Erro puro	3	0,105575	0,035192	*	*
Total	27	0,885526			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,167941	58,59%	14,00%	0,00%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	0,2536	0,0840	3,02	0,010		
ABTS	-0,0220	-0,0110	0,0343	-0,32	0,753	1,00
RBBR	0,1802	0,0901	0,0343	2,63	0,021	1,00
AG	0,0008	0,0004	0,0343	0,01	0,991	1,00
Mn+2	-0,0661	-0,0331	0,0343	-0,96	0,352	1,00
ABTS*ABTS	0,1326	0,0663	0,0343	1,93	0,075	1,14
RBBR*RBBR	-0,0060	-0,0030	0,0343	-0,09	0,932	1,14
AG*AG	0,0090	0,0045	0,0343	0,13	0,897	1,14
Mn+2*Mn+2	0,0806	0,0403	0,0343	1,18	0,261	1,14
ABTS*RBBR	0,0355	0,0177	0,0420	0,42	0,679	1,00
ABTS*AG	0,1616	0,0808	0,0420	1,92	0,076	1,00
ABTS*Mn+2	0,0172	0,0086	0,0420	0,20	0,841	1,00
RBBR*AG	0,0211	0,0105	0,0420	0,25	0,806	1,00
RBBR*Mn+2	0,0347	0,0173	0,0420	0,41	0,687	1,00
AG*Mn+2	0,0968	0,0484	0,0420	1,15	0,270	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

%D 526nm 48h = 2,174 - 1,015*ABTS - 0,48*RBBR - 0,315*AG - 2,02*Mn+2 + 0,265*ABTS*ABTS - 1,2*RBBR*RBBR + 0,0029*AG*AG + 0,645*Mn+2*Mn+2 + 0,71*ABTS*RBBR + 0,1293*ABTS*AG + 0,069*ABTS*Mn+2 + 0,169*RBBR*AG + 1,39*RBBR*Mn+2 + 0,155*AG*Mn+2

Regressão de Superfície de Resposta: MnP de *T. villosa* no tempo inicial versus ABTS; RBBR; AG; Mn+2

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	0,204783	0,014627	0,97	0,524
Linear	4	0,038584	0,009646	0,64	0,643
ABTS	1	0,001373	0,001373	0,09	0,767
RBBR	1	0,001373	0,001373	0,09	0,767
AG	1	0,001373	0,001373	0,09	0,767
Mn+2	1	0,034466	0,034466	2,29	0,154
Quadrado	4	0,004924	0,001231	0,08	0,987
ABTS*ABTS	1	0,002154	0,002154	0,14	0,711
RBBR*RBBR	1	0,002154	0,002154	0,14	0,711
AG*AG	1	0,002154	0,002154	0,14	0,711
Mn+2*Mn+2	1	0,002154	0,002154	0,14	0,711
Interação com 2 Fatores	6	0,161275	0,026879	1,79	0,179
ABTS*RBBR	1	0,051699	0,051699	3,43	0,087
ABTS*AG	1	0,051699	0,051699	3,43	0,087
ABTS*Mn+2	1	0,002059	0,002059	0,14	0,717
RBBR*AG	1	0,051699	0,051699	3,43	0,087
RBBR*Mn+2	1	0,002059	0,002059	0,14	0,717
AG*Mn+2	1	0,002059	0,002059	0,14	0,717
Erro	13	0,195741	0,015057		
Falta de ajuste	10	0,195741	0,019574	*	*
Erro puro	3	0,000000	0,000000	*	*
Total	27	0,400524			

Continuação

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,122707	51,13%	0,00%	0,00%

Coefficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	-0,0000	0,0614	-0,00	1,000		
ABTS	0,0151	0,0076	0,0250	0,30	0,767	1,00
RBBR	-0,0151	-0,0076	0,0250	-0,30	0,767	1,00
AG	0,0151	0,0076	0,0250	0,30	0,767	1,00
Mn+2	0,0758	0,0379	0,0250	1,51	0,154	1,00
ABTS*ABTS	0,0189	0,0095	0,0250	0,38	0,711	1,14
RBBR*RBBR	0,0189	0,0095	0,0250	0,38	0,711	1,14
AG*AG	0,0189	0,0095	0,0250	0,38	0,711	1,14
Mn+2*Mn+2	0,0189	0,0095	0,0250	0,38	0,711	1,14
ABTS*RBBR	-0,1137	-0,0568	0,0307	-1,85	0,087	1,00
ABTS*AG	-0,1137	-0,0568	0,0307	-1,85	0,087	1,00
ABTS*Mn+2	0,0227	0,0113	0,0307	0,37	0,717	1,00
RBBR*AG	-0,1137	-0,0568	0,0307	-1,85	0,087	1,00
RBBR*Mn+2	-0,0227	-0,0113	0,0307	-0,37	0,717	1,00
AG*Mn+2	0,0227	0,0113	0,0307	0,37	0,717	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

