

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

**MACROFUNGOS AMAZÔNICOS PRODUTORES DE FENOL-
OXIDASES PARA DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS**

JÉSSICA SOUZA DA COSTA

MANAUS - AM

2015

JÉSSICA SOUZA DA COSTA

**MACROFUNGOS AMAZÔNICOS PRODUTORES DE FENOL-
OXIDASES PARA DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Agroflorestal.

Orientadora: DRA. CECI SALES-CAMPOS

Co-orientadora: DRA. MARLI CAMASSOLA

MANAUS - AM

2015

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C837m Costa, Jéssica Souza da
Macrofungos amazônicos produtores de fenol-oxidases para
descoloração de corantes têxteis / Jéssica Souza da Costa. 2015
122 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Ceci Sales Campos
Coorientadora: Marli Camassola
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Fungos lignocelulolíticos. 2. Lacase. 3. Corantes. 4.
Descoloração. I. Campos, Ceci Sales II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

JÉSSICA SOUZA DA COSTA

**MACROFUNGOS PRODUTORES DE FENOL-OXIDASES PARA
DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Agroflorestal.

Comissão Examinadora

Dra. Ceci Sales-Campos

Dra. Antônia Souza

Dr. Ademir Castro e Silva

Manaus, Am ____ de _____ de 2015

Aos meus pais, Carlos e Naza, por me ensinarem valiosas lições de vida e me ajudarem a chegar aqui. A Débora e Nicole por serem as melhores irmãs que eu poderia ter.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus por conduzir meus caminhos, orientar minhas decisões e me dar força para continuar mesmo quando os meus olhos não enxergavam solução. A ele toda Honra e toda Glória.

À minha família pelas palavras de encorajamento e apoio incondicional.

À Prof Dra. Ceci Sales e Prof. Dra Marli Camassola pela orientação, confiança e incentivo ao logo deste projeto.

À Dra. Roselei Claudete Fontana pela disponibilidade e paciência ao me ensinar, profissionais como você me inspiram a continuar minha jornada acadêmica.

À Dra. Maria Aparecida pela importante colaboração com o trabalho e principalmente por sua amizade.

À todos os amigos do Laboratório de Enzimas e Biomassa da Universidade de Caxias do Sul (UCS) apesar da distância vocês moram no meu coração.

Às minhas amigas de profissão Lorena, Anne, Karem e Jeane pelas gargalhadas, palavras de incentivo e colaboração. A amizade de vocês é um presente de Deus.

Às minhas amigas de toda vida, Ananda e Sara muito obrigada pelo apoio e paciência, com vocês por perto tudo fica mais especial.

Ao meus chefes, Eva e Nagao pelo incetivo e compreensão e a todos os amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas.

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas pelo investimento em minha formação acadêmica.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e a Universidade de Caxias do Sul por propiciarem a estrutura necessária para realização deste projeto.

Enfim, a todos que torceram pela concretização deste sonho!

*“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,
mais evidente fica nossa ignorância”.*

(John F. Kennedy)

RESUMO

Os efluentes produzidos pela indústria têxtil apresentam coloração intensa causando grande impacto em corpos d'água. Os métodos utilizados no tratamento desses rejeitos industriais são, muitas vezes, ineficazes, sendo necessário buscar novas estratégias mais eficientes. Uma destas, a biodegradação, consiste no uso de microrganismos ou suas enzimas na degradação dos corantes presentes nos efluentes industriais. Neste trabalho foi estudada a produção de enzimas fenol-oxidases por *Auricularia* sp., *Corioloopsis* sp. e *Lentinus crinitus* em cultivo líquido e em estado sólido durante 14 dias. A caracterização enzimática de lacases foi realizada com as amostras que apresentaram os picos de atividade enzimática para cada um dos isolados selecionados, em cultivo em estado sólido e submerso. Para avaliar o potencial de descoloração, 23 corantes foram expostos a ação enzimática durante 72 h. Para este teste foram selecionadas as amostras com maior atividade de lacase. Após a degradação enzimáticas, foram realizados ensaios de toxicidade dos efluentes com *Daphnia magna*. No cultivo em estado sólido a maior produção de lacase (502,7 U/g) foi dosada no substrato marupá por *Auricularia* sp. No cultivo líquido, *Corioloopsis* sp. obteve maior atividade (567,14 UI/ml). As lacases obtidas do cultivo líquido apresentaram temperatura ótima de 45 °C, enquanto a maiores atividades de lacases foram entre 35° C e 45 ° C, para cultivo em estado sólido. Quanto ao pH, em tampão acetato de sódio as maiores atividades ficaram entre 4,0 - 4,5. No tampão McIlvaine ficaram entre 3,0 - 4,0. No teste de descoloração, os extratos enzimáticos de *Corioloopsis* sp. e *L. crinitus* degradaram os corantes *Brillante green* e *Bromocresol green*. Os corantes *Acid Blue 80*, *Remazol brilliant blue*, *Azul Reativo Kn*, *Reactive blue 220* e *Acid green*, da classe antraquinona, após tratamento com lacases de *L. crinitus* descoloriram quando comparados ao controle. Os extratos de lacase não foram eficientes na degradação dos azocorantes, apenas o *Congo red* foi degradado por lacases de *Auricularia* sp. e *L. crinitus*. Para o ensaio de toxicidade foram utilizados os extratos brutos de cultivo líquido dos três Agaricomycetes. Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda sobre *D. magna* permitem demonstrar que após ação das enzimas sobre o corante RBBR a solução com maior nível de toxicidade foi a de *Corioloopsis* sp. (Fator de toxidade FT= 32), seguida por *L. crinitus* (FT= 16) e *Auricularia* sp. (FT= 8). Por outro lado a solução com RBBR não apresentou morte dos indivíduos a partir da concentração de 50% (FT=2). Tal fato demonstra que o corante puro foi menos tóxico do que quando degradado pelas enzimas fúngicas. Deste modo a remoção da cor de um efluente não pode ser interpretada como detoxificação. Os resultados indicam o potencial de *Auricularia* sp., *Corioloopsis* sp. e *L. crinitus* para aplicação industrial e constituem o ponto de partida para a utilização de lacases provenientes destas linhagens em processos de remoção de corantes de efluentes têxteis.

Palavras chave: Fungo, Enzima, Corantes têxteis, Biodegradação, Lacase.

ABSTRACT

The effluent produced by the textile industry have intense coloration causing great impact on bodies of water. The methods used in the treatment of these industrial wastes are often ineffective, being necessary to seek new and more effective strategies. One of these, biodegradation refers to the use of microorganisms or their enzymes in the degradation of dyes present in the effluent. In this work the production of phenol oxidase enzymes by *Auricularia* sp., *Corioloopsis* sp. and *L. crinitus* in liquid cultivation and solid state for 14 days. The laccase enzyme characterization was performed using samples which showed the enzyme activity peaks for each of the selected isolates, both in submerged in a solid state. To evaluate the potential of discoloration, 23 dye were exposed to enzymatic action for 72 h. For this test the samples with the highest laccase activity were selected. After enzymatic degradation, toxicity to *Daphnia magna* effluent assays were performed. In cultivating a solid to increased production of laccase (502, 7 U / g) was measured in marupá substrate by *Auricularia* sp. In liquid culture, *Corioloopsis* sp. obtained the highest activity (567,14 IU / ml). Laccases obtained from liquid culture showed optimum temperature of 45 °C, while the highest activities of laccases were between 35 C and 45 C, for cultivation in the solid state. The pH in sodium acetate buffer the highest activities were between 4,0 – 4,5. In McIlvaine buffer were between 3,0 – 4,0. In the bleaching test, enzyme extracts *Corioloopsis* sp. and *L. crinitus* degraded dyes *Brillante green* and *Bromocresol green*. The dye *Acid Blue 80*, *Remazol brilliant blue*, *Reactive Blue Kn*, *Reactive Blue 220* and *Acid green*, the anthraquinone class, after treatment with laccase *L. crinitus* decolorized when compared to the control. The laccase extracts were not effective in the degradation of azo-dyes, only the *Congo red* was degraded by laccase *Auricularia* sp. and *L. crinitus*. For the toxicity test were used crude extracts liquid cultivation of the three Agaricomycetes. The results obtained in acute toxicity tests on *D. magna* establish that after the action of enzymes on the dye *RBBR* the solution with the highest level of toxicity was the *Corioloopsis* sp. (Toxicity factor (TF) = 32), followed by *L. crinitus* (TF = 16) and *Auricularia* sp. (TF = 8). On the other hand the solution with *RBBR* showed no death of individuals from the concentration of 50% (TF = 2). This fact demonstrates that the pure dye was less toxic than when degraded by the fungal enzymes. Thus removal of an effluent color can not be interpreted as detoxification. The results indicate the potential of *Auricularia* sp., *Corioloopsis* sp. and *L. crinitus* for industrial application and are the starting point for the use of laccases from these strains in processes of removal of dyes from textile effluents.

Keywords: Fungi, Enzyme, Textile dye, Biodegradation, Laccase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Lentinus crinitus</i> crescendo em galho caído na área do Hotel Berro de d'Água, Presidente Figueiredo, Amazonas	28
Figura 2. Ciclo catalítico da LiP	32
Figura 3. Ciclo catalítico da MnP	33
Figura 4. Ciclo catalítico de Lacase.....	35
Figura 5. Estrutura dos corantes da classe antraquinona. <i>Acid blue 80</i> (A), <i>Azul Reativo Kn</i> (B), <i>Reactive blue</i> (C), <i>Acid green 28</i> (D), <i>Remazol brilhante blue</i> (E)....	49
Figura 6. Estruturas dos azocorantes.....	50
Figura 7. Estruturas dos corantes da classe trifenilmetano.....	51
Figura 8. Cinética do crescimento micelial de Agaricomycetes.....	54
Figura 9. Crescimento micelial de <i>Tyromyces</i> sp. (A), <i>L. crinitus</i> (B), <i>Corioloopsis</i> sp. (C) e <i>Auricularia</i> sp. (D) em diferentes temperaturas e meios de cultivos (E; F; G).	55
Figura 10. Halos formados por Agaricomycetes em meio com ácido gálico após 5 dias de crescimento	58
Figura 11. Descoloração do <i>Remazol brilliant blue</i> por Agaricomycetes após 5 dias de crescimento	58
Figura 12. Halos formados por Agaricomycetes em meio com verde de malaquita após 5 dias de crescimento.....	59
Figura 13. Valores médios da atividade de enzimas modificadoras de lignina obtidos no cultivo sólido de <i>Corioloopsis</i> sp., <i>Auricularia</i> sp. e <i>L. crinitus</i>	61
Figura 14. Perfil de secreção de lacases durante o cultivo líquido de <i>Corioloopsis</i> sp., <i>Auricularia</i> sp. e <i>L. crinitus</i>	62
Figura 15. Variação dos valores de pH e biomassa micelial de <i>Corioloopsis</i> sp. (A), <i>L. crinitus</i> (B) e <i>Auricularia</i> sp. (C).....	64
Figura 16. Valores médios da atividade de enzimas modificadoras de lignina obtidos no cultivo sólido de <i>Corioloopsis</i> sp., <i>Auricularia</i> sp. e <i>L. crinitus</i>	66
Figura 17. Valores médios da atividade de enzimas modificadoras de lignina obtidos no cultivo sólido de <i>Corioloopsis</i> sp., <i>Auricularia</i> sp. e <i>L. crinitus</i>	67
Figura 18. Valores médios da atividade de lacase obtidos no cultivo sólido em Marupá e Cajuí. Atividade de lacase de <i>Corioloopsis</i> sp. ao longo de 14 dias de cultivo (A). Atividade de lacase de <i>Auricularia</i> sp. (B); Atividade de lacase durante cultivo de <i>L. crinitus</i> (C).....	68

Figura 19. Variação dos valores de pH e biomassa micelial de <i>Auricularia</i> sp., <i>L. crinitus</i> e <i>Corioloopsis</i> sp. cultivado nas serragens marupá (A, C, E) e cajuí (B,D,F),	72
Figura 20. Efeito do pH na atividade de lacases obtidas de extratos de <i>Corioloopsis</i> sp. (A), <i>L. crinitus</i> (B) e <i>Auricularia</i> sp. (C) em cultivo sólido.	74
Figura 21. Efeito do pH na atividade de lacases obtidas de extratos de <i>Corioloopsis</i> sp. (A), <i>L. crinitus</i> (B) e <i>Auricularia</i> sp. (C) em cultivo líquido.	75
Figura 22. Efeito do pH na atividade de lacases obtidas de extratos de <i>Auricularia</i> sp., <i>Corioloopsis</i> sp. e <i>L. crinitus</i> em cultivo sólido. As análises foram realizadas com tampão Acetato de sódio e ABTS como substrato	76
Figura 23. Efeito do pH na atividade de lacases obtidas de extratos de <i>Auricularia</i> sp., <i>Corioloopsis</i> sp. e <i>L. crinitus</i> em cultivo líquido.	76
Figura 24. Efeito da temperatura na atividade de lacases obtidas de extratos de crescimento de <i>Auricularia</i> sp., <i>Corioloopsis</i> sp. e <i>L. crinitus</i> em cultivo líquido.	78
Figura 25. Efeito da temperatura na atividade de lacases obtidas de extratos de <i>Auricularia</i> sp., <i>Corioloopsis</i> sp. e <i>L. crinitus</i> em cultivo sólido	79
Figura 26. Termoestabilidade de lacases de <i>Corioloopsis</i> sp. a 30,35, 40 e 45°C após 72 h, utilizando ABTS como substrato em tampão acetato, pH 4	82
Figura 27. Termoestabilidade do extrato de lacases a 30,35, 40 e 45°C após 72 h, utilizando ABTS como substrato em tampão acetato de sódio, pH 4. Extrato bruto de lacase de <i>L. crinitus</i> obtidas em meio com Cajuí (A) e Marupá (B). Extrato bruto de lacase de <i>Auricularia</i> sp. obtidas em meio com Cajuí (C) e Marupá (D).	83
Figura 28. Termoestabilidade do extrato de lacases a 30,35, 40 e 45°C após 72 h, utilizando ABTS como substrato em tampão acetato de sódio. Extrato bruto de lacase de cultivo líquido de <i>Corioloopsis</i> sp. (A), <i>L. crinitus</i> (B) e <i>Auricularia</i> sp. (C).	84
Figura 29. Termoestabilidade de lacases de <i>Corioloopsis</i> sp. a 30, 35, 40 e 45°C após 72 h, utilizando ABTS como substrato tampões Mc'Ilvaine, pH 4. Extrato bruto de lacase obtidas em meio com Cajuí (A). Extrato bruto de lacase obtidas em meio com Marupá (B)	86
Figura 30. Termoestabilidade do extrato de lacases a 30,35, 40 e 45°C após 72 h, utilizando ABTS como substrato em tampão Mc'Ilvaine. Extrato bruto de lacase de <i>Auricularia</i> sp. obtidas em meio com Cajuí (A) e Marupá (B). Extrato bruto de lacase de <i>L. crinitus</i> obtidas em meio com Cajuí (C) e Marupá (D).....	84

Figura 31. Termoestabilidade do extrato de lacases a 30,35, 40 e 45°C após 72 h, utilizando ABTS como substrato em tampão Mc'Ilvaine. Extrato bruto de lacase de cultivo líquido de <i>Corioloopsis</i> sp. (A), <i>L. crinitus</i> (B) e <i>Auricularia</i> sp. (C).	87
Figura 32. Perfil da atividade de lacases obtidas de cultivo sólido (A) e cultivo submerso (B), separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida revelado com ABTS.	89
Figura 33. Degradação de corantes em presença de 5 U/mL de lacases de <i>Corioloopsis</i> sp. (Cor 1). Mudança no aspecto do corante <i>Acid blue</i> (a 1; a 2; a 3) e <i>Brilliant Green</i> (f 4; f 5; f 6) quando comparados ao controle	90
Figura 34. Diminuição da absorbância de corantes do grupo Trifenilmetano ao longo de 24 horas por extratos de lacase.	91
Figura 35. Diminuição da absorbância de corantes do grupo Trifenilmetano ao longo de 24 horas por extratos de lacase por Cor 1 (A), Cor 4 (B), Lcr 3 (C) e Lcr 6 (D). .	92
Figura 36. Degradação do azocorante <i>Congo red</i> por lacases de Aur 2 (B) e Lcr 3 (C). No Controle foi adicionado apenas corante e água (A).	93
Figura 37. Diminuição da absorbância de corantes do grupo azo corantes ao longo de 24 horas após tratamento enzimático. Extratos de lacase de Lcr 3 (A), Lcr 6 (B).	94
Figura 38. Diminuição da absorbância de corantes do grupo azo corantes após tratamento enzimático.	95
Figura 39. Degradação de corantes da classe antraquinona por Lcr 3 (B). No Controle foi adicionado apenas corante e água (A).	96
Figura 40. Diminuição da absorbância de corantes do grupo antraquinonas ao longo de 24 horas. Extratos de lacase de <i>Corioloopsis</i> sp.- CS (A), <i>Corioloopsis</i> sp.- CES (B), <i>L. crinitus</i> - CS 3 (C) e <i>L. crinitus</i> - CES (D).	97
Figura 41. Diminuição da absorbância de corantes do grupo antraquinonas corantes após tratamento enzimático com por extratos de lacase de Aur 2 (A) e Aur 5 (B).	98
Figura 42. Mortalidade de <i>D. magna</i> em função da diluição das soluções com corante <i>RBBR</i> degradados por extratos enzimáticos de diferentes macrofungos.	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de corantes têxteis	22
Tabela 2. Relação dos fungos lignocelulolíticos.....	27
Tabela 3. Relação de azo corantes empregados nos ensaios de descoloração.....	48
Tabela 4. Corantes trifenilmetanos utilizados nos ensaios de descoloração	48
Tabela 5. Relação de corantes da classe antraquinona.....	48
Tabela 6. Análise qualitativa da degradação de corantes por macrofungos	57
Tabela 7. Atividade enzimática de fungos lignocelulolíticos em cultivo líquido.	63
Tabela 8. Produção enzimática de Agaricomycetes em diferentes substratos lignocelulósicos em cultivos em estado sólido	70
Tabela 9. Macrofungos com diferentes pH's ótimos.....	77
Tabela 10. Temperatura ótima de lacase	80
Tabela 11. Aspectos físico-químicos da degradação de RBBR por lacases de macrofungos.....	101

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. INDÚSTRIA TÊXTIL.....	18
2.2. CORANTES TÊXTEIS.....	19
2.3. POLUIÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS	20
2.3.1. Problemática da cor para o ambiente	21
2.3.2. Toxicidade	21
2.3.3. <i>Daphnia magna</i>	23
2.4. TRATAMENTOS DE EFLUENTES DA INDÚSTRIA TÊXTIL	24
2.5. FUNGOS LIGNOCELULOLÍTICOS	25
2.5.1. Fungos da podridão branca	26
2.5.1.1. <i>Lentinus crinitus</i> (Linn.) Fr.	27
2.5.1.2. <i>Corioloopsis</i> sp.....	29
2.5.1.3. <i>Auricularia</i> sp.....	29
2.5.2. Fungos de Podridão Parda	30
2.5.2.1. <i>Tyromyces</i> sp.	30
2.6. ENZIMAS MODIFICADORAS DE LIGNINA.....	31
3. OBJETIVOS	39
3.1. GERAL	39
3.2. ESPECÍFICOS	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	40
4.2. CINÉTICA MICELIAL.....	40
4.3. ANÁLISE QUALI-QUANTITATIVA DE FENOL-OXIDASES DOS ISOLADOS ...	41
4.3.1. Meios para as análises enzimáticas quali-quantitativas	41
4.4. ANÁLISES QUANTITATIVAS DE FENOL-OXIDASES DOS ISOLADOS	42
4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS	43
4.5.1. Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)	44
4.5.2. Biomassa micelial	44

4.6. DETERMINAÇÕES ENZIMÁTICAS	44
4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
4.8. CARACTERIZAÇÃO DE LACASES DOS MACROFUNGOS	46
4.8.1. Efeito do pH sobre a atividade de lacases	46
4.8.2. Temperatura ótima da atividade de lacases	46
4.8.3. Termoestabilidade da atividade de lacases.....	46
4.8.4. Estudos do extrato enzimático em eletroforese SDS-PAGE.....	46
4.8.4.1 Precipitação da amostra.....	46
4.8.4.2. SDS-PAGE.....	47
4.9. TESTE DE DESCOLORAÇÃO	47
4.9.1 Teste de Toxicidade	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1. CINÉTICA MICELIAL.....	53
5.2. FUNGOS PRODUTORES DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS	55
5.3. CULTIVO SUBMERSO.....	59
5.3.1. Atividade Enzimática	59
5.3.2. Variação das concentrações de biomassa e pH durante os cultivos de <i>L. crinitus</i> , <i>Coriolopsis</i> sp. e <i>Auricularia</i> sp.....	62
5.4. CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO (CES).....	64
5.4.1. Atividade Enzimática	64
5.4.2. Variação das concentrações de biomassa e do pH durante os cultivos de <i>L. crinitus</i> , <i>Coriolopsis</i> sp. e <i>Auricularia</i> sp.....	69
5.5. CARACTERIZAÇÃO DE LACASE.....	73
5.5.1. Atividade de lacase em diferentes pH.....	73
5.5.2. Temperatura	78
5.5.3. Termoestabilidade	81
5.5.4. SDS-PAGE	88
5.6. DEGRADAÇÃO DE CORANTES	89

5.7. TESTE DE TOXICIDADE	99
6. CONCLUSÃO	102
7. PERSPECTIVAS	104
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

1. INTRODUÇÃO

O meio ambiente é sistematicamente exposto a compostos recalcitrantes produzidos por diferentes fontes e com diferentes níveis de toxicidades. As fontes de contaminação são variadas, podem ser esgostos domésticos, pesticidas do setor agrícola ou efluentes contaminados da área industrial. O setor fabril, no entanto, tornou-se o principal responsável pela poluição do ar, contaminação dos solos, sedimentos, rios e oceanos, processo que se intensificou com industrialização de países desenvolvidos e sub-desenvolvidos (MOURA, 2014).

O setor têxtil é considerado um dos maiores poluentes entre todos os setores fabris, devido ao grande volume de água residual gerado. Estimativas indicam que estes efluentes podem conter mais de 2.000 diferentes produtos químicos, incluindo corantes, auxiliares de tingimento, contaminantes residuais provenientes das fibras e entre outros (SPINA et al., 2014). Todos esses compostos são danosos ao meio ambiente, principalmente os corantes que são recalcitrantes e altamente solúveis em água (BASHA; RAJAGANESH, 2014).

A produção mundial de corantes no setor têxtil é de aproximadamente 800.000 ton/ano. Por meio dos efluentes gerados, 10 a 15% desta produção é descartada no meio ambiente. Além das implicações ambientais, outra preocupação a cerca da liberação indiscriminada destes rejeitos têxteis está relacionada com as suas características mutagênicas e genotóxicas tanto aos organismos aquáticos como aos seres humanos (AKDOGAN; TOPUZ; URHAN, 2014).

Cada país possui seus próprios instrumentos de regulação de parques industriais. Entretanto algumas normas instituídas em determinado continente são globais devido à importância mercantil dos países que as legitimam. Nos últimos anos o setor têxtil brasileiro tem encontrado dificuldades em exportar para Europa em virtude de suas regulamentações ambientais. No Brasil a resolução do Conama nº 357/2005 – Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Entretanto a legislação é superficial e não leva em consideração as características tóxicas geradas pela presença dos corantes nos efluentes têxteis.

A partir desta necessidade, novas tecnologias para o tratamento efetivo destes resíduos estão em desenvolvimento. Neste contexto, os tratamentos físicos, químicos e biológicos podem ser empregados na recuperação ambiental (TEGLI et al., 2014).

Os métodos físico-químicos apresentam elevado custo, baixa eficiência, versatilidade limitada e dificuldade de tratar os resíduos gerados, como alternativa a estes tratamentos tem se investido em processos biológicos (RAMACHANDRAN; GNANADOSS, 2012).

Nos tratamentos biológicos são utilizados microrganismos, principalmente bactérias e fungos para degradar e metabolizar poluentes ambientais para as suas formas menos tóxicas ou não tóxicas, reduzindo o emprego de produtos químicos, energia e tempo (NEVES et al., 2013).

Os fungos estão amplamente distribuídos na natureza, representam a biomassa microbiana dominante em muitos ecossistemas florestais, dos quais aproximadamente 60% são macrofungos lignocelulolíticos. No meio ambiente, os macrofungos decompositores, especificamente os Agaricomycetes degradam biomassa lignocelulósica, formada por celulose, hemicelulose e lignina. Além de desempenhar papel fundamental no ciclo do carbono, nitrogênio, fósforo e potássio (SARDROOD et al., 2013).

A capacidade biodegradativa dos fungos lignocelulolíticos é resultado da ação das hifas nas células vegetais com a produção de uma grande quantidade de enzimas intra e extracelulares, do grupo das oxido-redutases representadas por peroxidases e lacases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio (ESPÓSITO; AZEVEDO, 2010). Este sistema enzimático ligninolítico inespecífico, extracelular e de alto poder oxidante tem um papel chave na degradação de diversas substâncias tóxicas como corantes, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos, entre outros (PEIXOTO; MARINHO; RODRIGUES, 2013). As enzimas lignocelulolíticas, principalmente a lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacases são amplamente estudadas visando sua aplicação em processos de biorremediação. Estas enzimas são produzidas por várias espécies fúngicas como *Agaricus blazei* Murill., *Lentinus tigrinus* (Bull.) Fr., *Pycnoporus cinnabarinus* (Jacq.) P. Karst. e *Trametes versicolor* (L.) Lloyd. (WONG, 2009).

Em virtude da crescente contaminação dos corpos d'água por corantes produzidos pelo setor têxtil é essencial obtenção de linhagens eficazes na degradação desses compostos. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o perfil enzimático de Agaricomycetes da Região Amazônica depositados na Coleção de Cultura de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural/ INPA, visando sua utilização em processos de biorremediação de efluentes têxteis.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. INDÚSTRIA TÊXTIL

As etapas iniciais do processo de industrialização de muitos países envolveram atividades relacionadas à indústria têxtil. De acordo com a Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção (2015), no início do século XIX surgiram no Brasil as primeiras fábricas, de pequeno porte e sem grande expressão. Atualmente, o país possui uma cadeia produtiva têxtil formada por 30.000 empresas, constituindo o maior polo têxtil da América Latina, gerando em torno 1,7 milhão de empregos, dos quais 75% são mão-de-obra feminina (ABIT, 2015).

A cadeia produtiva do setor têxtil apresentou faturamento de US\$ 52 bilhões em 2010 (ABIT, 2011). Em 2013, o faturamento total foi de US\$ 53 bilhões (ABIT, 2014). Apesar da crise econômica, no ano de 2014 o setor arrecadou US\$ 55,4 bilhões (ABIT, 2015).

Tais números demonstram a importância econômica da área têxtil para o PIB brasileiro. No entanto, este setor é classificado como o maior poluidor entre todos os segmentos industriais, os seus processos utilizam grande volume de água, gerando efluentes ricos em corantes sintéticos e aditivos como uréia e NaOH. Estes aditivos permitem uma melhor qualidade ao produto final, porém, também são arrastados nos efluentes juntamente com os corantes (NIEBISCH et al., 2009).

A cadeia de produção dos tecidos tem pouca participação na contaminação dos efluentes. No entanto, o processo de coloração da fibra é o maior gerador de poluentes, tendo em vista que os efluentes produzidos nesta etapa são ricos em corantes e compostos recalcitrantes. Os dados sobre a quantidade de corantes despejados durante o processamento têxtil não são precisos, estima-se que a perda de corantes varie entre 10 % a 15 %, englobando a etapa de produção e aplicação. Os valores aparentemente irrisórios não deveriam representar nenhum alarme ambiental, entretanto tornam-se preocupantes quando se considera que a produção mundial de corantes é de 800.000 t/ano (ALI; HAMEED; AHMED, 2009).

Os corantes têxteis são um grupo de substâncias orgânicas que apresentam efeitos indesejáveis ao ambiente aquático, tais como: eutrofização, diminuição da demanda de oxigênio e comprometimento do ciclo fotossintético devido ao aumento de turbidez da água (PERALTA-ZAMORA et al., 2002).

Segundo Freitag (2011), as empresas brasileiras não inseriram políticas de responsabilidade ambiental de modo que as práticas de gestão de resíduos industriais ainda são insignificantes quando comparadas ao volume de rejeitos produzidos. Entretanto, as atuais exigências legais têm estimulado a busca por novas técnicas de tratamento de rejeitos têxteis. Existe uma variedade de métodos físicos, químicos e biológicos 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.

2.2. CORANTES TÊXTEIS

Os corantes são compostos aplicados em solução que se fixam de modo uniforme em um substrato. Preferencialmente devem ser estáveis à luz e aos processos de lavagem. Segundo a Associação Brasileira da Indústria Química, (2011) os primeiros indícios da utilização de corantes foram registrados na civilização egípcia. Até a metade do século XIX os pigmentos utilizados eram provenientes de vegetais, insetos, moluscos e minerais. O primeiro corante sintético foi acidentalmente produzido em 1856, pelo químico inglês William Henry Perkin, a mauveína, conhecida também como púrpura de anilina (SAGGIORO, 2014). A partir desta descoberta centenas de novos corantes passaram a ser desenvolvidos, tornando-se essenciais para os seres humanos. No Brasil a indústria de corantes sintéticos foi introduzida após a 1ª Guerra mundial, atualmente o país é responsável por 2,6% da produção mundial de corantes (ABIT, 2015).

Os corantes são aplicados em vários substratos, tais como: alimentos, cosméticos, plásticos, entre outros. No setor têxtil, estes compostos orgânicos têm por finalidade conferir a fibra determinada cor, sob condições de processo pré-estabelecidos (FORGIARINI, 2006).

A molécula do corante é dividida em duas partes principais: (a) o grupo cromóforo - que dá cor ao composto, geralmente grupos retiradores de elétrons, os mais importantes são: C=C, -C=N-, -C=O-, -N=N, NO₂ e -NO; (b) grupos auxiliares (etila, nitro, amino, entre outros) intensificam a cor e propiciam qualidades tintoriais resultantes da afinidade do corante pela fibra têxtil natural ou sintética (DURÁN et al., 2000).

A classificação dos corantes é realizada de acordo com a sua origem, propriedades físico-químicas e suas características de aplicação. A *American Association of Textile Chemists and Colourists* e a *British Society of Dyers and Colourist* estabeleceu o *Colour Index* (C.I), classifica de modo sistemático os corantes de acordo com sua estrutura química. Entretanto, a classificação mais adotada pela indústria têxtil baseia-se no modo de fixação, sendo que os principais são reativos, diretos, azóicos, ácidos, pré-metalizados, à cuba, branqueadores, dispersivos e de enxofre, todos descritos na Tabela 1 (DEL MONEGO, 2007).

2.3. POLUIÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS

A intensa utilização de corantes pelas indústrias têxteis gera um grande volume de efluentes contaminados, visto que mesmo presente em concentrações tão baixas quanto 1 mg/L a qualidade da água é comprometida (SAGGIORO, 2014).

No ecossistema aquático os corantes diminuem a atividade fotossintética de alguns organismos, devido ao aumento de turbidez dos efluentes, provocando distúrbios na solubilidade dos gases e lesionando as brânquias dos organismos aquáticos (PERALTA-ZAMORA et al., 2002). Estes compostos tóxicos também afetam o metabolismo humano, através da cadeia alimentar, causando problemas renais, respiratórios, dermatites e hipertensão, entre outros. Estudos realizados com trabalhadores da indústria têxtil indicaram que esses profissionais possuem maior propensão ao câncer pancreático, câncer de bexiga e câncer de sistema digestório por estarem diariamente expostos aos corantes (MARTÍNEZ, 2013).

Os corantes da classe azo apresentam potencial carcinogênico e representam mais de 50% de toda linha de corantes comerciais empregados mundialmente no tingimento de fibras. Sua estrutura é composta por um ou mais grupamentos azo ($-N=N-$) ligados a sistemas aromáticos, conferindo-lhes resistência e dificultando a degradação química e biológica destes compostos (BRUSCATO, 2011).

Tal fato gera grande preocupação, especificamente no Brasil, pois 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, estabilidade estrutural, facilidade de produção e grande variedade de cores (NIEBISCH et al., 2009).

No âmbito ecológico, os corantes reativos solúveis em água e os ácidos são os que mais causam problemas ambientais, pois tanto os tratamentos convencionais quanto os sistemas de tratamentos aeróbicos dependentes de atividade biológica são ineficientes na remoção/degradação destes corantes (FORGIARINI, 2006). Em virtude as alterações, ecológicas e toxicológicas destas substâncias é imprescindível a aplicação de tratamentos alternativos que as eliminem ou reduzam seus níveis de toxicidade.

2.3.1. Problemática da cor para o ambiente

O setor têxtil é um dos principais geradores de efluentes ricos em corantes, tais compostos são responsáveis pela contaminação de corpos hídricos. Deste modo os rejeitos têxteis despejados em corpos d'água sem tratamento adequado conferem um risco aos sistemas de água potável alterando suas características visuais e organolépticas, inviabilizando sua utilização para o consumo (GUARATINI; ZANON, 2000).

Mesmo em pequenas concentrações, os corantes alteram a coloração e a transparência da água, diminuindo a incidência de raios no meio aquático, reduzindo as atividades fotossintéticas e provocando distúrbios na solubilidade de gases, o que é prejudicial para sistema respiratório de organismos aquáticos (BRUSCATO, 2011).

Sabe-se que a complexidade dos corantes está relacionada a sua lenta cinética de degradação, visto que os corantes podem permanecer por cerca de 50 anos na biota terrestre e aquática pondo em risco a estabilidade dos ecossistemas (DURÁN, 2000).

2.3.2. Toxicidade

Os dejetos coloridos liberados pelas indústrias têxteis são tóxicos para todas as formas biológicas. Em humanos as disfunções no sistema reprodutivo, fígado, rim e sistema nervoso central são algumas das sequelas causadas pelo contato com esses efluentes. Em ratos albinos, detectou-se alterações no fígado e testículos após o contato com efluentes têxteis. Alguns microrganismos e peixes também são suscetíveis a estes compostos químicos (MARTÍNEZ, 2013).

Tabela 1. Classificação de corantes têxteis

Corantes	Características
Reativo	Utilizado em fibras celulósicas; Alta solubilidade em água; Estabelecimento de uma ligação covalente entre o corante e a fibra, cuja ligação confere maior estabilidade na cor do tecido tingido, quando comparado a outros tipos de corantes.
Direto	Composto solúvel em água capaz de tingir fibras de celulose através de interações de Van der Waals. A vantagem desta classe de corantes é o alto grau de exaustão durante a aplicação e conseqüentemente a diminuição do conteúdo do corante nas águas de descarte.
Azóico	São compostos coloridos, insolúveis em água, sintetizados sobre a fibra durante o processo de tingimento. Os corantes azóicos possuem o grupo -N N- (grupo azo).
Ácido	Corantes com estrutura química baseada em compostos azos, antraquinona, triarilmetano. São solúveis em água, com grande importância em fibras protéicas e poliamida sintética.
Branqueadores	Diminuem a tonalidade amarelada das fibras têxteis. Apresentam grupos carboxílicos, azometino (-N=CH-) aliados a sistemas benzênicos, naftalênicos e anéis aromáticos.
Dispersivos	Constitui uma classe de corantes insolúveis em água aplicados em fibras de celulose e outras fibras hidrofóbicas. Utilizado principalmente para tinturas de fibras sintéticas como acetato celulose, nylon, poliéster e poliacrilonitrila.
Enxofre	Possuem compostos macromoleculares com pontes de polissulfetos. São utilizados principalmente na tintura de fibras celulósicas, conferindo cores preto, verde oliva, azul marinho, marrom, apresentando boa fixação. Estes corantes usualmente apresentam resíduos altamente tóxicos.
Pré-metalizados	São úteis principalmente para tintura de fibras protéicas e poliamida. A desvantagem ecológica deste corante está associada ao alto conteúdo de metal nas águas de rejeito.
À cuba	É classe de corantes baseada nos índigos, tioindigóides e antraquinóides. A maior aplicação deste tipo de corante é na tintura de algodão.

Fonte: (GUARATINI; ZANONI, 2000; DEL MONEGO, 2007)

Os corantes da classe azo estão entre os mais tóxicos devido à presença de aminas. Enquanto os baseados em antraquinona são resistentes à degradação e permanecem nos efluentes por muito tempo. Os corantes reativos são altamente solúveis e quimicamente estáveis, o que dificulta sua biodegradabilidade (GOWRI; VIJAYARAGHAVAN; MEENAMBIGAI, 2014).

O descarte indiscriminado de rejeitos com corantes tem gerado muita preocupação, devido a recalcitrância e ao potencial cancerígeno, mutagênico ou

teratogênico destes compostos, principalmente os que são a base de metais pesados como cromo, cádmio, chumbo e zinco (BASHA; RAJAGANESH, 2014).

Em virtude da gravidade ambiental foram intensificados os esforços para desenvolver métodos e tecnologias específicas para detectar e remover diferentes tipos de corantes dos fluxos de águas. Os parâmetros físico-químicos que avaliam a qualidade da água são a demanda química de oxigênio (DQO) e bioquímica de oxigênio (DBO), sólidos suspensos, concentrações de metais e de outras substâncias de caráter orgânico ou inorgânico (COSTA et al., 2008). Estas análises químicas permitem a identificação e quantificação das concentrações das substâncias tóxicas. Entretanto para compreender o efeito das substâncias sobre sistemas biológicos é necessário realizar testes de toxicidade. Neste caso, os ensaios de ecotoxicidade possuem uma série de vantagens para o controle ambiental, como baixo custo, obtenção de respostas rápidas, simplicidade da maior parte dos métodos e fácil interpretação dos resultados (COSTA et al., 2008).

A escolha do organismo-teste é um fator essencial nos ensaios de toxicidade. Geralmente as espécies utilizadas são cosmopolitas, sensíveis a vários contaminantes no meio, com representatividade ecológica, fácil amostragem, baixa variabilidade genética, mobilidade limitada e de fácil cultivo em laboratório a custos relativamente baixos (MAFFAZZIOLI, 2011). Os organismos-teste universalmente utilizados em testes de toxicidade são os microcrustáceos, no Brasil, representados pela *Daphnia similis*, *Daphnia magna*, *Daphnia levis* e *Ceriodaphnia dubia*. Outros organismos como as bactérias *Vibrio fischeri*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* e *Pseudokircheneriella subcaptata* e *Biomphalaria* ssp. também são amplamente utilizadas (KIST, 2013).

