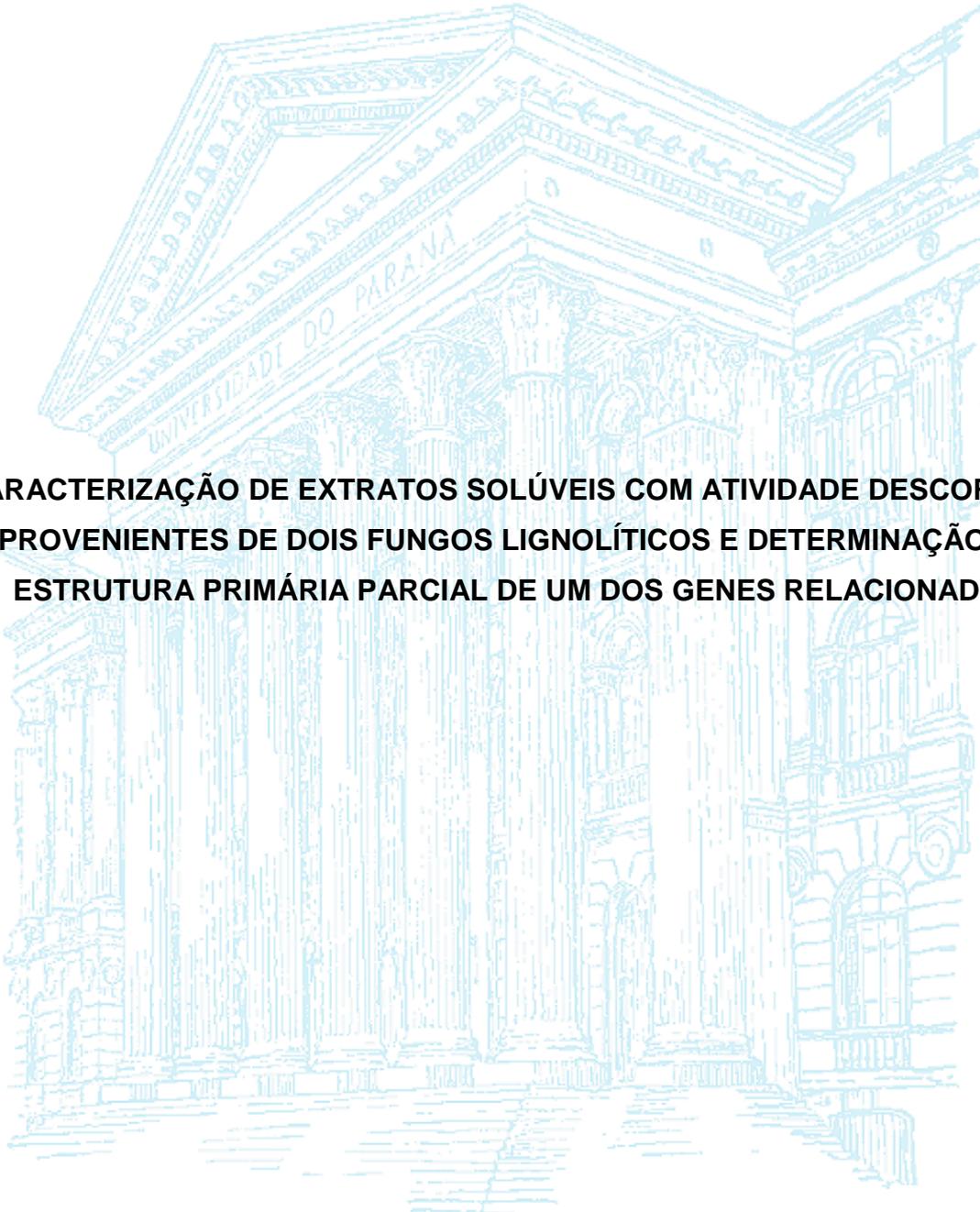


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA HEYSE NIEBISCH

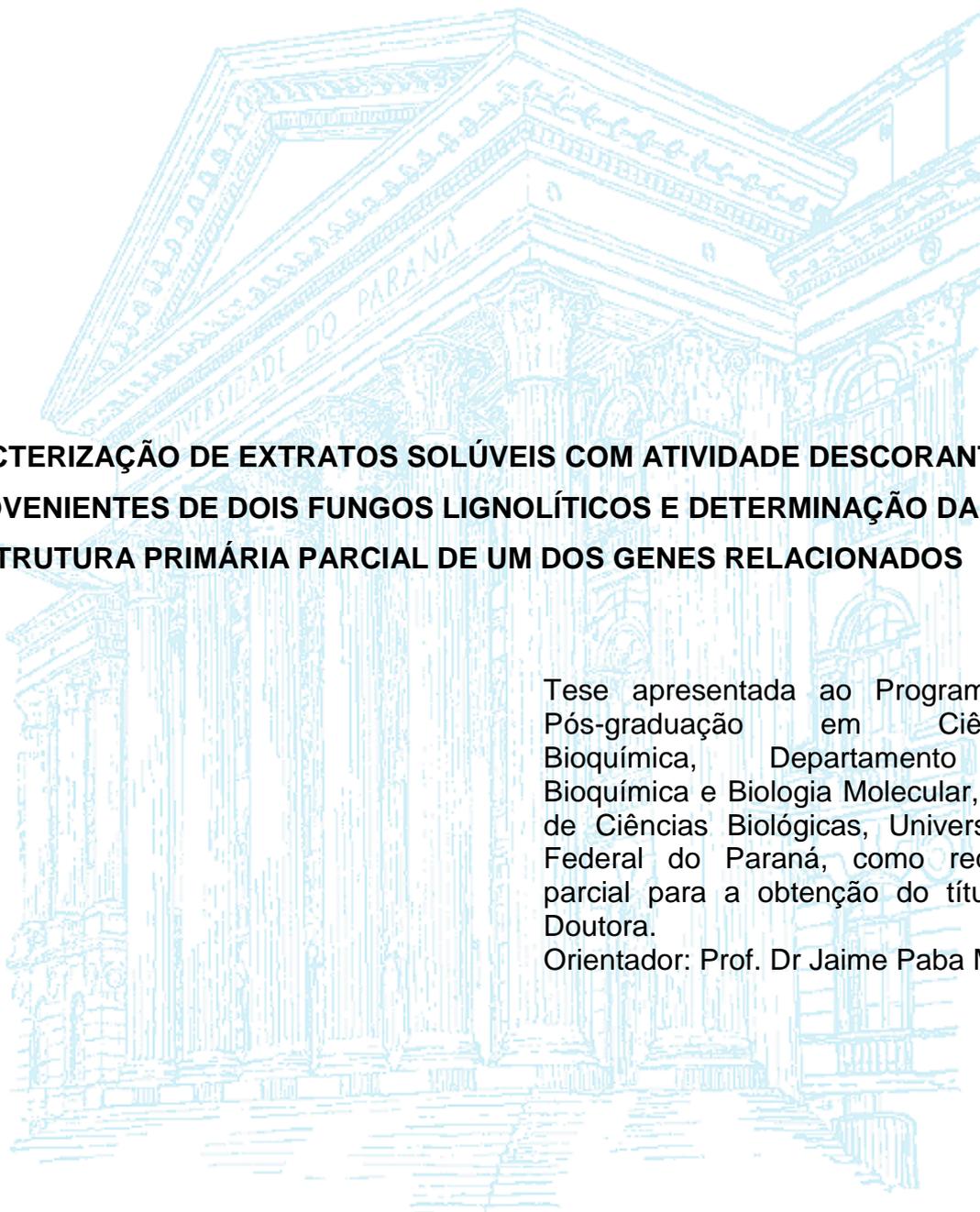


**CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS SOLÚVEIS COM ATIVIDADE DESCORANTE  
PROVENIENTES DE DOIS FUNGOS LIGNOLÍTICOS E DETERMINAÇÃO DA  
ESTRUTURA PRIMÁRIA PARCIAL DE UM DOS GENES RELACIONADOS**

CURITIBA

2012

CAROLINA HEYSE NIEBISCH



**CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS SOLÚVEIS COM ATIVIDADE DESCORANTE  
PROVENIENTES DE DOIS FUNGOS LIGNOLÍTICOS E DETERMINAÇÃO DA  
ESTRUTURA PRIMÁRIA PARCIAL DE UM DOS GENES RELACIONADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr Jaime Paba Mari

CURITIBA

2012

## **AGRADECIMENTOS**

Esta tese é fruto do incentivo, apoio e inspiração de muitas pessoas. Algumas delas foram fundamentais nestes anos de estudo e dedico a elas os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Jaime Paba por toda contribuição, incentivo, apoio e carinho. As conversas, as discussões, os momentos de aprendizado e crescimento foram muito importantes para minha formação. Obrigada pelo carinho e dedicação durante todos estes anos;

Aos professores Luciano Huergo, Wanderson Duarte da Rocha, David Mitchell, Dayane Alberton e Joana Léa pela participação na banca interna de acompanhamento e valiosas sugestões ao desenvolvimento deste trabalho;

Aos seres especiais, que no meu percurso de vida pessoal e profissional, ajudaram no meu crescimento e nos momentos de desânimo estiveram comigo: Anelis Maria Marin, Arquimedes Santana, Camila Silva e Souza, Ildemara Wojakewicz, João Francisco Bento, Mariana Lüders, Michele Pfeffer, Milena de Júlio, Renata Lazzari, Rubiana Ciola Matos e Mariza Boscacci Marques;

Como um dos meus pilares de sustentação para a conclusão desta tese de Doutorado, você, Richardson Guenther Schechi, foi fundamental para o desenvolvimento e finalização desse estudo através de sua compreensão, companheirismo e paciência. Muito obrigada por ter entrado na minha vida ao longo dessa pesquisa. Amo-te!!!

Aos meus familiares que sempre me deram amor e força;

Aos amigos e colegas Geison Cambri, Jaqueline Rosa, Alessandra Biz, Maura Guérios, Wellington Balmant, Daniele Stock, Monica Kangussu, Ana Paula Cunha,

Letícia Laibida, Normanda Melo, Michelle Zibetti Tadra Sfeir, Anelis Maria Marin pelas conversas, discussões, paciência e ajuda nos experimentos;

Aos meus mestres, que em cada etapa da minha trajetória, ensinaram-me através da palavra e do exemplo que a busca do conhecimento deve ser contínua;

Aos professores David Mitchell, Gláucia Martinez e Wanderson Duarte da Rocha pela disponibilização de laboratórios, equipamentos e materiais imprescindíveis à realização deste trabalho;

Ao Núcleo de Fixação de Nitrogênio, por permitir o uso da sua infraestrutura de sequenciamento de ácidos nucleicos e, em especial, ao Valter Baura pela ajuda no preparo e processamento das amostras;

À todos os professores, alunos e funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciências-Bioquímica, pela colaboração e estímulo na realização desta pesquisa;

À CAPES/REUNI, CNPq e IFS (International Foundation for Science, Suécia) pelo apoio financeiro, sem o qual a realização desta pesquisa teria sido impossível;

À todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização desta tese, muito obrigada!

## TERMO DE APROVAÇÃO

CAROLINA HEYSE NIEBISCH

### **CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS SOLÚVEIS COM ATIVIDADE DESCORANTE PROVENIENTES DE DOIS FUNGOS LIGNOLÍTICOS E DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA PARCIAL DE UM DOS GENES RELACIONADOS**

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Jaime Pabá Martinez (orientador)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

Prof. Dr. Carlos André Ornellas Ricart

Departamento de Biologia Celular - UNB

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dayane Alberton

Departamento de Patologia Médica - UFPR

Prof. Dr. Jürgen Andreaus

Departamento de Química - FURB

Prof. Dr. David Alexander Mitchell

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Curitiba, 27 de março de 2013.

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Niebish, Carolina Heyse

Caracterização de extratos solúveis com atividade descorante provenientes de dois fungos lignolíticos e determinação da estrutura primária parcial de um dos genes relacionados./Carolina Heyse Niebisch – Curitiba, 2013.

138f.: il. ; 30cm.

Orientador: Jaime Paba Martinez

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Biodegradação . 2. Corantes . 3. Indústria têxtil . I. Título II. Martinez, Jaime Paba. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.192

## RESUMO

Efluentes da indústria têxtil são considerados uns dos resíduos mais poluidores dos corpos de água. Os métodos atualmente aplicados para o seu tratamento são ineficazes na eliminação de corantes destes efluentes, levando à busca de estratégias mais eficientes e ecológicas. Uma destas, a biodegradação, refere-se ao uso de microrganismos ou enzimas na degradação de tais substratos coloridos. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito de diferentes parâmetros de cultivo na expressão de enzimas envolvidas na degradação de corantes a partir de culturas dos fungos *Lentinus crinitus* e *Lepista sordida*, bem como caracterizar a atividade descorante produzida e determinar a sequência parcial do gene que codifica tal atividade em *L. crinitus*. A atividade descorante em ambos os fungos mostrou-se associada a lacases, cuja expressão foi drasticamente afetada por alterações nas fontes de carbono e nitrogênio no meio de cultura. Foi observada a produção de quatro polipeptídeos (38, 41, 42,5 e 45 kDa) com atividade de lacase em *L. crinitus* e dois para *L. sordida* (36,5 e 48,5 kDa). A produção máxima de lacase para ambos os fungos foi atingida no 15º dia de cultivo, chegando a 7.000 e 3.721 UE/L para *L. crinitus* e *L. sordida*, respectivamente. A suplementação do meio de cultura com compostos aromáticos (álcool veratril, veratraldeído, catecol, vanilina, p-anisidina, ácido ferúlico ou ácido gálico) induziu a produção de lacase em quase todos os casos, com exceção do catecol em *L. sordida* e ácido gálico em *L. crinitus*. A atividade descorante nos extratos das duas linhagens manteve-se próxima da máxima em uma faixa ampla de valores de pH e temperatura, porém mostrou-se sensível a pequenas concentrações de sal no meio reacional. A presença de íons metálicos (cobre, manganês, magnésio, zinco, ferro e alumínio) resultou em diferentes efeitos na atividade, sendo que os íons de ferro inibiram completamente a atividade enzimática, enquanto íons de zinco e manganês a estimularam. Os extratos solúveis foram hábeis na descoloração de corantes de diferentes tipos e a presença de mediadores redox, como acetosiringona e siringaldeído, aumentou tanto a atividade descorante quanto o número de substratos descolorados pelos dois fungos. Usando *primers* contendo sequências conservadas das regiões de ligação ao cobre de enzimas lacase de basidiomicetos, foi possível obter dois produtos de 200 e 1400 bp a partir do DNA genômico de *L. crinitus*. O produto de amplificação menor foi totalmente sequenciado e está localizado entre os sítios de ligação ao cobre I e II. Do amplificado de 1400 bp, foram sequenciadas as duas extremidades que correspondem a 459 e 482 bp. Todos os fragmentos sequenciados apresentaram similaridade superior a 68 % com várias lacases de diferentes gêneros e espécies fúngicas, dentre elas duas espécies do gênero *Lentinus*: *L. tigrinus* e *L. sajor-caju*. Os resultados obtidos indicam que os extratos solúveis destes dois fungos indicam potencial para aplicação industrial e constituem o ponto de partida para a viabilização do uso de lacases provenientes destas linhagens em processos de remoção de corantes de águas residuais. Este é, também, o primeiro relato a respeito da estrutura primária de um gene de lacase em *L. crinitus*.

Palavras chave: Biodegradação. Corantes têxteis. *Lentinus crinitus*. *Lepista sordida*. Lacase.

## ABSTRACT

Industrial textile dye effluents are among the most important contaminants of water reservoirs. The low efficiency of the current methods applied to degrade the dyes in these wastewaters has led to the exploration for more effective and ecologically correct approaches. In this direction, biodegradation (the use of microorganisms or their products in the treatment of pollutants) has become a reliable alternative. This study had three main objectives: to assess the effect of several culture conditions on the expression of enzymes involved in the dye-destaining ability of *Lepista sordida* and *Lentinus crinitus* fungi; to characterize the dye-destaining activity of crude extracts, and to determine the partial sequence of the gene associated with this attribute in *L. crinitus*. The destaining activity in both fungi was associated with the expression of laccase-like multicopper oxidases. Enzyme production and destaining activity were widely affected by changes in the carbon and nitrogen sources in the culture medium. The production of up to four polypeptides (of 38, 41, 42.5 and 45 kDa) with laccase activity was observed on *L. crinitus*, while for *L. sordida* only two active proteins (of 36.5 and 48.5 kDa) were observed. Maximum laccase production for both species was achieved on the 15th day of cultivation, yielding activities of 7 000 and 3 721 UE/ L in *L. crinitus* and *L. sordida*, respectively. Both crude laccase extracts displayed high activity over a wide range of pH values, temperatures and salt concentrations, although a low stability at high salt concentrations. The effect of metal ions (copper, manganese, magnesium, zinc, iron and aluminum) on the destaining activity depended on the type and concentration used. Iron ions exerted a strong inhibitory effect, while the presence of zinc and manganese resulted in an improved enzyme activity. The introduction of acetosyringone and syringaldehyde as redox mediators enhanced the destaining rate and the number of target substrates. Supplementation of the culture medium with aromatic compounds (veratryl alcohol, veratraldehyde, catechol, p-anisidin, gallic acid, and ferulic acid) induced the production of laccase in almost all cases, with the exception of catechol and ethanol (used as solvent) for *L. sordida* and gallic acid for *L. crinitus*. Using *primers* derived from the conserved copper-binding sites of the lac gene family, and the *L. crinitus* genomic DNA as template, were obtained two products of 200 and 1400 bp. The former corresponded to the consensus region located between the laccase copper-binding sites I and II. From the longer PCR product were obtained the partial sequences of its ends, corresponding to 459 and 482 bp. In all cases, the sequence analysis revealed a similarity of 68 % with several laccases of different fungal genera and species, among them two species of the genus *Lentinus*: *L. tigrinus* and *L. sajor-caju*.

Keywords: Biodegradation. Textile dyes. *Lentinus crinitus*. *Lepista sordida*. Laccase.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURAS REPRESENTATIVAS DA MOLÉCULA DE LIGNINA E DE ALGUNS SUBSTRATOS POLUENTES.....	29
FIGURA 2 – CICLO CATALÍTICO DA ENZIMA LACASE.....	31
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ATIVIDADE CATALÍTICA DE LACASE NA PRESENÇA DE MEDIADORES.....	36
FIGURA 4 – FUNGO <i>LENTINUS CRINITUS</i> .....	39
FIGURA 5 – FUNGO <i>LEPISTA SORDIDA</i> .....	40
FIGURA 6 – FLUXOGRAMAS EXPERIMENTAIS PARA A CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DESCORANTE DE <i>L. CRINITUS</i> E <i>L. SORDIDA</i> (A) E PARA A DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA PARCIAL DO GENE DE LACASE DE <i>L. CRINITUS</i> (B).....	43
FIGURA 7 – ESTRUTURA GERAL DE UM GENE DE LACASE DE BASÍDIOMICETOS E OS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DOS CONJUNTOS DE <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS.....	56
FIGURA 8 – MAPA DO VETOR pGEM-T EASY.....	59
FIGURA 9 - ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E ZIMOGRAMA DE AMOSTRAS DE <i>L. CRINITUS</i> PROVENIENTES DE MEIO SÓLIDO.....	63
FIGURA 10 - ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E ZIMOGRAMA DE AMOSTRAS DO SOBRENADANTE DE <i>L. SORDIDA</i> .....	63
FIGURA 11 – EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ATIVIDADE DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE <i>L. SORDIDA</i> .....	65
FIGURA 12 - ZIMOGRAMA DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE <i>L. SORDIDA</i> OBTIDOS A PARTIR DE CULTURAS LÍQUIDAS PROVENIENTES DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO (5 g/L) ..	66
FIGURA 13 – EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E DE ATIVIDADE DESCORANTE DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE <i>L. SORDIDA</i> EM MALTOSE 5 g/L (A) E GLUCOSE 10 g/L (B).....	67
FIGURA 14 - ZIMOGRAMA DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE <i>L. SORDIDA</i> OBTIDOS A PARTIR DE CULTURAS LÍQUIDAS PROVENIENTES DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO (5 g/L) EM MALTOSE 5 g/L.....	67
FIGURA 15 – EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO NA ATIVIDADE DESCORANTE DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE <i>L. CRINITUS</i> .....	68
FIGURA 16 - ZIMOGRAMA DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE <i>L. CRINITUS</i> OBTIDOS A PARTIR DE CULTURAS SÓLIDAS CRESCIDAS EM MEIOS CONTENDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO.....	69
FIGURA 17 – EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO NA ATIVIDADE DESCORANTE DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE <i>L. CRINITUS</i> .....	70
FIGURA 18 - ZIMOGRAMA DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE <i>L. CRINITUS</i> OBTIDOS A PARTIR DE CULTURAS SÓLIDAS PROVENIENTES DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO E GLUCOSE 10 g/L.....	70

FIGURA 19 - EFEITO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE OXALATO DE AMÔNIA NO PERFIL DE ATIVIDADE EM GEL DE LACASE DOS SOBRENADANTES DE CULTURAS SÓLIDAS DE <i>L. CRINITUS</i> EM GLUCOSE 10 g/L.....	70
FIGURA 20 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SULFATO DE COBRE NA ATIVIDADE DESCORANTE EM <i>L. CRINITUS</i> .....	73
FIGURA 21– EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SULFATO DE COBRE NA ATIVIDADE DESCORANTE E CRESCIMENTO DE <i>L. SORDIDA</i> EM MALTOSE 5 g/L (A) E GLUCOSE 10 g/L (B) .....	74
FIGURA 22 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SULFATO DE MANGANÊS NA ATIVIDADE DESCORANTE E CRESCIMENTO DE <i>L. SORDIDA</i> EM MALTOSE 5 g/L (A) E GLUCOSE 10 g/L (B). .....	75
FIGURA 23 – EFEITO DA TEMPERATURA DE CULTIVO DE <i>L. CRINITUS</i> NA ATIVIDADE DESCORANTE .....	77
FIGURA 24 - EFEITO DA TEMPERATURA DE CULTIVO DE <i>L. SORDIDA</i> NA ATIVIDADE DESCORANTE E PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MALTOSE 5 g/L (A) E GLUCOSE 10 g/L (B).. .....	77
FIGURA 25 – EFEITO DO PH INICIAL DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE ATIVIDADE DESCORANTE E CRESCIMENTO DE <i>L. SORDIDA</i> EM MALTOSE 5 g/L (A) E GLUCOSE 10 g/L (B) .....	79
FIGURA 26 – EFEITO DO PH INICIAL DE CULTIVO DE <i>L. CRINITUS</i> NA PRODUÇÃO DE ATIVIDADE DESCORANTE .....	79
FIGURA 27 – EFEITO DA AGITAÇÃO DA CULTURA NA PRODUÇÃO DE ATIVIDADE DESCORANTE E CRESCIMENTO DE <i>L. SORDIDA</i> EM MALTOSE 5 g/L (A) E GLUCOSE 10 g/L (B) .....	80
FIGURA 28 – ATIVIDADE DESCORANTE DE EXTRATOS SOLUVEIS DE <i>L. CRINITUS</i> OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.....	81
FIGURA 29 - ATIVIDADE EM GEL DE EXTRATOS PROVENIENTES DE CULTURAS LÍQUIDAS DE <i>L. CRINITUS</i> NA PRESENÇA (A) E AUSÊNCIA (B) DE RB220 E CULTURAS SÓLIDAS NA PRESENÇA DE RB220 (C).....	82
FIGURA 30 – ATIVIDADE DESCORANTE, ATIVIDADE OXIDATIVA TOTAL E DE LACASE DO EXTRATO SOLÚVEL DE <i>L. CRINITUS</i> AO LONGO DO TEMPO DE CULTIVO .....	84
FIGURA 31 – ATIVIDADE DESCORANTE, ATIVIDADE OXIDATIVA TOTAL E DE LACASE DO EXTRATO SOLÚVEL DE <i>L. SORDIDA</i> AO LONGO DO TEMPO DE CULTIVO .....	84
FIGURA 32 - EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DESCORANTE (A E C) E TERMOESTABILIDADE DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE <i>L. CRINITUS</i> E <i>L. SORDIDA</i> (B E D).....	86
FIGURA 33 - EFEITO DO PH NA ATIVIDADE DESCORANTE (A E C) E NA ESTABILIDADE DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE <i>L. CRINITUS</i> E <i>L. SORDIDA</i> (B E D) .....	88
FIGURA 34 - EFEITO DA SALINIDADE NA ATIVIDADE DESCORANTE (A E C) E NA ESTABILIDADE DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE <i>L. CRINITUS</i> E <i>L. SORDIDA</i> (B E D). .....	89
FIGURA 35 – EFEITO DE ÍONS METALICOS NA ATIVIDADE DESCORANTE DE EXTRATOS SOLUVEIS DE <i>L. CRINITUS</i> .....	91

FIGURA 36 – EFEITO DE ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE DESCORANTE DE EXTRATOS SOLÚVEIS DE <i>L. SORDIDA</i> .	92
FIGURA 37 – EFEITO DE INIBIDORES DE METALENZIMAS NA ATIVIDADE DESCORANTE DO SOBRENADANTE DE <i>L. SORDIDA</i> (A) E <i>L. CRINITUS</i> (B).	93
FIGURA 38 – ATIVIDADE DESCORANTE DO SOBRENADANTE DE <i>L. CRINITUS</i> SOBRE DIFERENTES CORANTES TÊXTEIS E DE USO LABORATORIAL	94
FIGURA 39 – ATIVIDADE DESCORANTE DO SOBRENADANTE DE <i>L. SORDIDA</i> SOBRE DIFERENTES CORANTES TÊXTEIS E DE USO LABORATORIAL	94
FIGURA 40 – ATIVIDADE DESCORANTE DO SOBRENADANTE DE <i>L. CRINITUS</i> SOBRE DIFERENTES CORANTES TÊXTEIS E DE USO LABORATORIAL NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE 1 MM DE MEDIADORES REDOX	96
FIGURA 41 – DESCOLORAÇÃO DO SOBRENADANTE DE <i>L. SORDIDA</i> SOBRE DIFERENTES CORANTES TÊXTEIS E DE USO LABORATORIAL NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE 1 MM DE MEDIADORES REDOX.	97
FIGURA 42 – ATIVIDADE DESCORANTE DO SOBRENADANTE DE <i>L. CRINITUS</i> SOBRE DIFERENTES BANHOS DE TINGIMENTO, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE MEDIADORES REDOX	100
FIGURA 43 – ATIVIDADE DESCORANTE DO SOBRENADANTE DE <i>L. SORDIDA</i> SOBRE DIFERENTES BANHOS DE TINGIMENTO, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE MEDIADORES REDOX.	101
FIGURA 44 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DAS CULTURAS COM COMPOSTOS AROMÁTICOS NA PRODUÇÃO DE LACASE E ATIVIDADE DESCORANTE DO SOBRENADANTE DE <i>L. CRINITUS</i> .	103
FIGURA 45 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DAS CULTURAS COM COMPOSTOS AROMÁTICOS NO PERFIL DE ATIVIDADE EM GEL DE <i>L. CRINITUS</i> .	103
FIGURA 46 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DAS CULTURAS COM COMPOSTOS AROMÁTICOS NA PRODUÇÃO DE LACASE E DESCOLORAÇÃO DO SOBRENADANTE DE <i>L. SORDIDA</i> .	104
FIGURA 47 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DAS CULTURAS COM COMPOSTOS AROMÁTICOS NO PERFIL DE ATIVIDADE EM GEL DE <i>L. SORDIDA</i>	104
FIGURA 48 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO DNA GENÔMICO DE <i>L. CRINITUS</i> (A) E DOS FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADOS COM OS <i>PRIMERS</i> Cu1F E Cu2R ANTES (B) E APÓS PURIFICAÇÃO (C).	107
FIGURA 49 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO DNA PLASMIDIAL SUBMETIDO À DIGESTÃO COM <i>ECORI</i> .	108
FIGURA 50 - SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DO FRAGMENTO DE LACASE DE <i>L. CRINITUS</i> DENOMINADO P1	109
FIGURA 51 - DOMÍNIOS CONSERVADOS PRESENTES NO FRAGMENTO P1 DE <i>L. CRINITUS</i> .	109
FIGURA 52 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR USANDO <i>PRIMERS</i> #1 E #2 ANTES (A) E APÓS PURIFICAÇÃO (B)	110

FIGURA 53 – SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTIDEOS CORRESPONDENTES ÀS EXTREMIDADES DE P2, OBTIDAS UTILIZANDO OS <i>PRIMERS</i> T7(A) E SP6 (B) .....	111
FIGURA 54 - DOMÍNIOS CONSERVADOS ENCONTRADOS PARA A P2 DE <i>L. CRINITUS</i> OBTIDO A PARTIR DO PRIMER SP6 .....	111
FIGURA 55 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DAS EXTREMIDADES DE P2 DO FRAGMENTO DE LACASE DE <i>L. CRINITUS</i> OBTIDAS UTILIZANDO OS <i>PRIMERS</i> SP6 (A) E T7 (B) COM FRAGMENTOS DO GENE <i>LCC1</i> DE <i>L. TIGRINUS</i> .....	113

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – MÉTODOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES TÊXTEIS .....	26
TABELA 2- CLASSIFICAÇÃO DOS FUNGOS DA DECOMPOSIÇÃO DA MADEIRA .....	28
TABELA 3 – COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES DAS LMEs PROVENIENTES DE FUNGOS DE DECOMPOSIÇÃO DE MADEIRA .....	29
TABELA 4 - ESTRUTURAS, CLASSIFICAÇÃO E COMPRIMENTO DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO VISÍVEL ( $\lambda_{MAX}$ ) DOS CORANTES TÊXTEIS E DE LABORATÓRIO UTILIZADOS PARA ENSAIOS DE ATIVIDADE DESCORANTE. ....	46
TABELA 5 – CARACTERÍSTICAS E COMPRIMENTO DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO VISÍVEL ( $\lambda_{MAX}$ ) DOS BANHOS DE TINGIMENTO DA INDÚSTRIA TÊXTIL.....	53
TABELA 6 – ATIVIDADE DESCORANTE DO SOBRENADANTE DE <i>L. CRINITUS</i> SOBRE DIFERENTES CORANTES TÊXTEIS E DE USO LABORATORIAL NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE MEDIADORES REDOX, APÓS 24 H. ....	96
TABELA 7 – ATIVIDADE DESCORANTE DO SOBRENADANTE DE <i>L. SORDIDA</i> SOBRE DIFERENTES CORANTES TÊXTEIS E DE USO LABORATORIAL NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE MEDIADORES REDOX, APÓS 24 H. ....	98

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,6 DMP	- 2,6 dimetoxifenol
AB	- azul de bromofenol
AB193	- corante marinho CRD 150
AB194	- corante preto CR 150
ABTS	- 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
AcNH <sub>4</sub>	- acetato de amônio
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	- sulfato de alumínio
AM	- azul de metileno
BDA	- meio ágar batata dextrose
BLAST	- <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
B-Smax	- corante azul S-max
C.I.	- <i>Colour Index</i>
CaCl <sub>2</sub>	- cloreto de cálcio
C-HEXL	- corante crimson HEXL
CTBA	- brometo de cetil-triamônio
CuSO <sub>4</sub>	- sulfato de cobre
DBO	- demanda bioquímica de oxigênio
dNTPs	- desoxirribonucleotídeos fosfatados
DQO	- demanda química de oxigênio
DTT	- ditioneitol
EO	- eosina
ETDA	- <i>Ecological and Toxicological Association of the Dyestuff Manufacturing Industry</i>
FeSO <sub>4</sub>	- sulfato de ferro
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- peróxido de hidrogênio
HBT	- 1-hidroxibenzotriazol
HNA	- N-hidroxiacetanilida
HPI	- N-hidroxiftalimida
KCl	- cloreto de potássio
KCl	- cloreto de potássio
kDa	- kilodaltons
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	- fosfato de sódio

LA	- meio Luria Bertani sólido
Lac	- lacase
LB	- meio Luria Bertani líquido
<i>LccED</i>	- <i>The Laccase and Multicopper Oxidase Engineering Database</i>
LiP	- lignina peroxidase
LMEs	- enzimas modificadoras de lignina
MCO	- família das proteínas multicobre oxidase
MgCl <sub>2</sub>	- cloreto de magnésio
MgSO <sub>4</sub>	- sulfato de magnésio
MML	- meio mínimo líquido
MMS	- meio mínimo sólido
MnP	- Manganês peroxidase
MnSO <sub>4</sub>	- sulfato de manganês
MS	- meio de sais
N	- nitrogênio
NaCl	- cloreto de sódio
NaNO <sub>3</sub>	- nitrato de sódio
NCBI	- <i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
pH	- potencial hidrogeniônico
RB220	- corante azul brilhante BB
RBBR	- corante azul brilhante
RO176	- corante reactive Orange 176
R-PF3B	- corante vermelho PF3B
RR120	- corante vermelho HE3B
RR141	- corante vermelho HE7B
RR195	- corante vermelho BF3SR
RR198	- corante azul HE GX 145
RR198	- corante vermelho RB
R-Smax	- corante vermelho S-max
RY107	- corante amarelo ouro RNL 150
RY135	- corante amarelo HE6G
RY84	- corante amarelo HE4R
SDS	- dodecil sulfato de sódio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
1.1	OBJETIVO GERAL	21
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>22</b>
2.1	CORANTES E INDÚSTRIAS TÊXTEIS	22
2.2	CORANTES, EFLUENTES TÊXTEIS E TOXICIDADE	23
2.3	TRATAMENTO DE EFLUENTES TÊXTEIS	25
2.4	BIODEGRADAÇÃO E FUNGOS LIGNOLÍTICOS	27
2.5	ENZIMAS MODIFICADORAS DE LIGNINA - LMEs	28
2.6	LACASES FÚNGICAS	30
2.6.1	Características gerais das lacases	30
2.6.2	Efeito das condições de cultivo na produção de lacase	32
2.6.2.1	Fontes de carbono, nitrogênio e agitação	33
2.6.2.2	Efeito de indutores na produção e atividade de lacase	34
2.6.2.3	Efeito de mediadores redox na atividade de lacase	35
2.6.3	Características do gene de lacase	37
2.7	ANTECEDENTES DOS MICRORGANISMOS UTILIZADOS	38
2.7.1	<i>Lentinus crinitus</i>	38
2.7.2	<i>Lepista sordida</i>	40
<b>3</b>	<b>ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>42</b>
4.1	ESTUDO DO EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS COM ATIVIDADE DESCORANTE	42
4.1.1	Microrganismos e condições de cultura	44
4.1.2	Preparo dos extratos solúveis e eluídos	44
4.1.3	Determinação da massa micelial seca	45
4.1.4	Avaliação da atividade descorante	45
4.1.5	Avaliação da atividade de oxidases	49
4.1.6	Efeito da alteração dos parâmetros de cultivo na produção de enzimas com atividade descorante	50
4.1.6.1	Fontes de carbono e nitrogênio	50
4.1.6.2	Suplementação com sulfato de cobre e sulfato de manganês	50
4.1.6.3	Temperatura, pH e agitação	51
4.1.7	Efeito do pH, temperatura e concentração de sal na atividade descorante e estabilidade do extrato	51
4.1.8	Efeito de íons metálicos e inibidores de lacase na atividade descorante	52

4.1.9	Atividade descorante dos extratos enzimáticos sobre corantes têxteis e corantes de uso laboratorial .....	52
4.1.10	Atividade descorante dos extratos enzimáticos sobre banhos de tingimento da indústria têxtil .....	52
4.1.11	Efeito de compostos aromáticos na produção de atividade enzimática .....	53
4.1.12	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS- PAGE) e detecção de atividade enzimática em gel (zimograma) .....	54
4.1.13	Análise estatística .....	55
4.2	CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO GENE DA LACASE DE <i>L. CRINITUS</i> .....	55
4.2.1	Isolamento do DNA genômico .....	55
4.2.2	Obtenção das sequências específicas de <i>L. crinitus</i> .....	56
4.2.3	Clonagem .....	57
4.2.3.1	Condições de cultivo de <i>Escherichia coli</i> .....	57
4.2.3.2	Preparo de células competentes e transformação .....	58
4.2.3.3	Ligação .....	59
4.2.4	Obtenção de DNA plasmidial .....	60
4.2.5	Reação de sequenciamento .....	60
4.2.6	Purificação dos produtos da reação de sequenciamento com acetato de amônio .....	61
4.2.7	Análise das sequências de nucleotídeos obtidas .....	61
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>62</b>
5.1	EFEITOS DAS VARIAÇÕES DOS PARÂMETROS DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS COM ATIVIDADE DESCORANTE .....	62
5.1.1	Perfil de polipeptídeos com atividade de lacase nos extratos solúveis .....	62
5.1.2	Fontes de carbono e nitrogênio .....	64
5.1.2.1	<i>Lepista sordida</i> .....	65
5.1.2.2	<i>Lentinus crinitus</i> .....	68
5.1.3	Efeito da suplementação do meio de cultivo com cobre e manganês .....	73
5.1.4	Efeito da temperatura de cultivo sobre a produção de lacase .....	76
5.1.5	Efeito do pH inicial do meio de cultivo na produção de atividade descorante .....	78
5.1.6	Efeito da agitação sobre a produção de atividade descorante .....	80
5.1.7	Comparação entre cultivo em meio sólido e líquido e efeito da presença do corante RB220 no perfil de atividade em gel de <i>L. crinitus</i> .....	81
5.1.8	Produção de enzimas com atividade descorante ao longo do tempo de cultivo .....	83
5.1.9	Efeito do pH, temperatura e concentração de sal na atividade descorante e estabilidade dos extratos .....	85
5.1.10	Efeito de íons metálicos e inibidores de lacase na atividade descorante .....	90
5.1.11	Atividade descorante dos extratos solúveis sobre outros corantes têxteis e de uso em laboratório .....	93
5.1.12	Atividade descorante dos extratos enzimáticos sobre banhos de tingimento da indústria têxtil .....	99

5.1.13	Efeito de compostos aromáticos na produção de atividade descorante e produção de laccase .....	102
5.2	OBTENÇÃO DA SEQUÊNCIA PRIMARIA PARCIAL DO GENE DE LACASE DE <i>L. CRINITUS</i> .....	106
5.2.1	Produto amplificado 1 (P1) – <i>primers</i> Cu1F e Cu2R .....	107
5.2.2	Produto amplificado 2 (P2) – <i>primers</i> #1 e #2 .....	109
5.3	SÍNTESE DOS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS.....	114
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>116</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>118</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O setor têxtil é um dos setores industriais mais poluidores, considerando tanto o volume de água utilizado quanto a composição do efluente gerado. Estas águas residuais são constituídas por uma mistura complexa de compostos a base de carbono e sais, além de altas cargas de corante. Cerca de 15 % do corante utilizado durante o processo de tingimento não se fixa à fibra e é eliminado no efluente final (BISSCHOPS e SPANJERS, 2003; LATIF *et al.*, 2010).

Os efluentes têxteis são normalmente tratados por métodos físicos e químicos. Embora esses tratamentos alcancem elevados níveis de mineralização e descoloração, eles apresentam duas principais limitações: o alto custo e a produção de grandes quantidades de resíduos sólidos, que demandam um destino final, como incineração ou deposição em aterro (ALCÂNTARA e DALTIM, 1996).

A biodegradação, ou seja, a degradação biológica de poluentes, mostra-se uma alternativa bastante viável para o tratamento destes efluentes, tanto pelo seu custo ecológico, quanto por seu baixo custo. Dentre os organismos mais utilizados nesta estratégia, os fungos lignolíticos têm despertado grande interesse devido à produção de enzimas modificadoras de lignina (LMEs), como lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase (WESENBERG, 2003). Estas enzimas, devido a sua baixa especificidade, são capazes de atuar sobre diversos substratos que apresentam similaridade estrutural com a lignina, dentre eles, os corantes têxteis (LATIF *et al.*, 2010). Nas últimas décadas, tem-se estudado a aplicação de lacases na degradação de compostos xenobióticos como pesticidas e herbicidas, assim como na degradação de efluentes industriais (ASGHER *et al.*, 2008). Esta variedade de possíveis aplicações tem conduzido a um incremento na pesquisa de organismos produtores de lacase, das condições de produção e de suas propriedades catalíticas.

A adição de mediadores de óxido-redução no sistema de reação de enzimas lacase pode ampliar a faixa de alvos oxidáveis. Estes compostos atuam como uma “ponte” entre a enzima e o substrato tornando possível a oxidação de moléculas que dificilmente seriam alvos da enzima devido ao impedimento estérico ou porque a diferença de potencial de redução entre enzima e substrato desfavorece a ação direta entre eles (WESENBERG, 2003). No caso dos corantes têxteis, o uso de

mediadores que ampliam a ação catalítica da lacase é necessário para contornar a grande diversidade de potenciais substratos (corantes) presentes em efluentes da indústria têxtil.

As principais dificuldades para o uso de lacases em nível industrial são a baixa produção destas enzimas pela maioria dos fungos lignolíticos (WESENBERG, 2003), a diversidade de substratos alvo, assim como as variáveis características físico-químicas (pH, temperatura e salinidade) dos efluentes têxteis. Para transpor a baixa produção da enzima é necessário selecionar novos microrganismos, assim como otimizar as suas condições de cultivo, já que estas são particulares para cada isolado em estudo. Outra abordagem que permite aumentar a produção enzimática é a superexpressão em sistemas homólogos ou heterólogos, contudo, para esta estratégia é indispensável o conhecimento da estrutura primária dos genes que codificam a enzima alvo. Esta informação permite não só o controle da expressão de enzimas em diferentes hospedeiros, mas também a manipulação das propriedades catalíticas da enzima, permitindo ou aperfeiçoando a sua ação sobre diversos substratos e em variáveis condições de pH, temperatura e sal. Considerando que a aplicação das lacases no tratamento de efluentes ainda é incipiente, este trabalho visa contribuir para os próximos passos em direção ao desenvolvimento de um produto final com aplicação industrial de alta eficiência.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivos principais a avaliação do efeito de diferentes parâmetros na expressão de enzimas envolvidas na degradação de corantes a partir de culturas dos fungos *Lentinus crinitus* e *Lepista sordida*, bem como a caracterização da atividade descorante produzida, além da determinação da estrutura primária parcial do gene da lacase de *L. crinitus*.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Verificar o efeito da alteração das condições de cultivo (fontes de carbono e nitrogênio, suplementação com íons metálicos e compostos aromáticos, temperatura, pH e agitação) na produção de enzimas associadas à descoloração de corantes em *L. crinitus* e *L. sordida*
- II. Avaliar a atividade e estabilidade das enzimas envolvidas na descoloração frente a variações de pH, temperatura e concentração de sal;
- III. Verificar a atividade descorante dos extratos solúveis dos dois fungos sobre vários corantes têxteis comerciais que são utilizados em análises laboratoriais e banhos de tingimento da indústria têxtil, na presença e ausência de mediadores de oxido-redução;
- IV. Determinar a estrutura primária parcial do gene de lacase de *L. crinitus*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CORANTES E INDÚSTRIAS TÊXTEIS

Os corantes têxteis são compostos orgânicos que mostram alta capacidade de absorção de luz e conferem à fibra determinada cor (SARON e FELISBERTI, 2006). A molécula de corante é basicamente composta por um grupo cromóforo que confere cor a substância e o grupo reativo que corresponde à estrutura responsável pela fixação do corante à fibra (KUNZ *et al.*, 2002).

Para designar estes compostos, a nomenclatura química raramente é utilizada. A identificação de corantes com estruturas químicas semelhantes, mas comercializados com diferentes denominações, é feita pelo *Colour Index* (C.I.), catálogo da *American Association of Textile Chemists and Colourists* e da *British Society of Dyers and Colourist*. O C.I. classifica os corantes de acordo com sua estrutura química, definida pelos grupos cromóforos, e registra atualmente mais de oito mil corantes sintéticos associados à indústria têxtil (WESENBERG, KYRIAKIDES e AGATHOS, 2003). Pelo C.I., os corantes e pigmentos podem ser distribuídos em 26 tipos, segundo os critérios das classes químicas, ou em 20 tipos, do ponto de vista de suas aplicações (ABIQUIM, 2012). Ao se utilizar a estrutura química como critério de classificação, os corantes podem ser subdivididos em várias classes de cromóforos: azo (mono, di, tri e poliazó), nitrofenol, nitrosofenol, triarilmetano, antraquinônico, pirimidina, vinilsulfônico e triazina, entre outros (TWARDOKUS, 2004). De acordo com o modo de aplicação do corante à fibra têxtil, eles podem ser ácidos, azóicos, básicos, diretos, de enxofre, naturais, dispersos, a cuba, sulfurosos, pré-metalizados e reativos, entre outros (GUARATINI e ZANONI, 2000; HAO *et al.*, 2000; ABIQUIM, 2012).