MnP tempo inicial = - 0,038 - 0,151*ABTS + 4,55*RBBR - 0,061*AG - 0,242*Mn+2 + 0,038*ABTS*ABTS + 3,8* RBBR*RBBR + 0,0061*AG*AG + 0,152*Mn+2*Mn+2 - 2,27*ABTS*RBBR + 0,0909*ABTS*AG + 0,091*ABTS*Mn+2 - 0,909*RBBR*AG - 0,91*RBBR*Mn+2 + 0,0363*AG*Mn+2

Regressão de Superfície de Resposta: MnP de *T. villosa* em 48 horas versus ABTS; RBBR; AG; Mn+2

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	1,19465	0,085332	1,22	0,363
Linear	4	0,36359	0,090897	1,30	0,321
ABTS	1	0,09090	0,090897	1,30	0,275
RBBR	1	0,09090	0,090897	1,30	0,275
AG	1	0,09090	0,090897	1,30	0,275
Mn+2	1	0,09090	0,090897	1,30	0,275
Quadrado	4	0,01299	0,003246	0,05	0,995
ABTS*ABTS	1	0,00568	0,005681	0,08	0,780
RBBR*RBBR	1	0,00568	0,005681	0,08	0,780
AG*AG	1	0,00568	0,005681	0,08	0,780
Mn+2*Mn+2	1	0,00568	0,005681	0,08	0,780
Interação com 2 Fatores	6	0,81807	0,136346	1,95	0,147
ABTS*RBBR	1	0,13635	0,136346	1,95	0,186
ABTS*AG	1	0,13635	0,136346	1,95	0,186
ABTS*Mn+2	1	0,13635	0,136346	1,95	0,186
RBBR*AG	1	0,13635	0,136346	1,95	0,186
RBBR*Mn+2	1	0,13635	0,136346	1,95	0,186
AG*Mn+2	1	0,13635	0,136346	1,95	0,186
Erro	13	0,90897	0,069921		
Falta de ajuste	10	0,90897	0,090897	*	*
Erro puro	3	0,00000	0,000000	*	*
Total	27	2,10362			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,264425	56,79%	10,26%	0,00%

Coefficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	-0,000	0,132	-0,00	1,000		

Continuação

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
ABTS	0,1231	0,0615	0,0540	1,14	0,275	1,00
RBBR	-0,1231	-0,0615	0,0540	-1,14	0,275	1,00
AG	0,1231	0,0615	0,0540	1,14	0,275	1,00
Mn+2	-0,1231	-0,0615	0,0540	-1,14	0,275	1,00
ABTS*ABTS	0,0308	0,0154	0,0540	0,29	0,780	1,14
RBBR*RBBR	0,0308	0,0154	0,0540	0,29	0,780	1,14
AG*AG	0,0308	0,0154	0,0540	0,29	0,780	1,14
Mn+2*Mn+2	0,0308	0,0154	0,0540	0,29	0,780	1,14
ABTS*RBBR	-0,1846	-0,0923	0,0661	-1,40	0,186	1,00
ABTS*AG	0,1846	0,0923	0,0661	1,40	0,186	1,00
ABTS*Mn+2	-0,1846	-0,0923	0,0661	-1,40	0,186	1,00
RBBR*AG	-0,1846	-0,0923	0,0661	-1,40	0,186	1,00
RBBR*Mn+2	0,1846	0,0923	0,0661	1,40	0,186	1,00
AG*Mn+2	-0,1846	-0,0923	0,0661	-1,40	0,186	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

MnP 48 horas = -0,55 + 0,738*ABTS - 2,46*RBBR + 0,295*AG - 0,00*Mn+2 + 0,062*ABTS*ABTS + 6,2*RBBR*RBBR + 0,0098*AG*AG + 0,246*Mn+2*Mn+2 - 3,69*ABTS*RBBR + 0,148*ABTS*AG - 0,738*ABTS*Mn+2 - 1,48*RBBR*AG + 7,38*RBBR*Mn+2 - 0,295*AG*Mn+2