2.3.3. *Daphnia magna*

Daphnia magna Straus, 1820 (Cladocera, Crustacea) é um microcrustáceo de água doce com tamanho médio entre 5 e 6 mm. Na cadeia alimentar, atua como consumidor primário e entre os metazoários, é um filtrador de material orgânico particulado, principalmente de algas unicelulares (MARTÍNEZ, 2013). No Brasil *D. magna* é frequentemente empregada em ensaios de toxicidade aguda ou crônica devido a sua alta sensibilidade a um grande número de contaminantes aquáticos, a sua importância na cadeia alimentar, a facilidade de cultivo em laboratório e

principalmente a sua reprodução por partenogênese, que permite que estes organismos tenham uma uniformidade genética (BURATINI; BERTOLETTI; ZAGATTO, 2004).

Nos testes de toxicidade aguda, em conformidade com as normas da ABNT NBR 12713, *D. magna* é exposta a diversas concentrações da amostra a ser analisada por um período de 48 horas, sendo avaliada a letalidade dos indivíduos.

2.4. TRATAMENTOS DE EFLUENTES DA INDÚSTRIA TÊXTIL

Nas últimas décadas a sociedade está despertando para os perigos envolvidos em descartar efluentes com substâncias tóxicas sem tratamento. Em 1974 foi formada *Ecological and Toxicological Association of the Dyestus Manufacturing Industry* (ETAD), tendo como objetivo minimizar os danos ambientais, proteger os consumidores e cooperar com o governo e sociedade para discutir políticas que diminuam o impacto toxicológico dos seus produtos no meio ambiente (ROBINSON et al., 2001).

Neste contexto, os tratamentos utilizados para a recuperação de efluentes têxteis e degradação de corantes variam conforme as características do efluente, entretanto os métodos mais empregados classificam-se em: físicos, químicos e biológicos.

Os métodos físicos baseiam-se na transferência de fase do contaminante, sem que ele seja realmente destruído. As técnicas que se enquadram neste tipo de tratamento são: precipitação, coagulação, floculação, sedimentação, filtração, ultrafiltração, osmose reversa e destilação (RAVINDRAN; BALASUBRAMANI, 2014). Nos tratamentos químicos, a cor dos efluentes é removida por meio da oxidação da matéria orgânica, por meio da quebra das ligações aromáticas das moléculas de corantes. Os métodos químicos compreendem as reações de Fenton, ozonação, processos fotoquímicos e destruição eletroquímica (SAGGIORO, 2014). Tanto os tratamentos que empregam métodos físicos como químicos são eficientes na remoção de cor, entretanto além de serem procedimentos caros, apresentam problemas operacionais, devido a produção de substâncias tóxicas (SAGGIORO, 2014).

No sentido de minimizar os efeitos dessas substâncias, o tratamento biológico é um procedimento alternativo que apresentam baixo custo e versatilidade na degradação/adsorção de diferentes tipos de efluentes (PEIXOTO; MARINHO; RODRIGUES, 2013).

As plantas, fungos, algas e bactérias são organismos que podem ser utilizados no tratamento biológico de efluentes. Os fungos lignocelulolíticos, são especialmente apropriados para a biorremediação de efluentes têxteis, devido as suas características metabólicas. Os principais mecanismos utilizados pelos fungos para remover os corantes dos efluentes têxteis são: bioissorção, bioacumulação e biodegradação (PEIXOTO; MARINHO; RODRIGUES, 2013).

A bioacumulação consiste na adsorção de poluentes em células fúngicas em crescimento com gasto energético. Enquanto a bioissorção é um método aplicado em grandes volumes de água, podendo ser definido como a ligação do soluto à biomassa através de um processo que não envolve transporte de energia metabólica. Tem como desvantagem o resíduo de biomassa obtido ao fim do processo (KAUSHIK; MALIK, 2009).

A biodegradação é um processo dependente de energia e envolve a quebra dos corantes através da ação de várias enzimas. Os macrofungos, especificamente os fungos de podridão branca são eficientes na degradação de corantes devido ao seu complexo enzimático, capaz de degrada os compostos aromáticos (KAUSHIK; MALIK, 2009).

2.5. FUNGOS LIGNOCELULOLÍTICOS

A biodegradação de materiais lignocelulósicos, como a madeira, é um processo natural de reciclagem de matéria orgânica e o entendimento deste processo contribui para a compreensão do ciclo natural do carbono. A madeira é constituída de um arranjo ordenado de células com parede composta basicamente por lignina, celulose e hemicelulose (KUBICEK, 2013).

A lignina, polímero aleatório de fenilpropanóide é considerado um dos principais compostos recalcitrantes sintetizados pelas plantas devido a sua estrutura complexa e heterogênea. Até 30% do material vegetal é composto de lignina, conferindo as plantas integridade estrutural e proteção contra pragas e patógenos (WONG, 2009). Na natureza, apenas os fungos são capazes de metaboliza- la de forma eficiente (WONG, 2009).

Os Agaricomycetes estão entre os que possuem maior capacidade de degradar lignina e acessar a celulose e hemicelulose. De acordo com a atividade lignocelulolítica, podem causar podridão parda ou podridão branca (KUBICEK, 2013).

Nos mecanismos utilizados para acessar os polissacarídeos, as enzimas envolvidas no processo, as características do ataque e o aspecto final da madeira divergem entre as formas de podridão (Tabela 2). Os fungos de podridão branca são capazes de degradar lignina por meio da liberação de enzimas extracelulares. Enquanto os fungos de podridão parda, de modo geral não degradam a lignina, ao invés disso modificam a sua estrutura e digerem os componentes celulolíticos (KUBICEK, 2013).

No âmbito biotecnológico, os fungos degradadores de madeira podem ser utilizados no tratamento de diferentes contaminantes industriais como corantes têxteis, carboidratos aromáticos, clorofenóis, pesticidas, entre outros (RAVINDRAN; BALASUBRAMANI, 2014).

2.5.1. Fungos da podridão branca

Os fungos de podridão branca (FPB), especificamente os Agaricomycetes são um grupo ecofisiológico diversificado, diferenciam-se de outros degradadores de madeira por serem capazes de converter lignina a CO₂ e água (KUBICEK, 2013; SAPARRAT et al., 2008). A madeira atacada por fungos de podridão branca adquire um aspecto esbranquiçado e macio devido à perda de lignina, podendo apresentar linhas escuras delimitando a região atacada. Alguns fungos como *T. versicolor*, *Heterobasidium annosum* (Fr.) Bref. e *Irpex lacteus* (Fr.) Fr atacam simultaneamente os componentes lignocelulolíticos da madeira (ZHOU; WEI; DAI, 2014). Enquanto que outros realizam uma degradação seletiva, onde a lignina e a hemicelulose são preferencialmente degradadas. *Ceriporiopsis subvermispora* (Pilát) Gilb. & Ryv., *Phellinus pini* (Brot.) Murrill., *Phlebia* sp. e *Pleurotus* sp. pertencem a este grupo. Independente da forma de ataque, fungos de podridão branca degradam os materiais lignocelulósicos por meio de uma série de enzimas extracelulares (KUBICEK, 2013).

Os complexos oxidativos inespecíficos utilizado pelos FPB incluem as oxiredutases extracelulares, metabólitos de baixa massa molecular e espécies reativas de oxigênio.

As principais enzimas extracelulares envolvidas na degradação de lignina são as peroxidases, as lacases e as oxidases responsáveis pela produção de H₂O₂ extracelular (TIŠMA; ZELIĆ; VASIĆ-RAČK, 2010; SAPARRAT et al., 2014). Os fungos

podem produzir: (1) LiPs, MnPs e lacase; (2) MnPs e lacase; (3) LiPs e lacase; (4) apenas manganês peroxidase (HATAKKA, 1994).

As características deste sistema enzimático dependem da espécie, linhagem e condição de cultivo do fungo. Além deste sistema lignocelulolítico os FPB também produzem enzimas hidrolíticas (SCHMIDT, 2006)

Tabela 2. Relação dos fungos lignocelulolíticos.

Microrganismo	Táxon	Ação
Fungo de podridão branca	<i>Phanerochaete</i> , <i>Pleurotus</i> e <i>Trametes</i>	Mineralizam a lignina em CO ₂ e H ₂ O; algumas espécies são seletivas removendo apenas a lignina, enquanto outras degradam a lignina e celulose ao mesmo tempo.
Fungo de podridão parda	<i>Tyromyces</i> , <i>Monilinia</i> e <i>Gloeophyllum</i>	Modificam a lignina por meio de radicais oxidantes capazes de modificar a estrutura da lignina.
Fungo de podridão mole	<i>Chaetomium</i> , <i>Ceratocystis</i> e <i>Phialophora</i>	Modificações na estrutura da lignina.

Fonte: (WARD; HADAR; DOSORETZ, 2012).

Na recuperação de efluentes têxteis, são utilizadas linhagens de Agaricomycetes, essenciais para degradar e mineralizar um amplo grupo de corantes com estruturas moleculares diversas. Fungos de podridão branca como *T. versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* Burds. e *Tinctoporia* sp. são estudados visando sua utilização em processos de biopolpação e biorremediação (RAVINDRAN; BALASUBRAMANI, 2014)

2.5.1.1. *Lentinus crinitus* (Linn.) Fr.

Lentinus crinitus (Basidiomycota, Agaricomycetes) Polyporales; Família Polyporaceae, segundo o - *Catalogue of life: Annual Checklist* – 2008. Também é

conhecido como: *Agaricus crinitus*, *Agaricus essequeboensis*, *Lentinus chaetoloma*, *Lentinus essequeboensis*, *Lentinus microloma*, *Lentinus rigidulus*, *Lentinus subcervinus*, *Lentinus wrightii* e *Panus crinitus* (Figura 1).

L. crinitus apresenta ampla distribuição na América Central, sul da Flórida e na América do Sul. Ocorre também em alguns países da África e Ásia (MAIA et al., 2006). No Brasil, *L. crinitus* foi coletado em fragmentos remanescentes de Mata Atlântica e na Região Amazônica (COSTA; JESUS, 2010). É uma espécie decompositora de árvores vivas e mortas, pertencendo aos fungos da podridão branca, sendo um potencial produtor de LiP, MnP e Lac (NIEBISCH et al., 2009).

As espécies de *Lentinus* apresentam a capacidade de degradar diferentes pentaclorofenóis e trinitrotolueno, sendo também utilizada na degradação de alguns corantes têxteis. *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler descoloriu vários corantes sintéticos usando culturas crescidas em estado sólido, obtendo a descoloração total no 18º dia, sendo que a MnP foi a principal enzima envolvida no processo de degradação deste fungo (NIEBISCH et al., 2009).

L. crinitus apresenta um complexo enzimático eficiente na biodegradação do corante azul brilhante Remazol R (MACHADO; MATHEUS; BONONI, 2005). Este fungo também é utilizado na culinária por grupos indígenas da Amazônia Ocidental (FRANCO-MOLANO et al., 2005).

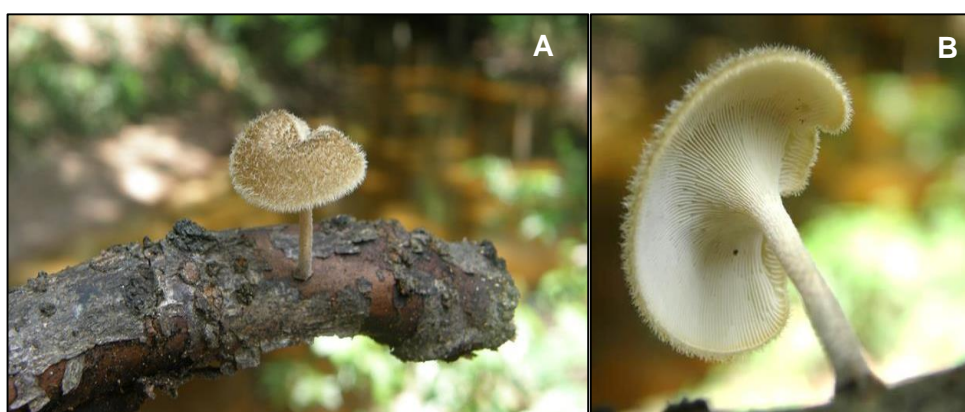


Figura 1. *Lentinus crinitus* crescendo em galho caído na área do Hotel Berro de d'Água, Presidente Figueiredo, Amazonas (A); lamelas de *L. crinitus* (B).

2.5.1.2. *Corioloopsis* sp.

O gênero *Corioloopsis* (Basidiomycota, Agaricomycetes, Polyporales, Polyporaceae). São fungos restritos as áreas neotropicais, provocam a podridão branca em substratos lignolíticos (HIBBETT et al., 2007).

Além de degradar a parede celular vegetal, com degradação seletiva de lignina também são eficientes na remoção de corantes sintéticos, o que pode estar relacionado com a atividade de seu sistema enzimático, visto que produzem principalmente lacases (MIRANDA et al., 2012). De acordo com Yang (2013) *Corioloopsis polyzona* (Pers.) Ryvar den degradou traços de contaminantes orgânicos da indústria farmacêutica. *Corioloopsis floccosa* (Jungh.) Ryvar den é utilizado no tratamento de óleos residuais (SILES et al., 2014). Enquanto *Corioloopsis rígida* (Berk. & Mont.) Murrill, *Corioloopsis gallica* (Fr.) Ryvar den e *Corioloopsis trogii* (Berk.) Dom. formaram halos de degradadação no corante RB38 em apenas três dias (BARRASA et al., 2014). Também são eficientes na remoção de metais pesados como o cobre (ARRIAGADA et al., 2009).

2.5.1.3. *Auricularia* sp.

Espécies de *Auricularia* pertencem à classe Agaricomycetes família Auriculariaceae. *Auricularia delicata* (Fr.) Henn., *Auricularia auricula-judae* (Bull.) Qué l., *Auricularia mesentérica* Retz. e *Auricularia fuscosuccinea* (Mont.) Henn. são utilizadas na alimentação de diversos grupos indígenas do Brasil e da Colômbia (FRANCO-MOLANO et al., 2005). Algumas espécies apresentam potencial medicinal, assim como a *A. auricula-judae* (WILLERDING et al., 2005).

Este gênero é composto por fungos decompositores de materiais lignocelulolíticos. *A. auricula-judae* é um excelente degradador de madeira, causando podridão branca e modificando o substrato (WORRALL; ANAGNOST; ZABEL, 1997).

As enzimas lignocelulolíticas aril álcool oxidase, lacase e manganês peroxidase são produzidas por *Auricularia* sp. Em alguns estudos com *Auricularia* houve a produção simultânea dessas enzimas, deste modo esta espécie pode ser utilizada na biorremediação (SAPARRAT et al., 2014). Segundo Jo et al., (2010) *Auricularia* sp. degradou o corante *Congo red*, além de crescer rapidamente sobre meio com RBBR formando halos embaixo da colônia no 3º dia de incubação, a descoloração total ocorreu ao 12º dia.

2.5.2. Fungos de Podridão Parda

Os fungos de podridão parda correspondem a menos de 10% dos fungos lignocelulolíticos (HATAKKA; HAMMEL, 2011). O mecanismo de podridão parda envolve dois passos, primeiro um sistema à base de radicais oxidantes capazes de iniciar mudanças nas características estruturais e químicas dos componentes holocelulósicos e da lignina. Tal fato, favorece o acesso das enzimas hidrolíticas aos constituintes da parede celular, resultando na sacarificação dos polissacarídeos e obtenção de açúcares essenciais para o metabolismo fúngico (ARANTES; JELLISON; GOODELL 2012; GOODELL; NICHOLAS; SCHULZ, 2003; MARTÍNEZ et al., 2005).

O resíduo orgânico obtido deste ataque apresenta baixa quantidade de polissacarídeos e alta quantidade de lignina modificada (ERIKSSON et al., 1990). Devido a esta degradação preferencial dos carboidratos, a madeira deteriorada adquire um aspecto marrom, com uma consistência frágil, rompendo-se em cubos (SCHWARZE; ENGELS; MATTHECK, 2000).

Apesar da ausência de um aparato enzimático para degradação de lignina, estudos evidenciam a presença de lignina peroxidase e manganês peroxidase em alguns fungos podridão-parda, bem como a metabolização de lignina (GOODELL; NICHOLAS; SCHULZ, 2003). A produção de lacase em cultivo líquido de *Coniophora puteana* (Schumach.) P. Karst., *Gloeophyllum trabeum* (Pers.) Murrill e *Oligoporus placenta* (Fr.) Gilb. & Ryvarden é relatada por Lee et al. (2004).

No setor industrial, os fungos de podridão parda podem ser aplicados em processos de biopulpação, biorremediação e em pré-tratamento de biomassas visando a produção de biocombustíveis (WARD; HADAR; DOSORETZ, 2012).

2.5.2.1. *Tyromyces* sp.

Tyromyces sp. (Basidiomycota, Polyporales, Polyporaceae). São fungos de podridão parda, decompõe madeira e árvores vivas (CHRENKOV et al., 2015).

No âmbito biotecnológico espécies de *Tyromyces* são aplicadas em processo de biorremediação. *Tyromyces palustres* (Berk. & M.A. Curtis) Murrill cresce em meio com metais, indicando potencial para metabolizar estas substâncias (MANTANISA et al., 2014). Esta mesma espécie mineralizou compostos aromáticos, fato característico apenas em fungos de podridão branca (KAMIDA; DURRANT, 2005). A tolerância a metais pode estar relacionada a grande produção de ácido oxálico, que atua nos

processos enzimáticos e não enzimáticos de degradação de carboidratos e como quelantes de metais (OSIN'SKA-JAROSZUK et al., 2014). *Tyromyces sambuceus* (Lloyd) Imazeki e *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst., apresentaram atividade antioxidante em ensaios biológicos e foram utilizadas em testes de durabilidade natural da madeira (FACKLER et al., 2007; KIM et al., 2012).

2.6. ENZIMAS MODIFICADORAS DE LIGNINA

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores de reações químicas, são essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos. O seu poder catalítico altamente específico, está associada a sua conformação nativa que pode ser afetada pela temperatura, pH e força iônica. Podem ser divididas em seis classes, segundo as reações que catalisam: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (ORLANDELLI et al., 2012).

Os Agaricomycetes lignocelulolíticos degradam a lignina, pelo fato de produzirem um consórcio de oxirredutases extracelulares tais como, ligninas peroxidases (ligninase, LiP, EC 1.11.1.14), manganês peroxidases (MnP, EC 1.11.1.13), peroxidases versáteis (VP; EC 1.11.1.16) e lacases (EC 1.10.3.2) (ESPÓSITO; AZEVEDO, 2010).

No setor têxtil, as enzimas lignocelulolíticas são utilizadas na descoloração de efluentes com corantes comerciais e na degradação de compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos (WESENBERG; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003). Na indústria papelreira estas enzimas são aplicadas visando o branqueamento da pasta *kraft*, tal processo requer a degradação da lignina sem comprometer a integridade dos polissacarídeos, particularmente a celulose. Neste sentido, o pré-tratamento com enzimas lignocelulolíticas é essencial para a deslignificação. (KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997).

2.6.1. Lignina Peroxidases (Lip EC 1.11.1.14)

A lignina peroxidase, uma das enzimas mais importantes envolvidas na degradação da lignina foi descoberta no fungo de podridão branca *P. chrysosporium* (CALL; MUCKE, 1997).

A LiP é uma glicoproteína hémica que catalisa uma variedade de compostos fenólicos, não fenólicos, hidratos de carbono aromáticos e outros compostos que são resistentes ao ataque microbiano. Requer peróxido de hidrogênio como cofator e a reação ocorre através do mecanismo de oxidação de um elétron seguido por uma série de reações não enzimáticas (SAPARRAT et al., 2002).

As peroxidases tem um mecanismo catalítico clássico, onde o peróxido de hidrogênio é o aceptor final de elétrons. A enzima nativa é oxidada por peróxido de hidrogênio formando o composto I. Com a perda de um elétron o composto I é reduzido a composto II. Quando houver H_2O_2 em excesso, este irá se combinar com o componente II da LiP, que é a forma inativa da enzima (Figura 2) (SAPARRAT et al., 2002; NILADEVI, 2009).

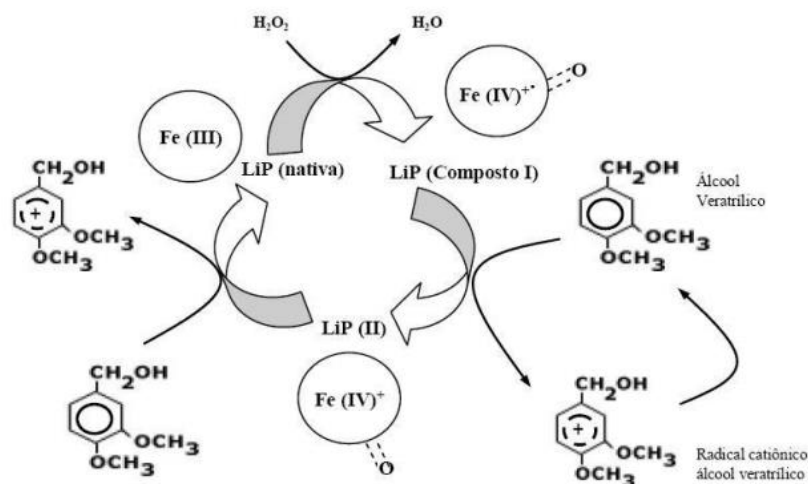


Figura 2. Ciclo catalítico da LiP.

Fonte: SAPARRAT et al. (2002)

Em alguns casos os substratos não estão diretamente acessíveis a LiP, de modo que para a oxidação ocorrer é necessária a presença de um mediador. O álcool veratrílico, metabólito secundário produzido pelos fungos, é o cofator da LiP, tendo um papel essencial na degradação da lignina, atua como mediador para oxidação indireta dos substratos, além de evitar a inativação desta enzima durante a produção excessiva de H_2O_2 . Na presença de peróxido de hidrogênio, a LiP oxida o álcool veratrílico a veratraldeído, reação de determinação de atividade em ensaios de lignina peroxidase (SAPARRAT et al., 2002).

2.6.2. Manganês peroxidase (MnP 1.11.1.13)

A MnPs são glicoproteínas extracelulares, secretadas em várias isoformas. Constitui o segundo grupo de glicoproteínas hémica que utilizam íons de manganês livres para a sua atividade. A atuação desta enzima necessita da presença de peróxido de hidrogênio e catalisa a oxidação do Mn^{2+} para o Mn^{3+} , que oxida vários compostos fenólicos (GARG; MODI, 1999). O Mn^{3+} complexado com um ácido orgânico atua como agente primário na clivagem da lignina.

O ciclo catalítico desta enzima é iniciado pela ligação de H_2O_2 a enzima nativa férrica formando o complexo ferro-peróxido (Figura 3). A quebra da ligação oxigênio-peróxido de hidrogênio requer a transferência de dois elétrons do grupamento heme da enzima, resultando na formação do composto I de manganês peroxidase e uma molécula de água. A seguir, um íon Mn^{2+} age como doador de um elétron para o composto I, formando o composto II e o íon Mn^{3+} . A redução do composto II ocorre de maneira similar à descrita acima e outro Mn^{3+} é formado a partir de um Mn^{2+} regenerando, deste modo, a enzima férrica nativa é regenerada (HOFRICHTER, 2002).

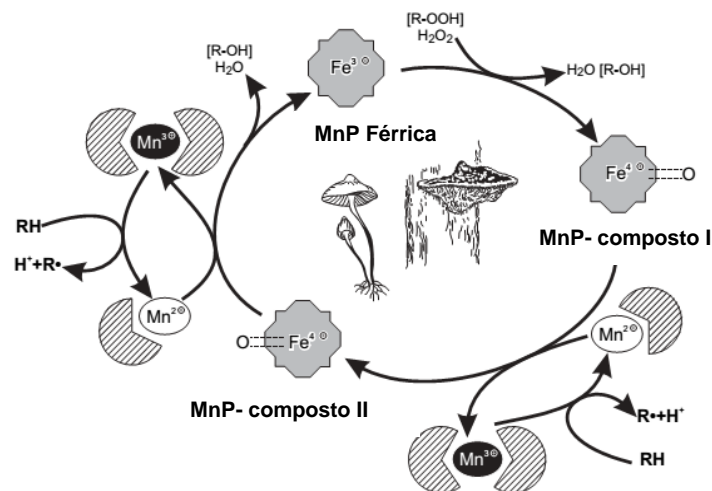


Figura 3. Ciclo catalítico da MnP. Inicialmente H_2O_2 liga-se a enzima nativa férrica formando o complexo ferro-peróxido, após reações de oxidação e redução mediadas por Mn^{2+} a enzima férrica nativa é regenerada.

Fonte: HOFRICHTER (2002)

MnP é considerada uma enzima chave na ligninólise, principalmente dos fungos de podridão branca. Essa enzima é encontrada em *Armillarias* sp., *L. edodes*,

Pleurotus ostreatus (Jacq.) P. Kumm e *T. versicolor* agindo conjuntamente com LiP e lacase (SCHMIDT, 2006).

O potencial degradativo da MnP possibilita a aplicação desta enzima em processos biotecnológicos, tais como: produção de etanol, branqueamento de papel e remoção de corantes sintéticos da indústria têxtil (BOER et al., 2004; HOFRICHTER, 2002).

2.6.3. Lacase (lac 1.10.3.2)

A lacase foi primeiramente descrita no látex de *Rhus vernicifera* (YOSHIDA, 1883). Está amplamente distribuída entre plantas, fungos, bactérias e insetos. As lacases de insetos têm seu papel bem definido, tendo comprovada participação em processos de esclerotização e pigmentação do exoesqueleto ou cutículas e cápsulas de ovos (ARAKANE et al., 2005; NAKAMURA; GO, 2005). Em bactéria, as lacases participam no processo de morfogênese, biossíntese de pigmentos, proteção contra luz UV e peróxido de hidrogênio (SANTHANAM et al., 2011; STRONG; CLAUS, 2011). No entanto, a maioria das lacases descritas na literatura foi isolada de Agaricomycetes, Deuteromycetes e Ascomycetes. Nos Agaricomycetes estas enzimas são abundantes, sendo mais de 100 lacases descritas para este grupo (RIVERA-HOYOS et al., 2013). Algumas espécies produtoras de lacases são *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Singer e *Pleurotus sajor-caju* (SODEN; DOBSON, 2001); *P. cinnabarinus*, *L. edodes* (BOLLAG; LEONOWICZ, 1984); *P. ostreatus* (BALDRIAN; GABRIEL, 2002); *P. chrysosporium* e *Trametes pubescens* (Schumach.) Pilát (GALHAUP; HALTRICH, 2002). Segundo Majeau, Brar e Tyagi (2010), devido à sua capacidade de degradar lignina, *Trametes* está entre os gêneros mais estudados para produção de lacases. Além disso, as lacases estão envolvidas na esporulação, produção de pigmentos e formação do corpo de frutificação (ALCALDE; BULTER; ARNOLD, 2007).

As lacases são metaloproteínas que pertencem a superfamília das multicobre oxidases (MCO), sua massa molecular varia entre 50 e 140 kDa (MOROZOVA et al., 2007). As lacases utilizam a capacidade redox dos íons de cobre para catalisar a redução de oxigênio molecular à água ao mesmo tempo em que oxidam um substrato orgânico (Figura 4). Estas enzimas estão envolvidas na degradação da lignina e

remoção de compostos tóxicos gerados durante este processo. Também oxidam compostos aromáticos com grupos fenólicos funcionais e compostos não aromáticos.

As lacases normalmente possuem quatro íons de cobre distribuídos em três sítios de ligação diferentes e altamente conservados: T1, T2 e T3. O sítio T1 oxida o substrato redutor e transfere os elétrons para os sítios T2 e T3, que formam um *cluster* trinuclear de Cu onde O_2 é reduzido a H_2O .

Os três sítios de cobre do centro catalítico possuem funções diferentes, o cobre T1 das lacases, catalisa a transferência dos elétrons e oxidam compostos, principalmente os fenóis, pois seu potencial redox é baixo o suficiente para permitir a remoção de elétrons pelo cobre; O T2 ativa o oxigênio molecular e funciona comoceptor de elétrons e o cobre T3 que é um dímero com dois centros de cobre é responsável pela ligação ao oxigênio molecular. Todos os sítios são importantes para a atividade da lacase, porém o potencial redox do cobre T1 é diretamente responsável pela capacidade catalítica da enzima (RIVERA-HOYOS et al., 2013).

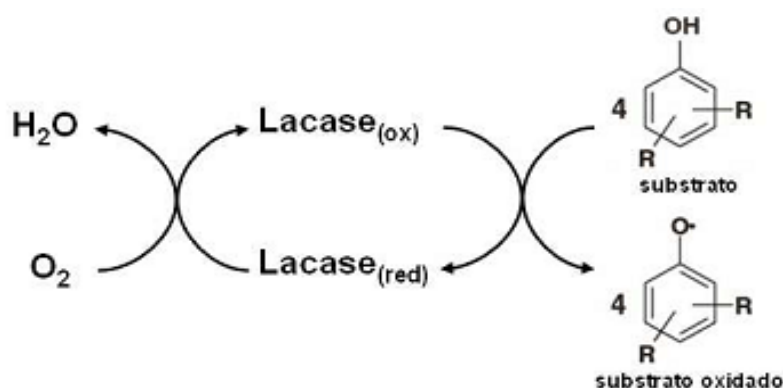


Figura 4. No ciclo catalítico de lacase, ocorre a redução de um oxigênio molecular a duas moléculas de água e a concomitante oxidação de quatro moléculas de substratos para produzir quatro radicais livres.

Fonte: RIVERA-HOYOS, 2013

Compostos não fenólicos também podem ser oxidados pela lacase, através de um mediador. Os mediadores são moléculas com a função de transportar elétrons entre as enzimas e os compostos não fenólicos. Depois de oxidado pela enzima, o mediador sai de seu sítio ativo e pode oxidar qualquer substrato. A forma oxidada do mediador é estruturalmente distinta da enzima oxidada, aumentando a gama de substratos suscetíveis a ação enzimática. Os mediadores podem ser sintéticos ou

naturais. O ácido 3-hidroxi-antranílico (3-HAA) foi o primeiro mediador natural descrito para lacases (BAIOCCO et al., 2003).

Diferentes mediadores sintéticos têm sido testados com lacases, dentre eles, o ABTS (2,2'-azinobis (3- etilbezotiazolina-6-sulfonato) e o HBT (1-hidro-zibenzotriazol) (WESEMBERG; KYRIAKIDES; GATHOS, 2003).

Para a indústria, as lacases são de grande aplicabilidade em processos de biopolpação e bioclareamento, transformação de corantes da indústria têxtil e biorremediação de PAHs, clorofenóis, dimetóxi-fenóis, pesticidas, entre outros (GAYOSSO-CANALESET et al., 2012). Recentemente estão sendo utilizadas no campo da nanotecnologia para a detecção de fenol (RIVERA-HOYOS et al., 2013).

2.7. PRODUÇÃO E INDUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

Os fungos possuem um arsenal de enzimas ligninolíticas que atuam não só na decomposição da madeira, mas também na formação do corpo de frutificação. Devido as diferentes funções durante o ciclo de vida dos fungos, as enzimas ligninolíticas apresentam grande número de isoformas com diferentes características físico-químicas e cinéticas. A expressão de lacases e de peroxidases envolve uma hierarquia de sinais ambientais, como a concentração de íons metálicos, carbono, nitrogênio, temperatura e presença xenobióticos e fotoperíodo (JANUSZ et al., 2013).

A concentração de carbono e nitrogênio influencia diretamente a expressão das enzimas lignolíticas, por serem produzidas durante o metabolismo secundário onde há depleção destes elementos (ELISASHVILI; KACHLISHVILI, 2009). Todavia as condições ótimas de expressão enzimática são variáveis, *P. ostreatus* e *Trametes trogii* produziram elevada quantidade de lacase e de MnP em altas concentrações de nitrogênio. Enquanto para *P. chrysosporium* nas mesmas condições, há supressão da atividade de LiP e MnP (LEATHAM; KIRK, 1983). A linhagem de *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murrill, em meio com baixos níveis de nitrogênio apresentou alta produção de lacase (VASCONCELLOS, 2010). Outros fungos são indiferentes a concentração de nitrogênio e carbono, caso de *Dichomitus squalens* (P. Karst.) que secreta MnP tanto em alta quanto em baixa concentração de nitrogênio (PERIE; GOLD, 1991). Além da concentração, a razão carbono e nitrogênio tem um impacto significativo na produção de enzimas ligocelulolíticas. Para *Cerrena unicolor* (Bull.), *P.*

ostreatus, *L. edodes*, *A. blazei* a produção de lacase é estimulada pela baixa razão C/N, enquanto para as peroxidases a razão C/N deve ser alta (JANUSZ et al., 2013).

Os Agaricomycetes são sensíveis à presença de metais como cobre, ferro, manganês, molibidênio, zinco e níquel. Estes são essenciais para o crescimento fúngico e também atuam como co-fatores enzimáticos induzindo a atividade ligninolítica (VASCONCELLOS, 2010). Os íons de manganês e cobre induzem a atividade de lacase e de manganês peroxidase, enquanto a LiP é inibida por Mn^{2+} . No entanto, em excesso estes metais podem diminuir o crescimento e a atividade das enzimas ligninolíticas, tornando-se tóxicos para os fungos.

Outra estratégia utilizada para aumentar a produção enzimática é a adição de indutores. Na degradação de alguns corantes, por exemplo, onde apenas a ação da enzima não é suficiente, a utilização de indutores é uma alternativa eficaz, pois aumenta drasticamente os níveis de descoloração. Os mediadores redox usados com frequência são 1-hidroxibenzotriazol (HBT), álcool veratrílico, ácido vanílico, ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) – ABTS, entre outros. Nos últimos anos, compostos naturais como siringaldeído e acetosiringona, também são explorados como mediadores de lacase para diversas aplicações ambientais (JANUSZ et al., 2013). A linhagem de *T. versicolor* praticamente dobrou sua produção de lacase devido à adição de álcool veratrílico e guaiacol. Outros mediadores não foram eficientes como é o caso do SBP/ H_2O_2 , que sozinho não é eficiente na degradação do corante Rhodamine B, entretanto na presença de HBT o corante foi bastante degradado (ELISASHVILI; KACHLISHVILI, 2009).

A temperatura é outro fator que influencia no desempenho enzimático, tal fato está relacionado a existência de regiões gênicas de resposta ao choque térmico (HSE) presente nos genes de lacase e MnP (JANUSZ et al., 2013). A expressão dessas enzimas é induzida por alterações suaves de temperatura, afetando diretamente o desempenho dos fungos em processos de degradação de corantes. A descoloração de *Cibanon Blue GFJ-MD* foi mais eficiente quando o fungo *C. versicolor* foi incubado a 30 °C (RAUF; ASHRAF, 2012).

Alguns estudos descreveram a influência de substâncias tóxicas e xenobióticos como arsenito de sódio, 2,4-diclorofenol, N, N-dimetilformamida e compostos aromáticos, na expressão de lacase e LiP (JANUSZ et al., 2013).

2.8. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DOS MACROFUNGOS E SEUS COMPLEXOS ENZIMÁTICOS

Durante as últimas décadas o potencial biotecnológico dos fungos tem se destacado no cenário científico. Sendo explorados devido as suas propriedades medicinais, terapêuticas ou ao seu potencial alimentar.

Os Agaricomycetes são capazes de degradar e modificar a lignina, por meio de um ataque enzimático extracelular. Este sistema enzimático tem se mostrado útil na degradação de uma variedade de poluentes ambientais persistentes, sendo empregado em diferentes setores industriais.

A indústria farmacêutica e alimentícia utiliza as peroxidases e as lacases fúngicas como biossensores de compostos fenólicos. Na indústria papelreira as enzimas lignolíticas, especificamente a MnP são usadas no branqueamento de polpa *kraft* (TAVARES, 2006; OLIVEIRA et al., 2009).

A produção de etanol também é beneficiada pelas enzimas lignocelulolíticas. Por meio da engenharia genética, a lacase obtida em *T. versicolor* foi expressa em *Saccharomyces cerevisiae* aumentando a sua resistência aos inibidores fenólicos nos hidrolisados lignocelulósicos. A MnP também está sendo utilizada na produção de etanol de segunda geração (HERMANN et al., 2013).

Nos processos de biorremediação, os fungos de podridão-branca são os mais utilizados, visto que as suas enzimas são eficazes na degradação de uma variedade de poluentes ambientais. Os fungos *Daedalea flavida* (Lév.) A. Roy, *Irpex flavus* Jungh., *P. sanguineus*, *P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *P. chrysosporium*, *T. versicolor* e *T. pubescens* são utilizados para degradar corantes sintéticos oriundos da indústria têxtil (TIŠMA; ZELIĆ; VASIĆ-RAČKI, 2010). Outros componentes tóxicos degradados pelos fungos lignocelulolíticos são os pesticidas, triclorofenol, alcenos, efluentes industriais, herbicidas e efluentes domésticos e industriais (NIEBISCH et al., 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar o potencial de *Tyromyces* sp., *Auricularia* sp., *Corioloropsis* sp. e *L. crinitus* na produção de enzimas lignocelulolíticas, visando sua aplicação em processos de biorremediação.

3.2. ESPECÍFICOS

- Avaliar a cinética micelial dos fungos crescendo em diferentes substratos e temperaturas.
- Avaliar o potencial de *Tyromyces* sp., *Auricularia* sp., *Corioloropsis* sp. e *L. crinitus* como produtores de MnP, Lip, Lac e OAV em cultivos em estado sólido e submerso.
- Caracterizar as lacases produzidas por estes fungos em cultivos submersos e em estado sólido.
- Verificar em eletroforese a presença de isoformas de lacases produzidas em cultivos em estado sólido e submerso.
- Avaliar a descoloração de corantes sintéticos pelos extratos enzimáticos dos macrofungos avaliados.
- Determinar a toxicidade dos corantes degradados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Os fungos utilizados neste projeto foram *Tyromyces* sp. (CMINPA, 1557), *Auricularia* sp. (CMINPA, 1645), *Coriolopsis* sp. (CMINPA, 1646) e *L. crinitus* (CMINPA, 1556) acessados na Coleção de Cultura de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural/ INPA.