A produção industrial de corantes no Brasil foi iniciada logo após a Primeira Guerra Mundial e atualmente supre 60% da sua demanda doméstica. Cerca de três quartos das indústrias têxteis estão localizadas nas regiões Sul (Santa Catarina), Sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e Nordeste (Pernambuco, Bahia e Ceará) (GUARATINI e ZANONI, 2000). Dados da Associação Brasileira da Indústria

Química (ABIQUIM, 2012) indicam que o uso de corantes no Brasil concentra-se, principalmente, em corantes reativos (57 % do mercado) e dispersos (35 %).

O processo de tratamento de fibras mais comum em indústrias têxteis abrange as seguintes etapas sequenciais: emgomagem, desengomagem, lavagem, branqueamento, mercerização, tingimento e enxague. A primeira etapa proporciona resistência aos fios e minimiza sua ruptura durante a tecelagem, pela adição de agentes de engomagem (amido, álcool polivinílico e carboximetil-celulose). O processo seguinte, a desengomagem, é utilizado para remover o excesso dos materiais de engomagem antes do tingimento. Subsequentemente, uma lavagem com solução de álcali (geralmente hidróxido de sódio) e surfactantes é utilizada para emulsificar e suspender impurezas como óleos naturais, gorduras e ceras, removendo estas impurezas das fibras. O próximo passo é o branqueamento, que é usado para remover material colorido não desejado das fibras, pelo uso de hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio. Na sequência, eventualmente, é realizado um processo químico contínuo denominado mercerização, utilizado para aumentar a capacidade de ligação dos corantes, brilho e aparência da fibra. Nesta etapa, aplica-se sobre a fibra uma solução alcalina concentrada e, a seguir, ocorre uma lavagem com solução ácida, antes do passo de tingimento. Este último consiste na adição de cor às fibras, o que normalmente requer um grande volume de água, não só no banho de tingimento, mas também durante o passo de enxague. Dependendo do processo de tingimento, muitos produtos químicos, tais como íons metálicos, sais, surfactantes, sulfeto e formaldeído, podem ser adicionados para melhorar a retenção do corante nas fibras (SANTOS, CERVANTES e LIER, 2007; RAMACHANDRAN, GANESAN e HARIHARAN, 2010).

## 2.2 CORANTES, EFLUENTES TÊXTEIS E TOXICIDADE

Os efluentes das indústrias têxteis apresentam composição complexa, e são caracterizados por extremas flutuações de vários parâmetros, tais como a demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), pH, cor e salinidade. A composição destas águas residuais depende dos diversos reagentes utilizados nas diferentes etapas do processo industrial (SANTOS, CERVANTES e

LIER, 2007). Estes fatores, aliados à grande demanda de água e à baixa biodegradabilidade dos compostos presentes, tornam este tipo de água residual uma importante fonte de poluição (WANG *et al.*, 2011).

Sem tratamento adequado, os corantes podem permanecer por períodos prolongados no ambiente (SANTOS, CERVANTES e LIER, 2007). A presença de quantidades muito pequenas de corantes é suficiente para tornar o efluente colorido (NIGAM *et al.*, 2000), reduzindo a penetração de luz solar e a solubilidade dos gases no corpo de água.

Vários trabalhos descrevem danos decorrentes da exposição a corantes têxteis em diferentes organismos biosensores, como peixes (SHARMA *et al.*, 2009), bactérias (LIMA *et al.*, 2007; GRINEVICIUS *et al.*, 2009), cianobactérias (SADETTIN e DOÑMEZ, 2006) e crustáceos (LANZER *et al.*, 2007). Dentre as alterações observadas, citam-se a genotoxicidade (GRINEVICIUS *et al.*, 2009; CHI *et al.*, 2010; BAFANA *et al.*, 2009), os efeitos mutagênicos e carcinogênicos (LIMA *et al.*, 2007; VINEIS e PIRASTU, 1997), o estresse oxidativo (GRINEVICIUS *et al.*, 2009), além da bioacumulação (SADETTIN e DOÑMEZ, 2006).

Os riscos causados pelas moléculas de corantes à saúde humana variam de acordo com o tempo e o modo de exposição. Alguns estudos têm relacionado um aumento no risco de dermatites de contato, de problemas respiratórios, de câncer de bexiga, pancreático e de sistema digestivo aos trabalhadores de indústrias têxteis expostos aos corantes (DOLIN, 1992; NOTANI, SHAH E BALAJRISHNAN, 1993; NILSSON *et al.*, 1993; HUNGER, 1994; ALGUACIL *et al.*, 2000; MASTRANGELO *et al.*, 2002). No entanto, os maiores riscos estão associados às etapas de biotransformação destes compostos. Os derivados metabolizados destes corantes podem apresentar propriedades carcinogênicas, mutagênicas (HUNGER, 1994), genotóxicas (VANHULLE *et al.*, 2008; CHEQUER *et al.*, 2009), citotóxicas (VANHULLE *et al.*, 2008) e clastogênicas (RAJAGURU *et al.*, 1999). Evidências epidemiológicas indicam relação entre o risco de desenvolvimento de câncer e aminas aromáticas derivadas de quebra de corantes azóicos (CERNIGLIA *et al.*, 1986 *apud* SWEENEY *et al.*, 1994; HUNGER, 1994).

## 2.3 TRATAMENTO DE EFLUENTES TÊXTEIS

Em 1974, foi criado o órgão internacional *Ecological and Toxicological Association of the Dyestuff Manufacturing Industry* (ETDA), com o intuito de fiscalizar, monitorar e, assim, minimizar os possíveis danos ao homem e ao meio ambiente decorrentes da atividade industrial têxtil. Este órgão fiscaliza, em nível mundial, a fabricação e o uso de corantes sintéticos, porém o controle ainda é falho em países em desenvolvimento. Muitos países tem normas rígidas para a emissão de efluentes da indústria têxtil, porém estas normas são particulares para cada país e não há um padrão internacional de descarte destes efluentes (WANG *et al.*, 2011).

A variada natureza química dos corantes e o uso rotineiro de aditivos químicos de composição variada (umectantes, antiespumantes, dispersantes, ajustadores de pH) durante o processo de tingimento dificultam o tratamento e remoção de corantes dos efluentes industriais (GHOREISHI e HAGHIGHI, 2003; ALCÂNTARA e DALTIM, 2006). As tecnologias tradicionais para o tratamento de águas residuais têxteis incluem combinações de métodos de tratamento biológicos, físicos e químicos (Tabela 1), mas estes apresentam custos de operação elevados e nem sempre são eficientes na remoção de corantes (WANG *et al.*, 2011).

A indústria têxtil apresenta, em geral, tratamentos fundamentados na operação de processos de precipitação-coagulação, seguido de lodos ativados. Este sistema apresenta eficiência de tratamento relativamente alta, em torno de 80%, porém o lodo gerado não pode ser reaproveitado, devido à alta concentração de corantes adsorvida. O lodo pode ser descartado em aterro industrial ou incinerado. Entretanto, considerando o grande volume produzido e a sua baixa biodegradabilidade, estas opções apresentam elevado impacto negativo sobre o meio ambiente. Aliado a isto, o alto custo e a produção de gases tóxicos na incineração do lodo estimulam a busca de novas possibilidades ecologicamente corretas e economicamente viáveis para o destino deste material (HASSEMER *et al.*, 2006; ROBINSON *et al.*, 2001). Dentro deste contexto, a biodegradação mostra-se uma alternativa bastante viável para substituir ou complementar os tratamentos atuais.

TABELA 1 – MÉTODOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES TÊXTEIS

Processo	Métodos	Vantagens	Desvantagens
Oxidação de Fenton	Químico	Descoloração efetiva de corantes solúveis e insolúveis; baixo capital e custo de funcionamento	Geração de lodo pela floculação dos reagentes e das moléculas do corante; necessidade de correção para pH ácido
Osmose reversa	Químico-Físico	Remoção de sais minerais, corantes reativos hidrolisados e auxiliares químicos	Grande quantidade de energia requerida para a separação
Eletrólise	Químico	Total descoloração; baixo custo	Tempo de vida da espuma e do eletrodo
Fotocatálise	Químico	Remoção da cor quase completa; desintoxicação	Somente como passo final de polimento
Ozonização	Químico	Total descoloração; reuso de água	Alto custo; formação de aldeídos; não reduz DQO, não efetivo para corantes dispersos e insolúveis; período de meia vida curto (20 min)
Coagulação/floculação	Químico-Físico	Total descoloração (corantes dispersos e sulfurosos); reuso de água; eliminação de corantes insolúveis	Nem sempre efetivo (corantes ácidos, diretos e reativos); disposição de lodo; custos.
Adsorção	Físico	Novos adsorventes são efetivos e com baixo custo; reuso de água	Alto custo de eliminação ou regeneração
Ultrafiltração/Microfiltração	Físico	Baixa pressão	Qualidade de efluente insuficiente
Nanofiltração	Físico	Separação de compostos orgânicos de baixo peso molecular e íons mono e divalentes, hidrolisados de corantes têxteis reativos, auxiliares de tingimento	Alta pressão, acúmulo de sólidos dissolvidos.
Flotação	Físico	Remove 90% da cor e 40% DQO; baixo custo; compacto.	Descarte do material retido
Lodo ativado	Biológico	Redução DQO e N.	Alto valor de DQO, N, cor e surfactantes no resíduo.
Sequência anaeróbica/aeróbica	Biológico	Redução da DQO, cor e tóxicos.	Grande quantidade de resíduo de cor e DQO
Leito fixo	Biológico	Redução da DQO e cor.	
Fungos/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Biológico	Total descoloração.	Possível formação de produtos mais tóxicos

FONTE: adaptado de VANDEVIVERE, BIANCHI E VERSTRAETE, 1998; SANTOS, CERVANTES e LIER, 2007; LATIF, 2010 e WANG *et al.*, 2011.

NOTA: DQO - demanda química de oxigênio, N – nitrogênio

## 2.4 BIODEGRADAÇÃO E FUNGOS LIGNOLÍTICOS

O processo de biodegradação consiste na transformação de poluentes por diferentes organismos (plantas, algas, bactérias, leveduras e fungos) em metabólitos inócuos, passíveis de serem introduzidos no fluxo normal de nutrientes na natureza. Quando a biodegradação é completa resulta na formação de gás carbônico e de água, o processo é chamado de mineralização (KAUSHIK e MALIK, 2008).

A utilização de fungos lignolíticos, ou decompositores de madeira, em processos de biodegradação tem despertado grande interesse, devido à produção de uma diversidade de enzimas que atuam sobre múltiplos substratos de origem industrial. Os fungos decompositores de madeira podem ser classificados em três grupos ecofisiológicos (Tabela 2): causadores da decomposição branca (*White-rot fungi*), parda (*Brown-rot fungi*) e macia (*Litter-rot fungi*). Os fungos da decomposição branca são únicos em sua habilidade em degradar e mineralizar todos os componentes da lignocelulose e, como consequência, são os organismos mais eficientes na biodegradação de poluentes (POINTING, 2001; WESENBERG, KYRIAKIDES e AGATHOS, 2003; BALDRIAN, 2006; ELISASHVILI e KACHLISHVILI, 2009; STRONG e CLAUS, 2011). A habilidade dos fungos de decomposição de madeira, na degradação de lignocelulose e biodegradação de poluentes, é decorrente da produção de uma gama de enzimas envolvidas na degradação da lignina, denominadas enzimas modificadoras de lignina (LMEs, *lignin modifying enzymes*)

Muitos fungos lignolíticos têm sido avaliados em processos de biodegradação de xenobióticos, entre eles espécies dos gêneros *Phanerochaete*, *Schizophyllum*, *Lentinus*, *Ganoderma*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Botryosphaeria* e *Corioloropsis* (SWAMY e RAMSAY, 1999; JOHANNES e MAJCHERCZYK, 2000; DEKKER *et al.*, 2007; ASGHER *et al.*, 2008; TORRES-DUARTE *et al.*, 2009; PATRICK *et al.*, 2011). O fungo *Phanerochaete chrysosporium* é um dos mais exaustivamente estudados. Este apresenta a capacidade de degradar corantes pertencentes a várias classes químicas (GLENN e GOLD, 1983; PASZCZYNSKI *et al.*, 1992; SPADARO, GOLD e RENGANATHAN, 1992; OLLIKKA *et al.*, 1993; SHAHVALI *et al.*, 2000; ASSADI *et al.*, 2001; CING *et al.*, 2003; CRIPPS, BUMPUS e AUST, 2004; FARACO *et al.*, 2009) e atua sobre vários outros compostos químicos

como polímeros sintéticos, compostos aromáticos clorinados, explosivos, pesticidas, compostos aromáticos policíclicos, azida, tetracloreto de carbono e cianetos (revisado em CAMERON, TOMIFEEVSKI e AUST, 2000).

TABELA 2- CLASSIFICAÇÃO DOS FUNGOS DA DECOMPOSIÇÃO DA MADEIRA

Grupo	Filo	Alteração na molécula de lignina	Ambiente	Alguns gêneros
Fungos de decomposição de madeira	Basidiomicetos, (Ascomicetos)	Mineralização da lignina	Principalmente madeira dura	<i>Phanerochaete, Phlebia, Trametes, Lentinus</i>
Fungos de decomposição parda	Basidiomicetos	Degradação/ Modificação parcial da lignina	Principalmente madeira mole	<i>Poria, Polyporus</i>
Fungos de decomposição macia	Ascomicetos, fungos amorfos (alguns basidiomicetos)	Degradação de lignina	Ambientes aquáticos, madeira com umidade elevada, serapilheira	<i>Chaetomium, Paecilomyces, Fusarium, Lepista</i>

FONTE: adaptado de Tuomela *et al.*, 2000

## 2.5 ENZIMAS MODIFICADORAS DE LIGNINA - LMEs

As LMEs são oxidoredutases de baixa especificidade envolvidas na degradação e mineralização da lignina, o que as torna capazes de atuar sobre um amplo espectro de organopoluentes persistentes com similaridade estrutural com a molécula de lignina, ou seja, com arranjos complexos entre anéis aromáticos (Figura 1). Os principais membros das LMEs são as Lacases (Lac), Manganês Peroxidases (MnP) e Lignina Peroxidases (LiP) (WESENBERG, KYRIAKIDES e AGATHOS, 2003). A tabela 3 lista as principais características das LMEs.

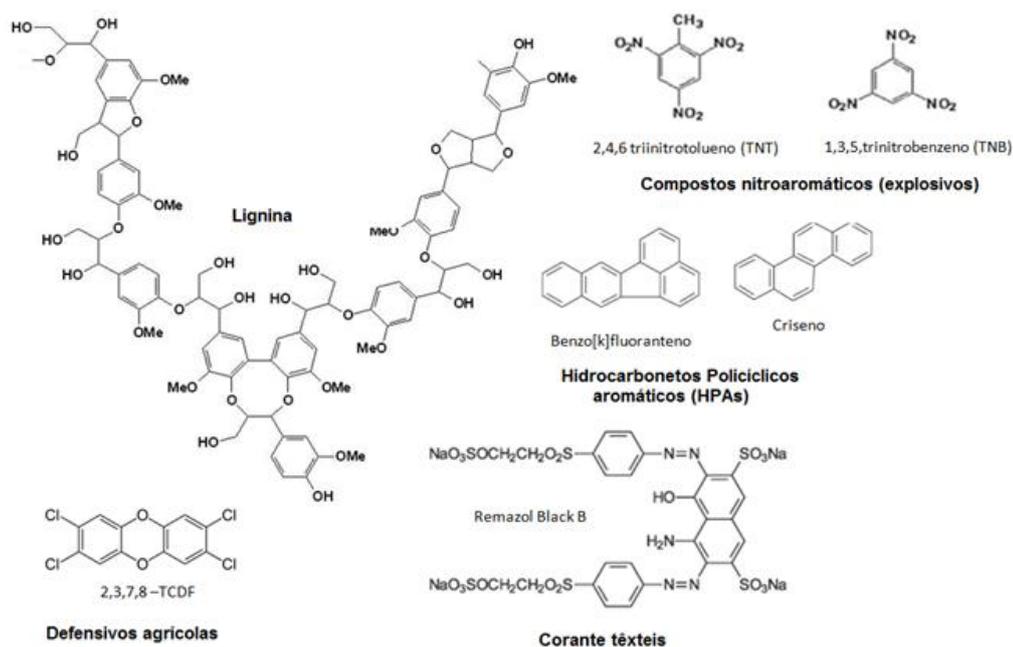


FIGURA 1 – ESTRUTURAS REPRESENTATIVAS DA MOLÉCULA DE LIGNINA E DE ALGUNS SUBSTRATOS POLUENTES. TCDF: Tetraclorodibenzeno-p-dioxina. Fonte: NIEBISCH, 2009.

TABELA 3 – COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES DAS LMEs PROVENIENTES DE FUNGOS DE DECOMPOSIÇÃO DE MADEIRA

Enzima	MnP	LiP	Lac
E.C.	1.11.1.13	1.11.1.14	1.10.3.2
Grupo Prostético	Heme	Heme	1-4 centros de cobre
Massa molar (kDa)	32 – 122	38-47	59–110
Glicosilação	N-	N-	N-
Isoformas	Monômeros	Monômeros	mono, di, tetrâmeros
pI	2,8 – 7,2	3,2-4,7	2,6-4,5
Faixa ótima de pH	2,6 – 4,5	2,0-5,0	2,0-8,5
Quebra de ligações C-C	Sim	Sim	Sim *
Regulação por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sim	Sim	Não
Mediadores nativos	Mn <sup>+2</sup> e Mn <sup>+3</sup>	Álcool veratril; 2 Cl-1,4 DMB	3-HAA
Especificidade	Mn <sup>+2</sup>	Anéis aromáticos incluindo não fenólicos	Anéis aromáticos fenólicos
Mediadores secundários naturais e sintéticos	Tióis e ácidos graxos insaturados	---	Vários

FONTE: adaptado de WESEBERG, KYRIAKIDES E AGATHOS, 2003

NOTA: MnP: manganês peroxidase; LiP: lignina peroxidase; Lac: lacase; \* MADHADI e LELE, 2009; 2 Cl-1,4 DMB: 2-cloro-1,4-dimetoxibenzeno; 3-HAA: ácido 3-hidroxiantranílico.

A degradação da lignina, bem como de xenobióticos recalcitrantes, é um processo complexo de oxidação, redução, metilação e hidroxilação. Além das LMEs, uma completa degradação da lignina requer várias enzimas auxiliares, tanto para a completa mineralização dos monômeros a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , quanto para a geração de metabólitos secundários que suportam a ação das enzimas extracelulares. Um importante componente do sistema lignolítico é o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que é um dos substratos em reações de peroxidação. Entre as enzimas extracelulares que participam da produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , encontra-se a glioxal oxidase, a aril álcool oxidase, a glucose-1-oxidase e a glucose-2-oxidase (BOURBONNAIS e PAICE, 1988; ERIKSSON *et al.*, 1986; ZHAO e JANSE, 1996; CULLEN e KERSTEN 2004).

## 2.6 Lacases fúngicas

### 2.6.1 Características gerais das lacases

As lacases (EC 1.10.3.2) pertencem à família das proteínas multicobre oxidases (MCO) que realizam a oxidação dos substratos acoplada à redução de oxigênio a água (SIRIM *et al.*, 2011). As lacases (benzenediol: oxigênio oxidoreductase) fúngicas são, em sua maioria, glicoproteínas monoméricas, mas algumas podem ser encontradas como estruturas homodiméricas, heterodiméricas ou até mesmo oligoméricas. Os monômeros de lacase podem variar em massa molecular de 42 a 383 kDa (BALDRIAN, 2006). Porém, a maioria apresenta, em gel de eletroforese desnaturante (SDS-PAGE), mobilidade correspondente a massas moleculares de 60-100 kDa, da qual 10-50% pode ser atribuída a glicosilação. Em lacases, a glicosilação está envolvida na secreção, resistência a proteólise, atividade, retenção de cobre e estabilidade térmica (MADHADI e LELE, 2009).

Estas enzimas podem ser extracelulares ou intracelulares, dependendo de sua função, mas são encontradas principalmente em ambiente extracelular (RIVA, 2006; MADHADI e LELE, 2009). Em fungos, as funções biológicas das lacases no meio extracelular incluem deslignificação, degradação de ácidos húmicos e detoxificação. Intracelularmente, as lacases estão associadas à polimerização de

precursores de melanina, morfogênese e esporulação e ao crescimento e desenvolvimento do micélio (DWIVEDI *et al.*, 2011; STRONG e CLAUS, 2011).

Durante o ciclo catalítico das lacases, ocorre a redução de um oxigênio molecular a duas moléculas de água e a concomitante oxidação de quatro moléculas de substrato para produzir quatro radicais livres, como demonstrado na Figura 2 (THURSTON, 1994; RIVA, 2006). Os monômeros de lacase geralmente requerem quatro íons de cobre para a atividade catalítica funcional, e estes são divididos em três tipos: um cobre Tipo 1 (T1), um cobre Tipo 2 (T2) e dois cobres Tipo 3 (T3). O cobre T1 é o sítio onde ocorre a oxidação do substrato e confere a típica coloração azul para proteínas multicobre oxidases. Os cobres T2 e T3 formam um arranjo trinuclear no qual o oxigênio molecular é reduzido à água, T2 transfere elétrons para o acceptor final, o oxigênio, enquanto o T3 age como intermediário na transferência de elétrons (BALDRIAN, 2006; DWIVEDI *et al.*, 2011; STRONG e CLAUS, 2011). A transferência de elétrons do substrato para o cobre T1 é controlada por diferenças de potencial de óxido-redução (MADHADI e LELE, 2009). As lacases conseguem oxidar somente compostos com potencial redox menor ou próximo ao do cobre T1 (MADHADI e LELE, 2009).

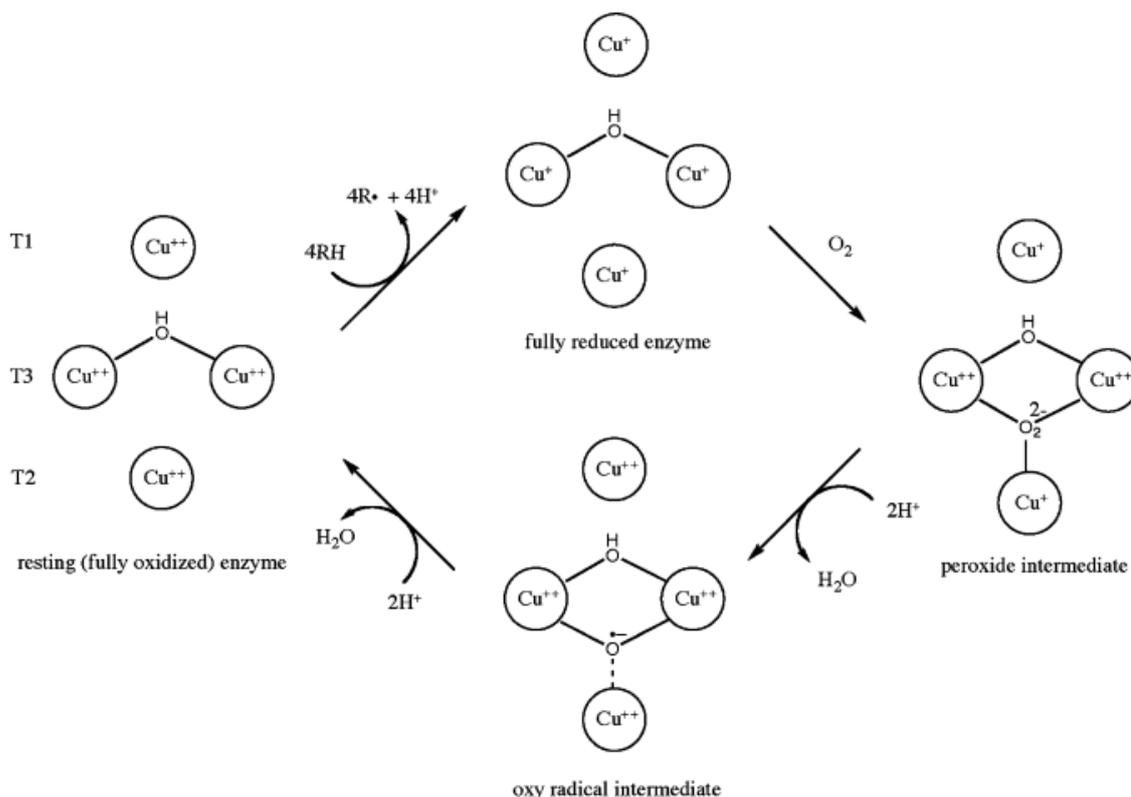


FIGURA 2 – CICLO CATALÍTICO DA ENZIMA LACASE  
 FONTE: WONG, 2009

Mais de cem lacases de fungos (ascomicetos e basidiomicetos) tem sido purificadas e caracterizadas e este número continua aumentando (STRONG e CLAUS, 2011). As máximas atividades de lacase são encontradas, geralmente, em temperaturas que variam entre 25 ° e 70 °C (BALDRIAN, 2006; STRONG e CLAUS, 2011). Além disso, as lacases tipicamente apresentam maior atividade e maior estabilidade em valores de pH ácidos, na faixa entre pH 3 e 6 (BOLLAG e LEONOWICZ, 1984; WESENBERG, KYRIAKIDES e AGATHOS, 2003; STRONG e CLAUS, 2011). A especificidade e a afinidade das lacases por seus substratos variam com a fonte da enzima e com o pH do meio reacional. Em substratos cuja oxidação envolve troca de prótons (como no ferrocianeto), a atividade de lacase geralmente diminui com o aumento do pH, já quando a oxidação não envolve troca de prótons (como em fenóis) o pH ótimo depende da fonte de lacase (DWIVEDI *et al.*, 2011).

Estudos cinéticos já foram realizados em lacases presentes em extratos brutos solúveis (ZILLY *et al.*, 2011; JUNIOR *et al.*, 2012) e lacases purificadas (MUÑOZ *et al.* 1997; MIN *et al.*, 2001 e BALDRIAN, 2004). O ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotriazolina-6-sulfônico) é um dos substratos mais utilizados para a avaliação da atividade destas enzimas (SRINIVASAN *et al.*, 1995). Difenóis simples, como hidroquinona e catecol, são bons substratos para a maioria das lacases, porém guaiacol e 2,6 dimetoxifenol são frequentemente melhores (MADHADI e LELE, 2009). Os substratos mais avaliados, no que diz respeito aos parâmetros cinéticos, são ABTS ( $K_m$  entre 4 e 770  $\mu\text{M}$ ), 2,6-dimetoxi fenol (2,6-DMP:  $K_m$  entre 26 e 14720  $\mu\text{M}$ ), guaiacol ( $K_m$  entre 4 e 30000  $\mu\text{M}$ ) e siringaldazina ( $K_m$  entre 3 e 4307  $\mu\text{M}$ ) (BALDRIAN, 2006).

### 2.6.2 Efeito das condições de cultivo na produção de lacase

A síntese e a secreção das lacases são influenciadas por níveis de nutrientes, condições de cultura, estágio de desenvolvimento do fungo, bem como pela adição de uma ampla gama de indutores ao meio de cultivo. A influência de cada um destes itens na produção de lacase é variável entre diferentes espécies fúngicas, bem como entre diferentes isoformas produzidas pela mesma linhagem

(PISCITELLI *et al.*, 2011). A maioria dos fungos de decomposição de madeira secreta mais de uma isoforma de lacase (HOSHIDA *et al.*, 2001). Além disto, diferentes padrões de glicosilação podem gerar variantes pós-traducionais (STRONG e CLAUS, 2011). A adição de cobre, açúcares, aminoácidos, etanol e vários compostos fenólicos pode induzir a produção de isoenzimas adicionais no meio de cultivo (DEKKER *et al.*, 2007; STRONG e CLAUS, 2011).

#### 2.6.2.1 Fontes de carbono, nitrogênio e agitação

As fontes de carbono e nitrogênio no meio de crescimento de fungos de decomposição de madeira afetam a quantidade e o tipo de enzimas degradadoras de lignina produzidas (D'SOUZA-TICLO *et al.*, 2006). Estas enzimas são, frequentemente, expressas em diferentes combinações, isoformas e concentrações, de acordo com as condições de cultivo (WESENBERG, KYRIAKIDES e AGATHOS, 2003; GIANFREDA e RAO, 2004).

Alguns estudos indicam maior produção de lacase em meios de cultura contendo baixos teores de carbono, como observado para os fungos *Ganoderma* sp., *Schizophyllum commune* e *Pleurotus ostreatus* (HOU *et al.*, 2004; ASGHER *et al.*, 2008; SIVAKUMAR *et al.*, 2010). Contudo, esta não é uma característica geral compartilhada. Níveis elevados de atividade de lacase podem ser obtidos com a suplementação com fontes de carbono de fácil absorção ou que regulem diretamente a expressão dos genes de lacase (ELISASHVILI e KACHLISHVILI, 2009; PISCITELLI *et al.*, 2011). Altas concentrações de glucose como fonte de carbono (superiores a 10 g/L) elevam a produção de lacase em *Trametes trogii*, *Morchella crassipes*, *Pleurotus sajor-caju* (KANWAL e REDDY, 2011; STRONG, 2011; PATRICK, 2011). Da mesma maneira, alterações observadas na atividade de lacase em resposta a diferentes fontes e concentrações de nitrogênio são particulares para cada fungo. Exemplos de aumento da atividade têm sido descritos, tanto em condições limitantes (HOU *et al.*, 2004; PATRICK *et al.*, 2011) quanto em condições não limitantes de nitrogênio (SRINIVASAN *et al.*, 1995; LEVIN, FORCHIASSIN e RAMOS, 2000; COVINO *et al.*, 2010). A fonte de nitrogênio presente no meio de cultivo pode alterar tanto a quantidade de enzima produzida,

quanto o número de polipeptídeos com atividade de lacase (D'SOUZA-TICLO *et al.*, 2006). As condições de cultivo associadas à maior produção de lacase devem, portanto, ser estabelecidas para cada novo isolado avaliado (ELISASHVILI e KACHLISHVILI, 2009).

A agitação também é uma variável importante para a expressão de lacase: melhora a transferência de oxigênio e a distribuição de nutrientes em comparação a culturas estáticas. Por outro lado, pode diminuir o crescimento do fungo, devido ao estresse mecânico e, com isso, acarretar em redução da produção de lacase (HOU *et al.*, 2004; NOVOTNÝ *et al.*, 2004; HUSSEINY, 2008; KAUSHIK e MALIK, 2008; SINGH e CHEN, 2008; TRIPATHI, UPADHYAY e SINGH, 2011).

#### 2.6.2.2 Efeito de indutores na produção e atividade de lacase

Uma das mais efetivas estratégias para aumentar a produção de lacase é a suplementação do meio de cultivo com indutores apropriados, principalmente compostos aromáticos e cobre. A presença de cobre no meio de cultivo pode aumentar a atividade de lacase por três mecanismos principais. Primeiro, a presença deste no meio de cultivo é imprescindível para a produção de enzimas que contém cobre em sua estrutura. Segundo, este íon induz a transcrição do gene da lacase (HATVANI e MÉCS, 2002; BALDRIAN, 2003; HOSHIDA *et al.*, 2005). Finalmente, o cobre também pode acarretar uma redução na atividade proteolítica do meio extracelular e auxiliar na manutenção da atividade de lacase. Além do cobre, íons manganês também podem modular a transcrição do gene de lacase (SCHEEL *et al.*, 2000; BALDRIAN, 2003; PISCITELLI *et al.*, 2011). A presença de íons manganês e cobre elevou a produção de lacase nos fungos *Ganoderma sp.* e *P. ostreatus* (SIVAKUMAR *et al.*, 2010; POZDNYAKOVA *et al.*, 2011). Em contrapartida, em algumas outras espécies estes íons não alteraram ou até mesmo causaram inibição na produção de lacase (GEDIKLI *et al.*, 2010, STRONG *et al.*, 2011).

Compostos fenólicos e aromáticos estruturalmente relacionados com a lignina podem ser adicionados ao meio de cultivo para aumentar a produção de lacase. O efeito indutor destas substâncias ocorre em nível transcricional, mas o efeito é particular para cada espécie fúngica. O efeito de cada composto aromático

sobre a produção de lacase foi determinado, ainda, pela sua interferência na fisiologia fúngica como, por exemplo, no crescimento e na esporulação. Tem sido descritos elementos de resposta a íons metálicos, compostos aromáticos, estresse oxidativo, entre outros, nas regiões promotoras de diferentes genes de lacase (PISCITELLI *et al.*, 2011). A indução depende também do tempo de adição do composto ao cultivo, da estrutura molecular do composto e da concentração do composto (DEKKER *et al.*, 2007; STRONG, 2011). Altas concentrações de compostos aromáticos no meio de cultivo podem afetar negativamente o crescimento fúngico se o estado fisiológico do micélio não se adaptar à presença do composto (PISCITELLI *et al.*, 2011). Vários compostos fenólicos naturais, derivados da estrutura da lignina, induzem a produção de lacases, dentre eles: ácido gálico, ácido ferúlico, guaiacol, álcool veratril, veratraldeído, catecol, p-anisidina, vanilina e ácido vanilínico (MUÑOS *et al.*, 1997; CAVALLAZZI, KASUYA e SOARES, 2005; BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2010; GALHAUP *et al.*, 2002; NILADEVI E PREMA, 2008; DAWKAR *et al.*, 2009).

Compostos xenobióticos, como defensivos agrícolas (MOUGIN, KOLLMANN e JOLIVALT, 2002), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (POZDNYAKOVA *et al.*, 2011), herbicidas (COELHO *et al.*, 2010) e corantes têxteis (D'SOUZA *et al.*, 2006) podem induzir a produção de lacase. O etanol também pode causar um aumento na produção de lacases. Existem três hipóteses a respeito do papel do etanol, sendo elas: (i) o aumento da permeabilidade de membrana e promoção da secreção de proteínas; (ii) inibição da formação da melanina e consequente aumento de monômeros fenólicos; e (iii) indução do estresse oxidativo (LOMASCOLO *et al.*, 2003; MEZA, *et al.*, 2007; GOMAA, 2012).

### 2.6.2.3 Efeito de mediadores redox na atividade de lacase

Durante a degradação da lignina, metabólitos fúngicos e alguns intermediários do processo de biodegradação atuam como mediadores de oxido-redução. A presença destes compostos torna possível a oxidação de compostos aromáticos não fenólicos (que representam mais de 80% da estrutura de lignina) pelas lacases, fato especialmente importante em fungos de decomposição de

madeira, que secretam lacase como a principal ou única enzima lignolítica (CAÑAS e CAMARERO, 2010). Além disto, a interação direta e específica entre a lignina e as lacases é dificultada pelo tamanho, tanto da enzima quanto da lignina. Uma vez oxidadas pela enzima, estas moléculas são capazes de oxidar outros compostos que, em princípio, não seriam substratos alvo para as lacases, devido ao impedimento estérico (Figura 3) (HAMMEL, 1996; VAN AKEN e AGTHOS, 2001; VAN AKEN e AGTHOS, 2002; CAMARERO *et al.*, 2005; HUSSAIN e HUSSAIN, 2008).

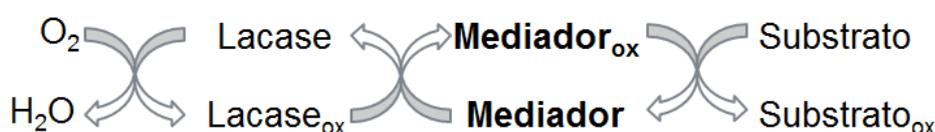


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ATIVIDADE CATALÍTICA DE LACASE NA PRESENÇA DE MEDIADORES  
 FONTE: O autor, 2013.

O ABTS foi o primeiro mediador redox de lacase descrito, após este, vários outros mediadores sintéticos foram encontrados, dentre eles, HBT (1-hidroxibenzotriazol), VIO (ácido violúrico), HPI (N-hidroxiftalimida), HNA (N-hidroxiacetanilida) e o radical TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-piperidin-N-oxil) e seus derivados (CAMARERO, *et al.*, 2005; ARENDS *et al.*, 2006; KUNAMNENI *et al.*, 2008a; CAÑAS e CAMARERO, 2010). A toxicidade e o alto custo destes mediadores são fatores limitantes em aplicações industriais, o uso de mediadores naturais representa uma alternativa na redução de custos, além de apresentar vantagens ambientais em relação aos mediadores sintéticos (CAMARERO, *et al.*, 2005; BALDRIAN, 2006; CAÑAS e CAMARERO, 2010). Estes mediadores naturais são, em sua maioria, compostos derivados da molécula da lignina. Em alguns casos, a eficiência catalítica de sistemas contendo estes mediadores naturais é similar àquela obtida para sistemas com mediadores sintéticos (BIBI e BHATTI, 2002; NOUSIAINEN *et al.*, 2009; DÍAZ-GONZALES, VIDAL e TZANOV, 2010; BIBI, BHATTI e ASGHER, 2011). Dentre as substâncias descritas como mediadores naturais encontram-se: anilina, ácido 4-hidroxibenzóico, álcool 4-hidroxibenzil, álcool veratril, veratraldeído, ácido vanílico, 2,5 xilidina, ácido ferúlico, guaiacol, catecol, *p*-anisidina, ácido gálico, 2,6 dimetoxifenol, ácido *p*-coumárico, vanilina, acetovanilona,

metilvanilato, acetosiringona e siringaldeído (MUÑOS *et al.*, 1997; CAMARERO *et al.*, 2005; CAVALLAZZI, KASUYA e SOARES, 2005; KUNAMNENI *et al.*, 2008a; NILADEVI E PREMA, 2008; DAWKAR *et al.*, 2009; BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2010; GALHAUP *et al.*, 2002).

### 2.6.3 Características do gene de lacase

A maioria dos fungos de decomposição de madeira secreta mais de uma isoforma de lacase (HOSHIDA *et al.*, 2001) e estas são codificadas por famílias complexas de genes estruturalmente relacionados e com grande proximidade filogenética (CULLEN *et al.*, 1997). As sequências da maioria dos genes de lacases descritas codificam para polipeptídeos de aproximadamente 500 a 619 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal aminoterminal de 20 aminoácidos (KUNAMNENI *et al.*, 2008b; MADHADI e LELE, 2009; JANUSZ *et al.*, 2013). As diferentes lacases têm baixa similaridade no que diz respeito à sequência de aminoácidos, porém as quatro regiões de ligação ao cobre são bem conservadas (THURSTON, 1994; CULLEN *et al.*, 1997).

As regiões promotoras em genes de lacase contém sequências TATA *box* (necessárias para início da transcrição), pelo menos um motivo CAAT (controle da transcrição) e regiões ricas em pirimidinas (CG) típicas de promotores fúngicos fortes. A expressão das lacases é modulada por múltiplos fatores, tais como fontes de carbono e nitrogênio, íons metálicos e xenobióticos. A sensibilidade a cada um destes fatores é determinada pela presença de sequências de nucleotídeos específicas, chamadas de elementos de resposta, que são reconhecidas por proteínas cuja atividade pode ser modulada por diversos fatores externos e internos. Alguns promotores podem conter elementos que participem do mecanismo de resposta a metais (MRE – *metal responsive elements*), a xenobióticos (XRE – *xenobiotic responsive element*), a temperatura (HSE – *heat shock responsive element*) ou a estresse oxidativo (ARE – *antioxidante response element*). Da mesma forma, elementos regulatórios sensíveis ao teor de carbono (CreA, Mig) e nitrogênio (NIT2) já foram descritos (GALHAUP *et al.*, 2002; COLAO *et al.*, 2003; XAIO *et al.*, 2006; JANUSZ *et al.*, 2013). A regulação da expressão do gene de lacase é complexa, devido à variável sensibilidade de cada elemento de resposta, do número

de cópias e da localização ou orientação dos elementos de resposta na sequência gênica (PISCITELLI *et al.*, 2011).

Recentemente, foi lançado o banco de dados de proteínas lacase e multicobre oxidases, denominado *LccED* (*The Laccase and Multicopper Oxidase Engineering Database*), a fim de coletar e gerenciar os dados moleculares referentes à diversa família de proteínas MCO. No *LccED*, mais de 2.200 proteínas de fungos, bactérias, insetos e plantas foram classificadas em 11 superfamílias e 56 famílias. Para cada família, este banco de dados fornece alinhamentos de sequências múltiplas, árvores filogenéticas, perfis família-específicos e estruturas tridimensionais de diversas proteínas. De acordo com Sirim (2011), o *LccED* serve como um instrumento de classificação para atribuir novas proteínas homólogas a uma família, e pode ser aplicado para investigar a relação sequência-estrutura-função e para orientar a engenharia de proteínas. O *LccED* está disponível ao público no endereço <http://www.lcced.uni-stuttgart.de>.

## 2.7 ANTECEDENTES DOS MICRORGANISMOS UTILIZADOS

### 2.7.1 *Lentinus crinitus*

A espécie fúngica *Lentinus crinitus* é classificada, segundo o “Catalogue of life: Annual Checklist – 2008”, em Filo Basidiomycota; Classe Basidiomycetes; Ordem Polyporales; Família Polyporaceae. Apresenta distribuição pantropical (regiões tropicais de África, Ásia nas Américas) e neotropical (América Central, o sul da Florida, ilhas do Caribe e a América do Sul) (SILVA e GIBERTONI, 2006; BRASIL, 2012). Este gênero encontra-se entre as espécies mais observadas em fragmentos remanescentes de floresta atlântica, principalmente em clareiras com incidência direta de luz (GOÉS-NETO *et al.*, 2003).

O gênero *Lentinus* é composto por cogumelos comestíveis e pertence ao grupo ecofisiológico dos fungos de decomposição de madeira (Figura 4), apresentando, portanto capacidade de produzir LMEs. Algumas espécies deste gênero são bem relatadas na literatura, principalmente *L. edodes* e *L. tigrinus*, porém

para *L. crinitus* a literatura é escassa. Diferentes espécies e linhagens deste gênero estão descritas por serem capazes de degradar diferentes poluentes como óleo cru (ADENIPEKUN e FASIDI, 2005), pentaclorofenóis (MACHADO *et al.*, 2006), DDT (VAN CHUNG *et al.*, 2009), trinitrotolueno (SAMSON *et al.*, 2008) e alguns corantes têxteis (MINUSSI *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2009), assim como pela produção de diferentes enzimas modificadoras de lignina (BUSWELL, CAI e CHANG, 1995; OKINO *et al.*, 2000; AGGELIS *et al.*, 2002; HATVANI e MECS, 2002; FENICE *et al.*, 2003; BOER *et al.*, 2004; ELISASHVILI, KACHLISHVILI e PENNINGCKX, 2008; GOMES *et al.*, 2009; NETO, MATHEUS e MACHADO, 2009; COVINO *et al.*, 2010). Relatos pontuais descrevem a produção de LiP e MnP por *L. crinitus*, em meios contendo resíduos agrícolas como cana de açúcar e casca de banana (MACHADO, MATHEUS e BONONI, 2005; GRANDA *et al.*, 2005). A atividade de lacase tem sido reportada em meios contendo solo contaminado com organoclorados (MACHADO, MATHEUS E BONONI, 2005) e usando cana de açúcar e farinha de soja como fontes de energia (BALLAMINUT E MATHEUS, 2007).



FIGURA 4 – FUNGO *Lentinus crinitus*

FONTE: Disponível em: [http://mushroomobserver.org/name/show\\_name/26820](http://mushroomobserver.org/name/show_name/26820). Acessado em: 15/01/2013.

Segundo os dados obtidos anteriormente no laboratório de Biodegradação da UFPR, *L. crinitus* secreta, tanto em meio sólido quanto líquido, a enzima responsável pela descoloração do corante têxtil Reactive Blue 220 (RB220). As frações eluídas do meio sólido apresentam atividade elevada em uma ampla faixa de temperatura, pH e força iônica. A única enzima lignolítica detectada nas frações descorantes foi uma lacase com massa molar de cerca de 41 kDa, portanto, é

possível que esta enzima seja responsável pela atividade de descoloração (NIEBISCH, 2009).