Regressão de Superfície de Resposta: Lacase de *T. villosa* no tempo inicial versus ABTS; RBBR; AG; Mn+2

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	397942	28424	1,80	0,149
Linear	4	118267	29567	1,87	0,176
ABTS	1	45460	45460	2,88	0,114
RBBR	1	7582	7582	0,48	0,501
AG	1	65050	65050	4,12	0,063
Mn+2	1	175	175	0,01	0,918
Quadrado	4	48524	12131	0,77	0,565
ABTS*ABTS	1	33282	33282	2,11	0,170
RBBR*RBBR	1	8760	8760	0,55	0,470
AG*AG	1	1727	1727	0,11	0,746
Mn+2*Mn+2	1	43	43	0,00	0,959
Interação com 2 Fatores	6	231151	38525	2,44	0,084
ABTS*RBBR	1	4507	4507	0,29	0,602
ABTS*AG	1	60596	60596	3,84	0,072
ABTS*Mn+2	1	31995	31995	2,03	0,178
RBBR*AG	1	21496	21496	1,36	0,264
RBBR*Mn+2	1	10692	10692	0,68	0,425
AG*Mn+2	1	101864	101864	6,45	0,025
Erro	13	205343	15796		
Falta de ajuste	10	155369	15537	0,93	0,596
Erro puro	3	49974	16658	*	*
Total	27	603286			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
125,681	65,96%	29,31%	0,00%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	EP de		Valor T	Valor-P	VIF
		Coef	Coef			
Constante	469,9	62,8	7,48	0,000		
ABTS	87,0	43,5	25,7	1,70	0,114	1,00
RBBR	35,5	17,8	25,7	0,69	0,501	1,00
AG	104,1	52,1	25,7	2,03	0,063	1,00
Mn+2	5,4	2,7	25,7	0,11	0,918	1,00

Continuação

Termo	Efeito	EP de		Valor T	Valor-P	VIF
		Coef	Coef			
ABTS*ABTS	-74,5	-37,2	25,7	-1,45	0,170	1,14
RBBR*RBBR	-38,2	-19,1	25,7	-0,74	0,470	1,14
AG*AG	17,0	8,5	25,7	0,33	0,746	1,14
Mn+2*Mn+2	2,7	1,3	25,7	0,05	0,959	1,14
ABTS*RBBR	33,6	16,8	31,4	0,53	0,602	1,00
ABTS*AG	123,1	61,5	31,4	1,96	0,072	1,00
ABTS*Mn+2	-89,4	-44,7	31,4	-1,42	0,178	1,00
RBBR*AG	-73,3	-36,7	31,4	-1,17	0,264	1,00
RBBR*Mn+2	51,7	25,9	31,4	0,82	0,425	1,00
AG*Mn+2	-159,6	-79,8	31,4	-2,54	0,025	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

Lacase tempo inicial = -560 + 429*ABTS + 611*RBBR + 230*AG + 757*Mn+2 - 149*ABTS*ABTS - 7642*RBBR*RBBR + 5,4*AG*AG + 22*Mn+2*Mn+2 + 671*ABTS*RBBR + 98,5*ABTS*AG - 358*ABTS*Mn+2 - 586*RBBR*AG + 2068*RBBR*Mn+2 - 255*AG*Mn+2

Regressão de Superfície de Resposta: Lacase de *T. villosa* em 24 horas versus ABTS; RBBR; AG; Mn+2