4.2. CINÉTICA MICELIAL

Inicialmente foi avaliada a velocidade de crescimento micelial dos fungos selecionados sobre a influência de diferentes temperaturas e substratos.

Para este experimento foram utilizadas as serragens: *Simarouba amara* Aubl. (Marupá) e *Anacardium spruceanum* Benth. Ex Eng. (Cajuí). Foram quatro tipos de substratos: serragem de marupá pura (MA), serragem de cajuí pura (CA), serragem de marupá suplementada (MA-SUPL) e serragem de cajuí suplementada (CA-SUPL). As suplementações foram realizadas com farelo de cereais.

Os meios de cultura foram preparados utilizando-se em base seca 100g de substrato/L final de infusão, preparado com 80% (m/m) de serragem, 18% (m/m) farelo de cereais (mistura de arroz, trigo e milho, na proporção 60: 20: 20) e 2% (m/m) de CaCO₃, para serragem suplementada (SALES-CAMPOS, 2008). Na serragem pura foi adicionada 2 % (m/m) de CaCO₃. O pH do meio de cultura deverá ser ajustado para pH 6,5. O experimento foi realizado nas temperaturas de 25°C, 30°C e 35°C.

Os meios de cultura foram preparados a partir da infusão de cada substrato em 1,5L de água fervente durante 30 minutos. Foram filtrados em algodão e completados os volumes para 1L. Após a filtração, adicionou-se a cada meio, 12g (m/v) de dextrose e 15g (m/v) de ágar/L. Como controle foi utilizado o meio de cultura malte-ágar. Os diferentes meios foram autoclavados a 121 °C e vertidos em placas de Petri.

A produção dos inóculos foi realizada para obtenção de linhagens viáveis para ensaios subsequentes. Este procedimento foi feito através da transferência de inóculos fúngicos do tubo de ensaio, para a placa de Petri, contendo meio Extrato de malte-ágar (URBEN et al., 2003).

No meio de cultura solidificado foi colocado um inóculos de 6 mm de diâmetro dos fungos. As placas de Petri foram distribuídas inteiramente ao acaso e mantidas

em estufa nas diferentes temperaturas por 5 dias. O crescimento micelial foi conduzido conforme Maziero (1990) e Sales-Campos (2008). A mensuração foi realizada diariamente até o fungo atingir a borda da placa de um dos meios testados.

O delineamento experimental utilizado para a avaliação do crescimento micelial das espécies fúngicas foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial $4 \times 5 \times 3$, correspondente às combinações das espécies de fungos (4) com os tipos de meio de cultura (5) e diferentes temperaturas (3), totalizando 60 tratamentos. Cada tratamento foi composto por cinco repetições, sendo cada repetição correspondente a uma placa de Petri, com um total de 300 placas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 1% de significância. Para tal, foi utilizado o programa Assistat 7.7.

4.3. ANÁLISE QUALI-QUANTITATIVA DE FENOL-OXIDASES DOS ISOLADOS

Para as análises quali-quantitativas os isolados mantidos em placas de Petri com 6 dias de crescimento, foram repicados (discos com 0,5cm de Ø) para placas de Petri cada uma contendo um meio de cultivo diferente: 1- Meio Ágar Ácido Gálico e 2 - Meio Ágar Corante e 3- Meio Ágar Malachita. Estas análises foram realizadas segundo metodologia modificada descrita em: Queiroz, Jordão e Salgueiro (2002), Gomes (2007) e Rosa, Bettio e Dillon (2008).

4.3.1. Meios para as análises enzimáticas quali-quantitativas

4.3.1.1. Meio Ácido Gálico (AG)

Para análise de fenol-oxidases primeiramente o meio de cultivo ágar ácido gálico foi formulado 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 H₂O destilada q.s.p. 100 mL (DAVIDSON; CAMPBELL; BAISDELL, 1938). O pH do meio foi ajustado para $5,5 \pm 0,5$ e autoclavado a 1atm por 15 minutos.

Após a solidificação do meio, o inóculo do fungo de 5 mm foi colocado no centro da placa de Petri. Em seguida foram mantidos em estufa a 30°C. O crescimento e a oxidação do ácido gálico foram acompanhados a cada 24h, utilizando um paquímetro, onde foi mensurado o diâmetro da colônia e do halo por 6 dias. O teste foi considerado

positivo para os fungos que formarem ao seu redor um halo marrom escuro - Reação de Bavendamm.

4.3.1.2. Meio Ágar Corante (AC)

O meio de cultivo ágar corante foi baseado em Munari et al. (2007), 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); Meio de sais* (10X), 10mL e H₂O destilada q.s.p. 90 mL. O pH do meio foi ajustado para 5,5±0,5 e o meio foi autoclavado a 1atm por 15 minutos. Foi realizado o mesmo procedimento de inoculação descrito no item 4.3.1.1.

4.3.1.3. Meio Ágar Malachita (AC)

O meio de cultivo ágar malachita foi baseado em Dhouib et al. (2005) com modificações, contendo: corante *Malachita green*, 0,01%(m/v); peptona, 0,2%(m/v); glicose, 1%(m/v); ágar bacteriológico, 2%(m/v); Meio de sais* (10X), 10mL e H₂O destilada q.s.p. 90 mL. O pH do meio foi ajustado para 5,5±0,5 e o meio foi autoclavado a 1atm por 15 minutos. O fungo foi inoculado nas mesmas condições que o item 4.3.1.1.

O meio de sais (10x) foi preparado com base na formulação de Mandels e Reese (1957) com a seguinte composição: KH₂PO₄, 2%(m/v); (NH₄)₂SO₄, 1,4%(m/v); MgSO₄.7H₂O, 0,3%(m/v); uréia, 0,3%(m/v); CaCl₂, 0,4%(m/v); MnSO₄.H₂O, 0,00156%(m/v); FeSO₄.7H₂O, 0,005%(m/v); ZnSO₄, 0,0014%(m/v); CoCl₂, 0,002%(m/v); H₂O destilada q.s.p. 100 ml. A solução foi armazenada a 4°C para posterior utilização.

4.4. ANÁLISES QUANTITATIVAS DE FENOL-OXIDASES DOS ISOLADOS

Para as análises quantitativas foram considerados os fungos que obtiveram a formação de halos. Estas linhagens foram submetidas a ensaios submersos e em estado sólido para a verificação de lacases, manganês peroxidases, lignina peroxidases, peroxidases totais e oxidases do álcool veratrílico.

4.4.1. Condições de cultivo

4.4.1.1. *Cultivo submerso com Agaricomycetes*

O meio de cultivo líquido foi elaborado conforme descrito por Silva et al., (2007). Cada 100 mL desse meio conteve: Meio de sais 10% (v/v); peptona 0,1%(m/v); glicose 1% (m/v) e H₂O destilada q.s.p. 90% (v/v). Em seguida o meio foi autoclavado a 1 atm por 15 minutos. Na sequência, foram inoculados 3 discos de 1,5 cm de diâmetro das diferentes linhagens selecionada. Após, o ensaio foi mantido sob agitação recíproca de 180 rpm a 30±2°C. O procedimento foi realizado com seis repetições.

Para a obtenção do extrato todo o volume do frasco foi filtrado com papel filtro e na sequência as amostras foram centrifugadas a 2000 × g e 4°C, durante 30 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para as determinações enzimáticas, pH, análises eletroforéticas e o precipitado para a verificação da biomassa.

4.4.1.2. *Cultivo em estado sólido com Agaricomycetes*

O cultivo sólido foi realizado em frascos de vidro com capacidade de 100 mL, contendo 21 g de substrato úmido fechados com chumaços contendo algodão e gaze, autoclavados a 1 atm por 2 horas. Os substratos utilizados foram serragem de cajuí e marupá. O inóculo fúngico de 1,5 cm foi colocado sobre os substratos. O ensaio foi mantido em estufa a 30°C ± 3° C com umidade saturada. As amostras foram coletadas do 0 ao 14º dia a cada 48 horas. Na sequência foi realizada a extração enzimática. Todos os testes foram realizados em quadruplicata.

Para a obtenção do extrato, 15 g do material cultivado foi suspenso em 30 mL de água destilada gelada e homogeneizado manualmente sendo mantidos sob agitação recíproca por 30 minutos a 130 rpm, a 4°C. Após, os sólidos foram removidos por filtração em papel filtro e centrifugação a 2000 × g e 4°C, durante 30 minutos. O extrato enzimático obtido foi utilizado para as determinações enzimáticas, pH, análises eletroforéticas e biomassa.

4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

Após a obtenção dos extratos dos fungos em cultivo submerso e em estado sólido foram realizadas as análises no espectrofotômetro Molecular Devices, modelo Spectra Max 190 em placas com 96 poços.

4.5.1. Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

O pH dos extratos fúngicos do cultivo submerso e em estado sólido foi determinado diretamente no caldo enzimático com a utilização de um pH-metro PHTEK modelo PHS-3B.

4.5.2. Biomassa micelial

A biomassa micelial dos macrofungos em cultivo submerso foi determinada por gravimetria, sendo realizado da seguinte forma: todo o conteúdo do Erlenmeyer foi filtrado em papel filtro (previamente seco e pesado em balança analítica), após a separação o filtro contendo a biomassa foi seco em estufa a 50° C, por cerca de 24h, resfriado em um dessecador e pesado em balança analítica. A massa final foi descontada da massa inicial chegando-se assim no valor da biomassa de cada amostra.

Em cultivo em estado sólido, a determinação da massa fúngica foi obtida por método indireto pela dosagem da N-acetilglicosamina (NAG) após tratamento do substrato por hidrólise ácida utilizando 0,5 g do substrato, coletadas antes da extração enzimática.

4.6. DETERMINAÇÕES ENZIMÁTICAS

Todas as atividades enzimáticas foram expressas em unidades internacionais por grama de massa seca ($U.g^{-1}$), para o cultivo em estado sólido e em unidades internacionais por mL ($U.mL^{-1}$), para cultivo submerso; onde foram definidas como a quantidade de enzima que libera um micromol do produto por minuto ($U = 1 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1}$).

4.6.1. Lacases (Lac)

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

4.6.2. Peroxidases totais (Per)

As peroxidases totais foram dosadas empregando-se a mesma metodologia das determinações de lacase, utilizando ABTS como substrato, entretanto com a presença de 0,04 mL de H₂O₂ 2 mM e somente 0,14 mL de tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0, na mistura reacional (HEINZKILL et al., 1998). As atividades de peroxidases foram descontadas das atividades detectadas para lacases.

4.6.3. Manganês peroxidases (MnP)

A atividade de manganês-peroxidase foi determinada utilizando o vermelho de fenol como substrato (KUWAHARA et al., 1984). A mistura reacional (2mL) continha: 1mL de tampão succinato de sódio 20 mmol/L, pH 4,5; 0,1mL 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 2mM; 0,05 mL de H₂O₂ 2mM, foi adicionado 0,5 mL de amostra. Após 5 min a 30°C, as reações foram interrompidas pela adição de 0,04 mL de NaOH 2mol/L. A formação do produto de oxidação foi quantificada pela variação da absorvância em espectrofotômetro ($\epsilon_{610} = 4,46 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) através de 0,3 mL colocados em uma placa de 96 poços, sendo considerado um branco para cada amostra com tempo zero de reação.

4.6.4. Lignina peroxidases (LiP)

A atividade de lignina peroxidases foi determinada pela formação de veratríaldeído ($\epsilon = 9,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), em uma mistura reacional contendo: 0,1 mL de álcool veratrílico 4 mmol/L; 0,1 mL de H₂O₂ 2 mmol/L; e 0,2 mL de amostra em meio tamponado com 250 mmol/L de tartarato de sódio pH 3,0 sendo o volume final de 0,4 mL (TIEN; KIRK, 1984). A variação de absorvância foi observada durante 5 min, a 30°C, após a adição da amostra.

4.6.5. 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 M e 0,2mL de amostra em meio tamponado com 250 mmol/L de tartarato de sódio pH 5,0, com volume final de 0,4 mL, sendo a reação

monitorada durante 5 min, a 30°C, após a adição da amostra, utilizando-se $\epsilon = 9,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (BOURBONNAIS; PAICE, 1988).

4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A partir dos resultados da análise das amostras em triplicatas, foram calculadas as médias e os desvios padrões da média.

4.8. CARACTERIZAÇÃO DE LACASES DOS MACROFUNGOS

A caracterização enzimática de lacases foi realizada com as amostras com maior atividade desta enzima dos três fungos cultivados em estado sólido e submerso.

4.8.1. Efeito do pH sobre a atividade de lacases

Para verificar a influência do pH na atividade enzimática de lacases foi realizada a mensuração desta enzima, utilizando ABTS como substrato, conforme exposto no item 4.6.1, porém utilizando dois tampões com pHs variando de 3 a 8,0. As análises foram realizadas com tampão McIlvaine em dez diferentes pHs (3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8) e tampão acetato de sódio com pHs 4,0; 4,5; 5,0; 5,5.

4.8.2. Temperatura ótima da atividade de lacases

A verificação da temperatura ótima utilizou ABTS como substrato, sendo avaliadas cinco diferentes temperaturas de análise: 28, 30, 35, 40 e 45°C.

4.8.3. Termoestabilidade da atividade de lacases

A termoestabilidade de lacases foi avaliada com as amostras não tamponadas, em placas de 96 poços tampadas (de 2 mL, contendo 1 mL do caldo), em três diferentes temperaturas 30°C, 40°C e 50°C. Alíquotas das amostras foram coletadas nos tempos 0, 8, 24, 48, 60 e 74h. A determinação da atividade enzimática de lacases foi feita conforme descrito no item 4.6.1, utilizando ABTS.

4.8.4. Estudos do extrato enzimático em eletroforese SDS-PAGE

4.8.4.1. Precipitação da amostra

O caldo enzimático bruto (100 ou 200 μL , em tubo de reação de 2mL) foi acrescido de acetona (a 0° C), na proporção 1:2. Após foi centrifugado a 12000 $\times g$, 0

°C, por 30 min. O sobrenadante foi retirado e o precipitado foi ressuspenso em 30 µL de tampão amostra e utilizado para a realização de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

4.8.4.2. SDS-PAGE

A determinação da massa molecular das lacases foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo metodologia descrita por Laemmli, 1970. Para tanto, foi preparado um gel para empilhamento com concentração 4% (m/v) e 0,05 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%; e um gel para separação com concentração 12% (m/v) e 0,1 mL SDS 10%. Utilizou-se 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 solução B (tampão acetato de sódio, pH 5,0) por 10 minutos 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 ágar) foi colocada sobre o gel. Poucos minutos após, em temperatura ambiente, é possível que ocorra 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.

4.9. TESTE DE DESCOLORAÇÃO

No ensaio de descoloração foram selecionados os extratos fúngicos do cultivo submerso e do cultivo em estado sólido com maior atividade de lacase. O experimento foi realizado em triplicata, em placas de 96 poços onde foi adicionado 5 U/mL de extrato enzimático e o corante. Foram utilizados 10 azocorantes (Tabela 3), 8 corantes da classe trifenilmetano (Tabela 4) e 5 corantes da classe antraquinona (Tabela 5). Nas Figuras 5, 6, 7 estão as fórmulas estruturais dos corantes da classe antraquinona, azo e trifenilmetano. A degradação dos corantes foi avaliada por meio de leitura espectrofotométrica, com o comprimento de onda ideal para cada corante avaliado, as leituras foram realizadas durante 24 h.

Tabela 3. Relação de azo corantes utilizados nos ensaios de descoloração.

Corante	Comprimento de onda (nm)
<i>Cl acid red</i>	490
<i>Orange G</i>	480
<i>Congo red</i>	500
<i>Reactive red</i>	520
<i>Disperse red 324</i>	490
<i>Reactive yellow</i>	410
<i>Cl disperse blue 79</i>	540
<i>Levafix brilliant red</i>	510
<i>Disperse orange 30</i>	470
<i>Levafix golden yellow</i>	440

Tabela 4. Relação de corantes trifenilmetanos utilizados nos ensaios de descoloração.

Corante	Comprimento de onda (nm)
<i>Metil violeta</i>	570
<i>Gentian Violet</i>	580
<i>Brillante green</i>	610
<i>Phenol red</i>	430
<i>Malachile green</i>	620
<i>Bromophenol blue</i>	590
<i>Bromocresol green</i>	620
<i>Comassie brilliant blue</i>	580

Tabela 5. Relação de corantes da classe antraquinona.

Corante	Comprimento de onda (nm)
<i>Remazol brilliant blue</i>	590
<i>Azul Reativo Kn</i>	600
<i>Acid Blue 80</i>	630
<i>Reactive blue 220</i>	610
<i>Acid green 28</i>	680

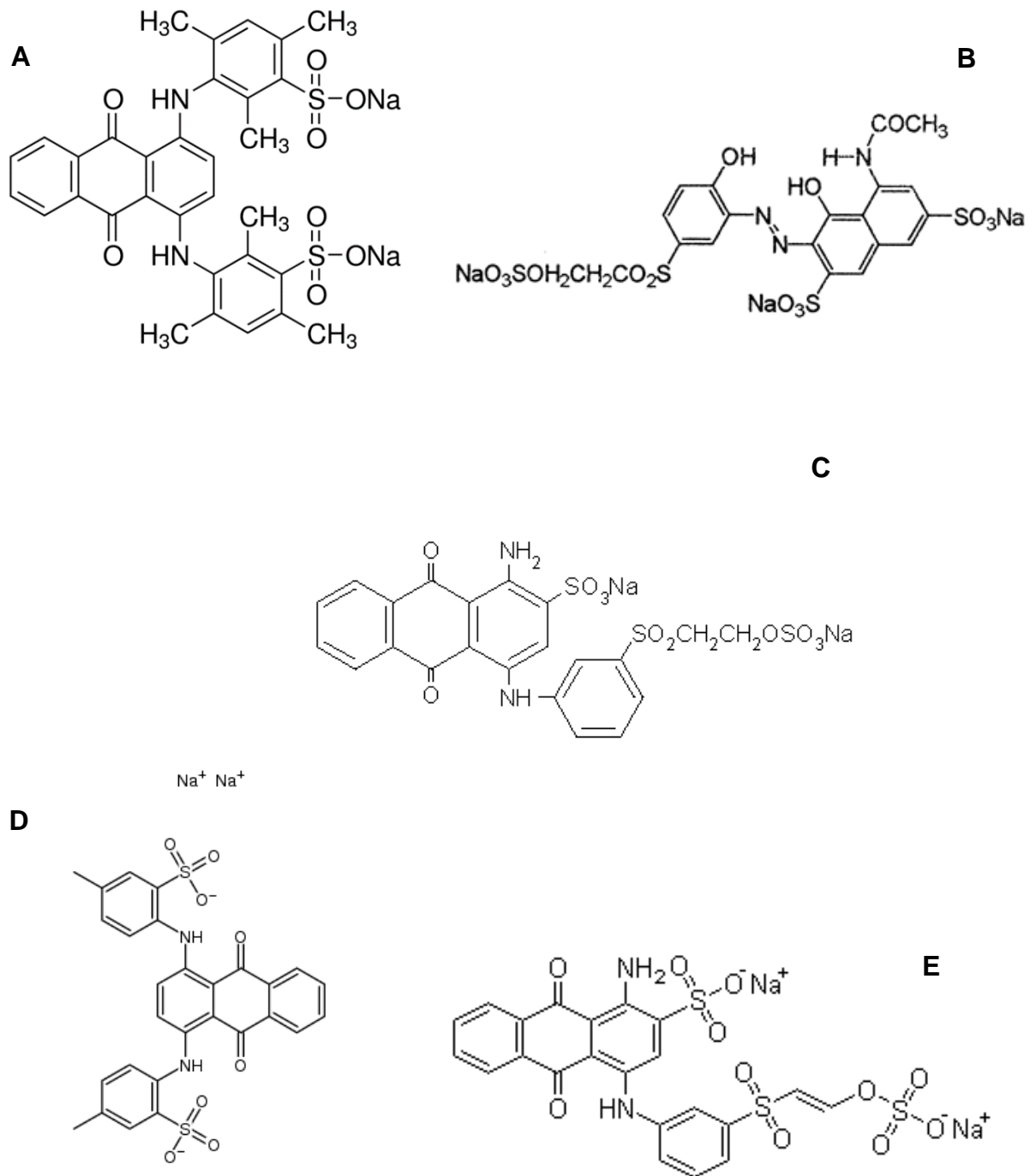


Figura 5. Estrutura dos corantes da classe antraquinona. *Acid blue 80* (A), *Azul Reativo Kn* (B), *Reactive blue* (C), *Acid green 28* (D), *Remazol brilhante blue* (E).

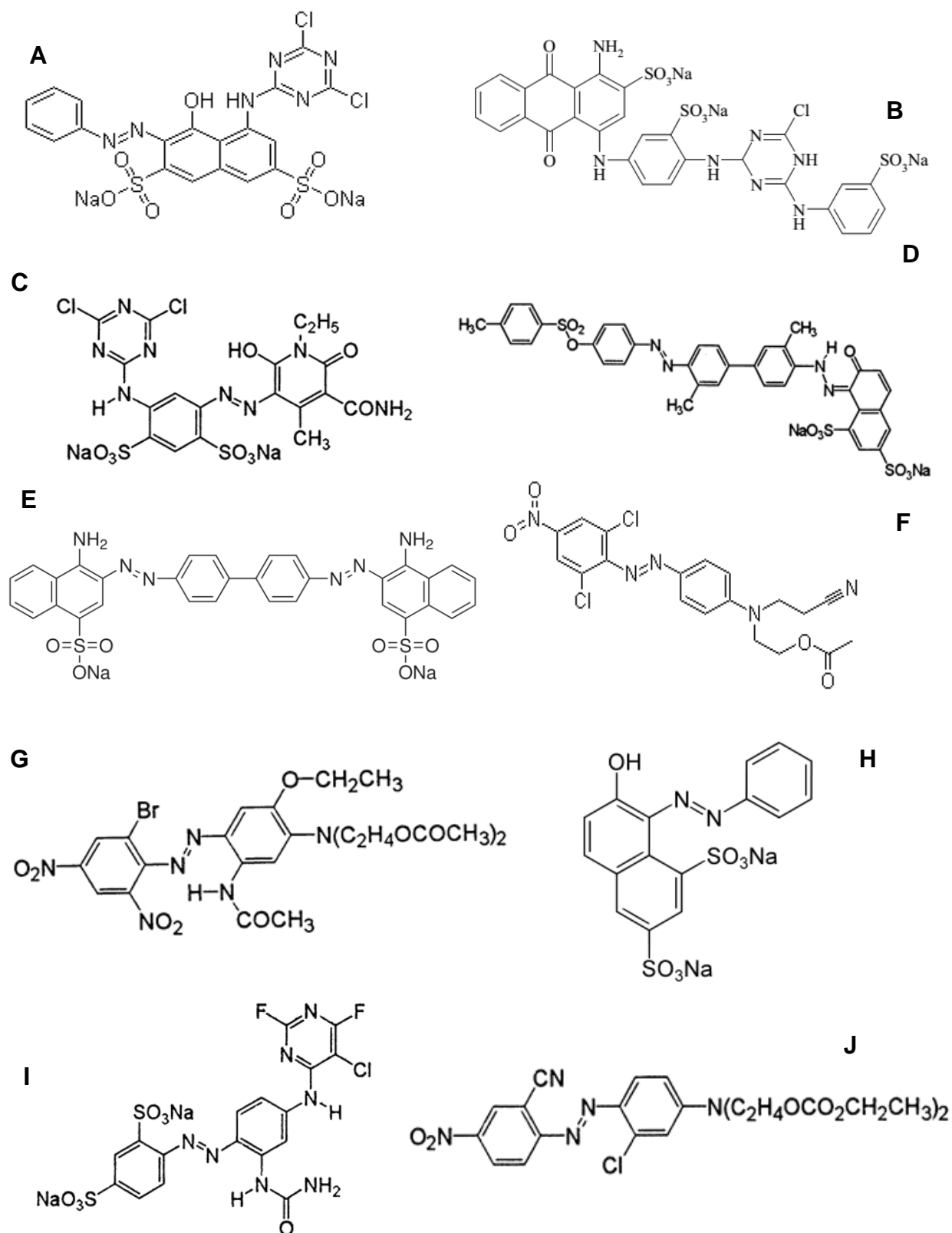


Figura 6. Estruturas dos azocorantes. *Reactive red* (A), *Levafix brilliant red* (B), *CI Reactive yellow* (C). *Acid red* (D), *Congo red* (E), *Disperse Orange 30* (F), *Disperse blue* (G), *Orange G* (H), *Levafix Golden yellow* (I) e *Disperse red* (J).

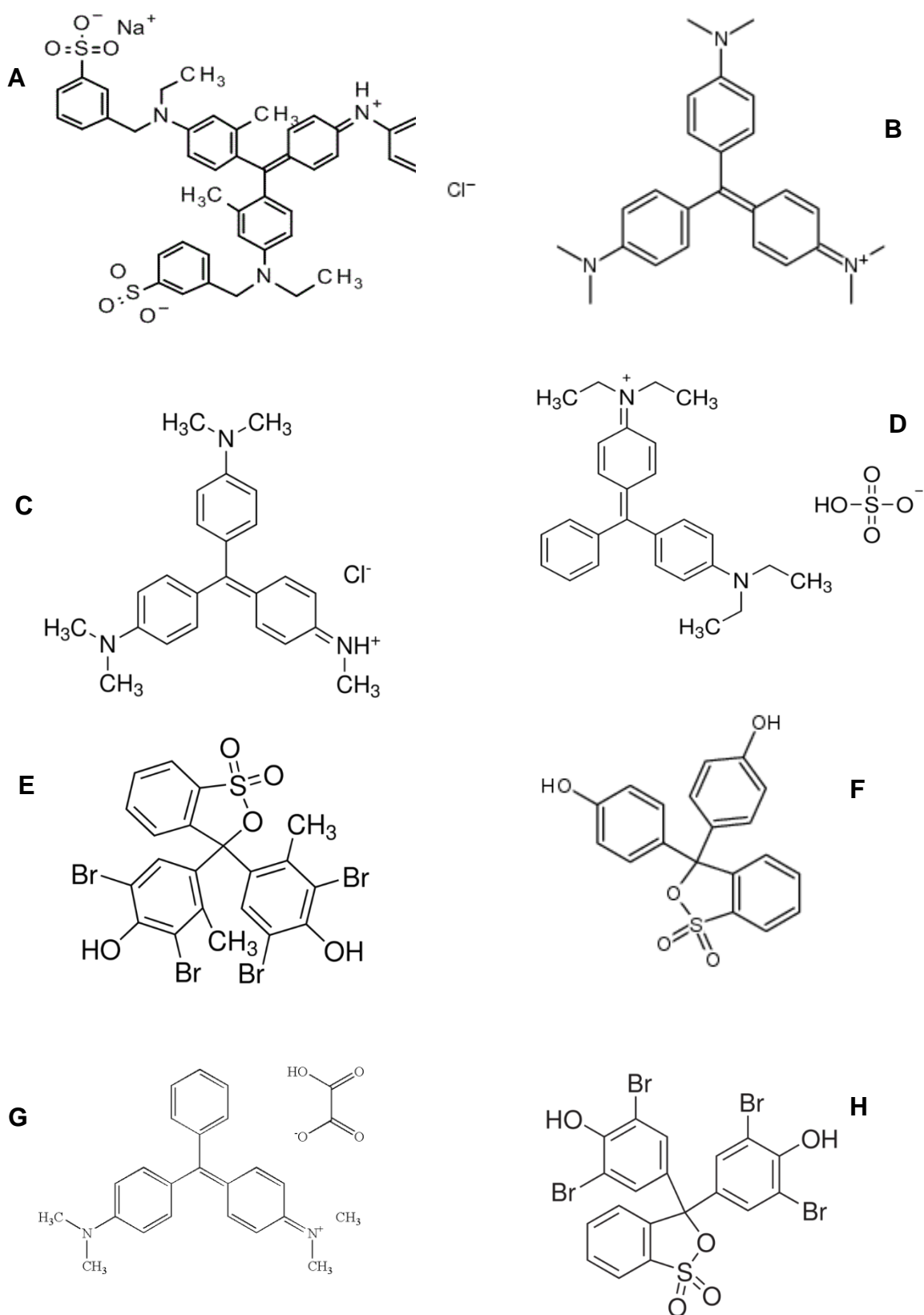


Figura 7. Estruturas dos corantes da classe trifenilmetano. *Coomassie brilliant blue* (A), *Gentian Violet* (B), *Methyl violet* (C), *Brillante green* (D), *Bromocresol green* (E), *Phenol red* (F), *Malachite green* (G), *Brophenol blue* (H).

4.9.1. Teste de Toxicidade

Exemplares de *D. magna* foram acessados no Laboratório de Toxicologia da Universidade de Caxias do Sul, conforme norma estabelecida pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) presentes na NBR 12713. Os organismos foram mantidos em sala climatizada (23°C) com fotoperíodo de 16:8 horas (claro: escuro), luminosidade em torno de 2.000 Lux, em béqueres de 2000 mL.

Para a realização dos ensaios de toxicidade foram utilizadas as amostras mais eficientes na degradação dos corantes testados em placa de 96 poços. Em seguida, misturou-se o extrato enzimático com o corante *Remazol Brilliant Blue R* (RBBR) durante 24h. Para avaliar a toxicidade, neonatos de *D. magna* foram expostos ao corante RBBR após ação dos extratos enzimáticos, nas diluições 1.50 %, 3.10 %, 6.25 %, 12.5 %, 25 %, 50 %, 100 %. Como controle os dafnídeos também foram expostos ao RBBR puro e a água destilada. Os ensaios foram executados em béqueres com 10 mL de solução, em 4 réplicas. Para cada concentração houve a exposição de 20 organismos testes, 5 por béquer.

Os organismos foram mantidos em incubadoras a 20 °C (± 0.5), sem iluminação e alimentação durante 48 h. Após esse período de exposição, a mobilidade e mortalidade dos organismos foram analisadas. O resultado é expresso através do Fator de toxicidade (FT), que corresponde à menor diluição da amostra em que não ocorreu imobilidade em mais de 10% dos organismos, que é igual ao fator de diluição.

O valor de 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; LOPES, 2004).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

São apresentados os dados sobre crescimento micelial e pré-seleção em meio sólido acrescido com corante. A partir destes resultados serão discutidos a produção das enzimas lignocelulolíticas de *Auricularia* sp., *Coriolopsis* sp. e *L. crinitus*, em cultivo submerso (CS) e cultivo em estado sólido (CES) empregando diferentes serragens. Nos extratos com as maiores atividades de lacases de cada fungo foi realizada a caracterização parcial desta enzima. São apresentados os dados de melhor pH, temperatura, termoestabilidade e massa molecular. Por fim serão discutidos os resultados da degradação dos corantes por extratos enzimáticos dos fungos testados e a avaliação de toxicidade.

5.1. CINÉTICA MICELIAL

As linhagens cresceram em todos os resíduos testados. *Coriolopsis* sp. apresentou as maiores médias de crescimento em relação aos outros fungos. O crescimento micelial rápido é característica desejável em linhagens com potencial industrial, além de reduzir consideravelmente o crescimento de outros organismos competidores (Figura 8). Através da análise da variação pode-se notar que houve diferença significativa ($\alpha = 0,01$) para a interação entre meios de cultivo e as temperaturas, para todas as linhagens estudadas. Todas as linhagens exceto *Auricularia* sp. apresentaram crescimento micelial superior em meio malte-ágar, isso ocorreu, provavelmente, em razão desse meio ser mais rico em nutrientes. Entretanto, entre os meios com serragem o meio de cultivo com cajuí suplementado foi o mais promissor.

O meio malte - ágar propiciou melhor crescimento micelial de *Tyromyces* sp. Quando avaliado apenas os meios com serragem, *Tyromyces* sp. teve o melhor crescimento no meio de cultivo obtido a partir do resíduo de cajuí com suplementação (Figura 9E). O crescimento micelial de *L. crinitus* também foi maior em meio malte-ágar durante os três primeiros dias de avaliação, entretanto no 4º dia nota-se que não houve diferença estatística entre os meios extrato de malte - ágar e cajuí suplementado (Figura 9H). Também não houve diferença estatística para crescimento micelial de *Coriolopsis* sp. nos meios de cultivo com cajuí suplementado, marupá suplementado e extrato de malte – ágar (Figura 9G).

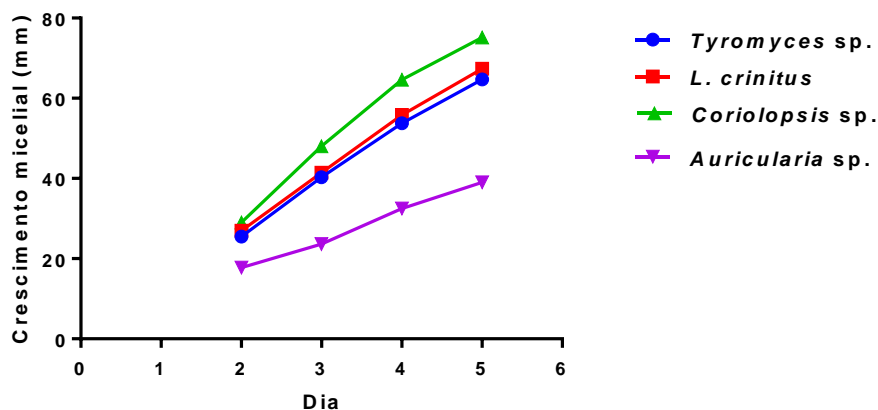


Figura 8. Cinética do crescimento micelial de *Tyromyces* sp., *Lentinus crinitus*, *Corioloopsis* sp. e *Auricularia* sp.

Por outro lado *Auricularia* sp. obteve o melhor crescimento micelial em meio com cajuí com suplementação. Entre os meios de cultivo com serragem todas as linhagens apresentaram melhor crescimento em meio suplementado com farelos de arroz, trigo e milho (Figura 9). Isso provavelmente ocorreu devido a maior disponibilidade de nutrientes facilmente assimiláveis, estimulando o desenvolvimento fúngico.

Os meios compostos por serragens apresentam vantagens econômicas e ecológicas. Visto que agregam valor a resíduos que seriam descartados, são mais econômicos quando comparados aos meios de cultivo industrializados e evitam o surgimento de mutantes auxotróficos (SALES-CAMPOS et al., 2008). Em estudo realizado por Macedo et al. (2011) foi obtido resultados similares, os substratos suplementados com farelo de arroz na concentrações 10% e 20% favoreceram o crescimento de *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. Entretanto segundo estudo de Montini (2001), o aumento da concentração de farelos nos meio de cultivo foi um fator limitante no crescimento de *L. edodes*, provavelmente devido ao excesso dos teores de carbono, nitrogênio, potássio, fósforo, magnésio e enxofre no meio. Os farelos de soja, trigo e arroz adicionados ao substrato capim-elefante também diminuiram a velocidade de crescimento de *P. ostreatus* (DONINI; BERNARDI; NASCIMENTO, 2006). Tal fato demonstra que o crescimento micelial varia de acordo com a espécie fúngicas e suas características genéticas. Outros fatores como luminosidade, umidade e temperatura também influenciam no crescimento micelial.

A temperatura está entre os fatores que mais influenciam o crescimento e metabolismo fúngico, sendo fator de variação intra e interespecífica. Geralmente, as espécies estão adaptadas às condições climáticas das regiões onde vivem. Sendo portanto esperado que estas linhagens, coletadas na cidade de Manaus, tenham melhor desempenho em temperatura elevada. Constatou-se que o crescimento micelial de *Tyromyces* sp., *Corioloopsis* sp. e *L. crinitus* foi superior na temperatura de 35 °C (Figura 9). Enquanto que *Auricularia* sp. diferiu das demais, apresentando crescimento micelial estatisticamente superior em 30 °C ao longo dos 5 dias de avaliação (Figura 9D).

5.2. FUNGOS PRODUTORES DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

Segundo Glenn e Gold (1983) os corantes poliméricos atuam como substrato para enzimas lignolíticas, sendo utilizados desde então para selecionar os fungos produtores destas enzimas. Para os testes de degradação de corante em placa foram utilizados meio ágar-malte com ácido gálico, meio ágar-malte com *Remazol Brillante Blue* e meio ágar-malte com *Malachite green*. No meio contendo ácido gálico o teste foi considerado positivo para aqueles inóculos que formaram ao seu redor um halo marrom escuro - Reação de Bavendamm. *Auricularia* sp., *Corioloopsis* sp. e *L. crinitus* formaram halo marrom escuro ao redor da colônia, o que indica a degradação do ácido gálico por enzimas oxidativas (Figura 10). A linhagem de *Auricularia* sp. formou o maior halo embora pouco micélio tenha se desenvolvido (Figura 10A). Isso ocorre, provavelmente, devido ao efeito tóxico do ácido sobre as hifas fúngicas, inibindo o crescimento micelial (DAVIDSON; CAMPBELL; BAISDELL, 1938). As linhagens de *Trametes elegans* (Spreng.: Fr.), *Ganoderma subamboinense* Bazzalo & Wright e *Ganoderma* sp. estudadas por Silva (2014) também apresentaram atividade enzimática, no entanto, não houve crescimento fúngico no meio de cultura com ácido tânico.

Tyromyces sp. é um fungo de podridão parda, deste modo a reação de Bavendamm foi negativa, tal fato está associado a não produção ou expressão basal de enzimas oxidativas como a lacase (Tabela 6). *Tyromyces pulcherrimus* (Rodway) G.Cunn. quando inoculado em meio com ácido gálico também não formou halo (BACHMANN et al., 2011).

