



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Tese de Doutorado

PRODUÇÃO DE FENOL-OXIDASES E DEGRADAÇÃO DE CORANTES
TÊXTEIS POR POLÍPOROS (BASIDIOMYCOTA) ISOLADOS NA REGIÃO
SUL DO BRASIL

Lígia Soares Carrascoza

Caxias do Sul – RS

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

C313p Carrascoza, Lígia Soares

Produção de fenol-oxidases e descoloração de corantes têxteis por
políporos (Basidiomycota) isolados na Região Sul do Brasil / Lígia
Soares Carrascoza. – 2018.

135 f. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, 2018.

Orientação: Marli Camassola.

Coorientação: Aldo José Pinheiro Dillon.

1. Fungos - Rio Grande do Sul. 2. Basidiomycota. 3. Corantes. I.
Camassola, Marli, orient. II. Dillon, Aldo José Pinheiro, coorient. III.
Título.

CDU 2. ed.: 582.28(816.5)

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

Lígia Soares Carrascoza

PRODUÇÃO DE FENOL-OXIDASES E DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS
POR POLÍPOROS (BASIDIOMYCOTA) ISOLADOS NA REGIÃO SUL DO BRASIL

*Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do
Sul, visando à obtenção de grau de Doutora em
Biotecnologia.*

Orientadora

Profa. Dra. Marli Camassola

Coorientador

Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Caxias do Sul – RS

2018

Lígia Soares Carrascoza

Produção de Fenol-oxidases e Descoloração de Corantes Têxteis por Políporos
(Basidiomycota) Isolados na Região Sul do Brasil

*Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,
visando à obtenção de grau de Doutora em
Biotecnologia.*

Orientadora: Profa. Dra. Marli Camassola

Coorientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Tese aprovada em 27 de abril de 2018.

Professora orientadora Dra. Marli Camassola

Professor coorientador Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Dra. Fernanda Bettin

Professora Dra. Lorena Benathar Ballod Tavares

Professor Dr. Maurício Moura da Silveira

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Renan Cancelli Carrascoza e Suzel Terezinha Soares pela sólida educação e incentivo.

Aos orientadores, professora Dra. Marli Camassola e professor Dr. Aldo José Pinheiro Dillon, pelos ensinamentos e tempo dedicado para o alcance de mais esse objetivo.

À técnica do laboratório Roselei Claudete Fontana, por toda cooperação na execução dos experimentos.

Aos colegas de laboratório pela ajuda, além das conversas e desabafos mútuos.

À professora Dra. Rosane Maria Lanzer e à aluna Paula Mulazzani Candiago do Laboratório de Toxicologia e Limnologia da UCS pela cooperação com os testes de toxicidade.

Aos professores da banca de acompanhamento Dr. Maurício Moura da Silveira e Dra. Rosane Maria Lanzer pelos apontamentos necessários.

À banca, Dra. Fernanda Bettin, Dra. Lorena Benathar Ballod Tavares e Dr. Maurício Moura da Silveira, pelas importantes complementações.

A CAPES pela bolsa concedida e ao CNPq e FAPERGS pelo incentivo à pesquisa.

Enfim, a todos os amigos que de uma forma ou de outra contribuíram para a minha formação.

Muito obrigada a todos!

“Quando a última árvore for cortada,
Quando o último rio for envenenado,
Quando o último peixe for pescado,
O homem descobrirá que o dinheiro não se come.”

Standing Elk – Líder indígena americano

ÍNDICE

Lista de Figuras

Lista de Quadros

Lista de Tabelas

Nomenclatura

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Indústria têxtil	5
2.1.1. Corantes têxteis	7
2.2. Problemática ambiental dos corantes têxteis	12
2.3. Tratamento dos corantes têxteis	14
2.3.1. Biodegradação dos corantes têxteis	15
2.4. Fungos lignolíticos	16
2.4.1. Filo Basidiomycota	17
2.4.1.1. Gênero <i>Pleurotus</i>	19
2.4.1.2. Gênero <i>Trametes</i>	21
2.5. Sistema enzimático lignolítico	23
2.5.1. Enzimas fenol-oxidases	24
2.5.1.1. Manganês peroxidases	24
2.5.1.2. Lignina peroxidases	26
2.5.1.3. Lacases	28
2.6. Produção das fenol-oxidases	31
2.7. Caracterização da degradação de corantes	33
2.8. Análises toxicológicas	34
2.8.1. <i>Daphnia magna</i>	36
2.8.2. <i>Caenorhabditis elegans</i>	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. Linhagens	41
3.2. Seleção das linhagens produtoras de enzimas extracelulares	46
3.2.1. Meio ágar ácido gálico	46
3.2.2. Meio ágar corante	47
3.2.3. Cálculo da porcentagem de oxidação dos meios ácido gálico e corante	47
3.3. Meios para produção enzimática	48
3.3.1. Cultivo submerso	48

3.3.2. Cultivo em estado sólido _____	49
3.4. Métodos analíticos _____	49
3.4.1. Determinação da umidade no cultivo em estado sólido _____	50
3.4.2. Determinação do potencial hidrogeniônico (pH) _____	50
3.4.3. Determinação das proteínas solúveis totais (PST) _____	51
3.4.4. Determinações enzimáticas _____	52
3.4.4.1. Lacases (Lac) _____	52
3.4.4.2. Peroxidases (Per) _____	53
3.4.4.3. Manganês peroxidases (MnP) _____	54
3.4.4.4. Lignina peroxidases (LiP) _____	55
3.4.4.5. Oxidases do álcool veratrílico (OAV) _____	56
3.4.5. Determinação da biomassa micelial em cultivo submerso _____	57
3.4.6. Caracterização específica de <i>Trametes hirsuta</i> 358/10 _____	57
3.4.6.1. Atividades específicas _____	57
3.4.6.2. Tampão e pH ótimo de atividade das lacases _____	58
3.4.6.3. Temperatura ideal de atividade das lacases _____	58
3.4.6.4. Termoestabilidade da atividade das lacases _____	59
3.4.6.5. Determinação das constantes cinéticas na atividade das lacases _____	59
3.4.6.6. Avaliação das isoformas das lacases em eletroforese <i>SDS-PAGE</i> _____	59
3.5. Testes de descoloração _____	60
3.6. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) _____	62
3.7. Teste de toxicidade _____	63
3.7.1. Toxicidade aguda _____	63
3.7.2. Toxicidade crônica _____	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	67
4.1. Seleção das linhagens com base na produção de enzimas extracelulares _____	67
4.2. Análises das linhagens selecionadas em cultivos submerso e em estado sólido _____	70
4.2.1. Atividade das lacases (Lac) _____	70
4.2.2. Atividade das peroxidases (Per) _____	72
4.2.3. Atividade das manganês peroxidases (MnP) _____	73
4.2.4. Atividade das lignina peroxidases (LiP) _____	74
4.2.5. Atividade das oxidases do álcool veratrílico (OAV) _____	75
4.2.6. Concentração das proteínas solúveis totais (PST) _____	80
4.2.7. Potencial hidrogeniônico (pH) _____	81
4.2.8. Crescimento micelial _____	83
4.3. Caracterização específica de <i>Trametes hirsuta</i> 358/10 _____	84
4.3.1. Atividades específicas das lacases, peroxidases e manganês peroxidases _____	85
4.3.2. Caracterização das lacases _____	86
4.4. Aplicação em tratamento de efluentes _____	93
4.5. Testes de descoloração _____	94
4.6. Análise de cromatografia líquida das amostras de corantes descoloridos _____	102
4.7. Teste de toxicidade _____	103
4.7.1. Toxicidade aguda _____	103
4.7.2. Toxicidade crônica _____	106
5. CONCLUSÕES _____	109
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	111

Lista de Figuras

Figura 1. Classificação dos corantes baseada no grupo cromóforo presente.	9
Figura 2. <i>Pleurotus pulmonarius</i> (A) e <i>Pleurotus albidus</i> (B).....	21
Figura 3. <i>Trametes hirsuta</i>	22
Figura 4. Ciclo catalítico simplificado da MnP.....	25
Figura 5. Ciclo catalítico simplificado da LiP.....	27
Figura 6. Ciclo catalítico da Lac.	28
Figura 7. Exemplares de <i>Daphnia magna</i>	37
Figura 8. Exemplar de <i>Caenorhabditis elegans</i>	38
Figura 9. Diluições às quais as amostras (controles e testes) foram submetidas e indicação dos respectivos fatores de toxicidade (FT).	65
Figura 10. Relação halo/colônia da oxidação do ácido gálico (A) e descoloração do corante <i>Reactive Blue 220</i> (B) produzidas por linhagens de fungos políporos. Os dados em valores percentuais são apresentados em relação aos da linhagem controle <i>Pleurotus pulmonarius</i> PS-2001, sendo a média de H/C desta linhagem considerada 100%.	68
Figura 11. Crescimento micelial e halo de oxidação do ácido gálico e de descoloração do corante <i>Reactive Blue 220</i> após quatro dias de incubação ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) de algumas das linhagens selecionadas pela produção de fenol-oxidases.	69
Figura 12. Variação das atividades de lacases das linhagens de macrofungos crescidas em cultivos submerso (A) e em estado sólido (B). Cultivos realizados em quintuplicatas e quadruplicatas, respectivamente.	71
Figura 13. Variação das atividades de peroxidases das linhagens de macrofungos crescidas em cultivos submerso (A) e em estado sólido (B). Cultivos realizados em quintuplicatas e quadruplicatas, respectivamente.	72
Figura 14. Variação das atividades de manganês peroxidases das linhagens de macrofungos crescidas em cultivos submerso (A) e em estado sólido (B). Cultivos realizados em quintuplicatas e quadruplicatas, respectivamente.	74

Figura 15. Variação das atividades de lignina peroxidases das linhagens de macrofungos crescidas em cultivos submerso (A) e em estado sólido (B). Cultivos realizados em quintuplicatas e quadruplicatas, respectivamente.....	75
Figura 16. Variação das atividades de oxidases do álcool veratrílico das linhagens de macrofungos crescidas em cultivos submerso (A) e em estado sólido (B). Cultivos realizados em quintuplicatas e quadruplicatas, respectivamente.	76
Figura 17. Variação da concentração de proteínas solúveis totais das linhagens de macrofungos crescidas em cultivos submerso (A) e em estado sólido (B). Cultivos realizados em quintuplicatas e quadruplicatas, respectivamente.	81
Figura 18. Variação do potencial hidrogeniônico das linhagens de macrofungos crescidas em cultivos submerso (A) e em estado sólido (B). Cultivos realizados em quintuplicatas e quadruplicatas, respectivamente.....	82
Figura 19. Crescimento micelial das linhagens de macrofungos crescidas em cultivo submerso realizado em quintuplicatas.	84
Figura 20. Variação das atividades específicas de lacases (Lac), peroxidases (Per) e manganês peroxidases (MnP) produzidas por <i>Trametes hirsuta</i> 358/10, em cultivos submerso (A) e em estado sólido (B).	85
Figura 21. Efeito do pH e de diferentes tampões na atividade das lacases produzidas por <i>Trametes hirsuta</i> 358/10 em cultivos submerso (A) e em estado sólido (B).	86
Figura 22. Atividade das lacases de <i>Trametes hirsuta</i> 358/10 avaliadas no tampão citrato em pH 3,5, nas diferentes temperaturas (20, 25, 30, 35, 40 e 45°C). No eixo Y esquerdo são apresentados os dados das enzimas produzidas em cultivo submerso e no eixo Y direito no cultivo em estado sólido.....	88
Figura 23. Atividade relativa (%) das lacases produzidas por <i>Trametes hirsuta</i> 358/10 em cultivo submerso (A) e em estado sólido (B) após incubação dos caldos enzimáticos em diferentes temperaturas. As análises enzimáticas foram realizadas utilizando o tampão citrato de sódio em pH 3,5.....	89
Figura 24. Comportamento da curva para a atividade das lacases de <i>Trametes hirsuta</i> 358/10 presentes nos caldos do cultivo submerso e em estado sólido.	91
Figura 25. Zimograma de proteínas nativas após a reação com o substrato (ABTS) para a detecção da atividade de lacases dos caldos enzimáticos produzidos por <i>Trametes</i>	

<i>hirsuta</i> 358/10 em cultivo submerso (1) e em estado sólido (3), além do marcador de referência (2) com as respectivas massas moleculares (kDa).	92
Figura 26. Fotografias do ensaio de descoloração após 48 h de reação, sendo (A) o controle e (B) o teste. O caldo enzimático de <i>Trametes hirsuta</i> 358/10 cultivado em meio submerso apresenta concentração de 5 U/mL de lacase e o corante diluição de 50 mg/L.	95
Figura 27. Fotografias do ensaio de descoloração após 48 h de reação, sendo (A) o controle e (B) o teste. O caldo enzimático de <i>Trametes hirsuta</i> 358/10 cultivado em estado sólido apresenta concentração de 5 U/mL de lacase e o corante diluição de 50 mg/L.	96
Figura 28. Porcentagem de descoloração dos corantes <i>Acid Blue</i> 80 e <i>Reactive Blue</i> 220 pelo caldo enzimático do <i>Trametes hirsuta</i> 358/10 em cultivo líquido (CL) e do corante <i>Brilliant Green</i> pelo caldo do cultivo sólido (CS).....	97
Figura 29. Potencial hidrogeniônico (pH) das reações dos corantes <i>Acid Blue</i> 80 (A) e <i>Reactive Blue</i> 220 (B) com o caldo enzimático do <i>Trametes hirsuta</i> 358/10 em cultivo líquido (CL) e do corante <i>Brilliant Green</i> (C) com o caldo em cultivo sólido (CS) e seus respectivos controles.....	99
Figura 30. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos controles <i>Acid Blue</i> 80 (A), <i>Reactive Blue</i> 220 (B) e <i>Brilliant Green</i> (C), bem como de suas reações, após 48 h, com os caldos dos cultivos líquido (CL) e sólido (CS) de <i>Trametes hirsuta</i> 358/10.	103
Figura 31. Crescimento corporal dos nematódeos <i>Caenorhabditis elegans</i> nas diluições avaliadas das amostras do caldo do cultivo sólido (CS), do cultivo sólido com o corante <i>Acid Blue</i> 80 e do cultivo sólido com o corante <i>Reactive Blue</i> 220 com diferença estatística (*) $p \geq 0,05$. As diluições de cada amostra foram realizadas em seis replicatas.....	106
Figura 32. Reprodução dos nematódeos <i>Caenorhabditis elegans</i> nas diluições avaliadas das amostras do caldo do cultivo sólido (CS), do cultivo sólido com o corante <i>Acid Blue</i> 80 e do cultivo sólido com o corante <i>Reactive Blue</i> 220 com diferença estatística (*) $p \geq 0,05$. As diluições de cada amostra foram realizadas em seis replicatas.	108

Lista de Quadros

Quadro 1. Classificação dos corantes de acordo com as características relacionadas ao processo de aplicação e fixação.....	11
Quadro 2. Exemplos de reações catalisadas pelas enzimas fenol-oxidases produzidas por fungos basidiomicetos.....	30
Quadro 3. Linhagens de fungos inicialmente avaliadas para produção de enzimas extracelulares.....	42

Lista de Tabelas

Tabela 1. Relação dos azocorantes utilizados nos ensaios de descoloração e seus respectivos comprimentos de onda.....	61
Tabela 2. Relação dos corantes trifenilmetano utilizados nos ensaios de descoloração e seus respectivos comprimentos de onda.....	61
Tabela 3. Relação dos corantes antraquinona utilizados nos ensaios de descoloração e seus respectivos comprimentos de onda.....	61
Tabela 4. Composições e quantidades das amostras para os testes de toxicidade.	64
Tabela 5. Comparação das atividades de fenol-oxidases produzidas por diferentes basidiomicetos em cultivo submerso.....	76
Tabela 6. Comparação das atividades de fenol-oxidases produzidas por diferentes basidiomicetos em cultivos em estado sólido.....	79
Tabela 7. pH e temperatura ótimos de atividade das lacases produzidas por diferentes fungos.	88
Tabela 8. Dados comparativos da capacidade de descoloração de diferentes corantes por diferentes fungos cultivados em meio submerso.....	100
Tabela 9. Dados comparativos da capacidade de descoloração de diferentes corantes por diferentes fungos cultivados em meio sólido.	101
Tabela 10. Fator de toxicidade (FT) dos testes com o microcústáceo <i>Daphnia magna</i> para as amostras listadas.	104

Nomenclatura

AE_{Lac} – atividade específica das lacases

ABTS – ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzolina-6-sulfonato)

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

K_m – constante de Michaelis-Menten

Lac – lacases

LiP – lignina peroxidases

MnP – manganês peroxidases

OAV – oxidases do álcool veratrílico

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

Per – peroxidases totais

PIB – produto interno bruto

PST – proteínas solúveis totais

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

U – unidades enzimáticas

V_{máx.} – velocidade máxima

RESUMO

Fungos políporos coletados na Região Sul do Brasil foram avaliados com relação à produção de enzimas extracelulares, sendo os mais promissores selecionados para os cultivos submerso e em estado sólido e caracterização dos caldos enzimáticos produzidos. Em ambas as formas de produção, destacou-se a linhagem de *Trametes hirsuta* 358/10, em que lacases e manganês peroxidases sobressaíram-se. As maiores atividades de lacases foram $131,13 \pm 32,37$ U/mL (cultivo submerso) e $631,57 \pm 42,99$ U/g (cultivo em estado sólido). Para manganês peroxidases, as maiores atividades foram $8,72 \pm 2,29$ U/mL e $246,97 \pm 28,36$ U/g. O pH que possibilitou a maior atividade de lacases para ambos os cultivos foi 3,5, em tampão citrato de sódio, na temperatura de 30°C; porém, as enzimas provenientes do cultivo em estado sólido apresentaram maior termoestabilidade. Ainda, foi verificado que as lacases produzidas nos dois sistemas de cultivo demonstraram afinidade semelhante pelo substrato ABTS, apesar das diferentes massas moleculares, dependendo da forma de produção. O potencial biotecnológico de *T. hirsuta* 358/10 foi explorado para a descoloração de corantes têxteis, mostrando uma ampla variação dependendo do corante e do sistema de produção dos caldos enzimáticos. Os corantes da classe antraquinona *Acid Blue* 80 e *Reactive Blue* 220 foram os mais eficientemente descoloridos, acima de 90%, pelo caldo do cultivo submerso, enquanto as reações com o extrato do cultivo em estado sólido apresentaram descolorações menos expressivas, sobressaindo-se a do corante da classe trifenilmetano *Brilliant Green* com descoloração acima de 80%. Porém, os testes de toxicidade revelaram que a descoloração não está diretamente relacionada à detoxificação e que, nesse ponto, o extrato do cultivo em estado sólido foi mais satisfatório ao diminuir a toxicidade aguda ao microcrustáceo *Daphnia magna* dos corantes *Acid Blue* 80 e *Reactive Blue* 220 e não interferir negativamente no crescimento corporal do nematódeo *Caenorhabditis elegans*, no teste de toxicidade crônica, em concentrações abaixo de 25% destes corantes após tratamento.

ABSTRACT

Polypore fungi collected in the Southern Region of Brazil were evaluated in relation to the production of extracellular enzymes, the most promising being selected for submerged and solid state cultures and characterization of the enzymatic broths produced. In both forms of production, the line of *Trametes hirsuta* 358/10 was highlighted, in which laccases and manganese peroxidases were prominent. The highest laccase activity was 131.13 ± 32.37 U/mL (submerged culture) and 631.57 ± 42.99 U/g (solid state culture). For manganese peroxidases, the highest activities were 8.72 ± 2.29 U/mL and 246.97 ± 28.36 U/g. The pH that allowed the highest activity of laccases for both cultures was 3.5, in sodium citrate buffer, at 30°C; however, the enzymes obtained from the solid state cultivation presented higher thermostability. Furthermore, it was verified that the laccases produced in the two culture systems showed similar affinity for the ABTS substrate, in spite of the different molecular masses, depending on the form of production. The biotechnological potential of *T. hirsuta* 358/10 was explored for the discoloration of textile dyes, showing a wide variation depending on the dye and the enzyme broth production system. Anthraquinone dyes Acid Blue 80 and Reactive Blue 220 were the most efficiently discolored, above 90%, by the submerged culture broth, while the reactions with the solid state culture extract showed less expressive discolorations, dye Brilliant Green of the triphenylmethane class with discoloration above 80%. However, toxicity tests revealed that the discoloration is not directly related to detoxification and that, at this point, the solid state culture extract was more satisfactory by decreasing the acute toxicity to *Daphnia magna* micro crustacean of the Acid Blue 80 and Reactive Blue 220 dyes and did not negatively interfere with the body growth of the nematode *Caenorhabditis elegans*, in the chronic toxicity test, at concentrations below 25% of these dyes after treatment.

1. INTRODUÇÃO

Cada vez mais, o meio ambiente vem sofrendo as consequências dos processos de industrialização que contribuem com uma crescente introdução de substâncias poluidoras de risco toxicológico para ecossistemas e para a saúde da população humana.

O desenvolvimento nas áreas da agricultura, medicina, fontes de energia e indústrias químicas é necessário para suprir as necessidades e exigências do excesso de população humana. Porém, quase todos os processos empregados para a produção de bens e serviços conduzem à produção de poluentes ambientais que são liberados no ar, na água e no solo.

Nas últimas décadas, tem havido um aumento da consciência para os efeitos tóxicos, carcinogênicos e mutagênicos de muitos poluentes químicos que não foram considerados perigosos no passado. Ao contrário de compostos orgânicos de ocorrência natural, que são prontamente degradados após a introdução no ambiente, alguns dos produtos químicos sintéticos são extremamente resistentes à biodegradação por microrganismos nativos.

Muitos dos compostos recalcitrantes são os principais poluentes ambientais, devido, sobretudo, à sua permanência no ambiente que contribui para sua acumulação, como, por exemplo, pesticidas organoclorados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, polímeros sintéticos e corantes sintéticos.

Os corantes sintéticos são frequentemente utilizados em muitos setores, como: têxtil, alimentar, papelero, de curtimento de couro, de cosméticos e de produtos farmacêuticos. Em sua maioria, são tóxicos, altamente solúveis em água, resistentes à degradação devido às suas complexas estruturas químicas e apresentam capacidade de absorver seletivamente a luz visível, além de apresentar propriedades carcinogênicas e/ou mutagênicas.

O setor têxtil é classificado como o maior poluidor entre todos os segmentos industriais. O lançamento de seus efluentes em corpos d'água sem um tratamento adequado gera modificações ambientais negativas, tais como eutrofização, com consequente diminuição

da demanda de oxigênio, e comprometimento do ciclo fotossintético, devido ao aumento de turbidez da água, provocando distúrbios na solubilidade dos gases, além de lesões nas brânquias dos organismos aquáticos. Através da cadeia alimentar, também afetam o metabolismo humano resultando em problemas renais, respiratórios, dermatites e hipertensão, entre outros.

Cerca de 10 a 15% dos corantes têxteis fabricados no mundo são descartados como efluentes (Akdogan *et al.*, 2014), tornando imprescindível o desenvolvimento de medidas que objetivem a diminuição dos impactos gerados por essa atividade, seja através de processos verdes – processos que eliminem ou minimizem a produção e liberação de produtos tóxicos no meio ambiente –, seja por meio da remediação ambiental.

Os tratamentos físicos, químicos e biológicos são amplamente empregados na recuperação ambiental, sendo os resíduos industriais de corantes geralmente tratados por métodos físico-químicos que são caros, produzem muitos resíduos e têm baixa versatilidade. Já os processos biológicos têm ganhado mais atenção devido ao seu baixo custo, versatilidade e ao fato de seus produtos e subprodutos poderem ser levados à completa mineralização.

Dessa forma, novas tecnologias estão em desenvolvimento, visando ao tratamento efetivo desses resíduos, e uma alternativa para reduzir os impactos é a possibilidade do emprego de fungos e suas enzimas para o tratamento dos efluentes e resíduos gerados pelas atividades envolvendo corantes, devido à capacidade dos fungos de catabolizar diferentes compostos orgânicos.

Entre as enzimas que se destacam para a degradação de corantes estão as fenol-oxidases, especialmente lacases e peroxidases, produzidas por diversos organismos. Trabalhos vêm sendo publicados indicando o potencial dos fungos da família Polyporaceae para processos de biorremediação por apresentarem capacidade de degradação de diversas substâncias recalcitrantes, tais como corantes, agrotóxicos e resíduos da indústria petrolífera.

Neste contexto, o presente trabalho objetiva avaliar o potencial de fungos políporos (Basidiomycota) isolados na Região Sul do Brasil para a produção de enzimas fenol-oxidases. Dentre os mais promissores, quantificar e caracterizar a produção dessas enzimas em meios de cultivo submerso e em estado sólido. Objetiva-se, ainda, avaliar a degradação de corantes têxteis pelos caldos enzimáticos, além de verificar sua conseqüente toxicidade, visando contribuir para o desenvolvimento de processos de biorremediação de efluentes e resíduos desse ramo industrial. Como objetivos específicos têm-se listados:

- selecionar fungos políporos produtores de fenol-oxidases;
- realizar cultivos submerso e em estado sólido para os fungos que apresentaram os resultados mais promissores na expressão dessas enzimas, determinando as atividades enzimáticas, as proteínas solúveis totais, o pH e o crescimento micelial;
- caracterizar os extratos do fungo que se destacou em ambos os meios com relação às atividades específicas e às lacases (constantes cinéticas, isoformas e efeitos do tampão, do pH e da temperatura);
- testar os caldos enzimáticos dos cultivos submerso e em estado sólido do fungo selecionado para a descoloração de corantes têxteis;
- avaliar a toxicidade das amostras que apresentaram maior descoloração.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No presente capítulo são apresentadas informações sobre as substâncias foco do presente trabalho, e a importância desse conhecimento para o desenvolvimento na área da biorremediação de corantes têxteis por enzimas fenol-oxidases produzidas por fungos basidiomicetos, além da abordagem toxicológica destes poluentes ambientais.

2.1. Indústria têxtil

As etapas iniciais do processo de industrialização de muitos países envolveram atividades relacionadas à indústria têxtil, apresentando, ainda hoje, grande importância na maioria desses países, sendo considerada um dos segmentos industriais de maior tradição. No Brasil, a indústria têxtil veio a se desenvolver no final do século XIX (Fujita & Jorente, 2015) e, de acordo com a Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção (2017), o País possui uma cadeia produtiva formada por 29.000 empresas formais, constituindo-se no quinto maior produtor têxtil do mundo, gerando em torno de 1,5 milhão de empregos diretos e 8 milhões se adicionados os indiretos e efeito renda, dos quais 75% são mão-de-obra feminina.

A expressividade desse setor é demonstrada, também, pelo faturamento, já que em 2016 o setor arrecadou US\$ 39,3 bilhões e US\$ 45 bilhões em 2017 (ABIT, 2017), evidenciando a importância econômica da área têxtil para o PIB brasileiro. Dessa forma, ao considerar-se que esta indústria é responsável por grande parte da economia de diversos países, avalia-se que, pelo grande volume de produção, 1,7 milhão de toneladas em 2017, só no Brasil (ABIT, 2017), também é significativo o volume de resíduos (sólidos, líquidos e gasosos) por ela produzidos.

Esses resíduos são oriundos das operações de limpeza, tingimento e acabamento, contribuindo para a classificação desse setor como o maior poluidor dentre todos os segmentos industriais, sendo responsável pela geração de uma enorme quantidade de efluentes, devido, também, aos seus processos utilizarem grande volume de água. Para se ter uma ideia, a indústria tradicional de acabamento têxtil consome cerca de 100 L de água para processar cerca de 1 kg de matéria têxtil, além de conter corantes sintéticos e aditivos como ureia, soda cáustica, gomas, detergentes, antiespumantes, cloro, formóis, emulsões, dispersantes, óleos e resinas, entre outros (Couto, 2009). Tais características podem causar uma série de problemas quando estes efluentes são descartados sem que os cuidados necessários sejam tomados.

No contexto dessa problemática, cada país é responsável pelos próprios instrumentos de regulação dos parques industriais. No Brasil, a Resolução do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 430/2011 – Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementando e alterando a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Entretanto, algumas normas instituídas em determinados locais tornaram-se globais, devido à importância mercantil dos países que as legitimam.

Segundo Freitag (2011), as práticas de gestão de resíduos industriais ainda são insignificantes quando comparadas ao volume de rejeitos produzidos. Entretanto, as atuais exigências legais têm elevado a busca por novas técnicas de tratamento, sejam elas físicas, químicas ou biológicas, e a escolha da melhor metodologia deve ser feita levando-se em consideração as características do efluente, assim como os objetivos a serem alcançados com o tratamento.

Vale ressaltar, com base no que foi abordado, que os efluentes têxteis apresentam uma composição bastante variada e danosa, sendo os corantes os componentes de maior complexidade, devido à recalcitrância e à solubilidade em água (Basha & Rajaganesh, 2014).

2.1.1. Corantes têxteis

Há indicações do uso de corantes pelo ser humano desde os primórdios das civilizações, estando relacionado, por exemplo, à história do Brasil, ao começar pelo nome, uma vez que este é proveniente da planta “pau-brasil” (*Caesalpinia echinata*), da qual era extraído um pigmento capaz de tingir tecidos com cores fortes, como vermelho, rosa ou marrom (Dallago *et al.*, 2005).

Até a metade do século XIX, os pigmentos utilizados eram somente de origem natural, provenientes de vegetais, insetos, moluscos e minerais, tendo grande importância cultural e econômica ao longo da história da humanidade. O primeiro corante sintético, a mauveína conhecida também como púrpura de anilina, foi acidentalmente produzido, em 1856, pelo químico inglês Willian Henry Perkin. A partir desta descoberta, centenas de novos corantes passaram a ser desenvolvidos e, no Brasil, a indústria de corantes sintéticos foi introduzida após a 1ª Guerra Mundial (Guaratini & Zanoni, 2000).

Apesar da vasta gama de cores oferecidas pela natureza, a baixa estabilidade e nenhuma padronização dos corantes naturais contribuíram para a necessidade do desenvolvimento de métodos de obtenção de novos corantes; assim, os corantes sintéticos entram em cena, impulsionando o desenvolvimento dessa indústria. Os corantes usados no setor têxtil são, em sua grande maioria, de origem sintética (Zanoni & Carneiro, 2001). A diversidade de corantes têxteis sintéticos é justificada, uma vez que cada tipo de fibra a ser colorida requer corantes com características próprias e bem definidas (Guaratini & Zanoni, 2000).

Os corantes têxteis são, então, uma mistura de compostos orgânicos com estruturas moleculares complexas, de coloração intensa, de origem natural ou sintética, aplicados em soluções que se fixam de modo uniforme em um substrato, devendo, preferencialmente, se apresentar estáveis à luz e aos processos de lavagem, características estas, que proporcionam

estabilidade às moléculas e, por consequência, uma difícil degradabilidade (Rosalen *et al.*, 2004).

A molécula de um corante é dividida em duas partes principais: (1) o grupo cromóforo – que dá cor ao composto, contendo frequentemente heteroátomos como N, O e S, com elétrons não ligantes, como exemplos, têm-se o nitrofenol, nitrosofenol, azo, trifenilmetano, antraquinona, entre outros, cujas estruturas moleculares podem ser visualizadas na Figura 1, e (2) grupos auxiliares – que intensificam a cor e propiciam qualidades tintoriais, gerando afinidade do corante pela fibra têxtil natural ou sintética, cujos exemplos são os grupamentos etila, nitro, amino, entre outros (Durán *et al.*, 2000).

Classe	Cromóforo	Exemplo
Nitro		 C.I. Amarelo ácido 24
Nitroso		 Verde rápido O
Azo		 Laranja de metila
Trifenilmetano		 C.I. Violeta básico 3
Ftalaleína		 Fenolftaleína
Índigo		 C.I. Azul ácido 71
Antraquinona		 C.I. Azul reativo 19

Figura 1. Classificação dos corantes baseada no grupo cromóforo presente.

(Fonte: Ali, 2010)

O cromóforo mais largamente empregado pertence à família dos azocorantes, representando cerca de metade de todos os corantes comerciais utilizados no mundo e o maior grupo dentre os corantes sintéticos, sendo, dessa forma, o mais comumente liberado no meio ambiente (Zhao & Hardin, 2007). Os azocorantes se caracterizam por conferirem cores intensas e variadas, apresentando um ou mais grupamentos azo (N=N) ligados aos sistemas aromáticos, conferindo-lhes os maiores níveis de toxicidade e resistência aos processos

químicos e biológicos de degradação dentre todos os corantes (Gowri *et al.*, 2014). Apresentam, por isso, as vias de degradação mais estudadas e estabelecidas quando comparados com os demais corantes.

Os corantes antraquinona constituem a segunda família de corantes, após os corantes azo, usados extensivamente na indústria têxtil, devido à sua ampla variedade de tons, facilidade de aplicação e consumo mínimo de energia (Baughman & Weber, 1994; Aspland, 1997). Os corantes à base de antraquinona são muito resistentes à degradação devido às suas fusões aromáticas – estruturas que retêm a cor por longos períodos de tempo (Banat *et al.*, 1996). A descoloração destes corantes também recebe muita atenção devido à toxicidade e efeitos cancerígenos e mutagênicos (Lu *et al.*, 2008).

Os corantes trifenilmetano são utilizados em vários processos industriais de tingimento e alguns podem, ainda, ser aplicados como fungicidas e ectoparasiticidas na piscicultura, gerando graves problemas ambientais, devido à sua interferência com os processos biológicos aquáticos (Fu *et al.*, 2013b). A maioria destes corantes apresentam estruturas moleculares aromáticas complexas, tornando-os difícil de degradar biologicamente através de reações de redução (Aksu, 2005). Apresentam-se, também, como moléculas recalcitrantes, tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas em células de mamíferos (Banat *et al.*, 1996; Culp & Beland, 1996).

Os corantes podem, dessa forma, ser classificados de acordo com a sua estrutura molecular – como visto anteriormente –, propriedades físico-químicas e características relacionadas ao processo de aplicação e fixação, sendo esta última a classificação mais adotada pela indústria têxtil, agrupando-os como segue no Quadro 1 (Guaratini & Zanoni, 2000).

Quadro 1. Classificação dos corantes de acordo com as características relacionadas ao processo de aplicação e fixação.

CORANTE	DESCRIÇÃO
Corantes reativos	Possuem este nome devido a sua capacidade de formar ligações covalentes com a fibra, conferindo maior estabilidade na cor; são os mais utilizados em todo o mundo; apresentam alta solubilidade em água; os principais possuem as funções azo e antraquinona; a reação química deste corante ocorre pela substituição do grupo nucleofílico pelo grupo hidroxila da celulose.
Corantes diretos	São constituídos, principalmente, por corantes contendo mais de um grupo azo, como diazo, triazo, entre outros, ou pré-transformados em complexos metálicos; possuem alta solubilidade em água, sendo capazes de tingir fibras celulósicas por meio de interações de Van der Waals; apresentam alto grau de exaustão durante a aplicação, com consequentemente diminuição nas águas de descarte.
Corantes azoicos	Utilizam um sistema de produção diretamente na fibra; insolúveis em água; alta resistência contra luz e umidade; em geral, possuem o grupo azo.
Corantes ácidos	Apresentam estrutura química baseada em compostos azo, antraquinona, triarilmetano; solúveis em água; previamente neutralizados se ligam à fibra por meio de trocas iônicas; ampla coloração e grau de fixação.
Corantes à cuba	Intensamente utilizados em fibras de algodão; praticamente insolúveis em água, porém, no processo, são reduzidos em solução alcalina, transformando-se em composto solúvel; classe de corantes baseada nos índigos, tioindigoides e antraquinoides.
Corantes de enxofre	Conferem coloração preta, verde oliva, azul marinho e marrom às fibras celulósicas; apresentam compostos macromoleculares com ligações de polissulfetos; altamente insolúveis em água; boa fixação; usualmente apresentam resíduos altamente tóxicos.
Corantes dispersivos	Utilizados principalmente em fibras sintéticas; insolúveis em água; aplicados por meio de suspensão; durante a coloração sofrem hidrólise, ocorrendo lentamente uma precipitação da molécula original.
Corantes pré-metalizados	Possuem um grupo hidroxila ou carboxila na posição orto em relação ao cromóforo azo, permitindo a formação de íons metálicos; estão associados ao alto conteúdo de metal em seu efluente; úteis, principalmente, para tintura de fibras protéicas e poliamidas.
Corantes branqueadores	Apresentam grupos carboxílicos, azometino, aliados a sistemas benzênicos e naftalênicos; são corantes brancos que diminuem a aparência amarelada das fibras têxteis no estado bruto devido à absorção da luz na faixa de baixo comprimento de onda, proporcionando, quando excitados por luz ultravioleta, a reflexão por fluorescência na região de 430 a 440 nm.

(Fonte: Elaborado pela autora a partir de Guaratini & Zanoni, 2000)

O processo de coloração das fibras é o maior contribuinte para geração de poluentes no setor têxtil (Ali *et al.*, 2009) e a produção mundial destes corantes é de aproximadamente 800.000 ton/ano, sendo que, como dito anteriormente, 10 a 15% dos corantes usados não se ligam às fibras e são descartados no meio ambiente (Akdogan *et al.*, 2014).