### 2.7.2 *Lepista sordida*

O fungo *Lepista sordida* é um cogumelo comestível de coloração lilás-esbranquiçada (Figura 5), classificado, segundo o “Catalogue of life: Annual Checklist – 2008”, como pertencente ao Filo Basidiomycota; Classe Basidiomycetes; Ordem Agaricales; Família Tricholomataceae. É uma espécie saprófita (decompositor de serapilheira) que frutifica nas pastagens, prados, bordas de trilhas de florestas caducifólias e coníferas (SULZBACHER *et al.*, 2007). No Brasil, encontra-se nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo (SULZBACHER *et al.*, 2007).



FIGURA 5 – FUNGO *Lepista sordida*

FONTE: Disponível em: <http://www.agraria.org/funghi/lepistasordida.htm>. Acessado em: 15/01/2013.

Algumas espécies pertencentes a este gênero têm alto valor nutricional, além de possuírem propriedades antitumorais, antibacterianas e antioxidantes (GAITÁN-HERNÁNDEZ e RODRÍGUEZ, 2008). O gênero *Lepista* pertence ao grupo eco-fisiológico dos fungos de decomposição macia, os quais apresentam capacidade de secretar um espectro de enzimas oxidativas similar àquele produzido pelos fungos decomposição branca (VALÁŠKOVÁ *et al.*, 2007). Contudo, relatos a respeito da produção de enzimas lignolíticas e a utilização destes fungos em processos de biodegradação são escassos. Neste contexto, as espécies mais

estudadas são *Lepista nuda* e *Lepista nebularis*. Estas duas espécies tem sido descritas como produtoras de LMEs (TOUMELA *et al.*, 2005; EICHLEROVÁ *et al.*, 2006; ERDEN *et al.*, 2009) e avaliadas quanto a capacidade de degradação de poluentes como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, corantes têxteis e compostos nitro aromáticos (SCHEIBNER *et al.*, 1997; OKINO *et al.*, 2000; STEFFEN, HATAKKA e HOFRICHTER, 2002; ERDEN *et al.*, 2009). A espécie *L. sordida* produz manganês peroxidase e lacase (CAVALLAZZI, OLIVEIRA e KASUYA, 2004).

Dados preliminares indicam que *L. sordida* descora o corante RB220, tanto em meio sólido quanto em meio líquido (NIEBISCH, 2009). Os extratos provenientes de culturas líquidas apresentam grande atividade em temperaturas de 20 a 70 °C, valores de pH entre 2,5 e 8 e concentrações de sal entre 0,05 e 0,4 M.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

O presente trabalho foi dividido em duas partes: (i) a avaliação do efeito de diferentes parâmetros na expressão de enzimas envolvidas na degradação de corantes a partir de culturas dos fungos *Lentinus crinitus* e *Lepista sordida*, assim como a caracterização da atividade descorante produzida e (ii) a determinação da sequência primária parcial do gene de lacase de *L. crinitus*.

Com relação à caracterização da atividade descorante (Figura 6A), foi verificado o efeito da alteração de parâmetros de cultivo na produção de enzimas responsáveis pela descoloração, quanto a fonte de carbono e nitrogênio, a suplementação com cobre e manganês, o efeito do pH, da temperatura e da agitação. Na sequência, foi avaliada a produção de enzimas lignolíticas e da atividade de descoloração ao longo do tempo. A seguir, foi verificada a atividade descorante e estabilidade do extrato frente a diferentes temperaturas, valores de pH e concentrações de sal, bem como o efeito de íons metálicos e inibidores de lacase na descoloração. O potencial de descoloração dos extratos solúveis destas cepas também foi testado frente a vários corantes e banhos de tingimento provenientes da indústria têxtil. Em paralelo, foi analisado o efeito de mediadores redox na descoloração destes substratos, bem como o efeito de indutores de lacase na produção de atividade da enzima.

Na segunda parte do trabalho, foi determinada a estrutura primária parcial do gene de lacase, enzima responsável pela descoloração dos substratos de *L. crinitus* (Figura 6B). Para isso, o DNA genômico deste fungo foi utilizado como molde em reações de PCR com *primers* contendo sequências conservadas dos domínios de ligação ao cobre em basidiomicetos. Os produtos de amplificação foram introduzidos em *E. coli* através de um vetor plasmidial e sequenciados. A estrutura primária resultante foi analisada através de buscas de similaridade e identidade, usando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

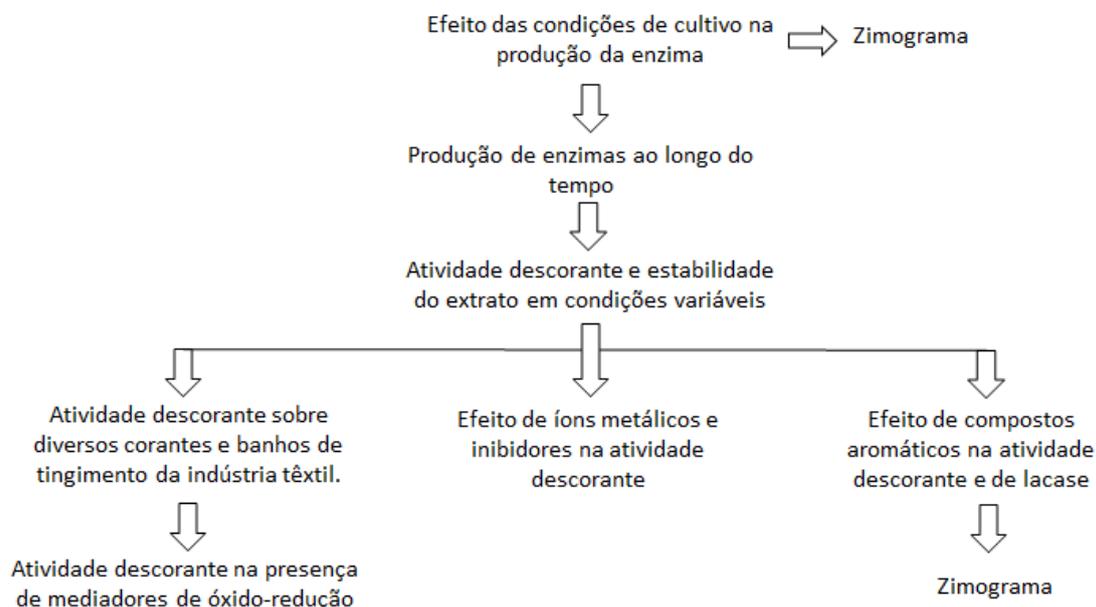
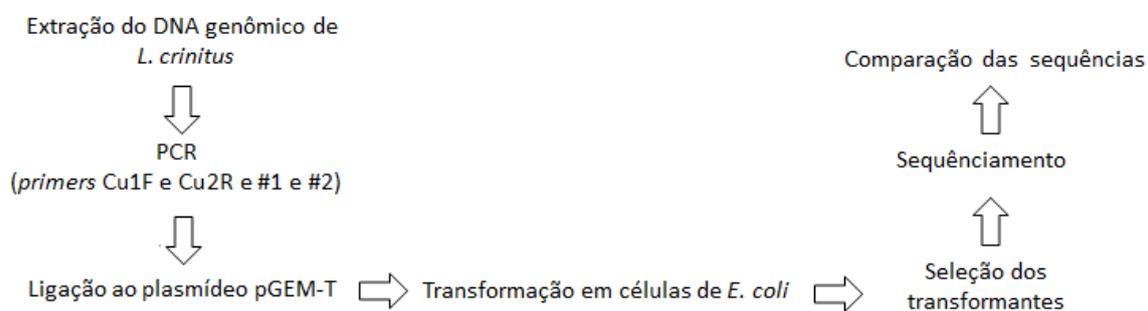
**A****B**

FIGURA 6 – FLUXOGRAMAS EXPERIMENTAIS PARA A CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DESCORANTE DE *L. crinitus* E *L. sordida* (A) E PARA A DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA PARCIAL DO GENE DE LACASE DE *L. crinitus* (B).

## 3.2 ESTUDO DO EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS COM ATIVIDADE DESCORANTE

### 3.2.1 Microrganismos e condições de cultura

A cepa de *L. crinitus* foi isolada no município de Campina Grande do Sul (Paraná) pelos professores Dr. Jaime Paba e Dra. Ruth Schadeck, e sua identificação foi realizada por Andrej de Meijer. A cepa de *L. sordida* foi gentilmente cedida pela prof<sup>a</sup>. Dra. Ruth Schadeck, do laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná. Os fungos *L. crinitus* e *L. sordida* foram depositados na coleção de fungos do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil) sob as denominações IOC4579 e IOC4580, respectivamente.

As linhagens foram mantidas por cultivo seriado em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) a 28 °C no escuro, com repiques a cada 30 dias. Para utilização nos experimentos, os fungos foram pré-cultivados em placas de meio mínimo sólido (MMS) contendo, por litro: NaNO<sub>3</sub> 6,0 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 g; KCl 0,5 g; MgSO<sub>4</sub> 0,5 g; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,01 g; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,02 g; glucose 10,0 g; ágar bacteriológico 10,0 g; pH 6,8. Após 7-10 dias de crescimento nas placas, fragmentos com 4 mm de diâmetro, proveniente das bordas ativas da cultura, foram rotineiramente utilizados para inocular réplicas de cultura em frascos de vidro contendo 5 mL de meio de cultivo previamente autoclavado a 120 °C por 20 min. Para cultivo em meio sólido, o inóculo foi realizado em 5 mL de MMS, já para culturas líquidas o meio utilizado foi MML, que consiste de MMS na ausência de ágar bacteriológico. As culturas foram incubadas por 15 dias na ausência de luz e a 28 °C para todas as análises subsequentes.

### 3.2.2 Preparo dos extratos solúveis e eluídos

Para a coleta das proteínas secretadas pelo fungo provenientes de cultivo em meio sólido, foram realizadas duas extrações de 30 min com 2 mL de meio MS

(MMS na ausência de ágar, fontes de carbono e de nitrogênio), sob 150 rpm de agitação (centrífuga Hsiangtai Machinery Ind. Co. Ltda, modelo *MCD-2000*) e o eluído resultante foi centrifugado a 5.000 rpm durante 5 min e utilizado para as análises subsequentes. Para as culturas líquidas, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi utilizado nos ensaios de descoloração.

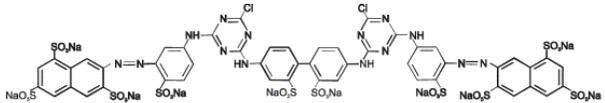
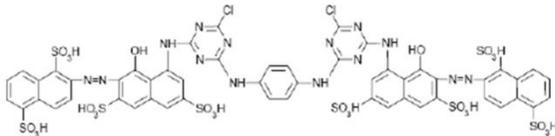
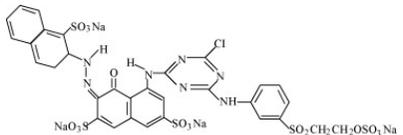
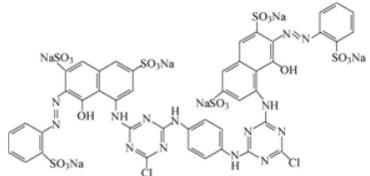
### 3.2.3 Determinação da massa micelial seca

A determinação da massa micelial seca foi realizada para as culturas crescidas em meio líquido. Após centrifugação das culturas a 5.000 rpm por 5 min (centrífuga Hsiangtai Machinery Ind. Co. Ltda, modelo *MCD-2000*), os micélios (pellets) foram lavados com água destilada por duas vezes, filtrados em papel Whatman N°. 1 (previamente seco e pesado). Após incubação em estufa a 60 °C por 12 h a biomassa seca foi determinada através de nova pesagem.

### 3.2.4 Avaliação da atividade descorante

Os comprimentos de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) de cada corante foram obtidos através de análise de espectros de varredura (200 a 800 nm) de soluções aquosas contendo 0,1 g/L de corante. O corante Reactive Blue 220 (RB220) foi utilizado como modelo para os ensaios. Os valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  obtidos para os corantes têxteis e de uso em laboratório estão descritos na tabela 4.

TABELA 4 - ESTRUTURAS, CLASSIFICAÇÃO E COMPRIMENTO DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO VISÍVEL ( $\lambda_{max}$ ) DOS CORANTES TÊXTEIS E DE LABORATÓRIO UTILIZADOS PARA ENSAIOS DE ATIVIDADE DESCORANTE.

Nome Comercial	Nome C.I.	Sigla	$\lambda_{max}$ (nm)	Classificação modo de aplicação/química	Estrutura
Amarelo HE4R	Reactive Yellow 84	RY84	420	Reativo/ diazo	 <span style="float: right;">a</span>
Amarelo HE6G	Reactive Yellow 135	RY135	400	Reativo/azóico	n.d.
Vermelho HE7B	Reactive Red 141	RR141	520	Reativo/ diazo	 <span style="float: right;">b</span>
Vermelho S-Max	--	R-SMax	520	--	n.d.
Vermelho BF 3SR	Reactive Red 195	RR195	540	Reativo/ monoazo	 <span style="float: right;">c</span>
Crimson HEXL	--	C- HEXL	540	--	n.d.
Vermelho HE 3B	Reactive Red 120	RR120	540	Reativo/ diazo, clortriazina	 <span style="float: right;">c</span>
Azul S-Máx	--	B-SMax	600	--	n.d.

CONTINUA NA PROXIMA PAGINA

TABELA 4 – CONTINUAÇÃO

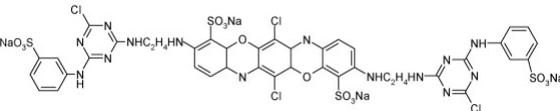
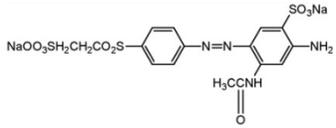
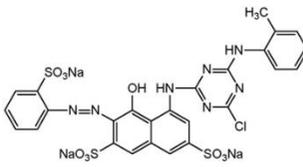
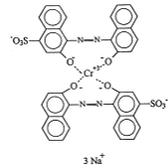
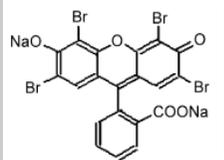
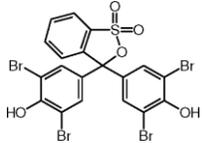
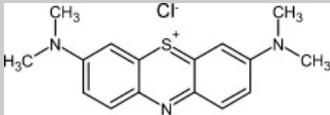
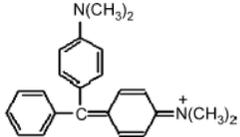
Corantes têxteis	Nome Comercial	Nome C.I.	Sigla	$\lambda_{\max}$ (nm)	Classificação modo de aplicação/química	Estrutura	
	Azul HE GX 145	Reactive Blue 198	RB198	620	Reativo/ monoazo, clorotriazina		d
	Vermelho PF3B	--	R-PF3B	520	--	n.d.	
	Amarelo ouro RNL 150	Reactive Yellow 107	RY107	420	Reativo/ monoazo		e
	Azul Brilhante BB	Reactive Blue 220	RB220	600	Reativo/ Vinilsulfona, antraquinona, monoazo	n.d.	
	Vermelho RB	Reactive Red 198	RR198	520	Reativo/ azo, vinilsulfona		e
	Preto CR 150	Acid Black 194	AB194	560	Ácido/ pré-metalizado	n.d.	
	Marinho CRD 150	Acid Blue 193	AB193	580	Ácido/ pré-metalizado		f

TABELA 4 – CONTINUAÇÃO

	Nome Comercial	Nome C.I.	Sigla	$\lambda_{\max}$ (nm)	Classificação modo de aplicação/química	Estrutura	
Corante de uso em laboratório	Eosina	--	EO	500			g
	Azul de Bromofenol	--	AB	600			h
	Azul de Metileno	--	AM	660			i
	Verde de malaquita	--	VM	600			g

NOTA: n.d.: não disponível; --: não apresenta; <sup>a</sup> NEAMȚU, CATRINESCU e KETTRUP, 2004; <sup>b</sup> KODAM *et al.*, 2005; <sup>c</sup> AKSAKALA e UCUNB, 2010; <sup>d</sup> ARICA e BAYRAMOĞLU, 2007; <sup>e</sup> CHEN *et al.*, 2010; <sup>f</sup> FRANCISCON *et al.*, 2010; <sup>g</sup> ZOOROB e CARUSO 1997; <sup>h</sup> SARMA e DUTTA, 2006; <sup>i</sup> SÁNCHEZ-MARTÍN *et al.*, 2010.

FONTE: O autor, 2013

A atividade descorante dos extratos solúveis fúngicos foi determinada pela mistura de 1 mL do sobrenadante/eluído) com 0,1 mL de meio de sais (MMS na ausência de ágar, carbono e nitrogênio) contendo cada corante à concentração final de 0,1 g/L. Para análise de descoloração de efluentes têxteis, a mistura de reação consistiu de 0,5 mL de efluente e 0,55 mL de sobrenadante.

O consumo do corante no ensaio foi mensurado através do monitoramento da absorbância ( $\lambda_{\text{máx}}$  de cada corante) em espectrofotômetro Shimadzu UV-160A UV-VIS, em um período de 90 min ou 24 h. A atividade descorante foi inferida a partir da descoloração, calculada como:

$$\% \text{ descoloração} = \frac{A_0 - A_F}{A_0} \cdot 100 \quad \text{Eq.1}$$

Onde  $A_F$  é a absorbância ( $\lambda_{\text{máx}}$  para cada corante, conforme especificado no texto) após 90 min ou 24 h de incubação a 28 °C e  $A_0$  é a absorbância inicial (no mesmo comprimento de onda) da mesma mistura de reação.

### 3.2.5 Avaliação da atividade de oxidases

A atividade total de oxidases foi determinada pelo monitoramento do ABTS a 420 nm ( $\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), segundo metodologia descrita por Machado e Matheus (2006). Cada 1 mL da mistura de reação apresentou: 0,6 mL de extrato enzimático (sobrenadante/eluído), 0,05 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM, 0,05 mL de  $\text{MnSO}_4$  400 mM, 0,1 mL de ABTS 5 mM e 0,2 mL de tampão citrato fosfato 50 mM, pH 4,0. Já a atividade de lacase foi determinada no mesmo meio reacional, porém na ausência de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{MnSO}_4$ . Uma unidade de enzima (UE) corresponde à quantidade de enzima capaz de oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto. A atividade de peroxidases foi determinada pela diferença entre as absorbâncias obtidas para atividade total de oxidases e lacase.

### 3.2.6 Efeito da alteração dos parâmetros de cultivo na produção de enzimas com atividade descorante

#### 3.2.6.1 Fontes de carbono e nitrogênio

Os meios iniciais de cultivo foram selecionados em experimentos prévios (NIEBISCH, 2009). Para *L. crinitus*, consistiram de meio mínimo sólido (MMS) com 0,1 g/L de corante RB220. Para *L. sordida*, foi líquido (MML, ou seja, MMS sem ágar bacteriológico) contendo maltose 5 g/L, na ausência de corante. Seis fontes de carbono (glucose, sacarose, amido, maltose, frutose e glicerol) foram utilizadas para substituir a fonte de carbono original dos meios selecionados. Subsequentemente, foram avaliadas diferentes fontes de nitrogênio (nitrato de sódio, tartarato de amônia, carbonato de amônia, oxalato de amônia, peptona e uréia). As concentrações testadas, de cada fonte de carbono e nitrogênio, foram 5, 10 e 15 g/L. Os fungos foram cultivados em frascos de vidro de 5 mL em condições estáticas durante 15 dias, a 28 °C no escuro. A obtenção das amostras, a determinação do peso seco e as análises de descoloração foram realizadas conforme descrito nas seções 3.2.2, 3.2.3 e 3.2.4, respectivamente.

#### 3.2.6.2 Suplementação com sulfato de cobre e sulfato de manganês

O efeito de três concentrações de sulfato de cobre (0,1, 1 e 5 mM) e sulfato de manganês (0, 5 e 10 mM) sobre a produção da enzima foi avaliado separadamente. Os meios de cultivo, contendo o sal do íon metálico correspondente, foram inoculados e incubados como descrito na seção 3.2.1. O sobrenadante e o micélio resultantes foram coletados e usados para determinar atividade descorante (seção 3.2.4) e massa micelial seca (3.2.3), respectivamente.

### 3.2.6.3 Temperatura, pH e agitação

A produção da enzima (atividade descorante) foi avaliada em culturas incubadas a 28°, 35° e 40 °C. A seguir, foi analisado o efeito da alteração do valor de pH inicial de cultivo; a faixa avaliada variou de 5,5 a 7,5, em intervalos de 0,5. No caso de cultura líquida, avaliou-se também o efeito da agitação (150 rpm). Os frascos foram incubados a 150 rpm durante 15 dias, já os controles não foram submetidos a agitação.

### 3.2.7 Efeito do pH, temperatura e concentração de sal na atividade descorante e estabilidade do extrato

Extratos solúveis, provenientes de culturas incubadas durante 15 dias, foram utilizados para avaliação da descoloração e estabilidade dos extratos, usando RB220 (0,1 g/L) como substrato. Para a avaliação da atividade em diferentes temperaturas, o ensaio de descoloração foi realizado a 4°, 20°, 30°, 40°, 50°, 60° e 70 °C, em pH 6,8. Já o efeito de diferentes concentrações de sal na descoloração foi avaliado através do ensaio padrão de descoloração (seção 3.2.4) na presença de 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,6 M de NaCl. O sistema de reação utilizado para análise do efeito de diferentes valores de pH apresentou, como base, o ensaio de descoloração, além de tampão citrato-fosfato 50 mM. Os valores de pH inicial testados variaram de 3,0 a 8,0, em intervalos de 1,0. Em todos os casos, a absorbância foi determinada no tempo zero e após 90 min de incubação. A temperatura utilizada durante a avaliação da descoloração nos testes de pH e concentração de sal foi 28°C.

A estabilidade da enzima envolvida na atividade descorante foi avaliada através de pré-incubação dos extratos, nas condições descritas acima para pH, temperatura e concentração de sal, em intervalos de 3, 6, 9 e 24 h. Ao final do período de incubação, a atividade descorante foi determinada, conforme descrito na seção 3.2.4.

### 3.2.8 Efeito de íons metálicos e inibidores de lacase na atividade descorante

Foi avaliado o efeito de vários íons metálicos que são normalmente encontrados em efluentes têxteis, como  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{CuSO}_4$ );  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{MgSO}_4$ );  $\text{Mn}^{2+}$  ( $\text{MnSO}_4$ );  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{FeSO}_4$ );  $\text{Zn}^{2+}$  ( $\text{ZnSO}_4$ ) e  $\text{Al}^{3+}$  ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ). Extratos solúveis (1 mL) foram incubados com estes sais em concentrações de 0,2, 10 e 50 mM e a atividade descorante foi determinada (Seção 3.2.4). A atividade descorante também foi avaliada na presença de EDTA e azida de sódio, potenciais inibidores da enzima, em concentrações de 0,1, 1 e 5 mM. Em todos os experimentos, a absorbância foi monitorada após 90 min de incubação a 28 °C.

### 3.2.9 Atividade descorante dos extratos enzimáticos sobre corantes têxteis e corantes de uso laboratorial

O potencial de descoloração dos extratos frente a diferentes substratos foi avaliado utilizando 15 corantes têxteis e 5 corantes utilizados em técnicas de laboratório. A mistura de reação (1,1 mL) consistiu de: 0,9 mL de extrato enzimático, 0,1 mL de solução aquosa do corante 1,1 g/L e 0,1 mL de tampão fosfato de sódio 550 mM pH 6,5. Do mesmo modo, a descoloração foi avaliada na presença de quatro mediadores de óxido-redução a 1 mM, sendo eles: ácido *p*-coumárico, vanilina, acetosiringona e siringaldeído. As análises de descoloração foram realizadas como descrito na seção 3.2.4, nos tempos de 90 min e 24 h. Os comprimentos de onda utilizados para análise espectrofotométrica estão descritos na tabela 4 (seção 3.2.4).

### 3.2.10 Atividade descorante dos extratos enzimáticos sobre banhos de tingimento da indústria têxtil

Os banhos de tingimento residuais foram coletados na empresa Siderquímica, São José dos Pinhais, Brasil, e estão descritos na tabela 5. Todos

eles apresentam em sua composição NaCl 60 g/L, e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 g/L. A descoloração foi medida após 24 h de incubação do efluente com o extrato enzimático (1,1/1 v/v), bem como na presença de 1 mM dos mediadores redox descritos na seção 3.2.9. O pH dos banhos (ao redor de 11) foi ajustado para pH 5 com tampão citrato-fosfato 0,6 M.

TABELA 5 – CARACTERÍSTICAS E COMPRIMENTO DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO VISÍVEL ( $\lambda_{\text{MÁX}}$ ) DOS BANHOS DE TINGIMENTO DA INDÚSTRIA TÊXTIL.

Banho de tingimento	Corantes presentes (concentração %)	$\lambda_{\text{max}}$
Vermelho	Reactive Red 198 (1,5 %)	540
Amarelo	Reactive Yellow 107 (1,5 %)	420
Azul	Reactive Blue 220 (1,5 %)	600
Violeta	Reactive Red 198 (0,5 %) Reactive Yellow 107 (0,5 %) Reactive Blue 220 (0,5 %)	600

FONTE: O autor, 2013

### 3.2.11 Efeito de compostos aromáticos na produção enzimática

Os seguintes compostos aromáticos foram incorporados aos meios de cultivo: 1 mM de álcool veratril (3,4-dimetoxi benzil álcool), veratraldeído, catecol (benzeno-1,2-diol), vanilina, p-anisidina (p-metoxi anilina), ácido ferúlico (ácido 2-propenóico, 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)) ou ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzóico). Os primeiros quatro compostos foram dissolvidos em água destilada estéril, enquanto os demais foram dissolvidos em etanol 50 % (v/v). Para o tratamento controle, o indutor foi substituído por água estéril ou etanol 50%. As soluções foram esterilizadas por filtração, utilizando membrana Millipore (0,45  $\mu\text{m}$ ) e adicionadas assepticamente no meio de cultura. A atividade descorante e a atividade de lacase foram determinadas 15 dias após o inóculo.

### 3.2.12 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS- PAGE) e detecção de atividade enzimática em gel (zimograma)

Amostras retiradas de cultivos realizados em diferentes condições de cultura foram avaliadas quanto à atividade de lacase, através de zimogramas usando géis unidimensionais. Os meios selecionados para análise são derivados de cultivos em diferentes fontes de carbono e nitrogênio, e na presença de compostos aromáticos. As condições de eletroforese desnaturante foram aquelas descritas por LAEMMLI (1970). A concentração do gel separador utilizada foi 12 % e a do gel concentrador foi 5 %. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical, seguindo as orientações do fabricante (Hoefler). As amostras (50 µL) foram diluídas em tampão de amostra 2X (Tris-HCl 100 mM pH 6,8, Ditioneitol (DTT) 200 mM, glicerol 20 % (v/v), SDS 4 % (p/v) e azul de bromofenol 0,2 % (p/v)) na proporção de 1:1. Foram aplicados 100 µL de amostra nos géis para análise da atividade. Como marcador de massa molecular, utilizou-se o padrão de proteínas da Fermentas Life Science ( $\beta$ -galactosidase 116 kDa; Soro albumina bovina 66,2 kDa; ovoalbumina 45 kDa; lactato desidrogenase 35 kDa; REase Bsp891 25 kDa;  $\beta$ -lactoglobulina 18,4 kDa; lisozima 14,4 kDa). As corridas foram realizadas a 30 mA por gel, utilizando solução de tampão Tris 25 mM, glicina 250 mM pH 8,3 e SDS 0,1 % (p/v).

Para a avaliação do perfil de proteínas o gel foi corado com nitrato de prata (BLUM, BEIER e GROSS, 1987). Já para o zimograma, o gel foi submetido a duas lavagens em H<sub>2</sub>O destilada durante 20 min cada, seguida de 12 h de incubação com tampão de renaturação 1 (fostato de sódio 0,1 M pH 6,0 e Triton X100 1 % (v/v)) ou em tampão de renaturação 2 (fosfato de sódio 50 mM pH 7,4, cloreto de sódio 50 mM, glicerol 10 % (v/v); nonidet P-40 1 % (v/v); beta-mercaptoetanol 10 mM) a 28°C. A seguir, foram realizadas três lavagens com meio MS durante 20 min cada, seguidas de incubação por aproximadamente 10 min em meio MS contendo 10 g/L de corante. Após o gel absorver o corante, foi retirado o excesso de solução e o gel foi incubado a 28 °C por, no mínimo, 6 h. Alternativamente, a solução de corante foi substituída por solução de ABTS 0,05 mM (p/v) ou guaiacol 0,01 % (p/v) em tampão acetato 50 mM pH 5,0.

### 3.2.13 Análise estatística

Todos os experimentos referentes à descoloração e à atividade enzimática, foram realizados em quadruplicata, tanto para amostras quanto para controles. Os valores de atividade descorante, de biomassa seca, de atividade de oxidases totais e de atividade de lacase apresentados neste trabalho são médias dos resultados (de quatro amostras) e desvio padrão da média das amostras.

Os dados foram analisados através do programa ASSISTAT Versão 7.5 beta – 2008 (<http://www.assistat.com>), pela análise de variância (teste ANOVA) seguido da aplicação do teste Tukey com nível de significância de 5%, ou seja, as diferenças entre as variáveis de cada tratamento foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 3.3 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO GENE DA LACASE DE *L. crinitus*

### 3.3.1 Isolamento do DNA genômico

O DNA genômico foi obtido através do método de Moller *et al.* (1992). Inicialmente, o micélio liofilizado (30-60 mg de peso seco) foi macerado em almofariz na presença de pérolas de vidro (425 – 600  $\mu\text{m}$ ) e nitrogênio líquido. O micélio em pó resultante foi colocado em microtubo de 2 mL na presença de 500  $\mu\text{L}$  TES (100 mM Tris, pH 8,0, 10 mM EDTA, SDS 2 % (p/v)) e 50  $\mu\text{g}$  de proteinase K e a mistura de reação incubada por 1 h a 55-60 °C. Na sequência, foram adicionados 140  $\mu\text{L}$  NaCl 5 M e 65  $\mu\text{L}$  CTAB 10 % (p/v) (brometo de cetil-trimetilamônio). Após incubação a 65 °C durante 10 min foram acrescentados 700  $\mu\text{L}$  de SEGAV (clorofórmio: álcool isoamílico, 24:1, v/v) e a mistura foi incubada em banho de gelo por 30 min. Após centrifugação a 4 °C por 10 min, a 14.000 rpm (centrífuga Hsiangtai Machinery Ind. Co. Ltda, modelo MCD-2000), o sobrenadante foi transferido para microtubo de 1,5 mL contendo 225  $\mu\text{L}$  de acetato de amônia 5 M

(225  $\mu$ L), e o tubo foi incubado em gelo por 30 min e centrifugado nas mesmas condições.

Na sequência, o sobrenadante foi novamente transferido para um microtubo, no qual foram adicionados 510  $\mu$ L de isopropanol para precipitação do DNA. Após 5 min, a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm (centrífuga Hsiangtai Machinery Ind. Co. Ltda, modelo MCD-2000). O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado em etanol 70 % (v/v) gelado, por duas vezes, e dissolvido em 50  $\mu$ L de água Milli Q. A concentração da solução de DNA foi determinada em espectrofotometro NANODROP 2000 (Thermo Scientific) em comprimento de onda de 260 nm.

### 3.3.2 Obtenção das sequências específicas de *L. crinitus*

O DNA genômico, obtido conforme descrito na seção 3.3.1, foi utilizado como DNA molde em uma reação de PCR com *primers* contendo sequências conservadas que codificam para domínios de ligação ao cobre de lacases dos basidiomicetos. Dois conjuntos de *primers* foram utilizados e seus sítios de ligação estão demonstrados na figura 7.

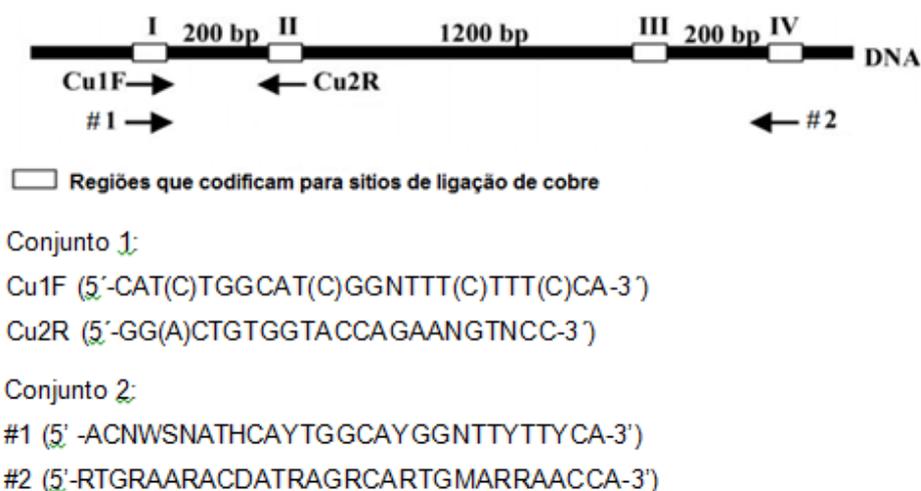


FIGURA 7 – ESTRUTURA GERAL DE UM GENE DE LACASE DE BASÍDIOMICETOS E OS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DOS CONJUNTOS DE *PRIMERS* UTILIZADOS. Os números I a IV correspondem aos domínios conservados de ligação ao cobre. No conjunto 2 de *primers*, as letras a seguir podem ser substituídas por mais de um nucleotídeo. N (A, G, C e T), W (A e T), S (C e G), H (A, C, T), Y (T e C), R (C e A), D (G, A e T) e M (A e C).  
 FONTE: modificado de LUIS, 2004.

A reação de PCR foi composta por *Taq buffer* 1x + KCl-MgCl<sub>2</sub> 1x; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de dNTPs; 0,5 μM de cada primer, 2 U de enzima *Taq* polimerase e entre 5 e 200 ng de DNA molde. A reação foi conduzida em termociclador, com ciclo inicial de desnaturação (3 min a 94 °C) seguido por 35 ciclos com desnaturação (30 segundos a 94 °C), anelamento (30 s a 55 °C) e extensão (2 min a 72 °C), e por uma extensão final (10 min a 72 °C).

Os fragmentos amplificados foram separados por corrida eletroforética em gel de agarose de acordo com Sambrook *et al.* (1989). As amostras de DNA foram misturadas a 4 μL de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,8%, ficol 10%, SDS 1%, EDTA 1,8 mM), na ausência de xileno-cianol, e aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada utilizando-se tampão TPE 1X (Tris base 90 mM, ácido fosfórico 90 mM; EDTA 2 mM), por 1 h a 40 ou 80 mV, para géis 1 % e 1,5 % de agarose, respectivamente. Na sequência, o gel foi tratado em solução de brometo de etídio (0,5 μg/mL) por aproximadamente 15 min. O gel foi visualizado sob incidência de luz ultravioleta em transiluminador EC3 System – UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CA/USA).

Os produtos de amplificação foram purificados do gel através do kit “GenEluate™ Gel Extraction Kit” (Sigma-Aldrich), segundo as recomendações do fabricante. A purificação foi confirmada através da corrida eletroforética em gel de agarose, conforme descrito acima. Os fragmentos foram clonados e submetidos a sequenciamento, conforme descrito nas seções a seguir.

### 3.3.3 Clonagem

#### 3.3.3.1 Condições de cultivo de *Escherichia coli*

A cepa de *Escherichia coli* XL1 Blue (Stratagene) foi gentilmente cedida pelo prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná. Esta estirpe foi utilizada como célula

quimiocompetente para etapas de clonagem e apresenta, como características: resistência à tetraciclina, alta eficiência de extração e inserção de fragmentos de DNA, uma vez que sua produção de endonucleases e recombinases é deficiente.

Esta estirpe foi cultivada em meio Luria Bertani (LB: triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7,0), sob 160 rpm de agitação a 37 °C ou em meio LA (meio LB acrescido de 1,5 % ágar p/v) a 37 °C. A adição dos antibióticos aos meios de cultura foi realizada no momento do uso, a seleção para a resistência da bactéria foi realizada na presença de tetraciclina 10 µg/mL e para o vetor pGEM-T Easy foi utilizado ampicilina 250 µg/mL.

### 3.3.3.2 Preparo de células competentes e transformação

Para o preparo de células competentes, uma colônia isolada da estirpe de *E.coli* XL 1 blue foi inoculada em 5 mL de meio LB e este foi incubado a 37 °C, na presença de tetraciclina, sob agitação de 150 rpm. Após 12 h de incubação, 1 mL da pré-cultura foi transferido para erlenmeyer contendo 200 mL de meio SOB (bacto-triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, cloreto de potássio 0,186 g/L) e este foi mantido a 30 °C sob agitação de 150 rpm até atingir uma  $DO_{600}$  entre 0,3 e 0,4. Na sequência, a cultura foi centrifugada a 5.000 rpm (centrífuga Hsiangtai Machinery Ind. Co. Ltda, modelo MCD-2000) durante 5 min a 4 °C. Então, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 50 mL de  $MgCl_2$  0,1 M resfriado. A seguir, as células foram centrifugadas a 4 °C durante 5 min, a 4.000 rpm (centrífuga Hsiangtai Machinery Ind. Co. Ltda, modelo MCD-2000), ressuspenso em 90 mL de  $CaCl_2$  0,1 M gelado e mantidas em gelo por 30 min. Novamente, a suspensão foi centrifugada nas mesmas condições descritas acima e, depois da retirada do sobrenadante, foram adicionados 2 mL de  $CaCl_2$  (85 mM em glicerol 15% p/v, estéril e refrigerado) ao sedimento. Após a ressusensão, a amostra foi dividida em alíquotas de 100 µL, que foram mantidas em congelador a -80 °C.

Para a transformação, foram adicionadas alíquotas das células competentes à reação de ligação (1 a 4 µL) ou do plasmídeo desejado. Após 30 min de incubação em gelo, as bactérias foram submetidas a choque térmico, através de incubação em banho-maria a 37 °C por 1 min, seguido de nova incubação em gelo por 3 min. A

recuperação das células foi realizada através da adição de 800 µL de meio SOC (meio SOB acrescido de 20 mmol/L de glucose, 5 g/L de cloreto de magnésio e 2,4 g/L de sulfato de magnésio). Após incubação a 37 °C em estufa por 1 h foi realizado o plaqueamento em meio de cultura Luria Bertani sólido (LA que corresponde ao meio LB na presença 1,5% de ágar), contendo ampicilina (250 ng/mL) e este foi incubado a 37 °C por um período de 16 a 24 h.

### 3.3.3.3 Ligação

O vetor plasmidial pGEM-T Easy (Figura 8) foi utilizado para a clonagem. Os produtos de amplificação purificados (seção 3.3.2) foram ligados ao vetor, através do kit “pGEM-T Easy vector systems” (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. A mistura de reação (10 µL) foi incubada “overnight” a 4 °C e continha 1 µL de tampão T4 ligase 10X, 1 µL do vetor, 0,5 µL de DNA ligase T4 e 10 ng do DNA a ser inserido.

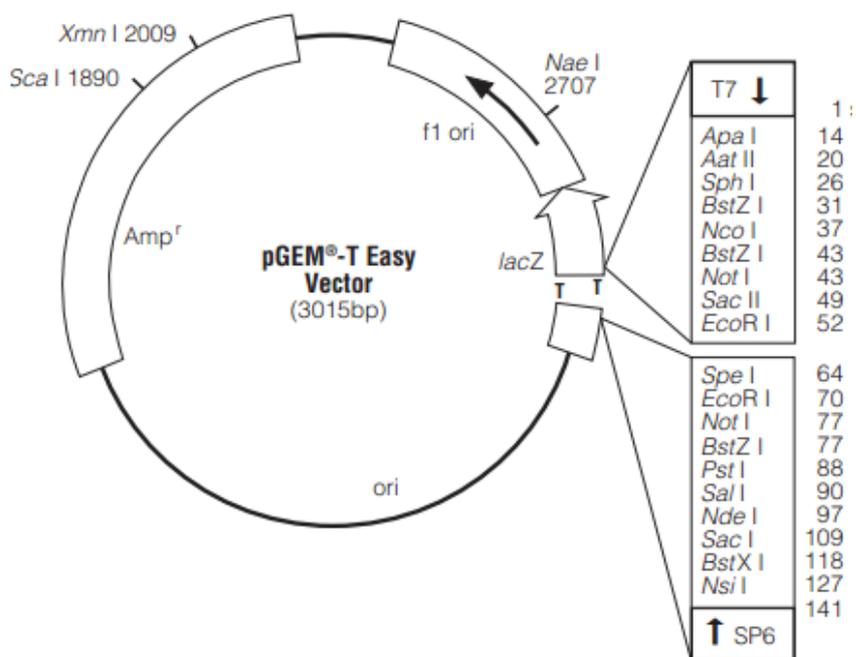


FIGURA 8 – MAPA DO VETOR pGEM-T Easy.

FONTE: Manual técnico: pGEM®-T and pGEM®-T Easy vector systems, disponível em: <http://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/pgem-t%20and%20pgem-t%20easy%20vector%20systems%20protocol.pdf?la=en>

### 3.3.4 Obtenção de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído de acordo com o método de lise alcalina modificado - miniprep (SAMBROOK *et al.*, 1989), na ausência da etapa de extração com fenol e clorofórmio. As colônias presentes no plaqueamento descrito na seção 3.3.3 foram crescidas por 12 h em meio LB. Após este período, 4 mL de cultura foram centrifugados a 13.400 rpm durante 1 min (centrífuga Hsiangtai Machinery Ind. Co. Ltda, modelo MCD-2000). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 250 µL de solução P1 (Glicose 55 mM, Tris-HCl 25 mM e EDTA 10 mM). Na sequência, foram adicionados 250 µL de solução P2 (SDS 1% e NaOH 0,2 M). Após homogeneização, solução P3 (60 mL de acetato de potássio 5 M, 11,5 mL de ácido acético glacial 98 % e 28,5 mL de água) foi adicionada, seguida de nova homogeneização e centrifugação a 13.400 rpm por 25 min (centrífuga Hsiangtai Machinery Ind. Co. Ltda, modelo MCD-2000). O sobrenadante foi coletado, e, a este, foi adicionado igual volume de isopropanol (~750µL). A solução foi centrifugada a 13.400 rpm por 20 min (centrífuga Hsiangtai Machinery Ind. Co. Ltda, modelo MCD-2000). O sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com etanol 70% (v/v) e, após secagem, dissolvido em 50 µL de água miliQ estéril. A pureza e a qualidade do DNA obtido foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose, de acordo com a seção 3.3.2.

### 3.3.5 Reação de sequenciamento

O sequenciamento foi realizado pelo método de terminação de cadeia, segundo Sanger *et al.* (1977), utilizando a incorporação de dideoxynucleotídeos fluorescentes na fita de DNA em síntese, através de sequenciador Automático 3500 (Life Technologies). A reação de amplificação foi realizada utilizando os *primers* T7 (5'TAATACGACTCACTATAGGG3') e SP6 (5'ATTTAGGTGACACTATAG3'), que são os oligonucleotídeos que se anelam nas extremidades do sítio de policlonagem do vetor plasmidial utilizado (Figura 8).

Para a reação de sequenciamento, foram utilizados cerca de 200 a 500 ng de DNA purificado, 3  $\mu\text{L}$  de tampão Save Money, 1  $\mu\text{L}$  de “BigDye terminator” (BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit) e água MiliQ para um volume final de 10  $\mu\text{L}$ . A reação foi realizada em termociclador Eppendorf (Modelo: Mastercycler Gradient) com um ciclo de desnaturação inicial (96 °C por 1 min), seguido de 30 ciclos de desnaturação (10 s a 96 °C), anelamento (1 min e 5 s a 50 °C), alongamento (4 min a 60 °C) e um alongamento final (20 min a 8 °C). Foi realizada uma reação controle na ausência do DNA do fungo para descartar a presença de DNA contaminante.

### 3.3.6 Purificação dos produtos da reação de sequenciamento com acetato de amônio

Ao produto da reação de sequenciamento, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de água miliQ estéril e 2  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio ( $\text{AcNH}_4$ ) 7,5 M. Após a homogeneização, foram adicionados 60  $\mu\text{L}$  de etanol 96% (v/v) e a mistura de reação foi novamente homogeneizada. Após incubação por 20 min em temperatura ambiente, esta foi centrifugada por 30 min, a 10.000 rpm a 4 °C (centrífuga Hsiangtai Machinery Ind. Co. Ltda, modelo MCD-2000). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 100  $\mu\text{L}$  de etanol 70 % (v/v) (recém-preparado), seguindo-se uma nova centrifugação a 10.000 rpm por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em temperatura ambiente.