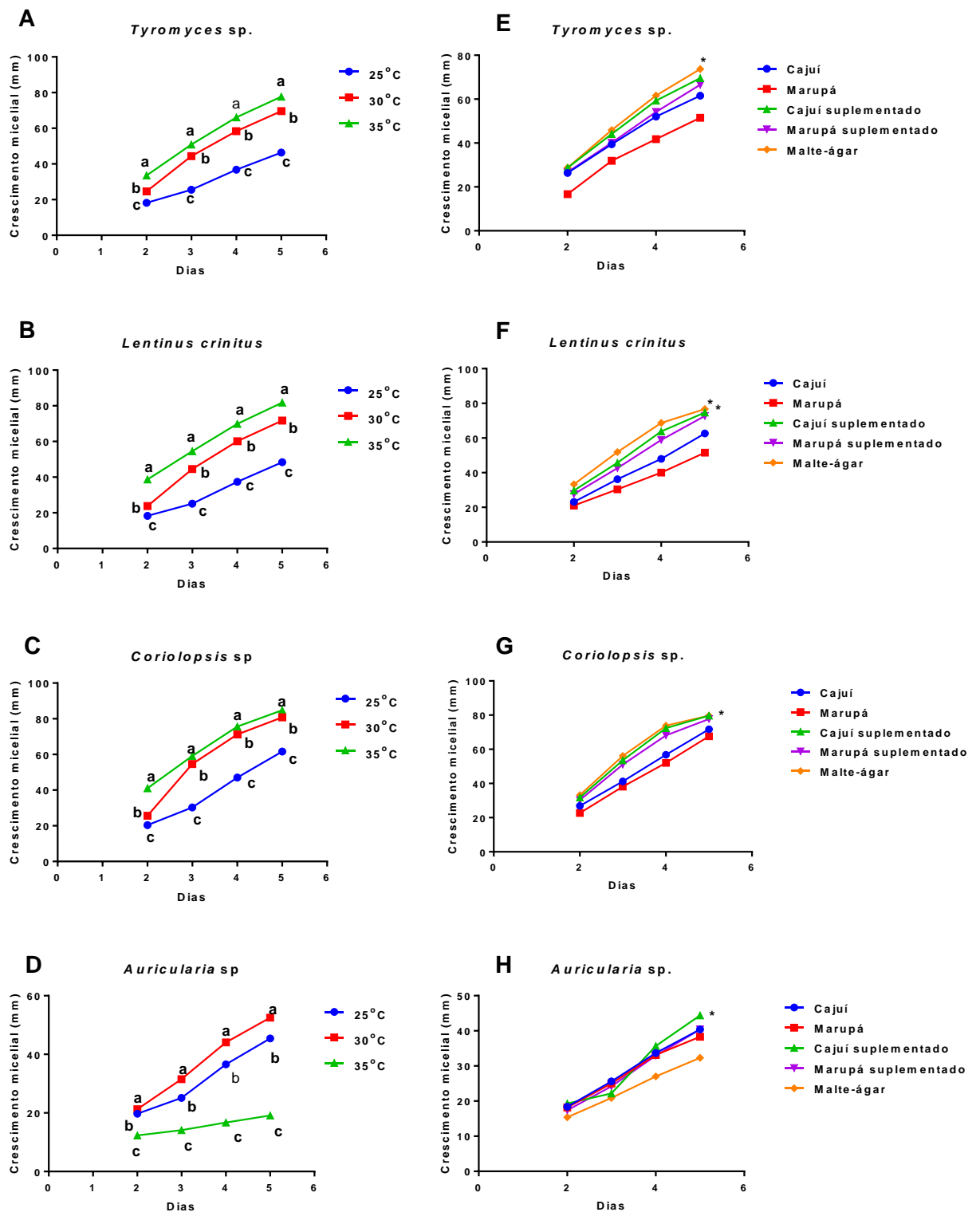


Figura 9. Crescimento micelial de *Tyromyces sp.* (A), *L. crinitus* (B), *Corioloipsis sp.* (C) e *Auricularia sp.* (D) em diferentes temperaturas e meios de cultivos (E; F; G; H). Os tratamentos com as mesmas letras não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p > 0, 01$); O asterisco indica aumento significativo de crescimento micelial ($p > 0, 01$).

Os fungos apresentaram diferença significativa quanto ao crescimento micelial no meio com ácido gálico. *Tyromyces* sp. teve a maior velocidade de crescimento, sendo a única linhagem a colonizar totalmente a placa até o último dia de experimento (Figura 10E).

No meio com *Remazol Brillante Blue*, *L. crinitus*, *Corioloopsis* sp. e *Auricularia* sp. degradaram o corante, isso foi visível apenas sob o micélio, sem a formação de halo (Figura 11). Barrasa et al. (2014) obteve resultados semelhantes com *Corioloopsis trogii*, *Corioloopsis gallica* e *T. versicolor*, onde a descoloração foi visível apenas sob a área micelial, sendo que em algumas linhagens ocorreu a formação de halo e em outras não. Segundo Barrasa et al. (2014) os fungos de podridão branca da madeira, Polyporales, formam o halo de descoloração no interior do micélio, enquanto os fungos de podridão branca de liteira, principalmente os Agaricales, apresentam halo ao redor da colônia. Tal fato está relacionado as estratégias de colonização e degradação no meio ambiente. Os Polyporales decompõem a madeira, substrato de difícil metabolização e com limitações nutricionais, sendo necessário que a secreção das enzimas lignolíticas ocorra próximo a região central da colônia. Enquanto os Agaricales de liteira, crescem no solo sobre folhas, com condições mais propícias para colonização e portanto a secreção de enzimas por hifas jovens que se encontram nas regiões periféricas do micélio (BARRASA et al., 2014).

Tabela 6. Análise qualitativa da degradação de corantes por macrofungos.

Fungo	Nº da cultura	Ácido gálico	Remazol	Verde de Malaquita
<i>Tyromyces</i> sp.	CMINPA 1557	-	-	-
<i>Lentinus crinitus</i>	CMINPA 1556	++	++	+
<i>Auricularia</i> sp.	CMINPA 1645	+++	+	+
<i>Corioloopsis</i> sp.	CMINPA 1646	++	+++	+

Legenda: - sem descoloração; + baixo; ++ intermediário; +++ intenso.

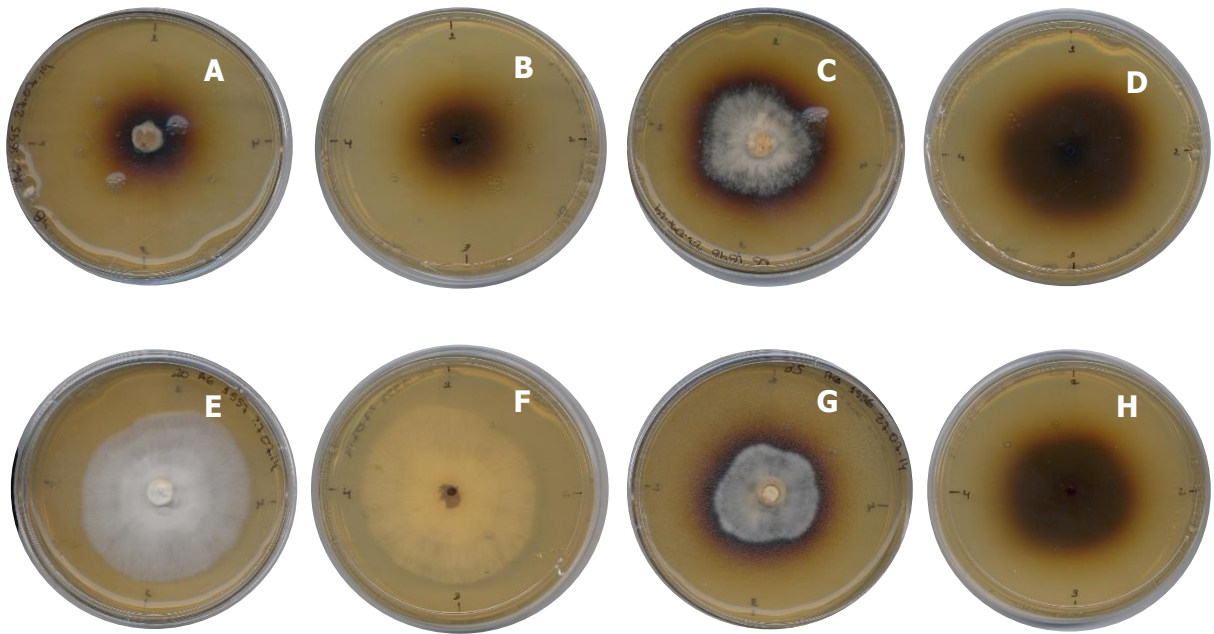


Figura 10. Halos formados por Agaricomycetes em meio com ácido gálico após 5 dias de crescimento. *Auricularia* sp. (A) e aspecto do verso da cultura (B); halo formado por *Corioloopsis* sp. (C) e verso da cultura (D); Crescimento de *Tyromyces* sp. (E) verso da cultura (F); halo formado por *L. crinitus* (G); verso da cultura (H).

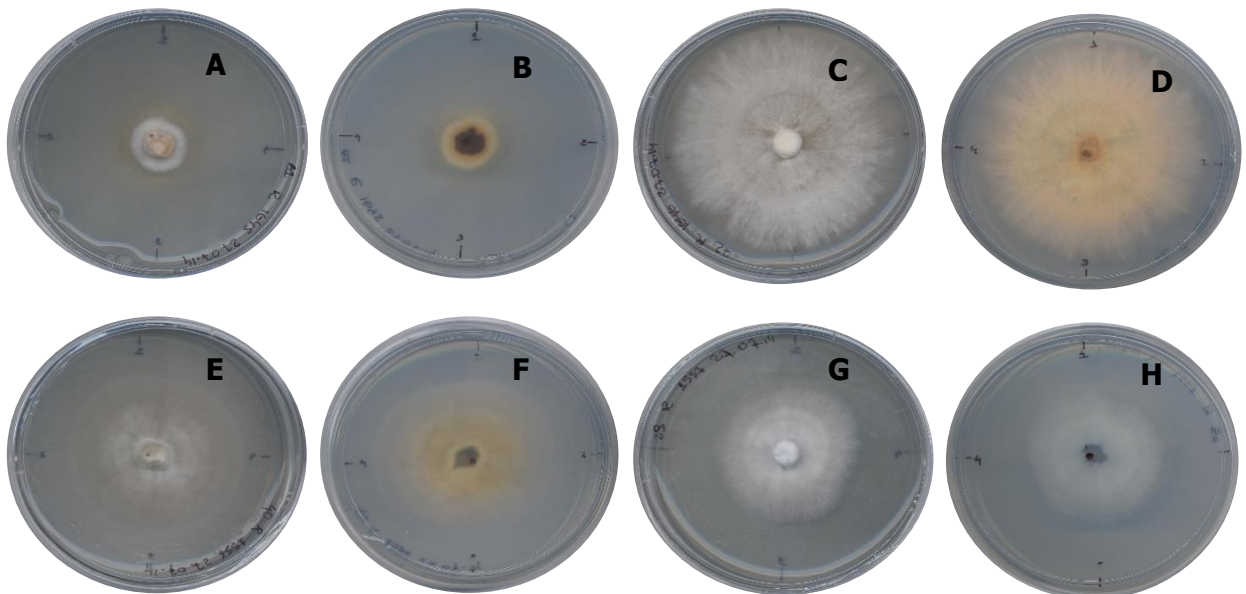


Figura 11. Descoloração do Remazol por Agaricomycetes após 5 dias de crescimento. *Auricularia* sp. (A) e aspecto do verso da cultura (B); halo formado por *Corioloopsis* sp. (C) e verso da cultura (D); Crescimento de *L. crinitus* (E) verso da cultura (F); *Tyromyces* sp. (G); verso da cultura (H).

O corante verde de malaquita é comumente utilizado em aquários como antifúngico, sendo tóxico também para os seres humanos, devido a sua similaridade estrutural com substâncias cancerígenas (CHA; DOERGE; CERNIGLIA, 2001).

No meio com verde de malaquita a descoloração foi lenta, limitando-se a região micelial, sendo realizada apenas por *Auricularia* sp., *Corioloopsis* sp. e *L. crinitus* (Figura 12). Atribui-se a toxicidade desse corante ao menor crescimento micelial para todas as linhagens fúngicas testadas, inclusive *Tyromyces* sp. que nos demais meios de cultivo apresentou um crescimento mais rápido.

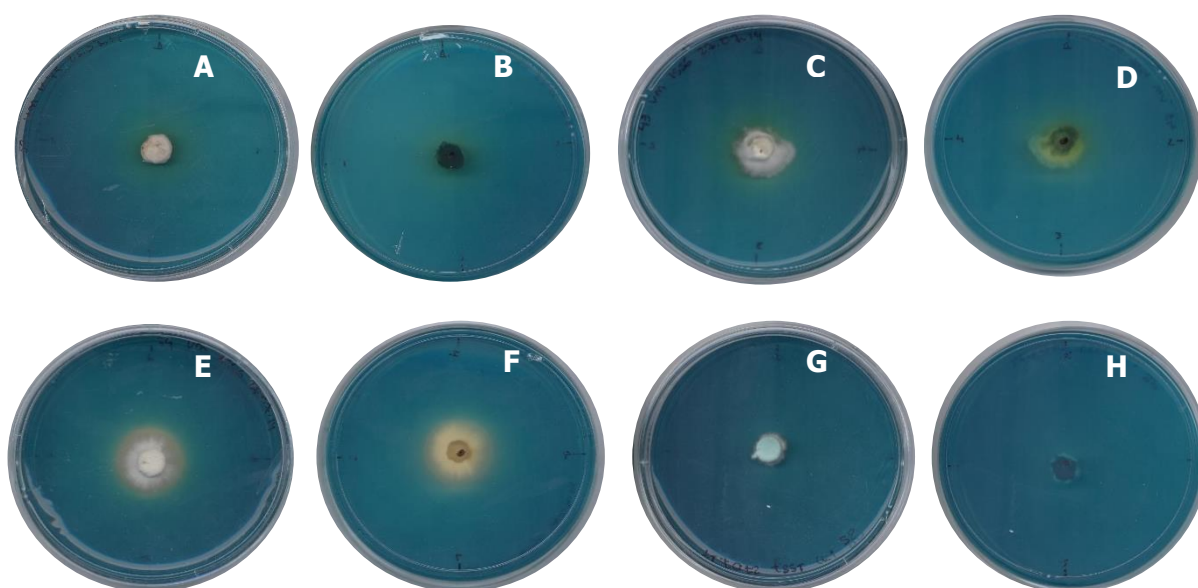


Figura 12. Halos formados por Agaricomycetes em meio com verde de malaquita após 5 dias de crescimento. *Auricularia* sp. (A) e aspecto do verso da cultura (B); *L. crinitus* (C) e verso da cultura (D); *Corioloopsis* sp. (E) verso da cultura (F); *Tyromyces* sp. (G); verso da cultura (H).

5.3. CULTIVO SUBMERSO

5.3.1. Atividade Enzimática

A partir dos resultados positivos para produção de enzimas lignolíticas foi realizado cultivo submerso com *L. crinitus*, *Corioloopsis* sp. e *Auricularia* sp. A cada dois dias foram coletados extratos enzimático brutos, dos quais se avaliou a atividade das ligninases.

No cultivo submerso, a expressão de Lip foi baixa nas três linhagens. *Auricularia* sp. obteve a maior atividade (0,0022 UI/mL) no 14º dia de cultivo, seguido por *L. crinitus* com 0,00083 UI/mL. Para *Corioloopsis* sp. a maior produção de Lip foi de 0,0005 UI/mL no 10º dia de cultivo (Figura 13A). Na Tabela 7 estão listados macrofungos que em cultivo submerso também apresentaram baixa produção de LiP. Outros autores relatam a ausência de LiP em cultivos submersos realizados com *P. ostreatus* e *Phanerochaete flavidoalba* (Cooke) S.S. Rattan (BLÁNQUEZ et al., 2002; HOU et al., 2004).

A atividade enzimática da MnP foi observada nas três linhagens, sendo que *Corioloopsis* sp. apresentou a concentração mais alta (26,61 UI/mL). *L. crinitus* teve seu pico de produção no 2º dia (1,03 UI/mL), a partir do 6º dia a produção desta enzima não foi detectável neste fungo (Figura 13C). *Auricularia* sp. obteve a maior atividade de MnP no 14º dia (1,02 UI/mL).

Observando a Figura 13B, a atividade das peroxidases totais foi maior em *Corioloopsis* sp. (20,22 UI/mL), atingindo o pico de atividade no 8º dia. Enquanto que *Auricularia* sp. (4,68 UI/mL) e *L. crinitus* (2,26 UI/mL) tiveram uma baixa atividade desta enzima.

A expressão de OAV foi baixa nas três linhagens (Figura 13D). *L. crinitus* teve a maior atividade dentre os fungos avaliados (0,60 UI/mL). Para *Auricularia* sp., o pico de atividade desta enzima foi no 2º dia (0,18 UI/mL), não sendo detectável nos dias posteriores. Para *Corioloopsis* sp. a maior atividade foi de 0,049 UI/mL. A baixa atividade de OAV também foi descrita por Moreira (2012), onde não houve expressão desta enzima por *Lentinus bertieri* (Fr.) Fr., *Lentinus villosus* Klotzsch e *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel cultivados em meio líquido com corante reativo.

As maiores atividades enzimáticas detectadas estiveram relacionadas à produção de lacase. *Corioloopsis* sp. produziu 567,14 UI/mL, no 8º dia. *L. crinitus* e *Auricularia* sp. produziram 55,19 UI/mL e 62,44 UI/mL, ambos no 10º dia de cultivo (Figura 14). Na Tabela 7 estão listadas as atividades enzimáticas de outras linhagens em diferentes meios de cultivo.

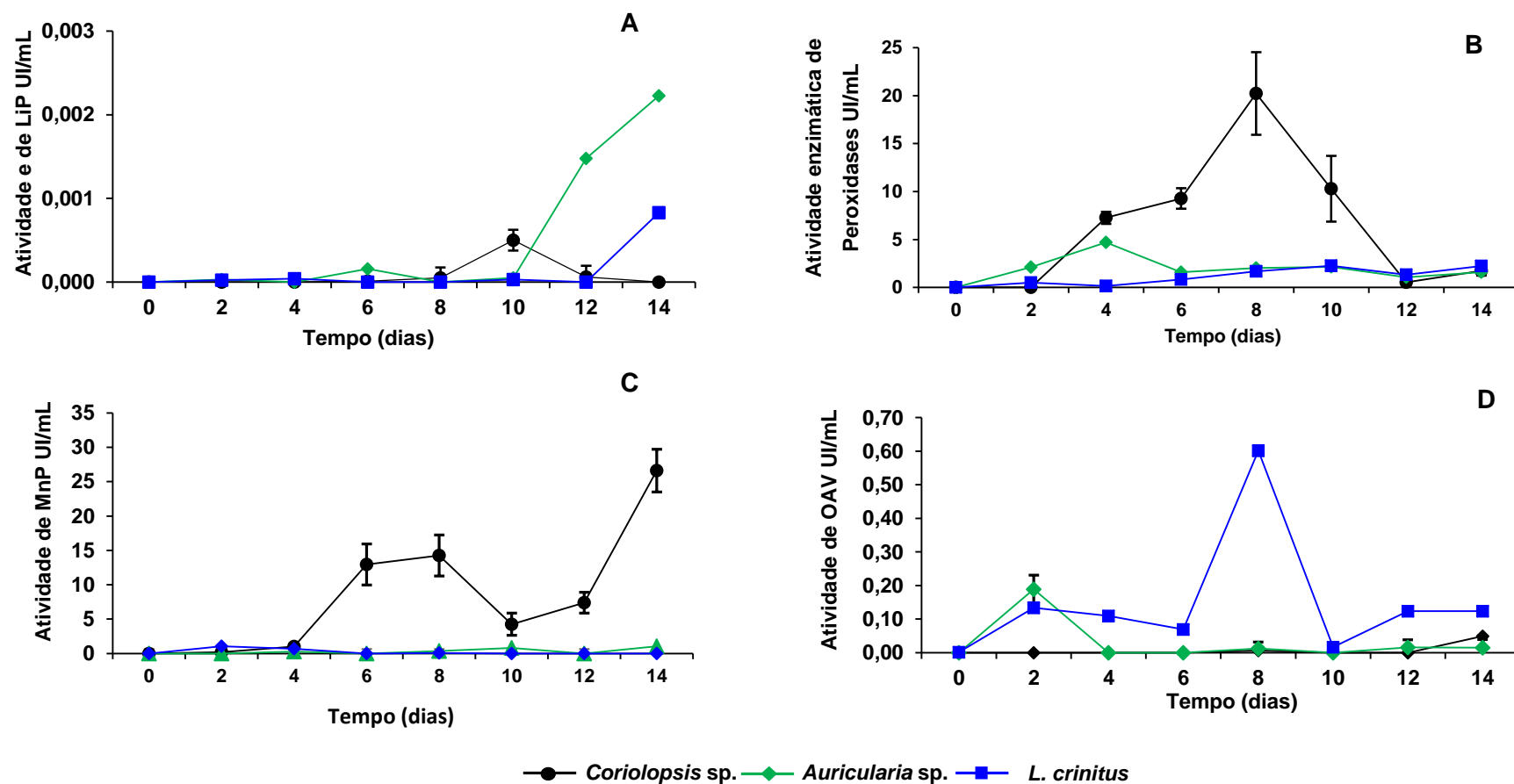


Figura 13. Valores médios da atividade de enzimas modificadoras de lignina obtidos ao longo de 14 dias de cultivo de *Corioloopsis sp.*, *Auricularia sp.* e *L. crinitus*. Atividade de LiP (A); Atividade de Peroxidases totais (B); Atividade de MnP (C); Atividade de OAV (D).

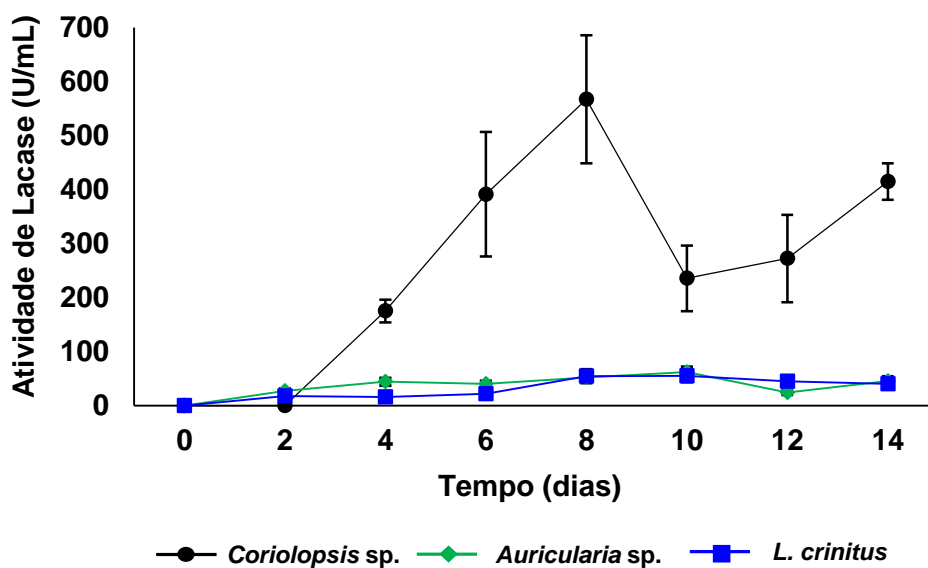


Figura 14. Perfil de secreção de lacases durante o cultivo líquido de *Corioloopsis sp.*, *Auricularia sp.* e *Lentinus crinitus*.

5.3.2. Variação das concentrações de biomassa e pH durante os cultivos de *L. crinitus*, *Corioloopsis sp.* e *Auricularia sp.*

Com relação aos valores de pH, o cultivo de *Corioloopsis sp.* apresentou uma oscilação entre 3,6 e 6,8. Quanto ao crescimento micelial os maiores valores de biomassa foram encontrados no 10º dia de cultivo (13,1 g/L), com posterior queda, apresentando no 12º dia 6,9 g/L (Figura 15A). Os valores encontrados para *L. crinitus* foram semelhantes, no 10º dia de cultivo (10,7 g/L) foi obtido o maior valor de biomassa com diminuição a partir do 12º dia (6,0 g/L). Quanto ao pH inicial do cultivo de *L. crinitus*, observa-se uma variação entre 4,6 e 5, entretanto no 14º dia o pH do meio atingiu 7,4 (Figura 15B).

O cultivo de *Auricularia sp.* por outro lado apresentou pH inicial de 4,6 permanecendo com o pH na faixa de 5,0 ao longo dos dias de cultivo. Em relação a biomassa os valores foram inferiores aos das outras linhagens. No 8º (5,1 g/L) dia foi obtido o maior valor de biomassa (Figura 15C).

Tabela 7. Atividade enzimática de fungos lignocelulolíticos em cultivo líquido.

Enzima	Fungo	Substrato	Atividade	Referências
Lacase	<i>Auricularia</i> sp.	Batata-dextrose	62,44 UI/mL	Neste trabalho
	<i>Corioloopsis</i> sp.	Batata-dextrose	567,14 UI/mL	Neste trabalho
	<i>L. crinitus</i>	Batata-dextrose	55,19 UI/mL	Neste trabalho
Manganês peroxidase	<i>Auricularia</i> sp.	Batata-dextrose	1,02 UI/mL	Neste trabalho
	<i>Corioloopsis</i> sp.	Batata-dextrose	26,61 UI/mL	Neste trabalho
	<i>L. crinitus</i>	Batata-dextrose	1,03 UI/mL	Neste trabalho
Lignina Peroxidase	<i>Auricularia</i> sp.	Batata-dextrose	0,0022 UI/mL	Neste trabalho
	<i>Corioloopsis</i> sp.	Batata-dextrose	0,0005 UI/mL	Neste trabalho
	<i>L. crinitus</i>	Batata-dextrose	0,00083 UI/mL	Neste trabalho
Lacase	<i>Auricularia</i> sp.	Serragem	80,57 UI/mL	Bodke; Senthilarasu; Raghukumar (2012)
	<i>Lentinus squarrosulus</i> Mont.:	Palha de arroz	593,8 UI/mL	Mukhopadhyay; Banerjee (2015)
	<i>L. squarrosulus</i>	Talos de milho	43,92 UI/mL	Isikhuemhen et al. (2012)
	<i>Lentinus edodes</i> (Berk.) Pegler	Batata-dextrose	30,88 UI/ mL	Fen et al. (2014)
	<i>Lentinus polychrous</i> Lev.	Batata-dextrose	145 UI/ mL	Ratanapongleka; Phetsom (2014)
	<i>Corioloopsis byrsina</i> (Mont.) Ryv	Folha de Carvalho	6, 2 UI/mL	Marcinkev et al. (2013)
	<i>Corioloopsis floccosa</i> (Jungh.) Ryv.	Espiga de milho	60 UI/mL	Chaurasia et al. (2013)
	<i>Pleurotus pulmonarius</i> (Fr.) Qué	Casca de laranja	12,2 UI/mL	Inácio et al. (2015)
Manganês peroxidase	<i>Corioloopsis gallica</i> (Fr.) Ryv.	Óleo de azeite	0, 271UI/mL	Daâssi et al. (2014)
	<i>Trametes versicolor</i> (L.:Fr.) Pillat	Batata-dextrose	0,27UI/mL	Jayasinghe et al. (2008)
	<i>Gloeophyllum striatum</i> (Fr.) Murrill	Palha de arroz	590,3 UI/mL	Baptista et al. (2015)
	<i>L. squarrosulus</i>	Bagaço de cana	15,40 UI/mL	Isikhuemhen et al. (2012)
	<i>Lentinus edodes</i>	Bagaço de cana	759,72 UI/mL	Dong et al. (2013)
Lignina Peroxidase	<i>Agaricus blazei</i> Murrill.	Bagaço de cana	0,0083 UI/ mL	Silva (2007)
	<i>Corioloopsis gallica</i>	Óleo de azeite	11 UI/mL	Daâssi et al. (2014)
	<i>Lentinus boryana</i> (Berk. & Mont.) Peg.	Socarean	0 UI/ mL	Hermann (2011)
	<i>Lentinus edodes</i>	Bagaço de cana	1,90 UI/mL	Rabonato et al. (2015)

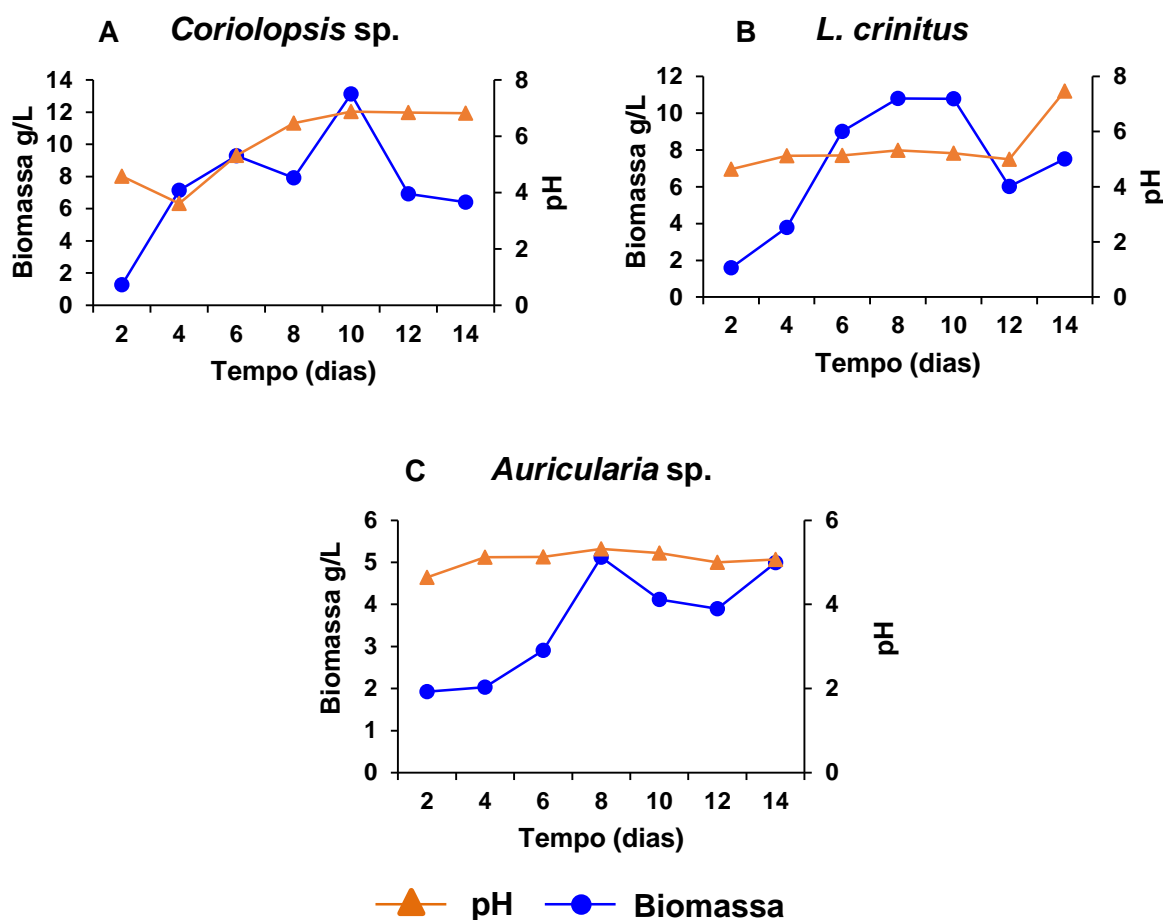


Figura 15. Variação dos valores de pH e biomassa micelial de *Corioloopsis sp.* (A), *L. crinitus* (B) e *Auricularia sp.* (C). Os valores correspondem a média de seis replicatas.

5.4. CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO (CES)

5.4.1. Atividade Enzimática

Foram realizados dois cultivos utilizando-se as seragens de marupá e cajuí como substrato. Os dados correspondem a valores médios de quatro repetições. Os valores das atividades enzimáticas estão representados por grama de substrato seco.

Das três linhagens, *Corioloopsis sp.* obteve a maior atividade de MnP com picos de atividade no 8º dia no substrato marupá (20,66 UI/g) e cajuí (18,67 UI/g), com decréscimo de atividade nos dias posteriores (Figura 16A). Para *L. crinitus* a atividade desta enzima foi baixa tanto no cultivo com substrato marupá (0,23 UI/g) quanto no cajuí (0,20 UI/g). De modo similar a máxima atividade de MnP obtida por *Auricularia*

sp. no cultivo em marupá (0,07 UI/g) e cajuí (0,16 UI/g) também foi baixa (Figura 16 C). Segundo Kadimaliev (2003), as mudanças na atividade de peroxidases pelos fungos, durante o cultivo em estado sólido, são diretamente afetadas pelo tipo de serragem utilizada.

Quanto a produção de LiP, as três linhagens tiveram uma baixa atividade. Para *Coriolopsis* sp., o melhor substrato foi marupá (0,04 UI/g), em cajuí a maior atividade deste fungo ocorreu na segunda semana com 0,011 UI/g (Figura 16D). A atividade de *Auricularia* sp. no substrato cajuí (0,016 UI/g) foi superior a de marupá (0,001 UI/g). Para *L. crinitus* o melhor substrato foi marupá (0,003 UI/g) com atividade um pouco menor em cajuí (0,001 UI/g) (Figura 16E). Tanto *Auricularia* sp. e *L. crinitus* tiveram sua maior atividade no 12º dia. Conceição (2010) cultivou diferentes Agaricomycetes em resíduos agroflorestais, detectando baixa ou nenhuma atividade LiP, corroborando os resultados encontrados. A LiP é um catalizador primário na deslignificação fúngicas, entretanto sua produção é restrita a alguns fungos. A expressão desta enzima pelos fungos de degradação branca ocorre somente durante seu metabolismo secundário, mediante a depleção de certos nutrientes como nitrogênio, carbono e enxofre (KIRK; FARRELL, 1987).

O nível máximo detectado de OAV foi em *L. crinitus* no substrato marupá (5,67 UI/g), em cajuí o pico de atividade desta linhagem foi apenas 0,1 UI/g, no 2º dia de cultivo (Figura 17C). Para *Coriolopsis* sp. a expressão de OAV, foi superior em marupá (0,92 UI/g). A atividade de OAV, de *Auricularia* sp. no substrato cajuí (0,28 U/g) apresentou maior atividade no 2º dia, a partir do 8º dia a produção de OAV não foi detectada. Quando cultivado em marupá a atividade desta oxidase foi de 0,068 UI/g (Figura 17A; 17B). A atividade de Peroxidases totais foi superior no substrato marupá para *Auricularia* sp. (16,5 U/g), *Coriolopsis* sp. (11,9 UI/g) e *L. crinitus* (6,9 UI/g). No cultivo com cajuí, a maior atividade foi de *Coriolopsis* sp. (10,62 UI/g), seguida por *Auricularia* sp. (6,1 UI/g) e *L. crinitus* (2,2 UI/g) (Figura 17D; 17F).

As maiores atividades enzimáticas estiveram relacionadas à produção de lacase. As linhagens de *Auricularia* sp. (502,7 UI/g), *Coriolopsis* sp. (402 UI/g) e *L. crinitus* (194,2 UI/g) obtiveram maior atividade desta enzima no cultivo com marupá (Figura 18).

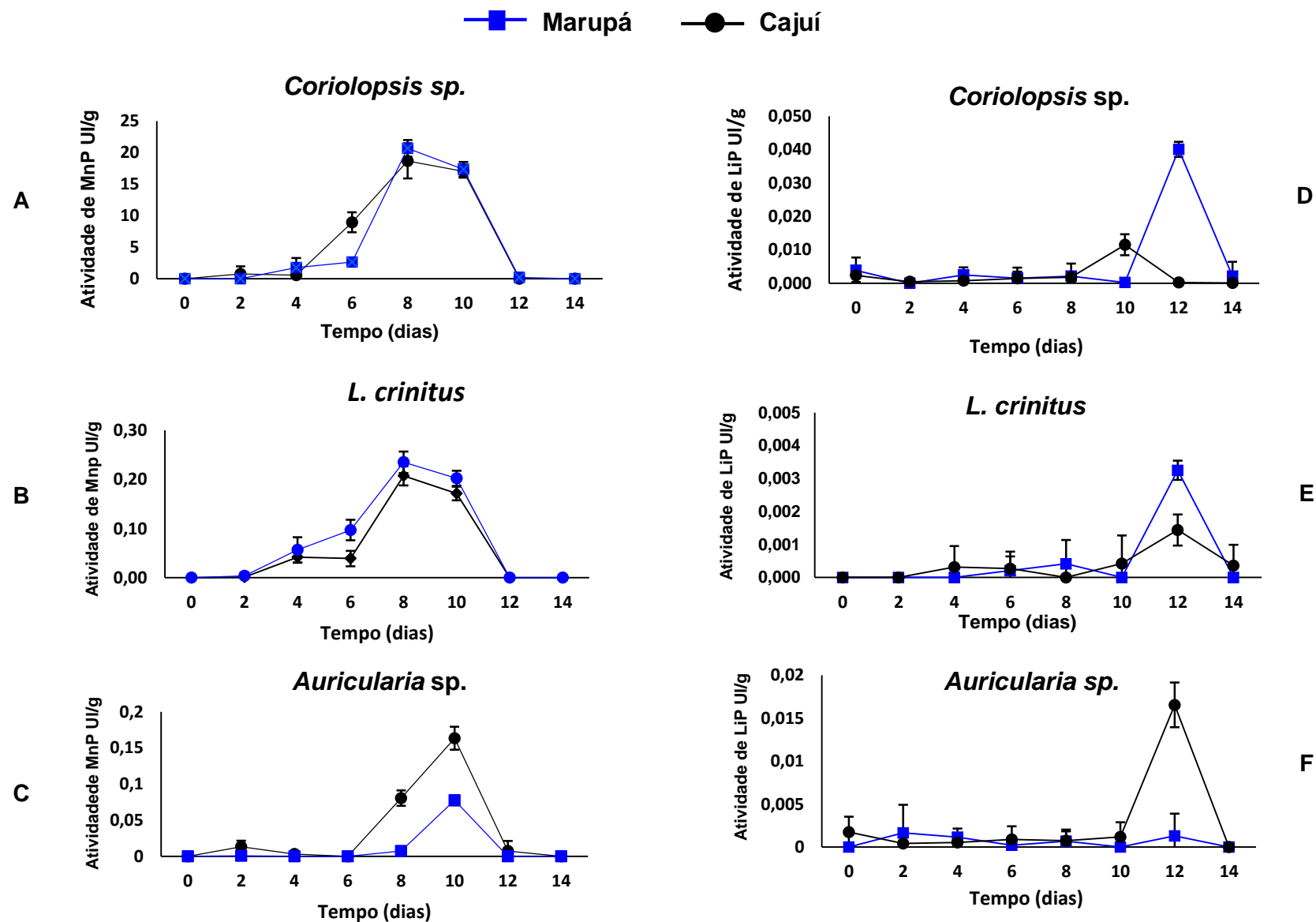


Figura 16. Valores médios da atividade de manganês peroxidases (MnP) (A, B, C) e lignina peroxidase (LiP) (C, D, E) obtidos nos cultivos em estado sólido pelos fungos *Corioloopsis sp.*, *Auricularia sp.* e *L. crinitus*. Utilizou-se meio de cultivo formulado com serragens de marupá e cajuí.