2.2. Problemática ambiental dos corantes têxteis

Os corantes têxteis são uma importante fonte de preocupação para os ambientalistas, em grande parte, por serem produzidos para resistir à exposição, transpiração, luz, água, produtos químicos e ataques microbianos. Esta elevada estabilidade dificulta sua degradação pelos sistemas de tratamento convencionais empregados pelas indústrias têxteis, mantendo-se de forma recalcitrante também no meio ambiente (Dallago *et al.*, 2005). Dessa forma, a complexidade dos corantes está relacionada à sua lenta cinética de degradação, podendo permanecer por cerca de 50 anos na biota terrestre e aquática, pondo em risco a estabilidade dos ecossistemas (Durán *et al.*, 2000).

Além da recalcitrância, a intensa utilização dos corantes pelas indústrias têxteis gera um grande volume de efluentes contaminados, visto que mesmo presente em concentrações tão baixas quanto 1 mg/L, muitos são visíveis e comprometem a qualidade da água (Pandey *et al.*, 2007). Dependendo da classe do corante, a sua perda nessas águas pode variar de 2% para os corantes básicos até 50% para os corantes reativos (O'Neill *et al.*, 1999).

A cor é a primeira indicação de contaminação visível (Kilic *et al.*, 2007) e, segundo Rodrigues *et al.* (2003), apesar de causar vários danos – redução da penetração de luz nos corpos d'água receptores, comprometendo o ciclo fotossintético com conseqüente diminuição da disponibilidade de alimento e da demanda de oxigênio dissolvido, agravada pela formação de uma fina camada de corantes na superfície – é o menor dos problemas, quando considerada

a composição e a toxicidade dos compostos, além da persistência de grupos cromóforos de alta massa molecular relacionados à mutagenicidade e genotoxicidade, levando à eutrofização, toxicidade aguda e crônica com o bioacúmulo de substâncias tóxicas em organismos aquáticos, passadas pela cadeia trófica, podendo, também, afetar o metabolismo humano, resultando em problemas renais, respiratórios, dermatites e hipertensão, entre outros. Estudos realizados com trabalhadores da indústria têxtil indicaram que estes profissionais possuem maior propensão ao câncer pancreático, câncer de bexiga e câncer do sistema digestório, por estarem diariamente expostos aos corantes (Martínez, 2013).

Os corantes reativos – os mais utilizados – são altamente solúveis em água e ácidos, quimicamente estáveis e tanto os tratamentos convencionais quanto os sistemas de tratamentos aeróbicos, dependentes de atividade biológica, são ineficientes para remoção/degradação destes corantes (Forgiarini, 2006), cujos principais representantes contêm os grupos azo e antraquinona.

Nas últimas décadas, os corantes azos têm sido amplamente eliminados na Europa (Ali, 2010). No Brasil, apesar da toxicidade e recalcitrância, os corantes com grupo azo sintetizados a partir de agentes carcinogênicos, como a benzadina, ainda são produzidos, devido ao seu baixo custo, constância da estrutura, facilidade de produção e grande variedade de cores (Niebisch *et al.*, 2010). Porém, a crescente publicação de pesquisas relacionadas à remediação da poluição causada pelos corantes sintéticos é uma indicação da preocupação global sobre esta questão, demonstrando, também, a participação ativa da comunidade científica nessa investigação.

2.3. Tratamento dos corantes têxteis

A legislação governamental está cada vez mais rigorosa no que diz respeito à remoção de corantes que, embora prioritária, raramente ocorre sua completa exaustão, resultando na descarga do excedente em águas residuais (Souza & Rosado, 2009). Deste modo, métodos para remoção da cor das águas de rejeito têm recebido enorme atenção, bem como o desenvolvimento de tecnologias eficientes que eliminem ou reduzam as alterações ecológicas e toxicidade para níveis aceitáveis, com custo acessível (Couto, 2009).

Existem diferentes métodos para a remediação dessas águas residuais, que incluem tratamentos físicos, químicos e biológicos. Os métodos físicos baseiam-se na transferência de fase do contaminante, sem que ele seja realmente destruído – adsorção, precipitação, coagulação, floculação, sedimentação, filtração, ultrafiltração, osmose reversa e destilação (Ravindran & Balasubramani, 2014). Os tratamentos químicos envolvem diversos mecanismos de oxidação avançada, destacando-se os processos: fenton, ozonização, radiação UV, H₂O₂ e fotocatalise heterogênea (Salgado *et al.*, 2009). Os métodos físicos e químicos são eficientes na remoção de cor, entretanto apresentam desvantagens, em grande parte, devido ao alto custo, versatilidade limitada, interferência por outros constituintes das águas residuais e necessidade de remoção das substâncias empregadas e de tratamento dos resíduos gerados (Kaushik & Malik, 2009).

Já os métodos biológicos são geralmente considerados ambientalmente “amigáveis”, pois podem levar à mineralização dos poluentes orgânicos com processos de relativo baixo custo, além da versatilidade para degradar diferentes compostos (Pandey *et al.*, 2007). Assim, a biodegradação é uma abordagem promissora para o tratamento desses efluentes por sua relação custo-eficácia (Jirasripongpun *et al.*, 2007; Shedbalkar *et al.*, 2008; Gopinath *et al.*, 2009), sendo, inclusive, considerado o mais eficaz método de tratamento de águas residuais contaminadas com corantes têxteis (Nozaki *et al.*, 2008).

É importante salientar que a adequação de qualquer um dos métodos de tratamento escolhido será muito mais efetivo, fácil e barato se realizado na estação de tratamento da indústria, isto é, antes de atingir os mananciais, pois o aumento da diluição destes compostos na presença de outras descargas de origem industrial e doméstica exigiriam procedimentos muito mais drásticos, sensíveis e caros para identificação e remoção específica destes corantes (Guaratini & Zanoni, 2000).

2.3.1. Biodegradação dos corantes têxteis

A remoção de corantes dos efluentes têxteis por organismos pode ocorrer por biossorção e biodegradação. Na biossorção – adsorção e/ou absorção na biomassa de organismos – a estrutura original dos corantes permanece intacta, isto é, não degradada em fragmentos, não erradicando, assim, o problema, pois o poluente não é destruído, sendo a eliminação dessa biomassa o grande obstáculo (Chander & Arora, 2007). Quando a estrutura molecular do corante é modificada pelo metabolismo celular levando à fragmentação da molécula (Kaushik & Malik, 2009; Peixoto *et al.*, 2013), têm-se a biodegradação.

A biodegradação é, então, um processo no qual compostos são quebrados através da atividade metabólica de organismos, especialmente microrganismos como bactérias, algas e fungos, podendo levá-los à completa mineralização – liberação de CO₂, H₂O e alguns sais inorgânicos – sob determinadas condições ambientais (Pandey *et al.*, 2007).

Tais microrganismos têm mostrado diferentes capacidades para degradar diferentes corantes, com alguns apresentando vantagens específicas sobre outros. A eficácia da biodegradação microbiana depende da adaptabilidade, número e atividade dos microrganismos (Chen *et al.*, 2003), além de fatores ambientais, incluindo pH, temperatura,

oxigenação, nutrientes como o nitrogênio e o fósforo, acessibilidade aos nutrientes e carbono disponibilizado pelo próprio contaminante (Singh & Ward, 2004).

Os corantes são, em sua maioria, xenobióticos e, desta forma, os sistemas naturais de microrganismos do ambiente receptor – normalmente rios e lagos – não contêm enzimas específicas para a degradação destes tipos de compostos sob condições aeróbias e, sob condições anaeróbias, a degradação do corante se processa muito lentamente (Guaratini & Zanoni, 2000). Assim, a seleção de estirpe adequada e versátil promoverá o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas com degradação eficiente de corantes (Novotný *et al.*, 2004), sendo os fungos os organismos mais apropriados para o tratamento de efluentes têxteis, devido às suas características fisiológicas (Peixoto *et al.*, 2013).

Diversos fungos são conhecidos por apresentarem propriedades de degradação de poluentes persistentes, sendo os fungos lignolíticos intensivamente estudados devido à estrutura irregular da lignina, que faz com que esses fungos produzam enzimas extracelulares com muito baixa especificidade de substrato, tornando-os adequados para a degradação de diferentes compostos (Haritash & Kaushik, 2009).

2.4. Fungos lignolíticos

Os fungos estão amplamente distribuídos na natureza – no solo, na água (doce e salgada), no ar, no gelo dos polos e em qualquer matéria orgânica em decomposição (Putzke & Putzke, 1998) –, representando a biomassa microbiana dominante em muitos ecossistemas florestais (devido às condições ali presentes), dos quais aproximadamente 60% são macrofungos lignocelulolíticos (Sardrood *et al.*, 2013). No meio ambiente, degradam biomassa lignocelulósica, como a madeira, constituída de um arranjo ordenado de células com parede composta basicamente por celulose, hemicelulose e lignina (Kubicek, 2013), além de

desempenharem papel fundamental no ciclo do carbono, nitrogênio, fósforo e potássio (Sardrood *et al.*, 2013), determinando as taxas de nutrientes liberados e seu retorno ao ecossistema após a morte das árvores.

Dentre os componentes da parede celular dos vegetais, a lignina, macromolécula aleatória de fenilpropanoide, é considerada um dos principais compostos recalcitrantes sintetizados pelas plantas, devido a sua estrutura complexa e heterogênea (Wong, 2009), estando relacionada à produção de enzimas com muito baixa especificidade de substrato por organismos degradadores, tornando-os capazes de metabolizá-la e, conseqüentemente, adequados para a degradação de diversos compostos complexos com estruturas semelhantes à lignina (Haritash & Kaushik, 2009).

Até 30% do material vegetal é composto de lignina, conferindo às plantas integridade estrutural e proteção contra pragas e patógenos. Na natureza, apenas os fungos são capazes de metabolizá-la de forma eficiente (Wong, 2009) – podendo mineralizá-la até CO₂ e H₂O – através de um sistema enzimático lignolítico inespecífico, de alto poder oxidante e extracelular, cuja secreção ocorre durante o crescimento das hifas, sendo liberadas pela parede celular recém-sintetizada.

Dentre os fungos produtores de enzimas lignolíticas, destaca-se o filo Basidiomycota, segundo maior do Reino Fungi, que apresenta três subfilos (Agaricomycotina, Pucciniomycotina e Ustilagionomycotina), 16 classes, 52 ordens, 177 famílias, 1.589 gêneros e 31.515 espécies (Kirk *et al.*, 2008).

2.4.1. Filo Basidiomycota

Uma forma de identificação para este filo é a presença de basídios com basidiósporos (uma estrutura reprodutiva onde ocorre a meiose). Sua fase vegetativa é chamada de micélio,

formado por vários filamentos denominados hifas (Pelczar *et al.*, 1997), que contêm fíbulas (grampos de conexão) e poro com septo dolíporo, no entanto, muitas espécies podem apresentar septos simples e sem fíbulas (Kirk *et al.*, 2008).

No subfilo Agaricomycotina, encontram-se os exemplares conhecidos popularmente por formarem basidiomas (anteriormente chamados de “basidiocarpos” ou “corpos de frutificação”) (Rosa, 2013), como cogumelos e orelhas-de-pau. Nestes basidiomas, estão presentes os basídios e basidiósporos de seus representantes.

Alguns fatores, como o pH do solo (pH ótimo 6), a umidade (ideal geralmente superior a 70%) e a temperatura (entre 10 e 25°C), são limitantes para o desenvolvimento dos basidiomas; porém, algumas espécies podem se desenvolver em solos mais básicos ou mais ácidos (Andrés *et al.*, 1990; Putzke & Putzke, 1998) e em temperaturas extremas de 0 a 90°C (Silveira, 1995).

Os fungos basidiomicetos são classificados de acordo com as diferenças macroscópicas dos padrões de degradação da madeira. Desta forma, podem ser divididos em fungos de degradação ou podridão branca e parda. Os fungos da podridão branca degradam três componentes principais da madeira, a saber, a celulose, a hemicelulose e a lignina, proporcionando coloração clara na sua degradação. Já os fungos da podridão parda, de modo geral, não degradam a lignina, em vez disso, modificam a sua estrutura, possibilitando o acesso e digestão dos componentes celulolíticos, observando-se uma coloração escura nos locais degradados (Kubicek, 2013).

Os basidiomicetos da podridão branca formam, então, um grupo importante na secreção de enzimas lignolíticas que convertem polímeros externos em moléculas menores, que são assimiladas e utilizadas como nutrientes, tendo um papel chave – de aplicação biotecnológica – na degradação de diversas substâncias de estruturas complexas e recalcitrantes como corantes, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos, entre outros (Kaushik &

Malik, 2009; Peixoto *et al.*, 2013; Ravindran & Balasubramani, 2014). Os estudos para essas aplicações iniciaram a partir da década de 1980 (Rodríguez *et al.*, 2003).

Dentre tais basidiomicetos secretores de enzimas lignolíticas, as espécies mais estudadas para esta finalidade pertencem aos gêneros *Pleurotus* (ordem Agaricales – família Pleurotaceae) e *Trametes* (ordem Polyporales – família Polyporaceae) (Majeau *et al.*, 2010), ambos representantes do subfilo Agaricomycotina – classe Agaricomycetes.

2.4.1.1. Gênero *Pleurotus*

O gênero *Pleurotus* é representado por cogumelos comestíveis, não apresentando risco de patogenicidade. Cosmopolita, ocorre naturalmente em florestas temperadas, subtropicais e tropicais (Alves *et al.*, 2017), sendo conhecido pela habilidade saprofítica, alta eficiência biológica e por degradar uma variedade de substratos lignocelulósicos (Silva *et al.*, 2007), podendo servir para seu cultivo, vários resíduos agroindustriais, como: palha de arroz, palha de milho, bagaço de cana-de-açúcar e suas misturas (Ragunathana & Swaminathan, 2003). Apresentam basidiomas com hastes concêntricas em forma de concha de ostra e lâminas unidas, onde encontram-se dispostos os basídios com os basidiósporos resultantes da meiose (Alexopoulos & Mims, 1985).

Atualmente, são relatadas 70 espécies deste gênero (Maftoun *et al.*, 2015), sendo que suas conexões evolutivas ainda não estão claras e muitas questões taxonômicas permanecem controversas, sendo um dos mais diversos grupos de cogumelos cultivados (Cohen *et al.*, 2002).

Pleurotus pulmonarius (Fr. 1872) (Figura 2 A) cresce em aglomerados semelhantes a prateleiras sobre praticamente qualquer madeira morta ou viva, aparecem em climas mais quentes – começando no verão, mas continuando no inverno –, sendo amplamente distribuídos na América do Norte. Os basidiomas são grossos, esbranquiçado a bege ou tons pálidos – geralmente sem coloração marrom escuro – e parece desenvolver mais de um

“caule” com 1-7 cm de comprimento e até 1,5 cm de espessura – lateral ou central – porém, às vezes, ausente ou rudimentar. Píleos com 2-12 cm, convexos, tornando-se plano ou um pouco deprimido, em forma de pulmão (daí seu nome latino) a semicircular, ou quase circular – se crescendo sobre os topos de troncos –, com margem enrolada quando jovem, tornando-se, depois, ondulada. Um pouco gorduroso quando jovem e fresco, odor distintivo "semelhante ao dos cogumelos ostra" e gosto leve. Esporos com coloração esverdeada, cinzenta ou lilás, cilíndricos a elípticos longos, medindo 7-10 x 2,5-5 μm (Kuo, 2009). Apresentam método de cultivo simples e tempo de crescimento curto (Patrabansh & Madan, 1997).

Tais basidiomas são comestíveis, de alto valor nutricional, ricos em compostos biologicamente ativos, tais como polissacarídeos e proteoglicanos (Wasser, 2002), possuem propriedades medicinais, incluindo antivirais (Teplyakova & Kosogova, 2016), antibacterianos (Heleno *et al.*, 2015), antifúngicos (Alves *et al.*, 2013), antiparasitários (Ademola & Odeniran, 2017) e anti-inflamatórios (Taofiq *et al.*, 2016), sendo identificado, ainda, efeito estimulador da imunidade, redutor do colesterol no sangue e atividades antitumorais (Shah *et al.*, 2007; Agrawal *et al.*, 2010), além de diversas aplicações ambientais e biotecnológicas (Han *et al.*, 2016).

Pleurotus albidus (Berk. 1983) (Figura 2 B) apresenta-se glabro, de cor branca a creme, píleos circulares e infundibuliformes, lamela profundamente decurrente, bases lamelares estriadas para cima, geralmente curvado-ascendente. É uma espécie comumente encontrada na América do Sul, porém, com poucas informações sobre o seu cultivo ou propriedades (Lechner *et al.*, 2004; Lechner & Albertó, 2011).

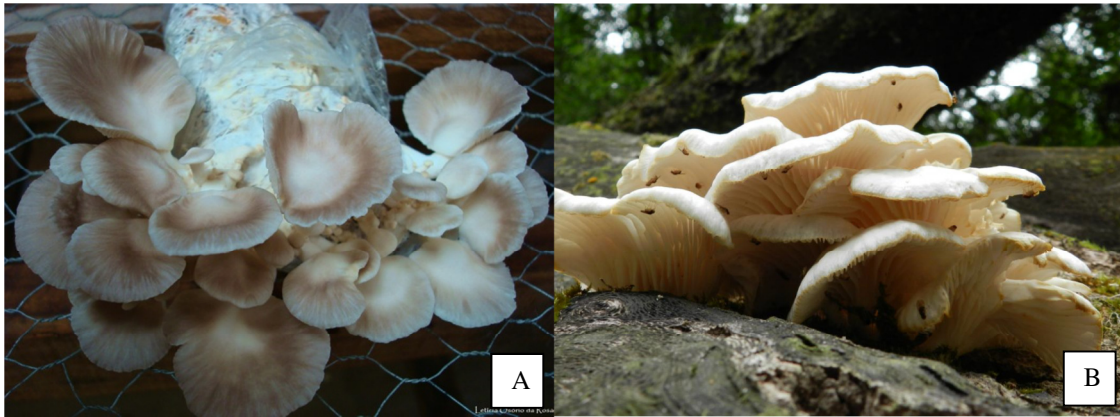


Figura 2. *Pleurotus pulmonarius* (A) e *Pleurotus albidus* (B).

(Fotos: Letícia Osório da Rosa)

2.4.1.2. Gênero *Trametes*

O gênero *Trametes* tem aproximadamente 335 espécies e é provavelmente o mais ativamente investigado no filo Basidiomycota, estando entre os mais versáteis fungos da podridão branca, característica demonstrada por pesquisas intensivas e contínuas em aplicações na indústria de papel, alimentar, química sintética, biocombustíveis, cosméticos, biossensores e têxtil, além do tratamento de efluentes e, principalmente, relacionados à biorremediação de solos (Nyanhongo *et al.*, 2007). Além dessa versatilidade em aplicações biotecnológicas, estes fungos podem crescer em meios de baixo custo, como milho, palha, cascas de amendoim e serragem (Couto *et al.*, 2004; Couto & Sanromán, 2005).

Trametes sp. mostra grande potencial na produção de lacases – tanto que o produto comercial da Novozymes NS51002® é obtido da espécie *Trametes villosa* – produzindo múltiplas isoformas de lacases ou manganês peroxidases, expressas em diferentes condições de cultura (Scherer & Fischer, 1998; Nyanhongo *et al.*, 2002).

Os basidiomas do gênero se caracterizam por serem anuais e de consistência flexível, consistindo de píleos semicirculares, com cerca de 4 cm de comprimento e 6 cm de largura. Enquanto frescos, apresentam coloração cinza e, à medida que amadurecem, adquirem cor amarelada (Reck, 2009). Sésseis, algumas vezes com a base discoide, apresentam crescimento

rápido em meio de cultura (5,5 cm em uma semana), constituídos por hifas trimíticas. Os esporos são brancos, elipsoides para subcilíndricos, medindo 5,5-6,6 x 2,5-3 μm (Ryvarden & Johansen, 1980).

A espécie *Trametes hirsuta* (Wulfen, 1939), anteriormente chamada de *Coriolus hirsutus*, apresenta píleos semicirculares semelhantes à cauda de peru, medindo até 10 cm de diâmetro e 6 cm de profundidade, além de 0,5-1 cm de espessura, únicos ou em grupos sobrepostos, podendo apresentar-se fundidos lateralmente; densamente cobertos de pelos prateados, concentricamente zonados, com tonalidades acinzentada, esbranquiçada e acastanhada que, geralmente, não contrastam acentuadamente, apresentando frequentemente finos sulcos e margem castanha a marrom ou preta, características estas que podem ser visualizadas na Figura 3; superfície dos poros esbranquiçada, tornando-se um pouco acastanhada, acinzentada ou amarelada com a idade, com cerca de 3-4 poros por mm, circulares a ligeiramente angulares, cujos tubos apresentam paredes bastante grossas com 6 mm de profundidade. Carne dura, coriácea e branca. Sabor e odor não distintivo. Estrutura trimítica das hifas. Esporos esbranquiçados e subcilíndricos (6-9 x 2-2,5 μm) (Kuo, 2010).

T. hirsuta é encontrado amplamente distribuído na Europa e em toda a América do Norte em madeira morta de árvores de folha caduca, anuais – aparecendo especialmente no verão e outono –, sendo relativamente raro e não comestível (Kuo, 2010).



Figura 3. *Trametes hirsuta*.

(Foto: Letícia Osório da Rosa)

2.5. Sistema enzimático lignolítico

As enzimas, presentes em todas as células vivas, são proteínas de estrutura complexa na qual podem estar integradas outras moléculas, como carboidratos e lipídios (Hartmeier, 1988). Apresentam atividade catalítica associada à conformação nativa, que depende de condições específicas de pH, temperatura e força iônica do meio, além de, algumas, requererem a participação de coenzimas (Sant'Anna Jr., 2001; Bon *et al.*, 2008).

O uso de enzimas em processos industriais, de maneira criteriosa, surgiu em meados do século XX, sendo as de origem microbiana mais recente, atuando em um dos maiores setores da biotecnologia industrial. O seu uso é – e cada vez mais se intensifica – de grande valia na preservação do meio ambiente, como, por exemplo, na degradação de compostos organoclorados, corantes sintéticos e carboidratos aromáticos (Said & Pietro, 2002; Ravindran & Balasubramani, 2014) pelo sistema enzimático lignolítico de fungos ou bactérias; ressaltando que as enzimas, por serem moléculas orgânicas, são biodegradáveis e, portanto, reincorporáveis à cadeia alimentar (Said & Pietro, 2002).

Uma das grandes vantagens do uso das enzimas é o fato de requererem condições brandas de reação, executando uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido (Orlandelli *et al.*, 2012).

As enzimas microbianas podem ser intracelulares, periplasmáticas ou extracelulares, sendo, as últimas, normalmente mais estáveis e produzidas em maiores quantidades (Bon *et al.*, 2008). As principais enzimas extracelulares envolvidas na degradação da lignina podem ser agrupadas em pelo menos duas classes distintas: as fenol-oxidases e as enzimas que produzem peróxido de hidrogênio, ditas auxiliares, por favorecerem a atuação das peroxidases (Kirk & Cullen, 1998; Tisma *et al.*, 2010).

2.5.1. Enzimas fenol-oxidases

As fenol-oxidases compreendem um grupo de enzimas característico por pertencerem às metaloproteínas. Entre as fenol-oxidases, pode-se descrever dois subgrupos. Um contém as enzimas dependentes de peróxido ou peroxidases – lignina peroxidase e manganês peroxidase – ambas comumente produzidas por basidiomicetos de decomposição branca, em conjunto ou separadas. O outro subgrupo contém as cuproproteínas que não dependem de peróxido para atuarem – lacases (Ferraz, 2004).

Dessa forma, o sistema lignolítico consiste de três principais enzimas, manganês peroxidases (MnP, E.C. 1.11.1.13), lignina peroxidases (LiP, E.C. 1.11.1.14) e lacases (Lac, E.C. 1.10.3.2), secretadas no meio extracelular de crescimento dos fungos.

Lac e MnP apresentam baixo potencial redox, suficiente, apenas, para abstrair elétrons de estruturas fenólicas (Bao, 1994), enquanto as LiP apresentam potencial redox maior, podendo oxidar diretamente estruturas aromáticas fenólicas e não fenólicas (Kirk & Ferrel, 1987).

Devido à estrutura irregular da lignina, as enzimas fenol-oxidases não se apresentam específicas com relação ao substrato, permitindo, como visto anteriormente, aos microrganismos produtores, a capacidade de oxidar diferentes compostos, cujas estruturas sejam semelhantes aos derivados da lignina (Silva & Gomes, 2004; Haritash & Kaushik, 2009).

2.5.1.1. Manganês peroxidases

A enzima manganês peroxidase (Mn (II): hidrogênio-peróxido oxidorreductase), que também pode ser chamada de peroxidase-M2 ou Mn-dependente (NADH-oxidante) peroxidase (IUBMB, 1992), é uma proteína heme glicosilada extracelular produzida por

quase todos os fungos da podridão branca (Hatakka, 2001), sendo uma das principais oxidorreduções envolvidas na degradação de lignina (Kirk & Farrell, 1987; Hatakka, 1994).

O ciclo catalítico desta enzima é iniciado pela sua ligação ao peróxido de hidrogênio formando o complexo ferro- H_2O_2 . A enzima recebe o oxigênio do H_2O_2 ficando deficiente de dois elétrons no grupamento heme, o que resulta na formação do composto I de MnP e uma molécula de água. A redução do composto I até a enzima nativa ocorre por meio de duas etapas, com a abstração de um elétron de cada vez. Então, um substrato fenólico ou um íon Mn^{2+} – parecendo o íon Mn^{2+} o elo preferencial de transferência – age como doador de um elétron para o composto I, formando o composto II. A redução do composto II ocorre pela oxidação obrigatória do íon Mn^{2+} , formando Mn^{3+} e regenerando a enzima férrica nativa (Hofrichter, 2002; Aguiar & Ferraz, 2011), como esquematizado na Figura 4.

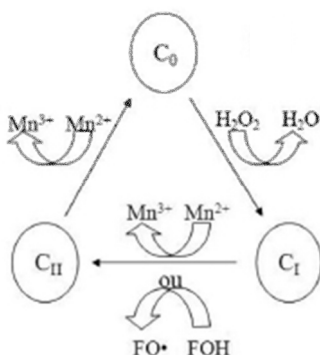


Figura 4. Ciclo catalítico simplificado da MnP.

O H_2O_2 oxida a enzima nativa férrica (C_0) formando o composto I (C_I), que pode ser reduzido por um substrato fenólico (FOH) ou íon Mn^{2+} ao composto II (C_{II}), que é na sequência reduzido, regenerando, assim, a enzima férrica nativa (C_0), com a formação do íon Mn^{3+} .

(Fonte: Aguiar & Ferraz, 2011)

Então, a MnP catalisa a oxidação dependente de H_2O_2 de Mn^{2+} para Mn^{3+} , o qual, por sua vez, é bastante reativo, sendo normalmente estabilizado por quelantes produzidos pelo próprio fungo, como o ácido oxálico. O complexo Mn^{3+} -oxalato pode ser reduzido à custa da

oxidação de outra estrutura fenólica; dessa forma, ao se difundir pela parede celular lignificada, atua como um oxidante inespecífico que ataca as estruturas fenólicas de ligninas por abstração de um elétron. A MnP tem-se mostrado capaz de despolimerizar e mesmo mineralizar ligninas *in vitro* (Hofrichter *et al.*, 1999; Hammel & Cullen, 2008), apresentando-se inativa na presença de álcool veratrílico ou substratos não fenólicos (IUBMB, 1992).

2.5.1.2. Lignina peroxidases

A enzima lignina peroxidase (1-(3,4-dimetoxifenil)-2-(2-metoxifenoxi)propano-1,3-diol: hidrogênio - peróxido oxidorreductase) pode ser chamada também de diarilpropano oxigenase, ligninase I, diarilpropano peroxidase, diarilpropano: oxigênio, peróxido de hidrogênio oxidorreductase (C-C-clivados) e ((3,4-dimetoxifenil)metanol: hidrogênio - peróxido oxidorreductase) (IUBMB, 2016). É uma heme peroxidase de basidiomicetos da podridão branca, capaz de catalisar a clivagem da lignina (Miki *et al.*, 1986), estando envolvida em sua despolimerização oxidativa inicial.

O ciclo catalítico da LiP envolve as reações esquematizadas na Figura 5, em que o ferro do grupo heme da enzima sofre uma oxidação inicial pelo peróxido de hidrogênio formando o composto I (cátion radical $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) no sítio ativo. Uma única redução de um elétron no composto I por um elétron derivado da molécula de substrato fenólico ou não fenólico produz o composto II (cátion não radical $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$), seguido de uma segunda transferência de um elétron do substrato que devolve a enzima ao estado de oxidação férrica. Os eventos de transferência de elétrons convertem a molécula de substrato num intermediário de radicais catiônicos transitórios que fragmenta espontaneamente (IUBMB, 2016).

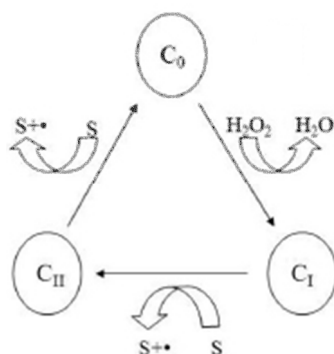


Figura 5. Ciclo catalítico simplificado da LiP.

O ferro do grupo heme da enzima nativa (C_0) é oxidado pelo H_2O_2 formando o composto I (C_1), que é reduzido ao composto II (C_{II}) por um elétron derivado da molécula de substrato aromático (S), seguido de uma segunda transferência de um elétron do substrato aromático (S) que devolve a enzima ao estado de oxidação férrica (C_0).

(Fonte: Aguiar & Ferraz, 2011)

A LiP pode atuar sobre uma vasta gama de compostos aromáticos, mas não diretamente sobre a molécula de lignina, que é demasiadamente grande para se encaixar no sítio ativo. No entanto, as moléculas de lignina podem ser degradadas na presença de álcool veratrílico – sendo sugerido que o radical livre que se forma quando a enzima atua sobre o álcool veratrílico pode difundir para a parede celular lignificada, onde oxida a lignina e outros substratos orgânicos – (IUBMB, 2016). Dessa forma, a LiP tem alto potencial oxidativo e a capacidade de oxidar vários substratos (Hammel & Cullen, 2008; Ruiz-Duenas & Martinez, 2009). Porém, na presença de uma elevada concentração de H_2O_2 , a enzima apresenta-se cataliticamente inativa (composto III), podendo ser resgatada pela interação com duas moléculas dos produtos de radicais livres (IUBMB, 2016).

Alguns estudos mostraram que a maioria dos fungos da podridão branca, incluindo alguns do gênero *Trametes*, produzem quantidades muito baixas ou não produzem LiP, apesar de serem eficientes degradadores de lignina (Eriksson *et al.*, 1990; Hatakka, 1994; Messner & Srebotnik, 1994).

2.5.1.3. Lacases

A lacase (benzenodiol: oxigênio oxidoreductase), conhecida também por urushiol oxidases, urushiol oxidases e *p*-difenol oxidases (IUBMB, 1978), é uma glicoproteína monomérica, dimérica ou tetramérica, normalmente com quatro átomos de cobre distribuídos em três sítios distintos: T1, T2 e T3, que formam o núcleo catalítico da enzima. O sítio T1, cujo cobre está próximo à superfície da enzima, apresenta potencial redox diretamente responsável pela capacidade catalítica da enzima, oxidando o substrato redutor e transferindo os elétrons para T2 e T3 – que formam um grupo trinuclear de Cu – onde o O₂ é reduzido a H₂O durante a oxidação sequencial de quatro moléculas de substrato (Solomon *et al.*, 1996; Tinoco *et al.*, 2001; Piontek *et al.*, 2002; Claus, 2004; Nyanhongo *et al.*, 2007; Quintanar *et al.*, 2007; Majeau *et al.*, 2010). Esta oxidação sequencial é indicada pela não detecção de H₂O₂ durante a catálise em estado estacionário (Gianfreda *et al.*, 1999). Entre as lacases fúngicas, a interação entre o sítio T1 e seu substrato parecem idênticas, com grandes diferenças entre os demais sítios ativos (Majeau *et al.*, 2010). As reações descritas encontram-se esquematizadas na Figura 6.

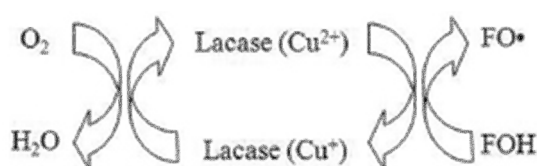


Figura 6. Ciclo catalítico da Lac.

A enzima oxida sequencialmente quatro moléculas de substrato fenólico (FOH) e transfere os elétrons para o O₂ que é reduzido a H₂O, com concomitante produção de quatro radicais livres.

(Fonte: Aguiar & Ferraz, 2011)

Através de mediadores, tais como ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)), HBT (1-hidroxibenzotriazol), (HAA) ácido hidroxiantranílico, o corante *Remazol Brilliant Blue* e TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-piperidina-N-oxil radical) – que são facilmente

oxidados por lacases – a especificidade da enzima pode ser alargada para diversos substratos, com subunidades não fenólicas (Xu, 1996; Bourbonnais *et al.*, 1997; Fabbrini *et al.*, 2002; Pozdnyakova *et al.*, 2004).

Sendo assim, a Lac é uma oxidase multicobre de baixa especificidade (Dwivedi *et al.*, 2011), que catalisa a oxidação de uma variedade de substâncias, cuja faixa varia de uma lacase para outra (Thurston, 1994). As lacases fúngicas apresentam potencial redox elevado e, assim, podem oxidar eficientemente uma ampla gama de compostos aromáticos, como monofenóis, difenóis, polifenóis, fenóis metoxi-substituídos, aminas aromáticas e diaminas, benzenotiolos e, até mesmo, alguns compostos inorgânicos, como o iodo (Xu, 1996). Podem também, catalisar a descarboxilação e reações de desmetilação (Reid & Paice, 1994).

Devido à especificidade de substrato relativamente ampla, as lacases representam grande promessa para muitas aplicações potenciais que vão desde o desenvolvimento de cátodos de oxigênio nas células de biocombustíveis (Barton *et al.*, 2004; Kavanagh *et al.*, 2009), de biossensores (Trudeau *et al.*, 1997; Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2005) e de biorremediação (Mayer & Staples, 2002; Munari *et al.*, 2008), até catalisadores para síntese orgânica, incluindo polímeros condutores (Karamyshev *et al.*, 2003), além da utilização dentro dos campos das indústrias de alimento, celulose e papel, têxtil, química sintética e cosmética (Couto & Herrera, 2006).

No Quadro 2, estão resumidos alguns exemplos das reações catalisadas pelas enzimas fenol-oxidases.

Quadro 2. Exemplos de reações catalisadas pelas enzimas fenol-oxidases produzidas por fungos basidiomicetos.

ENZIMAS	REAÇÕES CATALISADAS	REFERÊNCIAS
Manganês peroxidases	Oxidação de Mn ²⁺	Aguiar & Ferraz (2011)
	Oxidação de fenóis	Aguiar & Ferraz (2011)
	Clivagens de ligações C-C	Obst (1982)
	Clivagens de ligações C-O	Obst (1982)
Lignina peroxidases	Oxidação de fenóis e não-fenóis	Min <i>et al.</i> (2001)
	Oxidação de álcoois veratrílicos	IUBMB (2016)
	Abertura do anel aromático	Obst (1982)
	Clivagens de ligações C-C	Wong (2009)
	Clivagens de ligações C-O	Wong (2009)
Lacases	Oxidação de fenóis	Rasera <i>et al.</i> (2009)
	Polimerização de fenóis	Durán & Esposito (2000)
	Oxidação de não-fenóis através de mediadores	Pozdnyakova <i>et al.</i> (2004)
	Oxidação de alguns compostos inorgânicos	Xu (1996)
	Desmetilação	Reid & Paice (1994)
	Clivagens de ligações C-C	Obst (1982)
	Clivagens de ligações C-O	Obst (1982)

(Fonte: Elaborado pela autora)

As características do sistema enzimático dependem da espécie, linhagem, tempo e condição de cultura (Schmidt, 2006; Kunamneni *et al.*, 2007; Elisashvili & Kachlishvili, 2009; Brijwani *et al.*, 2010). No que concerne ao seu mecanismo lignolítico, os basidiomicetos podem produzir: (1) MnP, LiP e Lac; (2) MnP e Lac; (3) LiP e Lac; (4) apenas manganês peroxidase (Hatakka, 1994).

Essas enzimas são utilizadas, principalmente e de maneira geral, na indústria de biopolpação da madeira, aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para ração animal, degradação de xenobióticos e biorremediação (Reddy & Chinthamreddy, 1999).

Neste sentido, destaca-se a importância do entendimento das principais características bioquímicas desses sistemas enzimáticos presentes nos fungos basidiomicetos, utilizados na biodegradação de corantes contidos em efluentes têxteis.