### 3.3.7 Análise das sequências de nucleotídeos obtidas

As análises de similaridade e identidade de sequências foram realizadas utilizando o programa de busca BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) na base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EFEITOS DAS VARIAÇÕES DOS PARÂMETROS DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS COM ATIVIDADE DESCORANTE

#### 4.1.1 Perfil de polipeptídeos com atividade de lacase nos extratos solúveis

A seleção dos meios iniciais de cultura para a produção de lacase foi baseada em estudos prévios realizados com *L. crinitus* e *L. sordida*. Dados anteriores, obtidos no Laboratório de Biodegradação, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, indicaram que a atividade descorante presente nas culturas destes fungos é decorrente apenas da presença de lacase no meio de cultivo, uma vez que para a descoloração de RB220 e a oxidação de guaiacol e ABTS não é necessária a presença de manganês nem de peróxido de hidrogênio. Além disso, a presença de azida de sódio, conhecido inibidor de lacases, suprimiu a atividade descorante e a oxidação de guaiacol e ABTS (NIEBISCH, 2009).

Para *L. crinitus*, o perfil de polipeptídeos com atividade de lacase foi determinado em amostras provenientes de 15 dias de cultivo em meio sólido contendo glucose (10 g/L), nitrato de sódio (5 g/L) e RB220 (0,1 g/L), a pH 6,8. O SDS-PAGE demonstrou a presença de múltiplas bandas no extrato solúvel (Figura 9 A). Já os dados obtidos nos zimogramas demonstraram uma única banda com atividade sobre guaiacol e ABTS, o que indicou atividade de oxidase (Figura 9 B e C). O alinhamento destes géis com o zimograma revelado na presença do corante RB220 demonstrou que este mesmo polipeptídeo é responsável pela descoloração do substrato (Figura 9 D), e apresenta com massa molecular de 41 kDa.

Para *L. sordida*, o perfil de polipeptídeos com atividade de lacase foi determinado usando amostras crescidas durante 15 dias em meio líquido contendo maltose e nitrato de sódio, ambos a 5 g/L, a pH 6,5. O perfil obtido em gel demonstrou a presença de duas bandas com atividade de oxidase e de massas moleculares de 36,5 e 48,5 kDa (Figura 10 A, B e C), responsáveis pela descoloração de RB220 (Figura 10 D).

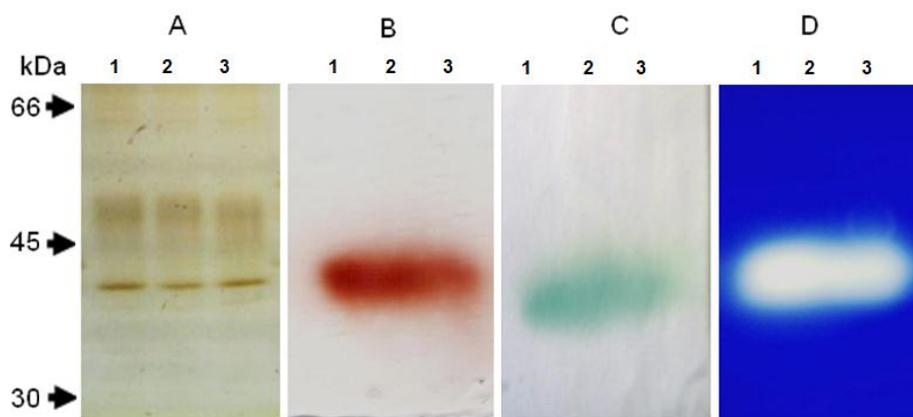


FIGURA 9 - ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E ZIMOGRAMA DE AMOSTRAS DE *L. crinitus* PROVENIENTES DE MEIO SÓLIDO. O fungo foi cultivado por 15 dias em meio contendo glicose 10 g/L, nitrato de sódio 5 g/L e RB220 0,1 g/L, pH 6,8. Os géis foram obtidos através de eletroforese desnaturante em gel de acrilamida 12 % e revelados por coloração com nitrato de prata (A) ou pela impregnação com solução de guaiacol 0,3 % (p/v) durante 3 h (B), ABTS 0,03 % (p/v) (C) e com solução de RB220 10 g/L (D). (1-3) amostras em triplicata.

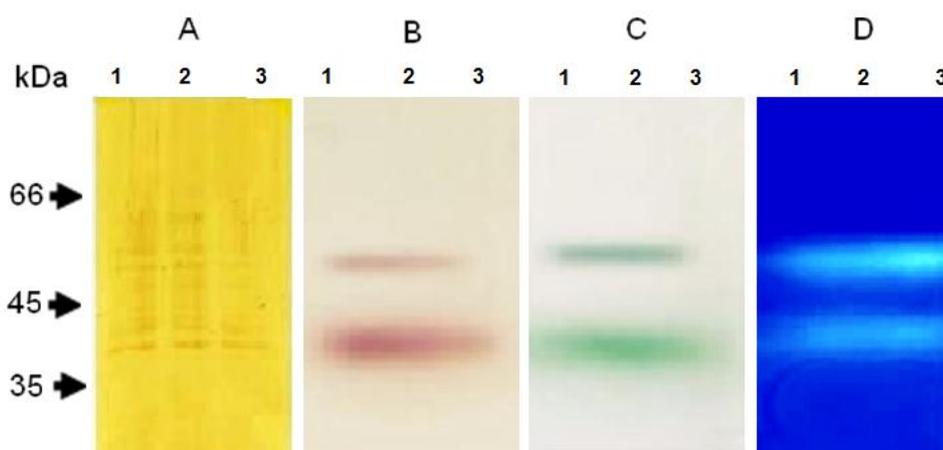


FIGURA 10 - ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E ZIMOGRAMA DE AMOSTRAS DO SOBRENADANTE DE *L. sordida*. O fungo foi cultivado por 15 dias em meio líquido contendo maltose 5 g/L e nitrato de sódio 5 g/L, pH 6,8. Os géis foram obtidos através de eletroforese desnaturante em gel de acrilamida 12 % e revelados por coloração com nitrato de prata (A) ou pela impregnação com solução de guaiacol 0,3 % (p/v) durante 3 h (B), ABTS 0,03 % (p/v) (C) e com solução de RB220 10 g/L (D). (1-3) amostras em triplicata.

A atividade de lacase em *L. crinitus* foi primeiramente descrita por Ullah e colaboradores (2001) e, mais recentemente, no extrato bruto de um isolado colombiano que exibiu atividade descorante sobre os corantes Azur B e azul de Coomassie (ARBOLEDA *et al.*, 2008). Neste último trabalho, a descoloração foi dependente tanto da atividade de lacase quanto de manganês peroxidase. De maneira similar, a produção de lacase e manganês peroxidase já foi descrita para *L. sordida* (CAVALLAZZI, OLIVEIRA e KASUYA, 2004). Em contrapartida, nas

condições de cultivo avaliadas no presente trabalho para as duas linhagens não foi detectada a produção de manganês peroxidase.

A produção de lacases com baixa massa molecular (<45 kDa), como observado para os dois fungos analisados neste estudo, é pouco frequente, mas já foi observada em outros fungos como *Ganoderma lucidum* (43 e 56 kDa), e *Pleurotus eryngii* (34 kDa) (WANG e NG, 2006; SONGULASHVILI *et al.*, 2008). Para o gênero *Lepista*, embora haja descrição da produção de lacase em diferentes espécies, incluindo *L. sordida*, estas enzimas não foram caracterizadas quanto a sua massa molecular.

Lacases previamente caracterizadas, produzidas por espécies pertencentes ao gênero *Lentinus*, apresentaram massas moleculares entre 44,6 e 74 kDa (LEATHAM, 1986; GOSHADZE e ELISASHVILI, 1993; D'ANNIBALE *et al.*, 1996; CADIMALIEV *et al.*, 2005). A literatura relata que diferentes isolados de uma mesma espécie produziram lacases com massas moleculares distintas, além disso, foram observadas alterações no número de polipetídeos com atividade de lacase. Leatham (1986) e Buswell e colaboradores (1995), ao avaliar isolados distintos de *L. edodes*, descreveram a produção de lacases com diferentes massas moleculares, 59 e 44,6 kDa, respectivamente. Além disso, um terceiro isolado desta espécie foi capaz de produzir duas isoformas cujas massas moleculares não foram determinadas (VETCHINKINA, POZDNYAKOVA, NIKITINA, 2008). Considerando que a influência dos níveis de nutrientes e condições de cultura na produção de lacase é variável entre diferentes espécies fúngicas, bem como entre diferentes isoformas produzidas pela mesma linhagem (PISCITELLI *et al.*, 2011) foram investigados, a seguir, os efeitos das alterações de cultivo na produção de atividade descorante.

#### 4.1.2 Fontes de carbono e nitrogênio

O efeito causado pela alteração das fontes de carbono e nitrogênio do meio de cultivo foi avaliado na produção de enzimas com atividade descorante, bem como na produção de biomassa em caso de meio líquido. Para isto, foi realizada a substituição da fonte de carbono ou de nitrogênio no meio de cultivo conforme o

procedimento descrito na seção 3.2.6.1. Os resultados referentes a esta avaliação foram subdivididos em duas seções, uma para cada linhagem fúngica.

#### 4.1.2.1 *Lepista sordida*

A melhor fonte de carbono, para *L. sordida*, no que diz respeito à produção de atividade descorante, foi maltose em todas as concentrações testadas. O grau de descoloração obtido variou de 50 a 64 % para esta fonte de carbono (Figura 11). Para as demais fontes, as atividades obtidas foram significativamente menores, exceto na presença de glucose 10 g/L (40 %). Da mesma forma, em quase todos os casos a produção de biomassa foi maior quando maltose foi utilizada como fonte de carbono. Além disso, a atividade em gel foi observada apenas em extratos provenientes de culturas contendo maltose (Figura 12). Estes apresentaram massas moleculares correspondentes a 36,5 e 48,5 kDa. As fontes de carbono selecionadas para dar continuidade aos testes foram glucose 10 g/L e maltose 5 g/L.

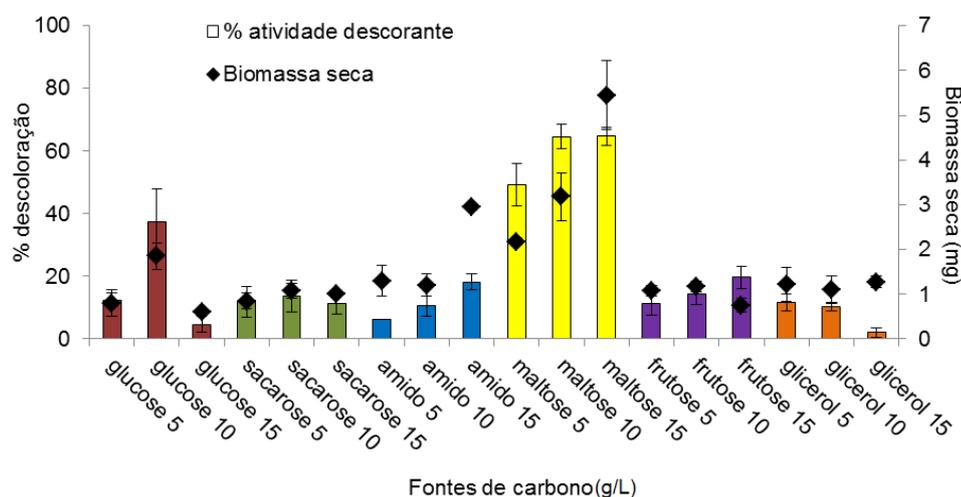


FIGURA 11 – EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ATIVIDADE DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE *L. sordida*. O fungo foi crescido em MML na presença de nitrato de sódio 5 g/L com substituição da fonte de carbono por 15 dias a 28 °C, pH 6,8. Os valores de atividade descorante foram obtidos a 600 nm, após 90 min de incubação do extrato solúvel do meio de cultura, em solução de RB220 a 0,1 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

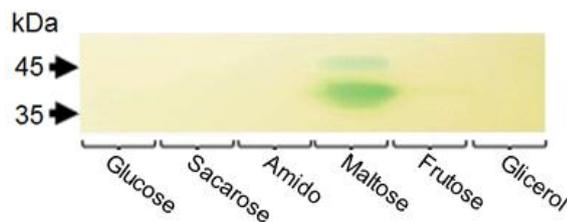


FIGURA 12 - ZIMOGRAMA DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE *L. sordida* OBTIDOS A PARTIR DE CULTURAS LÍQUIDAS PROVENIENTES DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO (5 g/L). O perfil foi obtido através de eletroforese desnaturante em gel de acrilamida 12 % e revelados pela impregnação com solução de ABTS 0,03 % durante 3 horas. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

Após a seleção de duas fontes de carbono, foram avaliados os efeitos de diferentes fontes de nitrogênio no meio de cultivo de *L. sordida*. Houve produção de atividade descorante significativa apenas na presença de nitrato de sódio a 5 g/L, tanto em meio contendo maltose quanto em meio contendo glucose como fontes de carbono, com percentuais de descoloração de 56 e 31 %, respectivamente (Figura 13 A e B). A alteração tanto da concentração quanto da fonte de nitrogênio acarretou drástica redução no percentual de descoloração obtido. O crescimento fúngico, neste caso, não esteve atrelado à produção de atividade descorante, uma vez que em meio contendo peptona, independente da concentração, foram observadas as maiores valores de biomassa (entre 15 e 20 mg) e atividades de descoloração inferiores a 10 % (Figura 13 A e B). Novamente, a atividade em gel foi avaliada para fontes de nitrogênio a 5 g/L e somente na presença de nitrato de sódio 5 g/L foram observados polipeptídeos com atividade de oxidase (Figura 14). A fonte de nitrogênio selecionada para dar continuidade aos testes foi nitrato de sódio 5 g/L, para ambas as fontes de carbono.

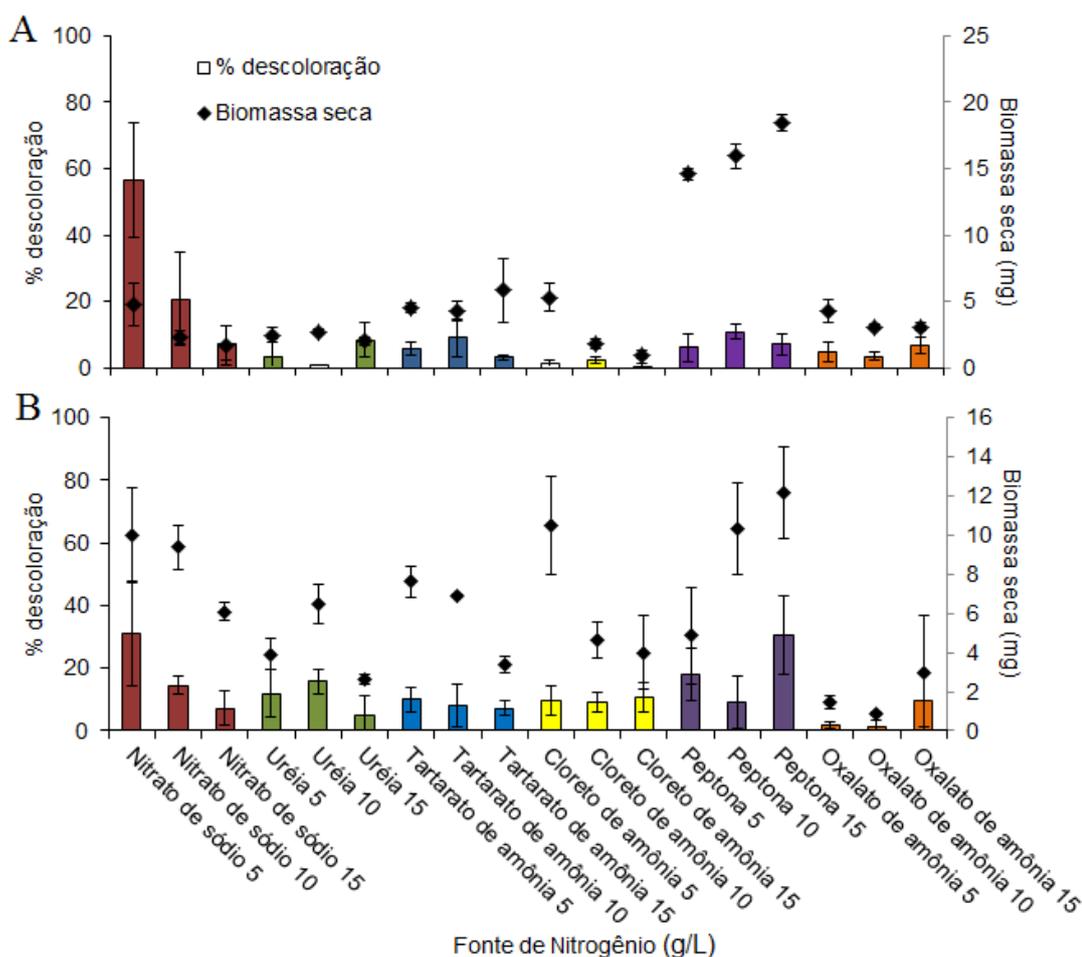


FIGURA 13 – EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E DE ATIVIDADE DESCORANTE DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE *L. sordida* EM MALTOSE 5 g/L (A) E GLUCOSE 10 g/L (B). O fungo foi crescido em MML com substituição da fonte de nitrogênio por 15 dias a 28 °C, pH 6,8. Os valores de atividade decolorante foram obtidos a 600 nm, após 90 min de incubação do extrato solúvel do meio de cultura, em solução de RB220 a 0,1 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

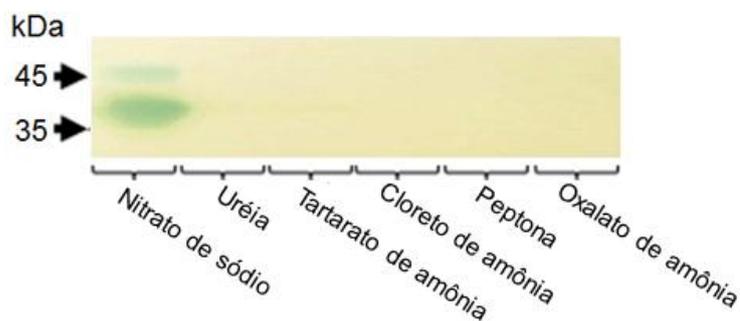


FIGURA 14 - ZIMOGRAMA DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE *L. sordida* OBTIDOS A PARTIR DE CULTURAS LÍQUIDAS PROVENIENTES DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO (5 g/L) EM MALTOSE 5 g/L. O perfil foi obtido através de eletroforese desnaturante em gel de acrilamida 12 % e revelados pela impregnação com solução de ABTS 0,03 % durante 3 horas. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

#### 4.1.2.2 *Lentinus crinitus*

O meio inicial de cultivo para esta linhagem foi meio mínimo sólido (MMS) na presença de 0,1 g/L de RB220. Todos os extratos solúveis provenientes do fungo crescido em diferentes fontes de carbono apresentaram atividade descorante sobre o RB220, porém, o grau de descoloração dependeu tanto da fonte de carbono quanto da concentração avaliada (Figura 15). A maior atividade descorante foi observada na presença de glucose (10 g/L), maltose (5 g/L) e frutose (10 g/L), resultando em percentuais de descoloração de 81, 69 e 70 %, respectivamente. Em contrapartida, quando o fungo foi cultivado na presença de 10 g/L de amido e 15 g/L de glicerol, a descoloração exercida pelos extratos foi praticamente nula. O perfil de atividade enzimática em gel indicou uma única banda de 41 kDa com atividade de oxidase, a intensidade da qual foi dependente da fonte de carbono presente no meio de cultivo (Figura 16). As fontes selecionadas para a continuação dos testes foram duas das que apresentaram maior atividade descorante: glucose 10 g/L e maltose 5 g/L.

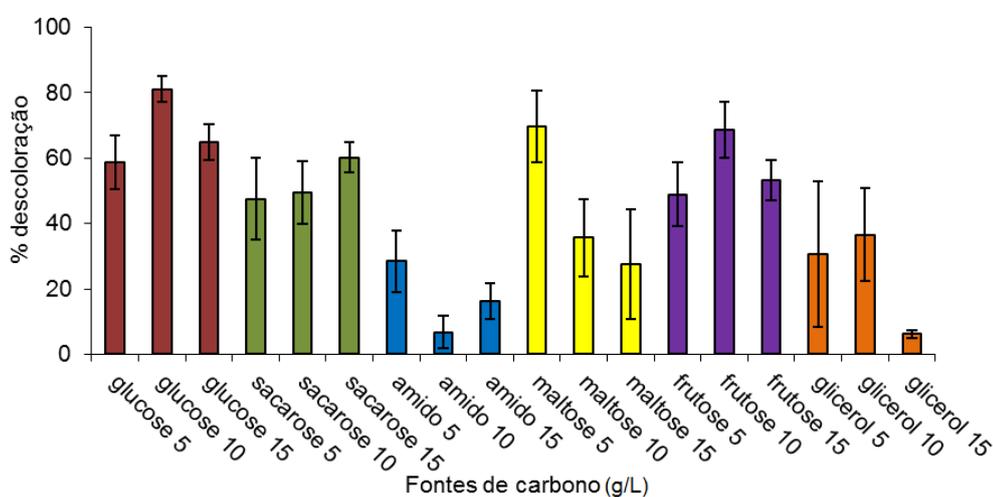


FIGURA 15 – EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO NA ATIVIDADE DESCORANTE DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE *L. crinitus*. O fungo foi crescido em MMS contendo RB220 0,1 g/L na presença de nitrato de sódio 5 g/L, com substituição da fonte de carbono por 15 dias a 28 °C, pH 6,8. Os valores de atividade descorante foram obtidos a 600 nm, após 90 min de incubação do extrato solúvel do meio de cultura, em solução de RB220 a 0,1 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

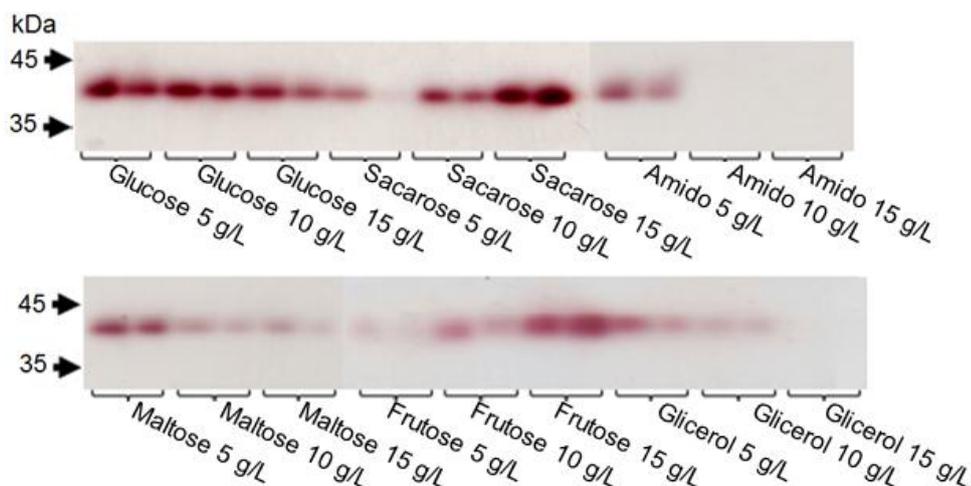


FIGURA 16 - ZIMOGRAMA DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE *L. crinitus* OBTIDOS A PARTIR DE CULTURAS SÓLIDAS CRESCIDAS EM MEIOS CONTENDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO. Os perfis foram obtidos através de eletroforese desnaturante em gel de acrilamida 12 % e pela impregnação com solução de guaiacol 0,3 % durante 3h.

O efeito de diferentes fontes de nitrogênio no meio de cultivo de *L. crinitus*, sobre a atividade descorante do sobrenadante e para cada fonte de carbono, esta demonstrado na figura 17. Os resultados indicaram uma atuação conjunta entre fonte de carbono e nitrogênio presente na cultura para a produção de atividade descorante. Em geral, as maiores atividades descorantes foram obtidas na presença de glucose. Os extratos provenientes de várias fontes de nitrogênio apresentaram descoloração acima de 60 %, sendo elas: nitrato de sódio e uréia (5 g/L), tartarato e oxalato de amônia (10 e 15 g/L) e peptona (15 g/L). Considerando frutose como fonte de carbono, os extratos solúveis provenientes de meios de cultivo contendo nitrato de sódio (5 g/L), tartarato de amônia ou peptona (ambas a 15 g/L) apresentaram as maiores atividades descorantes (entre 46 e 58 %).

Os zimogramas obtidos a partir de extratos provenientes de culturas com diferentes fontes de nitrogênio tinham, na maioria dos casos, uma única banda (41 kDa) com atividade de oxidase (Figura 18). Porém, na presença de oxalato de amônia (10 e 15 g/L) a expressão deste polipeptídeo não foi observada, mas sim a expressão de dois polipeptídeos com massas moleculares maiores, de aproximadamente 42,5 e 45 kDa, como destacado na figura 19. Os resultados mostram que a fonte de nitrogênio, para esta linhagem, não afeta somente a quantidade de lacase produzida, mas também o padrão de bandas ativas.

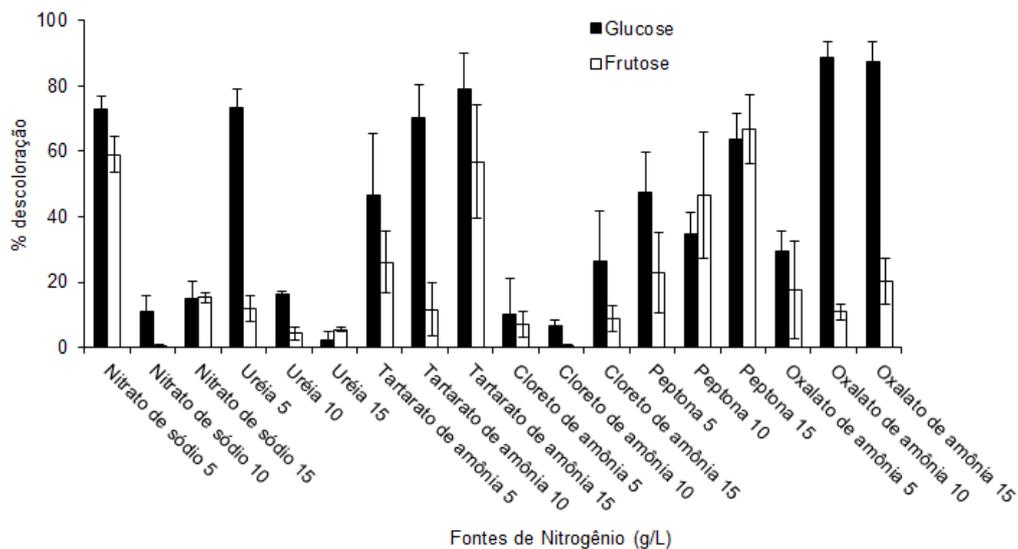


FIGURA 17 – EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO NA ATIVIDADE DESCORANTE DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE *L. crinitus*. O fungo foi crescido em MMS contendo RB220 0,1 g/L, com substituição da fonte de nitrogênio por 15 dias a 28 °C, pH 6,8. Os valores de atividade decolorante foram obtidos a 600 nm, após 90 min de incubação do extrato solúvel do meio de cultura, em solução de RB220 a 0,1 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

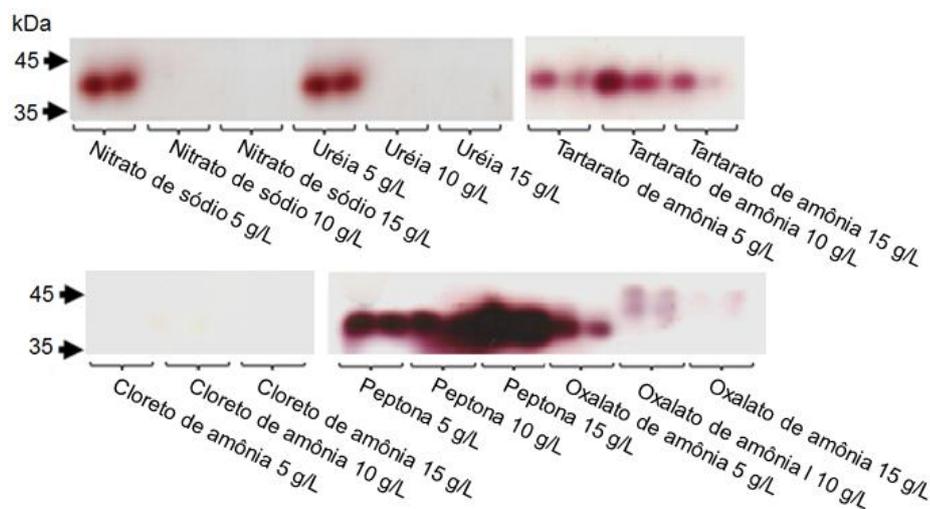


FIGURA 18 - ZIMOGRAMA DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE *L. crinitus* OBTIDOS A PARTIR DE CULTURAS SÓLIDAS PROVENIENTES DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO E GLUCOSE 10 g/L. Os perfis foram obtidos através de eletroforese desnaturante em gel de acrilamida 12 % e revelados pela impregnação com solução de guaiacol 0,3 % durante.

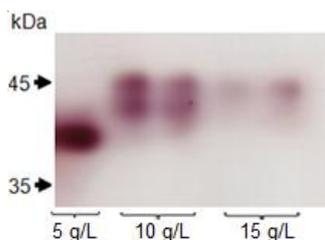


FIGURA 19 - EFEITO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE OXALATO DE AMÔNIA NO PERFIL DE ATIVIDADE EM GEL DE LACASE DOS SOBRENADANTES DE CULTURAS SÓLIDAS DE *L. crinitus* EM GLUCOSE 10 g/L. O perfil foi obtido através de eletroforese desnaturante em gel de acrilamida 12 % e revelado pela impregnação com solução de guaiacol 0,3 % durante 3 horas.

Vários estudos retrataram o efeito de fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção de enzimas lignolíticas por fungos da decomposição branca, embora este efeito tenha sido pouco descrito para espécies pertencentes aos gêneros *Lentinus* e *Lepista*. No presente trabalho, para a linhagem de *L. sordida*, a variação da concentração da fonte de carbono e nitrogênio não afetou significativamente a produção de lacase, porém esta foi drasticamente afetada pela alteração do tipo de fonte presente no cultivo. Já a produção de atividade descorante, por *L. crinitus*, foi afetada tanto pelo tipo quanto pela concentração da fonte de carbono e nitrogênio, mas tendências diferentes ocorreram para fontes distintas: concentrações elevadas de sais de amônia resultaram em maior produção de atividade descorante, enquanto que, para nitrato de sódio e uréia, as maiores atividades foram obtidas em baixas concentrações.

No que diz respeito ao gênero *Lentinus*, a atividade lignolítica de dois isolados distintos de *L. edodes*, segundo Leatham e Kirk (1983) e Buswell e colaboradores (1995), foi estimulada por elevadas concentrações de nitrogênio (34 mM e 26 mM), enquanto que Hatvani e Mécs (2002), ao avaliar a biodegradação de corantes por *Lentinus* sp., verificaram que a descoloração foi mais rápida na presença de baixas concentrações de cloreto de amônia, de peptona ou de extrato de malte (1-3 mM).

Entre as fontes de nitrogênio, a peptona, em diferentes concentrações, tem sido descrita como melhor fonte na produção de lacase para *T. pubescens* (STRONG, 2011), *Pleurotus dryinus* (KACHLISHVILI *et al.*, 2005) e *P. ostreatus* (HOU *et al.*, 2004), embora as linhagens avaliadas neste trabalho não compartilhem esta característica. Por outro lado, outras fontes têm sido reportadas na literatura como mais efetivas na produção de lacase, como por exemplo, nitrato de sódio para *M. crassipes* e *Ganoderma* sp. (KANDAL e REDDY, 2011; SIVAKUMAR *et al.*, 2012), nitrato de amônia para *Pleurotus tuberregium* e *Funalia Trogii* (KACHLISHVILI, *et al.*, 2005) e uréia para *Colorius versicolor* (KAPDAN *et al.*, 2000).

Concentrações elevadas de carbono (10 g/L) estão associadas a um aumento na produção de lacase em *Morchella crassipes*, *T. pubescens*, e *P. sajor-caju* (KANWAL e REDDY, 2011; PATRICK *et al.*, 2011; STRONG, 2011; TRIPATHI, UPADHYAY e SINGH, 2011). Em contrapartida, *Ganoderma* sp. e *P. ostreatus* apresentaram uma maior produção de lacase em meios contendo baixos teores de

carbono (maltose 0,2 % e celobiose ou glucose 0,5 g/L, respectivamente) (HOU *et al.*, 2004; SIVAKUMAR *et al.*, 2010).

A atividade descorante obtida neste trabalho, para *L. crinitus*, em diferentes fontes de nitrogênio variou drasticamente com o tipo de fonte de carbono presente no meio de cultura. A grande atividade de descoloração obtida em culturas contendo 5 g/L de uréia foi quase totalmente perdida quando a glucose foi substituída por frutose como fonte de carbono principal. Um efeito semelhante foi observado para o oxalato de amônio.

Adicionalmente, uma alteração do perfil de polipeptídeos com atividade de lacase foi obtida para *L. crinitus* na presença de oxalato de amônia em concentrações de 10 e 15 g/L. De maneira semelhante, a literatura indica alteração no número de lacases produzidas, em decorrência de modificações do meio de cultivo. D'Souza-Ticlo e colaboradores (2006) obtiveram a expressão de 6 lacases (com massa molecular entre 25 e 60 kDa), dependendo do meio de cultivo avaliado, em um isolado marinho denominado NIOCC#2. De maneira similar, Jiang e colaboradores (2013), trabalhando com o fungo comestível *Coprinus comatosus*, descreveram a expressão de até 6 polipeptídeos com atividade de lacase com a modificação do teor de carbono e nitrogênio, assim como da relação C/N final no meio de cultivo.

Em suma, os resultados obtidos neste trabalho estão em conformidade com os relatados na literatura, que demonstram que o perfil de secreção de lacases pode ser modificado qualitativa e quantitativamente de acordo com o tipo e concentração da fonte de carbono e de nitrogênio presente no meio de cultivo (BALDRIAN, 2006; DÍAZ *et al.*, 2011). Além disto, o efeito da variação do tipo e concentração da fonte de carbono e nitrogênio, sobre a produção de lacases, é particular para cada fungo.

Como alternativa a utilização destes meios, tem-se a avaliação do uso de resíduos lignocelulósicos e agroindustriais de disponibilidade local para crescimento destes fungos. A utilização destes para produção de enzimas, além de apresentar baixo custo, contorna o problema de poluição causado pela destinação final dos resíduos. Uma alta produção de lacase por fungos tem sido descrita na presença de vários resíduos, dentre eles, casca e bagaço de laranja (ALEXANDRINO *et al.*, 2007) e bagaço de cana de açúcar (MENEZES, SILVA e DURRANT, 2009). Esta é uma frente promissora a ser avaliada em estudos de produção enzimática.

#### 4.1.3 Efeito da suplementação do meio de cultivo com cobre e manganês

Após a avaliação do efeito das fontes de carbono e nitrogênio na produção de lacase, os ensaios subsequentes foram realizados utilizando dois meios de cultivo para cada fungo. Para *L. crinitus* foram selecionados meios sólidos contendo nitrato de sódio 5 g/L ou oxalato de amônia 10 g/L, ambos na presença de glucose 10 g/L. Já para *L. sordida* foram selecionados meios de cultivo líquidos com nitrato de sódio 5 g/L como fonte de nitrogênio, na presença de maltose 5 g/L ou glucose 10 g/L. A avaliação do efeito dos íons cobre e manganês na produção de lacase foi realizada pela adição destes ao meio de cultivo antes do inóculo conforme detalhado na seção 3.2.6.2.

Para *L. crinitus*, a adição de sulfato de cobre em meio contendo nitrato de sódio, como fonte de nitrogênio, causou redução na produção de lacase, indicada pela grande redução da atividade descorante. A atividade descorante dos extratos solúveis provenientes de meios com oxalato de amônia se apresentou menos sensível à presença do íon cobre (Figura 20). Isto pode ser decorrente da formação de um complexo entre o íon e oxalato em solução, alterando a quantidade de íon livre e disponível para ser absorvido (JONGEN *et al.*, 2000).

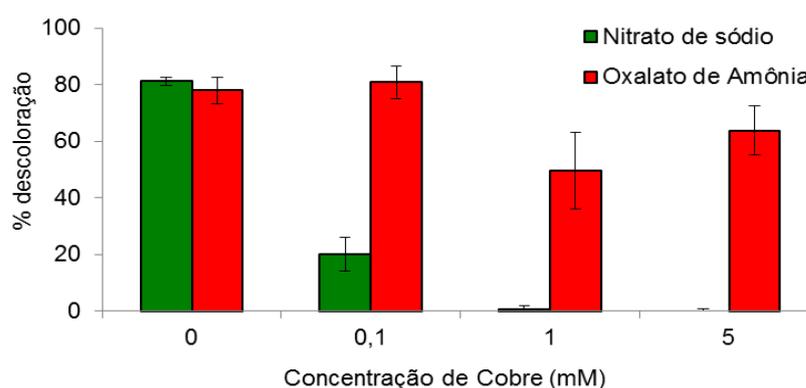


FIGURA 20 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SULFATO DE COBRE NA ATIVIDADE DESCORANTE EM *L. crinitus*. O fungo foi crescido em MMS contendo corante 0,1 g/L na presença de glucose 10 g/L por 15 dias a 28 °C, pH 6,8. A legenda indica a fonte de nitrogênio presente na cultura. Os valores de atividade descorante foram obtidos a 600 nm, após 90 min de incubação do extrato solúvel do meio de cultura, em solução de RB220 a 0,1 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

O perfil obtido para *L. sordida* demonstrou inibição da produção da atividade descorante em extratos provenientes de culturas suplementadas com sulfato de cobre em concentrações iguais a 0,1 mM ou acima, tanto com maltose quanto com glucose como fontes de carbono (Figura 21 A e B, respectivamente). O crescimento fúngico também foi prejudicado pela presença deste sal (Figura 21 A e B). A suplementação com sulfato de manganês no meio de cultivo de *L. sordida* resultou na redução da atividade descorante proveniente do sobrenadante do cultivo (Figura 22 A e B). Em contrapartida, a biomassa fúngica não foi afetada pela presença deste íon (Figura 22 A e B).

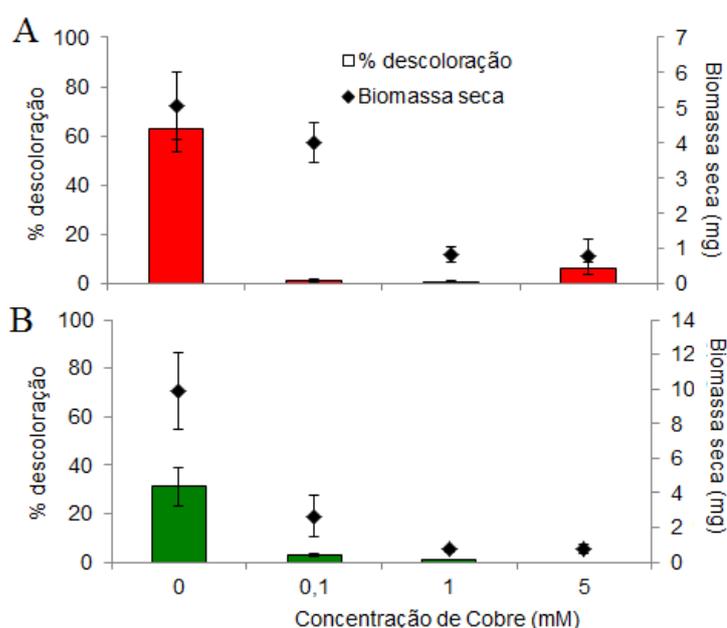


FIGURA 21– EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SULFATO DE COBRE NA ATIVIDADE DESCORANTE E CRESCIMENTO DE *L. sordida* EM MALTOSE 5 g/L (A) E GLUCOSE 10 g/L (B). O fungo foi crescido em MML na presença de nitrato de sódio 5 g/L e cultivado por 15 dias a 28 °C, pH 6,8. Os valores de atividade descorante foram obtidos a 600 nm, após 90 min de incubação do extrato solúvel do meio de cultura, em solução de RB220 a 0,1 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

O efeito da suplementação do meio de cultivo com cobre ou manganês, assim como aconteceu para as fontes de carbono e nitrogênio, apresentou efeitos variáveis e particulares para cada linhagem fúngica. Para *L. crinitus* e *L. sordida* a suplementação dos meios de cultura com íons cobre e manganês levou a uma diminuição da produção da atividade descorante, exceto em *L. crinitus* na presença de oxalato. Este efeito foi contrário ao esperado, pois a presença de cobre no meio de cultivo esta relacionada a um aumento na produção de lacase, uma vez que este íon é necessário para a síntese da enzima ativa, ou ainda, pode induzir a transcrição

do gene correspondente (BALDRIAN, 2003; HOSHIDA *et al.*, 2005). A literatura indica que quantidade de cobre necessária para aumentar a produção de lacase varia muito entre os fungos e geralmente se encontra na faixa entre 0,019  $\mu\text{M}$  e 0,25 mM (GALHAUP e HALTRICH, 2001), embora a indução já tenha sido descrita em concentrações mais elevadas (10 e 30 mM) em culturas de *P. ostreatus* e *P. chrysosporium* (GNANAMANI *et al.*, 2006; STAJIĆ *et al.*, 2006).

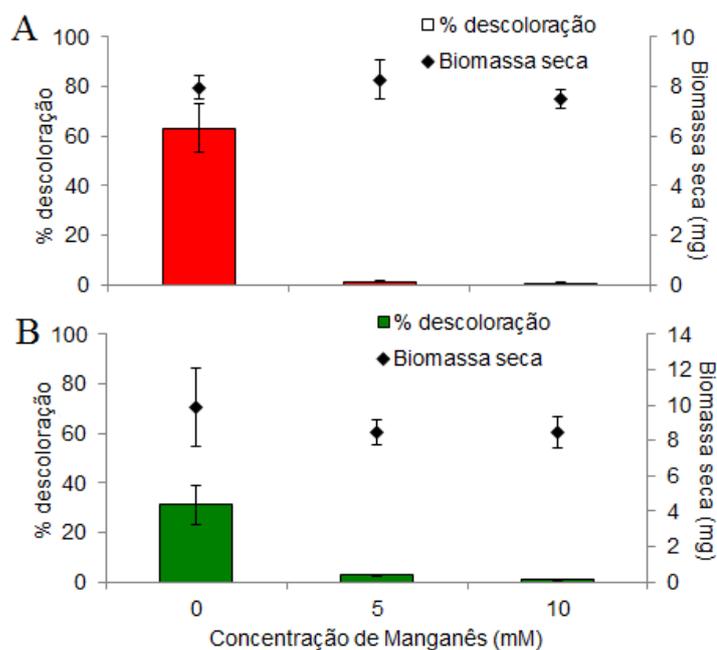


FIGURA 22 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SULFATO DE MANGANÊS NA ATIVIDADE DESCORANTE E CRESCIMENTO DE *L. sordida* EM MALTOSE 5 g/L (A) E GLUCOSE 10 g/L (B). O fungo foi crescido em MML na presença de nitrato de sódio 5 g/L e cultivado por 15 dias a 28 °C, pH 6,8. Os valores de atividade decolorante foram obtidos a 600 nm, após 90 min de incubação do extrato solúvel do meio de cultura, em solução de RB220 a 0,1 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

De maneira distinta ao observado neste trabalho para *L. crinitus*, Arboleda e colaboradores (2008) obtiveram, para outro isolado desta mesma espécie, um aumento na produção de lacase e manganês peroxidase pela suplementação do meio de cultivo com cobre e manganês. Um resultado similar foi observado com *L. edodes* após suplementação com manganês (20  $\mu\text{M}$ ) (GALHAUP e HALTRICH, 2001) e em *L. tigrinus* com sais de cobre (1,5 mM) (SHUTOVA *et al.*, 2008).