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	671995	48000	2,99	0,028
Linear	4	26094	6524	0,41	0,801
ABTS	1	1857	1857	0,12	0,739
RBBR	1	532	532	0,03	0,858
AG	1	302	302	0,02	0,893
Mn+2	1	23403	23403	1,46	0,249
Quadrado	4	62008	15502	0,97	0,459
ABTS*ABTS	1	55662	55662	3,47	0,085
RBBR*RBBR	1	12571	12571	0,78	0,392
AG*AG	1	278	278	0,02	0,897
Mn+2*Mn+2	1	2200	2200	0,14	0,717
Interação com 2 Fatores	6	583893	97315	6,06	0,003
ABTS*RBBR	1	19079	19079	1,19	0,295
ABTS*AG	1	112678	112678	7,02	0,020
ABTS*Mn+2	1	70220	70220	4,38	0,057
RBBR*AG	1	869	869	0,05	0,820
RBBR*Mn+2	1	8096	8096	0,50	0,490
AG*Mn+2	1	372951	372951	23,24	0,000
Erro	13	208593	16046		
Falta de ajuste	10	193337	19334	3,80	0,150
Erro puro	3	15255	5085	*	*
Total	27	880587			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
126,671	76,31%	50,80%	0,00%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	EP de		Valor T	Valor-P	VIF
		Coef	Coef			
Constante	519,7	63,3	8,21	0,000		
ABTS	17,6	8,8	25,9	0,34	0,739	1,00
RBBR	9,4	4,7	25,9	0,18	0,858	1,00
AG	-7,1	-3,5	25,9	-0,14	0,893	1,00
Mn+2	62,5	31,2	25,9	1,21	0,249	1,00
ABTS*ABTS	-96,3	-48,2	25,9	-1,86	0,085	1,14
RBBR*RBBR	-45,8	-22,9	25,9	-0,89	0,392	1,14
AG*AG	-6,8	-3,4	25,9	-0,13	0,897	1,14
Mn+2*Mn+2	-19,2	-9,6	25,9	-0,37	0,717	1,14

Continuação

Termo	Efeito	EP de		Valor T	Valor-P	VIF
		Coef	Coef			
ABTS*RBBR	69,1	34,5	31,7	1,09	0,295	1,00
ABTS*AG	167,8	83,9	31,7	2,65	0,020	1,00
ABTS*Mn+2	-132,5	-66,2	31,7	-2,09	0,057	1,00
RBBR*AG	14,7	7,4	31,7	0,23	0,820	1,00
RBBR*Mn+2	-45,0	-22,5	31,7	-0,71	0,490	1,00
AG*Mn+2	-305,3	-152,7	31,7	-4,82	0,000	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

Lacase 24 horas = - 1504 + 459*ABTS + 2049*RBBR + 351*AG + 2363*Mn+2 - 193*ABTS*ABTS - 9155*RBBR*RBBR - 2,2*AG*AG - 153*Mn+2*Mn+2 + 1381*ABTS*RBBR + 134,3*ABTS*AG - 530*ABTS*Mn+2 + 118*RBBR*AG - 1800*RBBR*Mn+2 - 489*AG*Mn+2

Regressão de Superfície de Resposta: Lacase de *T. villosa* em 48 horas versus ABTS; RBBR; AG; Mn+2

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	487692	34835	1,69	0,176
Linear	4	15367	3842	0,19	0,941
ABTS	1	9910	9910	0,48	0,500
RBBR	1	40	40	0,00	0,966
AG	1	3891	3891	0,19	0,671
Mn+2	1	1526	1526	0,07	0,790
Quadrado	4	111910	27977	1,36	0,302
ABTS*ABTS	1	104167	104167	5,05	0,043
RBBR*RBBR	1	22157	22157	1,07	0,319
AG*AG	1	14749	14749	0,72	0,413
Mn+2*Mn+2	1	19697	19697	0,96	0,346
Interação com 2 Fatores	6	360416	60069	2,91	0,050
ABTS*RBBR	1	2835	2835	0,14	0,717
ABTS*AG	1	70056	70056	3,40	0,088
ABTS*Mn+2	1	68836	68836	3,34	0,091
RBBR*AG	1	315	315	0,02	0,904
RBBR*Mn+2	1	4004	4004	0,19	0,667
AG*Mn+2	1	214369	214369	10,40	0,007
Erro	13	268017	20617		
Falta de ajuste	10	190470	19047	0,74	0,689
Erro puro	3	77547	25849	*	*
Total	27	755709			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
143,585	64,53%	26,34%	0,00%

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	EP de		Valor T	Valor-P	VIF
		Coef	Coef			
Constante	649,0	71,8	9,04	0,000		
ABTS	40,6	20,3	29,3	0,69	0,500	1,00
RBBR	2,6	1,3	29,3	0,04	0,966	1,00
AG	-25,5	-12,7	29,3	-0,43	0,671	1,00
Mn+2	-15,9	-8,0	29,3	-0,27	0,790	1,00
ABTS*ABTS	-131,8	-65,9	29,3	-2,25	0,043	1,14
RBBR*RBBR	-60,8	-30,4	29,3	-1,04	0,319	1,14
AG*AG	-49,6	-24,8	29,3	-0,85	0,413	1,14
Mn+2*Mn+2	-57,3	-28,6	29,3	-0,98	0,346	1,14
ABTS*RBBR	-26,6	-13,3	35,9	-0,37	0,717	1,00
ABTS*AG	132,3	66,2	35,9	1,84	0,088	1,00
ABTS*Mn+2	-131,2	-65,6	35,9	-1,83	0,091	1,00
RBBR*AG	8,9	4,4	35,9	0,12	0,904	1,00