2.6. Produção das fenol-oxidases

A formulação de um meio efetivo, que permita a manutenção e o crescimento do microrganismo, além do baixo custo, é importante para a produção enzimática, sendo necessária a presença de elementos básicos e indispensáveis para seu metabolismo, como carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, magnésio, cálcio, ferro, cobre, cobalto, zinco, manganês e molibdênio (Smits *et al.*, 1996).

Dessa forma, o processo de cultivo dos fungos basidiomicetos para produção das fenol-oxidases pode se dar em estado sólido ou submerso. O desenvolvimento de fungos filamentosos sobre superfícies sólidas assemelha-se ao seu crescimento no habitat natural, servindo para sua fixação, além de fonte de carbono, e a ausência de água livre pode oferecer algumas vantagens econômicas e de engenharia, incluindo volume reduzido do meio, baixa geração de resíduos, além de menores custos de manipulação e a recuperação facilitada do produto por estar em concentração mais elevada (Cannel & Moo-Young, 1980; González *et al.*, 2003; Osma *et al.*, 2007; Camassola & Dillon, 2010); embora apresente dificuldades, como na transferência do oxigênio e de calor, além da necessidade de maior quantidade de inóculo (Cannel & Moo-Young, 1980), devido ao fato da dispersão ser menor.

O cultivo em estado sólido é, então, qualquer processo de cultivo realizado em material insolúvel, que atua tanto como suporte físico, como fonte de nutrientes para o microrganismo, não contendo água livre (Chahal, 1985; Pandey, 1992), e onde o crescimento do microrganismo e a formação de produtos ocorrem na superfície e/ou dentro do sólido (Considine *et al.*, 1987).

Muitos resíduos agroindustriais, na sua forma natural, podem ser utilizados na formulação do meio desse tipo de cultivo, aliando a produção enzimática à diminuição do impacto ambiental causado pela acumulação destes resíduos (Camassola & Dillon, 2010), sendo muitos já testados, como bagaço de laranja, cascas de banana e de amendoim, espigas

de milho e polpa de café (Hernández *et al.*, 2003; Couto & Sanromán, 2006; Osma *et al.*, 2007; Rosales *et al.*, 2007), entre outros.

Já o cultivo submerso, apesar de ser bastante diferente das condições de vida natural destes organismos, é frequentemente utilizado para a produção da maioria das enzimas microbianas comerciais, principalmente porque a esterilização e o maior controle de parâmetros como pH, temperatura e concentração de nutrientes são facilitados (Nigam & Singh, 1994; Said & Pietro, 2002; Moonmoon *et al.*, 2010; Alecrim *et al.*, 2015). A melhor transferência do oxigênio aumenta a atividade lignolítica através da produção de peróxido de hidrogênio – derivado do oxigênio – como oxidante extra-celular (Sanchez, 2009). O oxigênio também mantém condições aeróbicas em culturas submersas, impedindo a autólise (Michel *et al.*, 1992).

O cultivo submerso, dessa forma, envolve o crescimento de um microrganismo em suspensão no meio líquido, onde vários nutrientes estão dissolvidos ou suspensos como partículas sólidas. A agitação deve ser ajustada a fim de minimizar o cisalhamento, que diminui a expressão das enzimas e causa danos ao micélio, podendo levar ao rompimento celular, enquanto os aglomerados de micélio são indesejáveis, por diminuírem sua produtividade. No entanto, o processo submerso não é ideal para todas as espécies de fungos (Majeau *et al.*, 2010).

Em ambos os métodos de cultivo, os resíduos agroindustriais podem ser utilizados, aliando-se ao fato de os fungos lignolíticos poderem remediar poluentes tanto na água como no solo (Novotný *et al.*, 2004), sendo, a expansão das pesquisas na área da produção enzimática, importante contribuidora para a diminuição dos custos de produção (Orlandelli *et al.*, 2012).

2.7. Caracterização da degradação de corantes

O conhecimento da composição química dos corantes e suas características é importante para se determinar as possíveis rotas de degradação, bem como o destino ambiental de seus produtos, já que a remoção da cor de águas residuais contendo corantes pode ser a primeira e uma grande preocupação (Sun *et al.*, 2009), porém, o objetivo da biodegradação de corantes não é apenas remover a cor, mas também eliminar ou diminuir substancialmente sua toxicidade (desintoxicação) (Ali, 2010), como será discutido no tópico 2.8.

Para a avaliação da descoloração, além da percepção direta da variação da cor, métodos utilizando espectrofotometria são importantes para a quantificação dessa descoloração, enquanto a caracterização detalhada dos intermediários e metabólitos produzidos durante a biodegradação é interessante para garantir a segurança das águas residuais descoloridas (Couto, 2009; Kaushik & Malik, 2009). Técnicas instrumentais básicas e avançadas de cromatografia podem ser usadas para isolar e caracterizar os produtos da biodegradação de corantes, permitindo uma visão desse mecanismo (Ali, 2010).

Para saber se a descoloração ocorreu pela adsorção de partículas do corante à superfície celular microbiana ou através da quebra da estrutura do corante pelo seu metabolismo ou ambos, podem ser usadas técnicas relativamente simples de espectrofotometria UV-visível e cromatografia em camada fina (CCF). Na adsorção e na biodegradação, o espectro revelará perfis diferentes, ocorrendo, no primeiro caso, diminuição de todos os picos aproximadamente na mesma proporção, enquanto, na biodegradação, o pico de absorvância desaparecerá completamente ou um novo pico aparecerá (Chen *et al.*, 2003; Saratale *et al.*, 2009). Além disso, na adsorção, as células podem se tornar profundamente coloridas, o que não ocorre nos casos de biodegradação, cujas células mantêm suas cores originais (Sun *et al.*, 2009).

Técnicas mais avançadas, como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) podem ser usadas para obter informações mais detalhadas sobre os produtos e mecanismos da biodegradação (Ali, 2010).

2.8. Análises toxicológicas

Os contaminantes presentes no ambiente são chamados de biodisponíveis quando possuem a capacidade de entrar no organismo dos seres vivos. Isso ocorre, prioritariamente, através da cadeia alimentar, devendo o contaminante, inicialmente, ser absorvido por organismos produtores ou capazes de se associar com a matéria orgânica particulada que serve de alimento para os variados indivíduos que compõem a base dessa cadeia trófica. No processo de assimilação, esses contaminantes podem ficar retidos nas células ou tecidos dos organismos, armazenamento este chamado de bioacumulação, ficando, assim, disponíveis aos demais integrantes da cadeia trófica (Penteado & Vaz, 2001).

A biomagnificação resulta do processo de acúmulo progressivo do contaminante nos organismos vivos durante sua passagem pelos níveis tróficos da cadeia alimentar. Assim sendo, espécies predadoras apresentam um maior fator de biomagnificação em relação às presas, ou seja, a concentração do contaminante aumenta com o aumento do nível trófico, e o ser humano, por ocupar o topo da cadeia alimentar, está sujeito à grande acumulação destes contaminantes (Correa, 2008).

No ser humano, ainda, ao serem absorvidos, os contaminantes podem ser transportados para a circulação sanguínea, sendo transformados e/ou armazenados, podendo ser metabolizados pelo fígado e serem armazenados, ou então, excretados pela bile ou rins, ou ainda, ficarem armazenados nos tecidos extra-hepáticos (Penteado & Vaz, 2001).

O efeito no organismo de grande parte dos contaminantes depende de diversos fatores, tais como, característica do contaminante, dosagem, valor residual, tempo de exposição, forma de contato, presença ou não de outras substâncias químicas, espécie do organismo, dentre outros (Correa, 2008).

A toxicidade aguda ocorre quando os efeitos tóxicos são produzidos por uma única ou por múltiplas exposições, por qualquer via, por um curto período – normalmente inferior a um dia – com as manifestações geralmente ocorrendo rapidamente. Enquanto a toxicidade crônica resulta de uma exposição contínua, não causando toxicidade aguda, por apresentar-se em baixas concentrações, com as manifestações podendo ocorrer tardiamente. Porém, nesta última, pelos efeitos não serem debilitantes de imediato, acaba facilitando a disseminação do contaminante pelos níveis tróficos (Dux & Stalzer, 1988).

Os efluentes ricos em corantes liberados pelas indústrias têxteis, como já visto, são tóxicos e passíveis dessa bioacumulação e biomagnificação. Em humanos, por exemplo, disfunções no sistema reprodutivo, fígado, rim e sistema nervoso central são algumas das sequelas causadas pelo contato com esses efluentes; enquanto em ratos albinos, já foram detectadas alterações no fígado e testículos (Martínez, 2013).

Portanto, análises dos componentes químicos como, por exemplo, por cromatografia, discutida anteriormente, podem qualificar e quantificar essas substâncias antes e depois do tratamento de biorremediação; porém, para observar se houve desintoxicação e compreender seus efeitos sobre os sistemas biológicos é necessária a realização de testes de toxicidade, que contribuem com evidências diretas das consequências da contaminação, além de apresentar baixo custo, obtenção de respostas rápidas e fácil interpretação dos resultados (Costa *et al.*, 2008).

Nos ensaios de toxicidade são utilizados, frequentemente, bioindicadores, definidos como organismos vivos indicadores de contaminação. Atuando como tais, podem-se utilizar

membros da flora ou fauna, onde os mais comuns são os peixes, microcrustáceos, algas, fungos e bactérias (Buikema *et al.*, 1982).

A escolha do organismo-teste é um fator essencial para o desenvolvimento dos ensaios de toxicidade, sendo geralmente utilizadas espécies cosmopolitas, sensíveis a vários contaminantes, com representatividade ecológica, fácil amostragem, baixa variabilidade genética, mobilidade limitada e de fácil cultivo em laboratório, a custos relativamente baixos (Maffazzioli, 2011).

Uns dos organismos-teste universalmente utilizados são os microcrustáceos, no Brasil representados por *Daphnia similis*, *Daphnia magna*, *Daphnia levis* e *Ceriodaphnia dubia*. Outros organismos, como as bactérias *Vibrio fischeri*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas putida*, e a alga *Pseudokircheneriella subcaptata* também são amplamente investigadas (Kist, 2013).

2.8.1. *Daphnia magna*

Atualmente, *Daphnia magna* (Straus, 1820) é um dos organismos mais utilizados em testes toxicológicos em vários países, inclusive no Brasil, reagindo sensivelmente à ampla gama de agentes tóxicos (Alves & Silvano, 2006), além de reunir as demais características citadas anteriormente.

D. magna (Figura 7), frequentemente empregada em ensaios de toxicidade aguda, é um microcrustáceo de água doce com tamanho médio entre 5 e 6 mm, cuja estratégia reprodutiva alterna entre assexuada (partenogênese) e sexuada, apresenta um tempo de geração curto e vive na coluna d'água (zooplâncton), filtrando material orgânico particulado – sendo importante na manutenção de toda a teia trófica (Martínez, 2013). Se estes organismos são atingidos, as alterações podem ter consequências sobre todo o ecossistema, sendo,

inclusive, reconhecida sua utilização em métodos de triagem para a avaliação da toxicidade letal de produtos químicos / compostos para mamíferos e humanos (Guilhermino *et al.*, 2000).



Figura 7. Exemplos de *Daphnia magna*.

(Foto: Milena Gedoz)

Em trabalhos como o de Bilal *et al.* (2016), *D. magna*, considerado verdadeiro representante do ecossistema aquático e modelo ideal para avaliar a toxicidade a curto prazo de qualquer sistema, revelou resultados satisfatórios na redução da toxicidade de efluentes têxteis tratados com enzimas fúngicas lignolíticas, com redução da mortalidade destes organismos em cerca de 50%. Lade *et al.* (2015a,b) também revelaram a natureza não tóxica dos metabólitos gerados a partir da degradação de corantes avaliados através de bioensaios com *D. magna*, e Franciscon *et al.* (2009) relataram resultados positivos na redução da toxicidade de corantes azo descoloridos, em teste agudo com tais organismos.

Outros poluentes, como lamas de esgoto contaminadas com produtos farmacêuticos, também tiveram sua toxicidade diminuída, em cerca de 56% para *D. magna*, após tratamento com o fungo *Trametes versicolor* (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2011); e os poluentes bisfenol A e Triclosan tratados com enzimas lignolíticas de fungos da podridão branca também apresentaram resultados satisfatórios na diminuição da toxicidade avaliada para o microcrustáceo *Daphnia pulex*, no trabalho realizado por Arboleda *et al.* (2012).

2.8.2. *Caenorhabditis elegans*

O nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Figura 8) tornou-se um modelo animal emergente para estudos de toxicidade devido à sua prevalência no ambiente natural, curto ciclo de vida, tamanho reduzido (cerca de 1 mm), manutenção fácil e de baixo custo, transparência para imagens, facilidade de manipulação genética (Caito *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2015) e alta homologia com os seres humanos – contendo 60-80% de homologia dos genes com os mamíferos (Kaletta & Hengartner, 2006; McDonald *et al.*, 2006) – assim sendo, os ensaios de toxicidade com *C. elegans* foram validados como preditores para os efeitos adversos de muitos produtos químicos em espécies de mamíferos (Leung *et al.*, 2008). Vários estudos empregam *C. elegans* usando pontos finais como sobrevivência, crescimento, reprodução, locomoção, metabolismo e expressão gênica (Zhao *et al.*, 2013).



Figura 8. Exemplar de *Caenorhabditis elegans*.

(Foto: Elias Zientarski Michalski)

Ensaio de alto rendimento usando *C. elegans* têm sido amplamente aplicados em genética e *screenings* químicos (Kaletta & Hengartner, 2006; Giacomotto & Ségalat, 2010); sendo também considerado um poderoso organismo modelo para explorar a toxicidade dos metais, pois muitos dos efeitos tóxicos, como por exemplo de metilmercúrio em mamíferos,

ocorrem em *C. elegans*, incluindo letalidade, atrasos de crescimento e desenvolvimento e comportamento alterado (Helmcke *et al.*, 2009; Helmcke & Aschner, 2010).

Testes utilizando *C. elegans* têm sido usados, ainda, para avaliar níveis de toxicidade em produtos da quebra de glucosinolatos vegetais (Donkin *et al.*, 1995) e para determinar a fonte da toxicidade de efluentes industriais (Hitchcock *et al.*, 1997), além de avaliar a toxicidade de águas residuais de tintura sintética após ozonação (Hitchcock *et al.*, 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens

Inicialmente, foram avaliadas 84 linhagens de fungos políporos (Quadro 3), coletadas na Região Sul do Brasil, durante o doutoramento em Botânica, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de Mateus Arduvino Reck, realizado sob orientação da professora Rosa Mara da Silveira. As linhagens foram isoladas em meio de cultivo artificial, classificadas por taxonomia clássica e, também, com o auxílio de técnicas moleculares, que foram realizadas na Université Catholique Louvain, Bélgica, sob supervisão do Prof. Dr. Cony Decock.

Como linhagens produtoras controles foram utilizadas *Pleurotus pulmonarius* (PS-2001) e *Pleurotus albidus* (88F.13). A linhagem PS-2001, doada pela empresa BRASMICEL – Biotecnologia em Fungicultura – localizada em Poá/SP, faz parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassas do Instituto de Biotecnologia da UCS. A linhagem *P. albidus* 88F.13 foi coletada em São Francisco de Paula, pela Mestre Letícia Osório da Rosa e o seu micélio é mantido no Laboratório de Enzimas e Biomassas do Instituto de Biotecnologia – UCS; o basidioma se encontra depositado na Micoteca do Herbário da Universidade de Caxias do Sul com a identificação HUCS/MIUCS 1586.

Quadro 3. Linhagens de fungos inicialmente avaliadas para produção de enzimas extracelulares.

ICN	Família	Gênero	Espécie	Autor	Coletor	Número coletor	Determinador	Data de determinação	País	Estado	Município	Localidade	Data de coleta
154753	Polyporaceae	<i>Fomitella</i>	<i>F. supina</i>	(Sw.) Murrill	M.A. Reck	044/09	M.A. Reck	12/05/2009	Brasil	RS	São Francisco de Paula	FLONA	24/04/2009
154754	Polyporaceae	<i>Fomitella</i>	<i>F. supina</i>	(Sw.) Murrill	M.A. Reck	045/09	M.A. Reck	12/05/2009	Brasil	RS	São Francisco de Paula	FLONA	24/04/2009
154760	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. versicolor</i>	(L.) Lloyd	M.A. Reck	059/09	M.A. Reck	16/06/2009	Brasil	RS	Dom Pedro de Alcântara	RPPN	16/05/2009
154762	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. membranacea</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	061/09	M.A. Reck	16/06/2009	Brasil	RS	Dom Pedro de Alcântara	RPPN	16/05/2009
154766	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>Trametes sp.</i>		M.A. Reck	067/09	M.A. Reck	16/06/2009	Brasil	RS	São Francisco de Paula	FLONA	18/05/2009
154777	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. versicolor</i>	(L.) Lloyd	M.A. Reck	088/09	M.A. Reck	16/06/2009	Brasil	RS	Viamão	Parque Saint-Hilaire	25/05/2009
154780	Polyporaceae	<i>Pycnoporus</i>	<i>P. sanguineus</i>	(L.) Murrill	M.A. Reck	094/09	M.A. Reck	16/06/2009	Brasil	RS	São Francisco de Paula	Pró-Mata	29/05/2009
154785	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. versicolor</i>	(L.) Lloyd	M.A. Reck	100/09	M.A. Reck	16/06/2009	Brasil	RS	São Francisco de Paula	Pró-Mata	29/05/2009
154786	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. versicolor</i>	(L.) Lloyd	M.A. Reck	101/09	M.A. Reck	16/06/2009	Brasil	RS	São Francisco de Paula	Pró-Mata	29/05/2009
154787	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. membranacea</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	102/09	M.A. Reck	16/06/2009	Brasil	RS	São Francisco de Paula	Pró-Mata	29/05/2009
154788	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. hirsuta</i>	(Wulfen) Lloyd	M.A. Reck	104/09	M.A. Reck	16/06/2009	Brasil	RS	São Francisco de Paula	Pró-Mata	29/05/2009
154791	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. villosa</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	107/09	M.A. Reck	16/06/2009	Brasil	RS	São Francisco de Paula	Pró-Mata	29/05/2009
154796	Polyporaceae	<i>Pycnoporus</i>	<i>P. sanguineus</i>	(L.) Murrill	M.A. Reck	113/09	M.A. Reck	16/06/2009	Brasil	RS	São Francisco de Paula	Pró-Mata	29/05/2009
154800	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. membranacea</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	117/09	M.A. Reck	16/06/2009	Brasil	RS	São Francisco de Paula	Pró-Mata	29/05/2009
154807	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. membranacea</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	130/09	M.A. Reck	10/07/2009	Brasil	RS	São Francisco de Paula	FLONA	22/06/2009
154808	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. betulina</i>	(L.) Pilát	M.A. Reck	132/09	M.A. Reck	10/07/2009	Brasil	RS	São Francisco de Paula	FLONA	22/06/2009
154809	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. membranacea</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	140/09	M.A. Reck	10/07/2009	Brasil	RS	São Francisco de Paula	FLONA	22/06/2009
154810	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. villosa</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	141/09	M.A. Reck	10/07/2009	Brasil	RS	São Francisco de Paula	FLONA	22/06/2009
154812	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. betulina</i>	(L.) Pilát	M.A. Reck	143/09	M.A. Reck	10/07/2009	Brasil	RS	São Francisco de Paula	FLONA	22/06/2009
154821	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. versicolor</i>	(L.) Lloyd	M.A. Reck	153/09	M.A. Reck	20/07/2009	Brasil	SC	Alfredo Wagner	RPPN Rio das Furnas	17/07/2009
154822	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. membranacea</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	155/09	M.A. Reck	20/07/2009	Brasil	SC	Alfredo Wagner	RPPN Rio das Furnas	17/07/2009
154824	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. membranacea</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	157/09	M.A. Reck	20/07/2009	Brasil	SC	Alfredo Wagner	RPPN Rio das Furnas	17/07/2009
154825	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. membranacea</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	158/09	M.A. Reck	20/07/2009	Brasil	SC	Alfredo Wagner	RPPN Rio das Furnas	17/07/2009
154826	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. membranacea</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	159/09	M.A. Reck	20/07/2009	Brasil	SC	Alfredo Wagner	RPPN Rio das Furnas	17/07/2009
154828	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. villosa</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	162/09	M.A. Reck	20/07/2009	Brasil	SC	Alfredo Wagner	RPPN Rio das Furnas	17/07/2009

154835	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. villosa</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	170/09	M.A. Reck	20/07/2009	Brasil	SC	Alfredo Wagner	RPPN Rio das Furnas	17/07/2009
154837	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. hirsuta</i>	(Wulfen) Lloyd	M.A. Reck	172/09	M.A. Reck	13/08/2009	Brasil	RS	Porto Alegre	Jardim Botânico	11/08/2009
154844	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>Trametes</i> sp.		M.A. Reck	191/09	M.A. Reck	20/09/2009	Brasil	RS	Derrubadas	Parque Estadual do Turvo	16/09/2009
154846	Polyporaceae	<i>Corioloopsis</i>	<i>C. rígida</i>	(Berk. & Mont.) Murrill	M.A. Reck	193/09	M.A. Reck	20/09/2009	Brasil	RS	Derrubadas	Parque Estadual do Turvo	16/09/2009
154847	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. villosa</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	194/09	M.A. Reck	20/09/2009	Brasil	RS	Derrubadas	Parque Estadual do Turvo	16/09/2009
154864	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. betulina</i>	(L.) Pilát	M.A. Reck	214/09	M.A. Reck	30/09/2009	Brasil	RS	São Francisco de Paula	FLONA	25/09/2009
154872	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. hirsuta</i>	(Wulfen) Lloyd	M.A. Reck	222/09	M.A. Reck	30/09/2009	Brasil	RS	São Francisco de Paula	Pró-Mata	26/09/2009
154874	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. villosa</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	225/09	M.A. Reck	30/09/2009	Brasil	RS	São Francisco de Paula	Pró-Mata	26/09/2009
154891	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. cubensis</i>	(Mont.) Sacc.	M.A. Reck	266/09	M.A. Reck	06/11/2009	Brasil	PR	Antonina		14/10/2009
154895	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. pavonia</i>	(Berk.) Fr.	M.A. Reck	272/09	M.A. Reck	06/11/2009	Brasil	PR	Guaraqueçaba		15/10/2009
154916	Polyporaceae	<i>Hexagonia</i>	<i>H. hydroides</i>	(Sw.) M. Fidalgo	M.A. Reck	313/09	M.A. Reck	20/03/2010	Brasil	RS	Dom Pedro de Alcântara	RPPN	12/03/2010
154919	Polyporaceae	<i>Grammothele</i>	<i>G. lineata</i>	Berk. & M.A. Curtis	M.A. Reck	321/10	M.A. Reck	20/03/2010	Brasil	RS	Morrinhos do Sul	Perdida	13/03/2010
154920	Polyporaceae	<i>Grammothele</i>	<i>G. subargentea</i>	(Speg.) Rajchenb.	M.A. Reck	322/10	M.A. Reck	20/03/2010	Brasil	RS	Morrinhos do Sul	Perdida	13/03/2010
154921	Polyporaceae	<i>Grammothele</i>	<i>G. fuligo</i>	(Berk. & Broome) Ryvarden	M.A. Reck	325/10	M.A. Reck	20/03/2010	Brasil	RS	Morrinhos do Sul	Perdida	13/03/2010
154932	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. hirsuta</i>	(Wulfen) Lloyd	M.A. Reck	358/10	M.A. Reck	20/04/2010	Brasil	RS	Riozinho		10/04/2010
154933	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. elegans</i>	(Spreng.) Fr.	M.A. Reck	359/10	M.A. Reck	20/04/2010	Brasil	RS	Riozinho		10/04/2010
154934	Polyporaceae	<i>Hexagonia</i>	<i>H. papyracea</i>	Berk.	M.A. Reck	362/10	M.A. Reck	20/04/2010	Brasil	RS	Caçapava do Sul		10/04/2010
154947	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. betulina</i>	(L.) Pilát	M.A. Reck	384/10	M.A. Reck	20/05/2010	Brasil	RS	Santa Maria		17/04/2010
154951	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. hirsuta</i>	(Wulfen) Lloyd	M.A. Reck	389/10	M.A. Reck	20/05/2010	Brasil	RS	Santa Maria		14/05/2010
154953	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. villosa</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	391/10	M.A. Reck	20/05/2010	Brasil	RS	Santa Maria		14/05/2010
154958	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. membranacea</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	397/10	M.A. Reck	20/05/2010	Brasil	RS	Santa Maria		14/05/2010
154960	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. pavonia</i>	(Berk.) Fr.	M.A. Reck	399/10	M.A. Reck	20/05/2010	Brasil	RS	Santa Maria		14/05/2010
154965	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. máxima</i>	(Mont.) A. David & Rajchenb.	M.A. Reck	407/10	M.A. Reck	20/05/2010	Brasil	RS	Santa Maria	Morro da Caturrita	15/05/2010
154967	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. hirsuta</i>	(Wulfen) Lloyd	M.A. Reck	410/10	M.A. Reck	20/05/2010	Brasil	RS	Santa Maria	Morro da Caturrita	15/05/2010
154984	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. membranacea</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	440/10	M.A. Reck	10/06/2010	Brasil	RS	São Francisco de Paula	FLONA	07/06/2010
154986	Polyporaceae	<i>Corioloopsis</i>	<i>C. rígida</i>	(Berk. & Mont.) Murrill	M.A. Reck	443/10	M.A. Reck	15/06/2010	Brasil	RS	Dom Pedro de Alcântara	RPPN	07/06/2010
154992	Polyporaceae	<i>Pycnoporus</i>	<i>P. sanguineus</i>	(L.) Murrill	M.A. Reck	451/10	M.A. Reck	15/06/2010	Brasil	RS	Dom Pedro de Alcântara	RPPN	11/06/2010
154996	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. hirsuta</i>	(Wulfen) Lloyd	M.A. Reck	455/10	M.A. Reck	15/06/2010	Brasil	RS	Dom Pedro de Alcântara	Morro Leffa	12/06/2010

154998	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. hirsuta</i>	(Wulfen) Lloyd	M.A. Reck	457/10	M.A. Reck	15/06/2010	Brasil	RS	Dom Pedro de Alcântara	Morro Leffa	12/06/2010
175159	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. membranacea</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	459/10	M.A. Reck	15/06/2010	Brasil	RS	Dom Pedro de Alcântara	Morro Leffa	12/06/2010
175161	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. villosa</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	461/10	M.A. Reck	15/06/2010	Brasil	RS	Dom Pedro de Alcântara	Morro Leffa	12/06/2010
175162	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. villosa</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	462/10	M.A. Reck	15/06/2010	Brasil	RS	Dom Pedro de Alcântara	Morro Leffa	12/06/2010
175164	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. pavonia</i>	(Berk.) Fr.	M.A. Reck	464/10	M.A. Reck	15/06/2010	Brasil	RS	Dom Pedro de Alcântara	Morro Leffa	12/06/2010
175165	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. hirsuta</i>	(Wulfen) Lloyd	M.A. Reck	465/10	M.A. Reck	15/06/2010	Brasil	RS	Dom Pedro de Alcântara	Morro Leffa	12/06/2010
175182	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. versicolor</i>	(L.) Lloyd	M.A. Reck	482/10	M.A. Reck	30/06/2010	Brasil	RS	Porto Alegre	Morro Santana	21/06/2010
175183	Polyporaceae	<i>Corioloopsis</i>	<i>C. caperata</i>	(Berk.) Murrill	M.A. Reck	483/10	M.A. Reck	30/06/2010	Brasil	RS	Porto Alegre	Morro Santana	21/06/2010
175184	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. betulina</i>	(L.) Pilát	M.A. Reck	484/10	M.A. Reck	30/06/2010	Brasil	RS	Porto Alegre	Morro Santana	21/06/2010
175201	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. hirsuta</i>	(Wulfen) Lloyd	M.A. Reck	505/10	M.A. Reck	30/06/2010	Brasil	RS	São Francisco de Paula	Pró-Mata	25/06/2010
175220	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. villosa</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	524/10	M.A. Reck	30/06/2010	Brasil	RS	São Francisco de Paula	Pró-Mata	25/06/2010
175224	Polyporaceae	<i>Hexagonia</i>	<i>H. papyracea</i>	Berk.	M.A. Reck	536/10	M.A. Reck	28/09/2010	Brasil	SC	Florianópolis	Morro da Lagoa	16/09/2010
175226	Polyporaceae	<i>Corioloopsis</i>	<i>C. rígida</i>	(Berk. & Mont.) Murrill	M.A. Reck	542/10	M.A. Reck	28/09/2010	Brasil	SC	Florianópolis	Morro da Lagoa	16/09/2010
175243	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. cubensis</i>	(Mont.) Sacc.	M.A. Reck	580/10	M.A. Reck	18/10/2010	Brasil	RS	Viamão	P.E. de Itapuã	16/10/2010
175246	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. hirsuta</i>	(Wulfen) Lloyd	M.A. Reck	585/10	M.A. Reck	28/10/2010	Brasil	RS	Santa Maria	Morro do Elefante	20/10/2010
175259	Polyporaceae	<i>Mollicarpus</i>	<i>Mollicarpus sp.</i>		M.A. Reck	602/10	M.A. Reck	21/11/2010	Brasil	PR	Piraquara	Morro do Canal	12/11/2010
175260	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. elegans</i>	(Spreng.) Fr.	M.A. Reck	604/10	M.A. Reck	21/11/2010	Brasil	PR	Matinhos	APA Guaratuba	12/11/2010
175265	Polyporaceae	<i>Hexagonia</i>	<i>H. hydnoides</i>	(Sw.) M. Fidalgo	M.A. Reck	611/10	M.A. Reck	21/11/2010	Brasil	PR	Matinhos	APA Guaratuba	13/11/2010
175268	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. máxima</i>	(Mont.) A. David & Rajchenb.	M.A. Reck	616/10	M.A. Reck	21/11/2010	Brasil	PR	Matinhos	APA Guaratuba	13/11/2010
175269	Polyporaceae	<i>Hexagonia</i>	<i>H. hydnoides</i>	(Sw.) M. Fidalgo	M.A. Reck	617/10	M.A. Reck	21/11/2010	Brasil	PR	Matinhos	APA Guaratuba	13/11/2010
175280	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. polyzona</i>	(Pers.) Justo	M.A. Reck	635/10	M.A. Reck	21/11/2010	Brasil	PR	Antonina		14/11/2010
175281	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. cubensis</i>	(Mont.) Sacc.	M.A. Reck	637/10	M.A. Reck	21/11/2010	Brasil	SC	Joinville	Vale do Pirafé	14/11/2010
175294	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. membranacea</i>	(Sw.) Kreisel	M.A. Reck	655/10	M.A. Reck	05/01/2011	Brasil	SC	Mondafé	Linha Uruguai	15/11/2010
175316	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. cingulata</i>	Berk.	M.A. Reck	686/10	M.A. Reck	05/01/2011	Brasil	PR	Foz do Iguaçu	P.N. do Iguaçu, Poço preto	12/12/2010
175318	Polyporaceae	<i>Datronia</i>	<i>D. stereoides</i>	(Fr.) Ryvarden	M.A. Reck	689/10	M.A. Reck	05/01/2011	Brasil	PR	Foz do Iguaçu	P.N. do Iguaçu, Poço preto	12/12/2010
175319	Polyporaceae	<i>Earliella</i>	<i>E. scabrosa</i>	(Pers.) Gilb. & Ryvarden	M.A. Reck	690/10	M.A. Reck	05/01/2011	Brasil	PR	Foz do Iguaçu	P.N. do Iguaçu, Poço preto	12/12/2010
175320	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. máxima</i>	(Mont.) A. David & Rajchenb.	M.A. Reck	691/10	M.A. Reck	05/01/2011	Brasil	PR	Foz do Iguaçu	P.N. do Iguaçu, Bananeiras	12/12/2010
175323	Polyporaceae	<i>Earliella</i>	<i>E. scabrosa</i>	(Pers.) Gilb. & Ryvarden	M.A. Reck	694/10	M.A. Reck	05/01/2011	Brasil	PR	Foz do Iguaçu	P.N. do Iguaçu, Bananeiras	13/12/2010

175328	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. lactinea</i>	(Berk.) Sacc.	M.A. Reck	699/10	M.A. Reck	05/01/2011	Brasil	PR	Foz do Iguaçu	P.N. do Iguaçu, Bananeiras	13/12/2010
175330	Polyporaceae	<i>Corioloopsis</i>	<i>Corioloopsis</i> sp.		M.A. Reck	702/10	M.A. Reck	05/01/2011	Brasil	PR	Foz do Iguaçu	P.N. do Iguaçu, Bananeiras	13/12/2010
175331	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	<i>T. hirsuta</i>	(Wulfen) Lloyd	M.A. Reck	703/10	M.A. Reck	05/01/2011	Brasil	PR	Foz do Iguaçu	P.N. do Iguaçu, Bananeiras	13/12/2010

3.2. Seleção das linhagens produtoras de enzimas extracelulares

A triagem das 84 linhagens de fungos se baseou no uso de testes rápidos e sensíveis, utilizando meios sólidos contendo compostos indicadores coloridos que facilitam a detecção visual da produção de enzimas extracelulares (Nishida *et al.*, 1988). Para tal, foram utilizados o reagente ácido gálico, de triagem tradicional, cuja reação positiva é uma zona colorida marrom-escura (Harkin & Obst, 1973), e o corante polimérico *Reactive Blue 220*, que sofre descoloração pelas enzimas fúngicas (Gold *et al.*, 1988).

Dessa forma, o processo de cultivo das linhagens em meio ácido gálico e corante foi realizado em triplicata, em duas placas, com posterior cálculo da porcentagem de degradação dos respectivos meios.

3.2.1. Meio ágar ácido gálico

O meio de cultivo foi formulado segundo Davidson *et al.* (1938), contendo: extrato de levedura, 0,3% (m/v); extrato de malte, 0,3% (m/v); peptona, 0,5% (m/v); glicose, 1% (m/v); ágar bacteriológico, 2% (m/v); ácido gálico, 0,5% (m/v) e água destilada q.s.p. 100 mL. O pH do meio foi ajustado para $5,5 \pm 0,5$ e o meio autoclavado a 121°C e 1 atm por 15 min. Após inoculadas, as placas foram mantidas em estufa a 24°C, sendo acompanhado o crescimento e a oxidação do ácido gálico a cada 24 h por quatro dias.

3.2.2. Meio ágar corante

O meio de cultivo foi baseado na formulação de Munari *et al.* (2008), com modificações, contendo: corante *Reactive Blue 220*, 0,01% (m/v); peptona, 0,2% (m/v); glicose, 1% (m/v); ágar bacteriológico, 2% (m/v); água destilada q.s.p., 90 mL e 10 mL do meio de sais (MS) (10×) (Mandels & Reese, 1957), com a seguinte composição: KH_2PO_4 , 20 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 14 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g; ureia, 3 g; CaCl_2 , 3 g; H_2O destilada q.s.p. 1 litro; além de 1 mL da seguinte solução para cada litro: $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 15,6 mg; FeSO_4 , 50 mg; ZnSO_4 , 14 mg; CoCl_2 , 20 mg. O pH do meio foi ajustado para $5,5 \pm 0,5$ e autoclavado a 121°C e 1 atm por 15 min. Após inoculadas, as placas foram mantidas em estufa a 24°C , sendo acompanhado o crescimento e o halo de degradação do corante a cada 24 h por quatro dias.

3.2.3. Cálculo da porcentagem de oxidação dos meios ácido gálico e corante

Para a determinação do potencial de oxidação do ácido gálico e de descoloração do *Reactive Blue 220* por ação das enzimas liberadas pelas diferentes linhagens no meio, com relação ao crescimento micelial, foi utilizado o cálculo, segundo Munari *et al.* (2008), a seguir:

$$D = \frac{\left(\frac{\text{halo}}{\text{colônia}}\right)}{M} \times 100$$

Onde:

- D (degradação)
- M (média halo/colônia do dia do controle *P. pulmonarius* PS-2001)
- Resultado expresso em %

3.3. Meios para produção enzimática

As linhagens que apresentaram os resultados mais promissores para a produção de enzimas extracelulares nos meios ácido gálico e corante foram selecionadas para realização de cultivo em meio submerso e em estado sólido.

3.3.1. Cultivo submerso

O meio de cultivo submerso foi formulado utilizando 200 g/L de batata, 50 mL/L de solução mineral (MS 20×) (Mandels & Reese, 1957) e 20 g/L de glicose. A solução de sais tem a seguinte composição (g/L): KH_2PO_4 , 10 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6 g; $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 6 g; CaCl_2 , 6 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,0312 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,028 g; e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,04 g. O caldo resultante foi distribuído em frascos *Erlenmeyer*, contendo 100 mL cada. Após fechados e autoclavados a 1 atm por 15 min, os mesmos foram inoculados com três discos de 1,5 cm de diâmetro dos isolados e dos controles, fechados com chumaços contendo algodão e gaze e mantidos em agitadores a $25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$, sendo acompanhado o crescimento micelial e a produção enzimática a cada 48 h por dez dias. O procedimento foi realizado em quintuplicata.