Por outro lado, alguns resultados similares aos obtidos neste estudo são encontrados na literatura. Para o fungo *Fomes sclerodermeus* a adição tanto de cobre (150  $\mu\text{M}$ ) quanto de manganês (1 mM) no meio de cultivo reduziu a produção de lacase (PAPINUTTI, DIORIO, e FORCHIASSIN, 2003). A inibição da produção

desta enzima causada pela suplementação de manganês (200  $\mu$ M) também foi descrita por Swamy e Ramsay (1999) para *Trametes versicolor*. Além disso, a presença de íons cobre (1 mM) não alterou a produção de lacase por *Lentinus strigosus* e *T. pubescens* (GEDIKLI et al., 2010; STRONG et al., 2011).

#### 4.1.4 Efeito da temperatura de cultivo sobre a produção de lacase

Temperaturas de cultivo superiores a 28 °C inibiram drasticamente a produção das enzimas com atividade descorante, tanto por *L. crinitus* (Figura 23), quanto por *L. sordida* (Figura 24 A e B). A produção de biomassa não foi avaliada para *L. crinitus*, pois este foi crescido em meio sólido. Com relação ao crescimento de *L. sordida*, este foi inibido em temperaturas acima de 28° e 35 °C, em meios de cultivo contendo maltose e glucose, respectivamente (Figura 24 A e B).

Poucos relatos na literatura descrevem o efeito da temperatura de incubação na produção de lacases e de atividade descorante, a maioria dos estudos disponíveis foi conduzida em temperaturas ao redor de 30 °C (ARORA e GIL, 2000; KAPDAN et al., 2000; DEKKER et al., 2007). Entre os poucos casos avaliados quanto ao efeito da temperatura, pode-se citar o fungo *Pleurotus sajor-caju*, cuja máxima produção de lacase foi obtida quando a incubação foi realizada em temperaturas entre 20 e 30 °C, temperaturas superiores inibiram o crescimento fúngico e causaram drástica redução da produção da enzima (PATRICK et al., 2011). Da mesma forma, Šnajdr e Baldrian (2007), ao avaliarem o efeito da temperatura de incubação na produção de enzimas lignolíticas por basidiomicetos, encontraram a maior produção de lacase entre 25 e 30 °C para *P. ostreatus* e a 30 °C para *T. versicolor*, respectivamente. A 10 °C a produção enzimática foi pequena, ao redor de 4-20 % da atividade máxima obtida para os dois fungos.

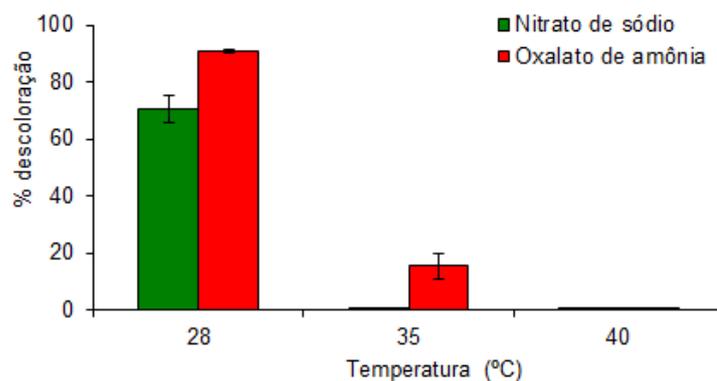


FIGURA 23 – EFEITO DA TEMPERATURA DE CULTIVO DE *L. crinitus* NA ATIVIDADE DESCORANTE. O fungo foi crescido em MMS contendo corante 0,1 g/L na presença de glucose 10 g/L e cultivado por 15 dias em pH 6,8. A legenda indica a fonte de nitrogênio presente na cultura. Os valores de atividade decolorante foram obtidos a 600 nm, após 90 min de incubação do extrato solúvel do meio de cultura, em solução de RB220 a 0,1 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

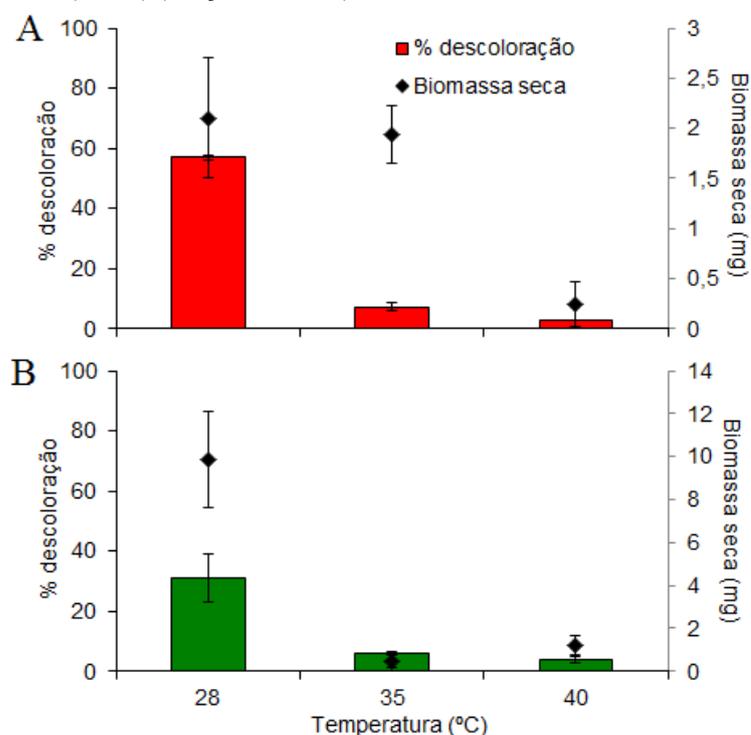


FIGURA 24 - EFEITO DA TEMPERATURA DE CULTIVO DE *L. sordida* NA ATIVIDADE DESCORANTE E PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MALTOSE 5 g/L (A) E GLUCOSE 10 g/L (B). O fungo foi crescido em MML na presença de nitrato de sódio 5 g/L e cultivado por 15 dias em pH 6,8. Os valores de atividade decolorante foram obtidos a 600 nm, após 90 min de incubação do extrato solúvel do meio de cultura, em solução de RB220 a 0,1 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

#### 4.1.5 Efeito do pH inicial do meio de cultivo na produção de atividade descorante

Os meios de cultivo avaliados para *L. crinitus* foram meios sólidos com nitrato de sódio 5 g/L ou oxalato de amônia 10 g/L, ambos na presença de glucose 10 g/L. Para *L. sordida*, foram usados meios líquidos com nitrato de sódio 5 g/L como fonte de nitrogênio, na presença de maltose 5 g/L ou glucose 10 g/L. Os fungos foram crescidos nos meios de cultivo descritos acima com valores de pH inicial entre 5,5 e 7,0, segundo protocolo descrito na seção 3.2.7. Após 15 dias de cultivo, os extratos solúveis foram avaliados quanto a produção de atividade descorante.

O efeito do pH inicial da cultura de *L. sordida*, na produção de enzimas com atividade descorante, foi dependente da fonte de carbono presente no meio de cultivo (Figura 25 A e B). Na presença de maltose, o percentual de descoloração não foi sensível às alterações no valor de pH ( $p < 0,05$ ). Já a maior produção de biomassa foi obtida a pH 7, nos demais valores de pH a produção de biomassa foi reduzida pela metade. Na presença de glucose, a maior porcentagem de descoloração foi observada nos extratos derivados de culturas com pH inicial entre 6,5 e 7,0 e a maior produção de biomassa foi obtida nos extremos da faixa de valores de pH avaliados (5,5 e 7). O extrato solúvel de *L. crinitus* apresentou altos percentuais de descoloração quando proveniente de culturas com pH inicial entre 5,5 e 6,5 (entre 61 e 94 %), sendo sua atividade drasticamente reduzida em amostras provenientes de cultivos com pH inicial de 7 (Figura 26).

Valores de pH ácidos ou próximos ao neutro estão normalmente associados a uma maior produção de lacase (BALDRIAN, 2006). A avaliação do efeito de diferentes valores de pH inicial (2,5, 4,5, 5,0 e 6,0) na produção de lacase e descoloração do corante têxtil RBBR por um isolado de *L. crinitus* foi realizado por Moreira Neto e colaboradores (2009). Os autores observaram a maior produção da atividade descorante e de lacase em extratos derivados de culturas com pH inicial de 4,5. De maneira similar ao descrito acima e para as linhagens avaliadas neste trabalho, valores de pH entre 4 e 6,5 estão relacionados a uma maior produção de lacase em *Botryosphaeria rhodina* (DEKKER *et al.*, 2007), *Ganoderma* sp. (SIVAKUMAR *et al.*, 2010), *T. pubescens* (STRONG, 2011) e *P. sajor-caju* (PATRICK *et al.*, 2011).

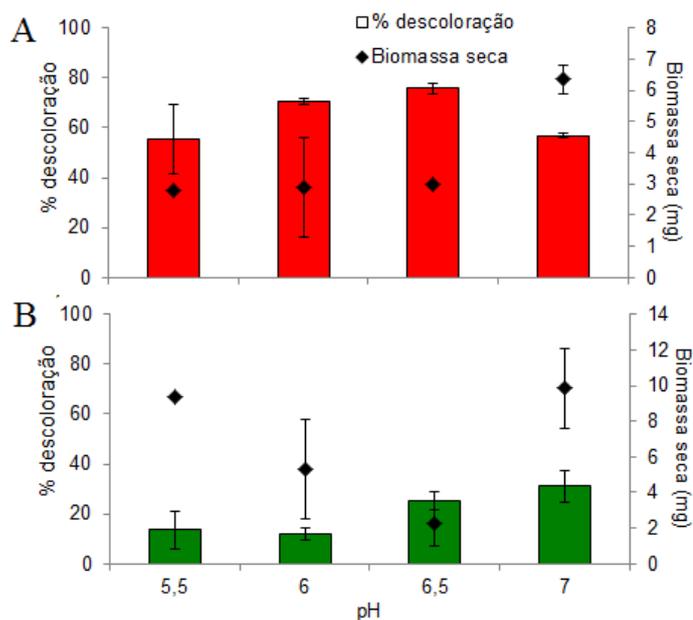


FIGURA 25 – EFEITO DO pH INICIAL DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE ATIVIDADE DESCORANTE E CRESCIMENTO DE *L. sordida* EM MALTOSE 5 g/L (A) E GLUCOSE 10 g/L (B). O fungo foi crescido em MML na presença de nitrato de sódio 5 g/L e cultivado por 15 dias a 28 °C. Os valores de atividade decolorante foram obtidos a 600 nm, após 90 min de incubação do extrato solúvel do meio de cultura, em solução de RB220 a 0,1 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

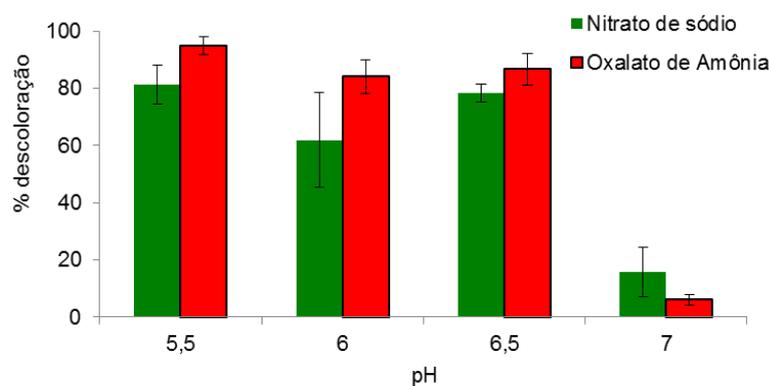


FIGURA 26 – EFEITO DO pH INICIAL DE CULTIVO DE *L. crinitus* NA PRODUÇÃO DE ATIVIDADE DESCORANTE. O fungo foi crescido em MMS contendo corante 0,1 g/L na presença de glucose 10 g/L e cultivado por 15 dias a 28 °C. A legenda indica a fonte de nitrogênio presente na cultura. Os valores de atividade decolorante foram obtidos a 600 nm, após 90 min de incubação do extrato solúvel do meio de cultura, em solução de RB220 a 0,1 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

#### 4.1.6 Efeito da agitação sobre a produção de atividade descorante

O efeito da agitação do meio de cultivo de *L. crinitus* não foi avaliado, visto que o meio de cultivo desta linhagem foi sólido. Para *L. sordida*, o meio avaliado foi o mesmo descrito no início da seção anterior, com pH ajustado para 6,5. A agitação causou redução da produção de atividade descorante em cerca de 30 % quando comparado à produção em meios estáticos, de forma independente da fonte de carbono presente no meio de cultivo (Figuras 27 A e B). Com relação ao crescimento do fungo, na presença de glucose foi observada uma redução significativa da biomassa em culturas submetidas à agitação (Figura 27 B). Ao contrário, na presença de maltose, o crescimento do fungo foi maior em culturas submetidas à agitação do que em condições estáticas, atingindo cerca de 10 mg por réplica de 5 mL de cultivo (Figura 27 A).

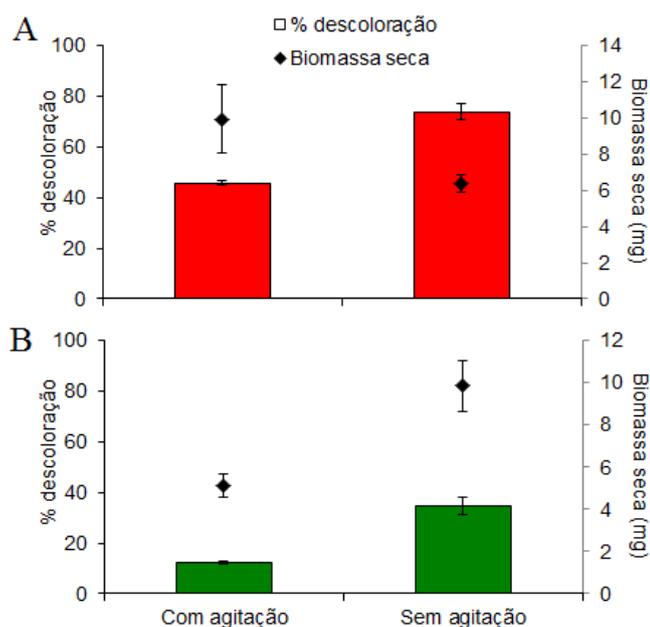


FIGURA 27 – EFEITO DA AGITAÇÃO DA CULTURA NA PRODUÇÃO DE ATIVIDADE DESCORANTE E CRESCIMENTO DE *L. sordida* EM MALTOSE 5 g/L (A) E GLUCOSE 10 g/L (B). O fungo foi crescido em MML na presença de nitrato de sódio 5 g/L e cultivado por 15 dias a 28 °C, pH 6,5. Os valores de atividade descorante foram obtidos a 600 nm, após 90 min de incubação do extrato solúvel do meio de cultura, em solução de RB220 a 0,1 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

Da mesma forma que para as demais variáveis analisadas, neste caso também não foi observado um efeito padrão decorrente da agitação da cultura. Estudos de outros autores com diferentes isolados fúngicos mostraram que culturas mantidas sob agitação apresentam maior produção de lacase, como em *Cyathus*

*bulleri* (VASDEV e KUHAD, 1994), *Streptomyces psammoticus* (NILADEVI e PREMA, 2008) e *Bjerkandera adusta* (TRIPATHI, UPADHYAY e SINGH, 2011), porém esta não é uma regra geral. Condições de cultivo estacionárias estão relacionadas à maior produção de lacase para *P. ostreatus* (HOU *et al.*, 2004), *Irpex lacteus* (NOVOTNÝ *et al.*, 2004) e *Lentinus squarrosulus* (TRIPATHI, UPADHYAY e SINGH, 2011), assim como a obtida para *L. sordida* neste estudo. A agitação da cultura ocasiona, em alguns casos, dano à estrutura micelial do fungo, o que pode retardar, ou até mesmo inibir, a produção de lacase (DONG *et al.*, 2005).

#### 4.1.7 Comparação entre cultivo em meio sólido e líquido e efeito da presença do corante RB220 no perfil de atividade em gel de *L. crinitus*

A comparação entre cultivo sólido e líquido quanto à produção de atividade descorante foi realizada somente para *L. crinitus*, uma vez que para *L. sordida* a atividade descorante obtida em meio sólido não é passível de eluição (NIEBISCH, 2009). Outro parâmetro verificado foi o efeito da presença de RB220 no meio de cultivo. As atividades descorantes obtidas foram similares entre extratos derivados dos diferentes meios de cultivo avaliados: meio sólido na presença de corante, meio líquido na presença de corante e meio líquido na ausência de corante (Figura 28). O zimograma obtido a partir de extratos provenientes de meio contendo o corante RB2220 revelou apenas um polipeptídeo de 41 kDa, tanto para meio líquido quanto para meio sólido. Em contrapartida, quando o fungo foi cultivado na ausência do corante, apareceu uma banda adicional com 38 kDa (Figura 29).

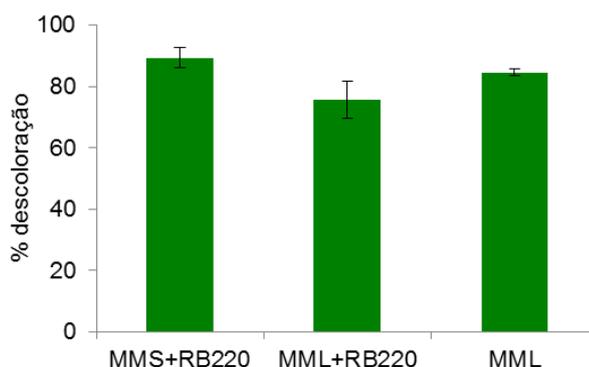


FIGURA 28 – ATIVIDADE DESCORANTE DE EXTRATOS SOLUVEIS DE *L. crinitus* OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA. O fungo foi cultivado a pH 6,5 por 15 dias a 28 °C. MMS: meio mínimo sólido, MML: meio mínimo líquido, RB220: Remazol azul 220. Os valores de atividade descorante foram obtidos a 600 nm, após 90 min de incubação do extrato solúvel do meio de cultura, em solução de RB220 a 0,1 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

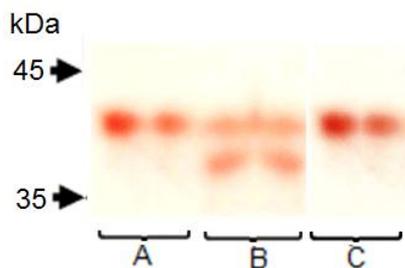


FIGURA 29 - ATIVIDADE EM GEL DE EXTRATOS PROVENIENTES DE CULTURAS LÍQUIDAS DE *L. crinitus* NA PRESENÇA (A) E AUSÊNCIA (B) DE RB220 E CULTURAS SÓLIDAS NA PRESENÇA DE RB220 (C). Perfil obtido através de eletroforese desnaturante em gel de poliácridamida 12 % e revelado por impregnação com solução de guaiacol 0,3 % (p/v) durante 3 h.

Os resultados obtidos neste trabalho para *L. crinitus* não mostraram um padrão diferente de produção de lacase entre os meios líquido e sólido avaliados. Em contrapartida, é reportada na literatura uma produção de lacase diferenciada entre meios de cultivo líquidos e sólidos para várias linhagens fúngicas. Elisashvili e colaboradores (2008) analisando a produção de lacase por sete fungos de decomposição branca (*Cerrena maxima*, *Funalia trogii*, *Trametes pubescens*, *T. versicolor*, *Coriolopsis polyzona* e *Pycnoporus coccineus*), mostraram que a quantidade de enzima produzida era drasticamente alterada dependendo da espécie do fungo, do substrato de crescimento e do método de cultivo. Em alguns casos a produção de lacase foi maior em culturas líquidas do que em culturas sólidas, independente do substrato empregado. Variações na produção de lacase em resposta a diferenças no meio de cultivo também podem ser observadas em diferentes isolados de uma mesma espécie, como observado para *P. ostreatus* (MAZUMDER *et al.*, 2009). Um isolado não identificado foi descrito por produzir duas vezes mais lacase em culturas sólidas quando comparado a meios de cultivo líquidos (MAZUMDER *et al.*, 2009), em contrapartida, para outro isolado a produção de lacase foi 5,4 vezes maior em culturas líquidas (TÉLLEZ-TÉLLEZ *et al.*, 2008).

A presença de xenobióticos, como corantes têxteis, no meio de cultivo exerce diferentes efeitos na produção de lacases. Para a linhagem de *L. crinitus* avaliada neste trabalho, a presença de RB220 no meio de cultura não afetou o nível de atividade descorante produzido, embora tenha inibido a produção de um dos polipeptídeos correspondentes à atividade de lacase. De maneira distinta, a produção da enzima por *Pleurotus calypratus* foi parcialmente inibida quando o fungo foi cultivado em meios contendo os corantes têxteis RBBR e "Orange G" (EICHLEROVÁ *et al.*, 2006). Por outro lado, a produção desta enzima pelo fungo

marinho NIOCC#2a foi induzida na presença de azul de anilina, verde brilhante, congo red e RO 176. Como pode ser observado, o efeito da suplementação do meio de cultivo com corantes sobre a produção de lacase é dependente do tipo de corante e fungo avaliados.

#### 4.1.8 Produção de enzimas com atividade descorante ao longo do tempo de cultivo

Para a obtenção do perfil de produção de enzimas com atividade descorante, os fungos foram cultivados por até 25 dias a 28 °C. Ao longo do período de incubação foram retiradas amostras dos extratos solúveis e estas foram avaliadas quanto à atividade descorante e de lacase, conforme protocolo descrito na seção 3.2.4. O meio utilizado para *L. crinitus* foi meio líquido com glucose 10 g/L e nitrato de sódio 5 g/L, pH 6,8. Para *L. sordida*, o meio líquido continha maltose e nitrato de sódio, ambos a 5 g/L, pH 6,8.

Em *L. crinitus*, o percentual de descoloração obtido a partir dos extratos solúveis permaneceu baixo até o 10° dia de cultivo (11 %). Entre o 10° e 15° dia de cultivo, observou-se um rápido aumento da atividade descorante, que apresentou um máximo de aproximadamente 90 % (Figura 30). Esta atividade foi completamente suprimida na presença de azida de sódio, que inibe a atividade de lacase (dados não mostrados). Basicamente, as atividades descorante e de lacase presente nos extratos avaliados apresentaram o mesmo comportamento ao longo do tempo de cultivo, mostrando seus maiores níveis entre os dias 15 e 20 de cultivo, com pico de produção de lacase ao redor de 7.000 UE/L. A produção de peroxidases foi significativa apenas no 25° dia de cultivo, representando cerca de 78 % da atividade de oxidase total observada. O padrão obtido para *L. sordida* foi similar àquele observado para *L. crinitus*, sendo que o pico de descoloração (69 %) e a máxima produção de enzima, 3.721 UE/L ocorreram no 15° dia de cultivo (Figura 31).

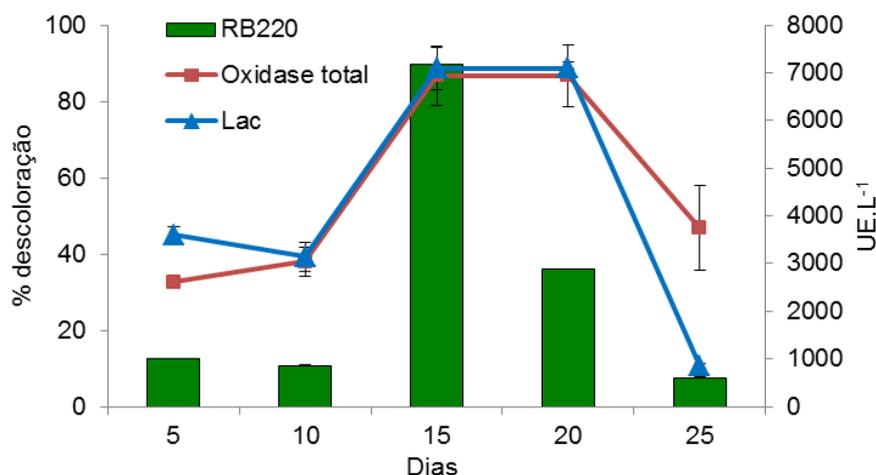


FIGURA 30 – ATIVIDADE DESCORANTE, ATIVIDADE OXIDATIVA TOTAL E DE LACASE DO EXTRATO SOLÚVEL DE *L. crinitus* AO LONGO DO TEMPO DE CULTIVO. O fungo foi cultivado em meio líquido contendo glucose 10 g/L e nitrato de sódio 5 g/L, pH 6,5 a 28 °C e aliquotas do extrato eluído foram retiradas ao longo do período de incubação em meio otimizado, e avaliadas a 600 nm para descoloração do corante RB220 e a 420 nm para testes enzimáticos. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

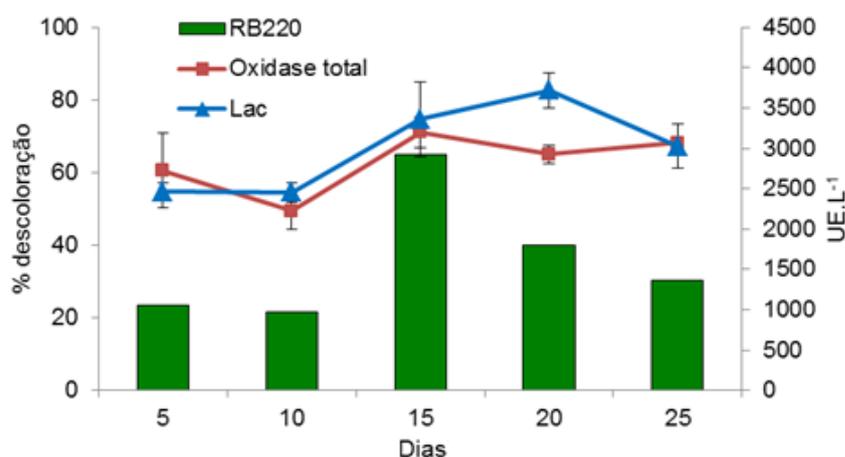


FIGURA 31 – ATIVIDADE DESCORANTE, ATIVIDADE OXIDATIVA TOTAL E DE LACASE DO EXTRATO SOLÚVEL DE *L. sordida* AO LONGO DO TEMPO DE CULTIVO. O fungo foi cultivado em meio contendo líquido glucose 10 g/L e nitrato de sódio 5 g/L, pH 6,5 a 28 °C e aliquotas do extrato eluído foram retiradas ao longo do período de incubação em meio otimizado, e avaliadas a 600 nm para descoloração do corante RB220 e a 420 nm para testes enzimáticos. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

O número de polipeptídeos com atividade de lacase produzido pelos fungos, e a concentração de cada um deles, variam em função de sua fase de crescimento, uma vez que a produção e secreção destas enzimas está relacionada às suas múltiplas funções biológicas como: delignificação, degradação de ácidos húmicos, detoxificação e polimerização de precursores de melanina (DWIVEDI *et al.*, 2011; STRONG e CLAUS, 2011). Os resultados obtidos neste trabalho corroboram estudos prévios realizados com outras linhagens fúngicas, que indicam uma máxima

produção de lacase entre o 5° e 14° dia de cultivo (SRIVIVASAN *et al.*, 1995; GNANAMANI *et al.*, 2006; ELISASHVILI e KACHLISHVILI, 2009; SIVAKUMAR *et al.*, 2010; PATRICK *et al.*, 2011). De maneira distinta, para alguns fungos o pico de produção ocorreu mais tarde, entre o 18° e 27° dia, como observado em *Lentinus squarrosulus*, *L. edodes*, *Dichomitus squalens*, *C. comatus* e *Phlebia floridensis* (ARORA e GIL, 2000; VETCHINKINA, POZDNYAKOVA, NIKITINA, 2008; LU e DING, 2010; TRIPATHI, UPADHYAY, SINGH, 2011).

Os extratos solúveis contendo lacases provenientes de 15 dias de cultivo foram utilizados nos ensaios subsequentes. O uso destes extratos, como alternativa ao uso de enzima purificada, apresentou como finalidade a obtenção de uma maior viabilidade econômica, visto que a aplicação em nível industrial requer grandes quantidades de enzima obtidas a baixo custo.

#### 4.1.9 Efeito do pH, temperatura e concentração de sal na atividade descorante e estabilidade dos extratos

A atividade descorante e a estabilidade dos extratos solúveis de *L. crinitus* e *L. sordida* foram avaliadas em uma ampla faixa de pH (3,0 - 8,0), temperaturas (4 - 70 °C) e concentrações de sal (0,05 - 0,6 M). Nas condições experimentais testadas, *L. crinitus* apresentou elevada atividade descorante (acima de 60 %) em todas as temperaturas, sendo as maiores atividades observadas entre 30 e 50 °C (Figura 32 A). Para *L. sordida*, foram observados dois picos de máxima descoloração, o primeiro a 30 °C e um segundo a 60 °C (Figura 32 C).

A máxima atividade encontrada para lacases fúngicas, na maioria dos casos, esta associada a temperaturas que variam entre 50 e 70 °C, embora algumas enzimas apresentem atividade máxima abaixo de 35 °C (BALDRIAN, 2004; BALDRIAN, 2006; WANG *et al.*, 2010). Outro isolado de *L. sordida*, descrito previamente por Cavallazzi e colaboradores (2004), apresentou máxima atividade de lacase a 45 °C, contrapondo os dados obtidos neste trabalho. Lacases produzidas por diferentes espécies de *Lentinus*, já caracterizadas, apresentam as melhores atividades em temperaturas entre 50 e 65 °C (GOSHADZE e ELISASHVILI, 1993; D'ANNIBALE *et al.*, 1996). Cadimaliev e colaboradores (2005) relataram uma lacase

*L. tigrinus* exibindo cerca de 70-100 % da atividade máxima a temperaturas entre 25 e 75 °C. Gomes e colaboradores (2009) observaram um padrão semelhante para lacases de *Lentinus* sp. e *L. strigellus*.

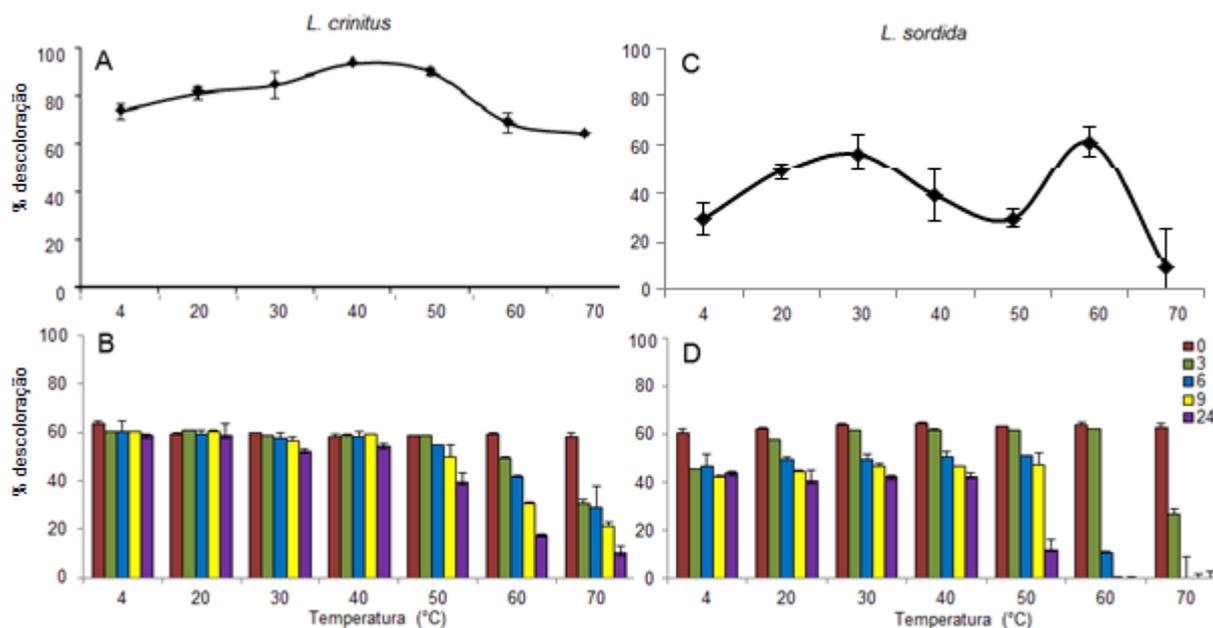


FIGURA 32 - EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DESCORANTE (A e C) E TERMOESTABILIDADE DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE *L. crinitus* E *L. sordida* (B e D). Amostras provenientes de culturas líquidas incubadas por 15 dias com pH inicial de 6,5. Os valores demonstrados na legenda da figura correspondem ao período de pré-incubação das amostras anterior à avaliação da atividade decolorante. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

As atividades decolorantes dos extratos de *L. crinitus* e *L. sordida* permaneceram estáveis (entre 70 - 100 % da máxima), por até 24 horas de incubação, em temperaturas entre 4 e 50 °C e 4 e 40 °C, respectivamente (Figuras 32 B e D). A pré-incubação em temperaturas superiores reduziu a atividade presente em ambos os extratos. Por exemplo, a pré-incubação a 70 °C acarretou perda de 50 % da atividade após 6 h para *L. crinitus* e, após menos do que 3 h para *L. sordida*.

A termoestabilidade de lacases fúngicas apresenta grande variação entre espécies (STRONG e CLAUS, 2011). Uma redução de 50 % na atividade da enzima, por pré-incubação a 50 °C, foi obtida em poucos minutos para *Galerina* sp. (IBRAHIM *et al.*, 2011), após mais de 4 horas para *Fomes fomentarius* (NEIFAR *et al.*, 2010) e somente depois de 50-70 h para *Coriolus* sp. (SMIRNOV *et al.*, 2001). Em *Lentinus polychrous*, a atividade de lacase apresentou uma meia vida de 84,5

horas quando mantida a 4 °C. O aumento da temperatura para 40 °C causou um encurtamento da meia vida para cerca de 5 horas, sendo reduzida para menos de uma hora em temperaturas superiores a 40 °C (RATANAPONGLEKA e PHETSOM, 2011). Um resultado semelhante foi obtido por Budda e colaboradores (2012) trabalhando com outro isolado de *L. polychrous*.

A avaliação da atividade descorante do extrato de *L. crinitus* em diferentes valores de pH revelou a máxima atividade (80 %) em pH 5,0, nos demais valores de pH avaliados, a atividade mostrou-se próxima da máxima (Figura 33 A). Além disso, a atividade descorante apresentou uma boa estabilidade (retenção de 70 - 100 % da atividade máxima) em valores de pH entre 4,0 e 6,0, por até 24 h (Figura 33 B). Os dados obtidos para a atividade descorante do extrato de *L. sordida* indicaram uma maior sensibilidade a alterações do pH no meio, quando comparada a *L. crinitus*. A maior atividade foi obtida em pH 4 (80 %), mantendo-se em níveis semelhantes em valores de pH entre 3,0 e 7,0. Porém, o aumento do valor de pH do meio reacional para 8 resultou em perda de 75 % do percentual de descoloração (Figura 33 C). A estabilidade do extrato foi máxima nos valores de pH 4 e 5 com perda de apenas 25 % do percentual de descoloração, mesmo após 24 h de incubação. (Figura 33 D).

A maioria das lacases fúngicas apresenta melhor atividade em valores de pHs ácidos (BALDRIAN, 2006). Lacases produzidas por espécies de *Lentinus*, já descritas na literatura, apresentaram a maior atividade em valores de pH entre 3,0 e 7,0 (GOSHADZE e ELISASHVILI, 1993; D'ANNIBALE *et al.*, 1996), embora lacases com alta atividade em meios alcalinos já tenham sido descritas. Cadimaliev e colaboradores (2005) relataram que a lacase produzida por *L. tigrinus* apresentou mais de 70 % da atividade máxima ao longo de valores de pH de 5,0 a 8,5, padrão semelhante ao obtido por Gomes e colaboradores (2009) para as lacases de *Lentinus sp.* e *L. strigellus*. Os extratos solúveis de *L. crinitus* e *L. sordida* avaliados neste trabalho apresentam maior atividade em valores de pH ácidos como o descrito para a lacase produzida por *Lentinus polychrous*, *Pleurotus eryngii*, *Trametes Trogii* e *Galerina sp.* (MUÑOZ *et al.* 1997; LEVIN, FORCHIASSIN e RAMOS, 2002; IBRAHIM *et al.*, 2011; BUDDA *et al.*, 2012).

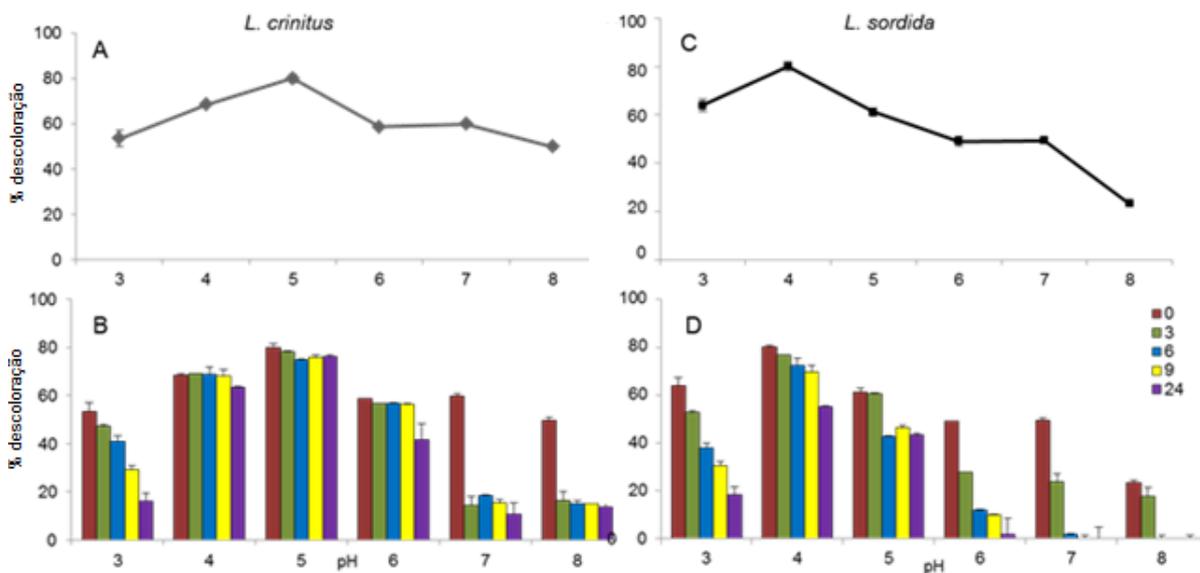


FIGURA 33 - EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DESCORANTE (A e C) E NA ESTABILIDADE DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE *L. crinitus* E *L. sordida* (B e D). Amostras provenientes de culturas líquidas incubadas por 15 dias a 28 °C. Os valores demonstrados na legenda da figura correspondem ao período de pré-incubação das amostras anterior à avaliação da atividade descorante. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

Valores de pH ácidos também estão associados a uma maior estabilidade de lacase (BOLLAG e LEONOWICZ, 1984), assim como o observado neste trabalho. A redução da atividade descorante e da estabilidade dos extratos frente a meios reacionais mais básicos pode ser decorrente do aumento do número de íons hidróxido. Estes íons podem se ligar ao arranjo tri-nuclear formado pelos centros de cobre T2 e T3 e, eventualmente, bloquear a transferência interna dos elétrons do centro T1 para o arranjo T2/T3 (BALDRIAN, 2006). A atividade residual de lacase, em um dado valor de pH, é bastante variável de acordo com o fungo avaliado. A literatura indica atividade residual em pH 5, após 24 horas de incubação, superior a 80 % para *Pycnoporus sp.* (WANG *et al.*, 2010), cerca de 50 % em *Galerina sp.* (IBRAHIM *et al.*, 2011) e apenas 30 % em *Trametes trogii* (LEVIN, FORCHIASSIN e RAMOS, 2002). Por outro lado, em alguns casos, já esta descrita uma maior estabilidade em condições alcalinas, como na lacase produzida por *Pycnoporus sp.*, que apresentou meia vida ao redor de 130 h em pH 10 (WANG *et al.*, 2010).

Quando avaliado o efeito de diferentes concentrações de NaCl, a presença de até 0,6 M de sal não afetou significativamente o percentual de descoloração do extrato de *L. crinitus*, cuja atividade foi próxima da máxima em todas as concentrações avaliadas (Figura 34 A). Para *L. sordida*, a maior descoloração (60 %) foi obtida na ausência de sal, enquanto a presença de NaCl acarretou uma

redução de 33 % na atividade (Figura 34 C). O extrato de *L. crinitus* apresentou-se estável em concentrações de sal de até 0,1 M, com redução de cerca de 30 % na descoloração, mesmo após 24 h de pré-incubação. Já na presença de 0,4 e 0,6 M de sal a atividade residual foi reduzida em até 67 % após apenas 3 h de pré-incubação (Figura 34 B). Por outro lado, o extrato de *L. sordida* apresentou baixa estabilidade na presença de sal, cerca de 80 % da descoloração foi perdida após apenas 6 h de incubação em solução de NaCl 0,05 M (Figura 34 D).

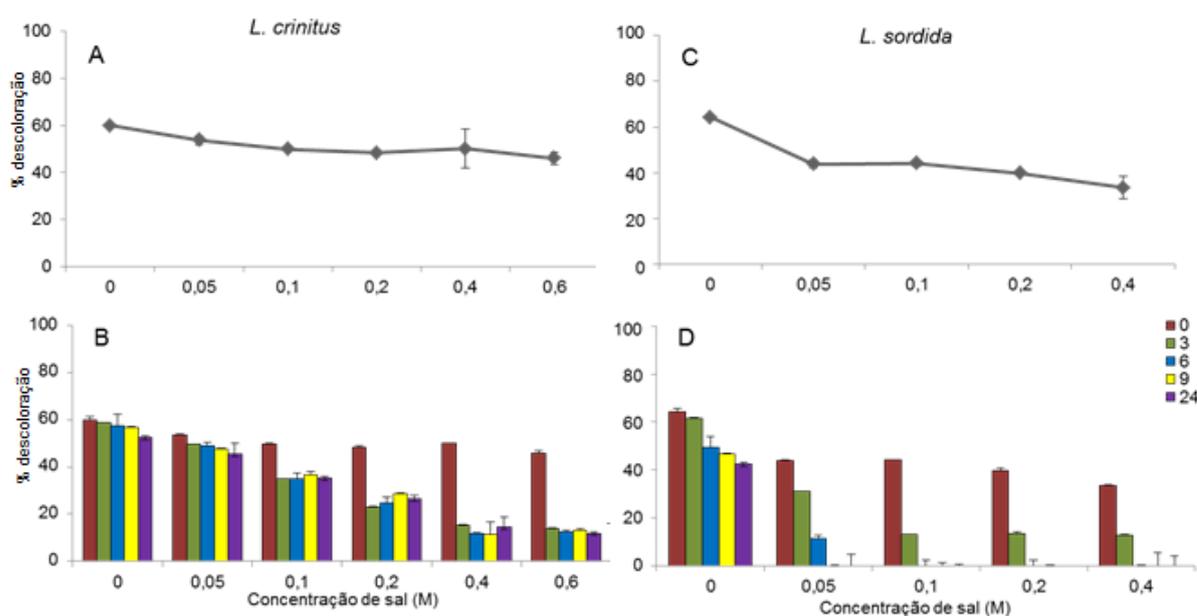


FIGURA 34 - EFEITO DA SALINIDADE NA ATIVIDADE DESCORANTE (A e C) E NA ESTABILIDADE DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE *L. crinitus* E *L. sordida* (B e D). Amostras provenientes de culturas líquidas incubadas por 15 dias a 28 °C, em pH inicial de 6,5. Os valores demonstrados na legenda da figura correspondem ao período de pré-incubação das amostras anterior à avaliação da atividade decolorante. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

A concentração de sal apresenta diferentes efeitos sobre a conformação e atividade catalítica de lacases (LI *et al.*, 2008). Encontra-se na literatura a descrição de lacases altamente sensíveis à concentração de sal no meio reacional, como no caso de *Trametes versicolor* e *Grifola frondosa* onde 0,05 M de cloreto de sódio levou a perda de 50 e 75 % da atividade de lacase, respectivamente (NITHERANONT *et al.*, 2011). Contudo, lacases com atividade resistente a meios salinos, como observado aqui, também já foram descritas como, por exemplo, a lacase de *Pycnoporus sanguineus* que apresentou mais de 50 % de atividade residual em concentrações de até 1 M de NaCl (TROVASLET *et al.*, 2007).