Continuação

Termo	Efeito	EP de		Valor T	Valor-P	VIF
		Coef	Coef			
RBBR*Mn+2	-31,6	-15,8	35,9	-0,44	0,667	1,00
AG*Mn+2	-231,5	-115,8	35,9	-3,22	0,007	1,00

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

$$\text{Lacase 48 horas} = -1628 + 881 \cdot \text{ABTS} + 4077 \cdot \text{RBBR} + 327 \cdot \text{AG} + 2462 \cdot \text{Mn+2} - 264 \cdot \text{ABTS} \cdot \text{ABTS} - 12154 \cdot \text{RBBR} \cdot \text{RBBR} - 15,9 \cdot \text{AG} \cdot \text{AG} - 458 \cdot \text{Mn+2} \cdot \text{Mn+2} - 532 \cdot \text{ABTS} \cdot \text{RBBR} + 105,9 \cdot \text{ABTS} \cdot \text{AG} - 525 \cdot \text{ABTS} \cdot \text{Mn+2} + 71 \cdot \text{RBBR} \cdot \text{AG} - 1266 \cdot \text{RBBR} \cdot \text{Mn+2} - 370 \cdot \text{AG} \cdot \text{Mn+2}$$

APÊNDICE E – Análise estatística item 4.5

Modelo Linear Generalizado: Descoloração 610nm *Peniophora cinerea* em 24 horas versus tratamento

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	Fixo	5	0; 2; 3; 4; 5 (0 = controle abiótico; 2 = sistema sem inibição; 3 = sistema sem lacase; 4 = sistema sem MnP; 5 = sistema sem lacase e MnP)

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tratamento	4	0,05580	0,013950	1,58	0,269
Erro	8	0,07062	0,008828		
Total	12	0,12642			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,0939551	44,14%	16,21%	0,00%

Coefficientes

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	0,0545	0,0266	2,05	0,074	
Tratamento					
0	-0,0545	0,0579	-0,94	0,374	1,87
2	-0,0545	0,0497	-1,10	0,305	1,68
3	-0,0545	0,0497	-1,10	0,305	1,68
4	0,1039	0,0579	1,79	0,110	1,87

Modelo Linear Generalizado: Descoloração 610nm *Peniophora cinerea* em 48 horas versus tratamento

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	Fixo	5	0; 2; 3; 4; 5 (0 = controle abiótico; 2 = sistema sem inibição; 3 = sistema sem lacase; 4 = sistema sem MnP; 5 = sistema sem lacase e MnP)

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tratamento	4	0,2131	0,05329	3,47	0,063
Erro	8	0,1230	0,01538		
Total	12	0,3362			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,124007	63,40%	45,11%	0,00%

Coefficientes

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	0,4300	0,0351	12,26	0,000	
Tratamento					
0	-0,2553	0,0764	-3,34	0,010	1,87
2	-0,0040	0,0656	-0,06	0,953	1,68
3	-0,0027	0,0656	-0,04	0,968	1,68
4	0,1405	0,0764	1,84	0,103	1,87

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tratamento	N	Média	Agrupamento
4	2	0,570489	A
5	3	0,551549	A
3	3	0,427347	A B
2	3	0,426043	A B
0	2	0,174751	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Descoloração 526nm *Peniophora cinerea* em 24 horas versus Tratamento

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	Fixo	5	0; 2; 3; 4; 5 (0 = controle abiótico; 2 = sistema sem inibição; 3 = sistema sem lacase; 4 = sistema sem MnP; 5 = sistema sem lacase e MnP)

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tratamento	4	0,4930	0,12324	8,37	0,006
Erro	8	0,1178	0,01472		
Total	12	0,6108			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,121345	80,71%	71,07%	52,40%

Coeficientes

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	0,3641	0,0343	10,61	0,000	
Tratamento					
0	-0,3641	0,0748	-4,87	0,001	1,87
2	-0,0974	0,0642	-1,52	0,168	1,68
3	0,0797	0,0642	1,24	0,250	1,68
4	0,1895	0,0748	2,53	0,035	1,87