A cada coleta, os frascos foram pesados e o volume perdido por evaporação repostado com água destilada, sendo então, centrifugados – $4000 \times g$ a 4°C , durante 20 min – e filtrados – em papel filtro – para quantificação da biomassa micelial e do caldo para posterior análise do pH, das proteínas solúveis totais e das determinações enzimáticas de cada dia.

3.3.2. Cultivo em estado sólido

O meio de cultivo em estado sólido foi formulado utilizando serragem de *Pinus* spp., 94% (m/m); farelo de trigo, 5% (m/m); CaCO₃, 1% (m/m) e água destilada q.s.p. até a obtenção de 66% (m/v) de umidade, como descrito por Tan e Wahab (1997). Posteriormente, 21 g do substrato foram distribuídos em frascos de vidro com capacidade de 100 mL e fechados, sendo autoclavados a 1 atm por 2 h. Na sequência, foi inoculado um disco de 1,5 cm de diâmetro das placas de Petri dos isolados e dos controles. Cada frasco foi fechado com chumaços contendo algodão e gaze e mantido em estufa com umidade saturada a 25°C ± 3°C, sendo acompanhado o crescimento micelial e a produção enzimática a cada 48 h por doze dias. O procedimento foi realizado em quadruplicata.

O conteúdo de cada frasco foi homogeneizado manualmente e 15 g suspensos em 30 mL de água destilada, mantidos sob agitação por 30 min a 130 rpm e 4°C; o restante do conteúdo do frasco foi colocado na estufa para secagem e análise do teor de umidade. Após os 30 min de agitação, os sólidos do material suspenso foram removidos por centrifugação – 4000 × g a 4°C, durante 20 min – e filtração com papel filtro para obtenção do extrato e posterior análise do pH, das proteínas solúveis totais e das determinações enzimáticas de cada dia.

3.4. Métodos analíticos

O caldo e a biomassa obtidos do cultivo submerso e em estado sólido foram analisados como se segue.

3.4.1. Determinação da umidade no cultivo em estado sólido

O teor de umidade foi determinado por método gravimétrico, baseado na perda de massa após secagem das amostras em estufa a 50°C por 48 h e resfriamento em dessecador, sendo medida em balança analítica (AOAC, 1995). Os resultados foram utilizados para as conversões de mL para grama das proteínas solúveis totais e análises enzimáticas do cultivo sólido.

$$MS = 0,5g \text{ MU após secagem}$$

$$MS\% = \frac{(MS \times 100)}{0,5}$$

$$MSg = \frac{(15 \times MS\%)}{100}$$

$$\text{água na amostra} = 30 - MSg$$

Onde:

- MS (massa seca)
- MU (massa úmida)
- MS% (porcentagem de massa seca no meio)
- MSg (grama de massa seca na extração)

3.4.2. Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

O pH de cada amostra foi determinado diretamente no extrato enzimático com a utilização de um pH-metro PHTEK modelo PHS-3B.

3.4.3. Determinação das proteínas solúveis totais (PST)

As proteínas solúveis totais presentes nas amostras foram determinadas pela quantificação do complexo azul resultante da ligação dessas proteínas ao corante *Coomassie Brilliant Blue* G-250, de acordo com Bradford (1976). A mistura reacional contém: 0,5 mL do reagente de *Bradford* e 1 mL do extrato enzimático devidamente diluído. As amostras foram mantidas sob agitação e, após 10 min, realizada a leitura em espectrofotômetro a 595 nm, em placa de 96 poços. As concentrações das proteínas foram estimadas correlacionando a absorbância das amostras a uma curva padrão com concentrações de albumina bovina de 0 a 100 mg/mL, como demonstrado na equação abaixo:

$$\text{PST} = \frac{\left(\frac{(\text{Abs} \times 2 - a)}{b}\right)}{1000}$$

Onde:

- Abs (absorbância)
- **a** e **b** = obtidos a partir da regressão linear da curva padrão
- Resultado expresso em mg/mL (mg de proteína/mL de meio)

$$\text{PST} = \left(\frac{\left(\frac{(\text{Abs} \times 2 - a)}{b}\right)}{1000}\right) \times \frac{\text{água na amostra}}{\text{MSg}}$$

Onde:

- MSg (grama de massa seca na extração)
- Resultado expresso em mg/g (mg de proteína/g de meio)

3.4.4. Determinações enzimáticas

Todas as análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro Molecular Devices®, modelo *Spectra Max* 190 em placas com 96 poços.

Todas as atividades enzimáticas são expressas em unidades internacionais por mL (U/mL) para cultivos líquidos e em unidades internacionais por grama de massa seca (U/g) para os cultivos sólidos, as quais são definidas como a quantidade de enzima que libera um μmol do produto por mL, ou grama, por minuto ($U = \mu\text{mol}/\text{min}$).

3.4.4.1. Lacases (Lac)

A atividade das lacases foi determinada segundo Wolfenden e Willson (1982), através da quantificação do produto da oxidação do 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), ABTS, utilizado como substrato. A mistura reacional (0,4 mL) contém: 0,18 mL do tampão acetato de sódio (0,2 mol/L, pH 5,0); 0,18 mL do extrato enzimático adequadamente diluído e 0,04 mL do substrato ABTS (5 mmol/L). A oxidação do ABTS foi monitorada em espectrofotômetro ($\epsilon_{420} = 3,6 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) durante 90 seg, a 25°C, em intervalos de 5 seg.

$$\text{Lac} = \frac{(\text{Abs} \times 60 \times V_t \times 10^6)}{(\epsilon_{420} \times V_a)}$$

Onde:

- Abs (absorbância)
- V_t (volume total) = 0,4
- ϵ_{420} (coeficiente de extinção molar) = $3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- V_a (volume da amostra) = 0,18
- Resultado expresso em U/mL

$$\text{Lac} = \left(\frac{(\text{Abs} \times 60 \times V_t \times 10^6)}{(\epsilon_{420} \times V_a)} \right) \times \frac{\text{água na amostra}}{\text{MSg}}$$

Onde:

- MSg (grama de massa seca na extração)
- Resultado expresso em U/g

3.4.4.2. Peroxidases (Per)

As peroxidases totais foram dosadas empregando-se a mesma metodologia utilizada para as determinações das lacases (subitem 3.4.4.1), com ABTS como substrato, entretanto com a presença de 0,04 mL de H₂O₂ (2 mmol/L) e somente 0,14 mL do tampão acetato de sódio (0,2 mol/L, pH 5,0), na mistura reacional (Heinzkill *et al.*, 1998). A atividade detectada para as lacases foi descontada da atividade das peroxidases totais resultando na atividade das peroxidases.

$$\text{Per} = \left(\frac{(\text{Abs} \times 60 \times V_t \times 10^6)}{(\epsilon_{420} \times V_a)} \right) - \text{Lac}$$

Onde:

- Abs (absorbância)
- V_t (volume total) = 0,4
- ε₄₂₀ (coeficiente de extinção molar) = 3,6 x 10⁴ M⁻¹cm⁻¹
- V_a (volume da amostra) = 0,18
- Lac (atividade das lacases)
- Resultado expresso em U/mL

$$\text{Per} = \left(\left(\frac{(\text{Abs} \times 60 \times V_t \times 10^6)}{(\epsilon_{420} \times V_a)} \right) - \text{Lac} \right) \times \frac{\text{água na amostra}}{\text{MSg}}$$

Onde:

- MSg (grama de massa seca na extração)
- Resultado expresso em U/g

3.4.4.3. Manganês peroxidases (MnP)

A atividade de manganês peroxidase foi determinada pelo método proposto por Kuwahara *et al.* (1984), utilizando vermelho de fenol como substrato. A mistura reacional (2 mL) contém: 1 mL de tampão succinato de sódio (20 mmol/L, pH 4,5); 0,1 mL de vermelho de fenol (0,1% (m/v)); 0,1 mL de lactato de sódio (250 mmol/L); 0,2 mL de albumina bovina (0,5% (m/v)); 0,05 mL de MnSO₄ (2 mmol/L); 0,05 mL de H₂O₂ (2 mmol/L); sendo adicionados 0,5 mL da amostra. Após 5 min a 30°C, as reações foram interrompidas pela adição de 0,04 mL de NaOH (2 mol/L). A formação do produto da oxidação foi quantificada pela variação da absorbância em espectrofotômetro ($\epsilon_{610} = 4,46 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) quando comparado ao branco de cada amostra, com tempo zero de reação.

$$\text{MnP} = \frac{(\text{Abs} \times V_t \times 10^6)}{(\epsilon_{610} \times V_a)}$$

Onde:

- Abs (absorbância) = Abs (reação) – Abs (branco)
- V_t (volume total) = 2,04
- ϵ_{610} (coeficiente de extinção molar) = $4,46 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- V_a (volume da amostra) = 0,5
- Resultado expresso em U/mL

$$\text{MnP} = \left(\frac{(\text{Abs} \times V_t \times 10^6)}{(\epsilon_{610} \times V_a)} \right) \times \frac{\text{água na amostra}}{\text{MSg}}$$

Onde:

- MSg (grama de massa seca na extração)
- Resultado expresso em U/g

3.4.4.4. Lignina peroxidases (LiP)

A atividade de lignina peroxidase foi determinada pela formação de veratrilaldeído ($\epsilon_{310} = 9,3 \times 10^3 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) em uma mistura reacional contendo: 0,15 mL de álcool veratrílico (4 mmol/L) em tampão tartarato de sódio (0,5 mol/L, pH 3,0); 0,1 mL de H_2O_2 (2 mmol/L) e 0,15 mL da amostra (Tien & Kirk, 1984). A variação da absorbância foi observada durante 5 min a 30°C.

$$\text{LiP} = \frac{(\text{Abs} \times V_t \times 10^6)}{(\epsilon_{310} \times V_a)}$$

Onde:

- Abs (absorbância)
- V_t (volume total) = 0,4
- ϵ_{310} (coeficiente de extinção molar) = $9,3 \times 10^3 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- V_a (volume da amostra) = 0,15
- Resultado expresso em U/mL

$$\text{LiP} = \left(\frac{(\text{Abs} \times V_t \times 10^6)}{(\epsilon_{310} \times V_a)} \right) \times \frac{\text{água na amostra}}{\text{MSg}}$$

Onde:

- MSg (grama de massa seca na extração)
- Resultado expresso em U/g

3.4.4.5. Oxidases do álcool veratrílico (OAV)

Para a determinação da atividade das oxidases do álcool veratrílico, foi observada a formação de aldeído veratrílico a partir de uma reação contendo: 0,2 mL de álcool veratrílico (2 mmol/L) em tampão tartarato de sódio (0,5 mmol/L, pH 5,0) e 0,2 mL da amostra, sendo a reação monitorada durante 5 min a 30°C, utilizando $\epsilon_{310} = 9,3 \times 10^3 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Bourbonnais & Paice, 1988).

$$\text{OAV} = \frac{(\text{Abs} \times V_t \times 10^6)}{(\epsilon_{310} \times V_a)}$$

Onde:

- Abs (absorbância)
- V_t (volume total) = 0,4
- ϵ_{310} (coeficiente de extinção molar) = $9,3 \times 10^3 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- V_a (volume da amostra) = 0,2
- Resultado expresso em U/mL

$$\text{OAV} = \left(\frac{(\text{Abs} \times V_t \times 10^6)}{(\epsilon_{310} \times V_a)} \right) \times \frac{\text{água na amostra}}{\text{MSg}}$$

Onde:

- MSg (grama de massa seca na extração)
- Resultado expresso em U/g

3.4.5. Determinação da biomassa micelial em cultivo submerso

A biomassa micelial dos macrofungos em cultivo submerso foi determinada por gravimetria, onde todo o conteúdo do *Erlenmeyer* (100 mL) foi filtrado em papel filtro (previamente seco e pesado em balança analítica), o filtro contendo a biomassa foi seco em estufa a 50°C por cerca de 48 h, resfriado em dessecador contendo cristais de sílica, durante 30 min, e pesado em balança analítica. A massa inicial foi descontada da massa final, chegando-se ao valor da biomassa de cada amostra, como demonstrado no cálculo:

$$BM = (MF - MI) \times 10$$

Onde:

- BM (biomassa)
- MF (massa final) = papel filtro + biomassa
- MI (massa inicial) = papel filtro
- Resultado expresso em g/L

3.4.6. Caracterização específica de *Trametes hirsuta* 358/10

A caracterização enzimática foi realizada com o pico das lacases da linhagem que apresentou melhor potencial, provindas tanto do cultivo submerso como do cultivo em estado sólido.

3.4.6.1. Atividades específicas

As atividades específicas das lacases, peroxidases e manganês peroxidases nos experimentos foram calculadas utilizando as seguintes fórmulas:

$$AE_{Lac} = \frac{U}{[PST]}$$

$$AE_{Per} = \frac{U}{[PST]}$$

$$AE_{MnP} = \frac{U}{[PST]}$$

Onde:

- AE (atividades específicas das lacases, peroxidases e manganês peroxidases)
- U (unidades enzimáticas das lacases, peroxidases e manganês peroxidases (U/mL) ou (U/g))
- [PST] (concentração das proteínas solúveis totais (mg/mL) ou (mg/g))
- Resultados expressos em unidades enzimáticas produzidas por mg de proteínas solúveis totais (U/mg).

3.4.6.2. Tampão e pH ótimo de atividade das lacases

Para verificar a influência do pH na atividade enzimática das lacases, foi realizada a mensuração desta enzima segundo Wolfenden e Willson (1982), porém, utilizando três diferentes tampões em distintos pHs. As análises foram realizadas com tampão Mc'Ilvaine (100 mmol/L) em pHs 2 a 8 com intervalos de 0,5; tampão citrato de sódio (100 mmol/L) nos pHs 3 a 8 com intervalos de 0,5 e tampão acetato de sódio (100 mmol/L) com valores de pHs 3 a 7,5 com intervalos de 0,5.

3.4.6.3. Temperatura ideal de atividade das lacases

Para a verificação da temperatura ideal foi utilizado o processo de análise das lacases com ABTS já descrito anteriormente no subitem 3.4.4.1., porém com tampão citrato em pH 3,5, sendo avaliadas seis diferentes temperaturas (20, 25, 30, 35, 40 e 45°C) durante a leitura no espectrofotômetro.

3.4.6.4. Termoestabilidade da atividade das lacases

A termoestabilidade das lacases foi avaliada em cinco diferentes temperaturas 20°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C, utilizando o tampão citrato, pH 3,5, com leitura a 30°C. Alíquotas das amostras foram coletadas nos tempos 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 h. A determinação das atividades foi feita conforme descrito anteriormente no subitem 3.4.4.1.

3.4.6.5. Determinação das constantes cinéticas na atividade das lacases

A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) foram calculadas empregando-se diferentes concentrações do substrato ABTS nos caldos do cultivo submerso e em estado sólido contendo 5 U/mL de lacase, sendo as reações realizadas a 30°C com tampão citrato em pH 3,5. Os gráficos e a determinação dos valores foram realizados com o software *GraphPadPrism* versão 5.01, para *Windows*, San Diego, Califórnia, EUA que, através dos métodos dos mínimos quadrados, calcula diretamente as constantes cinéticas.

3.4.6.6. Avaliação das isoformas das lacases em eletroforese SDS-PAGE

Precipitação das amostras

Para a precipitação das amostras, os caldos enzimáticos brutos (200 µL, em tubos de reação de 2 mL) foram acrescidos de acetona (a 0°C) na proporção 1:2, respectivamente. Após, foram centrifugados a 12.000 rpm, 0°C, por 30 min. O sobrenadante foi retirado e os precipitados ressuspensos em 30 µL de tampão e utilizados para a realização da eletroforese em gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*).

SDS-PAGE

A determinação da presença de proteínas solúveis para a verificação de isoformas com atividades de lacase, a partir de suas respectivas massas moleculares, foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*), segundo metodologia descrita por Laemmli (1970), que consiste em um gel para empilhamento com concentração de 4% (m/v)

e 0,05 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e um gel para separação com concentração de 12% (m/v) e 0,1 mL de SDS 10% (m/v), sendo utilizado o sistema *Mini-PROTEAN Tetra* da *Bio-Rad*®. Para coloração, o SDS foi removido por lavagem do gel, em temperatura ambiente, em solução A (*Triton X100*® 2,5%) e em solução B (tampão acetato de sódio, pH 5,0) por 10 min cada uma. O gel foi transferido para uma placa de vidro e uma camada de ABTS-ágar (0,02 g de ABTS; 0,4 g de ágar; 40 mL de água aquecida até dissolver o ágar) foi colocada sobre o gel. Minutos após, foram observados, em temperatura ambiente, o surgimento de bandas com coloração verde. O marcador utilizado foi o *Precision Plus Protein*™ *Standards* da *Bio-Rad*® com bandas de 10 a 250 kD.

3.5. Testes de descoloração

Os testes de descoloração foram realizados com os caldos enzimáticos, de ambos os meios, da linhagem com maior atividade das Lac. Os controles foram os corantes submetidos às mesmas condições, porém substituindo-se o extrato enzimático por água destilada.

O experimento foi realizado em placas de 96 poços, em triplicata, onde foram adicionados 5 U/mL de Lac do caldo enzimático e os diferentes corantes (Tabelas 1, 2 e 3) na concentração de 50 mg/L. A degradação dos corantes foi avaliada por meio do espectrofotômetro, com o comprimento de onda ideal para cada corante, nos tempos 0, 2, 6, 12, 24 e 48 h. Foram utilizados dez azocorantes (Tabela 1), oito corantes da classe trifenilmetano (Tabela 2) e cinco corantes da classe antraquinona (Tabela 3), classificados como corantes têxteis, embora alguns sejam utilizados em outros segmentos industriais.

Tabela 1. Relação dos azocorantes utilizados nos ensaios de descoloração e seus respectivos comprimentos de onda.

CORANTE	COMPRIMENTO DE ONDA (nm)
<i>Acid Red 315</i>	490
<i>Congo Red</i>	500
<i>Disperse Blue 79</i>	540
<i>Disperse Orange 30</i>	470
<i>Disperse Red 324</i>	490
<i>Levafix Brilliant Red</i>	510
<i>Levafix Golden Yellow</i>	440
<i>Orange G</i>	480
<i>Reactive Red 198</i>	520
<i>Reactive Yellow 15</i>	410

Tabela 2. Relação dos corantes trifenilmetano utilizados nos ensaios de descoloração e seus respectivos comprimentos de onda.

CORANTE	COMPRIMENTO DE ONDA (nm)
<i>Brilliant Green</i>	610
<i>Bromocresol Green</i>	620
<i>Bromophenol Blue</i>	590
<i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i>	580
<i>Gentian Violet</i>	580
<i>Malachite Green</i>	620
<i>Methyl Violet 2B</i>	570
<i>Phenol Red</i>	430

Tabela 3. Relação dos corantes antraquinona utilizados nos ensaios de descoloração e seus respectivos comprimentos de onda.

CORANTE	COMPRIMENTO DE ONDA (nm)
<i>Acid Blue 80</i>	630
<i>Acid Green 28</i>	680
<i>Reactive Blue KN-G</i>	600
<i>Reactive Blue 220</i>	610
<i>Remazol Brilliant Blue R</i>	590

Para os cálculos da porcentagem da descoloração de cada corante, foi utilizada a fórmula segundo Schmitt *et al.* (2012), onde a absorbância do corante submetido ao extrato enzimático do fungo é comparada à absorbância do controle do mesmo corante não submetido ao extrato enzimático.

$$\text{Descoloração\%} = 100 - \left(\frac{(\text{Abs}_a \times 100)}{\text{Abs}_c} \right)$$

Onde:

- Abs_a (absorbância da amostra)
- Abs_c (absorbância do controle)

Para excluir a possibilidade de alteração do pH ser a responsável pela descoloração, o pH foi medido também nos tempos 0, 2, 6, 12, 24 e 48 h diretamente nas formulações citadas com a utilização de um pH-metro PHTEK modelo PHS-3B.

3.6. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As amostras contendo os corantes que apresentaram as maiores porcentagens de descoloração no teste anterior com os caldos de ambos os meios de cultivo, foram avaliadas por CLAE, sendo os controles os corantes em concentração de 50 mg/L e os caldos do cultivo submerso e em estado sólido com 5 U/mL de Lac. Todas as amostras passaram por filtro de membrana com poro de 0,22 µm.

A análise dos corantes da classe antraquinona (*Acid Blue 80* e *Reactive Blue 220*) em CLAE (*Shimadzu*) foi realizada em um sistema isocrático, utilizando uma coluna C18

(*Discovery* ® *Sigma-Aldrich*), 30°C, 620 nm, fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 20 µL. A fase móvel consistiu em metanol.

A degradação do corante *Brilliant Green* (classe trifenilmetano) também foi avaliada em CLAE (*Shimadzu*), segundo Andersen e Turnipseed (2009), em que foi utilizada uma coluna C18 (*Discovery* ® *Sigma-Aldrich*), 30°C, 622 nm, fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 20 µL. A fase móvel foi composta de acetonitrila (fase móvel A) e tampão acetato pH 4,5 (fase móvel B). O gradiente de eluição da fase móvel foi de 55% de A por 4 min, 65% de A de 4 a 7 min e de 80% de A de 7 para 12 min, com gradiente inicial de 12 a 20 min.

3.7. Teste de toxicidade

No Laboratório de Toxicologia da Universidade de Caxias do Sul, as amostras contendo os corantes que apresentaram maior percentual de descoloração, foram avaliadas com relação à toxicidade sem e com o tratamento enzimático dos dois meios de cultivo utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna* para o teste dos efeitos agudos. Nos testes em que não foram detectados efeitos agudos, os nematódeos *Caenorhabditis elegans* foram utilizados para a avaliação de possíveis efeitos crônicos.

3.7.1. Toxicidade aguda

Exemplares de *D. magna* foram obtidos a partir da cultura do Laboratório de Toxicologia da Universidade de Caxias do Sul, mantidos conforme norma estabelecida pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) presentes na NBR 12713:2009. Os organismos foram cultivados a 20°C (± 2) em incubadoras com fotoperíodo de 16:8 h

(claro:escuro), luminosidade em torno de 2000 Lux, em béqueres de 2000 mL com 25 indivíduos. Três vezes por semana os meios são renovados, com condutividade, oxigenação e pH (ajustado entre 7,6 e 7,8) aferidos e os organismos alimentados com suspensão da cultura algácea de *Pseudokirchneriella subcaptata* e ração fermentada de *Artemia salina*. Mensalmente, os indivíduos têm a sensibilidade testada com cloreto de sódio (NaCl) a fim de determinar a CE50(48 h) para estabelecimento da carta-controle.

Para a realização dos ensaios, também seguindo a norma ABNT 12713:2009, utilizaram-se os caldos enzimáticos obtidos a partir do pico de lacase nos cultivos submerso e em estado sólido, com concentração das Lac de 5 U/mL, reagidos por 48 h com os corantes selecionados (*Acid Blue 80*, *Reactive Blue 220* e *Brilliant Green*); como controles, foram utilizados os corantes sem terem reagido com os caldos e os caldos dos dois cultivos.

As composições e quantidades encontram-se especificadas na Tabela 4.

Tabela 4. Composições e quantidades das amostras para os testes de toxicidade.

	Amostras	Corante* (mL)	Água (mL)	Caldo** (mL)
CONTROLES	<i>Acid Blue 80</i>	236,976	59,25	-
	<i>Reactive Blue 220</i>	236,976	59,25	-
	<i>Brilliant Green</i>	236,976	59,25	-
	Cultivo submerso	-	292,695	3,555
	Cultivo sólido	-	292,103	4,147
TESTES	Cult. sub. + <i>Acid Blue 80</i>	236,976	55,695	3,555
	Cult. sub. + <i>Reactive Blue 220</i>	236,976	55,695	3,555
	Cult. sub. + <i>Brilliant Green</i>	236,976	55,695	3,555
	Cult. sól. + <i>Acid Blue 80</i>	236,976	55,103	4,147
	Cult. sól. + <i>Reactive Blue 220</i>	236,976	55,103	4,147
	Cult. sól. + <i>Brilliant Green</i>	236,976	55,103	4,147

*Concentração dos corantes – 0,05 mg/mL

**Caldo enzimático – 5 U/mL de Lac

As amostras foram posteriormente diluídas – 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,1% e 1,5% - e os ensaios executados em béqueres de 50 mL, com 30 mL de solução, em quadruplicatas, conforme o esquema mostrado na Figura 9.

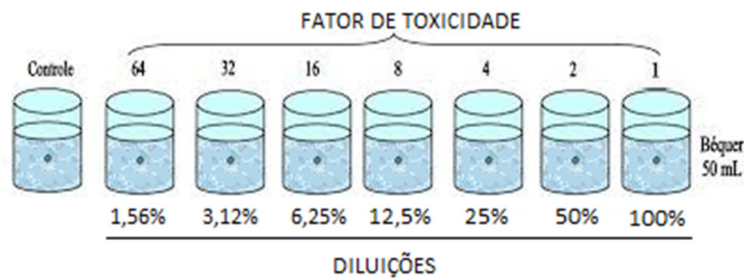


Figura 9. Diluições às quais as amostras (controles e testes) foram submetidas e indicação dos respectivos fatores de toxicidade (FT).

Para cada diluição, houve a exposição de vinte organismos-teste, sendo cinco por béquer, durante 48 h, mantidos em incubadoras a 20°C (± 2), sem iluminação e alimentação. Após este período de exposição, o número de organismos imóveis foi observado. Os resultados foram expressos em Fator de Toxicidade (FT), que corresponde à menor diluição da amostra na qual não se observa imobilidade em mais de 10% dos organismos.

O valor do FT é determinado através da observação direta da mobilidade dos indivíduos na série e diluições-teste, não sendo necessário cálculo estatístico para sua determinação (Knie & Lopez, 2004).

3.7.2. Toxicidade crônica

Foi utilizado como organismo-teste, também obtido a partir da cultura do Laboratório de Toxicologia da Universidade de Caxias do Sul, o nematódeo *C. elegans* var. Bristol de linhagem N2 tipo selvagem, cultivados seguindo os procedimentos descritos na norma

ISO/DIS 10872/2010. A linhagem foi mantida em placas de ágar com o meio para crescimento NGM sendo alimentada com *Escherichia coli* de linhagem OP50 em incubadora a 20°C.

Para a realização do teste, os organismos foram transferidos para uma placa com ágar NGM por 96 horas. Passado esse período, a placa foi lavada com o meio M9 e o líquido, com os organismos, foi transferido para uma cascata de filtros de 10 µm e 5 µm para a separação dos J1 (primeira fase larval do organismo) a serem utilizados no ensaio.

Foram colocadas em placas estéreis de doze poços, as diluições (50%, 25%, 12,5% e 6,25%) das amostras que não apresentaram toxicidade aguda, sendo: o caldo enzimático do cultivo sólido, o caldo do cultivo sólido com o corante *Acid Blue* 80 e o caldo do cultivo sólido com o corante *Reactive Blue* 220; além do controle e do teste de sensibilidade (BACC16), em seis replicatas por diluição, junto com dez organismos J1 e seu alimento (*E. coli* OP50). Após a montagem das placas, iniciou-se o teste, que teve duração de 96 horas.

Passadas as 96 horas, uma solução do corante Rosa de Bengala foi utilizada para corar a cutícula dos nematódeos e permitir uma melhor visualização dos organismos; após, as placas foram incubadas a 80°C por 10 min para a finalização do teste. O ensaio se torna válido se cada hermafrodita do controle originar ≥ 30 neonatos.

A avaliação do resultado do teste foi dada a partir do crescimento e reprodução dos hermafroditas. Os neonatos foram contados ao esteriomicroscópio e os hermafroditas fotografados e medidos em microscópio óptico, usando *software* de medição. O crescimento do corpo foi estimado pela diferença entre o comprimento final do organismo-teste menos a média do comprimento do corpo inicial dos J1 introduzidos (média realizada com 30 J1 concomitantemente ao início do teste). Os resultados foram expressos pela taxa de crescimento e de reprodução em relação ao controle (taxa de inibição (%)) e, conforme a normalidade dos dados, foi realizada análise estatística por meio dos testes ANOVA (Tukey HSD) e Kruskal-Wallis (α 0,05) utilizando o *software IBM Statistics SPSS 21*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente capítulo, estão apresentados os resultados obtidos das análises descritas no capítulo anterior, bem como suas interpretações e contextualizações, relacionando-as às características de outros fungos já estudados. Dessa forma, através da utilização de diversos parâmetros combinados, objetivou-se caracterizar o arsenal enzimático e identificar um fungo políporo – isolado na Região Sul do Brasil – com potencial para biodegradação de corantes frequentemente encontrados em efluentes têxteis, bem como avaliar sua real aplicação, produtos e subprodutos dessa biodegradação e efeitos toxicológicos decorrentes.

4.1. Seleção das linhagens com base na produção de enzimas extracelulares

As 84 linhagens de fungos políporos coletadas na Região Sul do Brasil foram avaliadas com relação ao crescimento micelial e halo de degradação do corante *Reactive Blue* 220 e oxidação do ácido gálico em placas de Petri. As linhagens cujo halo de degradação ou oxidação formado em relação ao crescimento micelial, segundo o cálculo descrito no subitem (3.2.3), mostraram-se promissoras na produção de enzimas extracelulares nos meios contendo ácido gálico e o corante *Reactive Blue* 220 encontram-se na Figura 10.

As plotagens das porcentagens de degradação nos dois meios de cultivo permitiram visualizar as linhagens que se sobressaíram – em algum momento – durante os quatro dias de incubação, quando comparadas ao controle *Pleurotus pulmonarius* PS-2001.

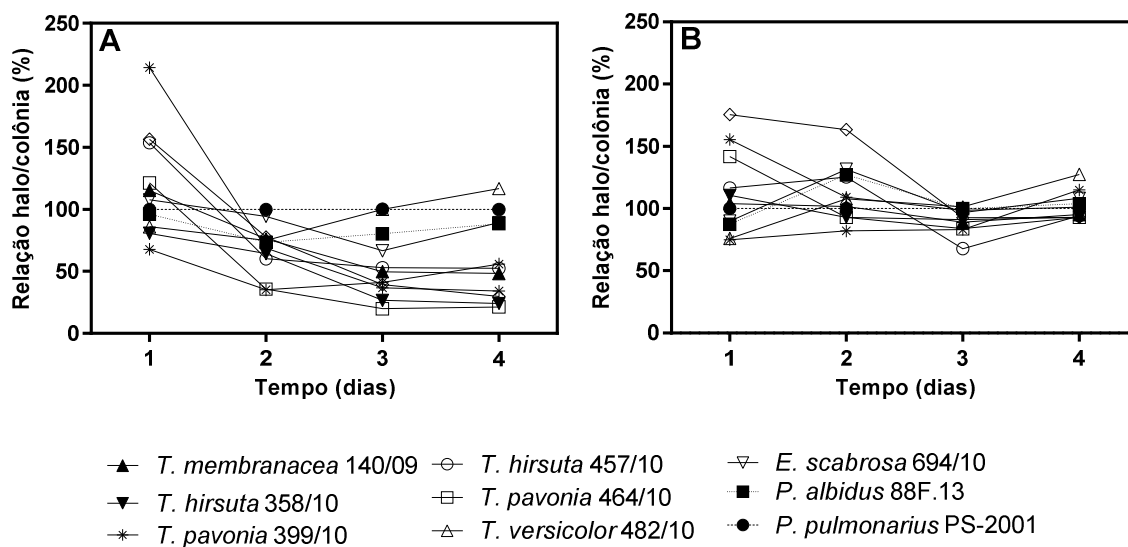


Figura 10. Relação halo/colônia da oxidação do ácido gálico (A) e descoloração do corante *Reactive Blue* 220 (B) produzidas por linhagens de fungos políporos. Os dados em valores percentuais são apresentados em relação aos da linhagem controle *Pleurotus pulmonarius* PS-2001, sendo a média de H/C desta linhagem considerada 100%.

As imagens de algumas dessas linhagens e dos controles, *Pleurotus albidus* 88F.13 e *P. pulmonarius* PS-2001, nos dois meios, podem ser visualizadas na Figura 11, que mostra o crescimento micelial e o halo de degradação após quatro dias de incubação a $\pm 25^{\circ}\text{C}$, lembrando que no ácido gálico a reação positiva é a zona colorida marrom-escura (Harkin & Obst, 1973) e no corante é a zona descolorida (Gold *et al.*, 1988).



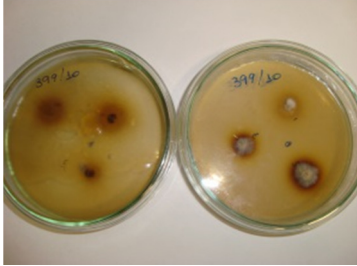
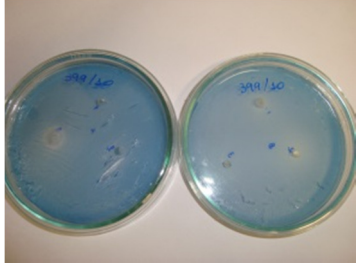
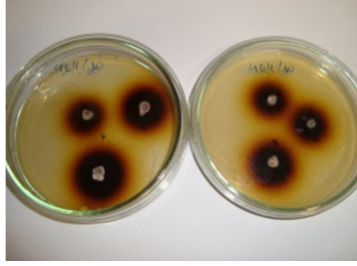
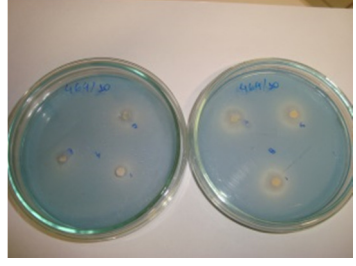

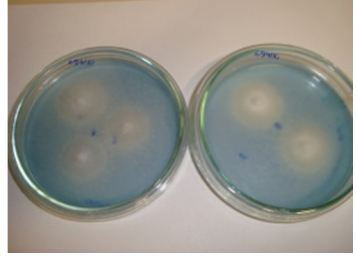

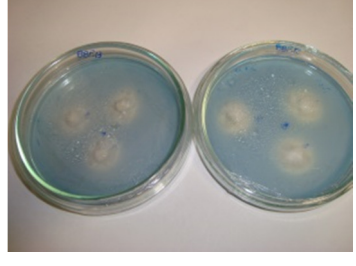


Linhas	Placas contendo meio com ácido gálico	Placas contendo meio com <i>Reactive Blue 220</i>
<i>Trametes hirsuta</i> 358/10		
<i>Trametes pavonia</i> 399/10		
<i>Trametes pavonia</i> 464/10		
<i>Earliella scabrosa</i> 694/10		
<i>Pleurotus albidus</i> 88F.13		
<i>Pleurotus pulmonarius</i> PS-2001		

Figura 11. Crescimento micelial e halo de oxidação do ácido gálico e de descoloração do corante *Reactive Blue 220* após quatro dias de incubação ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) de algumas das linhagens selecionadas pela produção de fenol-oxidases.

4.2. Análises das linhagens selecionadas em cultivos submerso e em estado sólido

A composição do meio e as condições de cultura, como visto anteriormente, desempenham um papel importante na expressão enzimática, que é fortemente afetada por muitos parâmetros, como tempo e forma de cultivo (submerso ou em estado sólido), concentrações de compostos orgânicos e inorgânicos, pH, temperatura, concentração de indutores (Palmieri *et al.*, 2000) e aeração (Dekker & Barbosa, 2001), entre outros, com tais exigências fisiológicas variando entre os fungos da podridão branca (Viswanath *et al.*, 2014).

4.2.1. Atividade das lacases (Lac)

As diferentes formas de condução da produção e formulação de meios para a produção enzimática apresentaram influência nos títulos de lacases. Verificou-se que a mesma linhagem pode produzir elevadas concentrações enzimáticas em cultivo submerso, mas não produzir em cultivo em estado sólido, caso do macrofungo *E. scabrosa* 694/10 (Figura 12, destacada em azul). Ainda, destaca-se a linhagem *T. hirsuta* 358/10, que apresentou produção tanto em cultivo submerso como em estado sólido (Figura 12, destaque em verde). *T. hirsuta* 358/10 apresentou, no sexto dia de cultivo submerso, um pico com média de $131,13 \pm 32,37$ U/mL de Lac, enquanto a linhagem *E. scabrosa* 694/10, no oitavo e décimo dias de cultivo, apresentou as maiores atividades, chegando a uma média de $815,11 \pm 115,23$ U/mL, demonstrando um alto potencial de produção dessa enzima comparada às demais linhagens testadas e, principalmente, aos valores relatados na literatura (Tabela 5).

Comparando o dado de produção de Lac por *T. hirsuta* 358/10 em cultivo submerso obtido neste trabalho com a literatura (Tabela 5), verifica-se que, entre as diferentes espécies e linhagens de *Trametes*, o obtido neste trabalho é superior aos demais relatados. Isto se deve

ao fato de esta linhagem já ter sido selecionada entre 84 linhagens de fungos políporos, coletadas na Região Sul do Brasil. Já comparando com macrofungos de outros gêneros, verifica-se que *C. unicolor* BCC300 (Kachlishvili *et al.*, 2016) e *Marasmiellus palmivorus* VE-111 (Cantele *et al.*, 2017) apresentaram atividades superiores.