Os efeitos da temperatura, do pH e da concentração de sal na atividade enzimática são de suma importância no que diz respeito à utilização de enzimas em processos industriais. Os efluentes da indústria têxtil apresentam valores de pH, concentrações de sal e temperatura extremamente variáveis, em decorrência da ampla gama de processos e insumos utilizados para o tingimento das fibras. Quanto maior a faixa de ação e estabilidade das lacases frente a estes fatores, maior a chance de sucesso na sua utilização para a remoção de corantes destas águas. A atividade do extrato de *L. crinitus* se mostrou mais resistente a alterações no meio reacional quando comparada a *L. sordida*. A melhor faixa de ação para *L. crinitus* consistiu de temperaturas entre 4 e 70 °C, valores de pH entre 3 e 8 e concentrações de sal de até 0,1 M. Embora a atividade dos extratos de *L. crinitus* tenha exibido grande tolerância a alterações de temperatura e de pH, sua estabilidade frente a altas concentrações de sal foi um pouco menor. Até 70 % da atividade original foi retida em temperaturas entre 4 e 50 °C e valores de pH entre 4 e 6, após pré-incubação de até 24 h. Já para *L. sordida* a melhor faixa de ação correspondeu a temperaturas próximas a 30 e 60 °C, valores de pH entre 4 e 5 e ausência de sal.

De maneira similar a outras lacases fúngicas, a atividade descorante dos extratos solúveis de *L. crinitus* e *L. sordida* apresentaram alta estabilidade em uma ampla faixa de pH (ácidos-neutros) e temperatura, o que facilita sua aplicação em nível industrial (KUNAMNENI *et al.*, 2008b; MAJEAU *et al.*, 2010). Por outro lado, para contornar a baixa estabilidade dos extratos frente a altas concentrações de sal, é necessário avaliar mecanismos que possam a aumentar a estabilidade enzimática nestas condições.

#### 4.1.10 Efeito de íons metálicos e inibidores de lacase na atividade descorante

Diferentes íons metálicos foram avaliados quanto ao seu efeito na atividade descorante de extratos solúveis de *L. crinitus* e *L. sordida* sobre o corante RB220. Para isso, diferentes íons metálicos foram adicionados ao meio reacional (seção 3.2.4). A influência destes íons na descoloração foi variável, de acordo com o tipo de íon metálico, bem como de sua concentração. Para o extrato solúvel de *L. crinitus*,

de maneira geral, a atividade descorante sofreu pequenas alterações na presença dos íons em concentrações entre 2 e 10 mM, considerando que para todos eles a atividade residual foi igual ou superior a 70 % da máxima. Concentrações de 50 mM dos íons cobre, magnésio e alumínio resultaram em drástico decréscimo da atividade descorante. De maneira particular, a presença de íons ferro, em qualquer concentração, foi extremamente deletéria para a atividade avaliada. Já a introdução de íons zinco 2 mM no meio reacional causou aumento da atividade descorante em 16 % (Figura 35).

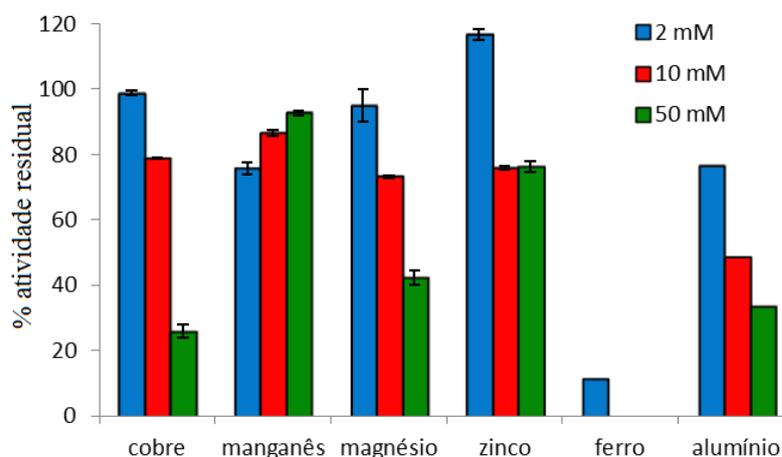


FIGURA 35 – EFEITO DE ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE DESCORANTE DE EXTRATOS SOLUVEIS DE *L. crinitus*. Amostras provenientes de culturas líquidas cultivadas por 15 dias a 28 °C em pH inicial de 6,5. Os valores foram obtidos após 90 min de incubação do extrato solúvel do fungo em solução de corante 0,1 g/L contendo sais dos íons acima citados. A legenda mostra a concentração do íon adicionada ao ensaio. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

O extrato solúvel de *L. sordida* foi extremamente sensível à presença de qualquer concentração de íons de ferro e alumínio, perdendo boa parte da sua atividade descorante. Já para os íons cobre, magnésio e zinco, o efeito inibidor foi evidente nas maiores concentrações avaliadas (10 e 50 mM). O manganês foi o único íon cuja presença (50 mM) resultou em melhora da atividade descorante, com aumento de 22 % na atividade residual (Figura 36).

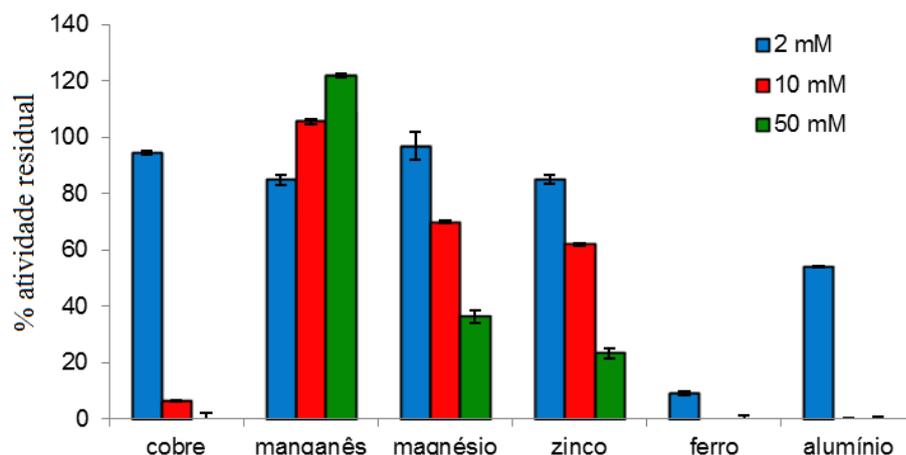


FIGURA 36 – EFEITO DE ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE DECOLORANTE DE EXTRATOS SOLÚVEIS DE *L. sordida*. Amostras provenientes de culturas líquidas incubadas por 15 dias a 28 °C em pH inicial de 6,5. Os valores foram obtidos após 90 min de incubação do extrato solúvel do fungo em solução de corante 0,1 g/L contendo sais dos íons acima citados. A legenda mostra a concentração do íon adicionada ao ensaio. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

Águas residuais da indústria têxtil apresentam diferentes sais em sua composição. Do ponto de vista biotecnológico, a presença de íons metálicos pode afetar o uso de lacases no tratamento de efluentes, uma vez que estes íons podem inibir a atividade enzimática (MURUGESAN *et al.*, 2009; LATIF *et al.*, 2010, YOUSHUANG *et al.*, 2011). Embora relatos na literatura a respeito das linhagens avaliadas neste trabalho sejam escassos, estudos têm reportado lacases de outros microrganismos com tolerância a íons metálicos. Guo e colaboradores (2011) reportaram para *Polyporus sp.*, uma melhora do desempenho enzimático quando adicionados íons zinco e manganês ao meio reacional, de maneira semelhante à observada no presente estudo. Por outro lado, estes mesmos íons não afetaram a atividade das lacases de *Ganoderma lucidum* e *Trametes versicolor* (MURUGESAN *et al.*, 2009; YOUSHUANG *et al.*, 2011), mas inibiram, no caso do íon manganês, a atividade de lacase em *Paraconiothyrium variabile* (FOROOTANFAR *et al.*, 2011).

Os extratos de *L. crinitus* e *L. sordida* demonstraram alta sensibilidade à presença de íons ferro (inibição total). Da mesma maneira, este efeito já foi demonstrado para outras linhagens fúngicas como, por exemplo, *Trametes versicolor* (YOUSHUANG *et al.*, 2011) e *Polyporus sp.* (GUO *et al.*, 2011). Os íons ferro reagem com alguns resíduos de aminoácidos importantes à atividade de lacase (IBRAHIM *et al.*, 2011), o que pode acarretar uma inibição da atividade enzimática, como aquela observada neste estudo. Por outro lado, o aumento da atividade residual observada para o extrato de *L. sordida* na presença de 50 mM de íons

mangânês pode estar relacionado com a atividade redox deste íon, que promove oxidação de substratos da enzima (MUÑOZ *et al.*, 1997).

Quando verificado o efeito da adição de inibidores convencionais de metaloenzimas, como azida sódica e EDTA, ao meio reacional, foi observado que a presença de 0,1 mM de azida de sódio causou inibição total da atividade descorante, tanto para *L. sordida* quanto para *L. crinitus* (Figura 37 A e B, respectivamente). A atividade descorante de ambos os extratos foi também sensível à presença do EDTA, já que esta foi reduzida à medida que a concentração de EDTA no meio foi aumentada, chegando a valores próximos de 35 e 40 % de atividade residual na presença de 5 mM deste inibidor. O comportamento observado na presença de ambos os inibidores está de acordo com estudos anteriores e fornece mais uma evidência de que a enzima envolvida é uma lacase (FOROOTANFAR *et al.*, 2011; YOUSHUANG *et al.*, 2011; NITHERANONT *et al.*, 2011).

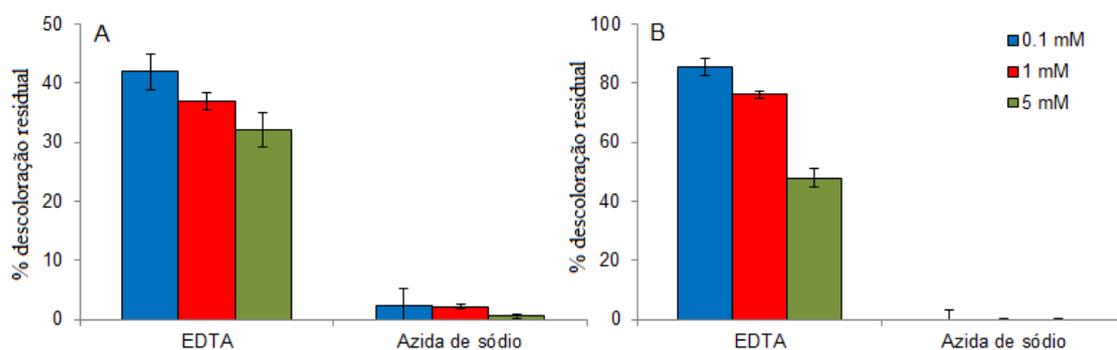


FIGURA 37 – EFEITO DE INIBIDORES DE METALOENZIMAS NA ATIVIDADE DESCORANTE DO SOBRENADANTE DE *L. sordida* (A) E *L. crinitus* (B). Amostras provenientes de culturas líquidas incubadas por 15 dias a 28 °C em pH inicial de 6,5. Os valores foram obtidos após 90 min de incubação do extrato solúvel do fungo em solução de corante 0,1 g/L contendo sais dos íons acima citados. A legenda mostra a concentração do íon adicionada ao ensaio. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

#### 4.1.11 Atividade descorante dos extratos solúveis sobre outros corantes têxteis e de uso em laboratório

Vinte corantes, com diferentes estruturas, foram incubados com extratos solúveis de *L. crinitus* e *L. sordida* para a determinação da atividade descorante após 90 min e 24 h de incubação. O extrato de *L. crinitus* descoloriu significativamente os corantes RB220, RB198 e AB193 (76, 54 e 30 %, respectivamente).

respectivamente) após 90 min de incubação. Com o aumento do período de incubação para 24 h, outros três corantes (AB194, B-Smax e VM), passaram a ser alvos da enzima, resultando em 30-93 % de descoloração (Figura 38). O extrato solúvel de *L. sordida* descoloriu os corantes RB220, AB194, RB198 e RR195, após 90 min de incubação e, com o aumento do período de incubação para 24 h, os corantes B-Smax e AB193 também passaram a ser substratos do extrato (Figura 39).

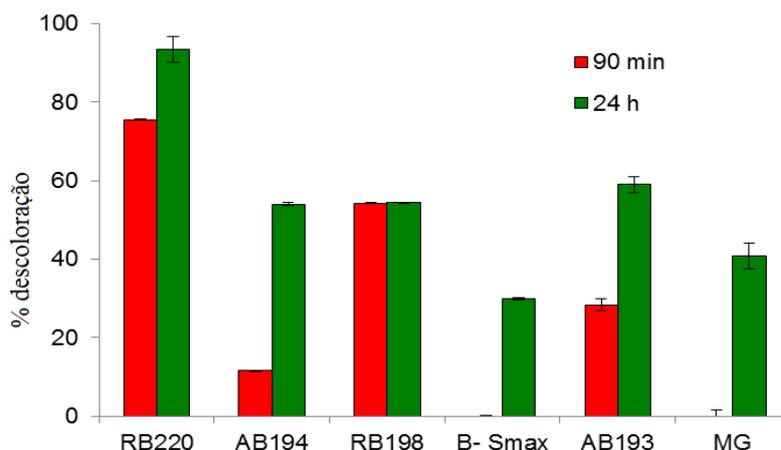


FIGURA 38 – ATIVIDADE DESCORANTE DO SOBRENADANTE DE *L. crinitus* SOBRE DIFERENTES CORANTES TÊXTEIS E DE USO LABORATORIAL. Amostras provenientes de culturas líquidas incubadas por 15 dias a 28 °C em pH inicial de 6,5. Os valores foram obtidos após 90 min e 24 h de incubação do extrato solúvel do fungo em solução de corante 0,1 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

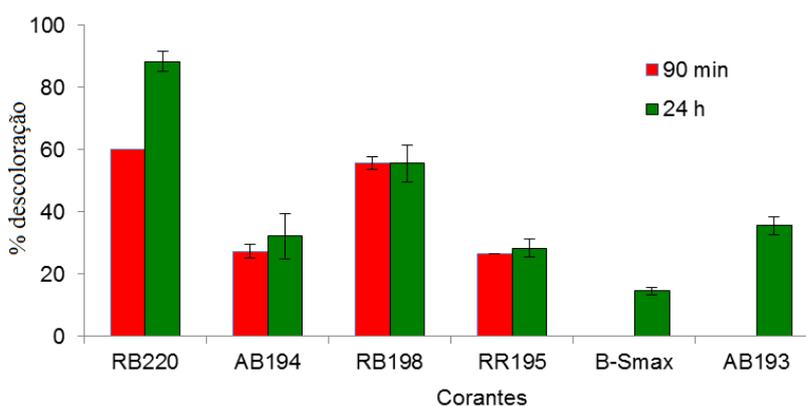


FIGURA 39 – ATIVIDADE DESCORANTE DO SOBRENADANTE DE *L. sordida* SOBRE DIFERENTES CORANTES TÊXTEIS E DE USO LABORATORIAL. Amostras provenientes de culturas líquidas incubadas por 15 dias a 28 °C em pH inicial de 6,5. Os valores foram obtidos após 90 min e 24 h de incubação do extrato solúvel do fungo em solução de corante 0,1 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

A capacidade dos fungos da decomposição branca em degradar corantes têxteis sintéticos de diferentes estruturas é bastante variável, sendo alterada tanto pela linhagem fúngica utilizada bem como pelo substrato presente. A avaliação do

potencial de descoloração de 18 linhagens fúngicas sobre cinco corantes têxteis reativos, realizada por Heinfling e colaboradores (1997), indicou que apenas *Bjerkandera adusta*, *T. versicolor* e *P. chrysosporium* apresentaram capacidade de descolorir todos os corantes avaliados. Da mesma forma, Knapp e colaboradores (1995), ao avaliar a capacidade de sete isolados fúngicos em descolorir 14 corantes de estrutura variada, obtiveram grandes diferenças nos resultados. O fungo *Piptoporus betulinus* foi capaz de causar grande descoloração em apenas um corante (índigo carmine), já *P. chrysosporium* descoloriu quatro corantes (índigo carmine, reactive red 4, orange II, cristal violeta e verde brilhante), enquanto outras duas cepas não identificadas chegaram a apresentar altos valores de descoloração sobre até 11 corantes mesmo na ausência de mediadores redox.

Os extratos de secreção dos fungos avaliados neste trabalho apresentaram capacidade de descolorar 6 dos 20 corantes testados. A fim de expandir o número de substratos descoloridos pelos extratos solúveis das culturas de *L. crinitus* e *L. sordida*, mediadores redox naturais (ácido *p*-coumárico, vanilina, siringaldeído e acetosiringona) foram adicionados ao teste de descoloração.

O conjunto total dos resultados obtidos para o extrato solúvel de *L. crinitus*, após 24 de incubação, encontra-se na Tabela 6. A presença de siringaldeído como mediador, após 24 h de incubação, resultou em perda de cor para quatro corantes adicionais (RR198, R-Smax, RR120 e AB). Na presença deste mediador, a atividade descorante obtida para os diferentes substratos variou entre 39 e 94% após 24 h de incubação (Figura 40). Similarmente, o uso de acetosiringona resultou em aumento do número de substratos alvo da enzima de 6 para 12, com eficiências de descoloração entre 20 e 95 % (Tabela 6).

A introdução de ácido *p*-coumárico e vanilina como mediadores de oxido-redução acarretou em redução da eficiência de descoloração na maioria dos casos (Tabela 6). Quando o corante RB220 foi utilizado como mediador redox, este acarretou em torno de 10% de descoloração no corante RY135, após 24 h de incubação, sendo o único mediador capaz de induzir a perda de cor para este corante. Nos demais casos, a presença de RB220 não afetou ou reduziu a descoloração. A presença de mediadores redox, na ausência da enzima, não causou descoloração em nenhum dos substratos.

TABELA 6 – ATIVIDADE DESCORANTE DO SOBRENADANTE DE *L. crinitus* SOBRE DIFERENTES CORANTES TÊXTEIS E DE USO LABORATORIAL NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE MEDIADORES REDOX 1 mM, APÓS 24 h.

Corante	Sem mediador	ácido p-coumárico	Vanilina	acetosiringona	siringaldeído	RB220
RB220	93,5 ± 3,15	77,16 ± 0,56	38,1 ± 5,65	86,9 ± 2,19	94,3 ± 0,07	
RY107	0,04 ± 0,87	0 ± 0,75	0 ± 2,14	0 ± 0,129	0,12 ± 5,79	0,43 ± 2,82
RR198	0 ± 1,65	0 ± 1,06	0 ± 5,51	88,7 ± 0,35	78,1 ± 3,25	0 ± 4,17
AB194	54 ± 0,35	29,16 ± 0,01	18 ± 6,4	44,9 ± 1,06	53,7 ± 0,14	21,3 ± 0,49
R-Smax	0 ± 0,66	0 ± 2,05	0 ± 4,31	92 ± 1,06	84 ± 0,84	0 ± 0,84
RR120	0 ± 0,47	0 ± 4,31	0 ± 0,42	64,3 ± 0,98	39,2 ± 0,09	0 ± 3,36
RB198	54,4 ± 0,12	65,22 ± 0,28	51,9 ± 1,37	76,4 ± 0,71	48,3 ± 1,55	44,8 ± 0,75
RY153	0 ± 0,58	0 ± 1,9	0 ± 0,91	0,08 ± 1,97	0 ± 7,42	9,17 ± 0,12
R-PF3B	0 ± 0,36	0 ± 5,37	0 ± 6,29	16 ± 2,12	0 ± 0,84	0 ± 0,99
RR195	0 ± 0,02	0 ± 0,03	0 ± 1,67	2,59 ± 1,55	0 ± 0,98	0 ± 0,28
B- Smax	29,9 ± 0,24	51,17 ± 0,28	32,2 ± 0,56	72,7 ± 0,92	74,5 ± 1,69	17,1 ± 7,14
RY84	0,15 ± 5,76	0 ± 0,98	0,14 ± 0,98	0,03 ± 2,61	0 ± 2,05	0 ± 1,12
RR141	0 ± 1,57	0 ± 0,91	0 ± 0,01	0 ± 1,55	0 ± 0,35	0 ± 0,28
AB193	59 ± 2,02	44,15 ± 6,78	41,8 ± 2,19	83,8 ± 3,45	78,4 ± 2,75	43,6 ± 2,82
CHEXL	0 ± 5,81	0 ± 0,32	0 ± 0,29	0 ± 4,1	0 ± 0,95	0 ± 0,09
CG-250	0,66 ± 0,02	0,323 ± 0,01	0 ± 0,77	56,4 ± 4,24	1,13 ± 0,35	0 ± 0,17
AB	0 ± 0,06	0,463 ± 0,56	0 ± 0,49	87,6 ± 1,62	51,7 ± 5,37	0,14 ± 6,79
AM	0,78 ± 0,06	0 ± 18,1	0,07 ± 0,49	0 ± 0,7	0,14 ± 1,62	0 ± 0,28
VM	40,9 ± 3,25	46,24 ± 3,04	60,1 ± 0,35	65 ± 0,35	83 ± 1,04	47,7 ± 1,37
EO	0 ± 0,19	0 ± 2,05	0 ± 0,08	0 ± 0,38	0,61 ± 0,12	0 ± 1,06

NOTA: Os valores estão representados na forma: média ± desvio padrão (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

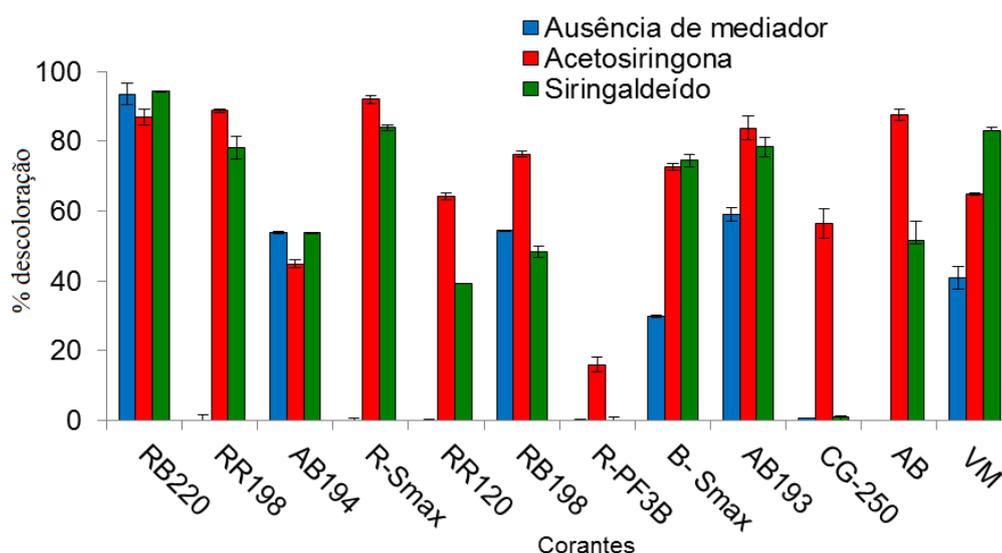


FIGURA 40 – ATIVIDADE DESCORANTE DO SOBRENADANTE DE *L. crinitus* SOBRE DIFERENTES CORANTES TÊXTEIS E DE USO LABORATORIAL NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE 1 mM de MEDIADORES REDOX. Amostras provenientes de culturas líquidas incubadas por 15 dias a 28 °C em pH inicial de 6,5. Os valores foram obtidos após 24 h de incubação do extrato solúvel do fungo em solução de corante 0,1 g/L na presença e ausência de mediadores redox 1 mM. A legenda mostra o mediador adicionado ao experimento. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

O extrato solúvel de *L. sordida*, na ausência de mediadores redox, causou descoloração em 6 corantes: RB220, AB194, RB198, RR195, B-Smax e AB193. A introdução de siringaldeído no ensaio elevou o número de substratos para 9, com eficiências de descoloração entre 28 e 84 %, após 24 h de incubação. Este mediador tornou os corantes RR 198, R-Smax e VM alvos da enzima (Figura 41). Resultados similares foram obtidos na presença de acetosiringona (Tabela 7), mas o número de substratos descoloridos aumentou para 11 no mesmo período de incubação, com porcentagens de descoloração variando de 16 a 87 %. Neste caso, os corantes RPF3B e AB também foram descoloridos pelo extrato. A introdução de ácido *p*-coumárico, vanilina e RB220 não acarretou aumento do número de substratos da enzima (Tabela 7).

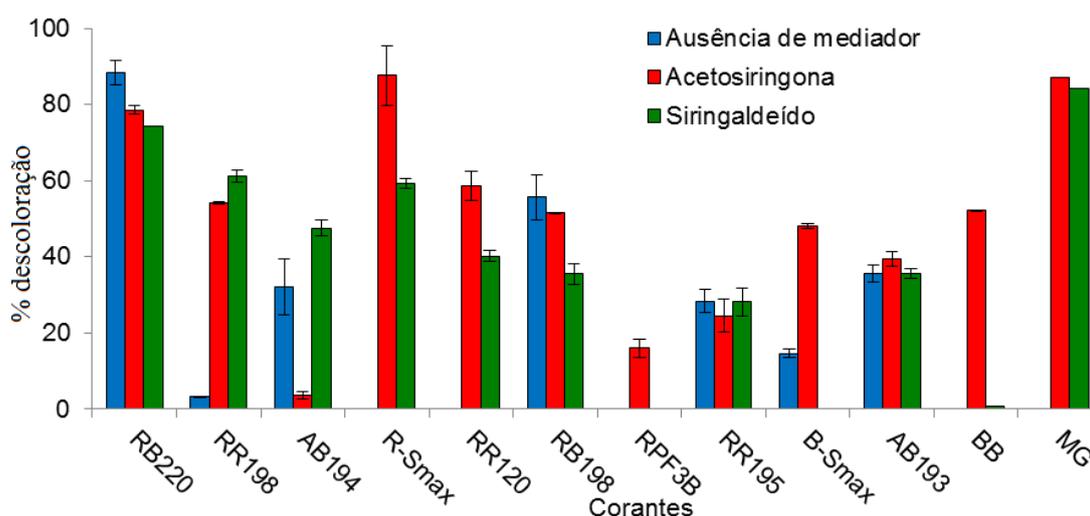


FIGURA 41 – DESCOLORAÇÃO DO SOBRENADANTE DE *L. sordida* SOBRE DIFERENTES CORANTES TÊXTEIS E DE USO LABORATORIAL NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE 1 mM DE MEDIADORES REDOX. Amostras provenientes de culturas líquidas incubadas por 15 dias a 28 °C em pH inicial de 6,5. Os valores foram obtidos após 24 h de incubação do extrato solúvel do fungo em solução de corante 0,1 g/L na presença e ausência de mediadores redox 1 mM. A legenda mostra o mediador adicionado ao experimento. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

Tanto para *L. crinitus* quanto para *L. sordida*, o aumento do tempo de incubação e a introdução dos mediadores redox naturais no ensaio de descoloração elevaram o número de substratos alvo dos extratos. De acordo com Cañas e Camarero (2010), a eficiência de sistemas lacase-mediador em degradar compostos recalcitrantes tem sido bem demonstrada, porém o elevado custo e a possível toxicidade dos mediadores artificiais dificulta a sua aplicação à escala industrial. Por

outro lado, o uso de mediadores naturais, disponíveis a partir de lignocelulose, pode contribuir para a implementação industrial de lacases.

TABELA 7 – ATIVIDADE DESCORANTE DO SOBRENADANTE DE *L. sordida* SOBRE DIFERENTES CORANTES TÊXTEIS E DE USO LABORATORIAL NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE MEDIADORES REDOX 1 mM, APÓS 24 h.

Corante	sem mediador	ácido p-coumárico	vanilina	acetosiringona	siringaldeído	RB220
RB220	88,4 ±3,16	66,8 ±0,01	45,98 ±2	78,51 ±1,09	74,22 ±0,06	
RY107	0 ± 0,06	0 ±0,58	0 ±0,01	0 ±0,12	0 ±0,22	0 ± 0,01
RR198	3,21 ± 0,1	0 ±0,53	81 ±4,1	54,08 ±0,25	61,25 ±1,54	0,24 ± 0,09
AB194	32,14 ±7,35	20,87 ±3,47	3,16 ±2,01	3,62 ±0,99	47,54 ±2,01	9,1 ± 1,06
R-Smax	0 ±0,04	0 ±0,8	27,73 ±6,25	87,65 ±7,82	59,22 ±1,22	2,93 ± 0,01
RR120	0 ±0,03	0 ±2,27	0 ±0,01	58,58 ±3,95	40,18 ±1,45	37,42 ± 0,66
RB198	55,65 ±5,9	62,95 ±1,12	54,76 ±1,6	51,49 ±0,15	35,54 ±2,75	54,21 ± 0,25
RY153	0 ±0,16	0 ±0,05	0 ±0,04	0 ±0,05	0 ±0,05	0 ± 0,04
R-PF3B	0 ±0,02	0 ±0,01	0 ±0,01	16,01 ±2,41	0 ±0,25	0 ± 0,04
RR195	28,35 ±2,96	0 ±0,02	26,05 ±0,93	24,48 ±4,32	28,09 ±3,65	19,01 ± 1,09
B- Smax	14,6 ±1,24	11,36 ±0,97	5,67 ±0,06	48,11 ±0,56	0 ±0,37	17,92 ± 4,16
RY84	0 ±0,58	0 ±0,02	0 ±0,22	0 ±0,34	0 ±0,39	0 ± 0,01
RR141	8,56 ±2,99	1,9 ±0,96	0 ±0,21	5,4 ±0,09	0 ±0,12	0 ± 0,01
AB193	35,58 ±2,15	36,55 ±2,45	38,92 ±1,96	39,48 ±2,01	35,69 ±1,24	36,71 ± 1,09
CHEXL	0 ±0,81	0 ±0,02	0 ±0,21	0 ±0,23	0 ±0,18	0 ± 0,01
CG-250	3,42 ±0,02	0 ±0,03	0 ±0,03	0 ±0,06	0,37 ±0,02	0,28 ± 0,08
AB	0 ±0,01	0,21 ±0,04	6,10 ±0,03	52,08 ±0,06	0,65 ±0,01	0 ± 0,07
AM	0 ±0,02	0 ±0,03	0,23 ±0,05	2,14 ±0,07	0,32 ±0,01	0,22 ± 0,06
VM	0 ±0,03	0 ±0,03	0,00 ±0,02	87,07 ±0,061	84,14 ±0,06	0 ± 0,07
EO	0,07 ±0,01	2,7 ±0,03	1,43 ±0,01	0 ±0,04	5,2 ±0,01	0 ± 0,04

NOTA: Os valores estão representados na forma: média ± desvio padrão (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

Do mesmo modo ao obtido neste trabalho, mediadores naturais tipo-siringil, como acetosiringona e siringaldeído, foram selecionados como os melhores mediadores para lacases provenientes de várias fontes como *Coriolopsis gallica*, *Trametes versicolor* e *P. cinnabarinus* (BIBI e BHATTI, 2002; CAMARERO *et al.*, 2005; NOUSIAINEN *et al.*, 2009; TORRES-DUARTE *et al.*, 2009; MOYA *et al.*, 2010). Estes mediadores apresentam dois substituintes metoxi nas posições orto do grupamento fenol que são rapidamente oxidados por lacases, esta oxidação gera uma alta concentração de radicais livres estáveis que podem estar relacionados a eficiência destes compostos (CAMARERO *et al.*, 2005; CAÑAS e CAMARERO, 2010). Além disso, tanto acetosiringona quanto siringaldeído são derivados fenólicos de presença natural em plantas e assim, não são considerados moléculas

xenobióticas, o que aumenta a possibilidade de aplicação com o intuito de tornar mais abrangente à atividade das lacases.

A verificação de que os mediadores redox ampliam o número de substratos usados pelas enzimas descritas neste estudo, levanta a necessidade de determinar a melhor relação entre a concentração de enzima, de mediador e de substrato no meio reacional. Embora tenha sido demonstrado que o número e tipos de substituições na estrutura do corante aromático influenciam a susceptibilidade à oxidação enzimática (ALMANSA *et al.*, 2004), neste trabalho não foi observada uma preferência particular das enzimas, ou do mediador, por uma classe específica de corantes. Estes resultados indicam um grande potencial de utilização destes extratos para descoloração de diversos corantes com estruturas químicas diferentes. Contudo, uma alta atividade descorante dos extratos frente a vários corantes não está diretamente relacionada à redução de toxicidade dos corantes alvo. Os metabólitos gerados da quebra da molécula do corante podem ser até mesmo, mais tóxicos que a molécula original do corante. Moya e colaboradores (2010) obtiveram grande descoloração, através de sistema lacase-acetosiringona, da maioria dos corantes têxteis avaliados, porém a perda de cor dos substratos alvo da enzima não foi acompanhada pela redução da toxicidade de seus metabólitos. Os produtos de descoloração dos corantes laranja de metila e Orange II apresentaram valores de toxicidade que foram 200 % maiores quando comparados aos da molécula de corante antes do tratamento (MOYA *et al.*, 2010). Portanto, é necessária a avaliação de quais produtos foram gerados, bem como da toxicidade de cada um dos produtos originados desta quebra.

#### 4.1.12 Atividade descorante dos extratos enzimáticos sobre banhos de tingimento da indústria têxtil

A atividade descorante dos extratos solúveis de *L. crinitus* e *L. sordida* sobre os banhos de tingimento vermelho, amarelo, azul e violeta foi avaliada, inicialmente sem ajuste prévio do valor de pH (ao redor de 11). Neste caso, não foram observados resultados significativos, mesmo na presença de mediadores redox (dados não mostrados). Quando realizado o prévio ajuste do valor de pH dos banhos

de tingimento para 5, o extrato solúvel de *L. crinitus* causou 40 e 55 % de descoloração nos banhos de tingimento azul e violeta, respectivamente. A presença de mediadores redox não estimulou a descoloração do banho violeta, porém a descoloração do banho azul foi aumentada para 70 % na presença dos mediadores vanilina e acetosiringona, respectivamente (Figura 42).

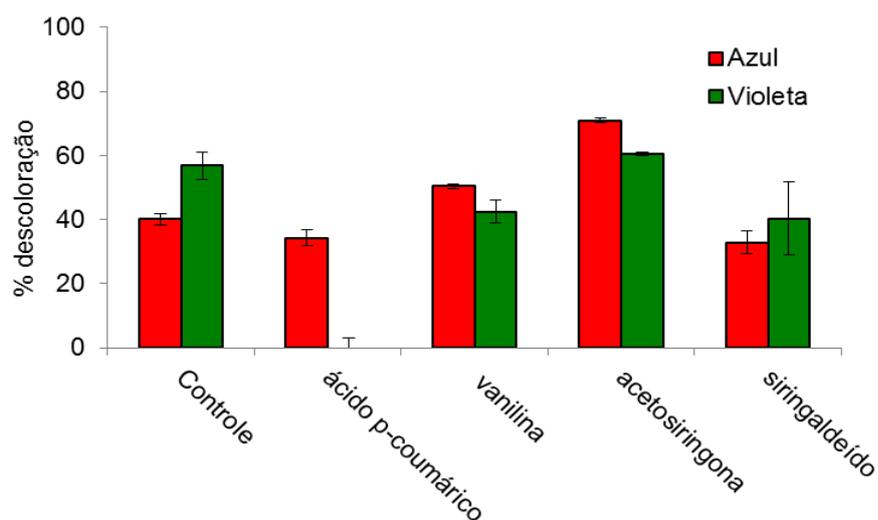


FIGURA 42 – ATIVIDADE DESCORANTE DO SOBRENADANTE DE *L. crinitus* SOBRE DIFERENTES BANHOS DE TINGIMENTO, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE MEDIADORES REDOX. Amostras provenientes de culturas líquidas incubadas por 15 dias a 28 °C em pH inicial de 6,5. Os valores foram obtidos após 24 h de incubação do extrato solúvel do fungo com banhos de tingimento da indústria têxtil na presença e ausência de mediadores redox a 1 mM. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

O extrato solúvel de *L. sordida*, na ausência de mediador, causou descoloração de cerca de 10 % para o banho de tingimento violeta, e não apresentou efeito significativo sobre o banho azul. Acetosiringona foi o mediador redox que apresentou os melhores resultados, com descolorações de 15 e 20% para os banhos violeta e azul, respectivamente (Figura 43); a presença de vanilina inibiu a descoloração em ambos os banhos. A descoloração realizada pelos extratos solúveis sobre os demais banhos de tingimento não foi significativa.

Os extratos avaliados neste trabalho apresentaram capacidade de descolorir os banhos de tingimento azul e violeta, em um percentual similar aos encontrados na literatura. O extrato solúvel de *L. crinitus* (3,5 UE/L) causou, após 24 horas de incubação, descolorações de 55 e 70 % dos banhos de tingimento violeta e azul, respectivamente. Já o extrato de *L. sordida* (1,7 UE/L) reduziu a cor dos banhos violeta e azul em 15 e 20 %, respectivamente, após 24 horas de incubação. Os resultados obtidos para os extratos avaliados neste trabalho, quando comparados a

dados da literatura, apresentaram atividade dentro da média observada. O extrato enzimático de *C. unicolor*, adicionado em uma concentração final de 500 UE/L a 4 banhos de tingimento, resultou em descoloração entre 48 e 90 %, dependendo do corante presente após 20 h de incubação. A adição de acetosiringona reduziu a remoção de cor em todos os casos (MOILANEN *et al.*, 2010). Da mesma maneira, o extrato solúvel de *Trametes trogii* (lacase a 9.000 UE/L) causou 10% de descoloração no efluente têxtil após 9 h de incubação. A adição de acetosiringona, siringaldeído ou vanilina causou apenas um pequeno aumento na descoloração (KHLIFI *et al.*, 2010). A utilização de extratos solúveis de *P. ostreatus* contendo lacase na descoloração de um efluente composto por corantes ácidos acarretou mais de 30% de perda de cor em 1 h de incubação com 1000 UE/L. Porém, este extrato não apresentou efeito algum sobre efluentes contendo corantes diretos e reativos (FARACO *et al.*, 2009).

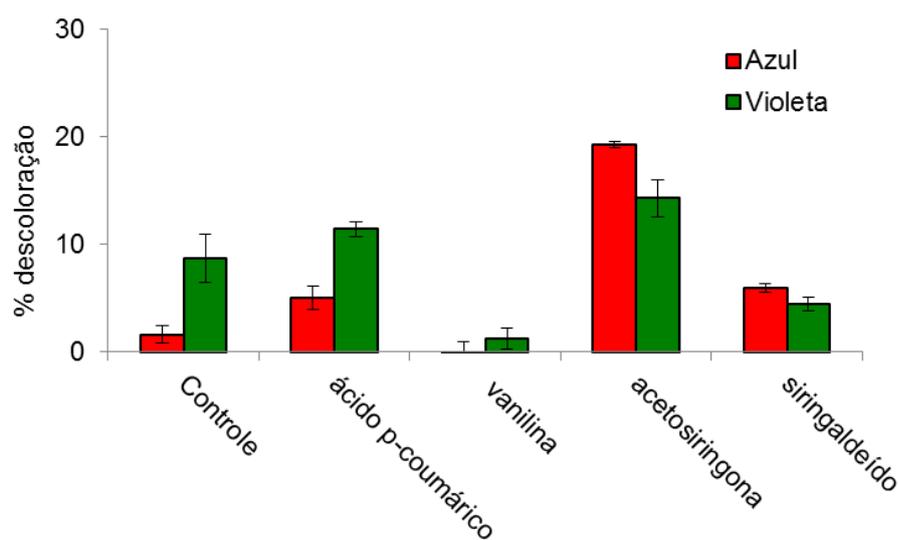


FIGURA 43 – ATIVIDADE DESCORANTE DO SOBRENADANTE DE *L. sordida* SOBRE DIFERENTES BANHOS DE TINGIMENTO, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE MEDIADORES REDOX. Amostras provenientes de culturas líquidas incubadas por 15 dias a 28 °C em pH inicial de 6,5. Os valores foram obtidos após 24 h de incubação do extrato solúvel do fungo com banhos de tingimento da indústria têxtil na presença e ausência de mediadores redox a 1 mMAs barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

Os extratos de *L. crinitus* e *L. sordida*, avaliados neste trabalho, não agiram sobre o banho amarelo, o que era esperado uma vez que em nenhuma das condições, as linhagens avaliadas foram capazes de descolorir o corante amarelo RY 107. De maneira distinta ao esperado, embora os extratos das duas cepas degradem o corante RR198 isoladamente, não foi observado efeito algum sobre o banho de tingimento vermelho. Possivelmente, o alto teor de sal presente no banho

de tingimento foi responsável pela inibição da atividade enzimática, ou ainda, alterou a interação entre lacase e os mediadores. Este fato indica que um mediador útil em sistemas controlados pode não ser eficiente em banhos de tingimento reais, porém uma maior eficiência de descoloração pode ser obtida através da otimização da relação enzima/mediador/banho de tingimento. No caso de banhos de tingimentos novamente é necessária à avaliação dos produtos formados.

#### 4.1.13 Efeito de compostos aromáticos na produção de atividade descorante e produção de lacase

A seguir foi avaliado o efeito de vários compostos aromáticos, como álcool veratril, veratraldeído, catecol, vanilina, *p*-anisidina, ácido ferúlico e ácido gálico, na produção de enzimas com atividade descorante e produção de lacase. A adição destes compostos no meio de cultivo de *L. crinitus* acarretou um aumento na produção de lacase na maioria dos casos. Na presença de veratraldeído foi obtida a máxima atividade de lacase 18.676 UE/L, que foi 2,5 vezes maior que a obtida na ausência de compostos aromáticos. A atividade descorante realizada por extratos derivados de culturas suplementadas com compostos aromáticos foi próxima ao máximo na presença de quase todos os compostos, após 90 min de incubação. Portanto, a atividade descorante foi reavaliada com 45 min de incubação. Após este período, foi observada indução da produção de atividade descorante em 15 e 17 % somente na presença de veratraldeído e ácido ferúlico, respectivamente (Figura 44).

Os zimogramas obtidos a partir de amostras derivadas de culturas de *L. crinitus* suplementadas com compostos aromáticos demonstraram um padrão de dois polipeptídeos, com massas moleculares de 41 e 38 kDa, com atividade de lacase. Contudo, a adição de álcool veratril ao meio de cultivo inibiu o aparecimento desses polipeptídeos e induziu o aparecimento de uma banda ativa de 45 kDa. Por outro lado, quando ácido gálico foi adicionado ao meio de cultivo, somente um polipeptídeo (38 kDa) ativo foi observado (Figura 45). A presença dos demais indutores no meio de cultivo resultou apenas na alteração na intensidade de atividade dos polipeptídeos.

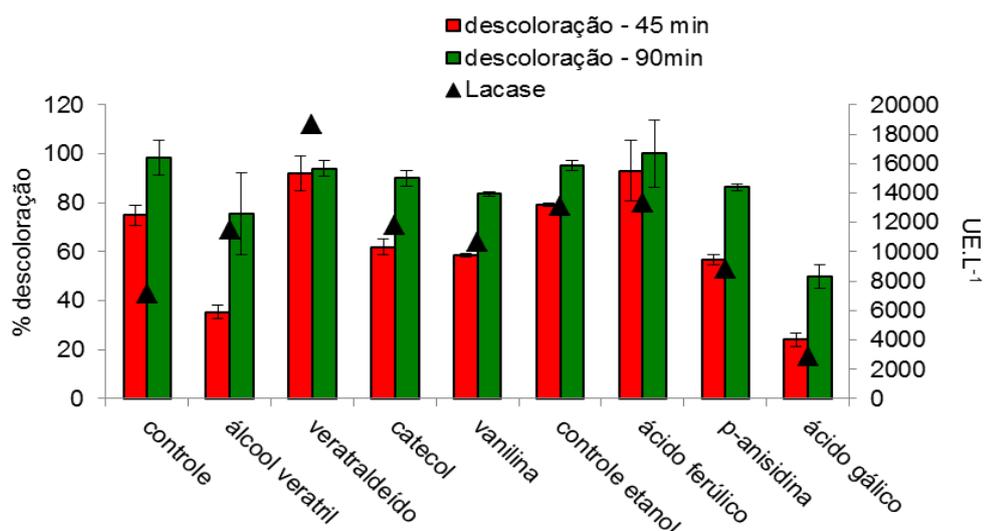


FIGURA 44 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DAS CULTURAS COM COMPOSTOS AROMÁTICOS NA PRODUÇÃO DE LACASE E ATIVIDADE DESCORANTE DO SOBRENADANTE DE *L. crinitus*. Amostras provenientes de culturas líquidas incubadas por 15 dias a 28 °C em pH inicial de 6,5 na presença de 1 mM de cada composto aromático. Os valores foram obtidos após 45 e 90 min de incubação do extrato solúvel do fungo com RB220 1 g/L. A legenda mostra o tempo de descoloração avaliado e a produção de lacase. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

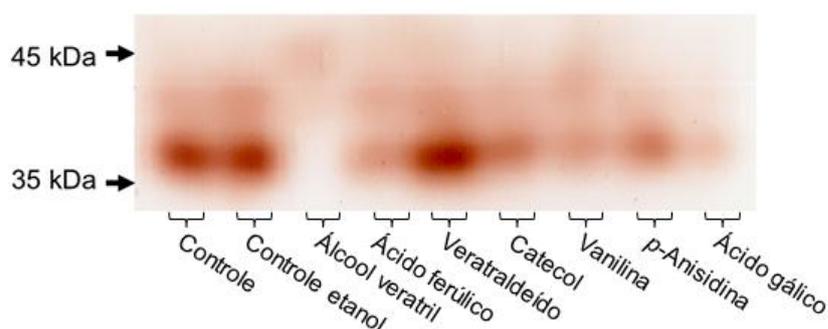


FIGURA 45 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DAS CULTURAS COM COMPOSTOS AROMÁTICOS NO PERFIL DE ATIVIDADE EM GEL DE *L. crinitus*. Perfil obtido através de eletroforese desnaturante em gel de acrilamida 12 % e revelado por impregnação com solução de guaiacol 0,3 % (v/v) durante 3 h.