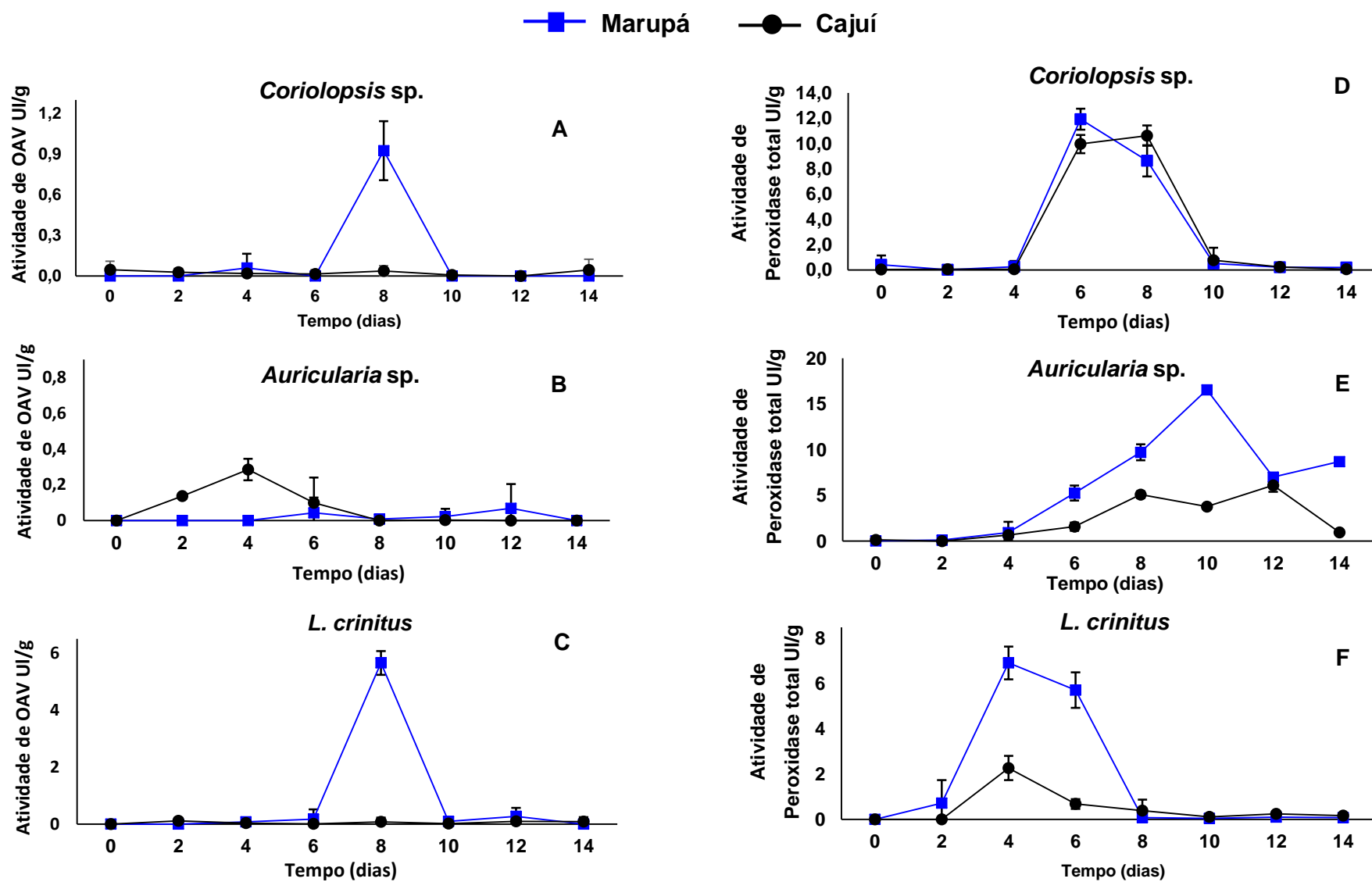


Figura 17. Valores médios da atividade de OAV (A, B, C) e peroxidases totais (C, D, E) obtidos nos cultivos em estado sólido pelos fungos *Coriopsis sp.*, *Auricularia sp.* e *L. crinitus*. Foi utilizado meio de cultivo formulado com serragens de marupá e cajuí.

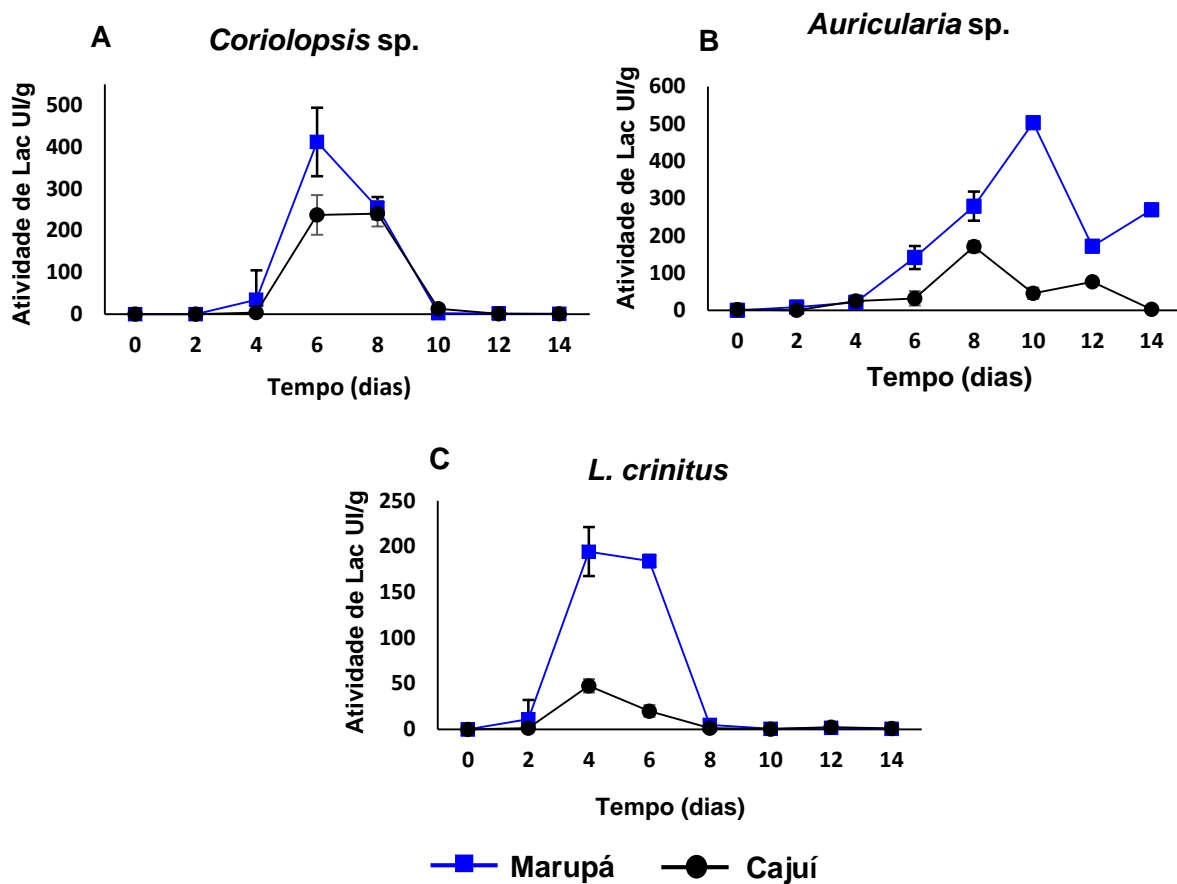


Figura 18. Valores médios da atividade de lacase (Lac) (A, B, C) obtidos nos cultivos em estado sólido de *Corioloopsis* sp., *Auricularia* sp. e *L. crinitus* com meios formulados com serragens de marupá e cajuí.

As atividades de lacase encontradas são superiores as observadas para outros fungos da podridão branca, *Trametes trogii* em CES com substrato composto por aparas de madeira produziu 100 UI/g enquanto *P. ostreatus* em CES com bagaço de cana produziu 167 UI/g (KARP et al., 2012; ZENG et al., 2011). No cultivo formulado com serragem cajuí, a atividade de lacase foi superior em *Corioloopsis* sp. (240 UI/g), com picos de atividade entre o 6^o e 8^o dia (Figura 18). Para *Auricularia* sp. a maior atividade de lacase foi de 170,8 UI/g, enquanto *L. crinitus* atingiu a atividade máxima no 4^o dia (47,5 UI/g). Na Tabela 8 estão descritos alguns Agaricomycetes cultivados em diferentes substratos visando a produção enzimática.

Os Agaricomycetes produzem enzimas ligninolíticas de forma constitutiva, sendo que os níveis de produção enzimática dependem das características genéticas

da espécie. Dentre as linhagens utilizadas *Corioloopsis* sp. e *Auricularia* sp. apresentaram os melhores resultados na produção de lacase. Além deste fator os substratos lignocelulósicos utilizados são determinantes na quantidade de enzimas ligninolíticas produzidas pelos fungos de podridão branca.

Foi demonstrado que diferenças de composição e proporção da lignina nos substratos utilizados como meio de cultura podem influenciar na secreção e produção das ligninases fúngicas (CARVALHO, 2005). Portanto, a seleção adequada do resíduo vegetal é essencial tanto para o crescimento dos fungos quanto para síntese da enzima alvo. A utilização de resíduos madeireiros representa uma alternativa economicamente viável agregando valor a um subproduto agroindustrial. Em estudos realizados por Sales-Campos et al. (2008) as serragens de cajuí e marupá foram utilizadas para crescimento micelial dos cogumelos comestíveis *P. ostreatus*, *L. edodes* e *Lentinus strigosus* Fr. Entretanto ainda não haviam sido utilizadas como substrato para cultivo em estado sólido visando a produção enzimática. Outros substratos alternativos já foram utilizados em trabalhos sobre atividade lignocelulolítica de macrofungos tais como: bagaço de laranja, serragem de *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp., entre outros (SILVA, 2004).

No cultivo em estado sólido, todos os fungos estudados foram mais eficientes na produção de lacase, quando cultivado no substrato com serragem de marupá. Para *L. crinitus* e *Corioloopsis* sp. a produção de manganês peroxidase, lignina peroxidase e OAV também foi superior neste substrato. Enquanto que para *Auricularia* sp. o cultivo em estado sólido com serragem de cajuí foi o mais indicado para expressão de manganês peroxidase, lignina peroxidase e OAV. No entanto, estas enzimas foram pouco expressas tanto no cultivo submerso quanto no cultivo em estado sólido.

5.4.2. Variação das concentrações de biomassa e do pH durante os cultivos de *L. crinitus*, *Corioloopsis* sp. e *Auricularia* sp.

Para a obtenção dos valores de biomassa fez-se uma curva empregando quantidades entre 2,5 a 100 mg de micélio. No cultivo com serragem cajuí houve incremento da produção de biomassa a partir do 6º dia tanto de *Corioloopsis* sp. como *L. crinitus* atingindo no 14º dia de cultivo 84,7 mg/g e 112,4 mg/g, respectivamente. Percebe-se que com o aumento de biomassa ocorreu a diminuição do pH, no 8º dia o pH do cultivo destas linhagens decaiu para 4, 4 e 4, 7 respectivamente.

Tabela 8. Produção enzimática de Agaricomycetes em diferentes substratos lignocelulolíticos, em cultivos em estado sólido.

Enzima	Fungo	Substrato	Atividade	Referências
Lac	<i>Auricularia</i> sp.	Marupá	502,7 UI/g	Neste trabalho
		Cajuí	170,8 UI/g	
	<i>Corioloopsis</i> sp.	Marupá	402 UI/g	Neste trabalho
		Cajuí	240 UI/g	
	<i>L. crinitus</i>	Marupá	194,2 UI/g	Neste trabalho
		Cajuí	47,5 UI/g	
MnP	<i>Auricularia</i> sp.	Marupá	0,07 UI/g	Neste trabalho
		Cajuí	0,16 UI/g	
	<i>Corioloopsis</i> sp.	Marupá	20,66 UI/g	Neste trabalho
		Cajuí	18,67 UI/g	
	<i>L. crinitus</i>	Marupá	0,23 UI/g	Neste trabalho
		Cajuí	0,20 UI/g	
LiP	<i>Auricularia</i> sp.	Marupá	0,001 UI/g	Neste trabalho
		Cajuí	0,016 UI/g	
	<i>Corioloopsis</i> sp.	Marupá	0,04 UI/g	Neste trabalho
		Cajuí	0,011 UI/g	
	<i>L. crinitus</i>	Marupá	0,003 UI/g	Neste trabalho
		Cajuí	0,001 UI/g	
Lac	<i>Auricularia polytricha</i> (Mont.) Sacc.	Malte	0,009 UI/g	Levin; Papinutti, Forchiassin (2004)
	<i>Corioloopsis byrsina</i> (Mont.) Ryv.	Farelo de trigo	279,02 UI/g	Gonçalves (2010)
	<i>Corioloopsis caperata</i> (Berk.) Murrill	Farelo de trigo	777, 83 UI/g	Nandal; Sreenivas; Ramesh (2013)
	<i>Pleurotus sapidus</i> QuéL.	Bagaço de cana	40, 56 UI/g	Patrick et al. (2014)
MnP	<i>Lentinus</i> sp.	Casca de amendoim	1004 UI/g	Carvalho (2005)
	<i>Lentinus edodes</i> (Berk.) Pegler	Serragem de <i>Eucalyptus</i> sp.	0,66 UI/g	Hermann (2011)
	<i>Pleurotus flabellatus</i> Sacc.	Vinhaça sólida	11,21 UI/g	Sartori (2011)
LiP	<i>Corioloopsis byrsina</i>	Farelo de algodão	1,13 UI/g	Gonçalves (2010)
	<i>Lentinus edodes</i>	Serragem de carvalho	0,011 UI/g	Montoya; Sánchez; Levin (2014)
	<i>Lentinus strigellus</i> Berk.	Farelo de algodão	1,14 UI/g	Gonçalves (2010)

Verificou-se o mesmo comportamento no meio com marupá para as linhagens de *Coriolopsis* sp. e *L. crinitus*. A partir do 8º dia *L. crinitus* teve um maior crescimento micelial atingindo 112 mg/g no último dia de cultivo, de modo simultâneo o pH também diminuiu para 4,1 (Figura 19C; 19D). Com *Coriolopsis* sp. o aumento de biomassa se iniciou a partir da segunda semana de cultivo, com o maior rendimento no 14º dia (78,8 mg/g). Este maior crescimento micelial acompanhou a diminuição gradativa do pH de cultivo, de 6,1 para pH 4 no 14º dia (Figura 19E; 19F).

A concentração final de biomassa fúngica é resultado direto do crescimento celular e do metabolismo primário. Com o aumento da biomassa ocorre a síntese de vários ácidos orgânicos como o malônico, o oxálico, o fumárico, o succínico entre outros, resultando na diminuição do pH (TAVARES, 2006). Tal fato pode ser observado nos cultivos em estado sólido de *Coriolopsis* sp. e *L. crinitus*. Quando se compara a máxima atividade de lacase e o respectivo valor de pH, nota-se que quanto menor o pH do meio, menor a produção desta enzima demonstrando que o pH do meio é um dos fatores que mais afetam a produção enzimática. Em contrapartida o crescimento micelial e o aumento de atividade de lacase não estão relacionados. Isto indica que a alta produção desta enzima é resultado do metabolismo secundário do fungo e não está associada ao crescimento micelial, mas a um estímulo externo.

Quanto a biomassa, a maior quantidade foi obtida para *Auricularia* sp. cultivada em marupá no 4º dia (78 mg/g), seguida por uma diminuição do crescimento micelial. No cultivo em cajuí o crescimento micelial começou a aumentar a partir do 6º dia atingindo seu maior valor no último dia de cultivo (96,7 mg/g) ocorrendo também a diminuição dos valores de pH. Nota-se que para os cultivos de *Auricularia* sp. em cajuí, o pH do meio manteve-se próximo a neutralidade até o 6º dia de cultivo com pH 7, a partir da segunda semana ocorreu uma diminuição progressiva chegando a 4,9 no último dia (Figura 19).

No meio com serragem marupá, esta linhagem não teve oscilações bruscas de pH, variando entre pH 6 e pH 6,7 até o 6º dia de cultivo. Esta variação moderada do pH pode estar relacionada ao menor metabolismo do fungo nesta condição de cultivo (Figura 19A; 19B).

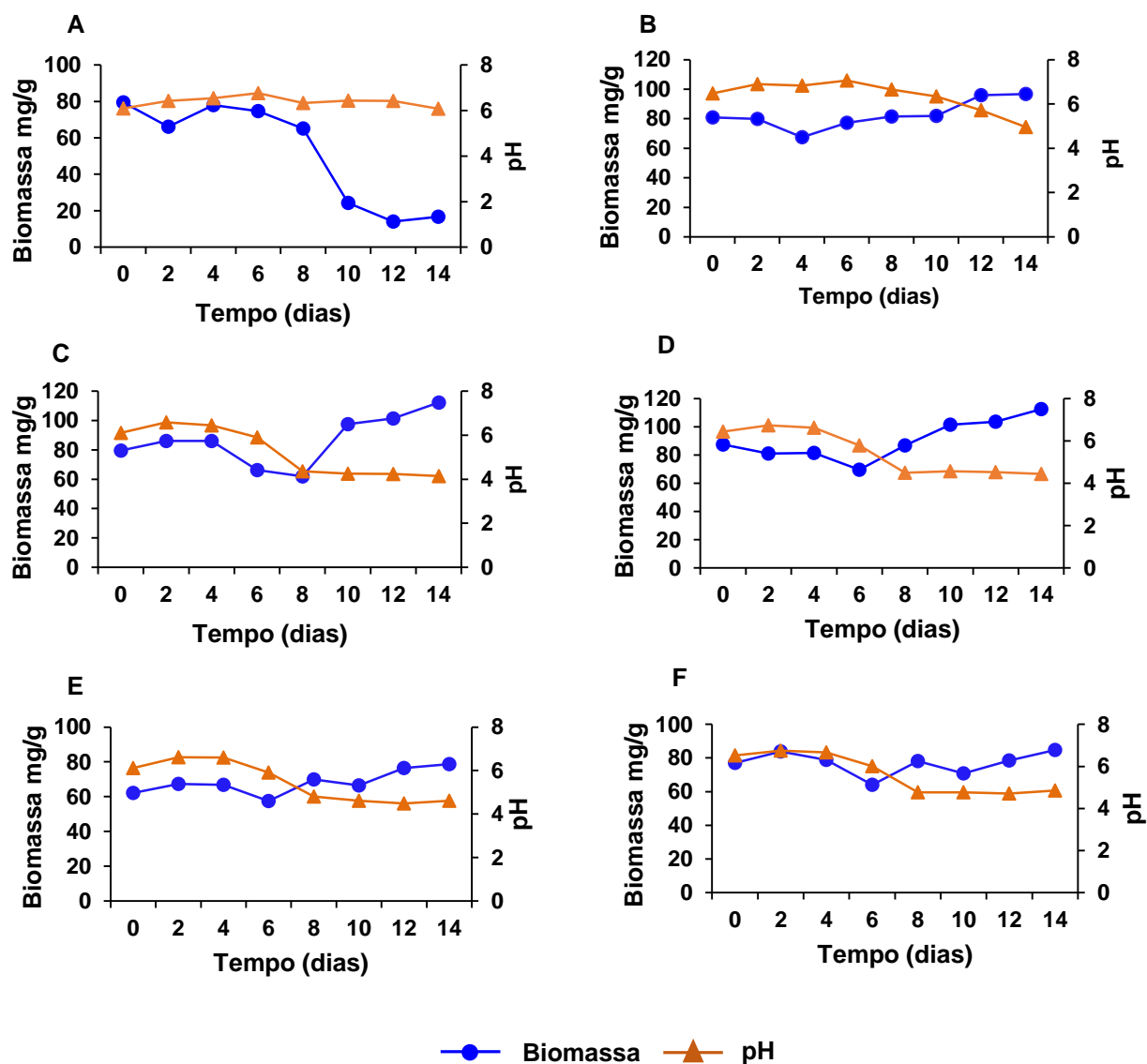


Figura 19. Variação dos valores de pH e biomassa micelial de *Auricularia* sp., *L. crinitus* e *Corioloopsis* sp. cultivado em marupá (A, C, E) e cajuí (B, D, F), respectivamente. Os valores correspondem à média de quatro replicatas.

5.5. CARACTERIZAÇÃO DE LACASE

Para a caracterização de lacase foram utilizados os extratos brutos de *Coriolopsis* sp., *Auricularia* sp. e *L. crinitus* coletados no 8º dia do cultivo submerso. No cultivo em estado sólido, formulado com serragem cajuí utilizou-se os extratos do 4º, 6º e 8º dia de *L. crinitus*, *Coriolopsis* sp. e *Auricularia* sp., respectivamente. No meio com marupá foi utilizado extratos do 6º dia para *Coriolopsis* sp. e *L. crinitus* e 10º dia para *Auricularia* sp. Tais amostras foram utilizadas devido a alta atividade de lacase.

5.5.1. Atividade de lacase em diferentes pH

A influência do pH foi determinada apenas para a lacase, uma vez que a atividade das demais enzimas foi pouco significativa. Foi determinada a atividade de lacase dos extratos obtidos, na faixa de pH de 3 - 8, utilizando os tampões Mc'Ilvaine e Acetato de sódio.

O aumento do pH, utilizando os dois tampões, promoveu um decréscimo nas atividades de lacases para os extratos avaliados. Nota-se que para os extratos de *Coriolopsis* sp. obtidos das duas serragens, a atividade de lacase apresentou maior atividade na faixa de pH compreendida entre 3 e 4,5. A partir do pH 4,5 houve uma queda acentuada na atividade desta enzima (Figura 20A). Não foi encontrada atividade de lacase em pHs superiores a 6,5. Em estudo de Carvalho (2005) a maior atividade de lacase de *C. byrsina* foi obtida entre pH 3,0 e 4,5 com diminuição da atividade enzimática a partir do pH 5,0. Na Tabela 9 está listado o pH ótimo de lacase para outros Agaricomycetes. Nota-se que estes fungos também apresentaram maior atividade de lacase entre pH 2,0 – 4,5.

Com o tampão Mc'Ilvaine os extratos de *L. crinitus* obtidos do cultivo com substrato cajuí tiveram a maior atividade de lacase em pH 3 (160,3 UI/g), com diminuição a partir do pH 4. O mesmo foi observado no cultivo em marupá, apesar da atividade de lacase ter sido menos expressiva (33,8 UI/g). A partir do pH 6 não foi detectado atividade de lacase nesses extratos (Figura 20B). Resultados obtidos por Carvalho (2005) com *Lentinus* sp. demonstraram que na faixa pHs de 3,5 e 4,0 a atividade de lacase é superior. No entanto, quando os ensaios foram realizados em pH 5,0 houve um decréscimo de 55% da atividade.

Para *Auricularia* sp. a faixa de pH entre 4 e 4,5 obteve maior atividade de lacase tanto em marupá (544 UI/g) como em cajuí (72 UI/g). A partir do pH 7 não se detectou atividade nos extratos de *Auricularia* sp. (Figura 20C).

Os extratos de *Corioloopsis* sp. (1458 UI/g), *L. crinitus* (118 UI/g) e *Auricularia* sp. (69,6 UI/g) obtidos do meio líquido obtiveram maior atividade no pH 3, com decréscimo gradual a partir do pH 4. Não foi detectada a atividade de lacase a partir do pH 6,5 (Figura 21).

No tampão acetato de sódio, a melhor atividade de lacase para *Corioloopsis* sp. cultivados em cajuí (466 UI/g) e em marupá (427 UI/g) foi em pH 4,0 (Figura 22B). As lacases de *Auricularia* sp. obtiveram melhor desempenho entre pH 4 e 4,5 (Figura 22A).

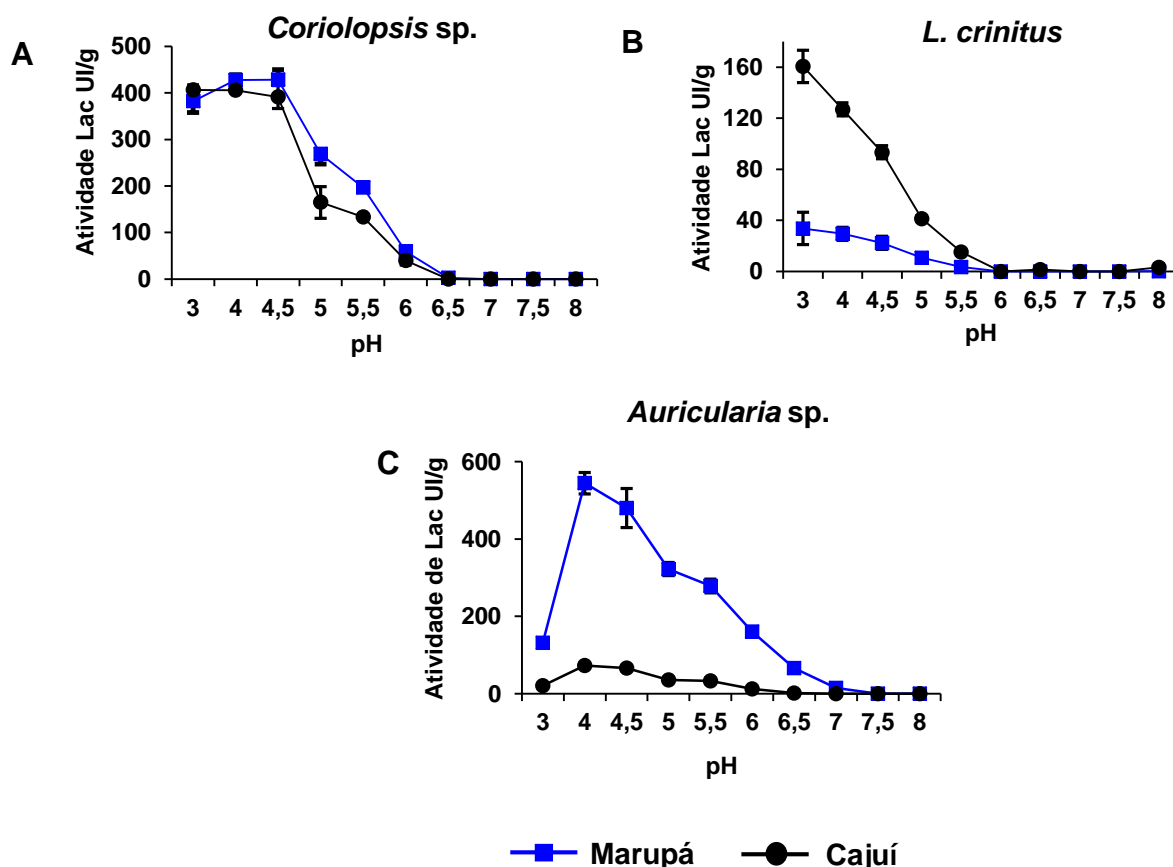


Figura 20. Efeito da variação do pH nas atividades de lacases obtidas de extratos de *Corioloopsis* sp. (A), *L. crinitus* (B) e *Auricularia* sp. (C) em cultivo em estado sólido. As análises foram realizadas com tampão Mc'Ilvaine e ABTS como substrato.

Em *L. crinitus* a atividade de lacase tanto do cultivo em cajuí (63,3 U/g), como em marupá (16,9 UI/g) foi melhor em pH 4 (Figura 22C). Quando os ensaios foram realizados em pH 5,0 houve um decréscimo de atividade das lacases nas três linhagens. Na tabela 9 vê-se que outras espécies de *Lentinus* também apresentaram pH ótimo entre 3,0 – 4,0.

Os extratos brutos do cultivo líquido de *Auricularia* sp. (73 UI/g) e *L. crinitus* (66 UI/g) tiveram maior atividade de lacase no pH 4,5. Enquanto a atividade de lacase de *Corioloopsis* sp. (1130 UI/g) foi melhor em pH 4 (Figura 23).

Considerando que os efluentes têxteis com corantes normalmente apresentam pH alcalino é necessário que as enzimas utilizadas para a biorremediação apresentem atividade nesta condição. Entretanto as maiores atividades de lacase são obtidas em pH ácido (Tabela 9). Deste modo uma alternativa seria uso desta enzima na forma imobilizada, visto que em experimento com lacase livre o pH ótimo foi 4,0, enquanto que imobilizada o pH ótimo foi acima de 7,0 (PACHECO; SOARES, 2014).

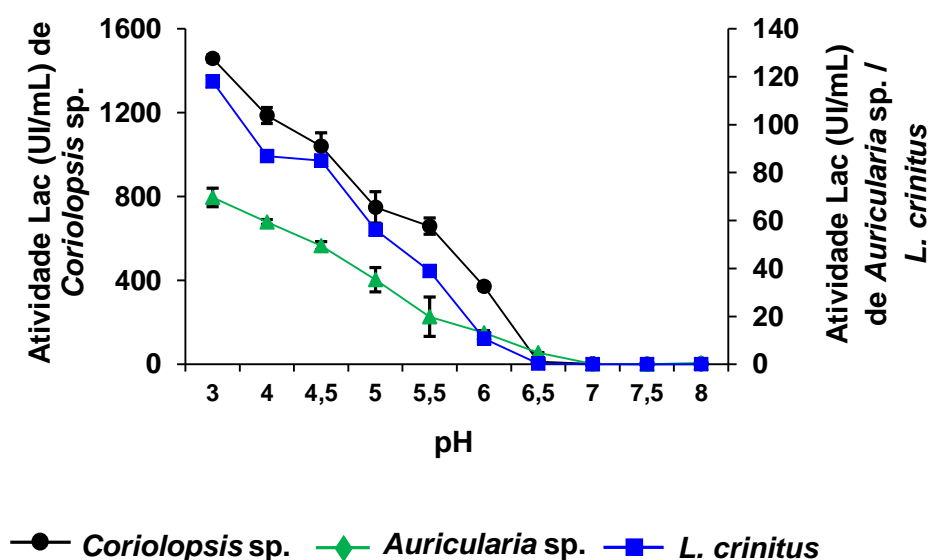


Figura 21. Efeito da variação do pH nas atividades de lacases obtidas de extratos de *Corioloopsis* sp., *Auricularia* sp. e *L. crinitus* em cultivo líquido. As análises foram realizadas com tampão Mc'Ilvaine e ABTS como substrato.

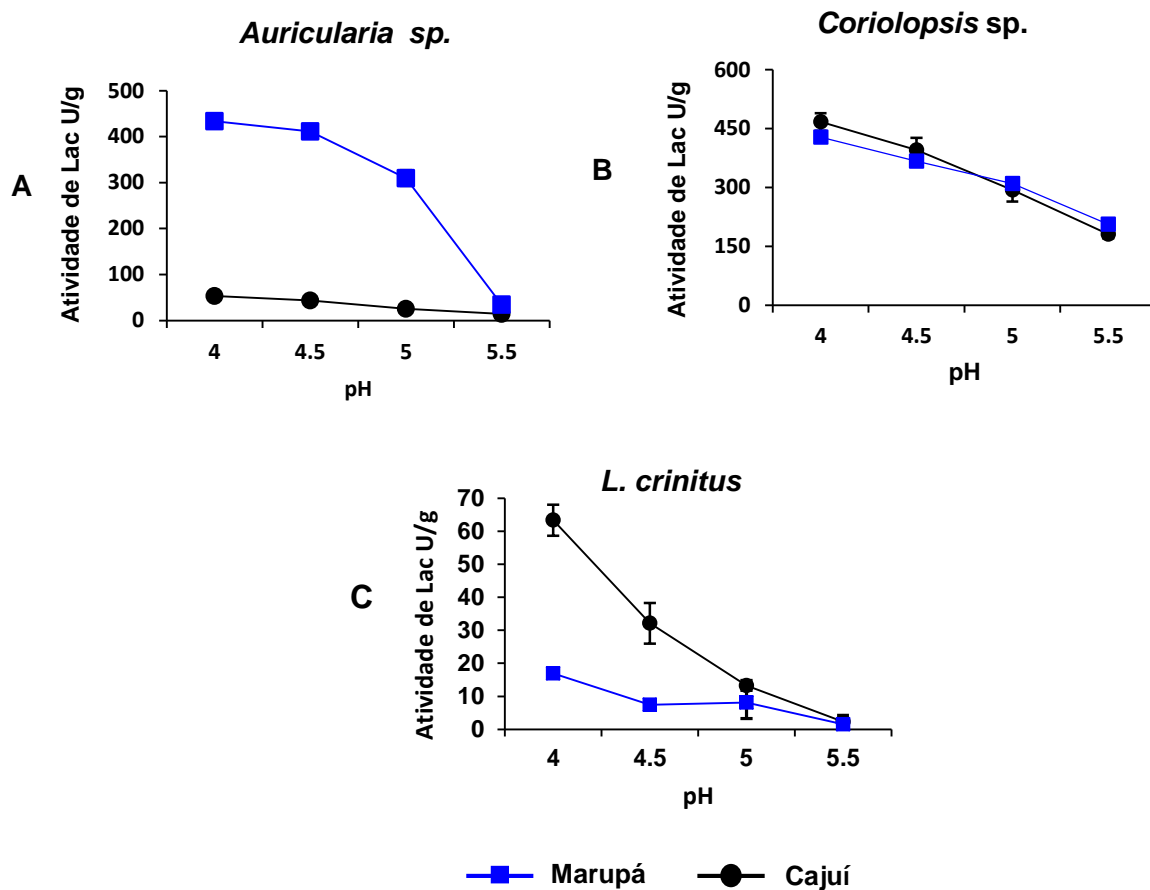


Figura 22. Efeito do pH na atividade de lacases obtidas de extratos de *Auricularia sp.*, *Corioloopsis sp.* e *L. crinitus* em cultivo sólido. As análises foram realizadas com tampão Acetato de sódio e ABTS como substrato.

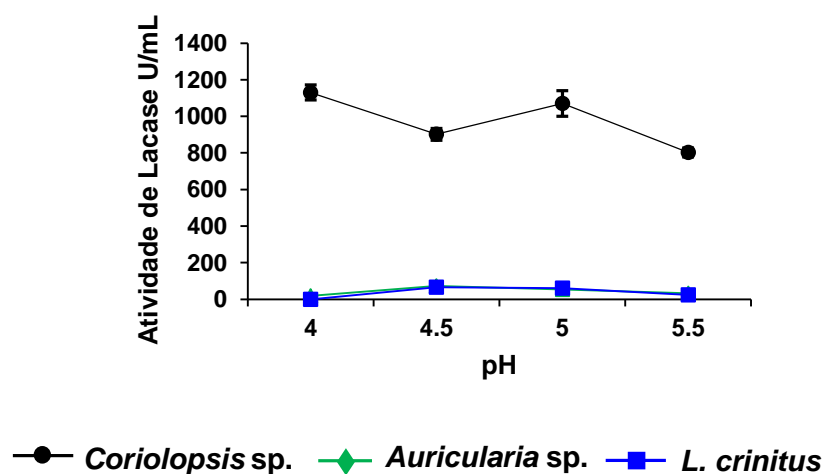


Figura 23. Efeito do pH na atividade de lacases obtidas de extratos de *Auricularia sp.*, *Corioloopsis sp.* e *L. crinitus* em cultivo líquido. As análises foram realizadas com tampão Acetato de sódio e ABTS como substrato.

Tabela 9. Macrofungos com diferentes pH's ótimos.

Tampão	Fungo	pH Ótimo	Referências
Mc'Ilvaine	Cultivo em estado sólido/ cajuí		Neste trabalho
	<i>L. crinitus</i>	3,0	Neste trabalho
	<i>Auricularia</i> sp.	4,0	Neste trabalho
	<i>Corioloopsis</i> sp.	4,0	Neste trabalho
	Cultivo em estado sólido/ marupá		Neste trabalho
	<i>L. crinitus</i>	3,0	Neste trabalho
	<i>Auricularia</i> sp.	4,0	Neste trabalho
	<i>Corioloopsis</i> sp.	4,0 – 4,5	Neste trabalho
	Cultivo submerso		Neste trabalho
	<i>L. crinitus</i>	3,0	Neste trabalho
	<i>Auricularia</i> sp.	3,0	Neste trabalho
	<i>Corioloopsis</i> sp.	3,0	Neste trabalho
Acetato de sódio	Cultivo em estado sólido/ cajuí		Neste trabalho
	<i>L. crinitus</i>	4,0	Neste trabalho
	<i>Auricularia</i> sp.	4,0	Neste trabalho
	<i>Corioloopsis</i> sp.	4,0	Neste trabalho
	Cultivo em estado sólido/ marupá		Neste trabalho
	<i>L. crinitus</i>	4,0	Neste trabalho
	<i>Auricularia</i> sp.	4,0- 4,5	Neste trabalho
	<i>Corioloopsis</i> sp.	4,0	Neste trabalho
	Cultivo submerso		Neste trabalho
	<i>L. crinitus</i>	4, 5	Neste trabalho
	<i>Auricularia</i> sp.	4, 5	Neste trabalho
	<i>Corioloopsis</i> sp.	4,0	Neste trabalho
Citrato-NaOH	<i>Corioloopsis byrsina</i>	3,5	Carvalho, (2005)
Citrato-NaOH	<i>Lentinus</i> sp.	3,5 - 4,0	Carvalho, (2005)
Malonato-sódio	<i>Lentinus strigellus</i> Berk.	3,0	Gomes et al. (2009)
Fosfato de sódio-ácido cítrico	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm	3,3	Bettin, (2010)
Acetato de sódio	<i>Trametes pubescens</i> (Schum.) Pilát	2,0 - 4,0	Gonzalez et al. (2013)
-----	<i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát.	4,0	Orozco-Rocha et al. (2013)
Fosfato de sódio-ácido cítrico	<i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd	4, 5	Touahar et al. (2014)

5.5.2. Temperatura

As lacases de *Corioloopsis* sp. e *Auricularia* sp. obtidas do cultivo em estado sólido apresentaram maior atividade a 45°C, esta mesma temperatura foi o ideal para as lacases produzidas por *Trametes trogii*, conforme listado na Tabela 10. Nota-se que a atividade enzimática para estes fungos aumentou conforme a elevação da temperatura. Outros fungos apresentam atividade ótima acima dos 45 °C, como o *P. sapidus* e *T. pubescens* com uma atividade máxima de lacase a 50 °C. Para *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst. usando como substrato ABTS e *Phlebia brevispora* Nakasone a atividade máxima de lacase foi a 80 °C e 70 °C, respectivamente (Tabela 10).