No cultivo em estado sólido, o pico de atividade correspondeu a $631,57 \pm 42,99$ U/g, no oitavo dia de cultivo (Figura 12 B). Comparando os dados de produção da literatura (Tabela 6), novamente *T. hirsuta* 358/10 destaca-se pelo elevado título enzimático para lacases, tanto quando comparado a outras espécies de *Trametes*, como com macrofungos de outros gêneros. Já os valores obtidos por *E. scabrosa* 694/10 foram inferiores ao verificado na literatura, na qual o único trabalho obtido, o de Guerra *et al.* (2008), verificou-se produção de 44,3 U/g de lacases em bagaço de cana-de-açúcar.

Ainda na Figura 12, destaca-se o potencial das linhagens utilizadas como controle (*P. albidus* 88F.13 e *P. pulmonarius* PS-2001) de produzirem lacases nas duas formas de condução de cultivo.

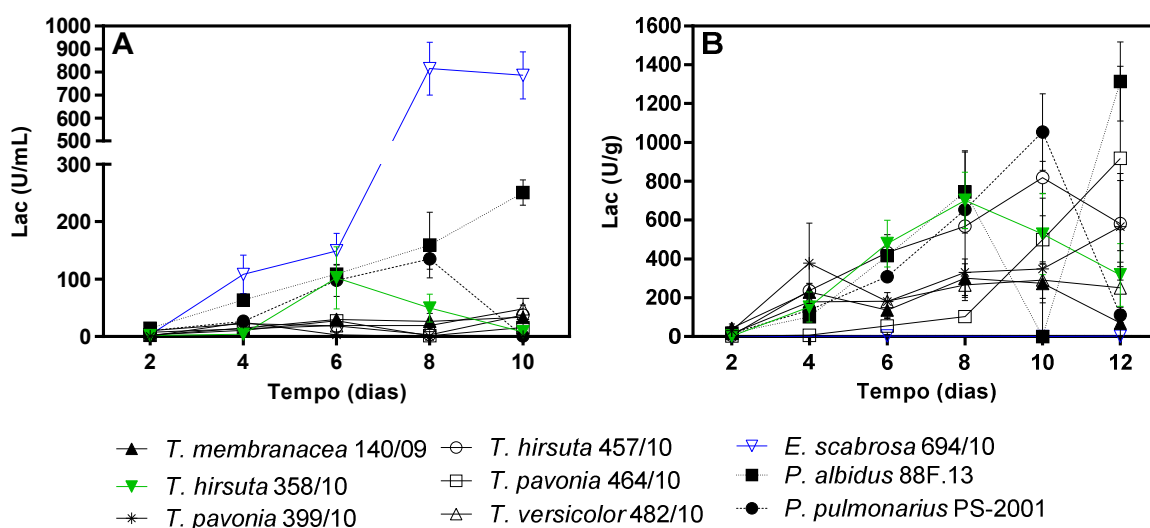


Figura 12. Variação das atividades de lacases das linhagens de macrofungos crescidas em cultivos submerso (A) e em estado sólido (B). Cultivos realizados em quintuplicatas e quadruplicatas, respectivamente.

4.2.2. Atividade das peroxidases (Per)

Com relação às peroxidases, novamente *E. scabrosa* 694/10 apresentou as maiores atividades, atingindo $1175,68 \pm 201,93$ U/mL no oitavo dia do cultivo submerso (Figura 13 A, destaque em azul), mas tal como verificado para lacases, não apresentou produção no cultivo em estado sólido (Figura 13 B), podendo ser devido à serragem de *Pinus* spp., que se apresenta prejudicial para algumas espécies. A linhagem *T. membranacea* 140/09 também se destacou no cultivo submerso ao superar, no sexto dia, os controles, com atividade de $20,34 \pm 2,88$ U/mL (Figura 13 A, destaque em rosa). Já no cultivo em estado sólido, quem se destacou foi *T. hirsuta* 358/10, com picos que superaram os controles no sexto e décimo dias, sendo no sexto a maior atividade ($303,41 \pm 101,46$ U/g) (Figura 13 B, destaque em verde).

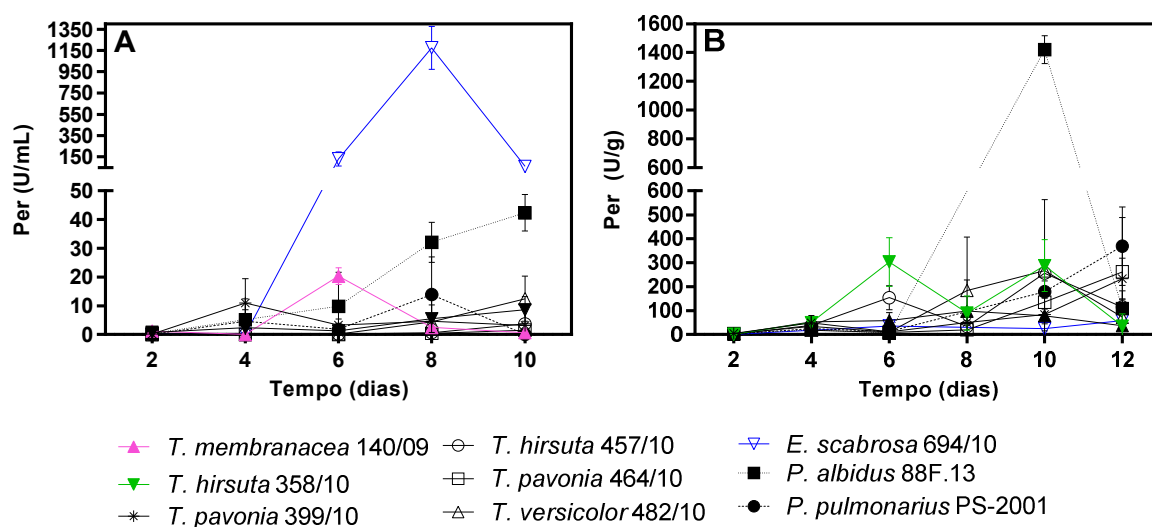


Figura 13. Variação das atividades de peroxidases das linhagens de macrofungos crescidas em cultivos submerso (A) e em estado sólido (B). Cultivos realizados em quintuplicatas e quadruplicatas, respectivamente.

4.2.3. Atividade das manganês peroxidases (MnP)

No cultivo submerso (Figura 14 A), as linhagens *T. hirsuta* 358/10 (destaque em verde) e *E. scabrosa* 694/10 (destaque em azul) apresentaram atividades superiores às linhagens controle (*P. albidus* 88F.13 e *P. pulmonarius* PS-2001) no oitavo dia, atingindo títulos enzimáticos de $8,72 \pm 2,29$ e $12,29 \pm 1,11$ U/mL, respectivamente. Todavia, cabe ressaltar que, já no segundo dia de cultivo, *T. hirsuta* 358/10 havia apresentado atividade de $6,48 \pm 1,65$ U/mL e *E. scabrosa* 694/10 apresentou maior título enzimático no décimo dia ($17,35 \pm 1,76$ U/mL). Verifica-se, ao comparar os valores a outros trabalhos (Tabela 5), que as atividades da MnP aqui obtidas são promissoras.

No cultivo em estado sólido (Figura 14 B), além da linhagem *T. hirsuta* 358/10, as linhagens *T. membranacea* 140/09 (destaque rosa) e *T. hirsuta* 457/10 (destaque vermelho) também se destacaram na produção de MnP até o oitavo dia de cultivo, apresentando atividades superiores às obtidas pelas duas linhagens utilizadas como controle positivo (*P. albidus* 88F.13 e *P. pulmonarius* PS-2001). Mais tardiamente, a linhagem *T. pavonia* 399/10 também destacou-se em relação às linhagens controle e às demais linhagens avaliadas. Os dados de produção obtidos pela diferentes linhagens de políporos avaliadas neste trabalho estão entre as maiores citadas na literatura (Tabela 6), sendo superiores tanto a de outros macrofungos do gênero *Trametes*, como de outros gêneros. Este último fato também ficou evidente na Figura 14 (B), onde a maior parte das linhagens avaliadas apresentaram atividades superiores às linhagens controle.

Ainda, os dados obtidos para MnP no cultivo em estado sólido indicam que esta forma de condução é a mais promissora, sendo também semelhante ao desenvolvimento destes fungos na natureza.

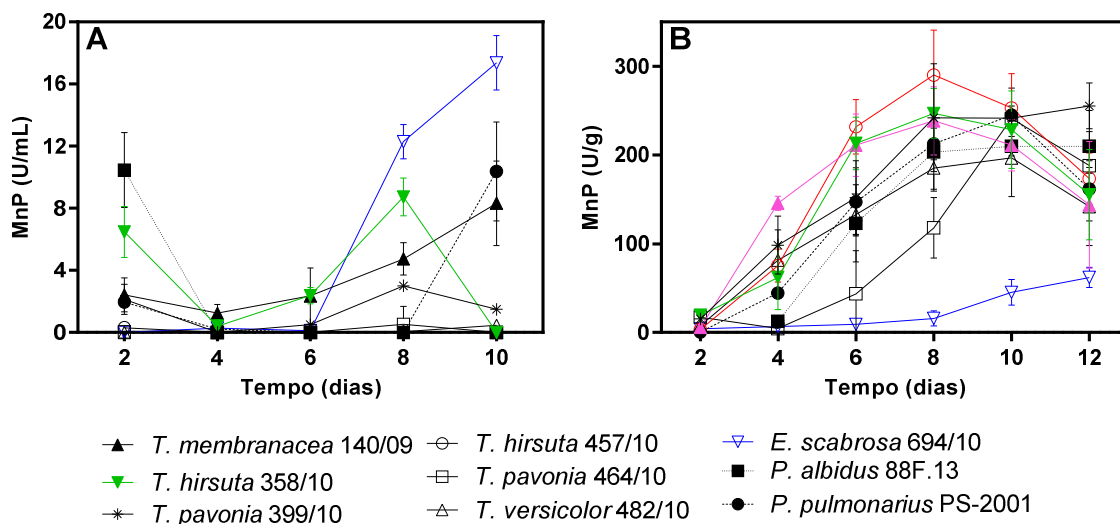


Figura 14. Variação das atividades de manganês peroxidases das linhagens de macrofungos crescidas em cultivos submerso (A) e em estado sólido (B). Cultivos realizados em quintuplicatas e quadruplicatas, respectivamente.

4.2.4. Atividade das lignina peroxidases (LiP)

Nenhuma das linhagens testadas no cultivo submerso (Figura 15 A) superaram as atividades de lignina peroxidases das linhagens controle, apresentando, também, os menores valores em comparação com a literatura (Tabela 5). No cultivo em estado sólido (Figura 15 B), o destaque se deu para a linhagem *T. pavonia* 464/10 que atingiu um pico no sexto dia de $2,53 \pm 0,01$ U/g, inferior ao encontrado em alguns trabalhos (Tabela 6). Muitos fungos da podridão branca, aparentemente, não apresentam lignina peroxidases (Hammel & Cullen, 2008) e as linhagens testadas apresentaram uma atividade muito baixa dessa enzima nos dois sistemas de cultivo utilizados.

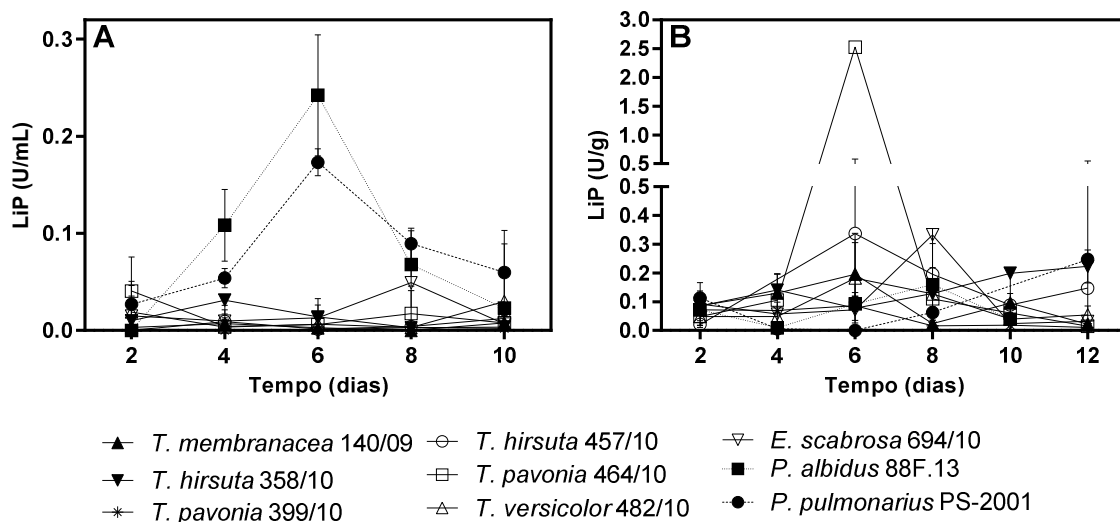


Figura 15. Variação das atividades de lignina peroxidases das linhagens de macrofungos crescidas em cultivos submerso (A) e em estado sólido (B). Cultivos realizados em quintuplicatas e quadruplicatas, respectivamente.

4.2.5. Atividade das oxidases do álcool veratrílico (OAV)

A formação de aldeído veratrílico pela atividade das OAV, em ambos os sistemas (Figura 16), foi bastante baixa e, por isso, pequenas variações na dosagem analítica representam um considerável desvio padrão nos gráficos. Estas enzimas estavam ausentes em culturas de várias espécies de *Pleurotus* (Camarero *et al.*, 1996) e de *Phlebia radiata* (Vares *et al.*, 1995) e devido às baixas atividades verificadas neste trabalho pelas linhagens avaliadas, sugere-se, também, que estas não são produtoras de oxidases do álcool veratrílico.

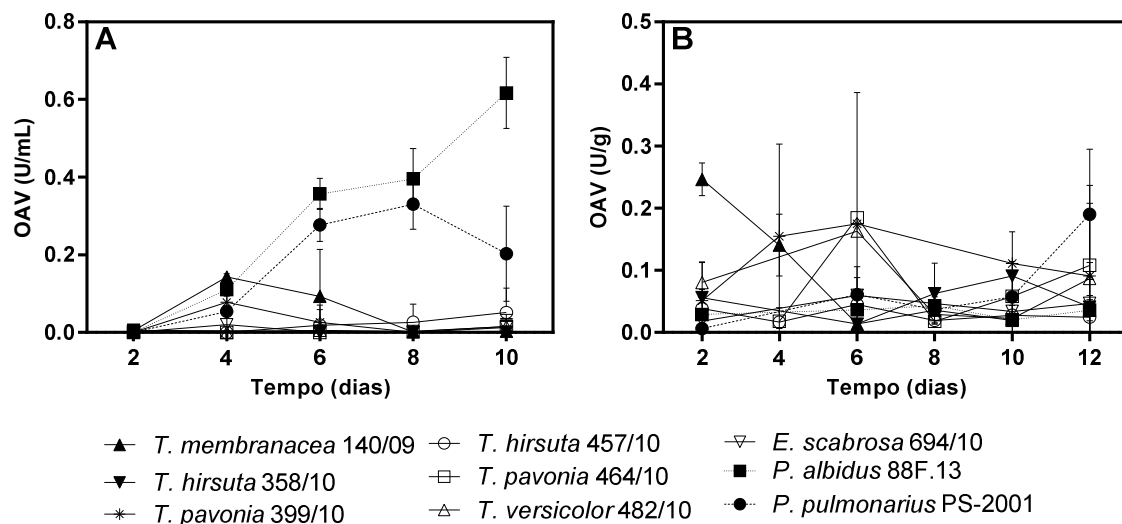


Figura 16. Variação das atividades de oxidases do álcool veratrílico das linhagens de macrofungos crescidas em cultivos submerso (A) e em estado sólido (B). Cultivos realizados em quintuplicatas e quadruplicatas, respectivamente.

Tabela 5. Comparação das atividades de fenol-oxidases produzidas por diferentes basidiomicetos em cultivo submerso.

Basidiomicetos	Atividades enzimáticas (U/mL)			Substrato	Referências
	Lacases*	Manganês peroxidases	Lignina peroxidases**		
<i>Trametes hirsuta</i>	131,13	8,72□	0,03	Glicose e batata	Presente trabalho
358/10	6 dias	8 dias	4 dias		
<i>Trametes pubescens</i>	0,18	-	-	Casca de café	Gonzalez <i>et al.</i> (2013)
CBS 696.94	22 dias				
<i>Trametes pubescens</i>	0,25	-	-	Casca de mandarin	Osma <i>et al.</i> (2007)
	2 dias				
<i>Trametes pubescens</i>	0,63	0,81□	-	Folhas de árvore	Elisashvili <i>et al.</i> (2008)
IBB 663	7 dias	7 dias			
<i>T. pubescens</i> IBB	1,08	traços□	-	Casca de mandarin	Elisashvili <i>et al.</i> (2008)
663	7 dias	7 dias			
<i>T. pubescens</i> IBB	0,83	0,96□	-	Casca de maçã	Elisashvili <i>et al.</i> (2008)
663	7 dias	7 dias			
<i>T. pubescens</i> IBB	1,68	0,17□	-	Casca de banana	Elisashvili <i>et al.</i> (2008)
663	7 dias	7 dias			
<i>Trametes versicolor</i>	0,77	0,20□	-	Folhas de árvore	Elisashvili <i>et al.</i> (2008)
IBB 897	7 dias	7 dias			

<i>T. versicolor</i> IBB 897	3,01 7 dias	0,13□ 7 dias	-	Cascas de mandarim	Elisashvili <i>et al.</i> (2008)
<i>T. versicolor</i> IBB 897	0,54 7 dias	0,81□ 7 dias	-	Cascas de maçã	Elisashvili <i>et al.</i> (2008)
<i>T. versicolor</i> IBB 897	1,29 7 dias	0,11□ 7 dias	-	Cascas de banana	Elisashvili <i>et al.</i> (2008)
<i>Trametes versicolor</i> CBS 100.29	3,20 35 dias	-	-	Farelo de cevada	Moldes <i>et al.</i> (2004)
<i>Trametes versicolor</i>	0,59 4 dias	-	-	Ácido vanílico	Wang <i>et al.</i> (2016)
<i>Trametes pubescens</i> MB89	2,14 10 dias	-	-	Farelo de trigo	Osma <i>et al.</i> (2011)
<i>Trametes versicolor</i> K120a2	2,64 13 dias	-	-	Farelo de trigo	Osma <i>et al.</i> (2011)
<i>Cerrena unicolor</i> T71	1,40 13 dias	-	-	Farelo de trigo	Osma <i>et al.</i> (2011)
<i>Pleurotus ostreatus</i> DSM 11191	2,78 12 dias	-	-	Farelo de trigo	Osma <i>et al.</i> (2011)
<i>Psathyrella</i> <i>candolleana</i> HLS-2	23,00 6 dias	-	-	Farelo de trigo + Cu	Fu <i>et al.</i> (2013a)
<i>Pycnoporus</i> <i>cinnabarinus</i> PB	1,20 7 dias	-	-	2,5-xilidina	Eggert <i>et al.</i> (1996)
<i>C. unicolor</i> BCC 300	206,30 14 dias	2,29■ 14 dias	-	Trinitrotolueno e cascas de mandarim	Kachlishvili <i>et al.</i> (2016)
<i>C. unicolor</i> BCC 302	121,80 14 dias	1,95■ 14 dias	-	Trinitrotolueno e cascas de mandarim	Kachlishvili <i>et al.</i> (2016)
<i>Fomes fomentarius</i> BCC 38	19,20 14 dias	1,24■ 14 dias	-	Trinitrotolueno e cascas de mandarim	Kachlishvili <i>et al.</i> (2016)
<i>Funalia trogii</i> BCC 146	30,40 14 dias	0,15■ 14 dias	-	Trinitrotolueno e cascas de mandarim	Kachlishvili <i>et al.</i> (2016)
<i>Pycnoporus</i> <i>coccineus</i> BCC 310	3,60 14 dias	0■ 14 dias	-	Trinitrotolueno e cascas de mandarim	Kachlishvili <i>et al.</i> (2016)
<i>T. versicolor</i> BCC 775	17,80 14 dias	0,45■ 14 dias	-	Trinitrotolueno e cascas de mandarim	Kachlishvili <i>et al.</i> (2016)

<i>Lentinus squarrosulus</i> MBFBL 201	0,15	0,01□	-	Talos de milho	Isikhuemhen <i>et al.</i> (2012)
<i>Marasmiellus palmivorus</i> VE-111	1.950,60	13,10□	-	Glicose e caldo de batata dextrose	Cantele <i>et al.</i> (2017)
<i>Panus tigrinus</i> CBS 577.79	4,60	0,41○	-	Resíduos de moinho de azeite	Fenice <i>et al.</i> (2003)
<i>Auricularia auricula-judae</i> IFO 5949	4,99	4,52●	0,06	Caldo de batata dextrose	Morisaki <i>et al.</i> (2001)
<i>Clitocybe nebularis</i> IFO 9350	8,77	2,37●	1,27	Caldo de batata dextrose	Morisaki <i>et al.</i> (2001)
<i>Flammulina velutipes</i> IFO 30224	0,20	0,06●	0,13	Caldo de batata dextrose	Morisaki <i>et al.</i> (2001)
<i>Grifola frondosa</i> IFO 30522	0	0,03●	0	Caldo de batata dextrose	Morisaki <i>et al.</i> (2001)
<i>Lentinus edodes</i> IFO 30719	10,00	3,02●	0	Caldo de batata dextrose	Morisaki <i>et al.</i> (2001)
<i>Pholiota aurivella</i> IFO 30265	7,94	5,65●	0,77	Caldo de batata dextrose	Morisaki <i>et al.</i> (2001)
<i>Pseudohiatula oshimae</i> IFO 30370	8,96	2,95●	0	Caldo de batata dextrose	Morisaki <i>et al.</i> (2001)
<i>Pleurotus ostreatus</i> IFO 30776	0,60	0,80●	1,16	Caldo de batata dextrose	Morisaki <i>et al.</i> (2001)

* Substrato utilizado – ABTS

** Substrato utilizado – álcool veratrílico

□ Substrato utilizado – vermelho de fenol

■ Substrato utilizado – Mn²⁺

○ Substrato utilizado – MnSO₄

● Substrato utilizado – 2,6-dimetoxifenol

Tabela 6. Comparação das atividades de fenol-oxidases produzidas por diferentes basidiomicetos em cultivos em estado sólido.

Atividades enzimáticas (U/g)					
Basidiomicetos	Lacases*	Manganês peroxidases	Lignina peroxidases**	Substrato	Referências
<i>Trametes hirsuta</i> 358/10	631,57 8 dias	246,97□ 8 dias	0,22 12 dias	Serragem de pinus	Presente trabalho
<i>Trametes pubescens</i> IBB 663	10,25 10 dias	23,20□ 10 dias	-	Folhas de árvore	Elisashvili <i>et al.</i> (2008)
<i>T. pubescens</i> IBB 663	8,10 10 dias	7,45□ 10 dias	-	Cascas de mandarin	Elisashvili <i>et al.</i> (2008)
<i>T. pubescens</i> IBB 663	14,00 10 dias	11,35□ 10 dias	-	Cascas de maçã	Elisashvili <i>et al.</i> (2008)
<i>T. pubescens</i> IBB 663	9,40 10 dias	34,50□ 10 dias	-	Cascas de banana	Elisashvili <i>et al.</i> (2008)
<i>T. versicolor</i> IBB 897	33,10 10 dias	8,00□ 10 dias	-	Folhas de árvores	Elisashvili <i>et al.</i> (2008)
<i>T. versicolor</i> IBB 897	6,85 10 dias	8,95□ 10 dias	-	Cascas de mandarin	Elisashvili <i>et al.</i> (2008)
<i>T. versicolor</i> IBB 897	9,40 10 dias	34,50□ 10 dias	-	Cascas de maçã	Elisashvili <i>et al.</i> (2008)
<i>T. versicolor</i> IBB 897	10,10 10 dias	6,00□ 10 dias	-	Cascas de banana	Elisashvili <i>et al.</i> (2008)
<i>Panus tigrinus</i> CBS 577.79	1,31 9 dias	0,29○ 13 dias	-	Resíduos de moinho de azeite	Fenice <i>et al.</i> (2003)
<i>Grifola frondosa</i> PSUMCC 922	14,42 30 dias	7,37□ 60 dias	-	Serragem de carvalho	Montoya <i>et al.</i> (2012)
<i>G. frondosa</i> PSUMCC 922	14,83 30 dias	6,74□ 30 dias	-	Serragem de carvalho/borra de café	Montoya <i>et al.</i> (2012)
<i>Pleurotus ostreatus</i> UCC001	90,42 28 dias	9,57□ 28 dias	-	Serragem de carvalho/casca de côco/óleo de soja	Montoya <i>et al.</i> (2015)
<i>Coriolus versicolor</i> PSUWC430	106,76 28 dias	7,36□ 28 dias	-	Serragem de carvalho/casca de côco/óleo de soja	Montoya <i>et al.</i> (2015)

<i>Lentinula edodes</i> CICL54	47,25 18 dias	6,92□ 25 dias	-	Serragem de carvalho/casca de côco/óleo de soja	Montoya <i>et al.</i> (2015)
<i>Phanerochaete</i> <i>chrysosporium</i> ME- 446 (ATTC 34541)	-	2,60■ 4 dias	1,38 5 dias	Palha de trigo explodida à vapor	Fujan <i>et al.</i> (2001)
<i>Earliella scabrosa</i>	44,30 11 dias	3,69○ 11 dias	-	Bagaço de cana-de- açúcar	Guerra <i>et al.</i> (2008)
<i>Trametes máxima</i>	0,31 4 dias	2,17○ 14 dias	-	Bagaço de cana-de- açúcar	Guerra <i>et al.</i> (2008)
<i>Ganoderma zonatum</i> B18	4,70 9 dias	5,40○ 9 dias	-	Bagaço de cana-de- açúcar	Guerra <i>et al.</i> (2008)
<i>Fomes sclerdermeus</i>	270,00 28 dias	6,30□ 14 dias	0	Farelo de trigo	Papinutti <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete</i> <i>chrysosporium</i>	-	-	13,70 5 dias	Espigas de milho	Asgher <i>et al.</i> (2006)
<i>P. ostreatus</i> MCC16	6,71 17 dias	2,54● 17 dias	0,23 17 dias	Cascas de batata pré- tratada com água destilada	Ergun & Urek (2017)
<i>Pleurotus eryngii</i> MCC58	2,25 10 dias	2,20● 15 dias	-	Resíduos de uva + Mn ²⁺	Akpinar & Urek (2012)

* Substrato utilizado – ABTS

** Substrato utilizado – álcool veratrílico

□ Substrato utilizado – vermelho de fenol

■ Substrato utilizado – Mn²⁺

○ Substrato utilizado – MnSO₄

● Substrato utilizado – 2,6-dimetoxifenol

4.2.6. Concentração das proteínas solúveis totais (PST)

As proteínas solúveis totais (PST) apresentaram maior concentração logo no segundo dia do cultivo submerso, no qual se destacaram as linhagens *T. hirsuta* 358/10 (0,07 mg/mL) e

T. hirsuta 457/10 (0,08 mg/mL), com posterior queda, porém, sem se sobressair com relação aos controles (Figura 17 A). O aumento logo no início pode estar relacionado à solubilização de fontes de proteínas presentes nos meios de cultivo, e a posterior diminuição associada à fixação no micélio. No cultivo em estado sólido (Figura 17 B), a liberação das PST foi maior para todas as linhagens quando comparadas ao cultivo submerso e a linhagem *T. hirsuta* 457/10 foi a que apresentou maior concentração (0,32 mg/g), embora sem destaque com relação às demais. Tanto para o cultivo submerso como para o cultivo em estado sólido, as concentrações de PST não apresentaram relação direta com as atividades enzimáticas.

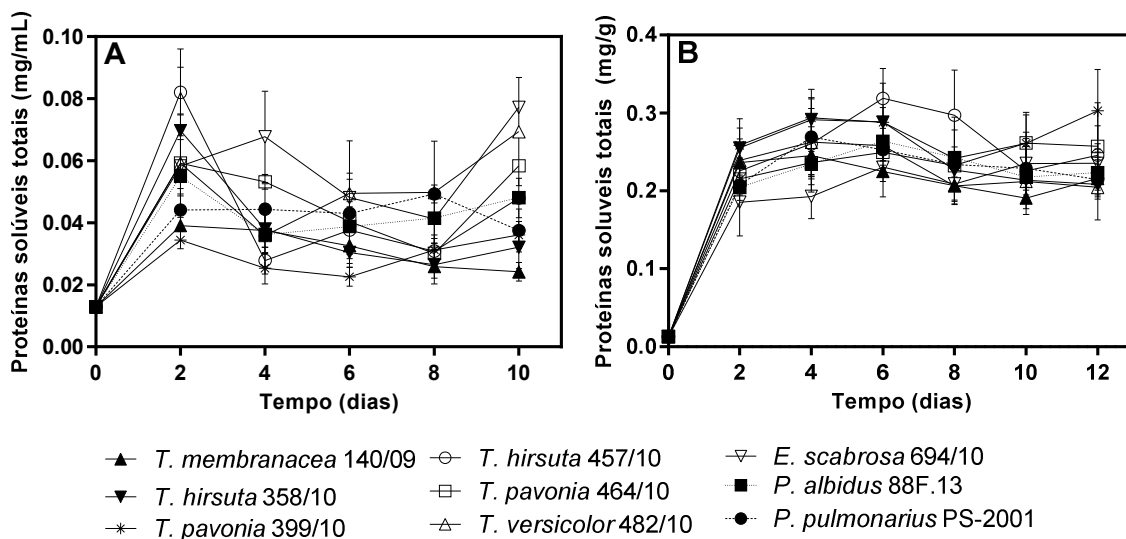


Figura 17. Variação da concentração de proteínas solúveis totais das linhagens de macrofungos crescidas em cultivos submerso (A) e em estado sólido (B). Cultivos realizados em quintuplicatas e quadruplicatas, respectivamente.

4.2.7. Potencial hidrogeniônico (pH)

Em ambos os sistemas de cultivo, o potencial hidrogeniônico (pH) de todas as linhagens avaliadas apresentou, de maneira geral e com exceção do controle *P. albidus*

88F.13 no cultivo submerso, queda no transcorrer dos dias, sendo mais considerável a partir do oitavo dia para algumas linhagens (Figura 18), o que pode ser justificado pelo crescimento fúngico (Figura 19) com conseqüente aumento do metabolismo e liberação de H^+ , demonstrando uma relação entre o crescimento e o pH ácido já detectado em outros estudos (Patrick *et al.*, 2011). Segundo Tavares *et al.* (2005), a queda do pH pode estar relacionada à síntese de ácidos orgânicos, associada com o metabolismo primário dos fungos quando a glicose é consumida. Devido a essa acidificação do meio promovida pelo próprio fungo, as enzimas fúngicas têm melhor atividade, geralmente, em pH variando entre 3,0 e 5,2 (Giardina *et al.*, 2010; Strong & Claus, 2011) estando relacionadas com as funções fisiológicas e nicho ecológico das diferentes espécies (Baldrian, 2006; Madhavi & Lele, 2009).

No cultivo em estado sólido, porém, os valores menos ácidos, quando comparados ao cultivo submerso, podem ser explicados pela dificuldade de dispersão das substâncias acidificantes, que acabam ficando concentradas no entorno do micélio fúngico e logo atinge o pH de atividade enzimática ideal, refletindo em uma queda de pH geral menos expressiva.

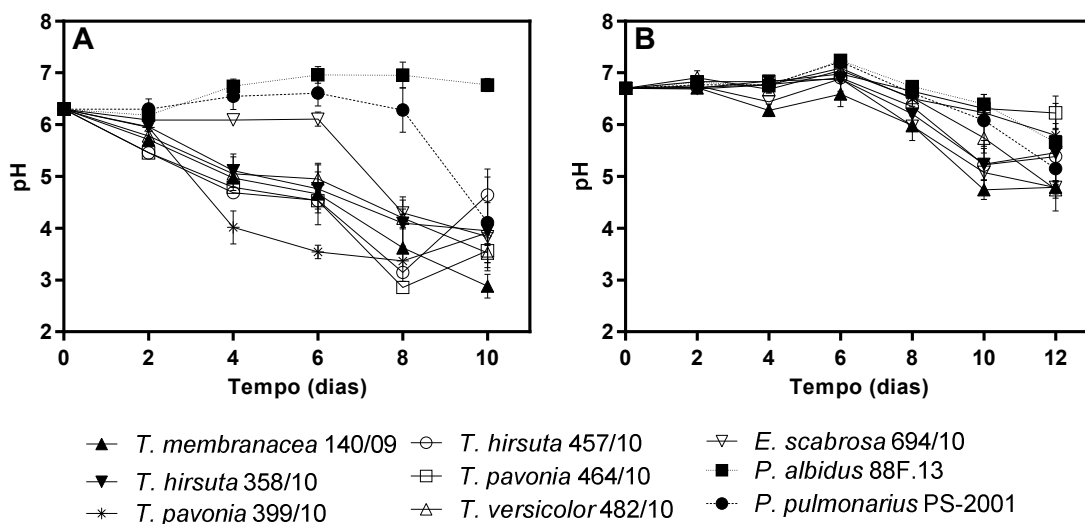


Figura 18. Variação do potencial hidrogeniônico das linhagens de macrofungos crescidas em cultivos submerso (A) e em estado sólido (B). Cultivos realizados em quintuplicatas e quadruplicatas, respectivamente.

4.2.8. Crescimento micelial

O crescimento micelial e sua correlação com o pH foram avaliados com o intuito de estabelecer uma conexão com a produção de lacases por *T. hirsuta* 358/10.

No cultivo submerso, *T. hirsuta* 358/10 (destaque em verde na Figura 19) apresentou um crescimento micelial semelhante ao controle *P. albidus* 88F.13, com uma média de crescimento a cada dois dias de 1,8 g/L, sempre inferior ao controle *P. pulmonarius* PS-2001. Esse crescimento micelial foi acompanhado pela queda do pH (Figura 18 A), demonstrando a relação entre o crescimento e o pH ácido relatado anteriormente; não apresentando, porém, correlação com a atividade das lacases produzidas nesse meio por *T. hirsuta* 358/10, já que estas apresentaram um pico de atividade no sexto dia (pH 4,76) com posterior decréscimo, enquanto a biomassa continuou a aumentar.

Já no cultivo em estado sólido, o pico de produção das lacases por *T. hirsuta* 358/10 no oitavo dia ocorreu em pH 6,21, sendo a posterior acidificação do meio (Figura 18 B) não correspondente ao aumento da atividade e, embora inúmeras técnicas espectrofotométricas e cromatográficas tenham sido avaliadas para determinar o crescimento por meio da dosagem de N-acetilglicosamina e ergosterol nesse meio, em nenhuma houve coerência nos dados, sempre sendo detectada maior concentração do analito no início do cultivo do que no tempo em que o crescimento fúngico era visivelmente maior.

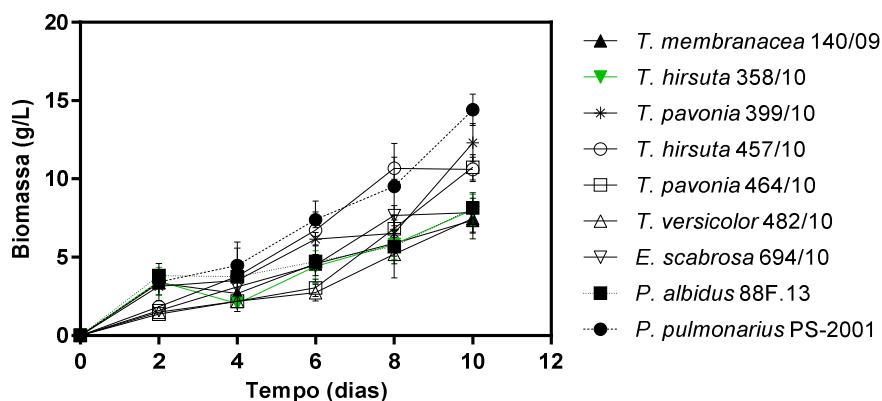


Figura 19. Crescimento micelial das linhagens de macrofungos crescidas em cultivo submerso realizado em quintuplicatas.

4.3. Caracterização específica de *Trametes hirsuta* 358/10

A escolha do fungo utilizado na caracterização das lacases, bem como para os testes de degradação dos corantes, foi realizada considerando-se a produção de enzimas nos dois sistemas de produção, bem como o potencial de produção de outras enzimas em associação com as lacases, sendo a linhagem *T. hirsuta* 358/10 escolhida para prosseguir com o trabalho. A linhagem *E. scabrosa* 694/10 apresentou uma alta atividade, principalmente na produção de Lac, Per e MnP em cultivo líquido, porém, mostrando-se bastante instável em cultivos posteriores.