Da mesma forma que o observado para *L. crinitus*, para a linhagem de *L. sordida* a produção de lacase (3.443 UE/L na cultura controle) foi aumentada na presença de quase todos os compostos aromáticos, com um máximo de 13.454 UE/L na presença de ácido gálico (Figura 46). A atividade descorante, avaliada após 45 min de incubação, indicou um aumento de 11 % na descoloração realizada pelo extrato solúvel proveniente de cultura crescida em meio contendo ácido gálico. A presença de catecol no meio de cultivo reduziu drasticamente tanto a produção de lacase quanto a produção de atividade descorante, que atingiu apenas 10 %.

O perfil obtido em zimograma para os extratos solúveis de *L. sordida* crescidos na presença de compostos aromáticos demonstrou que a presença de álcool veratril, vanilina ou ácido gálico não afetou nem o número e nem a massa molecular dos polipeptídeos obtidos (36,5 e 48,5 kDa). Na presença de etanol e ácido ferúlico, foi observada apenas a banda de 36,5 kDa, já na presença de catecol não foi observada a atividade em gel da lacase (Figura 47).

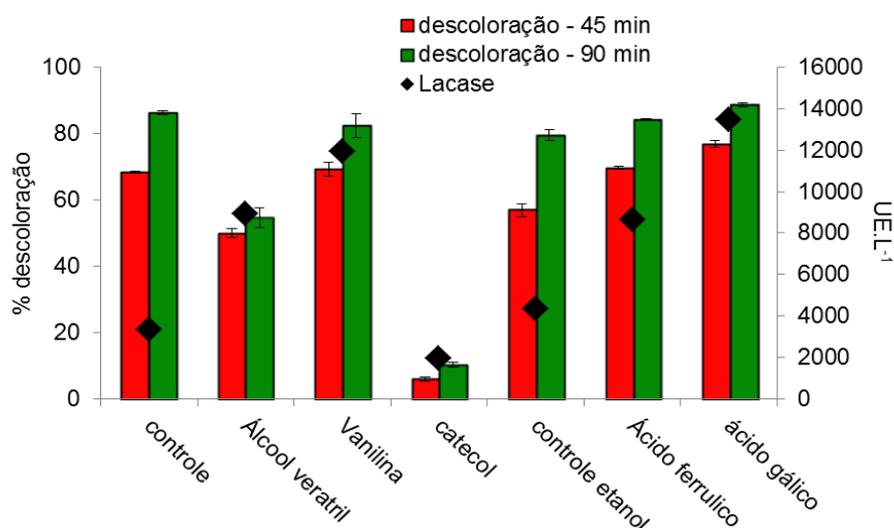


FIGURA 46 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DAS CULTURAS COM COMPOSTOS AROMÁTICOS NA PRODUÇÃO DE LACASE E DESCOLORAÇÃO DO SOBRENADANTE DE *L. sordida*. Amostras provenientes de culturas líquidas incubadas por 15 dias a 28 °C em pH inicial de 6,5 na presença de 1 mM de cada composto aromático. Os valores foram obtidos após 45 e 90 min de incubação do extrato solúvel do fungo com RB220 1 g/L. A legenda mostra o tempo de descoloração avaliado e a produção de lacase. As barras verticais representam o desvio padrão da média das amostras (N = 4) (SEÇÃO 3.2.13).

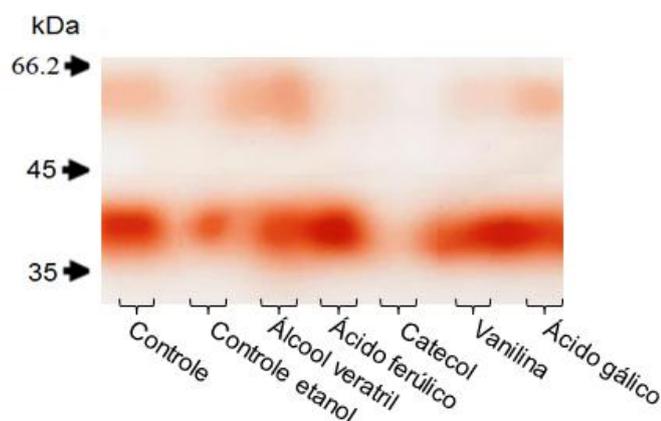


FIGURA 47 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DAS CULTURAS COM COMPOSTOS AROMÁTICOS NO PERFIL DE ATIVIDADE EM GEL DE *L. sordida*. Perfil obtido através de eletroforese desnaturante em gel de acrilamida 12 % e revelado por impregnação com solução de guaiacol 0,3 % (v/v) durante 3 h. A-controle; B-controle etanol; C-álcool veratril; D-ácido ferúlico; E-catecol; F-vanilina, G-ácido gálico.

A suplementação de culturas de *L. crinitus* e *L. sordida* com compostos aromáticos resultou, na maioria dos casos, em um aumento na produção de lacases e na alteração no perfil de polipeptídeos com atividade de lacase obtido. A dificuldade para relacionar o zimograma com as atividades descorante e de lacase dos extratos, para as duas linhagens, pode ser devido: (i) à diferença de substratos utilizados para cada ensaio, (ii) à diferença na susceptibilidade a desnaturação/renaturação dos diferentes polipeptídeos, (iii) à possibilidade de algum polipeptídeo observado não atuar na descoloração, ou ainda (iv) à participação de outras enzimas não observadas no gel na atividade descorante.

A produção de lacase pelas duas linhagens avaliadas foi passível de indução o que permitiu aumentar a produção destas de 7.000 UE/L (no meio original) para 18.700 UE/L na presença de veratraldeído para *L. crinitus*. Para *L. sordida* a produção de lacase foi 4 vezes maior na presença de ácido gálico (13.454 UE/L) quando comparada ao controle. A quantidade de enzima obtida neste trabalho supera a descrita previamente para outro isolado de *L. sordida*, que produziu apenas 137 UE/L em meio contendo glucose 2,5 g/L e extrato de levedura 0,1 g/L (CAVALLAZZI, OLIVEIRA e KASUYA, 2004). Embora tenham sido obtidas altas produções de enzima para ambos os fungos, este valor ainda pode ser melhorado pelo uso de metodologia de superfície de resposta. Esta permite a otimização do meio de cultivo para máxima produção de lacase e vem sendo rotineiramente aplicado (PRASADA *et al.*, 2005; VASCONCELOS *et al.*, 2010; BHATTACHARYA *et al.*, 2011).

Vários compostos têm sido utilizados como indutores da síntese de lacase, entre eles, compostos aromáticos, cujos efeitos variam de acordo com a espécie fúngica (GALHAUP *et al.*, 2002; NILADEVI e PREMA, 2008). Cavallazzi e colaboradores (2005) reportaram o ácido hidroxibenzóico como o composto aromático que acarretou maior produção de lacase por *Lentinus edodes*. Por outro lado, vanilina, álcool veratril e 2,5 xilidina foram os melhores indutores da produção de lacase por *Pleurotus pulmonarius*, *Coriolopsis polyzona*, *Trametes sp.*, respectivamente (RODRIGUEZ-COUTO *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2004; JAOUANI, TABKA e PENNINGCKX, 2006).

Assim como observado para *L. crinitus*, a adição de etanol absoluto ao meio de cultivo (10 a 35 mL/L) está relacionada a um aumento da produção de lacase em *Phanerochaete chrysosporium*, *T. pubescens* e *Pycnoporus cinnabarinus*

(LOMASCOLO *et al.*, 2003; STRONG, 2011; GOMAA, 2012). O efeito regulatório do etanol pode estar relacionado tanto a um aumento na expressão do gene de lacase, quanto a uma redução da atividade de protease encontrada no meio de cultivo (MEZA *et al.*, 2007).

A suplementação de culturas de *L. crinitus* e *L. sordida* com compostos aromáticos resultou, na maioria dos casos, em um aumento na produção de lacases e na alteração no perfil de polipeptídeos observado com tal atividade. Para *L. crinitus* a suplementação do meio de cultivo com veratraldeído ocasionou a maior produção de lacase, já para *L. sordida* a maior produção foi observada na presença de ácido gálico. A quantidade de enzima produzida por *L. sordida* neste trabalho (13.454 UE/L) superou a descrita por Cavallazzi e colaboradores (2004), cujo isolado de *L. sordida* produziu apenas 137 UE/L em meio contendo glucose 2,5 g/L e extrato de levedura 0,1 g/L.

A presença de indutores no meio de cultivo pode resultar na produção de diferentes polipeptídeos com atividade de lacase, como observado para *L. crinitus*. No entanto, esta não é uma regra geral. De acordo com Bollag e Leonowicz (1984), a adição de 2,5-xilidina ao meio de cultivo induziu a produção de lacase em *Fomes annosus*, *Pholiota mutabilis* e *Pleurotus ostreatus*, e ocasionou o aparecimento de novas isoformas da enzima. Por outro lado, a presença de diferentes indutores afetou apenas a intensidade das bandas de lacase produzidas por *Pleurotus eryngii* e *Rigidoporus lignosus* (MUÑOS *et al.*, 2005; CAMBRIA *et al.*, 2011).

#### 4.2 OBTENÇÃO DA SEQUÊNCIA PRIMÁRIA PARCIAL DO GENE DE LACASE DE *L. crinitus*

Nesta segunda parte do trabalho, foi determinada a estrutura primária parcial do gene de lacase de *L. crinitus*. A estratégia adotada consistiu na utilização de oligonucleotídeos que anelam em sequências conservadas que estão presentes nos domínios de ligação ao cobre de lacases de basidiomicetos. Foi realizada a clonagem de dois fragmentos do gene de lacase (Figura 7): um corresponde à sequência entre os sítios de ligação ao cobre I e II (*primers* Cu1F e Cu2R), e o segundo compreende a região entre os cobres I e IV (*primers* #1 e #2). O esquema

ilustrativo encontra-se na seção 3.3.1. Os produtos de amplificação obtidos foram submetidos a sequenciamento e analisados. Os resultados detalhados estão descritos a seguir.

#### 4.2.1 Produto amplificado 1 (P1) – *primers* Cu1F e Cu2R

Para a obtenção da sequência de domínios de ligação ao cobre I e II, o DNA genômico (Figura 48 A) foi utilizado como DNA molde em uma reação de PCR, com os *primers* Cu1F e Cu2R. Esta reação resultou em dois produtos, de 150 e 200 bp (Figura 48 B), de acordo com o esperado para sequências de lacase de basidiomicetos (LUIS, 2004). A seguir, foi realizada a purificação da amostra contida em cada uma das bandas (Figura 48 C), porém não foi possível purificar o produto de 150 bp.

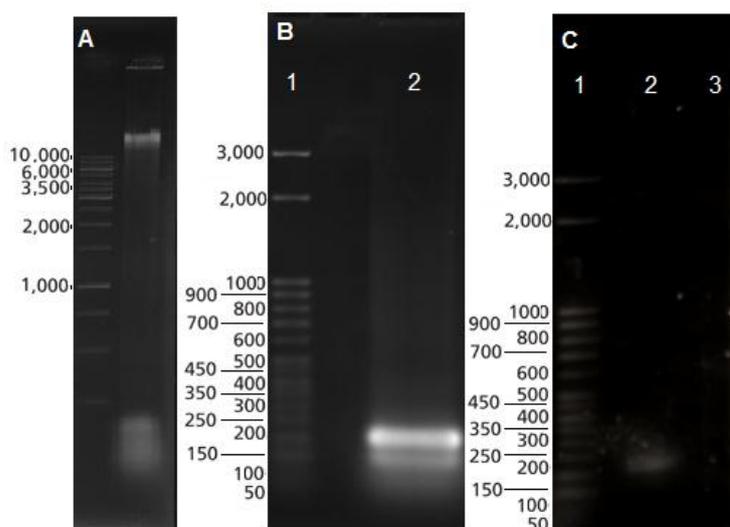


FIGURA 48 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO DNA GENÔMICO DE *L. crinitus* (A) E DOS FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADOS COM OS *PRIMERS* CU1F E CU2R ANTES (B) E APÓS PURIFICAÇÃO (C). A) amostra resolvida em gel de agarose 1%, B) 1: step ladder 50 bp; 2: 50 ul amostra, amostras resolvidas em gel agarose 1,5 %, corrida a 40 mV por 145 min C) amostras resolvidas em gel de agarose 1 %, 80 mV, 1 hora corrida. 1: step ladder 50 bp; 2: banda maior purificada; 3: banda menor purificada.

O produto purificado de 200 bp, correspondente à banda maior, foi ligado ao vetor pGEM-T Easy, que foi utilizado para transformar células de *E. coli* DH10B termocompetente que foram plaqueadas em meio LA. Após incubação “overnight”, foi observado o crescimento de 15 colônias, para as quais foi realizada a extração do DNA plasmidial. Para isso, as colônias foram crescidas em 4 mL de meio LB,

submetidas a *mini-prep*, seguida de digestão com a enzima de restrição *EcoRI*. Após a digestão, a presença do fragmento de interesse foi avaliada através de géis de agarose. Nestes, foi observada a presença de bandas na faixa de 200 bp nas linhas 6, 7, 8, 13 e 15 (Figuras 49 A e B).

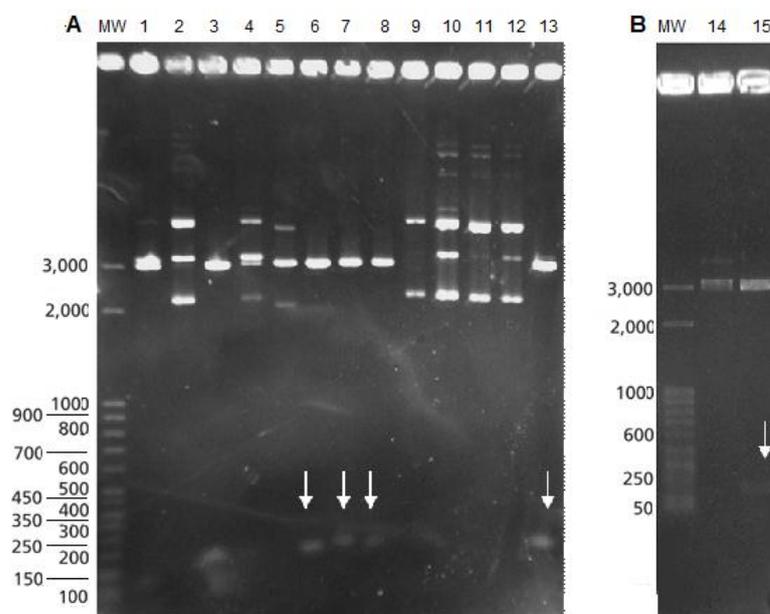


FIGURA 49 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO DNA PLASMIDIAL SUBMETIDO À DIGESTÃO COM *EcoRI*. amostras resolvidas em gel de agarose 1,4 % (A) e 1 % (B) e corado com brometo de etídio. m: marcador step ladder 50 bp, linhas 1 a 15: colônias. flechas indicam o inserto de 200 bp

O clone 15 (linha 15, figura 49 B) foi selecionado para confirmação da clonagem do fragmento do gene de lacase através de sequenciamento. Os *primers* utilizados nesta etapa foram o SP6 e o T7. Através do programa BLASTx, a sequência de nucleotídeos obtida foi traduzida para aminoácidos e analisada por comparação com sequências disponíveis no banco de dados do NCBI. Por esta comparação, concluiu-se que o fragmento em questão, com 212 bp, de fato se tratava de uma sequência lacase e foi denominado P1. A sequência inteira deste fragmento obtida a partir do sequenciamento com o oligonucleotídeo SP6 encontra-se na figura 50.

O fragmento P1, quando comparado às sequências depositadas no banco de dados do NCBI, apresentou similaridade entre 68 e 90 % e identidade superior a 58 % a várias lacases de diferentes gêneros fúngicos, dentre eles *Panus*, *Polyporus*, *Marasmiellus*, *Ganoderma*, *Pleurotus* e *Trametes*. Mais especificamente, foram observadas similaridades de 82 e 87 % com lacases de dois fungos do gênero *Lentinus*: *L. tigrinus* e *L. sajor-caju*, respectivamente. Uma similaridade de 84 % foi

obtida com a cadeia A da lacase azul de *Lentinus tigrinus*. Ainda, foi observada a presença de um domínio conservado com proteínas tipo Cu-oxidase\_3, lacase e ascorbase na sequência de leitura 3+ (frame +3) ao redor do nucleotídeo 75 (Figura 51).

```
>clone 15 Cu1F e Cu2R SP6
ACTATAATCAAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTAGTGA
TTCATTGGAAGGGTTTTCCAGCATACGACCCGCTGGCGGACGGACCGCGTTCGTCAGTGCAGTGCC
CATCATCTCCGGCGATTCTTCTCTACAACCTTAAGGCACCGGCCAGGCAGGTGAGGGCTTACTCAG
AGCACAGGATGATACACTGGAGTACTCGCAACTGATCATCTGTGGATGCACAGGAACCTTCTGGTAC
CACAGCCAATCGAATTCCTCCGCGGCCCATGCGGCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTCGCC
```

FIGURA 50 - SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DO FRAGMENTO DE LACASE DE *L. crinitus* DENOMINADO P1. O fragmento foi obtido a partir do clone 15 e do *primer* sp6. O destaque indica os nucleotídeos do vetor pGEM-T Easy que flanqueiam a sequência de *L. crinitus*.

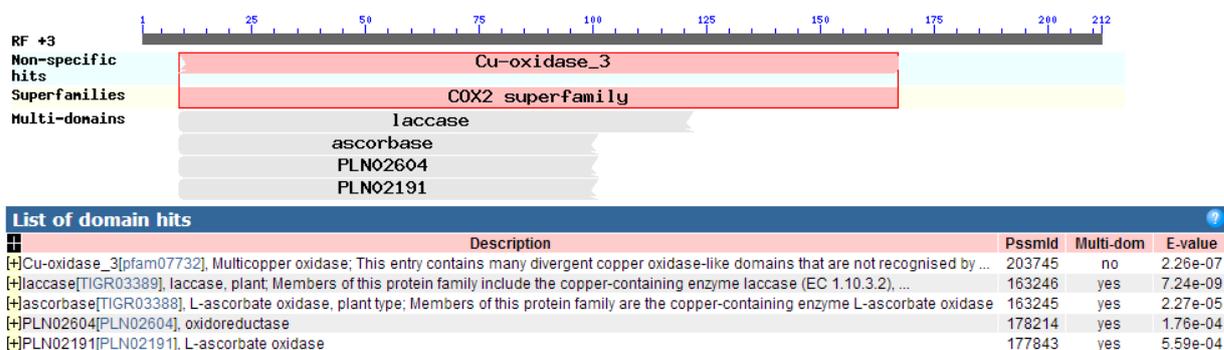


FIGURA 51 - DOMÍNIOS CONSERVADOS PRESENTES NO FRAGMENTO P1 DE *L. crinitus*. Resultados derivados do programa BLASTx.

#### 4.2.2 Produto amplificado 2 (P2) – *primers* #1 e #2

Para a obtenção da sequência de lacase de *L. crinitus* localizada entre os domínios de ligação ao cobre TI e TIV, denominada P2, foram utilizados os *primers* #1 e #2. Foi observado o aparecimento de duas bandas referentes aos produtos de amplificação, um com cerca de 1700 bp e outra com cerca de 1400 bp (Figura 52 A). A seguir, foi realizada a purificação do DNA presente em cada uma das bandas (Figura 52 B).

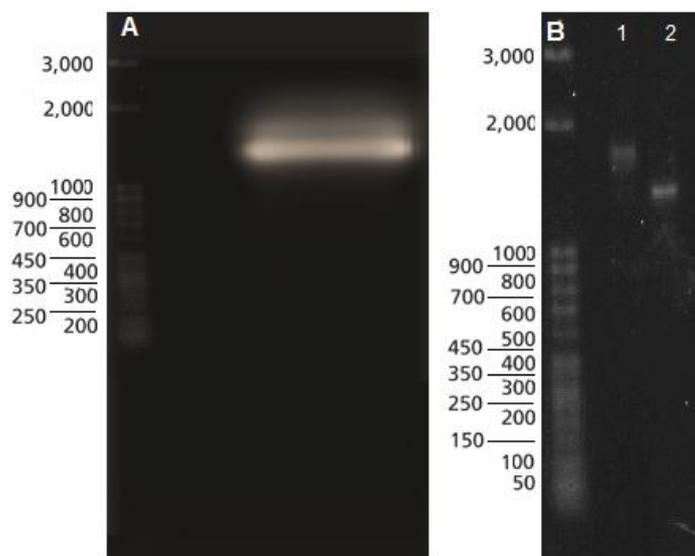


FIGURA 52 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR USANDO PRIMERS #1 E #2 ANTES (A) E APÓS PURIFICAÇÃO (B). A) step ladder 50 bp; 50  $\mu$ L amostra, amostras resolvidas em gel agarose 1,5 %, corrida a 40 mV por 145 min B) amostras resolvidas em gel de agarose 1 %, 80 mV, 1 hora corrida. B) step ladder 50 bp; 1: banda maior purificada; 2: banda menor purificada.

Os produtos purificados de 1700 bp (banda maior) e de 1400 bp (banda menor) foram ligados ao vetor pGEM-T Easy e usados no ensaio de transformação em *E. coli* DH10B termocompetente, que foram então plaqueadas em meio LA. Após incubação por aproximadamente 16 h, foi observado o crescimento de apenas uma colônia, referente ao fragmento de 1400 bp. Esta colônia foi crescida em 4 mL de meio LB e teve seu DNA plasmidial extraído. A sequência de DNA correspondente ao fragmento de 1400 pb, denominada P2, foi amplificada com os oligonucleotídeos SP6 e T7 e sequenciada. Em decorrência do tamanho do fragmento, foi possível sequenciar apenas suas extremidades. O sequenciamento com o oligonucleotídeo T7 resultou em uma sequência de 459 bp (Figura 53 A) e com o oligonucleotídeo SP6, a sequência obtida apresentou 482 bp (Figura 53 B).

As sequências das duas extremidades de P2, quando analisadas através do programa BLASTx, apresentaram similaridade acima de 70 % e identidades superiores a 60 % à várias lacases fúngicas. Uma das extremidades (obtida com o primer T7) apresentou similaridade máxima com duas lacases pertencentes ao gênero *Polyporus*. Por outro lado, os maiores índices de similaridade para a outra extremidade, obtida com o primer SP6, foram obtidos quando esta sequência foi comparada a lacases do gênero *Trametes* sp. Neste caso, foi observada a presença de domínios conservados (Figura 54), os quais são encontrados em duas

sequências de leitura (frames +1 e +3) ao redor dos nucleotídeos 225 e 75, respectivamente. Foram encontrados domínios conservados com proteínas tipo Cu-oxidase\_3, lacases e ascorbases, todas pertencentes à subfamília das proteínas multicobre oxidases (SIRIM *et al.*, 2011).

**A** >clone 1 #1 e #2 T7

```
TGGGTTGGCCACCTCGCCGGGCTCCCGGCCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGTGGAAGACT
ATAAGGCAGTGGAGGAAAACAGGACGGGGTGTTCGTCTGGAAGCGGATCGTGATGTTGTACCGGGA
GGGGGAGTGCCCGTGTGACGACGTGCGCCAGACGGGGTGTCTGATTTGAACTGTGCTGCCTGC
GCTGCGTACGACAGCAAGACGTGCTAGGAAAAGTCATAGCGTGGCGATGCCTCAAGAGTGGGGCG
AATGATGGAGGGGACTTACACCGTGCAGGTGGAAGGGGTGAGGGGCACCGGGGGCGGCATTATAGC
AGGGAAGGTGATCTCAATGGACGAGTTGGAAGGGAGCGAGTAGACGCTGCCAGAGGGCAGGAGGTC
CTGGGCGGAGTTGGCCCCGGAGATGATCTGCCGCAAGACAGGGACAGTCTGGGGAGAGATCGACGC
GCCCTTCAACAAGTTGGGGTGGGGGGGGGGGAAAGGCCCCCTCAT
```

**B** >clone 1 #1 e #2 sp6

```
GCCAAATTTCTCAACGCGGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGT
GATTACAAGGAGAACGGGGATGGTTTTTTCAGGCCGTACCAACTGGCGGAGGACCTAACGATCA
TCAACCAAGTGTCTATCGCTAGCGGAACTCCTTCTGTATGACTCCAGGTGCCGACCAAGCTGGTG
AGTCACCTTGTGCGCTACCGATAGATCACTCTCCCTGACCTCACCATCTTCAGGCACGTTCTGGTACC
ACAGTCACCTGTCCACTCAGTACTGTGACGGTCTCAGGGGACCGTTTGTGATACGATCCGCAAGACC
CTCATCTCAGCCTTACGACGTTGATGATGGTAAATTGCTGTGTGCTTGTGCATCTGAGGCAATGGTCT
AACCAGACTACTCAGACTCCACTGTCATCAGCTGGACAACAGGTACCAGTTGCCGCCAAACCCGGCC
CGGGGTCGGGTACGTGCTTCCCTCCAATCACTGAACATGAGGACCACGGTGCTCACTTGACTCTGAA
GCAA
```

FIGURA 53 – SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS CORRESPONDENTES ÀS EXTREMIDADES DE P2, OBTIDAS UTILIZANDO OS PRIMERS T7(A) E SP6 (B). O destaque indica os nucleotídeos do vetor pGEM-T Easy que flanqueiam as sequências de *L. crinitus*.

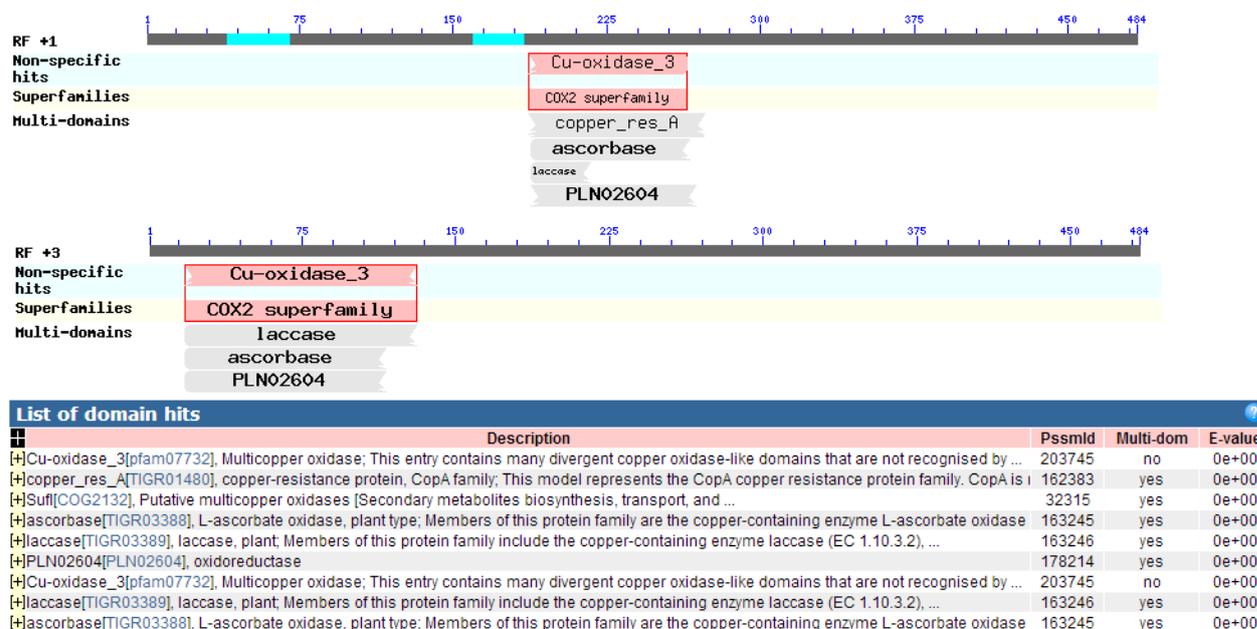


FIGURA 54 - DOMÍNIOS CONSERVADOS ENCONTRADOS PARA A P2 DE *L. crinitus* OBTIDO A PARTIR DO PRIMER SP6. Resultados derivados do programa BLASTx.

A seguir, as sequências foram analisadas utilizando o programa BLASTn, que compara a sequência de nucleotídeos de interesse a um banco de dados

contendo sequências de nucleotídeos. As extremidades de P2 sequenciadas a partir dos *primers* SP6 e T7 apresentaram alinhamentos com similaridades de cerca de 81 % quando comparadas à sequências de nucleotídeos de *Lentinus tigrinus*, como mostrado nas figuras 55 A e B. A sequência de nucleotídeos do gene *lcc1* de lacase de *L. tigrinus* é composta por 1962 nucleotídeos. O trecho entre os nucleotídeos 330 e 595 de *lcc1* apresenta alinhamento com o trecho entre os nucleotídeos 39 e 308 da extremidade de P2 obtida com o oligonucleotídeo SP6 (Figura 55 A). Da mesma maneira, o trecho entre os nucleotídeos 1520 e 1944 de *lcc1* se alinha aos primeiros 428 nucleotídeos da outra extremidade de P2, obtida com o oligonucleotídeo T7 (Figura 55 B).

Em decorrência da baixa produção destas enzimas pelos organismos que naturalmente as secretam (BALDRIAN, 2006), assim como, da necessidade da obtenção de largas quantidades para uso comercial, torna-se importante a determinação da estrutura do gene que codifica a enzima com o intuito de permitir sua superexpressão. Neste contexto, os dados obtidos indicam que, de fato, as duas sequências obtidas para P2, fazem parte da estrutura de uma lacase. Este trabalho é o primeiro relato a respeito da estrutura primária de um gene de lacase em *L. crinitus*, a sequência primária parcial obtida corresponde a duas porções: uma de 498 bp pertencente a região a jusante do sítio de ligação ao cobre I e a outra com 482 bp a montante do sítio de ligação ao cobre IV.

>gb|AY914796.1| *Lentinus tigrinus* laccase (lcc1) gene, partial cds  
Length=1962

**A** Score = 224 bits (121), Expect = 5e-55  
Identities = 225/274 (82%), Gaps = 12/274 (4%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 39  AACTGGGCGGA-GGACCTAACGATCATCAACCAGTGTCTATCGCTAGCGGAAACTCCTT 97
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 330  AACTGGGCGGACGGCCCT-GCCTTCATAAACCCAGTGTCCCATCGCCAGTGGTAACTCCTT 388

Query 98  CCTGTATGACTTCCAGGTGCCCGACCAAGCTGGTGAGTCACCTTGTGGCGCTACCGATAG 157
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 389  CCTCTATGATTTCCAGGTGCCCGGCCAAGCTGGTGAGTCACCTT-T-G-GCTACAG-T-C 443

Query 158 ATC-ACTCT--CCCTGACCTCACCCATCTTCAGGCACGTTCTGGTACCACAGTCACCTGT 214
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 444  ACCTAATCTGGTCTGA-CTCGGTCC-CTTCAGGCACCTTCTGGTACCATAAGTCACCTGT 501

Query 215 CCACTCAGTACTGTGACGGTCTCAGGGGACCGTTTGTGCTATACGATCCGCAAGACCCTC 274
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 502  CCACTCAGTACTGTGACGGCCTCAGGGGTCGGTTCGTCGTTACGATCCTAACGATCCTC 561

Query 275 ATCTCAGCCTCTACGACGTTGATGATGGTAAATTG 308
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 562  ATGCCAACCTCTACGACGTCGATGACGGTAAATTG 595

```

**B** Score = 322 bits (174), Expect = 2e-84  
Identities = 350/434 (81%), Gaps = 15/434 (3%)  
Strand=Plus/Minus

```

Query 1  GTGGAAGACTATAAGGCAGTGGAGGAA-AACAGGACGGGGTTGTTTCGTCTGGAAGCGGAT 59
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1944 GTGGAAGTCGATGTGGCAGTGGAGGAACCACGGGCCCGGGTTGTCCTGCTGGAAGCGGAT 1885

Query 60  CGTGATGTTGT-ACCGGGAGGGGAGTGCCCGTGTGACGACGTCGCGCCAGACGGGGTT 118
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1884  GGTACATTGTCCCGCCTGGGGTGTGCCCGTGTGACGACGTCGCGCCACACGGGGTC 1825

Query 119 GTCGTAGTTGTAAACTGTGCTGCCCTGCCGTGCGTACGACAGCGAAGACGTGCTAG-GAAA 177
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1824  GTCGTAGTTGTACGAGGTGCTGCCCTGCCGTGCGGACGACAGCGAAGACGTGCTAAAGATA 1765

Query 178  AGTCATAGCGTGGGCGATGCCCTCAAGAG-TGGGGC-GAATGATGGAGGGGACTTACACCG 235
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1764  CG--AT-GTGAGTGCAG-G--TCG-GAGCTAGCATAGCA-G-TGCAAGGGACTTACACCG 1714

Query 236  TGCAGGTGGAAGGGGTGAGGGGCACCGGGGGCGGCATTA-TAGCAGGGAAGGTGATCTCA 294
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1713  TGCAGGTGGAAGGGGTGCGGTGCACCAGGAGCGGCGGTGGTTGCAGGGAATGTGATCTCG 1654

Query 295  ATGGACGAGTTGGAAGGGAGCGAGTAGACGCTGCCAGAGGGCAGGAGGTCCTGGGCGGAG 354
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1653  ATAGACGAGTTAGACGGGAGCGAATAGACGCTGCCGAGGGGAGGAGGTCCTGCGCGGTG 1594

Query 355  TTGGCCCCGAGATGATCTGCCGCAAGACAGGGACAGTCTGGGGAGAGATCGACGCGCCC 414
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1593  TTGGCCCCGAAATGATCTGCAGCAAGACCGGGACAGTCCGGGGAGTGAACGACTCGCCG 1534