As lacases de *L. crinitus* do cultivo em estados sólido no substrato cajuí e marupá tem máxima atividade a 40 °C e 35 °C, respectivamente (Figura 25B). Estas temperaturas também foram reportadas como ideais para lacases de *Corioloopsis floccosa* e *Pleurotus ostreatus* (Tabela 10).

No cultivo líquido a melhor temperatura foi de 45°C para *Corioloopsis* sp. (1033 UI/mL), *L. crinitus* (52,1 UI/mL) e *Auricularia* sp. (29 UI/mL) (Figura 24). A temperatura ótima é um fator que influencia a atividade da lacase podendo variar conforme a espécie e com o substrato utilizado (ALVES, 2011). As temperaturas listadas na Tabela 10 evidenciam a ampla faixa de temperaturas que favorecem a atividade desta enzima. De acordo com a literatura a temperatura ótima da maioria das lacases encontra-se no limite 25 °C – 80 °C (ALVES, 2011).

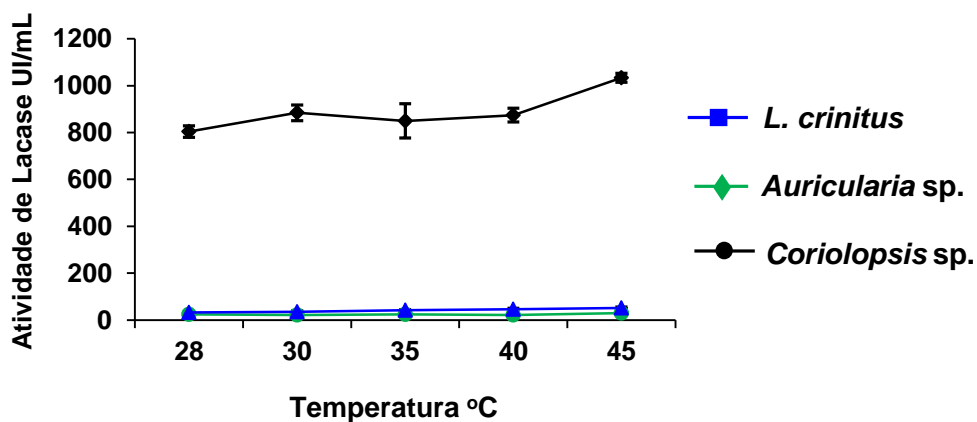


Figura 24. Efeito da temperatura na atividade de lacases obtidas de extratos de *Auricularia* sp., *Corioloopsis* sp. e *L. crinitus* em cultivo líquido. As análises foram realizadas com tampão Acetato de sódio e ABTS como substrato.

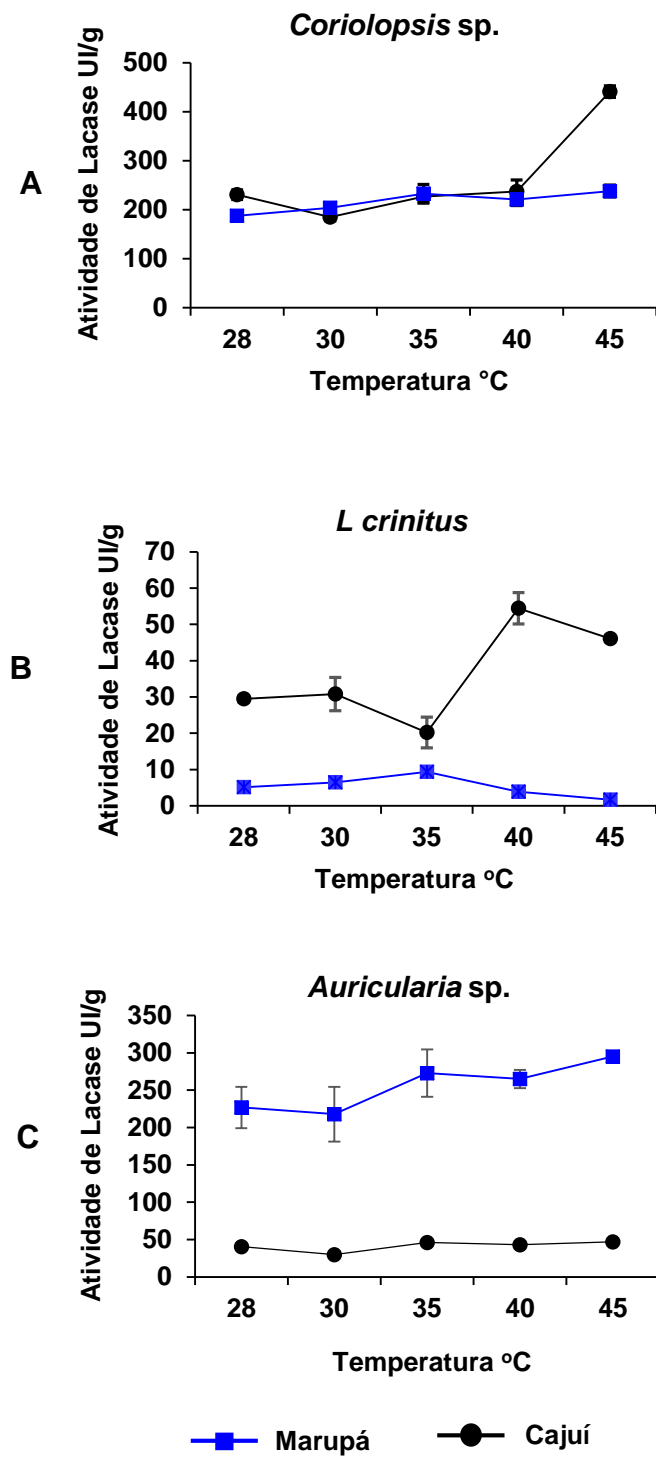


Figura 25. Efeito da temperatura na atividade de lacases obtidas de extratos de crescimento de *Auricularia sp.*, *Coriolopsis sp.* e *L. crinitus* em cultivo sólido. As análises foram realizadas com tampão Acetato de sódio e ABTS como substrato.

Tabela 10. Temperatura ótima de lacase.

Fungo	Substrato	Temperatura °C	Referências
Cajuí			
<i>L. crinitus</i>	ABTS	40	Neste trabalho
<i>Auricularia</i> sp.	ABTS	45	Neste trabalho
<i>Coriolopsis</i> sp.	ABTS	45	Neste trabalho
Marupá			
<i>L. crinitus</i>	ABTS	35	Neste trabalho
<i>Auricularia</i> sp.	ABTS	45	Neste trabalho
<i>Coriolopsis</i> sp.	ABTS	45	Neste trabalho
Cultivo submerso			
<i>L. crinitus</i>	ABTS	45	Neste trabalho
<i>Auricularia</i> sp.	ABTS	45	Neste trabalho
<i>Coriolopsis</i> sp.	ABTS	45	Neste trabalho
<i>Auricularia auricula</i> (Hook.) Underw	-----	50 °C	Li-ming et al. (2010)
<i>Cerrena</i> sp.	ABTS	55 °C	Yang (2013)
<i>Coriolopsis floccosa</i> (Jungh.) Ryv.	DMP	40 °C	Chaurasia et al. (2013)
<i>Fomitopsis pinicola</i> (Sw.) P. Karst.	ABTS	80 °C	Park e Park (2014)
<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	ABTS	50 °C	Kumar et al. (2015)
<i>Phlebia brevispora</i> Nakasone	DMP	60 - 70 °C	Fonseca et al. (2015)
<i>Phlebia rufa</i> (Pers.)	ABTS	65 °C	Alves (2011)
<i>Pleurotus sapidus</i> Quéf.	ABTS	50 °C	Salem (2014)
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm	SGZ	30 – 40 °C	Othman et al. (2014)
<i>Trametes</i> sp.	DMP	60 °C	Daâssi et al. (2014)
<i>Trametes pubescens</i> (Schum.) Pilát	ABTS	50 °C	Si, Peng, Cui (2013)
<i>Trametes trogii</i> Berk.	ABTS	45 °C	Yan et al. (2014)

5.5.3. Termoestabilidade

Em baixas temperaturas, as reações são mais lentas devido à queda da energia cinética do sistema, a medida que a temperatura se eleva ocorre o aumento na velocidade de reação. Como efeito adverso, a molécula absorve excesso de energia resultando no rompimento da estrutura terciária da enzima e perda da atividade catalítica. Neste sentido a velocidade de reação e velocidade de desnaturação são efeitos opostos da elevação da temperatura (GOMES et al., 2006), sendo essencial avaliar o comportamento da enzima frente a estas variações. Os nove extratos brutos de lacase foram avaliados em relação ao efeito da temperatura ao longo de 72 horas. Foram avaliados nos pH's ideais obtidos anteriormente, em tampão Acetato de sódio e Mc'Ilvaine.

As temperaturas de 35 °C, 40 °C e 45 °C em 72h de incubação propiciaram o aumento da atividade de lacase obtidas do extrato de *Coriolopsis* sp. (Figura 26B). As lacase de *Coriolopsis* sp. obtidas em meio com cajuí apresentaram baixa estabilidade visto que em 30°C, 40°C e 45°C a atividade diminui progressivamente (Figura 26A).

Verifica-se que as lacases de *L. crinitus* são sensíveis a temperatura, após 6h ocorreu uma queda acentuada na atividade enzimática desta enzima quando mantida a 30 °C (30%), 35 °C (31%), 40 °C (60%) e 45 °C (17%) (Figura 27B). As lacases obtidas de *L. crinitus* em meio com cajuí mantiveram atividade até 24h, seguida de diminuição gradual (Figura 27A). Resultados semelhantes foram obtidos com lacases de *Trametes galica* (Fr.) Fr. e *A. blazei*, onde a atividade enzimática sofreu uma diminuição brusca a 60°C (ULLRICH et al., 2005)

Na linhagem de *Auricularia* sp. as lacases dos dois substratos apresentaram um perfil de atividade similar. Para as temperaturas de 35 °C, 40 °C e 45 °C o pico de atividade ocorreu após 24h de incubação. Para as lacases obtida do cultivo em substrato cajuí, atividade enzimática diminui nas temperaturas de 35°C (50%), 40°C (70%) e 45°C (80%), após 72h de incubação. Por outro lado as lacases de *Auricularia* sp. obtidas do meio com serragem marupá incubadas em 30 °C e 35 °C não tiveram uma grande diminuição de atividade, diferente das lacases incubadas a 40 °C (80%) e 45 °C (95%) que após 72h foram praticamente inativadas (Figura 27C; 27D).

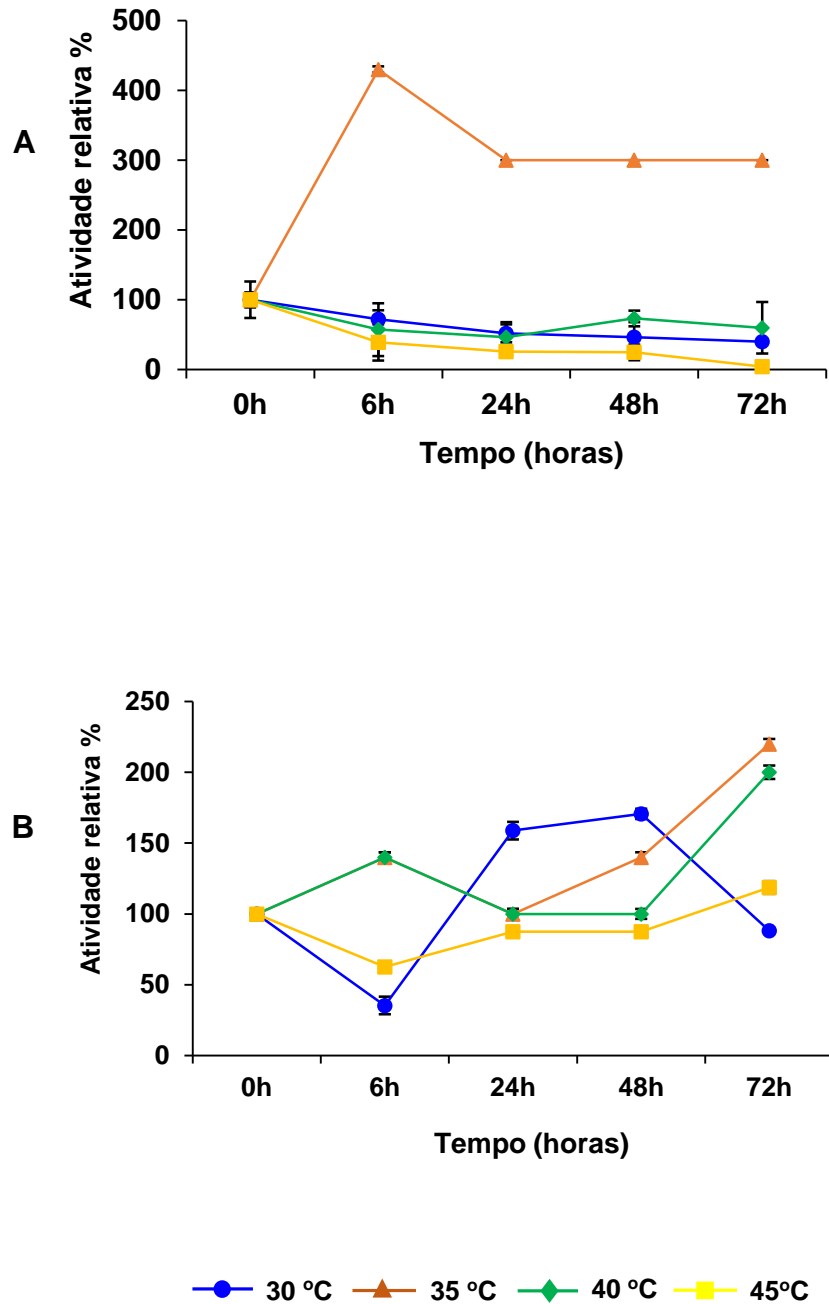


Figura 26. Termoestabilidade de lacases de *Coriolopsis* sp. a 30, 35, 40 e 45°C após 72 h, utilizando ABTS como substrato em tampão acetato, pH 4. Extrato bruto de lacase obtidas em meio com serragem cajuí (A). Extrato bruto de lacase obtidas do cultivo em estado sólido com substrato marupá (B). Os valores correspondem a média de três replicatas e as barras ao desvio padrão.

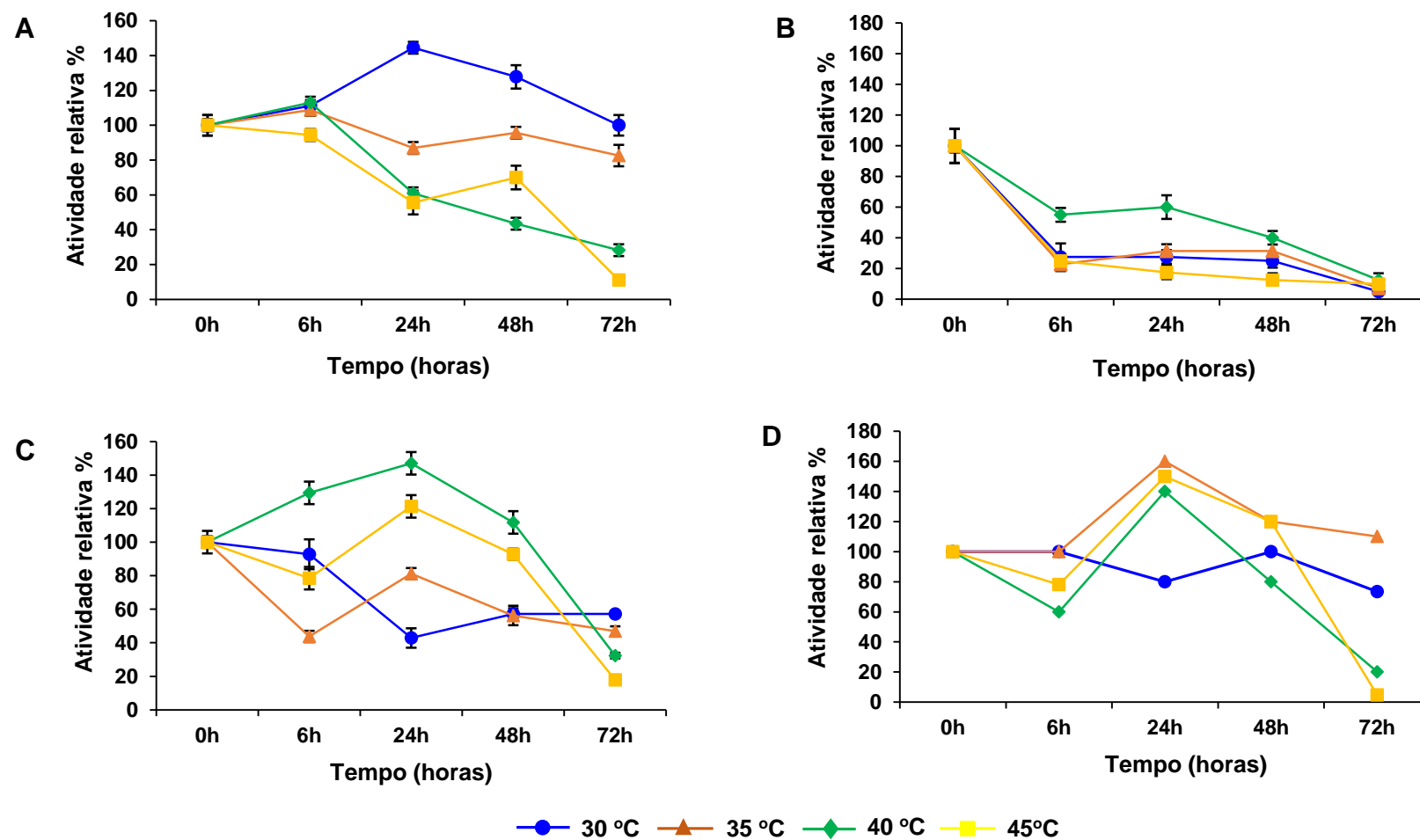


Figura 27. Termoestabilidade do extrato de lacases a 30, 35, 40 e 45°C após 72 h, utilizando ABTS como substrato em tampão Acetato de sódio, pH 4. Extrato bruto de lacase de *L. crinitus* obtidas em meio com Cajuí (A) e Marupá (B). Extrato bruto de lacase de *Auricularia* sp. obtidas em meio com cajuí (C) e marupá (D). Os valores correspondem a média de três replicatas.

As lacases de *L. crinitus* de cultivo líquido apresentaram baixa estabilidade, após 6 h de incubação a perda de atividade foi de cerca de 75% em todas as temperaturas testadas. A partir de 48h houve perda total de atividade da lacase mantida em 30 °C. Com 72 h as enzimas incubadas em 35 °C, 40 °C e 45 °C também foram inativadas. As lacase de *Auricularia* sp. com 6h de incubação diminuíram sua atividade cerca de 70%. As lacases de *Coriolopsis* sp. apresentaram maior estabilidade, sendo que em 30 °C a atividade aumentou 70% após 72 h de incubação. Nas temperaturas de 35 °C, 40 °C e 45 °C a atividade diminuiu com perda de 8%, 64% e 70% da atividade catalítica após 72 h (Figura 28).

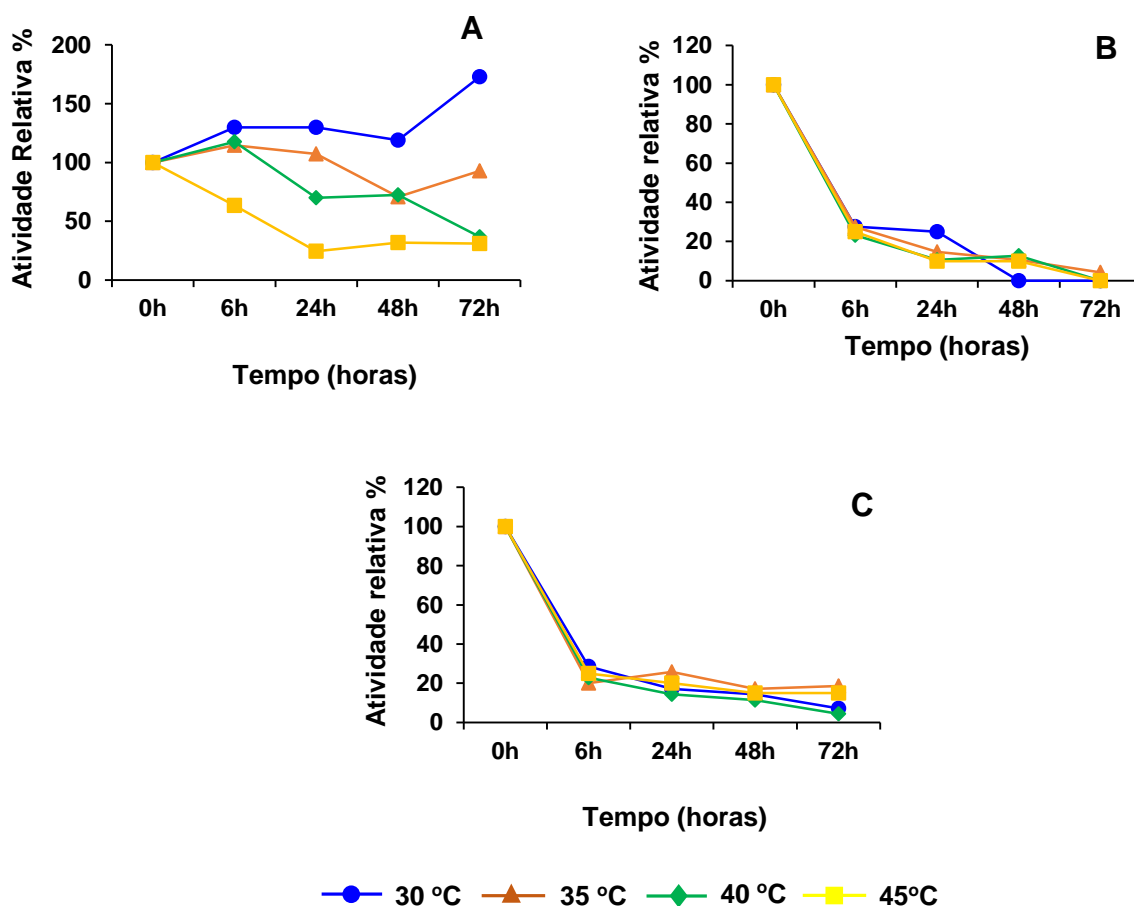


Figura 28. Termoestabilidade do extrato de lacases a 30, 35, 40 e 45°C após utilizando ABTS como substrato em tampão Acetato de sódio. Extrato bruto de lacase de cultivo líquido de *Coriolopsis* sp. (A), *L. crinitus* (B) e *Auricularia* sp. (C). Os valores correspondem a média de três replicatas.

A estabilidade térmica de lacase foi avaliada utilizando as mesmas amostras acima, entretanto com tampão Mc'Ilvaine.

As lacases de *Corioloropsis* sp. obtidas em meio com cajuí e marupá tiveram comportamento distintos (Figura 29). As lacases de cajuí diminuíram sua atividade catalítica cerca de 80% após 6h de incubação em 30°C, 35°C e 45°C. Para a temperatura de 45°C a diminuição da atividade enzimática foi de 95%. Os extratos brutos de lacase obtidas do cultivo com substrato marupá diminuíram gradualmente após 72h de incubação em 35°C (66 %) e 45°C (98 %). Entretanto no mesmo período verificou-se aumento de atividade de lacase incubadas a 30°C e 40°C.

Enquanto que *Auricularia* sp. apresentou pico de atividade de lacase em todas as temperaturas com 6h de incubação, posteriormente houve decréscimo de atividade (Figura 30A; 30B).

Verificou-se que as lacase de *L. crinitus* obtidas em marupá e cajuí tem pouca estabilidade térmica, visto que a atividade catalítica caiu a partir de 6h de incubação, exceto para as enzimas incubadas a 30°C, que aumentaram a atividade após 48h (Figura 30C; 30D).

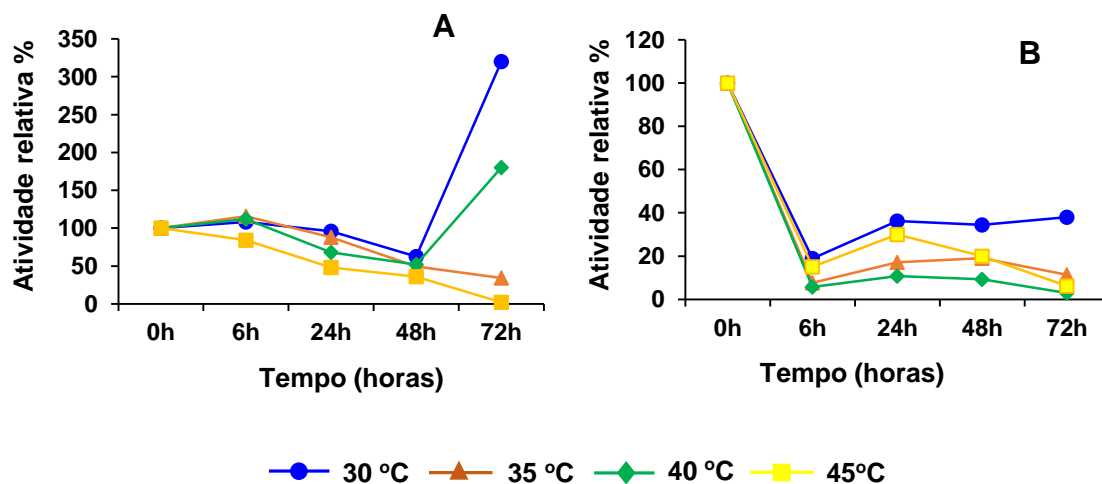


Figura 29. Termoestabilidade de lacases de *Corioloropsis* sp. a 30, 35, 40 e 45°C após 72 h, utilizando ABTS como substrato tampões Mc'Ilvaine, pH 4. Extrato bruto de lacase obtidas em meio com Cajuí (A). Extrato bruto de lacase obtidas em meio com Marupá (B). Os valores correspondem a média de três replicatas.

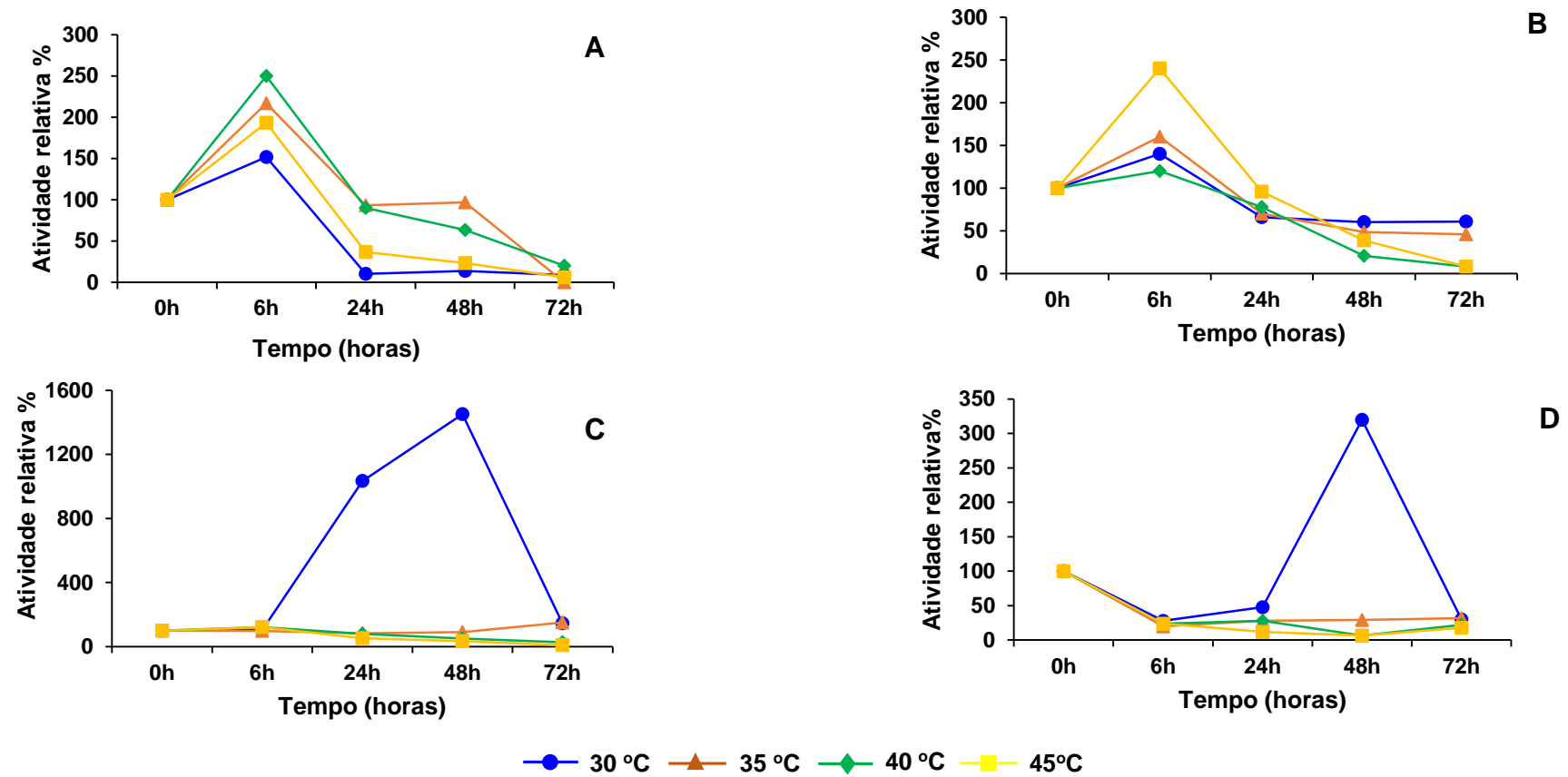


Figura 30. Termoestabilidade do extrato de lacases a 30,35, 40 e 45°C após 72 h, utilizando ABTS como substrato em tampão Mc'Ilvaine. Extrato bruto de lacase de *Auricularia* sp. obtidas em meio com Cajuí (A) e Marupá (B). Extrato bruto de lacase de *L. crinitus* obtidas em meio com Cajuí (C) e Marupá (D). Os valores correspondem a média de três replicatas.

No cultivo líquido as lacases de *L. crinitus* e *Auricularia* sp. mostraram-se pouco estáveis, visto que as amostras expostas as temperaturas (30, 35, 40 e 45 °C) perderam 100% de sua atividade após 72h de incubação (Figura 31). Somente, as lacases de *Coriolopsis* sp. mantiveram cerca de 30% de sua atividade após 72h quando incubados em 40 °C e 45 °C, enquanto que as lacase incubadas a 35 °C mantiveram valores de atividade próximos a 100% após 24h de incubação.

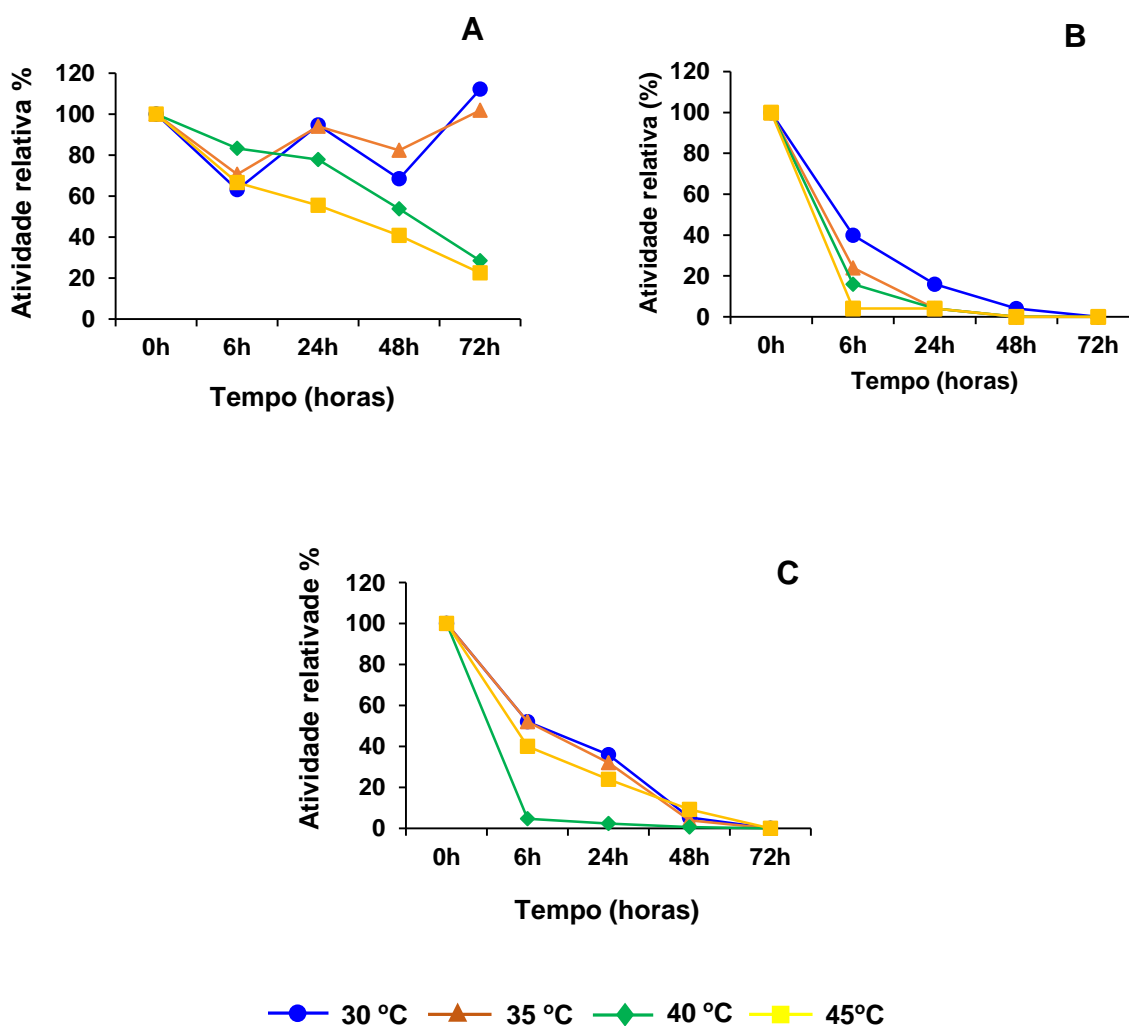


Figura 31. Termoestabilidade do extrato de lacases a 30, 35, 40 e 45°C após 72 h, utilizando ABTS como substrato em tampão McIlvaine. Extrato bruto de lacase de cultivo líquido de *Coriolopsis* sp. (A), *L. crinitus* (B) e *Auricularia* sp. (C). Os valores correspondem a média de três replicatas.

5.5.4. SDS-PAGE

Foram coletadas amostras do 6^o, 8^o e 4^o dia de *Corioloopsis* sp., *Auricularia* sp. e *L. crinitus* crescendo em cultivo com serragens de cajuí. No meio com marupá foi utilizado extratos do 6^o dia para *Corioloopsis* sp. e *L. crinitus* e do 10^o dia para *Auricularia* sp. Enquanto do cultivo submerso selecionou-se os extratos brutos do 8^o dia dos três fungos. Na Figura 32 são apresentados os géis utilizados para determinar a massa molar de lacases das amostras.

O perfil de lacases foi analisado usando SDS-PAGE, demonstrando a presença de múltiplas bandas. As amostras de *Auricularia* sp. do cultivo em cajuí, formaram duas bandas que correspondem a posição no gel de proteínas com massas molecular de aproximadamente 37 e 100 kD. Obteve-se uma banda correspondente ao valor de massa molar de 20 kDa das lacases de *Auricularia* sp. cultivadas em marupá. As amostras de *Corioloopsis* sp. e *Auricularia* sp. obtidas de cajuí e marupá apresentaram lacases com massa molar diferente. As lacases de *L. crinitus* formaram bandas próximo a 37 kDa (Figura 32).

A maioria das lacases apresenta massa molar entre 60-100 kDa. Entretanto, como observado neste estudo, os Agaricomycetes testados também podem produzir lacases com baixa massa molar (<45 kDa). Segundo Songulashvili et al. (2008), resultados similares foram encontrados com *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. (43 e 56 kDa) e *Pleurotus eryngii* (DC.) Qué. (34 kDa). A variação no tamanho de lacase está relacionado com o grau de glicosilação da proteína (BABU; PINNAMANENI; KOONA 2012).

A presença de bandas espessas foi observada na amostra do cultivo submerso de *Corioloopsis* sp. (Figura 32B). As amostras utilizadas são extratos brutos, e portanto, as enzimas não foram purificadas ou concentradas o que pode ter comprometido a qualidade do gel. Notou-se a formação de duas bandas com massa molar relativas entre 20 kDa e 37 kDa no cultivo de *L. crinitus* (Figura 33). Em estudos de Niebsch (2009) a massa molar de lacases obtidas de *L. crinitus* cultivado em meio mínimo líquido é correspondente a 41 kDa.