Assim sendo, as lacases de *T. hirsuta* 358/10 presentes nos caldos enzimáticos do sexto dia do cultivo submerso e do oitavo dia do cultivo em estado sólido foram avaliadas com relação aos parâmetros a seguir, para posterior análise da degradação de corantes.

4.3.1. Atividades específicas das lacases, peroxidases e manganês peroxidases

Para as lacases oriundas do cultivo submerso, o pico de atividade foi observado no sexto dia, enquanto para as do cultivo em estado sólido, o pico de atividade foi no oitavo dia, sendo que, nestes mesmos dias, também foram verificadas as maiores atividades específicas para lacases (Figura 20 A e B).

Com relação às peroxidases, a maior média de atividade ocorreu no décimo dia do cultivo submerso, sendo que as maiores atividades específicas ocorreram nas duas últimas coletas realizadas (Figura 20 A). No cultivo em estado sólido, a maior média de atividade específica foi observada no décimo dia de processo em decorrência da redução da concentração de proteínas verificadas (Figura 20 B). Já manganês peroxidase apresentou, no cultivo submerso, dois picos de atividade enzimática, no segundo e no oitavo dias de cultivo; todavia, a maior atividade específica foi verificada no oitavo dia de processo (Figura 20 A). Já no cultivo em estado sólido, as maiores atividades específicas foram verificadas nos dias em que houve maior atividade de manganês peroxidase, no oitavo e décimo dias (Figura 20 B).

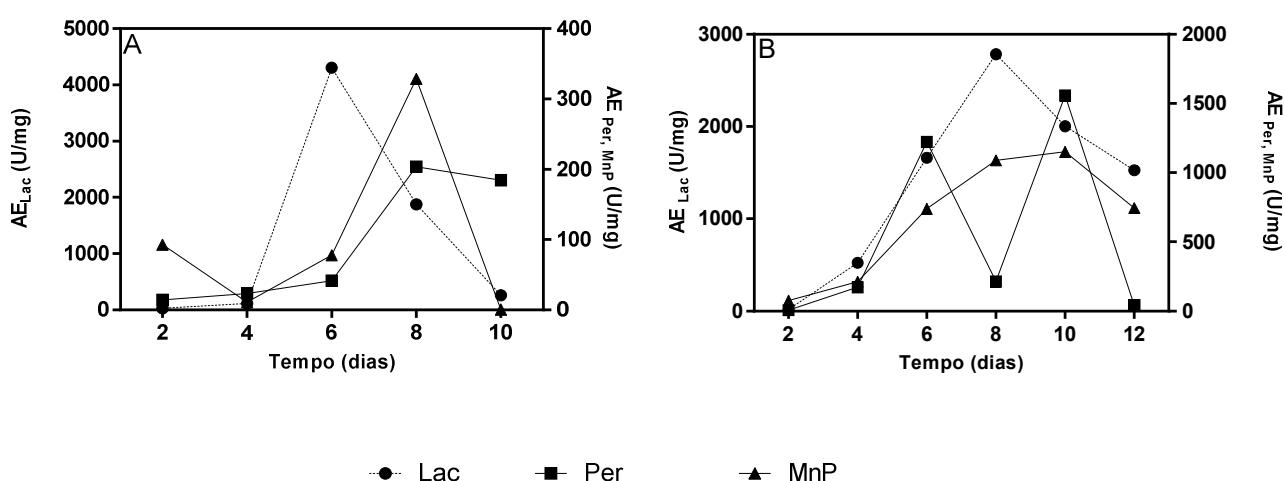


Figura 20. Variação das atividades específicas de lacases (Lac), peroxidases (Per) e manganês peroxidases (MnP) produzidas por *Trametes hirsuta* 358/10, em cultivos submerso (A) e em estado sólido (B).

4.3.2. Caracterização das lacases

A maior atividade das lacases produzidas por *T. hirsuta* 358/10, tanto no cultivo submerso como em estado sólido, foi verificada em tampão citrato pH 3,5 (Figura 21 A e B), embora, para o cultivo em estado sólido, também tenham sido verificados outros picos de atividade em pHs 3, 4 e 5, indicando a presença de mais de uma isoforma e/ou isoenzima. Tanto as enzimas derivadas do cultivo submerso como as do cultivo em estado sólido apresentaram redução de atividade em valores de pH acima de 5,0, em todos os tampões, sendo praticamente inativadas em pH acima de 6. Tal queda de atividade foi igualmente relatada para o *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 no trabalho de Bettin *et al.* (2011), no qual o valor de pH 3,2 do tampão foi o ideal. Outros autores verificaram a presença de lacases produzidas por outros fungos que também apresentaram atividade ótima em pHs ácidos (Tabela 7).

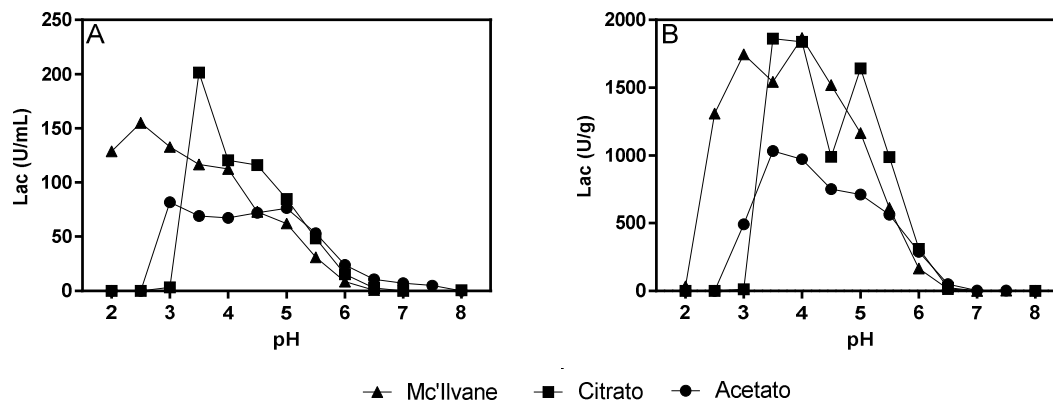


Figura 21. Efeito do pH e de diferentes tampões na atividade das lacases produzidas por *Trametes hirsuta* 358/10 em cultivos submerso (A) e em estado sólido (B).

Uma importante característica das lacases é a dependência do pH, que está relacionada a fatores como a estrutura da enzima, a disponibilidade de O_2 e o tipo de substrato empregado para a análise. Quanto maior a diferença do potencial redox do substrato e o sítio T1 da

lacase, maior a taxa de oxidação do substrato em pH mais elevado, enquanto o ânion de hidróxido, ao se ligar aos sítios T2 / T3, pode levar a uma inibição da atividade da lacase em pH mais alto, sendo a atividade determinada pelo balanço entre os dois (Xu, 1997). O ABTS, por exemplo, é um substrato cujo pH ótimo tende a ser mais ácido, numa faixa entre 3,0 e 5,0 (Heinzkill *et al.*, 1998), coincidindo com o intervalo de maior atividade detectado no presente estudo realizado com este substrato, para os três tampões testados em ambos os meios; sendo também esse o substrato utilizado em todos os trabalhos apresentados na Tabela 7 e cujos pHs ótimos se mantiveram na faixa citada.

Dessa forma, utilizando o tampão citrato em pH 3,5, a temperatura em que as lacases, produzidas em ambas as formas de condução do processo, apresentaram maior atividade foi a 30°C (Figura 22), semelhante à temperatura encontrada para as lacases de *Trichoderma hanzianum* WL1 (Sadhasivam *et al.*, 2008) e mais baixa do que para *Rigidoporus lignosus* (Cambria *et al.*, 2000), enquanto Palmieri *et al.* (1997) detectou temperaturas ótimas que variaram para cada uma das isoenzimas produzidas por *Pleurotus ostreatus*, sendo duas delas com faixas ainda mais elevadas, assemelhando-se às encontradas para os fungos *Trametes pubescens* (Gonzalez *et al.*, 2013) e *P. sajor-caju* PS-2001 (Bettin *et al.*, 2011) (Tabela 7).

De acordo com Baldrian (2006), as lacases apresentam maior atividade em temperaturas que variam entre 50 e 70°C. Entretanto, há lacases, como as produzidas por *Ganoderma lucidum* (Ko *et al.*, 2001), *Phanerochaete flavido-alba* (Perez *et al.*, 1996) e *Pycnoporus cinnabarinus* (Schliephade *et al.*, 2000) que apresentam maiores atividades a 30°C, tais como as lacases produzidas por *T. hirsuta* 358/10 neste trabalho. Como as lacases são enzimas inespecíficas e têm potencial para aplicações na degradação de compostos fenólicos, incluindo pesticidas e corantes, a sua ação em temperatura ambiente é de fundamental relevância.

Tabela 7. pH e temperatura ótimos de atividade das lacases produzidas por diferentes fungos.

Fungos	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Referências
<i>T. hirsuta</i> 358/10	3,5	30	Presente trabalho
<i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001	3,2	50	Bettin <i>et al.</i> (2011)
<i>Rigidoporus lignosus</i>	-	40	Cambria <i>et al.</i> (2000)
<i>Trametes pubescens</i>	2,0-3,0	55	Gonzalez <i>et al.</i> (2013)
<i>Pleurotus ostreatus</i> (isoenzima POXC)	3,0	50-60	Palmieri <i>et al.</i> (1997)
<i>Pleurotus ostreatus</i> (isoenzima POXA1)	3,0	45-65	Palmieri <i>et al.</i> (1997)
<i>Pleurotus ostreatus</i> (isoenzima POXA2)	3,0	25-35	Palmieri <i>et al.</i> (1997)
<i>Trichoderma hanzianum</i> WL1	4,5	35	Sadhasivam <i>et al.</i> (2008)

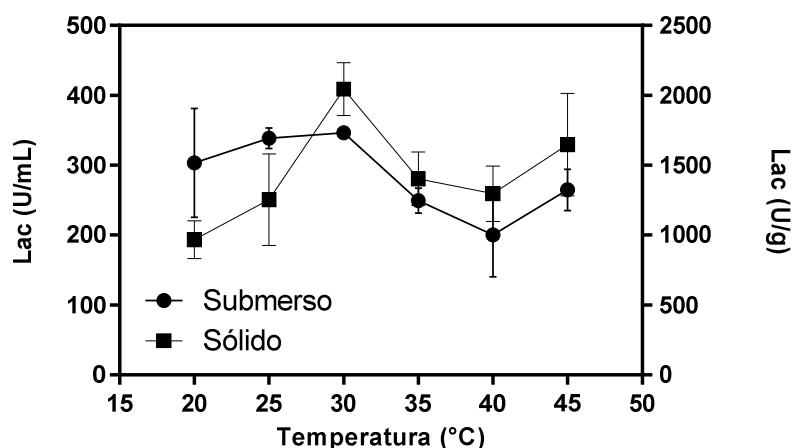


Figura 22. Atividade das lacases de *Trametes hirsuta* 358/10 avaliadas no tampão citrato em pH 3,5, nas diferentes temperaturas (20, 25, 30, 35, 40 e 45°C). No eixo Y esquerdo são apresentados os dados das enzimas produzidas em cultivo submerso e no eixo Y direito no cultivo em estado sólido.

Em baixas temperaturas, as reações são mais lentas devido à baixa energia cinética do sistema e, à medida que a temperatura se eleva, ocorre o aumento na velocidade de reação. Em temperaturas mais elevadas, como efeito adverso, a absorção do excesso de energia pela molécula resulta no rompimento da estrutura terciária da enzima e perda da atividade catalítica (Gomes *et al.*, 2006), além de haver a necessidade de gasto energético para a realização de processos em temperaturas distintas da temperatura ambiente.

As temperaturas em que as lacases de *T. hirsuta* 358/10, produzidas em cultivo submerso, apresentaram maiores estabilidades foram entre 20°C e 30°C (Figura 23 A), nas quais perderam cerca de 40% da atividade em até 72 h. Já as lacases oriundas do cultivo em estado sólido mantiveram as maiores atividades entre 20°C e 40°C (Figura 23 B), com perda de 20 a 30% da atividade no mesmo período. Nas demais temperaturas testadas, pode-se perceber quedas consideráveis na atividade enzimática após 12 h de incubação, sendo que, quanto maior a temperatura, em menor tempo houve perda da atividade enzimática.

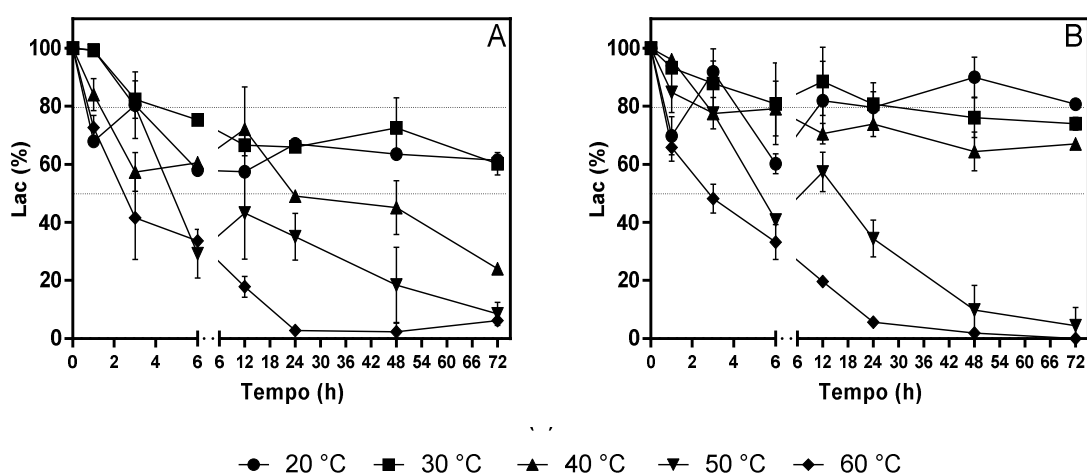


Figura 23. Atividade relativa (%) das lacases produzidas por *Trametes hirsuta* 358/10 em cultivo submerso (A) e em estado sólido (B) após incubação dos caldos enzimáticos em diferentes temperaturas. As análises enzimáticas foram realizadas utilizando o tampão citrato de sódio em pH 3,5.

Em um estudo realizado por Fu *et al.* (2013a), as lacases de *Psathyrella candolleana* exibiram notável estabilidade nas temperaturas de 4°C a 10°C, em pH 8,0, enquanto *P. ostreatus* apresentou termoestabilidade bastante variável para as isoenzimas detectadas, perdendo 50% de suas atividades em 200, 30 e 10 min após incubação a 60°C, investigadas em pH 7,0, na qual todas mostraram estabilidade máxima (Palmiere *et al.*, 1997). Já as lacases de *Trametes versicolor* mantiveram cerca de 70% da atividade a 30°C por doze dias, e o pH 5,0 sendo o mais estável (Rancaño *et al.*, 2003), enquanto que as de *P. cinnabarinus* (Eggert

et al., 1996) apresentaram termoestabilidade abaixo de 50°C em pH 4,0. Para *T. harzianum* WL1, não houve diminuição significativa da atividade enzimática mesmo após 24 h de incubação a 35°C (Sadhasivam *et al.*, 2008). Já para *P. sajor-caju* PS-2001 (Bettin *et al.*, 2011), verificou-se a manutenção de praticamente 100% da atividade enzimática por 96 h em temperaturas de 20 e 30°C, em pH 3,2 (tampão Mc'Ilvaine); porém, em temperaturas maiores, houve perda da atividade enzimática. Assim, verifica-se que os dados de termoestabilidade obtidos para as lacases de *T. hirsuta* 358/10 são comparáveis às enzimas de outras espécies, sendo que até 40°C as enzimas provenientes do cultivo em estado sólido mantiveram maior percentual de atividade. Esta maior termoestabilidade pode ser devida às diferentes isoformas de lacases que foram produzidas por *T. hirsuta* 358/10 nos diferentes sistemas.

Na Figura 24, são apresentados os resultados obtidos com relação aos parâmetros cinéticos da atividade das lacases de *T. hirsuta* 358/10, em relação ao ABTS. Os valores de K_m encontrados para ambas as conduções de cultivo foram iguais, sendo $0,1917 \pm 0,0177$ mM para o cultivo submerso e $0,2232 \pm 0,0269$ mM para o cultivo em estado sólido, o que indica que as lacases produzidas nos diferentes meios não mudam as afinidades ao substrato ABTS, sendo semelhantes, também, ao K_m encontrado para as lacases de *T. harzianum* WL1 (0,18 mM) (Sadhasivam *et al.*, 2008), *Lepista nuda* (0,19 mM) (Zhu *et al.*, 2016) e *R. lignosus* (0,2 mM) (Cambria *et al.*, 2000), em relação ao ABTS. Estes valores, entretanto, são mais baixos, mostrando maior afinidade da enzima com o substrato, em relação ao encontrado para *Trametes* C30 LAC2, como observado no trabalho realizado por Klonowska *et al.* (2002), onde o K_m verificado foi 0,536 mM, e para uma das isoenzimas de *P. ostreatus*, de K_m $0,28 \pm 0,4$ mM (Palmieri *et al.*, 1997); porém, mais altos quando comparados ao observado para *Trametes versicolor*, em que o valor de K_m 0,0373 mM foi encontrado por Höfer e Schlosser (1999) ou comparados ao *Lentinus* sp., com K_m de 0,0084 mM (Hsu *et al.*, 2012).

Apesar de as enzimas produzidas apresentarem afinidade ao substrato iguais para ambos os cultivos, e ter se tentado empregar a mesma atividade de lacase, equivalendo a 5

U/mL, a V_{max} (46,11 mM/min) obtida a partir do cultivo sólido foi inferior à encontrada para o meio de cultivo submerso (118,0 mM/min). A menor V_{max} do meio sólido poderia ser explicada pela existência de um inibidor do tipo não competitivo, visto que praticamente não ocorreu mudança do K_m . Alternativamente, na solução enzimática do cultivo sólido pode-se ter utilizado uma menor concentração de enzimas, visto que as enzimas não foram purificadas e isto pode ter influenciado as velocidades máximas, o que dificulta a comparação, inclusive com outros trabalhos.

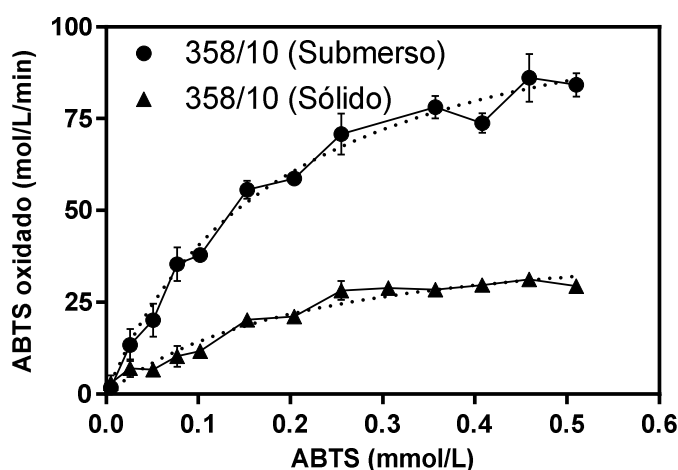


Figura 24. Comportamento da curva para a atividade das lacases de *Trametes hirsuta* 358/10 presentes nos caldos do cultivo submerso e em estado sólido.

Na Figura 25, verifica-se que, no caldo enzimático obtido a partir de cultivo submerso, observa-se uma banda de maior intensidade, de massa molecular relativa de 96 kDa, e outra de 42 kDa. Na amostra proveniente do cultivo em estado sólido, a banda de menor intensidade tem massa molecular relativa de 53 kDa e a de maior intensidade 39 kDa. Estes dados mostram que, embora seja o mesmo fungo e, provavelmente, as mesmas enzimas em ambos os meios, como indicado pelo K_m , a forma de condução e a formulação do meio de cultivo podem ter possibilitado diferentes glicosilações, o que influenciaria nas massas moleculares, explicando, inclusive, as diferenças verificadas nas propriedades catalíticas.

Muitos fungos são capazes de produzir múltiplas isoformas da mesma enzima, dependendo da espécie – ou linhagem – e condições ambientais, como pH, temperatura e suprimento de oxigênio, mas não está claro se essa multiplicidade corresponde a papéis funcionais diferentes (Wood, 1980; Collins & Dobson, 1997). As isoformas, verificadas nas mesmas amostras, podem apresentar diversidade bioquímica, podendo ser devido, neste caso, aos diferentes genes envolvidos; ainda, a regulação da expressão dos genes pode variar entre as espécies (Palmieri *et al.*, 2003). Os dados obtidos para *T. hirsuta* 358/10 indicam que suas isoenzimas interferem nas propriedades dos caldos enzimáticos.

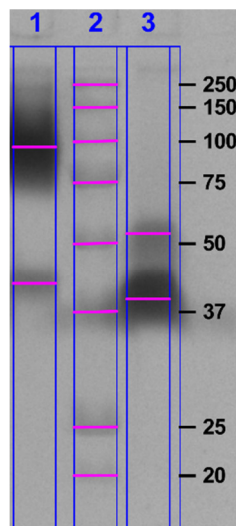


Figura 25. Zimograma de proteínas nativas após a reação com o substrato (ABTS) para a detecção da atividade de lacases dos caldos enzimáticos produzidos por *Trametes hirsuta* 358/10 em cultivo submerso (1) e em estado sólido (3), além do marcador de referência (2) com as respectivas massas moleculares (kDa).

Segundo vários autores, a maioria das lacases apresenta massa molecular entre 50 e 130 kDa (Giardina *et al.*, 2010) – faixa em que se enquadrava a banda mais intensa obtida do cultivo submerso do presente trabalho – sendo mais comum, por serem enzimas glicosiladas que contêm cobre, uma massa molecular entre 60 e 80 kDa (Baldrian, 2006; Kunamneni *et al.*, 2008; Gonzales *et al.*, 2013). Dessa forma, a variação da massa molecular das lacases pode ser atribuída ao seu grau de glicosilação, de acordo com Babu *et al.* (2012).

A variação de uma a quatro bandas, cujas massas moleculares indicam atividade de lacases, representam suas diferentes isoformas, o que já foi observado em diversas espécies e linhagens de fungos (Bettin *et al.*, 2011), sendo condizente com o presente trabalho e com os demais citados a seguir. Schroeder *et al.* (2008) obtiveram duas frações diferentes de lacases de *T. hirsuta* com massas moleculares de 38 e 61 kDa, apresentando certa coincidência com as bandas equivalente a 39 e 53 kDa encontradas no presente trabalho no cultivo em estado sólido. Já Liu *et al.* (2014) verificaram a presença de apenas uma banda de lacase com massa molecular estimada de 62 kDa para *T. hirsuta* SYBC-L5, enquanto a lacase de *Magnaporthe grisea* tem uma massa molecular de 70 kDa (Iyer & Chattoo, 2003). A análise de *T. harzianum* indicou uma única banda correspondente à massa molecular de 79 kDa (Sadhasivam *et al.*, 2008), e *P. sajor-caju* PS-2001 apresentou três isoformas com massas moleculares relativas de 35, 45 e 70 kDa (Bettin *et al.*, 2011). Gonzalez *et al.* (2013) encontraram duas isoformas de lacases com massas moleculares de 60 e 120 kDa produzidas pelo fungo *T. pubescens*; *R. lignosus* produziu uma banda simples com massa molecular de 54 kDa no trabalho realizado por Cambria *et al.* (2000). O fungo *P. ostreatus*, estudado por Palmieri *et al.* (1997), apresentou duas isoformas de lacases, com pesos moleculares de 61 e 67 kDa. No entanto, têm sido encontradas lacases com massas moleculares superiores e inferiores às referidas como, por exemplo, a lacase de *Podospira anserine* (390 kDa), *Botryosphaeria rhodina* (113 kDa) e *Botrytis cinerea* (36 e 38 kDa) (Obara *et al.*, 2005; Gochev & Krastanov, 2007; Giardina *et al.*, 2010).

4.4. Aplicação em tratamento de efluentes

Visando à utilização dos caldos em plantas industriais, mais especificamente em efluentes têxteis, é de extrema importância conhecer-se as normas que regulamentam as

características que os efluentes devem apresentar. No Brasil, tal regulamentação fica a cargo do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA.

A Resolução CONAMA nº430/2011, no que diz respeito às Condições e Padrões de Lançamento de Efluentes de qualquer fonte poluidora em corpos receptores, estabelece que o pH do efluente deve apresentar-se entre 5,0 e 9,0. No cultivo submerso, o pico de atividade das lacases de *T. hirsuta* 358/10 (sexto dia) é atingido com uma média de pH 4,8, enquanto no cultivo em estado sólido este pico ocorre no oitavo dia com uma média de pH 6,2, indicando, no cultivo submerso, um meio um pouco mais ácido do que o permitido, porém, como normalmente o efluente de tingimento têxtil apresenta uma característica mais básica (Braile & Cavalcanti, 1993), tal variação pode facilmente ser corrigida para ficar dentro do parâmetro estabelecido. Além disso, a norma ainda estabelece um limite máximo de temperatura desse efluente de 40°C, sendo que a variação de temperatura do corpo receptor não deverá exceder a 3°C no limite da zona de mistura; dessa forma, a termoestabilidade das lacases avaliadas (entre 20 e 40°C) indica que um tratamento de efluentes têxteis com estas enzimas sob as melhores condições de atividade é possível, sem a necessidade de grandes gastos para o ajuste de temperatura do efluente final.

Assim sendo, os caldos de *T. hirsuta* 358/10, provindos do cultivo submerso e em estado sólido, estão aptos para a utilização nos testes de descoloração dos corantes como possível biotratamento dos mesmos em plantas industriais.

4.5. Testes de descoloração

Tem sido confirmado por vários autores que as lacases estão envolvidas na transformação de corantes industriais (Swamy & Ramsay, 1999; Kirby *et al.*, 2000; Novotný *et al.*, 2000; Conneely *et al.*, 2002). Dessa forma, os caldos de *T. hirsuta* 358/10 do sexto dia

do cultivo submerso e do oitavo dia do cultivo em estado sólido, caracterizados com relação a essa enzima, foram utilizados nos testes de descoloração de 23 corantes, divididos com base na estrutura química do grupo cromóforo, sendo dez azocorantes, oito trifenilmetano e cinco antraquinona.

Nas Figuras 26 e 27, estão os resultados, após 48 h de reação entre os caldos enzimáticos e as soluções contendo corantes, dos ensaios de descoloração. Visualmente, os resultados mais expressivos do cultivo submerso podem ser observados pelas marcações na Figura 26, ao comparar-se o controle com o grupo teste. Porém, a diminuição da absorvância com descoloração acima de 90% foi observada apenas nas reações com os corantes *Acid Blue* 80 (marcação em azul) e *Reactive Blue* 220 (marcação em vermelho).

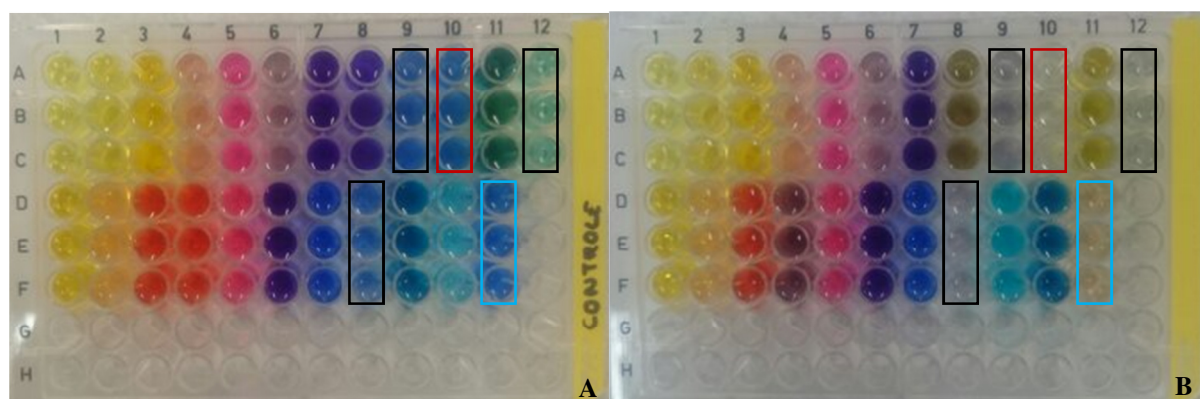


Figura 26. Fotografias do ensaio de descoloração após 48 h de reação, sendo (A) o controle e (B) o teste. O caldo enzimático de *Trametes hirsuta* 358/10 cultivado em meio submerso apresenta concentração de 5 U/mL de lacase e o corante diluição de 50 mg/L.

Já no teste com o caldo do cultivo em estado sólido (Figura 27), tanto visualmente como na análise de absorvância, as descolorações se apresentaram menos expressivas, sendo na reação com o corante *Brilliant Green* a detecção da maior descoloração, apresentando uma queda da absorvância com descoloração acima de 80%, marcado em verde, quando comparado ao controle.

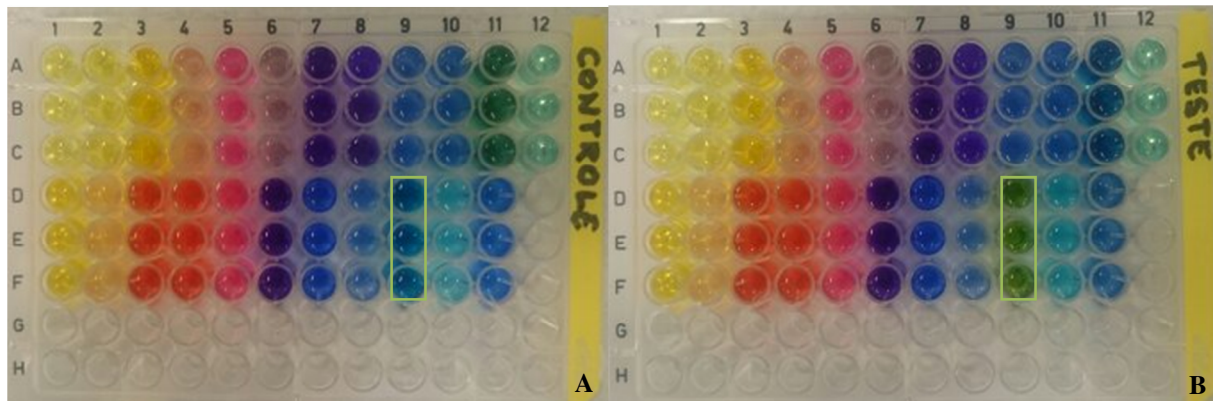


Figura 27. Fotografias do ensaio de descoloração após 48 h de reação, sendo (A) o controle e (B) o teste. O caldo enzimático de *Trametes hirsuta* 358/10 cultivado em estado sólido apresenta concentração de 5 U/mL de lacase e o corante diluição de 50 mg/L.

De maneira geral, levando em conta, principalmente, o tratamento com o caldo do cultivo submerso, os corantes antraquinona foram os que apresentaram maiores descolorações, seguidos por alguns representantes da classe trifenilmetano, enquanto os azocorantes se mostraram mais resistentes, concordando com o explanado anteriormente de que este grupo apresenta os maiores níveis de resistência aos processos de degradação (Gowri *et al.*, 2014).

Na Figura 28, pode ser visualizada a progressão da descoloração dos três corantes que apresentaram os resultados mais promissores, sendo o *Acid Blue 80* e o *Reactive Blue 220* – ambos corantes antraquinona – com o caldo do cultivo submerso e o corante *Brilliant Green* – trifenilmetano – com o caldo do cultivo sólido. Pode-se observar que, além do caldo do cultivo submerso proporcionar uma maior porcentagem de descoloração, sua eficiência também foi maior, ao compará-lo ao caldo do cultivo em estado sólido, já que com 12 h praticamente levou ao auge da descoloração do *Reactive Blue 220* (93%) e o *Acid Blue 80* perdeu mais de 60% de sua cor, enquanto o *Brilliant Green* praticamente não foi descolorido (4,6%) nas 12 h com o caldo do cultivo sólido.

Tal discrepância pode ser devido à diferença do potencial redox das isoenzimas de lacases liberadas nas diferentes formas de condução da produção (Li *et al.*, 1999). De acordo

com Niebisch *et al.* (2010), por exemplo, a descoloração do corante *Reactive Blue 220* por *Lentinus crinitus* é mediada por uma lacase com massa molecular de 41 kDa – inferior ao descrito para outras espécies de *Lentinus* – porém, semelhante à banda presente no caldo enzimático do *T. hirsuta* 358/10 em cultivo submerso (Figura 25). Caldo este que apresentou melhor desempenho na descoloração do corante supracitado quando comparado ao cultivo em estado sólido do mesmo organismo.

Tem sido relatado, ainda, que corantes trifenilmetano necessitam de mais tempo para serem descoloridos (Xu, 1996), relação não observada no presente estudo, ao comparar as diferentes classes tratadas com o mesmo caldo. Além disso, o fato de nenhum corante apresentar 100% de descoloração pode ser devido à inibição enzimática por algum produto gerado no processo de descoloração (Osma *et al.*, 2007) ou ao tempo insuficiente, em alguns casos, já que a maioria dos corantes apresentaram estabilização na descoloração após curto período de reação.

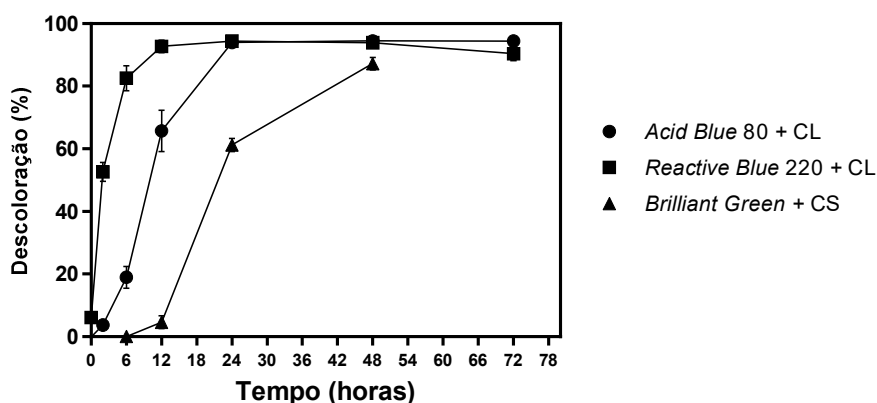
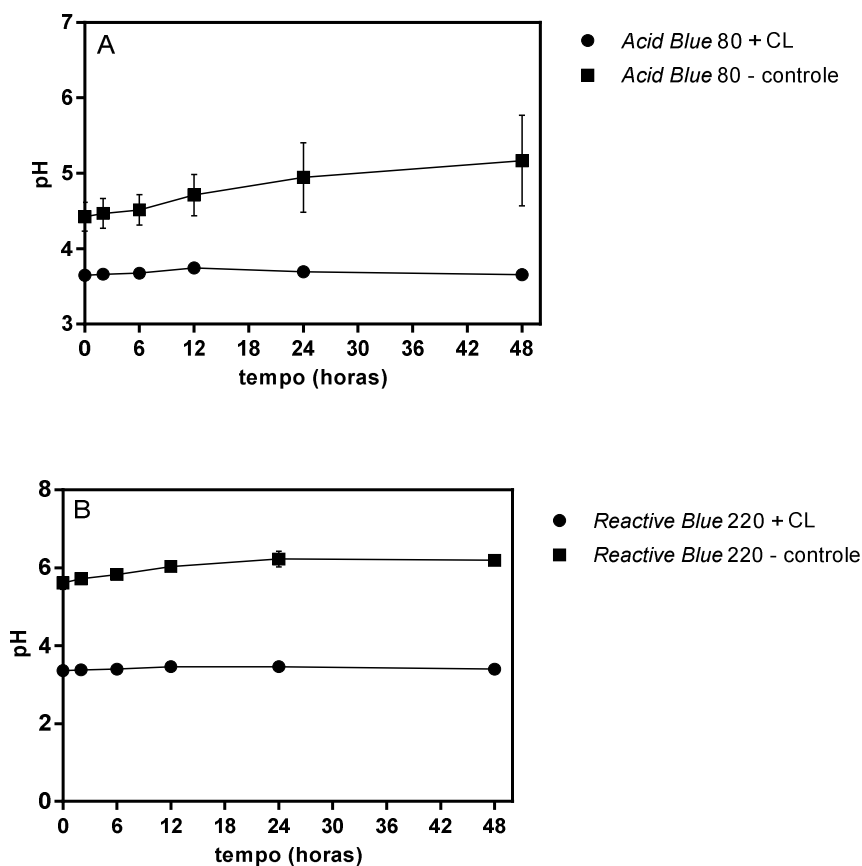


Figura 28. Porcentagem de descoloração dos corantes *Acid Blue 80* e *Reactive Blue 220* pelo caldo enzimático do *Trametes hirsuta* 358/10 em cultivo líquido (CL) e do corante *Brilliant Green* pelo caldo do cultivo sólido (CS).