Query 415  TTCATCAACAAGTT 428
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1533  TTGATGAAGAAGTT 1520

```

FIGURA 55 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DAS EXTREMIDADES DE P2 DO FRAGMENTO DE LACASE DE *L. crinitus* OBTIDAS UTILIZANDO OS PRIMERS SP6 (A) E T7 (B) COM FRAGMENTOS DO GENE *lcc1* DE *L. tigrinus*. Query *L. crinitus* (query) e *L. tigrinus* (subject). Resultados derivados do programa BLASTn.

### 4.3 SÍNTESE DOS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS

- A atividade descorante dos dois fungos estudados, *L. crinitus* e *L. sordida*, é realizada por enzimas tipo lacase;
- Nos dois fungos, as fontes de carbono e nitrogênio no meio de cultivo afetaram drasticamente tanto a produção de atividade descorante quanto a de lacase;
- A suplementação dos meios de cultura com íons metálicos e a agitação levaram a uma diminuição da produção da atividade descorante;
- A atividade descorante dos extratos de *L. crinitus* e *L. sordida* se apresentou alta e relativamente estável em uma ampla faixa de valores de pH e temperaturas;
- Os dois fungos apresentaram alta atividade descorante em concentrações de sal de até 0.4 M, porém a redução de 50 % desta atividade é obtida em curtos períodos em concentrações acima de 0,1 e 0,05 M de NaCl, para *L. crinitus* e *L. sordida*, respectivamente;
- De maneira geral, os íons metálicos testados levaram a uma alteração da atividade enzimática. As enzimas foram inibidas por ferro, enquanto íons zinco e manganês foram os únicos em melhorar o desempenho enzimático;
- Os mediadores redox acetosiringona e siringaldeído ampliaram o espectro de substratos alvo dos extratos solúveis em ambas as espécies;
- A suplementação de culturas com compostos aromáticos resultou em maior atividade de lacase total e na alteração do número de polipeptídeos ativos expresso;
- A máxima produção de enzimas com atividade descorante em *L. crinitus* (18.700 UE/L) foi obtida em meio contendo glucose 10 g/L, nitrato de sódio 5 g/L, veratraldeído 1 mM e pH inicial 6,5, após 15 dias de incubação a 28 °C. Já a máxima produção de lacase por *L. sordida* (13.454 UE/L) foi obtida em meio contendo maltose 5 g/L, nitrato de sódio 5 g/L, ácido gálico 1 mM e pH inicial 6,5, também após 15 dias de incubação a 28 °C;
- Em *L. crinitus*, a modificação das condições de cultura permitiu a expressão de quatro polipeptídeos com massa molecular de 38, 41, 42,5 e 45 kDa, responsáveis pela atividade descorante;
- Em *L. sordida*, dois polipeptídeos de 36,5 e 48,5 kDa foram produzidos independente do meio de cultivo avaliado;

- Foram obtidas duas sequências parciais, de 498 e 482 bp, de um gene de lacase de *L. crinitus*. Estas sequências correspondem a regiões a jusante do sítio de ligação ao cobre I e a montante do sítio de ligação ao cobre IV, respectivamente.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para *L. crinitus* e *L. sordida*, as informações relacionadas à biodegradação de corantes e a caracterização e produção das enzimas (lacases) envolvidas são inexistentes ou escassas na literatura. Os resultados obtidos no presente trabalho indicaram que os extratos solúveis destes dois fungos apresentam potencial para aplicação industrial e constituem o ponto de partida para a viabilização do uso de lacases provenientes destas linhagens em processos de remoção de corantes de águas residuais a nível industrial.

A alteração dos meios de cultivo dos dois organismos avaliados resultou em grande variação, tanto na produção enzimática, quanto no perfil de polipeptídeos com atividade de lacase. Estes resultados estão em conformidade com o comportamento descrito na literatura para outros fungos, onde cada linhagem ou estirpe apresenta suscetibilidade particular e variável para cada parâmetro de cultura. Ainda, esta constatação reforça a necessidade de explorar mais organismos e substratos, entre eles resíduos agroindustriais, assim como avaliar outras metodologias de trabalho, como a análise de superfície de resposta, com o intuito de maximizar a produção enzimática e atrelar esta a um processo de baixo custo.

A verificação de que diferentes enzimas são produzidas, dependendo das condições de cultivo, incita ao estudo particular de cada uma delas, já que, como tem sido observado em outros fungos, cada variante enzimática pode possuir diferentes propriedades catalíticas e ocasionalmente, aquelas menos expressas podem se mostrar mais promissoras em seu potencial de aplicação.

A atividade descorante dos extratos fúngicos mostrou-se alta e estável em ampla faixa de valores de pH e de temperatura, o que poderá facilitar a sua aplicação em processos industriais. Por outro lado, para contornar a baixa estabilidade dos extratos frente a altas concentrações de sal, torna-se necessário avaliar mecanismos que possam a aumentar a estabilidade enzimática nestas condições, como por exemplo, imobilização, modificação química ou alteração da estrutura primária do gene.

Os extratos solúveis descoloriram substratos de diferentes naturezas químicas na presença de mediadores redox naturais, mas o número de substratos alvo poderia ainda ser aumentado através da otimização da razão

substrato/mediador/enzima, assim como da avaliação de outros mediadores similares. Adicionalmente, já que a perda de cor não esta necessariamente atrelada a diminuição da toxicidade do corante de partida, é conveniente e necessário avaliar também a toxicidade dos subprodutos gerados após o tratamento enzimático.

Finalmente, no âmbito da biologia molecular, este é o primeiro registro sobre a estrutura primária de um gene de lacase em *L. crinitus*. Tendo como base as sequências parciais do gene obtidas neste trabalho, a elucidação da sequência completa torna-se o próximo objetivo a ser atingido. O conhecimento da estrutura primária poderá: (a) explicar, pelo menos parcialmente, a expressão diferenciada da enzima em determinadas condições de cultivo, (b) abrir novas possibilidades para a produção da enzima em diferentes escalas e sistemas biológicos, (c) e ainda permitir a alteração do produto final para que este apresente propriedades catalíticas mais adequadas a sua aplicação industrial, de maneira eficiente e a um baixo custo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABORLEDA, C.; MEJIA, A. I.; FRANCO-MOLANO, A. E.; JIMENEZ, G. A.; PENNINGCKX, M. J. Autochthonous white rot fungi from the tropical forest of Colombia for dye decolourisation and ligninolytic enzymes production, **Sydowia**, v. 60, p.165–180, 2008.

AGGELIS, G.; EHALIOTIS, C.; NERUD, F.; STOYCHEV, I.; LYBERATOS, G.; ZERVAKIS, G. I. Evaluation of white-rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from the green olive debittering process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, p.353–360, 2002.

ADENIPEKUN, C. O.; FASIDI, I. O. Bioremediation of oil-polluted soil by *Lentinus subnudus*, a Nigerian white-rot fungus. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 796–798, 2005.

AKSAKALA, O.; UCUNB, H. Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies of the biosorption of textile dye (Reactive Red 195) onto *Pinus sylvestris* L. **Journal of Hazardous Materials**, v.181, p.666–672, 2010.

ALCÂNTARA, M. R. e DALTIM, D. A química do processamento têxtil. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 320-330, 1996.

ALGUACIL, J.; KAUPPINEN, T.; PORTA, N. PARTANEN, T.; MALAST, N.; KOGEVINAS, M.; BENAVIDES, F. G.; OBIOLS, J.; BERNAL, F.; RIFA, J.; CARRATO, A. Risk of pancreatic cancer and occupational exposures in Spain. **Annals of Occupational Hygiene**, v. 44, n. 5, p. 391-403, 2000.

ALMANSA, E., KANDELBAUER, A., PEREIRA, L., CAVACO-PAULO, A., GUEBITZ, G.M., Influence of Structure on Dye Degradation with Laccase Mediator Systems. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 22, p.315-324, 2004.

ARANA-CUENCA, A.; RODA, A.; TÉLLEZ, A.; LOERA, O.; CARBAJO, J. M.; TERRÓN, M. C.; GONZÁLEZ, A. E. Comparative analysis of laccase-isozymes patterns of several related Polyporaceae species under different culture conditions. **Journal of Basic Microbiology**. v.44, n.2, p.79–87, 2004.

ARENDS, I. W. C. E.; LI, Y-X.; AUSAN, R. e SHELDON, R. A. Comparison of TEMPO and its derivatives as mediators in laccase catalysed oxidation of alcohols **Tetrahedron** v. 62, p.6659–6665, 2006.

ARICA, M.Y.; BAYRAMOĞLU, G. Biosorption of Reactive Red-120 dye from aqueous solution by native and modified fungus biomass preparations of *Lentinus sajor-caju*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, p.499–507, 2007.

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

- ASGHER, M., BHATTI, H.N., ASHARF, M., LEGGE, R.L. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, v. 19, p.771-783, 2008.
- ASSADI, M. M., ROSTAMI, K., SHAHVALI, M., AZIN, M. Decolorization of textile wastewater by *Phanerochaete chrysosporium*. **Desalination**, v.141, p.331-336, 2001.
- BAE, J-S. e FREEMAN, H S. Aquatic toxicity evaluation of copper-complexed direct dyes to the *Daphnia magna*. **Dyes and Pigments**, v.73, p.126-132, 2007.
- BAFANA, A.; JAIN, M.; AGRAWAL, G. e CHAKRABARTI, T. Bacterial reduction in genotoxicity of Direct Red 28 dye, **Chemosphere**, v. 74, p.1404–1406, 2009.
- BALDRIAN, P. Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.63, p.560–563, 2004.
- BALDRIAN, P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.78-91, 2003.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases - occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v.30, p. 215–242, 2006.
- BALLAMINUT, N.; MATHEUS, D. R. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 248-252, 2007.
- BAUGHMAN, G. L.; PERENICH, T. A. Fate of dyes in aquatic systems: I Solubility and partitioning of some hydrophobic dyes and related compounds. **Environmental Toxicology & Chemistry**, v. 7, p. 183-199, 1988.
- BIBI, I.; BHATTI, H. N. Biodecolorization of Reactive Black 5 by laccase mediator System. **African Journal of Biotechnology**. v. 11, n.29, p. 7464-7471, 2012.
- BIBI, I.; BHATTI, H. N.; ASGHER, H. N. Comparative study of natural and synthetic phenolic compounds as efficient laccase mediators for the transformation of cationic dye **Biochemical Engineering Journal** v. 56, p.225– 231, 2011.
- BISSCHOPS, I., SPANJERS, H. Literature review on textile wastewater characterization. **Environmental Technology**, v.24, p.1399-1411, 2003.
- BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p.93-99, 1987.
- BOER, C. G.; OBICI, L.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. **Bioresource Technology**, v. 94, p. 107-112, 2004.

BOLLAG, J.-M., LEONOWICZ, A. Comparative Studies of Extracellular Fungal Laccases. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, p.849-854, 1984.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SETTE, L. D. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. **Fungal biology**, v. 114, p. 863-872, 2010.

BOURBONNAIS, R. e PAICE, M.G.. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Biochemical Journal**, v. 255 p. 445-450, 1988.

BUDDA, W.; SARNTHIMA, R.; KHAMMUANG, S.; MILINTAWIISAMAI, N.; NAKNIL, S. Ligninolytic enzymes of *Lentinus polychrous* grown on solid substrates and its application in black liquor treatment. **Journal of Biological Sciences**, v.12, n.1, p.25-33, 2012.

BUSWELL, J.A; CAI, Y.; CHANG, S-T. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, v.128, n.1, p.81-87, 1995.

CADIMALIEV, D. A.; REVIN, V. V.; ATYKYAN, N. A.; SAMUILOV, V. D. Extracellular Oxidases of the Lignin Degrading Fungus *Panus tigrinus*. **Biochemistry (Moscow)**, v.70, n.6, p.703-707, 2005.

CAMARERO, S., IBARRA, D., MARTÍNEZ, M.J.; MARTÍNEZ, A.T. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.1775–1784, 2005.

CAMBRIA, M. T.; RAGUSA, S.; CALABRESE, V.; CAMBRIA, A. enhanced laccase production in white-rot fungus *Rigidoporus lignosus* by the addition of selected phenolic and aromatic compounds. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v.163, p.415–422, 2011.

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

CAÑAS, A.I.; CAMARERO, S. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. **Biotechnology Advances**, v.28, p. 694–705, 2010.

CANTARELA, G.; GALLI, C.; GENTILLI, P. Free radical versus electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems: Catalytic or stoichiometric procedures. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**, v. 22, p.135-144, 2003.

CAVALLAZZI, J. R. P., OLIVEIRA, M. G. A., KASUYA, M. C. M. Laccase production by *Lepista sordida*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p.261-263, 2004.

CAVALLAZZI, J. R. V., KASUYA, C. M., SOARES, M.A. Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.383-387, 2005.

CHEQUER, F. M. D.; ANGELI, J. P. F.; FERRAZ, E. R. A. e OLIVEIRA, D. P. The azo dyes Disperse Red 1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells, **Mutation Research**, v. 676, p. 83–86, 2009.

CHEN, B.-Y.; ZHANG, M.-M.; DING, Y.; CHANG, C.-T. Feasibility study of simultaneous bioelectricity generation and dye decolorization using naturally occurring decolorizers. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.41, p.682–688, 2010.

CHI, Z.; LIU, R.; SUN, Y.; WANG, M.; ZHANG, P. e GAO, C. Investigation on the toxic interaction of toluidine blue with calf thymus DNA. **Journal of Hazardous Materials**, v.175, p.274–278, 2010.

CHUNG, T. V.; KHUE, D. N.; MINH, D. B.; CHENG, F. Use of fungal humus for 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) polluted soil treatment. **Chemistry – An Asian Journal**, v.21, p.5967–5972, 2009.

CING, S. ASMA, D.; APOHAN, E.; YESILADA, O. Decolorization of Textile Dyeing Wastewater by *Phanerochaete chrysosporium*. **Folia Microbiologica**, v.47, n.5, p.639–642, 2003.

COELHO, J. S., OLIVEIRA, A. L., SOUZA, C. G. M., BRACHT, A., PERALTA, R. M. Effect of the herbicides bentazon and diuron on the production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma lucidum*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.64, p.156-161, 2010.

COLAO, M. CH.; GARZILLO, A. M.; BUONOCORE, V.; SCHIESSER, A.; RUZZI, M. Primary structure and transcription analysis of a laccase-encoding gene from the basidiomycete *Trametes trogii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.63, p.153–158, 2003.

COVINO, S.; SVOBODOVÁ, K.; KŘESINOVÁ, Z.; PETRUCCIOLI, P.; FEDERICI, F.; D'ANNIBALE, A.; ČVANČAROVÁ, M.; CAJTHAML, T. In vivo and in vitro polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus* CBS 577.79. **Bioresource Technology Volume**, v.101, n.9, p.3004–3012, 2010.

CRIPPS, C.; BUMPUS, J. A.; AUST, S. D. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n.4, p. 1118-1118, 1990.

CULLEN, D. e KERSTEN, P. J. Enzymology and Molecular Biology of Lignin Degradation. In: BRAMBL, R. E MARZLUF, G.A. **The Mycota III: Biochemistry and Molecular Biology**, Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, p. 249-273, 2004,

CULLEN, D. Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. **Journal of Biotechnology**, v.53, p. 273–289, 1997.

D'ANNIBALE, A.; CELLETTI, D.; FELICI, M.; DI MATTIA, E.; GIOVANNOZZI-SERMANNI, G. Substrate specificity of laccase from *Lentinus edodes*, **Acta Biotechnologica**, v.16, p.257–270, 1996.

D'SOUZA-TICLO, D.; VERNA, A. K.; MATHEW, M.; RAGHUKUMAR, C. Effect of nitrogen on laccase production, its isozyme pattern and effluent decolorization by the fungus NIOCC #2a, isolated from mangrove wood. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 35, n. 4, p. 364-372, 2006.

DAWKAR, V. V.; JADHAV, U. U.; GHODAKE, G. S.; GOVINDWAR, S. P. Effect of inducers on the decolorization and biodegradation of textile azo dye Navy blue 2GL by *Bacillus* sp. VUS. **Biodegradation**, v.20, p.777–787, 2011.

DEKKER, R. F.H.; BARBOSA, A. M.; GIESE, E. C.; GODOY, S. D. S. E COVIZZI, L.G. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **International Microbiology**, v. 10, p.177-185, 2007.

DÍAZ, R.; SÁNCHEZ, C.; BIBBINS-MARTÍNEZ, M. D.; DÍAZ-GODÍNEZ, G. Effect of medium pH on laccase zymogram patterns produced by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n.18, p. 2720-2723, 2011.

DÍAZ-GONZALES, M.; VIDAL, M.; TZANOV, T. Phenolic compounds as enhancers in enzymatic and electrochemical oxidation of veratryl alcohol and lignins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.89, n.6, p.1893-1700, 2011.

DOLIN, P. J. A descriptive study of occupation and bladder cancer in England & Wales. **British Journal of Cancer**, v. 66, p. 568-578, 1992.

DOMÍNGUEZ, A.; RIVELA, I.; COUTO, R. S.; SANROMÁN, M. A. Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on an inert support. **Process Biochemistry**, v.37, n.5, p.549–554, 2001.

DONG, J. L.; ZHANG, Y. W.; ZHANG, R. H.; HUANG, W. Z.; ZHANG, Y. Z. Influence of culture conditions on laccase production and isozyme patterns in the white-rot fungus *Trametes gallica*. **Journal of Basic Microbiology**, v.45, n. 3, p.190–198, 2005.

DWIVEDI, U.N.; SINGH, P.; PANDEY, V.P; KUMAR, A. Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.68, p.117–128, 2011.

EICHLEROVÁ, I., HOMOLKA, L., LISÁ, L., NERUD, F., The influence of extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production on decolorization ability in fungi. **Journal of Basic Microbiology**, v.46, p.449-455, 2006.

ELIZALDE-GONZÁLEZ, M. P.; FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; GUEVARA-VILLA, M.R.G. Degradation of immobilized azo dyes by *Klebsiella* sp. UAP-b5 isolated from maize bioadsorbent. **Journal of Hazardous Materials**, v.161, p.769–774, 2009.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. **Journal of Biotechnology**, v.144, p.37–42, 2009.

ELISASHVILI, V.; PENNINGCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLAURI, N.; METREVELI, E.; KHARZIANI, T.; KVESITADZE, G. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresource Technology**, v.99, n.3, p.457-462, 2008.

ERDEN, E. M., CIGDEM, U., GEZER, T., PAZARLIOGLU, N. K. Screening for ligninolytic enzymes from autochthonous fungi and applications for decolorization of remazole marine blue. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.40, p.346-353, 2009.

ERIKSSON, K. E.; PETTERSSON, B.; VOLC, J.; MUSILEK, V. Formation and partial characterization of glucose-2-oxidase, a hydrogen peroxide producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 23, p. 257-262, 1986.

FARACO, V., PEZZELLA, C., MIELE, A., GIARDINA, P., SANNIA, G. Bio-remediation of colored industrial wastewaters by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and their enzymes. **Biodegradation**, v.20, p.209–220, 2009.

FENICE, M.; SERMANI, G. G. FEDERICI, F.; D'ANNIBALE, A. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. **Journal of Biotechnology**, v.100, n., p.77-85, 2001.

FOROOTANFAR, H., FARAMARZI, M.A., SHAHVERDI, A.R., YAZDI, M.T. Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. **Bioresource Technology**, v.102, p.1808–1814, 2011.

FRANCISCON, E.; PIUBELI, F.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; MENEZES, C.R.; SILVA, I.S.; CAVACO-PAULO, A.; GROSSMAN, M.J.; DURRANT, L.R. Polymerization study of the aromatic amines generated by the biodegradation of azo dyes using the laccase enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**. v.46, p.360–365, 2010.

GAITÁN-HERNÁNDEZ, R.; RODRÍGUEZ, I. B. Crecimiento micelial de cepas silvestres nativas de *Lepista nuda*, en medios de cultivo con diferentes suplementos orgánicos. **Revista Mexicana de Micología**, v.26, p.41-49, 2008.

GALHAUP, C.; HALTRICH, D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.56, p.225–232, 2001.

GALHAUP, C., WAGNER, H., HINTERSTOISSER, B., HALTRICH, D. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, p.529–536, 2002.

GEDIKLI, S.; AYTAR, P.; ÜNAL, A.; YAMAÇ, M.; ÇABUK, A.; KOLANKAYA, N. Enhancement with inducers of lacasse production by some strains and application of enzyme to dechlorination of 2,4,5-trichlorophenol. **Electronic Journal of Biotechnology**. v.13, n.6, p.1-6, 2010.

GHOREISHI, M.; HAGHIGHI, R. Chemical catalytic reaction and biological oxidation for treatment of non-biodegradable textile effluent. **Chemical Engineering Journal**, v.95, p.163-169, 2003.

GLENN, J. K.; GOLD, M. H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1741-1747, 1983.

GNANAMANI, A.; JAYAPRAKASHVEL, M.; ARULMANI, M.; SADULLA, S. Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p.1017–1021, 2006.

GOÉS-NETO, A.; MARQUES, M. F. O.; ANDRADE, J. D. e SANTOS, D. S. Lignicolous aphylloroid basidiomicota, in na atlantic forest fragment in the semi-arid caatinga region of Brazil. **Mycotaxon**, v.88, p. 359-364, 2003.

GOMAA, O. M. Ethanol induced response in *Phanerochaete chrysosporium* and its role in the decolorization of triarylmethane dye. **Annals of Microbiology**, v. 62, p.1403–1409, 2012.

GOMES, E.; AGUIAR, A. P.; CARVALHO, C. C.; BONFÁ, M. R. B.; SILVA, R.; BOSCOLO, M. Ligninases production by basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.31-39, 2009.

GOSHADZE, M.K.; ELISASHVILI, V.I. Biosynthesis and some properties of laccase from *Lentinus tigrinus* IBR-101, **Biochemistry (Moscow)**, v.58, p.1448–1452, 1993.

GRANDA, R. D. M.; MEJIA G. A. I.; JIMENEZ T. G. A. Utilizacion de residuos de plantano para La produccion de metabolitos secundarios por fermentacion em estado solido com el hongo *Lentinus crinitus*. **Vitae, Revista de La Facultad de Química Farmacêutica**, v. 12, n., p. 12-30, 2005.

GRINEVICIUS, V. M. A. S.; GEREMIAS, R.; LAUS, R.; BETTEGA, K.F.; LARANJEIRAS, M. C. M.; FÁVERE, V. P.; WILHELM- FILHO, D. e PEDROSA, R. C. Textile effluents induce biomarkers of acute toxicity, oxidative stress, and genotoxicity, **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 57, p.307–314, 2009.

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

GUO, L.-Q., LIN, S.-X., ZHENG, X.-B., HUANG, Z.-R., LIN, J.-F. Production, purification and characterization of a thermostable laccase from a tropical white-rot fungus. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, p.731-735, 2011.

HAMMEL, K. E. Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungi. **New Journal of Chemistry**, v. 20, p. 195-198, 1996.

HAO, O.J.; KIM, H.; CHIANG, P. C. Decolorization of wastewater. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 30, p.449– 502, 2000.

HASSEMER, M. E. N. **Oxidação Fotoquímica – UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Para Degradação de Poluentes Em Efluentes Da Indústria Têxtil**. Tese de doutorado, 175 p., Florianópolis, 2006.

HATVANI, N.; MÉCS, I. Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, n.3, p.381-386, 2002.

HEINFLING, A.; BERGBAUER, M.; SZEWZYK, U. Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.48, n.2, p.261-266, 1997.

HOSHIDA, H.; FUJITA, T.; MURATA, K.; KUBO, K.; AKADA, R. Copper-dependent production of a *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, n.6, p. 1090-1097, 2005.

HOSHIDA, H.; NAKAO, M.; KANAZAWA, H.; KUBO, K.; HAKUKAWA, T.; MORIMASA, M.; AKADA, R.; NISHIZAWA, Y. Isolation of Five Lactase Gene Sequences from the White-Rot Fungus *Trametes sanguinea* by PCR, and Cloning, Characterization and Expression of the Laccase cDNA in Yeasts. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 4, p.372-380, 2001.

HOU, H.; ZHOU, J.; WANG, J.; DU, C.; YAN, D. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v.39, p.1415–1419, 2004.

HUNGER, K. On the toxicology and metabolism of azo dyes. **Chimia**, v. 48, p. 520-522, 1994.

HUSSAIN, M.; HUSSAIN, Q. Applications of redox mediators in the treatment of organic pollutants by using oxidoreductive enzymes: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.38, n.1, p.1-42, 2008.

HUSSEINY SH. M. Biodegradation of the Reactive and Direct Dyes Using Egyptian Isolates. **Journal of Applied Sciences Research**, v.4, n. 6, p. 599-606, 2008.

IBRAHIM, V., MENDOZA, L., MAMO, G., HATTI-KAUL, R. Blue laccase from *Galerina* sp.: Properties and potential for Kraft lignin demethylation. **Process Biochemistry**, v.46, p.379-384, 2011.

JANG, M. Y.; RYU, W. Y.; CHO, M. H. Enhanced production of laccase from *Trametes* sp. By combination of various inducers. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.11, p. 96-99, 2006.

JANUSZ, G.; KUCHARZYK, K. H.; PAWLIK, A.; STASZCZAK, M.; PASZCZYNSKI, A. J. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.52, n.1, p. 1–12, 2013.

JAOUANI, A.; TABKA, M. G.; PENNINCKX, M. J. Lignin modifying enzymes of *Coriolopsis polyzona* and their role in olive oil mill wastewaters decolourisation. **Chemosphere**, v.62, p.1421–1430, 2006.

JIANG, M.; TEN, Z.; DING, S. 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.

JOHANNES, C.; MAJCHERCZYK, A. Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 524–528, 2000.

JONGEN, N.; BOWEN, P.; LEMAÎTRE, J.; VALMALETTE, J. C.; HOFMANN, H. Precipitation of Self-Organized Copper Oxalate Polycrystalline Particles in the Presence of Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC): Control of Morphology. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.226, p.189–198, 2000.

JUNIOR, N. L.; GERN, R. M. M.; FURLAN, S. P.; SCHLOSSER, D. Laccase Production by the Aquatic Ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03 and the White Rot Basidiomycete *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 During Submerged Cultivation on Banana Peels and Enzyme Applicability for the Removal of Endocrine-Disrupting Chemicals. **Appl Biochem Biotechnol** . v.167, p.1144–1156, 2012.

KACHLISHVILI, E.; PENNINCKX, M. J.; TSIKLARI, N.; ELISASHVILI, V. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, DOI 10.1007/s11274-005-9046-8, 2005.

KANWAL, H.K.; REDDY, M. S. Effect of carbon, nitrogen sources and inducers on ligninolytic enzyme production by *Morchella crassipes*. . **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, n.27, p.687–691, 2011.

KAPDAN, I. K.; KARGI, F.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R. Effect of environmental conditions on biological decolorization of textile dyestuff by *C. versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 381-387, 2000.

KAUSHIK, P. e MALIK, A. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. **Environmental international**, v. 35, n. 1, p. 127-141, 2008.

KHLIFI, R., BELBAHRI, L., WOODWARD, S., ELLOUZ, M., DHOUI, A., SAYADI, S., MECHICHI, T. Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system. **Journal of Hazardous Materials**, v.175, p. 802–808, 2010.

KNAPP, J. S.; NEWBY, P. S. e REECE, L. P. Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p. 664-668, 1995.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

KODAM, K.M.; SOOJHAWON, I.; LOKHANDE, P.D.; GAWAI, K.R.. Microbial decolorization of reactive azo dyes under aerobic conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n.21, p.367–370, 2005.

KUMAR, G. N.; SRIKUMAR, K. characterization of xerophytic thermophilic laccase exhibiting metal ion-dependent dye decolorization potential. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p.662–676, 2012.

KUNAMNENI, A.; CAMARERO, S.; GARCÍA-BURGOS, C.; PLOU, F. J.; BALLESTEROS, A.; ALCALDE, M. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. **Microbial Cell Factories**, doi:10.1186/1475-2859-7-32, 2008a.

KUNAMNENI, A.; PLOU, F. J.; BALLESTEROS, A.; ALCALDE, M. Laccases and their applications: a patent review. **Recent Patents on Biotechnology**, v.2, n.1, p.10-24, 2008b.

LAEMMLI, U.K. SDS-PAGE. **Nature**, 227, 680-685, 1970.

LANZER, R.; MÜLLER, M.; DUNCKE, M.; RASERA, K. Comparação de testes ecotoxicológicos com *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e *Daphia magna* (Straus, 1829) utilizando Remazol Brilliant Blue R e água de arroio urbano. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 1, p. 27-32, 2007.

LATIF, A., NOOR, S., SAHRIF, Q. M., NAJEEBULLAH, M. Different Techniques Recently Used For the Treatment of Textile Dyeing Effluents: A Review. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 32, n.1, p. 115–124, 2010.

LEATHAM, G. F. The ligninolytic activities of *Lentinus edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.51-58, 1986.

LEATHAM, G. F.; KIRK, T. K. Regulation of ligninolytic activity by nutrient N in white rot basidiomycetes, **FEMS Microbiology Letters**, v.7, p.16–65, 1983.

LEVIN, L.; FORCHIASSIN, F.; RAMOS, A. M. Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. **Mycologia**, v.94, n.3, p. 377–383, 2002.

LI, L.; DAI, W.; YU, P.; ZHAO, J.; QU, Y. Decolorisation of synthetic dyes by crude laccase from *Rigidoporus lignosus* W1. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, p. 399–404, 2008.

LIERS, C.; ULLRICH, R.; PECYNA, M.; SCHLOSSER, S.; HOFRICHTER, M. Production, purification and partial enzymatic and molecular characterization of a laccase from the wood-rotting ascomycete *Xylaria polymorpha*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.41, p.785–793, 2007.

LIMA, R. O. A.; BAZO, A. P.; SALVADORI, D. M. F.; RECH, C. M.; OLIVEIRA, D. P. e UMBUZEIRO, G. A. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source, **Mutation Research**, v. 626, p. 53–60, 2007.

LOMASCOLO, A.; RECORD, E.; L-GIMBERT, I. H.; DELATTRE, M.; ROBERT, J. L.; GEORIS, J.; DAUVRIN, T.; SIGOILLOT, J.-C.; ASTHER, M. Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.618–624, 2003.

LU, X.; DING, S. Effect of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and aromatic compounds on the Production of laccase isoforms by *Coprinus comatus*. **Mycoscience**, v.5, p.68–74, 2010.

LUIS, P., WALTHER, G., KELLNER, H., MARTIN, F., BUSCOT, F. Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p.1025–1036, 2004.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R. R. Biodegradation of Remazol Brilliant Blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 468-473, 2006.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; BONONI, V. I. R. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 146-252, 2005.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; RODRIGUES, T. A.; BONONI, V. L. R. Enhancement of growth of *Lentinus crinitus* in soil using benomyl and vegetable oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.425-427, 2006.

MADHAVI, V.; LELE, S. S. Laccase: properties and amplications. **BioResource**, v.4, n.4, p.1694-1717, 2009.

MASTRANGELO, G.; FEDELI, U.; FADDA, E.; MILAN, G.; LANGE, J. H. Epidemiologic evidence of cancer risk in textile industry workers: a review and *Mauginiella* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 854–862, 2003.

MAZUMDER, S., BASU, S. K., MUKHERJEE, M. Laccase production in solid-state and submerged fermentation by *Pleurotus ostreatus*. **Engineering in Life Sciences.**, v.9, p. 45–52, 2009.

MEZA, J. C.; AURIA, R.; LOMASCOLO, A.; SIGOILLOT, J-C.; CASALOT, L. Role of ethanol on growth, laccase production and protease activity in *Pycnoporus cinnabarinus* ss3. **Enzyme and Microbial Technology**, v.41, p. 162–168, 2007.

MIQUELANTE, F. A. **Prospecção de fungos filamentosos halotolerantes para uso na descoloração de efluentes têxteis**. Dissertação de Mestrado, 88 p., Curitiba, 2011.

MICHNIEWICZ, A.; ULLRICH, R.; LEDAKOWICZ, S.; HOFRICHTER, M. The white-rot fungus *Cerrena unicolor* strain 137 produces two laccase isoforms with different physico-chemical and catalytic properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.69, p.682–688, 2006.

MINUSSI, R.C.; MORAES, S.G.; PASTORE, G.M.; DURAN, N. Biodecolorization screening of synthetic dyes by four white-rot fungi in a solid medium: possible role of siderophores. **Letters in Applied Microbiology**, v.33, p.21–25, 2001.

MOILANEN, U.; OSMA, J. F.; WINQUIST, E.; LEISOLA, M.; RODRÍGUEZ COUTO, S. Decolorization of simulated textile dye baths by crude laccases from *Trametes hirsute* and *Cerrena unicolor*. **Engineering in Life Sciences**, v.10, n. 3, p. 242–247, 2010.

MOLLER, E. M., BAHNWEIG, G., SANDERMANN, H. E GEIGER, H.H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 22, p. 6115-6116, 1992.

MOUGIN, C.; KOLLMANN, A.; JOLIVALT, C. Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics, **Biotechnology Letters**, v.24, p.139–142, 2002.

MOREIRA NETO, S. L.; MATHEUS, D. R.; MACHADO, K. M. G. Influence of pH on the growth, laccase activity and RBBR decolorization by tropical basidiomycetes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.5, p.1075-1082, 2009.

MOYA, R., HERNÁNDEZ, M., GARCÍA-MARTÍN, A.B., BALL, A.S., ENRIQUETA ARIAS, M. Contributions to a better comprehension of redox-mediated decolouration and detoxification of azo dyes by a laccase produced by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. **Bioresource Technology** 101, 2224–2229, 2010.

MUÑOZ, C., GUILLÉN, F., MARTÍNEZ, A.T., MARTÍNEZ, M.F., Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn<sup>2+</sup> oxidation. **Applied and Environmental Microbiology**, 63, 2166–2174. 1997a.

MUÑOZ, C., GUILLÉN, F., MARTÍNEZ, A.T., MARTÍNEZ, M.J. Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. **Current Microbiology**, v.34, p. 1–5, 1997b.

MURUGESAN, K., KIM, H-M., JEON, M-K., CHANG, Y-S. Effect of metal ions on reactive dye decolorization by laccase from *Ganoderma lucidum*. **Journal of Hazardous Materials**, v.168, p.523–529, 2009.

NEIFAR, M., JAOUANI, A., ELLOUZE-GHORBEL, R., ELLOUZE-CHAABOUNI, S. Purification, characterization and decolourization ability of *Fomes fomentarius* laccase produced in solid medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.64, p.68-74, 2010.

NEAMȚU, M.; CATRINESCU, C.; KETTRUP, A. Effect of dealumination of iron(III)—exchanged Y zeolites on oxidation of Reactive Yellow 84 azo dye in the presence of hydrogen peroxide. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 51, p.149–157, 2004.

NIEBISCH, C. N. **Aplicação de culturas de *Lentinus crinitus*, *Lepista sordida* e *Hydnopolyporus fimbriatus* na biodegradação do corante têxtil Remazol Azul**. Dissertação de Mestrado, 109 p., Curitiba, 2009.

NIGAM, P.; ARMOUR, G.; BANAT, I. M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-absorbed agricultural residues. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 219-226, 2000.

NILADEVI, K.N., PREMA, P. Effect of inducers and process parameters on laccase production by *Streptomyces psammoticus* and its application in dye decolourization. **Bioresource Technology**, v. 99, p.4583–4589, 2008.

NILSSON, R.; NORDLINDER, R.; WASS, U.; MEDING, B.; BELIN, L. Asthma, rhinitis, and dermatitis in workers exposed to reactive dyes. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 50, p. 65-70, 1993.

NITHERANONT, T., WATANABE, A., ASADA, Y. Extracellular laccase produced by an edible basidiomycetous mushroom, *Grifola frondosa*: purification and characterization. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.75, p.538-43, 2011.

NOTANI, P. N.; SHAH, P.; BALAJRISHNAN, V. Occupation and cancers of the lung and bladder: a case-control study in Bombay. **International Journal of Epidemiology**, v. 22, p. 185-191, 1993.

NOUSASIAINEN, P.; MAIAJALA, P.; HATAKKA, A.; MARTÍNEZ, A. T.; SIPILÄ. Syringyl-type simple plant phenolics as mediating oxidants in laccase catalyzed degradation of ligninocellulosic materials: Model compound studies. **Holzforschung**, v.63, n.6, p.699-704, 2009.

NOVOTNÝ, C.; SVOBODOVÁ, K.; ERBANOVA, P.; CAJTHAML, T.; KASINATH, A.; LANG, E.; ŠAŠEK, V. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme

production and degradation rate. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p 1554-1551, 2004.

OKINO, L. K.; MACHADO, K. M. G.; CARLA FABRIS, C. e BONONI, V. L. R. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.16, p. 889-893, 2000.

OLLIKKA, P.; ALHONMÄKI, K.; LEPPÄNEN, V.; GLUMOFF, T.; RAIJOLA, T.; SIOMINEM, I. Decolorization of azo, triphenil methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 12, p. 4010-4016, 1993.

PALONEN, H.; SALOHEIMO, M.; VIIKARI, L.; KRUUS, K. Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p.854–862, 2003.

PAPINUTTI, V. L.; DIORIO, L. A.; FORCHIASSIN F. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.157–160, 2003.

PASZCZYNSKI, A.; PASTY-GRIGSBY, M. B.; GOSZCZYNSKI, S.; CRAWFORD, R. L.; CRAWFORD, D. L. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 3598-3604, 1992.

PATRICK, F.; MTUI, G.; MSHANDETE, A. M.; KIVAISI, A. Optimization of laccase and manganese peroxidase production in submerged culture of *Pleurotus sajor-caju*. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.50, p. 10166-10177, 2011.

PISCITELLI, A.; DEL VECCHIO, C.; FARACO, V.; GIARDINA, P.; MACELLARO, G.; MIELE, A.; PEZZELLA, C.; SANNIA, G. Fungal laccases: Versatile tools for lignocellulose transformation. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, p.789–794, 2011.

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

POZDNYAKOVA, N. N.; NIKIFOROVA, S. V.; MAKAROV, O. E.; Turkovskaya, O. V. Effect of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Laccase Production by White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus* D1. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 47, n. 5, p 543–548, 2011.

RAJAGURU, P.; FAIRBAIM, L. J.; ASHBY, J.; WILLINTONG, M. A.;TURNER, S.; WOOLFORD, L. A.; CHINNASAMY, N.; RAFFERTY, J. A. Genotoxicity studies on the azo dye Direct Red 2 using the in vivo mouse bone marrow micronucleus test. **Mutation Research**, v. 444, p. 175-180, 1999.

RAJENDRAN, R.; KARTHIK SUNDARAM, S.; SRIDEVI, B. V.; PRABHACATHI, P.; GOPI, V. Biodetoxification of azo dye containing textile effluent through adapted

fungal strains. **Journal of Environmental Science and Technology**, v.6, n.1, p.29-41, 2012.

RAMACHANDRAN, T., GANESAN, P., HARIHARAN, S. Decolourization of Textile Effluents — an Overview. **Journal of the Institution (India) Part TX**. v.90, p.20-25, 2010.

RATANAPONGLEKA, K.; PHETSOM, J. Extraction in Two-Phase Systems and Some Properties of Laccase from *Lentinus polychrous* **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 81, p. 812-815 , 2011.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **TRENDS in Biotechnology**, v. 24, n°5, p. 219-226, 2006.

ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 247-255, 2001.

ROBLES, A.; LUCAS, R.; MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M.; OMAR, N. B.; PÉREZ, R. e GÁLVEZ, A. Characterisation of laccase activity produced by the hyphomycete *Chalara* (syn. *Thielaviopsis*) *paradoxa* CH32, **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p. 516–522, 2002.

RODRIGUES, R. C.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Coupling chemical modification and immobilization to improve the catalytic performance of enzymes. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, p.2216–2238, 2011.

RODRÍGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN MA, GÜBIT, G.M. Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsute*. **Chemosphere**, v. 58, p.417–422, 2005.

ROGALSKI, J.; DAWIDOWICZ, A.; JÓZWIK, E.; LEONOWICZ, A. Immobilization of laccase from *Cerrena unicolor* on controlled porosity glass. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.6, p. 29–39, 1999.

SADETTIN, S. e DOÑMEZ, G. Bioaccumulation of reactive dyes by thermophilic cyanobacteria, **Process Biochemistry**, v. 41, p. 836–841, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMSON, J.; LANGLOIS, E.; LEI, J.; PICHE, Y.; CHENEVERT, R. Removal of 2,4,6-trinitrotoluene and 2,4-dinitrotoluene by fungi (*Ceratocystis coerulescens*, *Lentinus lepideus* and *Trichoderma harzianum*). **Biotechnology Letters**, v. 20, p.355–358, 1998.

SANTOS, A. B.; CERVANTES, F. J.; B.VAN LIER, J. B. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. **Bioresource Technology**, v.98, p. 2369–2385, 2007.

- SAPARRAT, M. C. N.; MOCCHIUTTI, P.; LIGGIERI, C. S.; AULICINO, M. B.; CAFFINI, N. O.; BALATTI, P. A. e MARTÍNEZ, M. J. Ligninolytic enzyme ability and potential biotechnology applications of the white-rot fungus *Grammothele subargentea* LPSC no. 436 strain, **Process Biochemistry**, v. 43, p. 368–375, 2008.
- SARON, C. e FELISBERTI, M. I. Ação de colorantes na degradação e estabilização de polímeros. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 124-128, 2006.
- ŞAŞMAZ, S.; GEDIKLI, S.; AYTAR,, P.; GÜNGÖRMEDI, G.; ÇABUK, A.; HÜR, E.; ÜNAL, E.; KOLANKAYA, N. Decolorization Potential of Some Reactive Dyes with Crude Laccase and Laccase-Mediated System. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.163, p.346–361, 2010.
- SATHIYA MOORTHI, P.; PERIYAR SELVAM, S.; SASIKALAVENI, A.; MURUGESAN, K.; KALAIHELVAN, P. T. Decolorization of textile dyes and their effluents using white rot fungi. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n.4, p. 424-429, 2007.
- SCHEEL, T.; HOFER, M.; LUDWIG, S.; HOLKER, U. Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.54, p. 686–691, 2000.
- SCHEIBNER, K.; HOFRICHTER, M.; HERE, A.; MICHELS, J.; FRITSCHÉ, W. Screening for fungi intensively mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.47, p.452-457, 1997.
- SHAO, X.; GAO, Y.; JIANG, M.; LI, L. Deletion and site-directed mutagenesis of laccase from *Shigella dysenteriae* results in enhanced enzymatic activity and thermostability, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 274–280, 2009.
- MATÉ, D.; GARCÍA-RUIZ, E.; CAMARERO,S.; ALCALDE, M. Directed evolution of fungal laccases. **Current Genomics**, v.12, n.2, p.113–122, 2012.
- SHARMA, S.; SHARMA, S.; SINGH, P. K.; SWAMI, R. C. e SHARMA, K. P. Exploring fish bioassay of textile dye wastewaters and their selected constituents in terms of mortality and erythrocyte disorders, **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 34, p.83:29, 2009.
- SHIN, K-S. The Role of Enzymes Produced by White-Rot Fungus *Irpex lacteus* in the Decolorization of the Textile Industry Effluent. **The Journal of Microbiology**, v.42, n.1, p.37-41, 2004.
- SHUTOVA, V. V.; REVIN, V. V.; MYAKUSHINA, Y. A. The effect of copper ions on the production of laccase by the fungus *Lentinus (Panus) tigrinus*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 619–623, 2008.
- SILVA, G. T. e GIBERTONI, T. B. Aphylophorales (Basidiomycota) em áreas urbanas da região metropolitana de Recife, PE, Brasil. **Hoehnea**, v. 33, n. 4, p. 344-543, 2006.

- SINGH D. e CHEN, S. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology** v.8, p. 399-417, 2008.
- SIRIM D, WAGNER F, WANG L, SCHMID RD, PLEISS J. The laccase engineering database: a classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases. **Database**. doi:10.1093/database/bar006. (2011).
- SIVAKUMAR, R.; RAJENDRAN, R.; BALAKUMAR, C.; TAMILVENDAN, M. Isolation, Screening and Optimization of Production Medium for Thermostable Laccase Production from *Ganoderma* sp. **International Journal of Engineering Science and Technology**, v. 2, n.12, p.7133-7141, 2010.
- SMIRNOV, S. A., KOROLEVA, O. V., VAVRILOVA, V. P., BELOVA, A. B., KLYACHKO, N. L. Laccases from basidiomycetes: physicochemical characteristics and substrate specificity towards methoxyphenolic compounds. **Biochemistry (Moscow)**, v.66, p.774–779, 2001.
- ŠNAJDR, J.; BALDRIAN, P. Temperature affects the production, activity and stability of ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*. **Folia Microbiologica**, v.52, n.5, p.498-502, 2007.
- SOARES, G. M. B.; AMORIM, M. T. P.; COSTA-FERREIRA, M. Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. **Journal of Biotechnology**, v.89, p. 123–129, 2001.
- SODEN, D. M.; DOBSON, A. D. W. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. **Microbiology**, v. 147, p.1755–1763, 2001.
- SONGULASHVILI, G.; ELISASHVILI, V.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; HADAR, Y. Purification and Particular Characterization of Laccase from the Ling Zhi or Reishi Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. 447 (Aphyllphoromycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.10, n.4, p.361–368, 2008.
- SOUZA, C. G. M.; TYCHANOWICZ, G. K.; SOUZA, D. F.; PERALTA, R. M. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. **Journal of Basic Microbiology**. v.44, n. 2, p.129–136, 2004.
- SPADARO, J. T.; GOLD, M. H.; RENGANATHAN, V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2397-2401, 1992.
- SRINIVASAN, C.; D'SOUZA, T. M.; BOOMINATHAN, K.; REDDY, C.A. Demonstration of Laccase in the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.12, p. 4274–4277, 1995.

STAJIĆ, M.; PERSKY, L.; HADAR, Y.; FRIESEM, D.; DULETIĆ-LAUŠEVIĆ, S.; WASSER, S. P.; NEVO, E. Effect of Copper and Manganese Ions on Activities of Laccase and Peroxidases in Three *Pleurotus* Species Grown on Agricultural Wastes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 128, p.87-96, 2006.

STEFFEN, K.T., HATAKKA, A., HOFRICHTER, M. Removal and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.60, p.212–217, 2002.

STRONG, P. J. Improved Laccase Production by *Trametes pubescens* MB89 in Distillery Wastewaters. **Enzyme Research**, doi:10.4061/2011/379176, 2011.

STRONG P.J. E CLAUS H. Laccase: A review of its past and its future in bioremediation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.411, p. 373-434, 2011.

SULZBACHER, M. A.; PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L.; CORTEZ, V. G. Nota sobre os fungos agaricales (basidiomycota) da Estação Ecológica de Aracuri, Esmeralda, Rio Grande do Sul, Brasil. **Biociências**, v. 15, n. 1, p. 143-153, 2007.

SWAMY, J. e RAMSAY, J. A. Effects of  $Mn^{2+}$  and  $NH_4$  concentrations on laccase and manganese peroxidase production and Amaranth decoloration by *Trametes versicolor*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p.391-396, 1999.

SWEENEY, E. A.; CHIPMAN, J. K.; FORSYTHE, F. J. Evidence for direct-acting oxidative genotoxicity by reduction products of azo dyes. **Environmental Health Perspectives**, v.102, n. 6, p.119-122, 1994.

TÉLLEZ-TÉLLEZ, M., FERNÁNDEZ, F. J., MONTIEL-GONZÁLEZ, A. M., SÁNCHEZ, C., DÍAZ-GODÍNEZ, G. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.81, p.675–679, 2008.

THURSTON, C.F. The structure and function of fungal lacasses. **Microbiology**, v.140, n. 1, p. 19-26, 1994.

TLECUITL-BERISTAIN, S.; SÁNCHEZ, C.; LOERA, O.; ROBSON, G. D.; DÍAZ-GODÍNEZ, G. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. **Mycological Research**, v.112, p. 1080 – 1084, 2008.

TORRES-DUARTE, C.; ROMAN, R.; TINOCO, R.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Halogenated pesticide transformation by a laccase–mediator system. **Chemosphere**, v.77, p.687–692, 2009.

TOUMELA, M.; STEFFEN, K. T.; KERKO, E.; HARTIKAINEN, H.; HOFRICHTER, M.; HATAKKA, A. Influence of Pb contamination in boreal forest soil on the growth and ligninolytic activity of litter-decomposing fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, n. 53, p.179-186, 2005.

TRIPATHI, A.; UPADHYAY, R. C.; SINGH, S. Extracellular Ligninolytic Enzymes in *Bjerkandera adusta* and *Lentinus squarrosulus*. **Indian Journal of Microbiology**, v.51, n.6, p.635-49, 2011.

TROVASLET, M.; ENAUD, E.; GUIAVARC'H, Y.; CORBISIER, A.-M.; VANHULLE, S. Potential of a *Pycnoporus sanguineus* laccase in bioremediation of wastewater and kinetic activation in the presence of an anthraquinonic acid dye. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 368–376, 2007.

TWARDOKUS, R. G. **Reuso de água no processo de tingimento da indústria têxtil**. Dissertação de Mestrado pelo curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

ULLAH, M.A.; CAMACHO, R.; EVANS, C.S.; HEDGER, J.N. Production of ligninolytic enzymes by species assemblages of tropical higher fungi from Ecuador, in: Watling, R.; Frankland, J.C.; Ainsworth, A.M.; Isaac, S.; Robinson C.H. (Eds.), **Tropical Mycology: Macromycetes**, v. 1, CABI Publishing, UK, 2001, p. 101–112.

VALÁŠKOVÁ, V., ŠNAJDR, J., BITTNER, B., CAJTHAML, T., MERHAUTOVÁ, V., HOFRICHTER, M., BALDRIAN, P. Production of lignocellulose-degrading enzymes and degradation of leaf litter by saprotrophic basidiomycetes isolated from a *Quercus petraea* forest. **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, p. 2651-2660, 2007.

VALENZUELA F, E. Hongos comestibles silvestres colectados en la X region de Chile. **Boletín Micológico**, v. 18, p. 1-14, 2003.

VAN AKEN, B. e AGTHOS, S. N. Implications of manganese (III), oxalate, and oxygen in the degradation of nitroaromatic compounds by manganese peroxidase (MnP). **Advances in Applied Microbiology**, v. 58, p.345-351, 2002.

VAN AKEN, B.; AGTHOS, S. N. Biodegradation of nitro-substituted explosives by lignolytic white-rot fungi: a mechanistic approach. **Advances in Applied Microbiology**, v. 48, p.1-77, 2001.

VANDEVIVERE, P. C.; BIANCHI, R.; VERSTRAETE, W. Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 72, p. 289-302, 1998.

VANHULLE, S.; TROVASLET, M; ENAUD, E.; LUCAS, M.; SONVEAUX, M.; DECOCK, C.; ONDERWATER, R.; SCHNEIDER, Y-J e CORBISIER A. M. Cytotoxicity and genotoxicity evolution during decolorization of dyes by White Rot Fungi, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.337–344, 2008.

VASDEV, K.; KUHAD, R. C. Induction of Laccase Production in *Cyathus buller* under Shaking and Static Culture Conditions. **Folia Microbiologica**, v.39, n.4, p.326-330, 1994.

VETCHINKINA, E.; POZDNYAKOVA, N. N.; NIKITINA, N. E. Laccase and lectin activities of intracellular proteins produced in a submerged culture of the xylotrophic basidiomycete *Lentinus edodes*. **Current Microbiology**, v.57, p.381–385, 2008.

VINEIS, P. e PIRASTU. R. Aromatic amines and cancer. **Cancer Causes and Control**, v.8, p.346-355, 1997.

WANG, Z., XUE, X., HUANG, K., LIU, Z. Textile Dyeing Wastewater Treatment, Advances in Treating Textile Effluent, Prof. Peter Hauser (Ed.), ISBN: 978-953-307-704-8, InTech, Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-treating-textile-effluent/textile-dyeing-wastewatertreatment>. 2011.

WESENBERG, D.; BUCHON, F.; AGATHOS, S. N. Degradation of dye-containing textile effluent by the agaric white-rot fungus *Clitocybula dussenii*. **Biotechnology Letters**, v.24, p.989–993, 2002.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I., AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances** v.22, p. 161-187, 2003.

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

XIAO, Y. Z.; HONG, Y. Z.; LI, J. F.; HANG, J.; TONG, P. G.; FANG, W. ; ZHOU, C. Z. Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.71, p.493-501, 2006.

YOUSHUANG, Z., HAIBO, Z., MINGLE, C., ZHENZHEN, M., FENG, H. E PEIJI, G. Production of a thermostable metal-tolerant Laccase from *Trametes versicolor* and its Application in dye decolorization. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.16, p.1027-1035, 2011.

YOUNES, S. B.; BOUALLAGUI, Z.; SAYADI, S. Catalytic behavior and detoxifying ability of an atypical homotrimeric laccase from the thermophilic strain *Scytalidium thermophilum* on selected azo and triarylmethane dyes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.79, p. 41– 48, 2012.

ZANONI, M. V. B. E CARNEIRO, P. A. O descarte dos corantes têxteis. **Ciência Hoje**, v. 29, n. 174, p. 61-64, 2001.

ZHAO, J. E JANSE, B. J. H. Comparison of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzymes in selected white rot fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 139, p. 215–221, 1996.

ZILLY, A.; COELHO-MOREIRA, J. A.; BRACHT, A.; SOUZA, C. G. M.; CARVAJAL, A. E.; KOEHNLEIN, E. A., PERALTA, R. M. Influence of NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on the kinetics and dye decolorization ability of crude laccase from *Ganoderma lucidum*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.65, p.340-344, 2011.

ZOOROB, G.K., CARUSO, J.A. Speciation of chromium dyes by high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v.773, p.157–162, 1997.