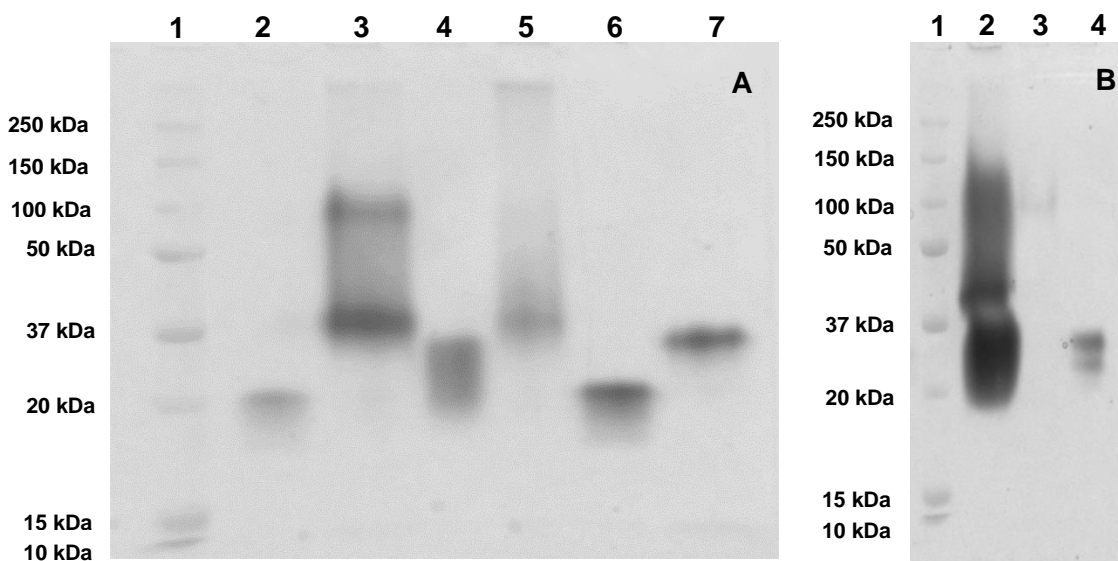


Figura 32. Perfil da atividade de lacases obtidas de cultivo sólido (A) e cultivo submerso (B), separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e revelada com ABTS. No gel proveniente do cultivo sólido em cajuí, os números de 2 a 4 representam as linhagens de *Corioloopsis* sp., *Auricularia* sp. e *L. crinitus*. E os números de 5 a 7 representam as mesmas linhagens cultivadas em marupá. No gel de cultivo líquido os números de 2 a 4 representam as linhagens de *Corioloopsis* sp., *Auricularia* sp. e *L. crinitus*. O número 1 de cada gel corresponde ao marcador de massa molar.

5.6. DEGRADAÇÃO DE CORANTES

Para os testes de descoloração foram utilizados os extratos brutos de lacases obtidos no cultivo submerso (CS) e no cultivo em estado sólido (CES). No cultivo submerso foram utilizados extratos de *Corioloopsis* sp., *Auricularia* sp. e *L. crinitus*. No cultivo em estado sólido, foram utilizados extratos brutos de *Corioloopsis* sp., *Auricularia* sp. e *L. crinitus* cultivados em substrato formulado com marupá. Estas amostras foram as mesmas empregados na caracterização parcial de lacase.

Para os testes de descoloração foram utilizados 23 corantes, divididos com base na estrutura química do grupo cromóforo, 5 são antraquinonas, 8 são trifenilmetanos e 10 são azocorantes. A Figura 35A mostra os resultados dos ensaios de descoloração de corantes trifenilmetanos por lacase de *Corioloopsis* sp. obtidas do cultivo submerso, onde o corante *Brilliant Green* (5%) foi degradado. Nota-se a diminuição gradativa da absorbância ao longo do tempo, indicando a remoção deste

corante da solução, em placa observou-se a modificação da cor quando comparado ao controle (Figura 33). Enquanto os demais corantes não foram degradados.

Após a ação das lacases de *Corioloopsis* sp. (CES) ocorreu uma diminuição moderada da absorbância dos corantes *Phenol red* (64%), *Metil violeta* (78%), *Gentil violet* (68%) e *Brillant green*, entretanto a modificação da cor em placa foi observada apenas para o corante *Brillant green* (Figura 35B).

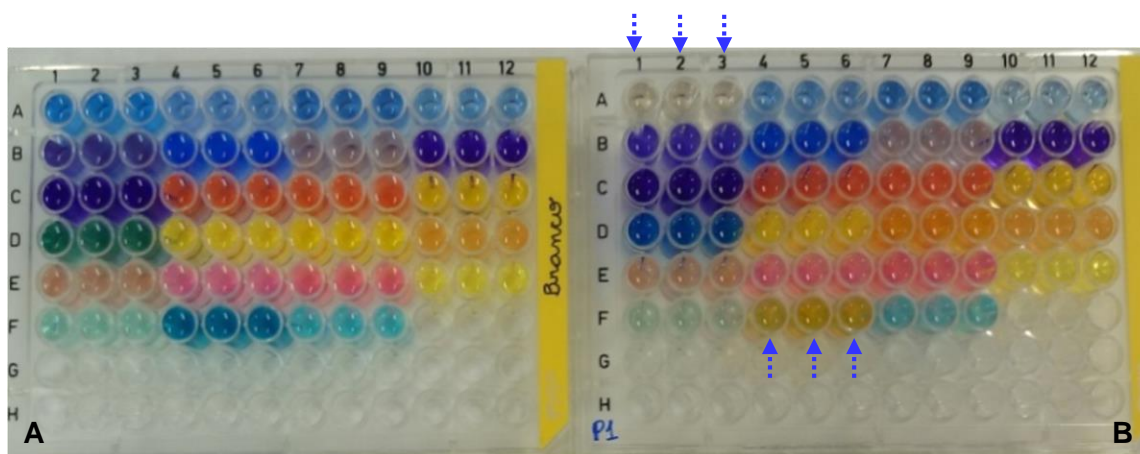


Figura 33. Degradação de corantes após 24 h em presença de 5 U/mL de lacases de *Corioloopsis* sp. (CS). Placa controle (A); Mudança no aspecto do corante *Acid blue* (a 1; a 2; a 3) e *Brillant Green* (f 4; f 5; f 6) degradados por lacase de *Corioloopsis* sp. -CS (B).

As lacases de *Auricularia* sp. (CS) e *Auricularia* sp. (CES) não foram eficientes na descoloração dos trifenilmetanos. A diminuição da absorbância de *Methyl violet* (87%), *Gentian Violet* (81%) e *Brillant green* (94%) foi baixa, após serem expostos a extratos de *Auricularia* sp. (CS). Os corantes *Phenol red* e *Comassie brilliant blue* não foram degradados (Figura 34).

O extrato de lacases de *L. crinitus* (CS), foi eficiente na descoloração de *Bromocresol green* (19%). A estrutura molecular do *Bromophenol blue* é semelhante ao do *Phenol red*, tendo como diferença a presença de átomos de bromo. Entretanto quando tratados pelo mesmo extrato enzimático apenas *Bromophenol blue* (15%) descoloriu (Figura 35C; Figura 35D). Presume-se que as diferenças de distribuição eletrônica, densidade de cargas, natureza e posição dos substituintes em um dos anéis aromáticos podem influenciar a descoloração. Os corantes *Methyl violet* (79%) e *Gentian Violet* (64%) foram pouco degradados por lacases de *L. crinitus* (CES).

Verifica-se na Figura 34 que os corantes *Bromophenol blue*, *Bromocresol green* e *Malachile green* tiveram um aumento da absorbância mesmo após o tratamento enzimático, tal fato indica a formação de produtos de oxidação que absorvem luz nesta região do espectro. Em estudos de degradação de RBBR por peroxidases também houve aumento de absorbância (SILVA et al., 2012). Zanella (2014), associa o aumento da absorbância da solução com corante carmim após o tratamento enzimático, com a formação de precipitado em alguns ensaios.

Aproximadamente metade dos corantes utilizados na indústria têxtil são azocorantes. São considerados recalcitrantes à degradação microbiológica e de alta toxicidades para biota aquática, sendo descrito como cancerígeno para seres humanos. Em testes de toxicidade os corantes azo inibiram o crescimento do *Tetrahymena pyriformis*, além de modificarem as dimensões deste protozoário (FONSECA et al., 2004).

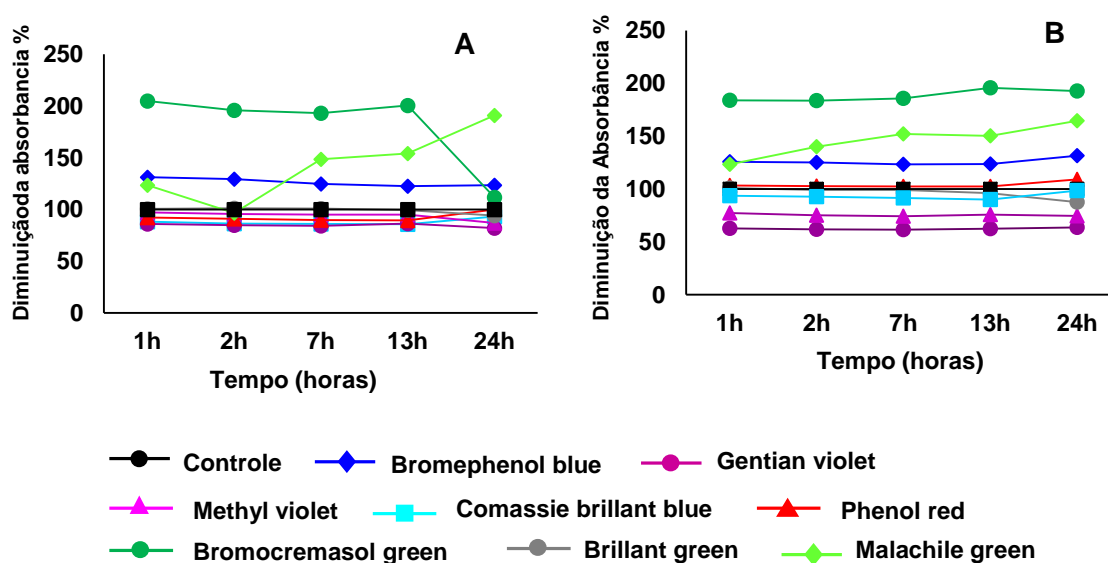


Figura 34. Diminuição da absorbância de corantes do grupo Trifenilmetano ao longo de 24 horas por extratos de lacase de *Auricularia* sp. (CS) (A) e *Auricularia* sp. (CES) (B).

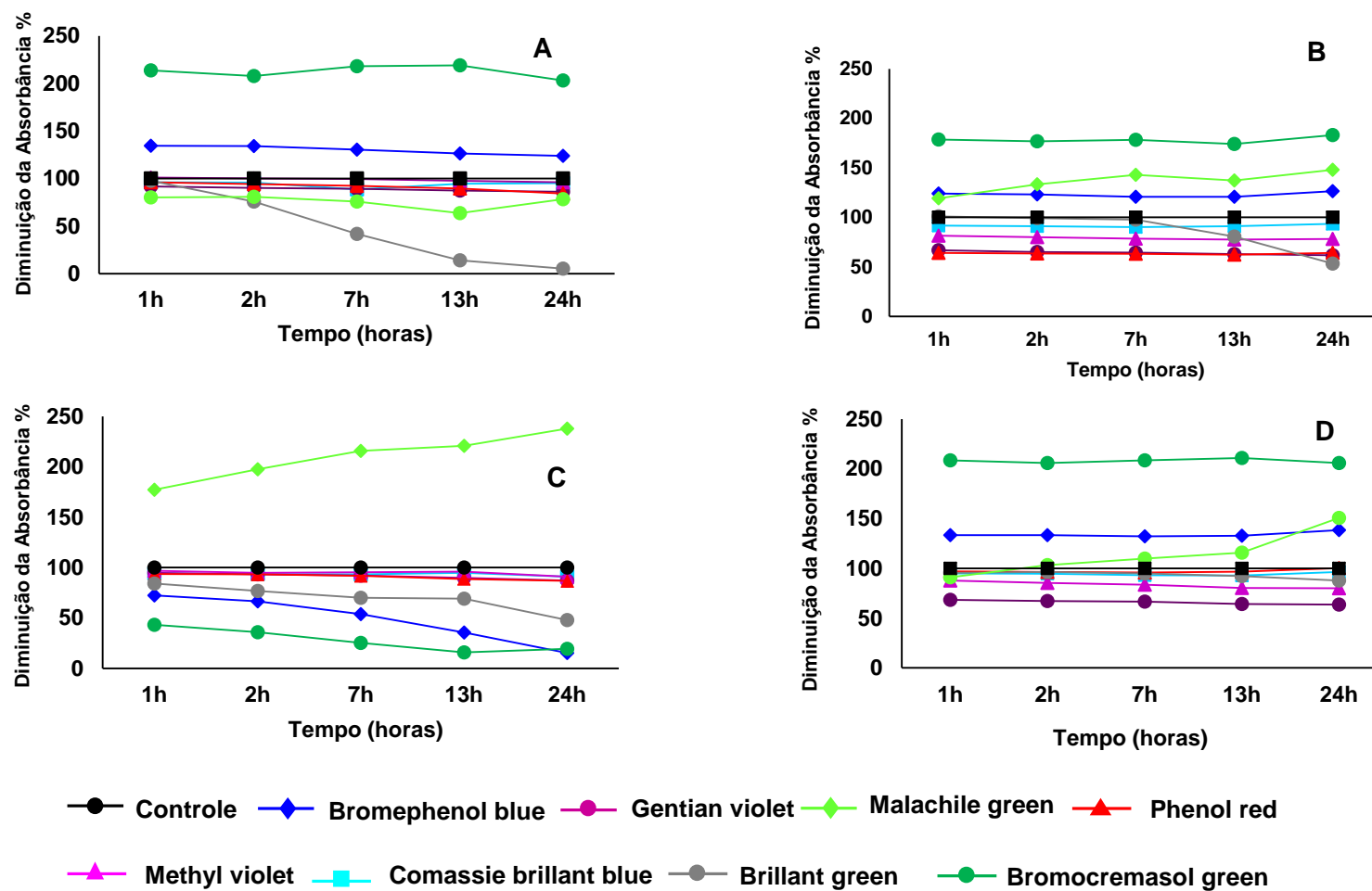


Figura 35. Diminuição da absorbância de corantes do grupo Trifenilmetano ao longo de 24 horas por extratos de lacase de *Coriopsis sp.*- CS (A), *Coriopsis sp.*- CES (B), *L. crinitus* - CS (C) e *L. crinitus* - CES (D).

Os extratos de lacase não foram eficientes na degradação dos azocorantes, pois não se observou a modificação no aspecto do corante em placa, além de não haver diminuição da absorbância. Exceto para o corante *Congo red*, onde após tratamento enzimático com lacases de *Auricularia* sp. (CS) e *L. crinitus* (CS), nota-se a diminuição da absorbância (Figura 37A; Figura 37C). Foi possível verificar em placa a alteração da cor, confirmando a degradação (Figura 36). As lacases de *Lentinus Polychrous* Lév. removeram 75% do corante do corante *Congo red* (SUWANNAWONG; KHAMMUANG; SARNTHIMA, 2010).

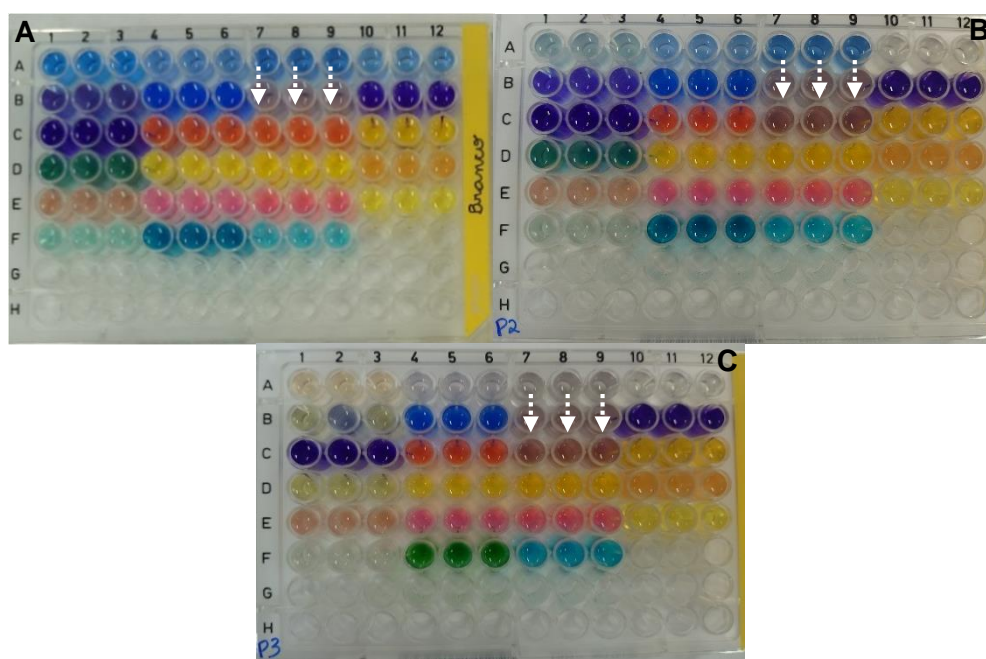


Figura 36. Degradação do azocorante por lacases de *Auricularia* sp. - CS e *L. crinitus* - CS (C). No Controle foi adicionado apenas corante e água (A). Nota-se modificações no corante Corante *Congo red* após 24 h na presença de 5 U/mL de *Auricularia* sp. - CS (B), *L. crinitus* - CS (C) quando comparados ao controle.

Carvalho (2005) obteve uma descoloração de 30% do azocorante *Reactive Red* por lacase de *Lentinus* sp. Em experimentos com *Phanerochaete sordida* (P. Karst.) Erikss. & Ryv. obteve 90,6% de descoloração em 7 dias de tratamento.

A variação estrutural dos corantes assim como a sua concentração em solução são fatores que interferem na degradação. Para alguns corantes é

necessário que estes primeiramente sejam adsorvidos pelas hifas para depois ocorrer a degradação. No presente trabalho a descoloração não está relacionada a adsorção do corante, uma vez que foi utilizado nos experimentos apenas o extrato enzimático bruto, livre de biomassa fúngica. Deve-se destacar que as amostras de enzimas utilizadas nos testes não foram concentradas ou purificadas como na maioria dos trabalhos realizados em descoloração (HOU et al., 2004).

A absorvância dos azocorantes aumentou mesmo após o tratamento enzimático. Provavelmente houve a formação de produtos de oxidação que absorvem nesta região do espectro.

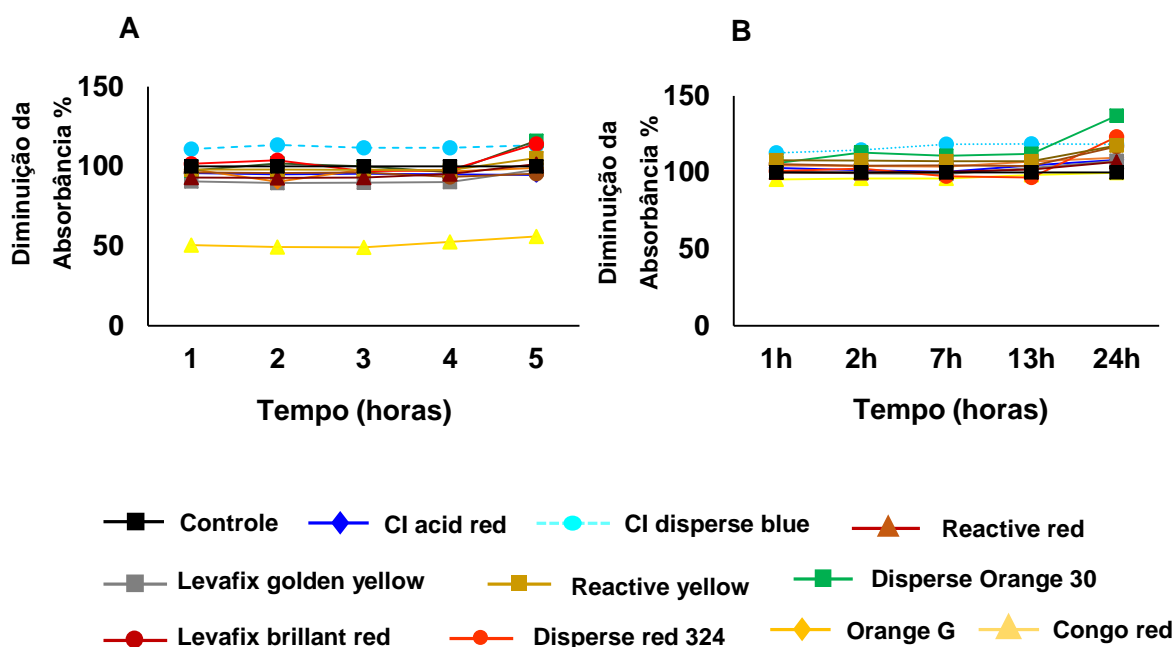


Figura 37. Diminuição da absorvância de corantes do grupo azo ao longo de 24 horas após tratamento enzimático. Extratos de lacase de *L. crinitus* - CS (A), *L. crinitus* - CES (B).

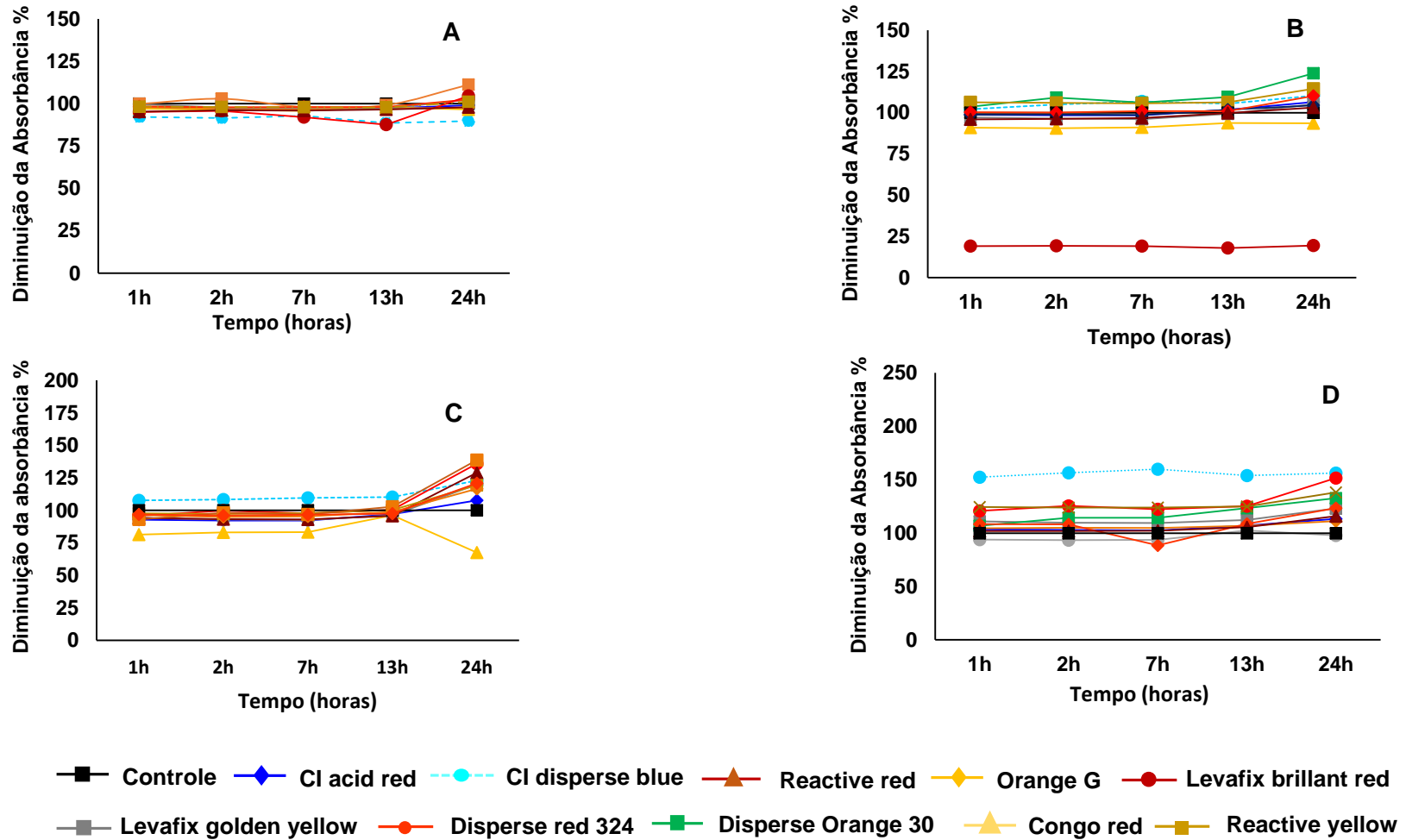


Figura 38. Diminuição da absorbância de corantes do grupo azo corantes após tratamento enzimático. Extratos de lacase de *Coriolopsis* sp. - CS (A), *Coriolopsis* sp. - CES (B), *Auricularia* sp. CS (C) e *Auricularia* sp. CES (D).

Os extratos de *L. crinitus* obtidos em cultivo líquido tiveram menor atividade de lacase ($55,19 \text{ UI/ml}^{-1}$) quando comparados a *Corioloopsis* sp. ($567,14 \text{ UI/ml}^{-1}$) e *Auricularia* sp. ($62,44 \text{ UI/ml}^{-1}$), entretanto foram os mais eficientes na descoloração dos corantes da classe antraquinona. Na Figura 39 nota-se que os corantes *Acid Blue 80*, *Remazol brilliant blue*, *Azul Reativo Kn*, *Reactive blue 220* e *Acid green* após tratamento com lacases de *L. crinitus* (CS) descoloriram quando comparados ao controle. Além disso, ao longo de 24 h o valor de absorvância destes corantes diminuiu, indicando a degradação do composto (Figura 40). No entanto não podemos concluir que houve mineralização total, pois os produtos não foram submetidos a análises químicas.

As lacases de *Corioloopsis* sp. (CS) descoloriram *Reactive blue* e *Acid green*, diminuindo sua absorvância para 61% e 66%, respectivamente (Figura 40A). Entretanto o corante mais degradado foi *Acid Blue 80*, o aspecto do corante foi modificado em placa, após 24 horas a absorvância diminuiu para 15%. O extrato de *Corioloopsis* sp. (CS) também foi eficiente na remoção deste corante. As lacases de *Auricularia* sp. (CS) degradaram *Reactive blue*, *Azul reativo kn* e *Acid green* com diminuição da absorvância para 34%, 38% e 47%. *Auricularia* sp. (CES) degradou apenas o corante *Acid bue* (Figura 41). O extrato *L. crinitus* (CES) não foi eficiente na degradação de nenhum corante (Figura 40D).

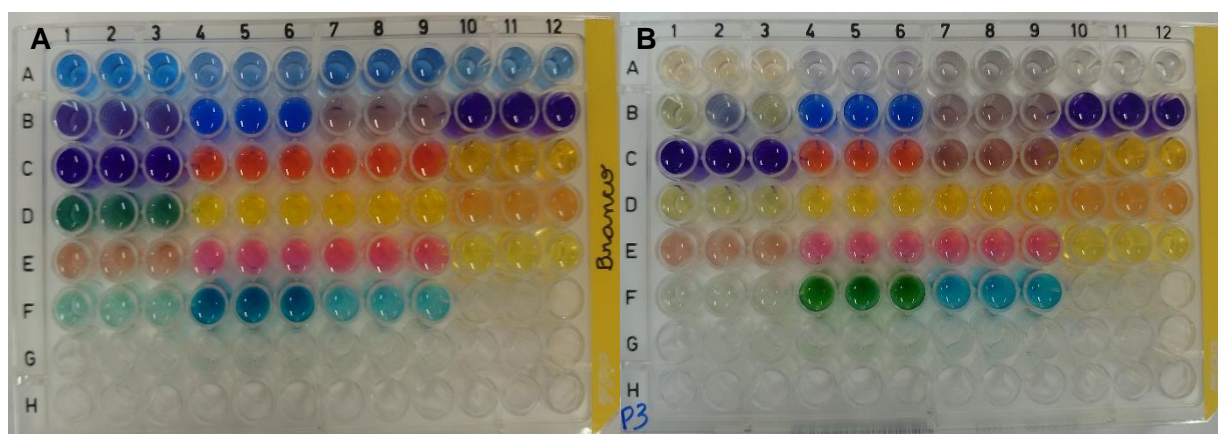


Figura 39. Aspecto do corantes da classe antraquinona após 24 h sobre ação de lacase de *L. crinitus* – CS (B). No Controle foi adicionado apenas corante e água (A). Nota-se que os corantes *Acid Blue 80* (A1; A2; A3), *Remazol brilliant blue* (A4; A5; A6), *Azul Reativo Kn* (A7 A8; A9), *Reactive blue 220* (A10; A11; A12) e *Acid green* (F1; F2; F3) sofreram modificações na cor quando comparados ao controle.

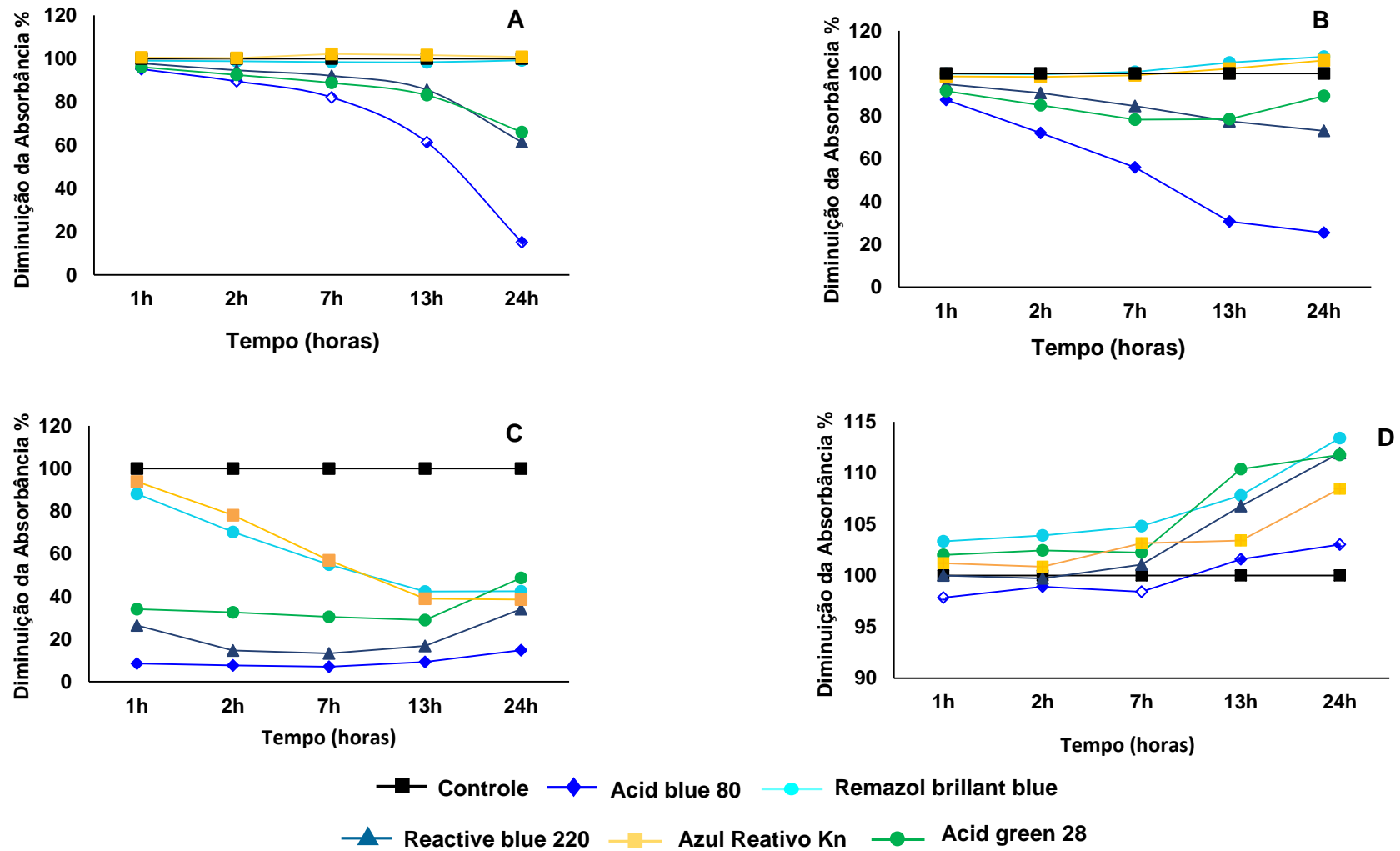


Figura 40. Diminuição da absorbância de corantes do grupo antraquinonas ao longo de 24 horas. Extratos de lacase de *Coriopsis* sp.- CS (A), *Coriopsis* sp.- CES (B), *L. crinitus* - CS (C) e *L. crinitus* - CES (D).

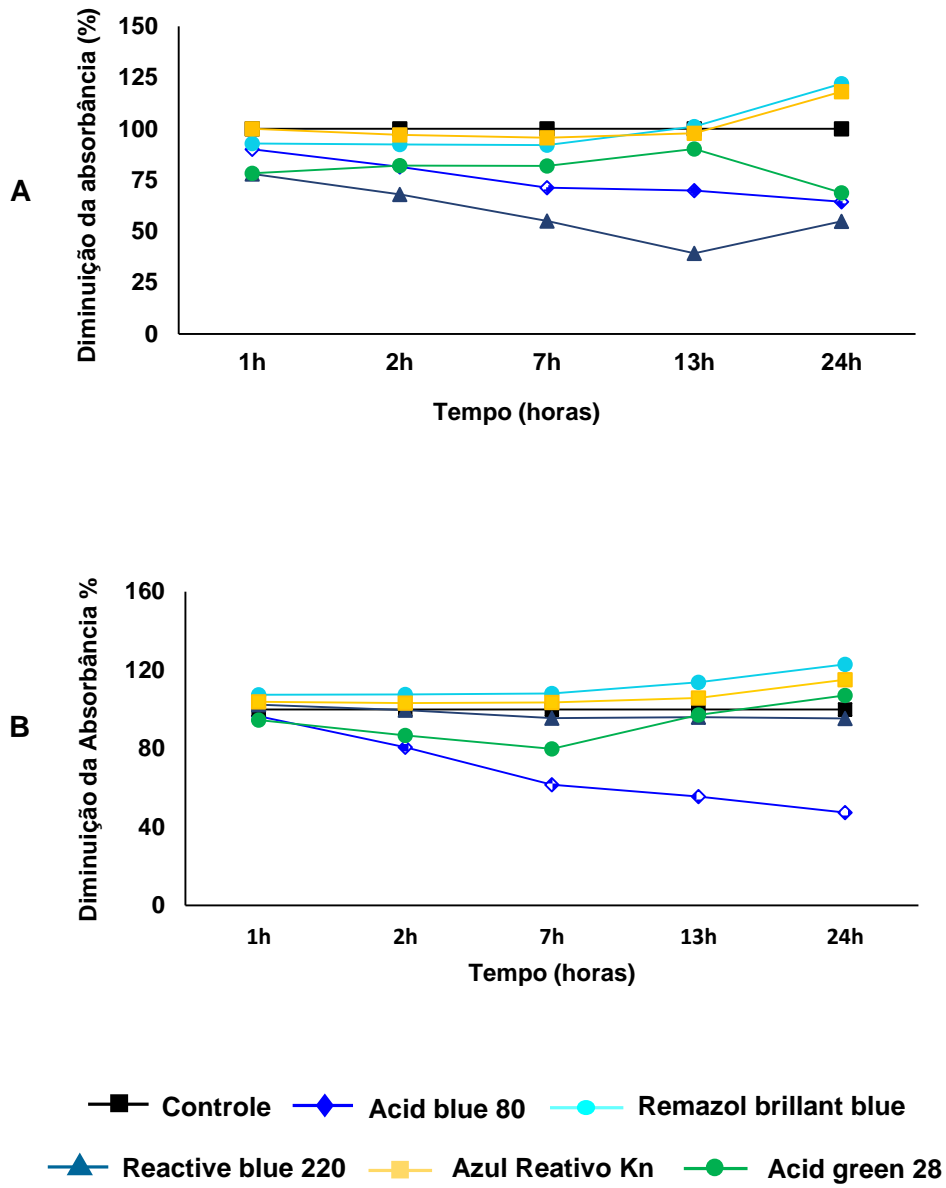


Figura 41. Diminuição da absorbância de corantes do grupo antraquinonas corantes após tratamento enzimático com por extratos de lacase de *Auricularia* sp. CS (A) e *Auricularia* sp. - CES (B).

5.7. TESTE DE TOXICIDADE

A Figura 42 apresenta os resultados dos ensaios de toxicidade, realizados com *D. magna*. Para este experimento foram selecionados os extratos brutos do cultivo submerso de *Corioloopsis* sp., *Auricularia* sp. e *L. crinitus*.

Na amostra com RBBR e extrato enzimático de *Auricularia* sp. o fator de Toxicidade (FT_d) foi 8. Para *L. crinitus* o FT_d foi 16 e para *Corioloopsis* sp. FT_d foi igual a 32. Como controle *D. magna* também foi exposta a água destilada, nestas condições não houve mortalidade. A partir destes resultados nota-se que a solução com maior nível de toxicidade foi a de *Corioloopsis* sp., visto que é necessário diluir a solução 32 vezes para que esta não seja tóxica (Figura 42). Por outro lado, a solução com RBBR não apresentou morte dos indivíduos a partir da concentração de 50% ($FT=2$). Tal fato demonstra que o corante puro foi menos tóxico do que quando degradado pelas enzimas fúngicas. Os corantes têxteis degradados são convertidos em produtos intermediários, os quais, por vezes são mais tóxicos. Deste modo a remoção da cor de um efluente não pode ser interpretada como detoxificação (LANZER et al., 2007).