Pode-se observar, ainda (Figura 29), que os pHs das reações dos corantes com os caldos enzimáticos do cultivo submerso se mantiveram relativamente constantes ao longo das

48 h analisadas e que o caldo reduziu o pH dos corantes *Acid Blue 80* e *Reactive Blue 220* cerca de 0,77 e 2,25, respectivamente, ao compará-los com os controles no início das reações, enquanto a solução do corante *Brilliant Green* mostrou um pH inicial semelhante ao da sua reação com o caldo do cultivo em estado sólido que, como visto anteriormente, apresenta um pH mais elevado do que o pH do caldo do cultivo submerso, ou seja, mais semelhante ao pH do próprio corante; podendo-se concluir, dessa forma, que a variação de pH proporcionada pelos caldos não é responsável pela descoloração observada anteriormente, já que a mesma não foi instantânea (detectada no tempo 0) como pode ser observado na Figura 28, enquanto a variação do pH foi instantânea (Figura 29).



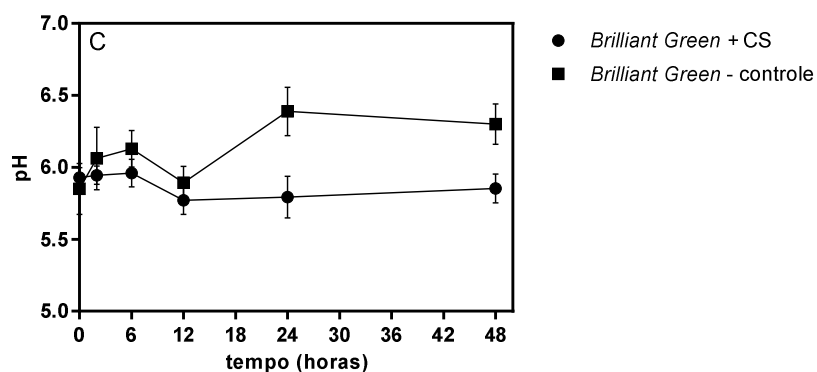


Figura 29. Potencial hidrogeniônico (pH) das reações dos corantes *Acid Blue 80* (A) e *Reactive Blue 220* (B) com o caldo enzimático do *Trametes hirsuta* 358/10 em cultivo líquido (CL) e do corante *Brilliant Green* (C) com o caldo em cultivo sólido (CS) e seus respectivos controles.

Muitos estudos realizam os testes de descoloração através do crescimento fúngico em meios contendo os corantes a serem degradados, como pode ser visualizado na Tabela 8. Tais metodologias são interessantes por permitirem que os organismos secretem um conjunto de enzimas que os possibilitem de se desenvolverem da melhor forma possível sob as condições impostas; entretanto, nestas condições, a toxicidade do corante pode dificultar, ou mesmo impedir, seu desenvolvimento e a consequente liberação de enzimas degradadoras, bem como a biossorção dos corantes pelas hifas pode levar a uma falsa ideia de degradabilidade (Chander & Arora, 2007).

Como os testes do presente trabalho foram realizados com os caldos enzimáticos brutos, livres de biomassa fúngica, a descoloração não está relacionada à biossorção dos corantes pelas hifas, além das amostras de enzimas utilizadas não terem sido purificadas, como na maioria dos trabalhos realizados de descoloração (Hou *et al.*, 2004).

Na Tabela 8, pode-se perceber, ainda, que a capacidade de descoloração varia grandemente, dependendo da espécie fúngica, do corante – independentemente da classe –, e se a produção enzimática ocorreu em meio submerso ou em estado sólido (Tabela 9).

Tabela 8. Dados comparativos da capacidade de descoloração de diferentes corantes por diferentes fungos cultivados em meio submerso.

Organismos	Reação	Corantes	Descoloração (%)	Período de incubação	Referências
<i>Trametes hirsuta</i>	Caldo livre de biomassa	<i>Acid Blue 80</i>	94,4	48 h	Presente estudo
358/10	fúngica + corante.	<i>Reactive Blue 220</i>	93,9	48 h	
		<i>Brilliant Green</i>	70,8	48 h	
<i>Trametes pubescens</i>	Caldo livre de biomassa	<i>RBBR</i>	84,5	21 h	Osma <i>et al.</i> (2007)
	fúngica + corante.	<i>Methyl Green</i>	96,4	21 h	
<i>Earliella scabrosa</i>	Crescimento fúngico em meio contendo corante.	<i>Navy FNB</i>	± 92,0	11 dias	Guerra <i>et al.</i> (2008)
		<i>Red FN-3G</i>	± 46,0	11 dias	
		<i>Yellow P6GS</i>	3,0	ni*	
<i>Trametes máxima</i>	Crescimento fúngico em meio contendo corante.	<i>Navy FNB</i>	99,0	ni*	Guerra <i>et al.</i> (2008)
		<i>Red FN-3G</i>	98,0	ni*	
		<i>Yellow P6GS</i>	85,0	ni*	
<i>Ganoderma zonatum</i>	Crescimento fúngico em meio contendo corante.	<i>Navy FNB</i>	79,0	ni*	Guerra <i>et al.</i> (2008)
		<i>Red FN-3G</i>	76,0	ni*	
		<i>Yellow P6GS</i>	28,0	ni*	
<i>Earliella scabrosa</i>	Crescimento fúngico em meio contendo corante.	<i>Bromophenol Blue</i>	96,6	10 dias	Lyra <i>et al.</i> (2009)
		<i>Methylene Blue</i>	19,7	10 dias	
		<i>Methyl Orange</i>	38,5	10 dias	
		<i>Methyl Green</i>	96,5	10 dias	
		<i>Congo Red</i>	0,0	10 dias	
		<i>Phenol Red</i>	95,8	10 dias	
<i>Lentinus crinitus</i>	Crescimento fúngico em meio contendo corante.	<i>Remazol Blue 220</i>	90,0	10 dias	Niebisch <i>et al.</i> (2010)
<i>Lentinus sp.</i>	Lacase purificada (1 U/mL) + corante.	<i>Acid Blue 80</i>	97,0	1 h	Hsu <i>et al.</i> (2012)
		<i>RBBR</i>	29,0	1 h	
		<i>Acid Red 37</i>	48,0	1 h	
		<i>Acid Black 1</i>	22,0	1 h	
		<i>Direct Blue 71</i>	22,0	1 h	
		<i>Direct Black 19</i>	4,0	1 h	

* ni – não indicado.

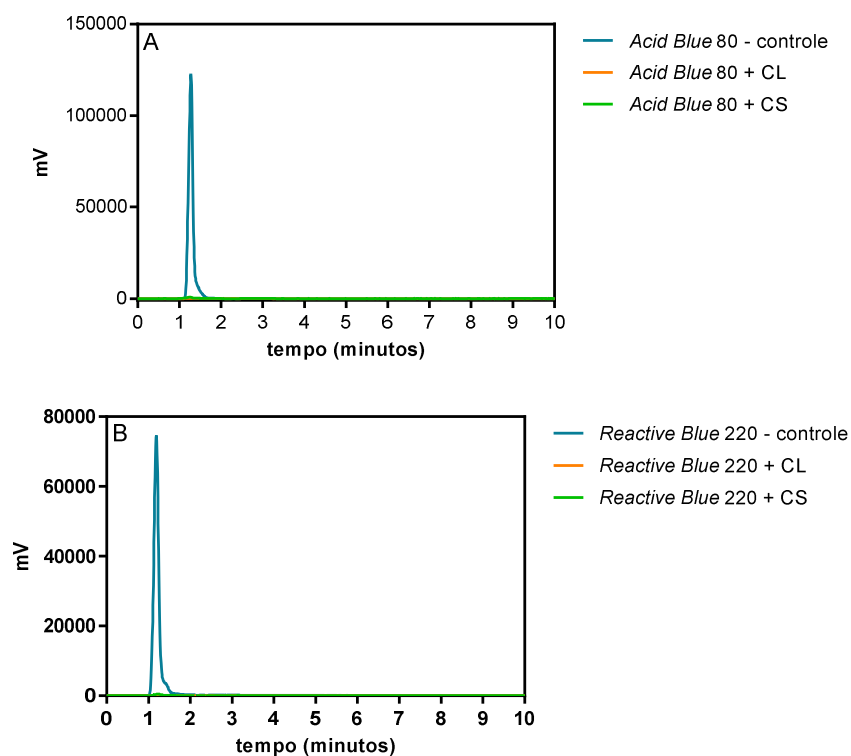
Tabela 9. Dados comparativos da capacidade de descoloração de diferentes corantes por diferentes fungos cultivados em meio sólido.

Organismos	Reação	Corantes	Descoloração (%)	Período de incubação	Referências
<i>Trametes hirsuta</i> 358/10	Extrato livre de biomassa fúngica + corante.	<i>Acid Blue</i> 80 <i>Reactive Blue</i> 220 <i>Brilliant Green</i>	28,1 0,7 87,2	48 h 48 h 48 h	Presente estudo
<i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001	Extrato livre de biomassa fúngica + corante.	<i>Reactive Blue</i> 220 <i>Disperse Blue</i> 79 <i>Acid Red</i> 315 <i>Acid Blue</i> 80 <i>Acid Green</i> 28 <i>Reactive Red</i> 198	100,0 61,0 15,0 100,0 80,0 28,5	30 min 10 h 10 h 1 h 3 h 10 h	Munari <i>et al.</i> (2008)
<i>Earliella scabrosa</i>	Extrato livre de biomassa fúngica + corante.	<i>Navy FNB</i> <i>Red FN-3G</i> <i>Yellow P6GS</i>	92,1 45,9 60,9	18 dias 11 dias 11 dias	Guerra <i>et al.</i> (2008)
<i>Trametes máxima</i>	Extrato livre de biomassa fúngica + corante.	<i>Navy FNB</i> <i>Red FN-3G</i> <i>Yellow P6GS</i>	11,9 29,1 52,4	11 dias 11 dias 11 dias	Guerra <i>et al.</i> (2008)
<i>Ganoderma zonatum</i>	Extrato livre de biomassa fúngica + corante.	<i>Navy FNB</i> <i>Red FN-3G</i> <i>Yellow P6GS</i>	38,9 46,0 40,6	16 dias 16 dias 16 dias	Guerra <i>et al.</i> (2008)

Alguns dos corantes analisados apresentaram um aumento da absorvância após o tratamento enzimático; tal fato indica que ocorreu a formação de produtos de oxidação que absorvem nesta região do espectro, podendo estar relacionado, ainda, ao precipitado formado em alguns ensaios.

4.6. Análise de cromatografia líquida das amostras de corantes descoloridos

As amostras dos corantes que apresentaram os maiores percentuais de descoloração com um dos caldos de *T. hirsuta* 358/10 foram analisadas, após 48 h de reação, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), demonstrando, por mais uma metodologia, a degradação do corante, que pode ser visualizada pelo desaparecimento do pico do controle ao reagir com os caldos dos cultivos líquido e sólido (Figura 30). A reação enzimática quebra as moléculas de corante, não sendo mais detectadas pelo cromatógrafo, com exceção do corante *Brilliant Green* que, ao reagir com o caldo do cultivo líquido, suas moléculas não foram todas quebradas, sendo observada apenas uma diminuição do pico (Figura 30 C). Devido ao fato de a metodologia utilizada ser específica para a detecção de cada tipo de corante, os possíveis resíduos gerados não são detectáveis por tais metodologias.



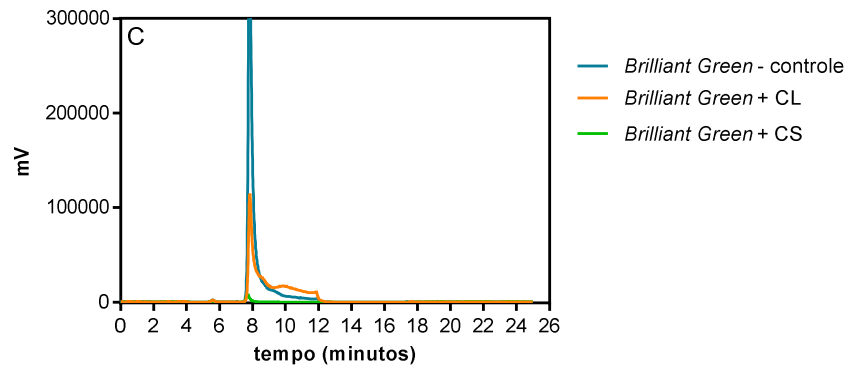


Figura 30. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos controles *Acid Blue 80* (A), *Reactive Blue 220* (B) e *Brilliant Green* (C), bem como de suas reações, após 48 h, com os caldos dos cultivos líquido (CL) e sólido (CS) de *Trametes hirsuta* 358/10.

4.7. Teste de toxicidade

A simples descoloração do corante não indica que o eventual dano ao meio ambiente tenha sido solucionado. Como visto, a avaliação da toxicidade é essencial para a garantia de que o corante e seus produtos de degradação não causem interferências agudas ou crônicas na biota.

4.7.1. Toxicidade aguda

Os corantes *Acid Blue 80*, *Reactive Blue 220* e *Brilliant Green* foram escolhidos para a realização do teste de toxicidade aguda por terem sido mais expressivamente descoloridos por um dos caldos enzimáticos, dos cultivos submerso ou em estado sólido, de *T. hirsuta* 358/10. Após 48 h, as reações resultantes de cada corante com os caldos, bem como os controles, foram avaliadas para determinar a toxicidade utilizando os microcrustáceos da espécie

Daphnia magna. Tais testes revelam a toxicidade aguda das amostras, ou seja, o efeito sobre os organismos até 48 h de exposição. Os resultados dos testes estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10. Fator de toxicidade (FT) dos testes com o microcústáceo *Daphnia magna* para as amostras listadas.

	Amostras	Fator de toxicidade (FT)
CONTROLES	<i>Acid Blue 80</i>	1
	<i>Reactive Blue 220</i>	16
	<i>Brilliant Green</i>	16
	Cultivo submerso	2
	Cultivo sólido	ND
TESTES	Cult. sub. + <i>Acid Blue 80</i>	4
	Cult. sub. + <i>Reactive Blue 220</i>	4
	Cult. sub. + <i>Brilliant Green</i>	16
	Cult. sól. + <i>Acid Blue 80</i>	ND
	Cult. sól. + <i>Reactive Blue 220</i>	ND
	Cult. sól. + <i>Brilliant Green</i>	16

ND – Toxicidade não detectada

Como se pode observar, os corantes apresentaram toxicidade, embora com uma grande variação, já que o FT1 do *Acid Blue 80* demonstra uma baixa toxicidade por precisar de uma alta concentração (sem diluição do meio preparado) para causar imobilidade superior a 10% das dáfrias; enquanto os corantes *Reactive Blue 220* e *Brilliant Green*, com FT16, apresentaram alta toxicidade já que com uma concentração de apenas 6,25% do meio preparado causou tal imobilidade.

Com relação aos controles dos caldos enzimáticos, o cultivo submerso apresentou FT2, o que é considerado baixo, já que se apresentou tóxico em concentração de 50%, enquanto o caldo do cultivo em estado sólido não apresentou toxicidade nas concentrações testadas.

Quando o caldo do cultivo submerso foi testado na degradação dos três corantes, as reações resultantes apresentaram toxicidade, inclusive aumentando a do corante *Acid Blue 80*

de FT1 para FT4, enquanto a do *Reactive Blue 220* teve sua toxicidade reduzida de FT16 para FT4 e a do *Brilliant Green* não sofreu alteração.

O resultado promissor foi observado nos tratamentos com o caldo do cultivo sólido que, embora não tenha apresentado uma descoloração satisfatória para os corantes *Acid Blue 80* e *Reactive Blue 220*, levou-os a fatores de toxicidade não detectados, tornando-os, dessa forma, mais seguros para a biota.

Em estudo semelhante realizado por Costa (2015), a amostra com o corante *Remazol Brilliant Blue R* apresentou FT2 e, em seu tratamento com os caldos enzimáticos de *Auricularia* sp., o FT foi 8, com *Lentinus crinitus* 16 e com *Coriolopsis* sp. 32, demonstrando que a preparação do corante teve sua toxicidade aumentada ao reagir com os caldos enzimáticos dos organismos supracitados.

Em outros estudos, os dados mostraram que as amostras tratadas apresentaram menor taxa de mortalidade de *D. magna*, com redução de 53,73%, 55,35%, 59,61% e 52,45%, para os efluentes têxteis *Sitara Textile* (SIT), *Masood Textile* (MAS), *Khyber Textile* (KHT) e *Kalash Textile* (KAT), respectivamente, demonstrando que os processos biológicos que levam a degradação, pode ser um método de tratamento viável em efluentes têxteis para remoção da toxicidade (Bilal *et al.*, 2016).

Nota-se, a partir dos dados expostos, que a toxicidade dos corantes é variável, mesmo dentro da mesma classe, como foi o caso do *Acid Blue 80* e do *Reactive Blue 220* – ambos corantes antraquinona –, e que os tratamentos com enzimas fúngicas promovem modificações em suas moléculas observadas pela descoloração, podendo ser convertidas em produtos mais ou menos tóxicos para os organismos testados, dependendo do fungo utilizado, da forma de cultivo e conseqüentemente do conjunto enzimático. Os corantes antraquinona, neste caso, formaram produtos que não apresentaram toxicidade para *D. magna* ao serem tratados com o caldo do cultivo sólido de *T. hirsuta* 358/10, enquanto a mesma solução enzimática não

promoveu o mesmo efeito sobre o corante trifenilmetano *Brilliant Green*, apesar de tê-lo descolorido mais eficientemente do que aos dois corantes anteriormente citados.

Desse modo, a remoção da cor de um efluente não pode ser interpretada como detoxificação (Lanzer *et al.*, 2007), bem como a não descoloração não significa que a toxicidade não possa ter sido diminuída.

4.7.2. Toxicidade crônica

A não detecção de toxicidade aguda não significa que a amostra não possa afetar a biota a longo prazo; dessa forma, as amostras que apresentaram toxicidade não detectada (ND) no teste anterior (caldo enzimático do cultivo sólido, caldo do cultivo sólido com o corante *Acid Blue 80* e caldo do cultivo sólido com o corante *Reactive Blue 220*), foram avaliadas para toxicidade crônica com o nematódeo *Caenorhabditis elegans*, sendo os resultados de crescimento e de reprodução dos organismos nas diferentes diluições avaliadas, apresentados nas Figuras 31 e 32.

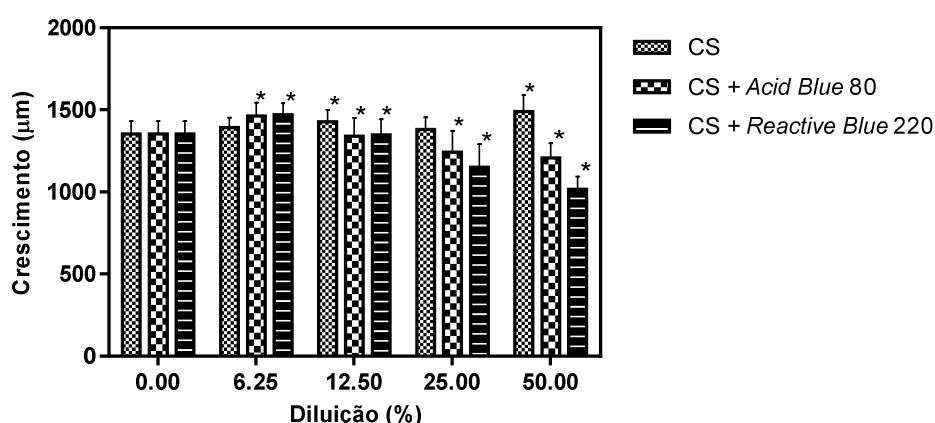


Figura 31. Crescimento corporal dos nematódeos *Caenorhabditis elegans* nas diluições avaliadas das amostras do caldo do cultivo sólido (CS), do cultivo sólido com o corante *Acid Blue 80* e do cultivo sólido com o corante *Reactive Blue 220* com diferença estatística (*) $p \leq 0,05$. As diluições de cada amostra foram realizadas em seis replicatas.

A amostra com o caldo enzimático do cultivo em estado sólido apresentou-se como um estimulante do crescimento corporal do *C. elegans*, já que no teste com 12,5% ($p \leq 0,05$) dessa amostra houve um estímulo de 6% no crescimento, alcançando um estímulo de 10% na diluição com 50% ($p \leq 0,05$) da amostra.

A amostra da reação do caldo do cultivo sólido com o corante *Acid Blue 80*, estimulou o crescimento corporal de *C. elegans* na maior diluição (6,25%) ($p \leq 0,05$) em 8%, enquanto as menores diluições, 25% e 50% ($p \leq 0,05$), inibiram em 8 e 11% o crescimento, respectivamente.

A maior diluição da amostra contendo a reação do caldo do cultivo sólido com o corante *Reactive Blue 220*, também estimulou o crescimento corporal (9%), enquanto as menores diluições (25 e 50%) ($p \leq 0,05$) inibiram o crescimento em 15 e 25%, respectivamente.

Dessa forma, pode-se concluir que o caldo do cultivo sólido, sozinho, não apresenta toxicidade crônica, com relação ao crescimento, para *C. elegans*, já que não inibiu seu desenvolvimento corporal, bem como as suas reações com os corantes altamente diluídas. Porém, na presença dos corantes em altas concentrações – diluição de 25 e 50% –, verifica-se toxicidade crônica ao se constatar a inibição do crescimento corporal do *C. elegans*.

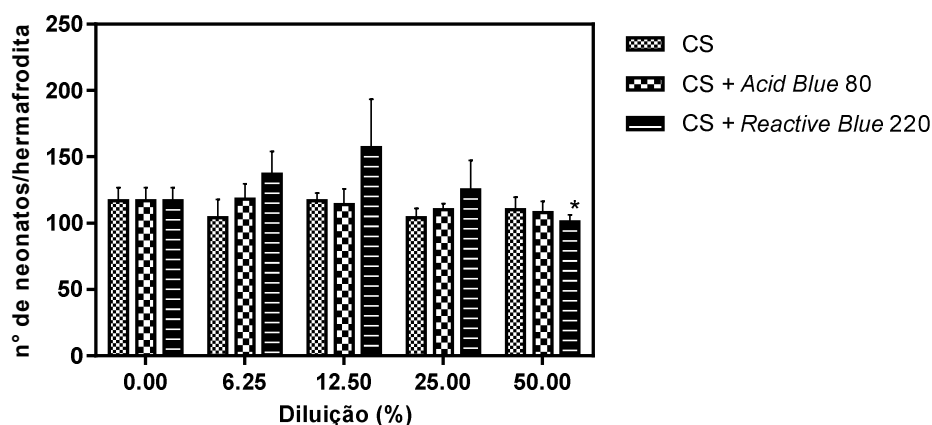


Figura 32. Reprodução dos nematódeos *Caenorhabditis elegans* nas diluições avaliadas das amostras do caldo do cultivo sólido (CS), do cultivo sólido com o corante *Acid Blue 80* e do cultivo sólido com o corante *Reactive Blue 220* com diferença estatística (*) $p \leq 0,05$. As diluições de cada amostra foram realizadas em seis replicatas.

Com relação aos dados sobre a reprodução dos nematódeos, ocorreu diferença estatística apenas na diluição de 50% do cultivo sólido com o corante *Reactive Blue 220*, evidenciando efeito tóxico, nas demais amostras a diferença estatística não foi comprovada. Outros estudos, como o trabalho realizado por Khanna *et al.* (1997), por exemplo, demonstraram que concentrações de NaCl superiores às toleradas pela maioria dos organismos de água doce, comumente encontradas em efluentes têxteis, interferem no desenvolvimento normal dos organismos. Ainda, alterações do pH, que extrapolem os limites tolerados pelo *C. elegans*, também interferem na toxicidade, sendo verificado, no trabalho de Hitchcock *et al.* (1998), que a ozonação de águas residuais de tinturas sintéticas, por formar ácidos orgânicos (Fouché, 1995), pode aumentar a toxicidade de uma amostra após o tratamento.

5. CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento do presente trabalho, conclui-se que:

- a estratégia de utilizar os meios contendo ácido gálico e corante para a seleção dos fungos políporos produtores de fenol-oxidases mostra-se adequada, destacando-se oito linhagens dentre as avaliadas;
- é verificada, para as linhagens selecionadas, produção mais significativa de Lac e MnP nos meios de cultivos submerso e em estado sólido;
- a linhagem *T. hirsuta* 358/10 se sobressaiu em ambos os cultivos e suas Lac apresentam atividade ótima em pH 3,5, tampão citrato de sódio e temperatura de 30°C, com termoestabilidade entre 20 e 40°C; além de mostrarem afinidade pelo substrato ABTS semelhante, apesar das diferentes massas moleculares, dependendo da forma de produção;
- os caldos enzimáticos dos cultivos submerso e em estado sólido de *T. hirsuta* 358/10 mostram uma ampla variação na descoloração, sendo os corantes antraquinona *Acid Blue* 80 e *Reactive Blue* 220 os que apresentaram maior descoloração pelo caldo do cultivo submerso e o *Brilliant Green* – trifenilmetano – pelo cultivo em estado sólido, sendo o primeiro cultivo, de maneira geral, mais vantajoso;
- os testes de toxicidade revelam que a descoloração não está diretamente relacionada à detoxificação e que, nesse ponto, o caldo do cultivo em estado sólido é mais satisfatório.

Como perspectivas para o aproveitamento do conhecimento adquirido, sugerem-se o escalonamento da produção do caldo do cultivo em estado sólido de *T. hirsuta* 358/10 para aplicação em plantas industriais e a extensão da investigação de sua eficácia na detoxificação

de diversos efluentes que contenham compostos aromáticos persistentes prejudiciais aos seres vivos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIT - Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecções. (2017). **Disponível (online)** <http://www.abit.org.br/cont/perfil-do-setor> (31 de maio de 2018).
- Ademola, I. O.; Odeniran, P. O. (2017). Novel trypanocide from an extract of *Pleurotus sajor-caju* against *Trypanosoma congolense*. **Pharmaceutical Biology**. 55 (1): 132–138.
- Agrawal, R. P.; Chopra, A.; Lavekar, G. S.; Padhi, M. M.; Srikanth, N.; Ota, S., *et al.* (2010). Effect of oyster mushroom on glycemia, lipid profile and quality of life in type 2 diabetic patients. **Australian Journal of Medical Herbalism**. 22 (2): 50-54.
- Aguiar, A.; Ferraz, A. (2011). Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**. 34 (10): São Paulo.
- Akdogan, H. A.; Topuz, M. C.; Urhan, A. A. (2014). Studies on decolorization of reactive blue 19 textile dye by *Coprinus plicatilis*. **Journal of Environmental Health Science & Engineering**. 12 (1): 49-53.
- Akpınar, M.; Urek, R. O. (2012). Production of ligninolytic enzymes by solid-state fermentation using *Pleurotus eryngii*. **Prep. Biochem Biotechnol**. 42 (6): 582-597.
- Aksu, Z. (2005). Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochem**. 40: 997–1026.
- Alecrim, M. M.; Palheta, R. A.; Teixeira, M. F.; Oliveira, I. M. (2015). Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on amazonic fruit waste. **Int. J. Food Sci. Technol**. 50: 151-157.
- Alexopoulos, C. J.; Mims, C. W. (1985). **Introducción a la micología**. Barcelona: Ediciones Omega, pp.421-435.
- Ali, H. (2010). Biodegradation of synthetic dyes - a review. **Water Air Soil Pollut**. 213: 251–273.

- Ali, N.; Hameed, A.; Ahmed, S. (2009). Physicochemical characterization and bioremediation perspective of textile effluent, dyes and metals by indigenous bacteria. **J. Hazard. Mater.** 164: 322–328.
- Alves, A. C.; Silvano, J. (2006). Avaliação da sensibilidade de *Daphnia magna* straus, 1820 (cladóceras, crustácea) ao dicromato de potássio. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)**. 65 (1): São Paulo, pp. 59-61.
- Alves, E. P.; Tavares, L. B.; Gern, R. M.; Silva, D. A.; Furlan, S. A.; Wisbeck, E. (2017). Produção e caracterização de biossurfactantes metabolizados por *Pleurotus sajor-caju* a partir de óleo de soja. **Revista Matéria**. 22 (3).
- Alves, M. J.; Ferreira, I. C.; Dias, J.; Teixeira, V.; Martins, A.; Pintado, M. (2013). A review on antifungal activity of mushroom (basidiomycetes) extracts and isolated compounds. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. 13 (21): 2648–2659.
- Andersen, W. C.; Turnipseed, S. B. (2009). **Anal. Chim. Acta**. 637: 279–289.
- Andrés, J. R.; Llamas, B. F.; Terrón, A. A.; Sánchez, J. A.; García, O. P.; Arrojo, E. M.; *et al.* (1990). **Guia de hongos de la Península Ibérica**. Claves - descripciones - fotografía. 3 ed. León - noroeste peninsular: CELARAYN. 547p.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. (1995). **Official Methods of Analysis**. 16 ed. Washington, DC, USA.
- Arboleda, C.; Cabana, H.; De Pril, E.; Jones, J. P.; Jiménez, G. A.; Mejía, A. I., *et al.* (2012). Elimination of bisphenol a and triclosan using the enzymatic system of autochthonous colombian forest fungi. **ISRN Biotechnol**. 2013.
- Asgher, M.; Asad, M. J.; Legge, R. L. (2006). Enhanced lignin peroxidase synthesis by *Phanerochaete chrysosporium* in solid state bioprocessing of a lignocellulosic substrate. **World J. Microbiol. Biotechnol**. 22 (5): 449-453.
- Aspland, J. R. (1997). Textile dyeing and coloration. **Research triangle park: american association of textile chemists and colorists**.
- Babu, P. R.; Pinnamaneni, R.; Koona, S. (2012). Occurrences, physical and biochemical properties of laccase. **Journal of Environmental Research and Technology**. 2 (1): 1-13.

- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases - occurrence and properties. **FEMS Microbiol. Rev.** 30 (2): 215-242.
- Banat, I. M.; Nigam, P.; Singh, D.; Machant, R. (1996). Microbial decolorization of textile dye containing effluent. A review. **Bioresource Technology.** 58: 217–227.
- Bao, W. (1994). Oxidative degradation of nonphenolic lignin during lipid-peroxidation by fungal manganese peroxidase. **FEBS Letters.** 354: 297-300.
- Barton, S. C.; Gallaway, J.; Atanassov, P. (2004). Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices. **Chem. Rev.** 104: 4867-4886.
- Basha, S. A.; Rajaganesh, K. (2014). Microbial bioremediation of heavy metals from textile industry dye effluents using isolated bacterial strains. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.** 3 (5): 785-794.
- Baughman, G. L.; Weber, E. J. (1994). Transformation of dyes and related-compounds in anoxic sediment kinetics and products. **Environmental Science & Technology.** 28: 267–276.
- Bettin, F.; Rosa, L. O.; Montanari, Q.; Calloni, R.; Gaio, T. A.; Malvessi, E.; *et al.* (2011). Growth, kinetics, production and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. **Process Biochem.** 46: 758-764.
- Bilal, M.; Iqbal, M.; Hu, H.; Zhang, X. (2016). Mutagenicity, cytotoxicity and phytotoxicity evaluation of biodegraded textile effluent by fungal ligninolytic enzymes. **Water Sci. Technol.** 73 (10): 2332-2344.
- Bon, E. P.; Pereira Jr., N.; Gottschalk, L. M.; Sá-Pereira, P.; Roseiro, J. C.; Ferrara, M. A. (2008). Bioprocessos para a produção de enzimas. In: Bon, E. P.; Ferrara, M. A.; Corvo, M. L. *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado* (pp. 95-122). Rio de Janeiro: Interciência.
- Bourbonnais, R.; Paice, M. G. (1988). The fate of ¹⁴C-labelled high molecular weight chlorinated lignin and chromophoric material during microbial treatment of bleached kraft effluent. **J. WoodChem. Technol.** 7: 51–64.

- Bourbonnais, R.; Paice, M. G.; Freiermuth, B.; Bidoie, E.; Borneman, S. (1997). Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 4627-4632.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** 72: 248-254.
- Braile, P. M.; Cavalcanti, J. E. (1993). **Manual de tratamento de águas residuárias industriais.** São Paulo: CETESB, 18 ed.
- Brijwani, K.; Rigdon, A.; Vadlani, P. V. (2010). Fungal laccases: production, function and applications in food processing. **Enz. Res.** pp. 1-10.
- Buikema, A. L.; Niederlehner, B. R.; Cairns, J. J. (1982). Biological. Monitoring part IV. Toxicity testing. **Water Res.** 16: 239-262.
- Caito, S. W.; Yaofang, Z.; Aschner, M. (2013). Involvement of AAT transporters in methylmercury toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 435: 546–550.
- Camarero, S.; Böckle, B.; Martínez, M. J.; Martínez, A. T. (1996). Manganese-mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonarius*. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 1070–1072.
- Camassola, M.; Dillon, A. J. (2010). Cellulases e xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown sugar cane bagasse in solid-state fermentation. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 162: 1889-1900.
- Cambria, M. T.; Cambria, A.; Ragusa, S.; Rizzarelli, E. (2000). Production, purification and properties of an extracellular laccase from *Rigidoporus lignosus*. **Protein Expression and Purification.** 18: 141–147.
- Cannel, E.; Moo-Young, M. (1980). Solid state fermentation systems. **Process Biochemistry.** pp. 2-7.
- Cantele, C.; Fontana, R. C.; Mezzomoa, A. G.; Rosa, L. O.; Poletto, L.; Camassola, M.; *et al.* (2017). Production, characterization and dye decolorization ability of a high level

- laccase from *Marasmiellus palmivorus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 12: 15–22.
- Chahal, D. S. (1985). Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. **Appl. Environm. Microbiol.** 49: 205-210.
- Chander, M.; Arora, D. S. (2007). Evaluation of some white-rot fungi for their potential to decolorize industrial dyes. **Dyes and Pigments**. 72: 192–198.
- Chen, K. C.; Wu, J. Y.; Liou, D. J.; Huang, S. C. (2003). Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. **Journal of Biotechnology**. 101: 57–68.
- Claus, H. (2004). Laccases: structure, reactions, distribution. **Micron**. 35: 93-96.
- Cohen, R.; Persky, L.; Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 58: 582–594.
- Collins, P. J.; Dobson, A. D. (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 3444–3450.
- CONAMA, (2011). *Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011*. Disponível (online) <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646> (4 de fevereiro de 2017).
- Conneely, A.; Smyth, W. F.; McMullan, G. (2002). Study of the white-rot fungal degradation of selected phthalocyanine dyes by capillary electrophoresis and liquid chromatography. **Anal. Chim. Acta**. 451: 259-270.
- Considine, P. J.; Hackett, T. J.; Coughlan, M. P. (1987). Solid-state cultivation of cultivation of *Penicillium capsulatum* on beet pulp. **Biotecnol. Lett.** 9: 131-134.
- Correa, T. D. (2008). Impactos geoquímicos e sócio-ambientais no estuário do rio Potengi – região metropolitana da Grande Natal / RN. **Dissertação de mestrado**. Programa Regional de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente/PRODEMA. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN, Brasil.
- Costa, C. R.; Olivi, P.; Botta, C. M.; Espindola, E. L. (2008). A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**. 31 (7): 1820-1830.

- Costa, J. S. (2015). Macrofungos amazônicos produtores de fenol-oxidases para descoloração de corantes têxteis. **Dissertação de mestrado**. Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas. Manaus, AM, Brasil.
- Couto, S. R. (2009). Dye removal by immobilized fungi. **Biotechnology Advances**. 27: 227–235.
- Couto, S. R.; Herrera, J. L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. **Biotechnol. Adv.** 24: 500-513.
- Couto, S. R.; Sanromán, M. Á. (2005). Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochem. Eng. J.** 22: 211–219.
- Couto, S. R.; Sanromán, M. A. (2006). Effect of two wastes from groundnut processing on laccase production and dye decolourisation ability. **Journal of Food Engineering**. 73: 388–393.
- Couto, S. R.; Rosales, E.; Gundín, M.; Sanromán, M. Á. (2004). Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* species. **J. Food Eng.** 64: 423–428.
- Culp, S. J.; Beland, F. A. (1996). Malachite green: a toxicological review. **Int. J. Toxicol.** 15: 219–238.
- Dallago, R. M.; Smaniotto, A.; Oliveira, L. C. (2005). Resíduos sólidos de curtumes como adsorventes para a remoção de corantes em meio aquoso. **Química Nova**. 28 (3): 433-437.
- Davidson, R. W.; Campbell, W. A.; Blaisdell, D. J. (1938). Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. **J. of Agric. Res.** 57 (9): 683-685.
- Dekker, R. F.; Barbosa, A. M. (2001). The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria sp.* **Enzyme and Microbial Technology**. 28 (1): 81–88.
- Donkin, S. G.; Eiteman, M. A.; Williams, P. L. (1995). Toxicity of glucosinolates and their enzymatic decomposition products to *Caenorhabditis elegans*. **J. Nematol.** 27: 258–262.