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tratamento	N	Média	Agrupamento
5	3	0,556308	A
4	2	0,553563	A
3	3	0,443740	A
2	3	0,266645	A B
0	2	-0,000000	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Descoloração 526nm *Peniophora cinerea* em 48 horas versus Tratamento

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	Fixo	5	0; 2; 3; 4; 5 (0 = controle abiótico; 2 = sistema sem inibição; 3 = sistema sem lacase; 4 = sistema sem MnP; 5 = sistema sem lacase e MnP)

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tratamento	4	0,72687	0,18172	17,52	0,001
Erro	8	0,08299	0,01037		
Total	12	0,80987			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,101854	89,75%	84,63%	69,54%

Coeficientes

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	0,4947	0,0288	17,17	0,000	
Tratamento					
0	-0,4947	0,0628	-7,88	0,000	1,87
2	0,0077	0,0539	0,14	0,890	1,68
3	0,0759	0,0539	1,41	0,197	1,68
4	0,1762	0,0628	2,81	0,023	1,87

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

--	--	--	--	--	--

Continuação

Tratamento	N	Média	Agrupamento
5	3	0,729702	A
4	2	0,670914	A
3	3	0,570593	A
2	3	0,502410	A
0	2	-0,000000	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Descoloração 610nm *Pleurotus ostreatus* em 24 horas versus Tratamento

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	Fixo	6	0; 1; 2; 3; 4; 5 (0 = controle abiótico; 1 = controle abiótico com fungo morto; 2 = sistema sem inibição; 3 = sistema sem lacase; 4 = sistema sem MnP; 5 = sistema sem lacase e MnP)

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tratamento	5	1,3039	0,26077	5,75	0,015
Erro	8	0,3626	0,04532		
Total	13	1,6664			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,212884	78,24%	64,65%	49,32%

Coeficientes

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	0,6012	0,0579	10,38	0,000	
Tratamento					
0	-0,601	0,136	-4,42	0,002	2,01
1	0,084	0,136	0,62	0,554	2,01
2	0,208	0,116	1,79	0,111	1,78
3	-0,010	0,136	-0,08	0,941	2,01
4	0,443	0,136	3,26	0,012	2,01

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tratamento	N	Média	Agrupamento
4	2	1,04417	A
2	3	0,80888	A
1	2	0,68514	A
3	2	0,59079	A B
5	3	0,47824	A B
0	2	-0,00000	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Descoloração 610nm *Pleurotus ostreatus* em 48 horas versus Tratamento

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	Fixo	6	0; 1; 2; 3; 4; 5 (0 = controle abiótico; 1 = controle abiótico com fungo morto; 2 = sistema sem inibição; 3 = sistema sem lacase; 4 = sistema sem MnP; 5 = sistema sem lacase e MnP)

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tratamento	5	1,2797	0,25593	3,71	0,049
Erro	8	0,5517	0,06896		
Total	13	1,8314			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,262607	69,87%	51,05%	29,62%

Continuação

Coeficientes

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	0,7657	0,0715	10,71	0,000	
Tratamento					
0	-0,493	0,168	-2,94	0,019	2,01
1	0,057	0,168	0,34	0,741	2,01
2	0,267	0,143	1,87	0,098	1,78
3	-0,118	0,168	-0,71	0,501	2,01
4	0,471	0,168	2,81	0,023	2,01

Comparações Pareadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 90%

Tratamento	N	Média	Agrupamento
4	2	1,23654	A
2	3	1,03306	A
1	2	0,82305	A B
3	2	0,64753	A B
5	3	0,58167	A B
0	2	0,27263	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Modelo Linear Generalizado: Descoloração 526nm *Pleurotus ostreatus* em 24 horas versus Tratamento

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	Fixo	6	0; 1; 2; 3; 4; 5 (0 = controle abiótico; 1 = controle abiótico com fungo morto; 2 = sistema sem inibição; 3 = sistema sem lacase; 4 = sistema sem MnP; 5 = sistema sem lacase e MnP)

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tratamento	5	0,4598	0,09195	1,87	0,206
Erro	8	0,3935	0,04918		
Total	13	0,8532			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,221770	53,89%	25,06%	0,00%

Coeficientes

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	0,5162	0,0604	8,55	0,000	
Tratamento					
0	-0,388	0,142	-2,74	0,025	2,01
1	0,184	0,142	1,30	0,230	2,01
2	-0,029	0,121	-0,24	0,815	1,78
3	0,085	0,142	0,60	0,564	2,01
4	0,187	0,142	1,32	0,223	2,01

Modelo Linear Generalizado: Descoloração 526nm *Pleurotus ostreatus* em 48 horas versus Tratamento

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	Fixo	6	0; 1; 2; 3; 4; 5 (0 = controle abiótico; 1 = controle abiótico com fungo morto; 2 = sistema sem inibição; 3 = sistema sem lacase; 4 = sistema sem MnP; 5 = sistema sem lacase e MnP)

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tratamento	5	0,7178	0,14356	2,13	0,163
Erro	8	0,5384	0,06730		
Total	13	1,2562			

Sumário do Modelo

Continuação

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,259418	57,14%	30,35%	0,00%

Coeficientes

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	0,5970	0,0706	8,46	0,000	
Tratamento					
0	-0,473	0,166	-2,86	0,021	2,01
1	0,195	0,166	1,17	0,274	2,01
2	-0,043	0,141	-0,30	0,770	1,78
3	0,051	0,166	0,31	0,767	2,01
4	0,301	0,166	1,82	0,106	2,01

Modelo Linear Generalizado: Descoloração 610nm *Trametes villosa* em 24 horas versus Tratamento

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	Fixo	6	0; 1; 2; 3; 4; 5 (0 = controle abiótico; 1 = controle abiótico com fungo morto; 2 = sistema sem inibição; 3 = sistema sem lacase; 4 = sistema sem MnP; 5 = sistema sem lacase e MnP)

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tratamento	5	0,4042	0,08083	2,41	0,129
Erro	8	0,2679	0,03349		
Total	13	0,6721			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,183009	60,13%	35,22%	0,00%

Coeficientes

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	0,4772	0,0498	9,58	0,000	
Tratamento					
0	-0,325	0,117	-2,78	0,024	2,01
1	0,176	0,117	1,51	0,171	2,01
2	0,0122	0,0996	0,12	0,905	1,78
3	0,008	0,117	0,07	0,948	2,01
4	0,227	0,117	1,94	0,088	2,01

Modelo Linear Generalizado: Descoloração 610nm *Trametes villosa* em 48 horas versus Tratamento

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	Fixo	6	0; 1; 2; 3; 4; 5 (0 = controle abiótico; 1 = controle abiótico com fungo morto; 2 = sistema sem inibição; 3 = sistema sem lacase; 4 = sistema sem MnP; 5 = sistema sem lacase e MnP)

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tratamento	5	0,3110	0,06220	1,34	0,340
Erro	8	0,3723	0,04654		
Total	13	0,6833			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,215736	45,51%	11,45%	0,00%

Coeficientes

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	0,5393	0,0587	9,19	0,000	
Tratamento					
0	-0,272	0,138	-1,98	0,084	2,01

Continuação

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
1	0,203	0,138	1,48	0,178	2,01
2	-0,039	0,117	-0,33	0,750	1,78
3	-0,014	0,138	-0,10	0,921	2,01
4	0,181	0,138	1,31	0,226	2,01

Modelo Linear Generalizado: Descoloração 526nm *Trametes villosa* em 24 horas versus Tratamento

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	Fixo	6	0; 1; 2; 3; 4; 5 (0 = controle abiótico; 1 = controle abiótico com fungo morto; 2 = sistema sem inibição; 3 = sistema sem lacase; 4 = sistema sem MnP; 5 = sistema sem lacase e MnP)

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tratamento	5	0,3110	0,06220	1,34	0,340
Erro	8	0,3723	0,04654		
Total	13	0,6833			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,215736	45,51%	11,45%	0,00%

Coeficientes

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	0,5393	0,0587	9,19	0,000	
Tratamento					
0	-0,272	0,138	-1,98	0,084	2,01
1	0,203	0,138	1,48	0,178	2,01
2	-0,039	0,117	-0,33	0,750	1,78
3	-0,014	0,138	-0,10	0,921	2,01
4	0,181	0,138	1,31	0,226	2,01

Modelo Linear Generalizado: Descoloração 526nm *Trametes villosa* em 48 horas versus Tratamento