- Durán, N.; Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Appl. Catal. B: Environ.** 28: 83-99.
- Durán, N.; Morais, S. G.; Freire, R. S. (2000). Degradation and toxicity reduction of textile effluent by combined photocatalytic and ozonation processes. **Chemosphere.** 40: 369-373.
- Dux, J. P.; Stalzer, R. F. (1988). **Managing safety in the chemical laboratory.** New York: Van Nostrand Reinhold.
- Dwivedi, U. N.; Singh, P.; Pandey, V. P.; Kumar, A. (2011). Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.** 68 (2): 117–128.
- Eggert, C.; Temp, U.; Eriksson, K.-E. L. (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. **Applied and Environmental Microbiology.** 62 (4): 1151–1158.
- Elisashvili, V.; Kachlishvili, E. (2009). Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot basidiomycetes. **J. Biotechnol.** 144: 37-42.
- Elisashvili, V.; Penninckx, M.; Kachlishvili, E.; Tsiklauri, N.; Metreveli, E.; Kharziani, T.; *et al.* (2008). *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresource Technology.** 99 (3): 457-462.
- Ergun, S. O.; Urek, R. O. (2017). Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. **Annals of Agrarian Science.** 15 (2): 273-277.
- Eriksson, K. E.; Blankette, R. A.; Ander, P. (1990). Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. **Springer:** New York, USA.
- Fabbrini, M.; Galli, C.; Gentili, P. (2002). Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. **J. Mol. Catal. B: Enzym.** 16 (5): 231–240.
- Fenice, M.; Sermanni, G. G.; Federici, F.; D'Annibale, A. (2003). Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. **J. Biotechnol.** 100 (1): 77–85.

- Ferraz, A. (2004). Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: Esposito, E.; Azevedo, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia** (cap. 6, pp. 215-242). Caxias do Sul: EDUCS.
- Forgiarini, E. (2006). Degradação de corantes e efluentes têxteis pela enzima horseradish peroxidase (HRP). **Dissertação de mestrado**. Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.
- Fouche, E. (1995). Use of ozone to renovate dyebath water. **Carpet, apparel and textiles environmental conference (CATEC)**. Athens, GA: University of Georgia.
- Franciscon, E.; Zille, A.; Dias, G. F.; Ragagnin, M. C.; Durrant, L. R.; Cavaco-Paulo, A. (2009). Biodegradation of textile azo dyes by a facultative *Staphylococcus arlettae* strain VN-11 using a sequential microaerophilic/aerobic process. **International Biodeterioration and Biodegradation**. 63: 280–288.
- Freitag, V. C. (2011). Estado da arte da pesquisa em evidências ambientais. **Revista ADMpg Gestão Estratégica**. 4 (1).
- Fu, K.; Fu, S.; Zhan, H.; Zhou, P.; Liu, M.; Liu, H. (2013a). A newly isolated wood-rot fungus for laccase production in submerged cultures. **BioResources**. 8 (1): 1385-1397.
- Fu, X. Y.; Zhao, W.; Xiong, A. S.; Tian, Y. S.; Zhu, B.; Peng, R. H.; *et al.* (2013b). Phytoremediation of triphenylmethane dyes by overexpressing a *Citrobacter sp.* triphenylmethane reductase in transgenic *Arabidopsis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 97: 1799–1806.
- Fujita, R. M.; Jorente, M. J. (2015). A indústria têxtil no Brasil: uma perspectiva histórica e cultural. **Revista ModaPalavra e Periódico**. 8 (15): 153-174.
- Giacomotto, J.; Ségalat, L. (2010). High-throughput screening and small animal models, where are we? **Br. J. Pharmacol.** 160 (2): 204-216.
- Gianfreda, L.; Xu, F.; Bollag, J. (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation J.** 3: 4–25.
- Giardina, P.; Faraco, V.; Pezzella, C.; Piscitelli, A.; Vanhulle, S.; Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story. **Cell Mol Life Sci.** 67 (3): 369-385.

- Gochev, V. K.; Krastanov, A. I. (2007). Fungal laccases. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**. 13: 75-83.
- Gold, M. H.; Glenn, J. K.; Alic, M. (1988). Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays. **Methods in Enzymology**. 161: 74–78.
- Gomes, F. M.; Paula, A. V.; Silva, G. S.; Castro, H. F. (2006). Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Química Nova**. 29: 710- 718.
- González, G. V.; Torres, E. F.; Aguilar, C. N.; Gomez, S.; Godínez, G. D.; Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochem. Eng. J.** 13: 157-167.
- Gonzalez, J. C.; Medina, S. C.; Rodriguez, A.; Osma, J. F.; Alméciga-Díaz, C. J.; Sánchez, O. F. (2013). Production of *Trametes pubescens* laccase under submerged and semi-solid culture conditions on agro-industrial wastes. **PLOS ONE**. 8 (9).
- Gopinath, K. P.; Sahib, H. A.; Muthukumar, K.; Velan, M. (2009). Improved biodegradation of congo red by *Bacillus sp.* **Bioresource Technology**. 100: 670–675.
- Gowri, R. S.; Vijayaraghavan, R.; Meenambigai, P. (2014). Microbial degradation of reactive dyes - a review. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.** 3 (3): 421-436.
- Guaratini, C. C.; Zanoni, M. V. (2000). Corantes têxteis. **Química Nova**. 23 (1): 71-78.
- Guerra, G.; Domínguez, O.; Ramos-Leal, M.; Manzano, A. M.; Sánchez, M. I.; Hernández, I.; *et al.* (2008). Production of laccase and manganese peroxidase by white-rot fungi from sugarcane bagasse in solid bed: use for dyes decolourisation. **Sugar Tech**. 10 (3): 260-264.
- Guilhermino, L.; Diamantino, T.; Silva, M. C.; Soares, A. M. (2000). Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity. **Ecotoxicology Environmental Safety**. 46: 357–362.
- Hammel, K. E.; Cullen, D. (2008). Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. **Curr. Opin Plant Biol.** 11: 349-355.

- Han, N. S.; Ahmad, W. A.; Ishak, W. R. (2016). Quality characteristics of *Pleurotus sajor-caju* powder: study on nutritional compositions, functional properties and storage stability. **Sains Malaysiana**. 45 (11): 1617–1623.
- Haritash, A. K.; Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. **Journal of Hazardous Materials**. 169: 1-15.
- Harkin, J. M.; Obst, J. R. (1973). Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. **Experientia**. 29 (4): 381–387.
- Hartmeier, W. (1988). Immobilized biocatalysts: an introduction. **Berlin**: Springer Verlag.
- Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiol. Rev.** 13: 125-135.
- Hatakka, A. (2001). Biodegradation of lignin. In: Hofrichter, M.; Steinbüchel, A. Biopolymers lignin, humic substances and coal (pp. 129-180). Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Heinzkill, M.; Bech, L.; Halkier, T.; Schneider, P.; Anke, T. (1998). Characterization of laccase and peroxidase from wood-rotting fungi. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 1601- 1606.
- Heleno, S. A.; Barros, L.; Martins, A.; Morales, P.; Fernandez-Ruiz, V.; Glamoclija, J.; *et al.* (2015). Nutritional value, bioactive compounds, antimicrobial activity and bioaccessibility studies with wild edible mushrooms. **LWT-Food Science and Technology**. 63 (2): 799–806.
- Helmcke, K. J.; Aschner, M. (2010). Hormetic effect of methylmercury on *Caenorhabditis elegans*. **Toxicol. Appl. Pharm.** 248: 156–164.
- Helmcke, K. J.; Syversen, T.; Miller, D. M.; Aschner, M. (2009). Characterization of the effects of methylmercury on *Caenorhabditis elegans*. **Toxicol. Appl. Pharm.** 240: 265–272.
- Hernández, D.; Sánchez, J. E.; Yamasaki, K. (2003). A simple procedure for preparing substrate for *Pleurotus ostreatus* cultivation. **Bioresource Technology**. 90: 145–150.

- Hitchcock, D. R.; Black, M. C.; Williams, P. L. (1997). Investigations into using the nematode *Caenorhabditis elegans* for municipal and industrial wastewater toxicity testing. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 33: 252–260.
- Hitchcock, D. R.; Law, S. E.; Wu, J.; Williams, P. L. (1998). Determining toxicity trends in the ozonation of synthetic dye wastewaters using the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 34: 259–264.
- Höfer, C.; Schlosser, D. (1999). Novel enzymatic oxidation of Mn^{2+} to Mn^{3+} catalyzed by a fungal laccase. **FEBS Lett.** 451 (2): 186–190.
- Hofrichter, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology.** 30: 454-466.
- Hofrichter, M.; Vares, K.; Scheibner, K.; Galkin, S.; Sipila, J.; Hatakka, A. (1999). Mineralization and solubilization of synthetic lignin by manganese peroxidases from *Nematoloma frowardii* and *Phlebia radiata*. **J. Biotechnol.** 67: 217-228.
- Hou, H.; Zhou, J.; Wang, J.; Du, C.; Yan, B. (2004). Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochem.** 39: 1415-1419.
- Hsu, C. A.; Wen, T. N.; Su, Y. C.; Jiang, Z. B.; Chen, C. W.; Shyur, L. F. (2012). Biological degradation of anthroquinone and azo dyes by a novel laccase from *Lentinus sp.* **Environ. Sci. Technol.** 46: 5109–5117.
- Isikhuemhen, O. S.; Mikiashvili, N. A.; Adenipekun, C. O.; Ohimain, E. I.; Shahbazi, G. (2012). The tropical white rot fungus, *Lentinus squarrosulus* mont.: lignocellulolytic enzymes activities and sugar release from cornstalks under solid state fermentation. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 28: 1961–1966.
- IUBMB Enzyme Nomenclature EC 1.10.3.2. (1978). **Disponível (online)** <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/10/3/2.html> (23 de fevereiro de 2017).
- IUBMB Enzyme Nomenclature EC 1.11.1.13. (1992). **Disponível (online)** <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/11/1/13.html> (23 de fevereiro de 2017).

- IUBMB Enzyme Nomenclature EC 1.11.1.14. (2016). **Disponível (online)** <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/11/1/14.html> (19 de fevereiro de 2017).
- Iyer, G.; Chattoo, B. B. (2003). Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **FEMS Microbiology Letters**. 227: 121-126.
- Jarosz-Wilkolazka, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L. (2005). Amperometric detection of mono- and diphenols at *Cerrena unicolor* laccase-modified graphite electrode: correlation between sensitivity and substrate structure. **Talanta**. 66 (5): 1219-1224.
- Jirasripongpun, K.; Nasanit, R.; Niruntasook, J.; Chotikasatian, B. (2007). Decolorization and degradation of C. I. reactive red 195 by *Enterobacter sp.* **International Journal of Science and Technology**. 12: 6–11.
- Jung, S.-K.; Qu, X.; Aleman-Meza, B.; Wang, T.; Riepe, C.; Liu, Z.; *et al.* (2015). A multi-endpoint, high-throughput study of nanomaterial toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Environ. Sci. Technol.**
- Kachlishvili, E.; Asatiani, M.; Kobakhidze, A.; Elisashvili, V. (2016). Trinitrotoluene and mandarin peels selectively affect lignin-modifying enzyme production in white-rot basidiomycetes. **SpringerPlus**. 5 (252): 1-9.
- Kaletta, T.; Hengartner, M. O. (2006). Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nat. Rev. Drug Discov**. 5 (5): 387-399.
- Karamyshev, A. V.; Shleev, S. V.; Koroleva, O. V.; Yaropolov, A. I.; Sakharov, I. Y. (2003). Laccase catalyzed synthesis of conducting polyaniline. **Enzyme and Microbial Technology**. 33 (5): 556-564.
- Kaushik, P.; Malik, A. (2009). Fungal dye decolorization: recent advances and future potential. **Environment International**. 35: 127–141.
- Kavanag, P.; Boland, S.; Jenkins, P.; Leech, D. (2009). Performance of a glucose/O₂ enzymatic biofuel cell containing a mediated *Melanocarpus albomyces* laccase cathode in a physiological buffer. **Fuel Cells**. 9: 79-84.

- Khanna, N.; Cressman, C. P.; Tataru, C. P.; Williams, P. L. (1997). Tolerance of *Caenorhabditis elegans* to pH, salinity and hardness in aquatic medium. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 32: 1–6.
- Kilic, N. K.; Nielson, J. P.; Yuce, M.; Donmez, G. (2007). Characterization of a simple bacterial consortium for effective treatment of wastewaters with reactive dyes and Cr (VI). **Chemosphere.** 67: 826–831.
- Kirby, N.; Marchant, R.; McMullan, G. (2000). Decolourisation of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. **FEMS Microbiol. Lett.** 188: 93-96.
- Kirk, P. M.; Cannon, P. F.; Minter, D. W.; Stalpers, J. A. (2008). **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi.** 10 ed. Europe - UK: CABI, pp.784.
- Kirk, T. K.; Cullen, D. (1998). Enzimology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: Young, R.; Akhtar, M. Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry (pp. 273-308). New York: John Wiley & Sons.
- Kirk, T. K.; Farrell, R. L. (1987). Enzymatic “combustion” the microbial degradation of lignin. **Annu Rev. Microbiol.** 41: 465-505.
- Kist, C. K. (2013). Estudo da degradação de compostos nitroaromáticos utilizando fungos do gênero *Pleurotus*. **Dissertação de mestrado.** Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, PR, Brasil.
- Klonowska, A.; Gaudin, C.; Fournel, A.; Asso, M.; Le Petit, J.; Giorgi, M.; *et al.* (2002). Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30. **Eur. J. Biochem.** 269 (24): 6119–6125.
- Knie, J. L.; Lopes, E. W. (2004). Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: **FATMA/GTZ**, pp.289.
- Ko, E. M., Leem, Y. E., Choi, H. T. (2001). Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 57: 98-102.
- Kubicek, C. P. (2013). Fungi and lignocellulosic biomass. 290 p.

- Kunamneni, A.; Ballesteros, A.; Plou, F. J.; Alcalde, M. (2007). Fungal laccase e a versatile enzyme for biotechnological applications. In: Mendez-Vilas, A. Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology (pp. 233-245). **Formatex**.
- Kunamneni, A.; Ghazi, I.; Camarero, S.; Ballesteros, A.; Plou, F. J.; Alcalde, M. (2008). Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on poly-activated carriers. **Process Biochem.** 43: 169–178.
- Kuo, M. (2009). *Pleurotus pulmonarius*: the summer oyster. **Disponível (online)** http://www.mushroomexpert.com/pleurotus_pulmonarius.html (2 de março de 2017).
- Kuo, M. (2010). *Trametes hirsuta*. **Disponível (online)** http://www.mushroomexpert.com/trametes_hirsuta.html (5 de Março de 2017).
- Kuwahara, M.; Glenn, J. K.; Morgan, M. A.; Gold, M. H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters.** 169: 247-250.
- Lade, H.; Govindwar, S.; Paul, D. (2015a). Mineralization and detoxification of the carcinogenic azo dye congo red and real textile effluent by a polyurethane foam immobilized microbial consortium in an up flow column bioreactor. **International Journal of Environmental Research and Public Health.** 12: 6894–6918.
- Lade, H.; Kadam, A.; Paul, D.; Govindwar, S. (2015b). Biodegradation and detoxification of textile azo dyes by bacterial consortium under sequential microaerophilic/aerobic processes. **EXCLI Journal.** 14: 158–174.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227 (5259): 680–685.
- Lanzer, R.; Müller, M.; Dumcke, M.; Rasera, K. (2007). Comparação de testes ecotoxicológicos com *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e *Daphnia magna* (Straus, 1820) utilizando *remazol brilliant blue R* e água de arroio urbano. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** 2 (1): 27-32.

- Lechner, B. E.; Albertó, E. (2011). Search for new naturally occurring strains of *Pleurotus* to improve yields: *Pleurotus albidus* as a novel proposed species for mushroom production. **Rev. Iberoam. Micol.** 28: 148–154.
- Lechner, B. E.; Wright, J. E.; Albertó, E. (2004). The genus *Pleurotus* in Argentina. **Mycologia.** 96: 845-858.
- Leung, M. C.; Williams, P. L.; Benedetto, A.; Au, C.; Helmcke, K. J.; Aschner, M.; *et al.* (2008). *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. **Toxicol. Sci.** 106 (1): 5-28.
- Li, K.; Xu, F.; Eriksson, K. L. (1999). Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a non-phenolic lignin model compound. **Applied and Environmental Microbiology.** 65: 2654-2660.
- Liu, J.; Liu, W.; Cai, Y.; Liao, X.; Huang, Q.; Liang, X. (2014). Laccase production by *Trametes hirsuta*, characterization and its capability of decoloring chlorophyll. **Polish Journal of Microbiology.** 63 (3): 323–333.
- Lu, H.; Zhou, J.; Wang, J.; Liu, G.; Zhao, L. (2008). Decolorization of 1-aminoanthraquinone-2-sulfonic acid by *Sphingomonas xenophaga*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology.** 24: 1147–1152.
- Lyra, E. S.; Moreira, K. A.; Porto, T. S.; Carneiro da Cunha, M. N.; Paz Júnior, F. B.; Neto, B. B.; *et al.* (2009). Decolorization of synthetic dyes by basidiomycetes isolated from woods of the Atlantic Forest (PE), Brazil. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 25: 1499–1504.
- Madhavi, V.; Lele, S. S. (2009). Laccase: properties and applications. **BioResources.** 4 (4).
- Maffazzioli, T. F. (2011). Eficiência de ensaios ecotoxicológicos na detecção de toxicidade em efluentes de refinaria de petróleo. **Dissertação de mestrado.** Universidade de Caxias do Sul, 78 f. Caxias do Sul, RS, Brasil.
- Maftoun, P.; Johari, H.; Soltani, M.; Malik, R.; Othman, N. Z.; El Enshasy, H. A. (2015). The edible mushroom *Pleurotus sp.*: I. Biodiversity and nutritional values. **Int. J. Biotechnol.** 4: 67-83.

- Majeau, J. A.; Brar, S. K.; Tyagi, R. D. (2010). Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresour. Technol.** 101: 2331-2350.
- Mandels, M.; Reese, E. T. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. **J. Bacteriol.** 73 (2): 269–278.
- Martínez, A. C. (2013). Decoloración del colorante rojo ácido 27 utilizando un cultivo mixto de *Trametes versicolor* y *Pseudomonas putida*, diseñado para el tratamiento de efluentes textiles. **Tese de doutorado**. Universidade Autônoma do Estado de Hidalgo. México.
- Mayer, A. M.; Staples, R. C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry.** 60: 551-565.
- McDonald, P. W.; Jessen, T.; Field, J. R.; Blakely, R. D. (2006). Dopamine signaling architecture in *Caenorhabditis elegans*. **Cell. Mol. Neurobiol.** 26: 593–618.
- Messner, K.; Srebotnik, E. (1994). Biopulping: an overview of developments in an environmentally safe papermaking. **FEMS Microbiol. Rev.** 13: 351–365.
- Michel Jr., F. C.; Grulke, E. A.; Reddy, C. A. (1992). A kinetic model for the fungal pellet lifecycle. **AIChE J.** 38 (9): 1449–1460.
- Miki, K.; Renganathan, V.; Gold, M. H. (1986). Mechanism of β -aryl ether dimeric lignin model compound oxidation by lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemistry.** 25: 4790–4796.
- Min, K. L.; Kim, Y. H.; Kim, Y. W.; Jung, H. S.; Hah, Y. C. (2001). Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. **Arch. Biochem. Biophys.** 392: 279-286.
- Moldes, D.; Lorenzo, M.; Sanromán, M. A. (2004). Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. **Biotechnol. Lett.** 26 (4): 327-330.
- Montoya, S.; Orrego, C. E.; Levin, L. (2012). Growth, fruiting and lignocellulolytic enzyme production by the edible mushroom *Grifola frondosa* (maitake). **World J. Microbiol. Biotechnol.** 28 (4): 1533-1541.

- Montoya, S.; Sánchez, Ó. J.; Levin, L. (2015). Production of lignocellulolytic enzymes from three white-rot fungi by solid-state fermentation and mathematical modeling. **African Journal of Biotechnology**. 14 (15): 1304-1317.
- Moonmoon, M.; Uddin, M. N.; Ahmed, S.; Shelly, N. J.; Khan, M. A. (2010). Cultivation of different strains of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) on saw dust and rice straw in Bangladesh. **Saudi J. Biol. Sci.** 17: 341-345.
- Morisaki, K.; Fushimi, T.; Kaneko, S.; Kusakabe, I.; Kobayashi, H. (2001). Screening for phenoloxidases from edible mushrooms. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 65 (10): 2334-2336.
- Munari, F. M.; Gaio, T. A.; Calloni, R.; Dillon, A. J. (2008). Descolorization of textile dyes by enzymatic extract and submerged cultures of *Pleurotus sajor-caju*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 24: 1383-1392.
- Niebisch, C. H.; Malinowsk, A. K.; Schadeck, R.; Mitchell, D. A.; Cordeiro, V. K.; Pabaa, J. (2010). Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract. **Journal of Hazardous Materials**. 180: 316–322.
- Nigam, P.; Singh, D. (1994). Solid state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. **J. Basic Microbiol.** 34: 405-414.
- Nishida, T.; Yoshinori, K.; Mimura, A.; Takahara, Y. (1988). Lignin biodegradation by wood-rotting fungi I. Screening of lignin-degrading fungi. **Mokuzai Gakkaishi**. 34: 530–536.
- Novotný, C.; Erbanová, P.; Cajthaml, T.; Rolhschild, N.; Dosoretz, C.; Sasek, V. (2000). *Irpex lacteus*, a white-rot fungus applicable to water and soil bioremediation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 54: 850-853.
- Novotný, C.; Svobodova, K.; Kasinath, A.; Erbanova, P. (2004). Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions. **International Biodeterioration and Biodegradation**. 54: 215–223.
- Nozaki, K.; Beh, C. H.; Mizuno, M.; Isobe, T.; Shiroishi, M.; Kanda, T. (2008). Screening and investigation of dye decolorization activities of basidiomycetes. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 105: 69–72.

- Nyanhongo, G. S.; Gomes, J.; Gübitz, G.; Zvauya, R.; Read, J. S.; Steiner, W. (2002). Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. **Bioresour. Technol.** 84: 259–263.
- Nyanhongo, G. S.; Gübitz, G.; Sukyai, P.; Leitner, C.; Haltrich, D.; Ludwig, R. (2007). Oxidoreductases from *Trametes sp.* **Food Technol. Biotechnol.** 45 (3): 250–268.
- O'Neill, C.; Hawkes, F. R.; Hawkes, D. L.; Lourenco, N. D.; Pinheiro, H. M.; Delee, W. (1999). Color in textile effluents sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology.** 74: 1009–1018.
- Obara, F. W.; Varéa-Pereira, G.; Miyagui, D. T.; Silva, M. L. (2005). Purificação de lacases PPO-I de *Botryosphaeria rhodina*. **Acta Sci. Biol. Sci.** 27: 303-310.
- Obst, J. R. (1982). Guaiacyl and syringyl lignis composition in hardwood cell components. **Holzforschung.** 36 (3): 143-152.
- Orlandelli, R. C.; Specian, V.; Felber, A. C.; Pamphile, J. A. (2012). Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Rev. Saúde e Biol.** 7 (3): 97-109.
- Osma, J. F.; Herrera, J. L.; Couto, S. R. (2007). Banana skin: a novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions. Application to synthetic dye decolouration. **Dyes and Pigments.** 75: 32-37.
- Osma, J. F.; Herrera, J. L.; Couto, S. R. (2011). Cost analysis in laccase production. **Journal of Environmental Management.** 92: 2907-2912.
- Palmieri, G.; Cennamo, G.; Faraco, V.; Amoresano, A.; Sannia, G.; Giardina, P. (2003). Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. **Enzyme Microbiol. Technol.** 33: 220-230.
- Palmieri, G.; Giardina, P.; Bianco, C.; Fontanella, B.; Sannia, G. (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology.** 66 (3): 920–924.
- Palmieri, G.; Giardina, P.; Bianco, C.; Scaloni, A.; Capasso, A.; Sannia, G. (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. **J. Biol. Chem.** 272: 31301-31307.

- Pandey, A. (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochem.** 27: 109–117.
- Pandey, A.; Singh, P.; Iyengar, L. (2007). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. **International Biodeterioration and Biodegradation.** 59: 73–84.
- Papinutti, V. L.; Diorio, L. A.; Forchiassin, F. (2003). Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 30: 157–160.
- Patrabansh, S.; Madan, M. (1997). Studies on cultivation, biological efficiency and chemical analysis of *Pleurotus sajor-caju* (FR.) singer on different bio-wastes. **Acta Biotechnology.** 17 (2): 107-122.
- Patrick, F.; Mtui, G.; Mshandete, A. M.; Kivaisi, A. (2011). Optimization of laccase and manganese peroxidase production in submerged culture of *Pleurotus sajor-caju*. **African Journal of Biotechnology.** 10 (50): 10166-10177.
- Peixoto, F.; Marinho, G.; Rodrigues, K. (2013). Corantes têxteis: uma revisão. **HOLOS.** 5 (29): 98-106.
- Pelczar Jr., M. J.; Chan, E. C.; Krieg, N. R. (1997). Microbiologia: conceitos e aplicações. 2a ed. **Pearson Makron Books.**
- Penteado, J. C.; Vaz, J. M. (2001). The legacy of the polychlorinated biphenyls (PCBs). **Química Nova.** 24 (3): 390-398.
- Perez, J.; Martinez, J.; de la Rubia, T. (1996). Purification and partial characterization of a laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavidio-alba*. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 4263-4267.
- Piontek, K.; Antorini, M.; Choinowski, T. (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90 Å resolution containing a full complement of coppers. **J. Biol. Chem.** 227: 37663–37669.
- Pozdnyakova, N. N.; Rodakiewicz-Nowak, J.; Turkovskaya, O. V. (2004). Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. **J. Mol. Catal. B.: Enzym.** 30: 19-24.

- Putzke, J.; Putzke, M. T. (1998). Os reinos dos fungos. Santa Cruz do Sul: **EDUNISC**. v.1, 606 pp.
- Quintanar, L.; Stoj, C.; Taylor, A. B.; Hart, P. J.; Kosman, D. J.; Solomon, E. I. (2007). Shall we dance? How a multicopper oxidase chooses its electron transfer partner. **Acc. Chem. Res.** 40 (6): 445-452.
- Ragunathana, R.; Swaminathan, K. (2003). Nutritional status of *Pleurotus sp.* grown on various agro-wastes. **Food Chemistry**. 80: 371–375.
- Rancaño, G.; Lorenzo, M.; Molares, N.; Couto, S. R.; Sanromán, M. A. (2003). Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentor. **Process Biochemistry**. 39: 467-473.
- Rasera, K.; Ferla, J.; Dillon, A. J.; Riveiros, R.; Zeni, M. (2009). Immobilization of laccase from *Pleurotus sajor-caju* in polyamide membranes. **Desalination**. 245: 657-661.
- Ravindran, N.; Balasubramani, G. (2014). Role of white rot fungi in textile dye degradation. **International Journal of Advances in Interdisciplinary Research**. 1 (2): 38-44.
- Reck, M. A. (2009). Políporos (basidiomycota) em remanescentes da mata atlântica *sensu stricto* no Rio Grande do Sul, Brasil. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. RS, Brasil.
- Reddy, K. R.; Chinthamreddy, S. (1999). Electrokinetic remediation of heavy metal contaminated soils under reducing environments. **Waste Management**. 19 (4): 269-282.
- Reid, I. D.; Paice, M. G. (1994). Effect of residual lignin type and amount on bleaching of kraft pulp by *Trametes versicolor*. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 1395–1400.
- Rodríguez, S.; Fernández, M.; Bermúdez, R. C. (2003). Tratamiento de efluentes industriales coloreados com *Pleurotus sp.* **Rev. Iberoam Micol.** Santiago de Cuba, n.20, 164-168.
- Rodríguez-Rodríguez, C. E.; Jelić, A.; Llorca, M.; Farré, M.; Caminal, G.; Petrović, M.; *et al.* (2011). Solid-phase treatment with the fungus *Trametes versicolor* substantially reduces pharmaceutical concentrations and toxicity from sewage sludge. **Bioresource Technology**. 102: 5602-5608.

- Rosa, L. O. (2013). Levantamento de macrofungos (filo basidiomycota, subfilo agaricomycotina) do nordeste do Rio Grande do Sul e avaliação do seu potencial ligninolítico. **Dissertação de mestrado**. Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Instituto de Biotecnologia, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, RS, Brasil.
- Rosalen, I. A.; Monteiro, R. T.; Dellamatrice, P. M.; Kamida, H. M. (2004). Biodegradação de efluente têxtil e nove corantes técnicos utilizando fungos basidiomicetos. **Revista Química Têxtil**. 76: 44-52.
- Rosales, E.; Couto, S. R.; Sanromán, M. A. (2007). Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings. **Enzyme and Microbial Technology**. 40: 1286–1290.
- Ruiz-Duenas, F. J.; Martinez, A. T. (2009). Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. **Microbial. Biotechnol.** 2: 164-177.
- Ryvarden, L.; Johansen, I. (1980). A preliminary polypore flora of east Africa. **Fungiflora**. Oslo.
- Sadhasivam, S.; Savitha, S.; Swaminathan, K.; Lin, F.-H. (2008). Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. **Process Biochemistry**. 43: 736–742.
- Said, S.; Pietro, R. (2002). Enzimas de interesse industrial e biotecnológico. Rio de Janeiro: **Eventos**, 121 pp.
- Salgado, B. C.; Nogueira, M. I.; Rodrigues, K. A.; Sampaio, G. M.; Buarque, H. L.; Araújo, R. S. (2009). Descoloração de efluentes aquosos sintéticos e têxtil contendo corantes índigo e azo via processos fenton e foto-assistidos (UV e UV/H₂). **Eng. Sanit. Ambient.** 14 (1): 1-8.
- Sanchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi . **Biotechnol. Adv.** 27 (2): 185–194.

- Sant'Anna Jr., G. L. (2001). Produção de enzimas microbianas. In: Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzane, W. *Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos* (v.3, pp. 351-362). São Paulo: **Edgard Blücher**.
- Saratale, R. G.; Saratale, G. D.; Chang, J. S.; Govindwar, S. P. (2009). Decolorization and biodegradation of textile dye navy blue HER by *Trichosporon beigelii* NCIM-3326. **Journal of Hazardous Materials**. 166: 1421–1428.
- Sardrood, B. P.; Goltapeh, E. M.; Varma, A. (2013). Ecophysiology of fungal bioremediation. In: Goltapeh, E. M.; Danesh, Y. R.; Editors, A. V. *Fungi as bioremediators*. **Springer**, pp. 3-28.
- Scherer, M.; Fischer, R. (1998). Purification and characterisation of laccase II of *Aspergillus nidulans*. **Arch. Microbiol.** 170: 78–84.
- Schmidt, T. M. (2006). The maturing of microbial ecology. **Int. Microbiol.** 9: 217–223.
- Schmitt, S.; Souza, R. d.; Bettin, F.; Dillon, A. J.; Valle, J. A.; Andreaus, J. (2012). Decolorization of aqueous solutions of disperse textile dyes by oxidoreductases. **Biocatalysis and Biotransformation**. 30: 48-56.
- Schroeder, M.; Pöllinger-Zierler, B.; Aichernig, N.; Siegmund, B.; Guebitz, G. M. (2008). Enzymatic removal of off-flavors from apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56: 2485-2489.
- Shah, S.; Ghosh, D.; Mallick, S. K.; Sarangi, I.; Bhutia, S. K.; Banerje, I.; *et al.* (2007). Immunomodulatory and antitumor activities of water-soluble proteoglycan isolated from the fruiting bodies of culinary-medicinal oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. **International Journal of Medicinal Mushroom**. 9: 123-138.
- Shedbalkar, U.; Dhanve, R.; Jadhav, J. (2008). Biodegradation of triphenylmethane dye cotton blue by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517. **Journal of Hazardous Materials**. 157: 472–479.
- Silva, E. G.; Dias, E. S.; Siqueira, F. G.; Schwan, R. F. (2007). Análise química de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 27 (1): 72-75.

- Silva, R.; Gomes, E. (2004). Ligninases. In: Said, S.; Pietro, R. C. Enzimas como agentes biotecnológicos (pp. 349-379). Ribeirão Preto, SP: **Legis Summa**.
- Silveira, V. D. (1995). Micologia. Rio de Janeiro: **Âmbito Cultural**. 5 ed. 336 pp.
- Singh, A.; Ward, O. P. (2004). Biodegradation and bioremediation. **Series: Soil Biology**. v.2, Springer-Verlag, New York.
- Smits, J. P.; Rinzema, A.; Tramper, J.; Sonsbeek, H. M.; Knol, W. (1996). Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM9414: substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics. **Applied Microbiol. Biotechnol.** 46: 489-496.
- Solomon, E. I.; Sundaram, U. M.; Machonkin, T. E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. **Chem. Rev.** 96: 2563-2606.
- Souza, A. F.; Rosado, F. R. (2009). Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**. 2 (1): 121-139.
- Strong, P. J.; Claus, H. (2011). Laccase: a review of its past and its future in bioremediation. **Environmental Science and Technology**. 41: 373-434.
- Sun, J.; Hu, Y. Y.; Bi, Z.; Cao, Y. Q. (2009). Simultaneous decolorization of azo dye and bioelectricity generation using a microfiltration membrane air-cathode single chamber microbial fuel cell. **Bioresource Technology**. 100: 3185–3192.
- Swamy, J.; Ramsay, J. A. (1999). The evaluation of white-rot fungi in the decolouration of textile dyes. **Enzyme and Microbial Technol.** 24: 130-137.
- Tan, Y. H.; Wahab, M. N. (1997). Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 13 (6): 613-617.
- Taofiq, O.; Heleno, S. A.; Calhelha, R. C.; Alves, M. J.; Barros, L.; Barreiro, M. F.; *et al.* (2016). Development of mushroom-based cosmeceutical formulations with anti-inflammatory anti-tyrosinase, antioxidant and antibacterial properties. **Molecules**. 21 (1372): 1-12.

- Tavares, A. M.; Coelho, M. A.; Coutinho, J. A.; Xavier, A. M. (2005). Laccase improvement in submerged cultivation: induced production and kinetic modeling. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 80: 669-676.
- Teplyakova, T. V.; Kosogova, T. A. (2016). Antiviral effect of agaricomycetes mushrooms (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms.** 18 (5): 375–386.
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. **Microbiol.** 140: 19-26.
- Tien, M.; Kirk, T. T. (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium* purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 81 (8): 2280–2284.
- Tinoco, R.; Pickard, M. A.; Vazquez-Duhalt, R. (2001). Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. **Lett. Appl. Microbiol.** 32: 331-335.
- Tisma, M.; Zelic, B.; Vasic-Racki, D. (2010). White-rot fungi in phenols, dyes and other xenobiotics treatment - a brief review. **Croatian Journal of Food Science and Technology.** 2: 34-47.
- Trudeau, F.; Daigle, F.; Leech, D. (1997). Reagentless mediated laccase electrode for the detection of enzyme modulators. **Anal. Chem.** 69: 882-886.
- Vares, T.; Kalsi, M.; Hatakka, A. (1995). Lignin peroxidases, manganese peroxidases and other ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 3515–3520.
- Viswanath, B.; Rajesh, B.; Janardhan, A.; Kumar, A. P.; Narasimha, G. (2014). Fungal laccases and their applications in bioremediation. **Hindawi Publishing Corporation - Enzyme Research.**
- Wang, K. F.; Hu, J. H.; Guo, C.; Liu, C. Z. (2016). Scale-up laccase production from *Trametes versicolor* stimulated by vanillic acid. **Bioprocess Biosyst. Eng.** 39 (7): 1041–1049.
- Wasser, S. P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 60: 258-274.

- Wolfenden, R. S.; Willson, R. L. (1982). Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **J. Chemical Society Perkin Transactions.** 2: 805-812.
- Wong, D. W. (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 157: 174–209.
- Wood, D. A. (1980). Productions, purifications and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. **J. Gen. Microbiol.** 117: 327–338.
- Xu, F. (1996). Oxidation of phenols, anilines and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. **Biochemistry.** 35: 7608-7614.
- Xu, F. (1997). Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. **J. Biol. Chem.** 272: 924-928.
- Zanoni, M. V.; Carneiro, P. A. (2001). Corantes têxteis e o meio ambiente. **Ciência Hoje.**
- Zhao, X.; Hardin, I. (2007). HPLC and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*. **Dyes and Pigments.** 73: 322–325.
- Zhao, Y. L.; Wu, Q. L.; Li, Y. P.; Wang, D. Y. (2013). Translocation, transfer and in vivo safety evaluation of engineered nanomaterials in the non-mammalian alternative toxicity assay model of nematode *Caenorhabditis elegans*. **RSC Adv.** 3 (17): 5741-5757.
- Zhu, M.; Zhang, G.; Meng, L.; Wang, H.; Gao, K.; Ng, T. (2016). Purification and characterization of a white laccase with pronounced dye decolorizing ability and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from *Lepista nuda*. **Molecules.** 21 (415).