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	Fixo	6	0; 1; 2; 3; 4; 5 (0 = controle abiótico; 1 = controle abiótico com fungo morto; 2 = sistema sem inibição; 3 = sistema sem lacase; 4 = sistema sem MnP; 5 = sistema sem lacase e MnP)

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Tratamento	5	0,3549	0,07099	1,12	0,421
Erro	8	0,5073	0,06342		
Total	13	0,8623			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,251830	41,16%	4,39%	0,00%

Coeficientes

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	0,6460	0,0685	9,42	0,000	
Tratamento					
0	-0,323	0,161	-2,01	0,080	2,01
1	0,133	0,161	0,83	0,431	2,01
2	0,069	0,137	0,50	0,628	1,78
3	0,056	0,161	0,35	0,737	2,01
4	0,170	0,161	1,05	0,322	2,01

Análise de correlação para *Peniophora cinerea***Lacase versus descoloração 610nm**

Correlação de Pearson = -0,516

Valor-P = 0,041

MnP versus descoloração 610nm

Correlação de Pearson = -0,236

Valor-P = 0,378

Lacase versus descoloração 526nm

Correlação de Pearson = -0,438

Valor-P = 0,090

MnP versus descoloração 526nm

Correlação de Pearson = -0,110

Valor-P = 0,684

Lacase versus MnP

Correlação de Pearson = 0,185

Valor-P = 0,492

Atividade redutora de ferro versus descoloração 610nm

Correlação de Pearson = Valor-P = * Todos os valores na coluna são idênticos.

Atividade redutora de ferro versus descoloração 526nm

Correlação de Pearson = -0,607

Valor-P = 0,585

Quelantes de ferro versus descoloração 610nm

Correlação de Pearson = Valor-P = * Todos os valores na coluna são idênticos.

Quelantes de ferro versus descoloração 526nm

Correlação de Pearson = 0,692

Valor-P = 0,513

Quelantes de ferro versus atividade redutora de ferro

Correlação de Pearson = -0,994

Valor-P = 0,071

Lacase versus atividade redutora de ferro

Correlação de Pearson = -0,711

Valor-P = 0,497

Lacase versus quelantes de ferro

Correlação de Pearson = 0,785

Valor-P = 0,426

MnP versus atividade redutora de ferro

Correlação de Pearson = -0,550

Valor-P = 0,629

MnP versus quelantes de ferro

Correlação de Pearson = 0,640

Valor-P = 0,558

Análise de correlação para *Pleurotus ostreatus***Lacase versus descoloração 610nm**

Correlação de Pearson = 0,658

Continuação

Valor-P = 0,003

Lacase versus descoloração 526nm*Continuação*

Correlação de Pearson = 0,073

Valor-P = 0,774

Atividade redutora de ferro versus descoloração 610nm

Correlação de Pearson = -0,947

Valor-P = 0,207

Atividade redutora de ferro versus descoloração 526nm

Correlação de Pearson = -0,995

Valor-P = 0,065

Quelantes de ferro versus descoloração 610nm

Correlação de Pearson = 0,904

Valor-P = 0,281

Quelantes de ferro versus descoloração 526nm

Correlação de Pearson = 1,000

Valor-P = 0,008

Lacase versus atividade redutora de ferro

Correlação de Pearson = 0,374

Valor-P = 0,756

Lacase versus quelantes de ferro

Correlação de Pearson = -0,478

Valor-P = 0,683

Atividade redutora de ferro versus quelantes de ferro

Correlação de Pearson = -0,993

Valor-P = 0,073

Análise de correlação para *Trametes villosa***Lacase *versus* descoloração 610nm**

Correlação de Pearson = 0,035

Valor-P = 0,889

Lacase *versus* descoloração 526nm

Correlação de Pearson = 0,189

Valor-P = 0,452

Atividade redutora de ferro *versus* descoloração 610nm

Correlação de Pearson = 0,528

Valor-P = 0,646

Quelantes de ferro *versus* descoloração 610nm

Correlação de Pearson = -0,430

Valor-P = 0,717

Atividade redutora de ferro *versus* descoloração 526nm

Correlação de Pearson = -0,790

Valor-P = 0,420

Quelantes de ferro *versus* descoloração 526nm

Correlação de Pearson = 0,716

Valor-P = 0,492

Lacase *versus* quelantes de ferro

Correlação de Pearson = -0,933

Valor-P = 0,234

Lacase *versus* atividade redutora de ferro

Correlação de Pearson = 0,888

Valor-P = 0,305