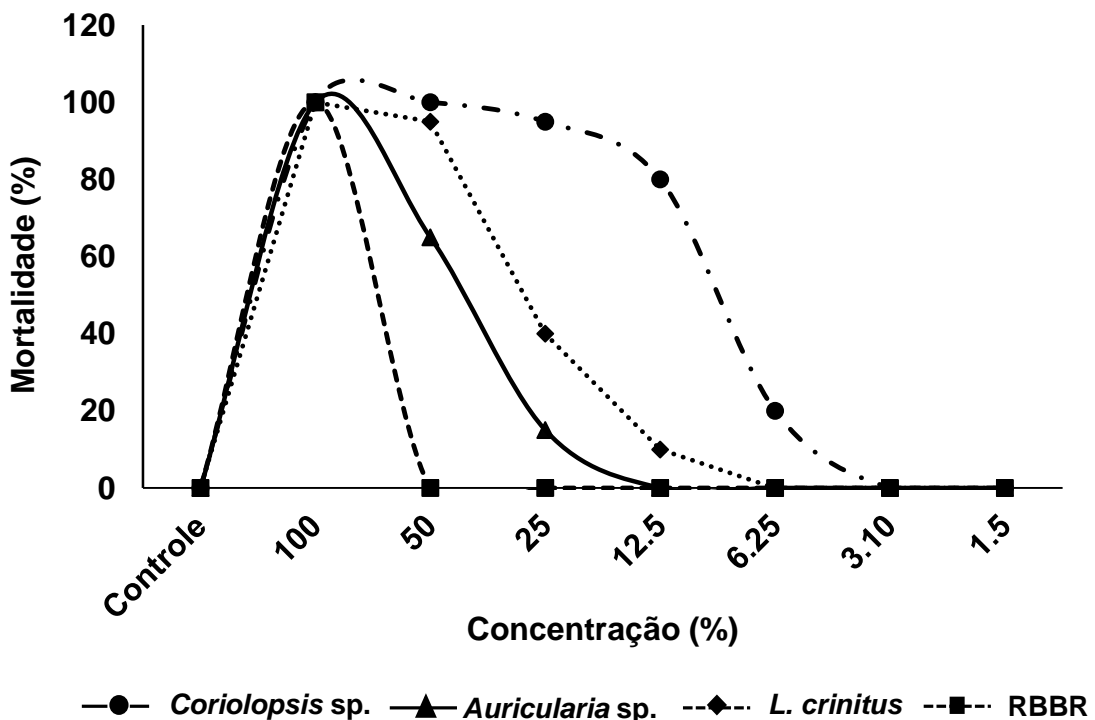


Figura 42. Mortalidade de *D. magna* em função da diluição das soluções com corante RBBR degradados por extratos enzimáticos de diferentes macrofungos.

Além dos compostos intermediários que podem ter sido formados após a degradação do RBBR, outros fatores podem ter influenciado na letalidade de *D. magna*. O corante RBBR puro degradado por *Auricularia* sp. apresenta uma alteração dos fatores físico-químicos. Na diluição de 50%, a disponibilidade de oxigênio (OD) caiu de 8,21 mg/L para 0,3 mg/L com queda do pH de 7,9 para 4,5. Tais fatores podem ter contribuído para a morte de 65% dos indivíduos neste tratamento. Na diluição de 25% o OD variou de 8,63 mg/L para 1,71 mg/L, com letalidade de 15% dos indivíduos. Na diluição de 12,5% nenhum indivíduo morreu apesar da variação do OD 8,68 mg/L para 2,85 mg/L (Tabela 11).

Os níveis de oxigênio dissolvido são um fator limitante para manutenção da vida aquática, sendo essencial na dinâmica desse ecossistema. A quantidade de oxigênio dissolvido nos corpos de água é um indicador primário da qualidade desta água. Dentre outros fatores, a incorporação de quantidades significativas de matéria orgânica, resultante do lançamento de efluentes tóxicos, como os rejeitos têxteis, pode afetar a saúde do ecossistema aquático. Em muitos casos a morte de peixes em rios contaminados é resultado da diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido e não necessariamente da toxicidade do efluente despejado no corpo d'água (JANZEN; SCHULZ; LAMON 2008).

Apesar do OD ter ocasionado o aumento das mortes de *D. magna* em tratamentos específicos, é importante destacar que o experimento foi realizado em um tempo limitado de 48 h. No meio ambiente esses efluentes poderiam causar grandes distúrbios ambientais, visto que não teriam tempo limite de ação.

Nas amostras de RBBR degradado por *Corioloopsis* sp. e *L. crinitus* as variações físico-químicas foram poucas, a princípio a alta toxicidade observada não é justificada por estes fatores, podendo estar associada a compostos intermediários formados a partir da degradação do corante.

Neste sentido fica claro que além da toxicidade dos corantes têxteis, outra problemática associada a liberação destes efluentes está relacionada a redução dos teores de OD.

Tabela 11. Aspectos físico-químicos da degradação de RBBR por lacases fúngicas.

Amostras	pH _i	pH _f	OD _i (mg/L)	OD _f (mg/L)	Concentração (%)
RBBR	7,83	7,08	8,83	8,41	Controle
	7,63	7,27	8,67	7,49	100
	7,85	8,28	8,63	8,36	50
	7,79	8,26	8,7	8,24	25
	7,8	8,23	8,81	8,31	12,5
	7,83	8,2	8,65	8,3	6,25
	7,85	8,13	8,78	8,29	3, 10
	7,84	8,04	8,91	8,21	1,5
RBBR + Lacase de <i>Corioloropsis</i> sp.	7,83	7,08	8,83	8,41	Controle
	7,69	6,99	8,3	7,67	100
	7,88	6,63	8,58	7,77	50
	7,9	7,95	8,69	7,8	25
	7,94	8,35	8,68	7,98	12,5
	7,94	8,26	8,80	8,35	6,25
	7,95	8,33	80,73	8,55	3, 10
	7,94	8,35	80,89	8,5	1,5
RBBR + Lacase de <i>Auricularia</i> sp.	7,83	7,08	8,83	8,41	Controle
	7,69**	4,51**	8,21*	0,3*	100
	7,64	6,35	8,53	6,9	50
	7,66	6,77	8,63*	1,71*	25
	7,64	6,91	8,68*	2,85*	12,5
	7,72	7,08	8,74	5,63	6,25
	7,8	7,49	8,77	7,12	3, 10
	7,9	7,67	8,81	7,9	1,5
RBBR + Lacase de <i>L. crinitus</i>	7,83	7,08	8,83	8,41	Controle
	7,77	6,6	8,25*	3,68*	100
	7,6	6,99	8,4*	4,74*	50
	7,89	7,08	8,57	6,7	25
	7,68	7,77	8,38	7,79	12,5
	7,69	7,86	8,59	8,06	6,25
	7,7	7,94	8,52	8,25	3, 10
	7,71	8,01	8,65	8,23	1,5

6. CONCLUSÃO

A análise dos dados obtidos neste trabalho a partir das condições avaliadas permite concluir que:

- Os fungos obtiveram o maior crescimento no meio extrato de malte-ágar, entretanto os meios formulados com serragem de cajuí suplementado promoveram a maior taxa de crescimento micelial.
- O maior crescimento de *Corioloopsis* sp., *Tyromyces* sp. e *L. crinitus* ocorre à 35 °C e para *Auricularia* sp. à 30 °C.
- As linhagens de *Corioloopsis* sp., *Auricularia* sp. e *L. crinitus* degradaram os corantes em placa de Petri, indicando potencial de produção enzimática. *Tyromyces* sp. não formou halo em meios com ácido gálico, verde de malaquita e RBBR, portanto não produz enzimas oxidativas.
- No cultivo submerso, a lacase foi a enzima com maior atividade no extrato enzimático produzido por todos os fungos testados.
- No cultivo em estado sólido, a maior produção de MnP e LiP foi obtida com *Corioloopsis* sp. e a maior atividade de Oxidase do Álcool Veratrílico com *L. crinitus*, enquanto que *Auricularia* sp. apresentou a maior atividade de lacase.
- A serragem de *Simarouba amara* (marupá) mostrou-se o melhor substrato para a produção de lacase. Entretanto a serragem de *Anacardium spruceanum* (cajuí) também mostrou-se promissora na produção das ligninases.
- Na caracterização parcial, as lacase apresentaram maior atividade em pH ácido. No tampão Mc'Ilvaine atividade de lacase é superior no pH 3 para *L. crinitus*, para *Auricularia* sp. os pH's mais adequados estão entre 3 e 4 e para *Corioloopsis* sp. entre 3 e 4,5. No tampão acetato de sódio os pH's ideais estão entre 4 e 4,5 para todas as linhagens de macrofungos amazônicos.
- Em relação a temperatura, os extratos brutos de *Corioloopsis* sp. e *Auricularia* sp. apresentaram maior atividade de lacase à 45 °C. Enquanto que as lacase de *L. crinitus* obtidas do cultivo em estado sólido apresentaram maior atividade entre 35°C e 40 °C e as do cultivo submerso à 45°C.

- Os extratos dos macrofungos amazônicos degradaram corantes com diferentes estruturas químicas, sendo mais eficientes na descoloração dos corantes da classe antraquinona e trifenilmetano.
- Entre os azocorantes testados, apenas *Congo red* foi parcialmente degradado por extratos do cultivo submerso de *Auricularia* sp. e *L. crinitus*.
- *Corioloopsis* sp. apresentou maior eficiência na degradação do corante *Brilliant Green*. Enquanto que *L. crinitus* apresentou maior potencial de descoloração de *Brilliant green*, *Bromocresol green* e *Bromophenol blue*.
- As lacases de *L. crinitus* do cultivo submerso foram eficientes na degradação de *Acid Blue 80*, *Remazol brilliant blue*, *Azul Reativo Kn*, *Reactive blue 220* e *Acid green*.
- Os extratos de *Corioloopsis* sp. e *Auricularia* sp. foram eficientes na remoção de *Acid Blue 80*.
- A solução com corante RBBR degradado por extrato enzimático de *Corioloopsis* sp., *Auricularia* sp. e *L. crinitus* foi mais tóxico do que o RBBR não degradado.

7. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para a continuidade de pesquisas relacionadas a este trabalho, sugerem-se:

- a realização de estudos de escalonamento da produção, assim como caracterizar as diferentes enzimas produzidas, visto que, como se tem observado em outros fungos, as enzimas menos expressas podem se mostrar mais promissoras em processos de biorremediação;

- a realização de processos mais detalhado para a descoloração de corantes, a degradação destes quando submetidos a diferentes condições, tais como: pH alcalino, presença/ausência de oxigênio e presença de diferentes indutores enzimáticos. Além disso, em virtude da alta toxicidade do corante degradado após ação enzimática seria importante analisar os subprodutos formados na descoloração, e planejar processos de biorremediação com outras enzimas e/ou microfugos amazônicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKDOGAN, H. A.; TOPUZ, M. C.; URHAN, A. A. Studies on decolorization of reactive blue 19 textile dye by *Coprinus plicatilis*. **Journal of Environmental Health Science & Engineering**, v. 12, n.1, p. 49-53, 2014.
- ALCALDE, M.; BULTER, T.; ARNOLD, F.H. Colorimetric assays for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 7, n. 6, p.547-533, 2007.
- ALI, N.; HAMEED, A.; AHMED, S. Physicochemical characterization and Bioremediation persp.ective of textile effluent, dyes and metals by indigenous Bacteria. **J. Hazard. Mater.**, v. 164, p. 322–328, 2009.
- ALVES, A.L. **Produção, purificação e caracterização de uma lacase de *Phlebia rufa* (Pers.) M. P. Christ**. 2011, 111 f. Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2011.
- ARAKANE, Y.; MUTHUKRISHNAN, S.; BEEMAN, R.W.; KANOST, M.R.; KRAMER, K.J. Laccase is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 102, n. 32, p. 11337–11342, 2005.
- ARANTES, V.; JELLISON, J.; GOODELL, B. Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 323–338, 2012.
- ARRIAGADA, C.; ARANDA, E.; SAMPEDRO, I.; GARCIA-ROMERA, I.; OCAMPO, J. A. Interactions of *Trametes versicolor*, *Coriolopsis rigida* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus deserticola* on the copper tolerance of *Eucalyptus globulus*. **Chemosphere**, v.77, n. 2, p. 273–8, 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO - ABIT. Disponível em <<http://www.abit.org.br>> Acesso em 5/03/2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO - ABIT. Disponível em <<http://www.abit.org.br>> Acesso em 5/03/2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO - ABIT. Disponível em <<http://www.abit.org.br>> Acesso em 5/03/2015.
- BABU, P. R.; PINNAMANENI, R.; KOONA, S. Occurrences, Physical and Biochemical Properties of Laccase. **Journal of Environmental Research and Technology**,v. 2, n. 1, p. 1-13, 2012.

- BACHMANN, V.; ZABOENCO, M. A.; NUNES, H.; LIMA, E. A.; HELM, C. V.; MAGALHAES, W. L. E.; SILVA, P. R.; TAVARES, L. B. B. Screening de macrofungos potencialmente produtores de enzimas fenoloxidativas, xilanolíticas e celulolíticas. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, Caxias do Sul, 2011. **Anais do simpósio nacional de bioprocessos**, Caxias do Sul, 2011.
- BATIOCCO, P.; BARRECA, A. M.; FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase–mediator systems. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.1, p. 191-197, 2003.
- BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Variability of laccase activity in the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **Folia Microbiologica**, v. 47, p. 385-390, 2002.
- BAPTISTA, N.M.Q.; SOLIDÔNIO, E.G.; ARRUDA, F.V.F.; MELO, E.J.V.; CAVALCANTI, J.R.N.; CALLOU, M.J.A.; MIRANDA, R.C.M.; COLAÇO, W.; GUSMÃO, N.B. Effects of gamma radiation on enzymatic production of lignolytic complex by filamentous fungi. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 7, pp. 612-621, 2015.
- BARRASA, J. M.; BLANCO, M. N.; ESTEVE-RAVENTÓS, F.; ALTÉS, A.; CHECA, J.; MARTÍNEZ, A. T.; RUIZ-DUEÑAS, F. J. Wood and humus decay strategies by white-rot basidiomycetes correlate with two different dye decolorization and enzyme secretion patterns on agar plates. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, p.106-14, 2014.
- BASHA, S. A.; RAJAGANESH, K. Microbial Bioremediation of Heavy Metals From Textile Industry Dye Effluents using Isolated Bacterial Strains **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, v. 3, n. 5, p. 785-794, 2014.
- BETTIN, F. **Cinética de Crescimento E Produção de Lacases Do Fungo *Pleurotus Sajor-Caju* PS-2001 (Fr.) Singer Em Processo Submerso Em Biorreator Com Agitação Mecânica**. 2010, 205f. Tese- Universidade de Caxias do Sul.
- BLÁNQUEZ, P.; CAMINAL, G.; SARRÀ, M.; VINCENT, M.T.; GABARRELL, X. Olive oil mill waste water decoloration and detoxification in a bioreactor by the white rot fungus *Phanerochaete flavidio-alba*. **Biotechnol. Prog.**, v. 18, p. 660-662, 2002.
- BODKE, P.M.; SENTHILARASU, G.; INDIAN, S.R. Screening Diverse Fungi for Laccases of Varying Properties **Journal Microbiol**, v. 52, n. 2, p. 247–250, 2012.
- BOER, C. G., OBICI, L.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese

peroxidase as the main ligninolytic enzyme. **Bioresource Technology**. v. 94, p. 107-112, 2004.

BOLLAG, J. M.; LEONOWICZ, A. Comparative studies of extracellular fungal laccases. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 48, p. 849–854, 1984.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. The fate of 14 C-labelled high molecular weight chlorinated lignin and chromophoric material during microbial treatment of bleached kraft effluent. **J. WoodChem. Technol.**, 7, 51–64, 1988.

BRUSCATO, E.C. **Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos na Descoloração de Corantes da Indústria Têxtil**. 2011. 117f. Dissertação de mestrado Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética, 2011.

BURATINI, S.V.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. Evaluation of *Daphnia similis* as a test species in ecotoxicological assays. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 73, n. 5, p. 878-882, 2004.

CALL H.P., MUCKE I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). **Journal of Biotechnology**, v. 53, p.163–202, 1997.

CARVALHO, C.C. **Produção de Ligninases por Basidiomicetos Através de Fermentação em Estado Sólido, Caracterização e Aplicação das Enzimas**. 2005, 112 f. Dissertação, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, São Paulo, 2005.

CHA, C.J.; DOERGE, D.R.; CERNIGLIA, C.E. Biotransformation of Malachite Green by the Fungus *Cunninghamella elegans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4358-4360, 2001.

CHAURASIA, P.K.; YADAV, A.; YADAV, R.S.S.; YADAVA, S. Purification and characterization of laccase from *Coriopsis floccosa* MTCC-1177 and its use in the selective oxidation of aromatic methyl group to aldehyde without mediators, **J. Chem. Sci.**, v. 125, n. 6, p. 1395–1403, 2013

CHRENKOVA, V.; KOLARIK, M.; HUBACEK, P.; KOLARIK, J.; SIMONEK, J.; LISCHKE, R.; DREVINEK, P. Possible *Tyromyces fissilis* (Basidiomycota, Polyporales) co-infection in a lung transpl. recipient. **Folia Microbiol**, v. 60, p. 33–35, 2015.

CONCEIÇÃO, T.A. **Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por fungos Agaricomycetes cultivados em resíduos agro-industriais do estado da Bahia**.

- DURÁN, N., MORAIS, S.G, FREIRE, R.S. Degradation and toxicity reduction of textile effluent by combined photocatalytic and ozonation processes. **Chemosphere**, v. 40, p. 369-373, 2000.
- ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. **Journal of Biotechnology**, v. 144, p. 37–42, 2009.
- ERIKSSON, K.E. L.; BLANCHETTE, R.A.; ANDER, P. **Microbial and enzymatic degradation of wood components**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. 497p.
- ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos Uma Introdução a Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. Universidade Federal Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul. 2010, 90pp.
- FACKLER, K.; HINTERSTOISSER, B.; SCHWANNINGER, M.; GRADINGER, C.; SREBOTNIK, E.; MESSNER, E. Quality Control for Wood and Wood Products 33 Assessment of Early Stage Fungal Decay of Wood by FT-NIR-spectroscopy, 2007, Warsaw, pp 33-38.
- FEN, L.; XUWEI, Z.; NANYI, L.; PUYU, Z.; SHUANG, Z.; XUE, Z.; PENGJU, L.; QICHAO,Z.; HAIPING, L. Screening of Lignocellulose - Degrading Superior Mushroom Strains and Determination of Their CMCase and Laccase Activity. **Scientific World Journal**, p. 1-7, 2014.
- FONSECA, H.; DIAS, N.; NICOLAU, A.; LIMA, N. Estudo da citotoxicidade in vitro de corantes azo em *Tetrahymena pyriformis*. In: Anais do VI CONGRÈS NATIONAL DES CONGRÈS BORDEAUX-LAC, 88, 2004.
- FONSECA, M.I.; FARINA, J.I.; SADANOSKI, M.A.; D'ERRICO, R.; VILLALBA, L.L.; ZAPATA, P. D. Decolorization of Kraft liquor effluents and biochemical characterization of laccases from *Phlebia brevispora* BAFC 633. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 104, pp. 443-451, 2015.
- FORGIARINI, E. **Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis Pela Enzima Horseradish Peroxidase (HRP)**. 2006. 101f. Dissertação de Mestrado Submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico, da Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
- FRANCO-MOLANO, A.E.; VASCO-PALACIOS, A.M.; LÓPEZ-QUINTEIRO, C.A.; BOEKOUT, T. Macrohongos de la Región Del Médio Caquetá-Colombia. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 2005, 210pp.

- FREITAG, V.C. Estado da Arte da Pesquisa em Evidenciações Ambientais, **Revista ADMpg Gestão Estratégica**, v. 4, n. 1, 2011.
- GALHAUP, C.; HALTRICH, D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 56, p. 225-232, 2002.
- GARG, S.K.; MODI, D.R. Decolorization of pulp-paper mill effluents by white-rot fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, p. 85-112, 1999.
- GAYOSSO-CANALES, M.; RODRIGUEZ-V A. R.; ESPARZA-GARCIA, F.J.; BERMUDEZ-CRUZ, R.M. PCBs stimulate laccase production and activity in *Pleurotus ostreatus* promoting their removal. **Folia Microbiol.** v. 57, n. 2, p. 149-158, 2012.
- GLENN, J.K.; GOLD, M.H.; Decolorization of Several Polymeric Dyes by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.45, n. 6, p.1741-1747, 1983.
- GOODELL, B.; NICHOLAS, D.D.; SCHULZ, T.P. **Wood deterioration and preservation**. Am Chem Soc, Washington, DC. 2003.
- GOMES, F.M.; PAULA, A.V.; SILVA, G.S.; CASTRO, H.F. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol, **Química Nova**, v. 29, p. 710- 718, 2006.
- GOMES, D.N.F. **Biodiversidade e Potencial Biotecnológico de Fungos Filamentosos Isolados do Manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes**, Pernambuco. 2007. Tese (Pós-graduação em Biologia de Fungos). Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, PB.
- GOMES, E.; AGUIAR, A.P.; CARVALHO, C.C.; BONFÁ, M. R.B.; SILVA, R.; BOSCOLO, M. Ligninases production by Basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 31-39, 2009.
- GONÇALVES, A.Z.L. **Produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos por fermentação em estado sólido utilizando resíduos sólidos agroindustriais, visando potencial aplicação na produção animal**. 2010.132 f. Tese, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, São Paulo.
- GONZALEZ, J. C.; MEDINA, S. C.; RODRIGUEZ, A.; OSMA, J. F.; ALMÉCIGA-DÍAZ, C. J.; SÁNCHEZ, O. F. Production of *Trametes pubescens* laccase under submerged and semi-solid culture conditions on agro-industrial wastes. **PLoS One**, v. 8, n. 9, 2013.

- GOWRI, R.S.; VIJAYARAGHAVAN, R.; MEENAMBIGAI, P. Microbial degradation of reactive dyes- A Review, **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, v. 3, n.3, p. 421-436, 2014.
- GUARANTINI, C.I. E ZANONI, V.B. Corantes Têxteis. **Revista Química Nova**, v. 23, p. 71- 78, 2000.
- HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.13, p. 125-135, 1994.
- HATAKKA,A.; HAMMEL, K. Fungal Biodegradation of Lignocelluloses. In: HOFRICHTER, M. (Ed.), **Industrial Applications SE – 15**, Springer Berlin Heidelberg, 2011, v. 10, p. 319–340.
- HEINZKILL, M.; BECH, L.; HALKIER, T.; SCHNEIDER, P.; ANKE, T. Characterization of laccase and peroxidase from wood-rotting fungi. **Appl.Environ. Microbiol.** v. 64, p. 1601- 1606, 1998.
- HERMANN, K.L. **Produção de Manganês peroxidase por *Lentinula edodes* e *Lentinula boryana* cultivados em biomassa lignocelulósica**, 2011, 121f. Dissertação- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, Santa Catarina.
- HERMANN, K.L.; COSTA, A.; HELM, C.V.; LIMA, E.A.; TAVARES, L.B.B. Expression of manganese peroxidase by *Lentinula edodes* and *Lentinula boryana* in solid state and submerged system fermentation. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro , v. 85, n. 3, p. 965-973, Sept. 2013.
- HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J.F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P.; ERIKSSON, O. A Higher-level Phylogenetic Classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, p. 509-547, 2007.
- HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**. v. 30, p. 454-466, 2002.
- HOU, H.; ZHOU, J.; WANG, J.; DU, C.; YAN, B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochem.**, v. 39, p. 1415-1419, 2004.
- INÁCIO, F.D.; FERREIRA, R.O.; ARAUJO, C.A.V.; PERALTA, R.M.; SOUZA, C.G.M. Production of Enzymes and Biotransformation of Orange Waste by Oyster Mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. **Advances in Microbiology**, v. 5, p. 1-8, 2015.
- ISIKHUEMHEN, O.S.; MIKIASHVILI, N.A.; ADENIPEKUN, C.O.; OHIMAIN, E.I.; SHAHBAZI, G. The tropical white rot fungus, *Lentinus squarrosulus* Mont.:

- lignocellulolytic enzymes activities and sugar release from cornstalks under solid state fermentation, **World Journal Microbiol. Biotechnology**, v. 28, p.1961–1966, 2012.
- JANUSZ, G.; KUCHARZYK, K. H.; PAWLIK, A.; STASZCZAK, M.; PASZCZYNSKI, A. J. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. **Enzyme and microbial technology**, v. 52, n. 1, p. 1–12., 2013.
- JANZEN, J.G.; SCHULZ, H. E.; LAMON, A.W. Medidas da concentração de oxigênio dissolvido na superfície da água. **Eng. Sanit. Ambient.**, v. 13, n. 3, p. 278-283, 2008.
- JAYASINGHE, C.; AHMED, I.; GEON, W.L.; KYUNG, H.I.; HYUN, H.; MIN, W.L.; HEE-SUN, Y.; TAE-SOO, L. Degradation of Three Aromatic Dyes by White Rot Fungi and the Production of Lignolytic Enzymes. **Mycobiology**. v. 36, n. 2, p.114–20, 2008.
- JO, W.S.; BAE, S.H.; CHOI, S.Y.; PARK, S.D; YOO, Y.B.; PARK, S.C. Dvelopment of Detction for Cellulolytic Activity of *Auricularia auricularia-judae*. **Mycobiology**, v. 38, n. 1, p.74-77, 2010.
- KADIMALIEV, D. A.; REVIN, V. V.; ATYKYAN, N. A.; SAMUILOV, V. D. Effect of wood modification on lignin consumption and synthesis of lignolytic enzymes by the fungus *Panus (Lentinus) tigrinus*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 488-492, 2003.
- KAMIDA, H. M.; DURRANT, R. L. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**. v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005.
- KARP, S.G., FARACO, V., AMORE, A., BIROLO, L., GIANGRANDE, C., SOCCOL, V.T., PANDEY, A., SOCCOL, C.R. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Bioresour. Technol.**, v. 114, p. 735–739, 2012.
- KAUSHIK, P.; MALIK, A. Fungal dye decolourization: recent advances and future potential. **Environ Int.** v. 35, n. 1, p. 127-141, 2009.
- KIM, S.E.; LEE, K.; JUNG, Y.A.; YEOM, J.H.; KI, D.W.; LEE, M.S.; SONG, J.G.; JIN, Y.J.; SEOK, S.J.; YUN, B.S. Mushrooms Collected from Deogyu Mountain, Muju, Korea and Their Antioxidant Activity, **Mycobiology**, v. 40, n. 2, p.134-137, 2012.
- KIRK, T.K.; FARRELL, R.L. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. **Ann. Ver. Microbiol.** v. 41, p. 465-505, 1987.
- KIST, C. K. **Estudo da degradação de compostos nitroaromáticos utilizando fungos do gênero *Pleurotus***. 2013, 15f. Dissertação, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

- KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis, FATMA/GTZ, 2004. 289 p.
- KUBICEK, C.P. **Fungi and Lignocellulosic Biomass Fungi and Lignocellulosic Biomass**. 2013, 290 p.
- KUHAD R.C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K.E.L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell wall. In: ERIKSSON, K.E.L. **Biotechnology in the Pulp and Paper Industry**. Berlin: Springer Verlag, 1997. p. 45-125.
- KUMAR, A.; SHARMA, K. K.; KUMAR, P.; RAMCHARY, N. Laccase isozymes from *Ganoderma lucidum* MDU-7: Isolation, characterization, catalytic properties and differential role during oxidative stress. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 113, pp. 68–75, 2015.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, p. 247-250, 1984.
- LAEMMLI, U.K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LANZER, R.; MÜLLER, M.; DUMCKE, M.; RASERA, K. 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.**, v. 2, n. 1, p. 27-32, 2007.
- LEATHAM, G.F.; KIRK, T.K. Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 16, p. 65–7, 1983.
- LEE, K.H.; WI, S.G.; SINGH, A.P.; KIM, Y.S. Micromorphological characteristics of decayed wood and laccase produced by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. **J Wood Sci**, v. 50, p. 281-284, 2004.
- LEVIN, L.; PAPINUTTI, L.; FORCHIASSI, F. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes, **Bioresource Technology**, v. 94, p. 169–176, 2004.
- LI-MING, Z.; YU-QIAN, G.; HAI-JUN, J.; JIN, J.; TING-JING, Z.; SHU-XIA, X.; SHI-MIN, Z.; KUN, W. Analysis on Laccase Properties of *Auricularia auricular*. **Shandong Agricultural Science**, v. 6, 2010.
- MACEDO, A.J.P.M.; KIRSCH, L.S.; PALHETA, R.A.; PUTZKE, J.A.; TEIXEIRA, M.F.S. Crescimento micelial de *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. Em resíduos

lignocelulósicos disponíveis na amazônia, **Caderno de Pesquisa, Série Biologia**, v. 23, n. 316, p. 16-25, 2011.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic enzymes production and Remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal Microbiology [online]**, v. 36, n 3, p.246-252, 2005.

MAIA, L. C. ; CAVALCANTI, M.A.Q.; GIBERTONI, T.; GOTO, B. T. ; MELO, A. M. M. ;BASEIA, I.G; SILVÉRIO, M. Fungos. In: PÔRTO, K.C.; ALMEIDA-CORTEZ, J.S.; TABARELLI, M. (Org.). **Diversidade Biológica e Conservação da Floresta Atlântica ao Norte do Rio São Francisco**. 1ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2006, v. 1, p. 75-106.

MAFFAZZIOLI, T. F. **Eficiência de ensaios ecotoxicológicos na detecção de toxicidade em efluentes de refinaria de petróleo**. 2011. 78 f. Dissertação- Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, 2011.

MAJEAU, J.A.; BRAR, S.K.; TYAGI, R.D. Laccase for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresour Technol**, v. 101, p. 2331–2350, 2010.

MANDELS, M.; REESE, E.T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. **J Bacteriol**, v. 73, n. 2, p. 269-78, 1957.

MANTANISA, G.; TERZIB, E.; KARTALB, S.N.; PAPADOPOULOSC, A.N. Evaluation of mold, decay and termite resistance of pine wood treated with zinc- and copper-based nanocompounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 90, p. 140–144, 2014.

MARCINKEV, L.; VIDŽIŪNAIT, R.; TAURAITĖ, D.; RUTKIENĖ, R.; BACHMATOVA, I.; MORKŪNAS, M.; RAZUMIENĖ, J.; ČASAITĖ, V.; MEŠKIENĖ, R.; KULYS, J. Characterization of laccase from *Coriolopsis byrsina* GRB13 and application of the enzyme for synthesis of redox mediators, **Chemija**, v. 24, n. 1, p. 48–58, 2013.

MARTÍNEZ, A. T.; SP.ERANZA, M.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; DEL RÍO, J. C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International microbiology** : the official journal of the Spanish Society for Microbiology, v.8, n. 3, p. 195–204, 2005.

MARTÍNEZ, A.C., **Decoloración del colorante rojo ácido 27 utilizando un cultivo mixto de *Trametes versicolor* y *Pseudomonas putida*, diseñado para el**

tratamiento de efluentes textiles. 2013. 103f. Tese - Universidade Autônoma do Estado de Hidalgo, México, Hidalgo, 2013.

MAZIERO, R. **Substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus* sp.** 1990. 136p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 3, p. 426, 1959.

MIRANDA, R.D.C.M.; GOMES, E.D.B.; GOUVEIA, E.R.; MARIA, K.; MACHADO, G.; GUSMAO, N.B. Decolorization of laundry effluent by filamentous fungi. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n. 18, p. 4216-4224, 2012.

MONTINI, R.M.C. **Efeito de linhagens e substratos no crescimento miceliano e produtividade em cultivo axênico do cogumelo SHIITAKE (*Lentinula edodes* (BERK.) PEGLER).** 2001, 106 f. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu, São Paulo, 2001.

MONTOYA, S.; SÁNCHEZ, O.J.; LEVIN, L. Evaluación de actividades endoglucanasa, exoglucanasa, lacasa y lignina peroxidasa en diez hongos de pudrición blanca. **Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 12, n. 2, p.115-124, 2014.

MOREIRA, S. L. **Lacases: screening, produção, purificação, propriedades, mecanismos reacionais e aplicações na descoloração de efluentes têxteis e tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.** 2012. 168 f. Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada), Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2012.

MOURA, L.S. **Avaliação da qualidade ambiental da água e sedimento de quatro mananciais de abastecimento público do estado de Goiás.** 2014. 99 f. Dissertação – Universidade Federal de Goiás, Escola de Engenharia Civil, Goiás, 2014.

MOROZOVA, O.V. SHUMAKOVICH, G.P.; GORBACHEVA, M.A.; SHLEEV, S.V.; YAROPOLOV, A.I. “Blue” laccases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, n. 10, p. 1136-1150, 2007.

MUKHOPADHYAY, M.; BANERJEE, R. Purification and biochemical characterization of a newly produced yellow laccase from *Lentinus squarrosulus* MR13, **Biotech.**, v. 5, p. 227–236, 2015.

- MUNARI, F. M.; GAIO T. A.; CALLONI, R.; DILLON, A. J. P. Decolorization of textile dyes by enzymatic extract and submerged cultures of *Pleurotus sajor-caju*. **World J. Microb. Biot.** v. 24, p. 1383-1392, 2007.
- NAKAMURA, K.; GO, N. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. **Cell. Mol. Life Sci.** v.62, n. 18, p. 2050-2066, 2005.
- NANDAL, P.; SREENIVAS, R.R.; RAMESH, C.K. Laccase production by *Coriolopsis caperata* RCK2011: Optimization under solid state fermentation by Taguchi DO Emethodology, **Scientific reports**, v. 3, p. 1-7, 2013.
- NBR 12713, 2004, ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas.
- NEVES, F.A.; LACERDA, M.F.A.R.; JÚNIOR, L.A.S.; LOPES, F.M.; SANTIAGO, M.F. Aplicação de fungos de decomposição branca para remoção de cor em simulados de efluentes industriais. **Rev Biotecnol Ciência.** v. 2, p. 40-57, 2013.
- NIEBISCH, C.H **Biodegradação do corante têxtil Remazol Azul por *Lentinus crinitus*, *Lepista sordida* E *Hydnopolyporus fimbriatus***. 2009.109f. Dissertação Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- NILADEVI, K.N. Ligninolytic Enzymes In: NIGAM, P.S.; PANDEY, A. **Ligninolytic Enzymes in Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**, Springer Science. 2009, p. 397-416.
- OLIVEIRA, I. R. W. Z; FATIBELLO-FILHO, O; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C. Imobilização da lacase em micropartículas de quitosana obtidas por spray drying e usadas na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 32, 1195-1201, 2009.
- ORLANDELLI, R.C.; SP.ECIAN, V.; FELBER, A.C.; PAMPHILE, J.A. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e Aplicações. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.3, p.97-109, set.-dez, 2012
- OROZCO-ROCHA, M.A.; SOLÍS-PEREIRA, S.; TAMAYO-CORTÉS, J.; RIVERA-MUÑOZ, G. Kinetic characterization of lacase present in a crude preparation produced by *Trametes hirsuta* BM2. In: 2th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, 2013, Yucatán, México. **Anais do 2th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms**, Yucatán, México, 2013.
- OSIN´SKA-JAROSZUK, M.; WLIZŁO, K.; SZAŁAPATA, K.; JAROSZ-WILKOŁAZKA, A. Correlation between the production of exopolysaccharides and oxalic acid secretion by *Ganoderma applanatum* and *Tyromyces palustres*. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 30, p. 3065–3074, 2014.

- OTHMAN, A. M.; ELSHAFEI, A.M.; HASSAN, M.M.; HAROUN, B. M.; ELSAYED, M.A.; FARRAG, A.A. Purification, Biochemical Characterization and Applications of *Pleurotus ostreatus* ARC280 Laccase. **British Microbiology Research Journal**, v. 4, n. 12, p. 1418-1439, 2014.
- PACHECO, S. M. V.; SOARES, C. H. L. Imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleras. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 209-214, Apr. 2014
- PARK, N.; PARK, S.S. Purification and characterization of a novel laccase from *Fomitopsis pinicola* mycelia. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 70, pp. 583–589, 2014.
- PATRICK, F.; MTUI, G.Y.S.; MSHANDETE, A.M.; KIVAISI, A. K Ligninolytic enzymes activities of *Pleurotus sapidus* p969 during vegetative growth and fruit development on sugarcane residues-based substrates, **The International Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 58-71, 2014.
- PEIXOTO, F.; MARINHO G.; RODRIGUES, K. Corantes têxteis: Uma Revisão, **HOLOS**, v. 5, n. 29, p. 98-106, 2013.
- PERALTA-ZAMORA, P.; TIBURTIUS, E.R.L; MORAES, S.G; DURÁN, N. Degradação Enzimática de Corantes Têxteis. **Revista Química Têxtil**, v. 23, n.68, p.32-38, 2002.
- PERIE, F.H.; GOLD, M.H. Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. **Applied and Environment Microbiology**, v. 57, p. 2240–5, 1991.
- QUEIROZ, G.O.; JORDÃO, R.C.C.; SALGUEIRO, A.A. Seleção de Microrganismos produtores de celulasas e de lacases a partir de efluente de fábrica de papel. **Revista Química e Tecnologia**. v. 1, p. 7-10, 2002.
- RABONATO, A.C.; MINHONI, M.T.A.; CERVEZAN, T.C.M.; BONFIM, F.P.G.; DUARTE, M.C.T. Determinação do teor de glicose em bagaço de cana-deaçúcar hidrolizado pelo processo de conversão enzimática, **Energ. Agric., Botucatu**, v. 30, n.1, p.11-19, 2015.
- RAMACHANDRAN, R.; GNANADOSS, J. J. Mycoremediation for the treatment of dye containing effluents. **International Journal of Computing Algorithm**, v.2, p. 286-293, oct, 2012
- RATANAPONGLEKA, K.; PHETSOM, J. Decolorization of Synthetic Dyes by Crude Laccase from *Lentinus Polychrous* Lev. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 5, n. 1, 2014.

- RAUF, M.A.; ASHRAF, S.S. Survey of recent trends in biochemically assisted degradation of dyes, **Chemical Engineering Journal**, n. 209, p. 520–530, 2012.
- RAVINDRAN, N.; BALASUBRAMANI, G. Role of White Rot Fungi in Textile Dye Degradation **International Journal of Advances in Interdisciplinary Research**, v. 1, n. 2, p. 38-44, 2014.
- RIVERA-HOYOS, C. M.; ALVAREZ, E. D. M.; PEDROZA-RODR, A. M.; AZQUEZ, I.; DELGADO-BOADA, J. M. Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**, p.1–16, 2013.
- ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresour Technol.**, v. 77, n. 3, p. 247-255, 2001.
- ROSA, L.O.; BETTIO, M.; DILLON, A.J.P. (2008). Crescimento de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e produção de lacases e manganês peroxidases em cultivo sólido utilizando diferentes inóculos. In: VIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática (ENZITEC). Anais. pp.111-112. Rio de Janeiro, 2008.
- SAGGIORO, E.M., **Efeito do dióxido de titânio na decomposição fotocatalítica de substâncias persistentes no ambiente: corantes têxteis e interferentes endócrinos**. 2014. 269f. Tese- Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2014.
- SALEM, A.A. Lignocellulose Degrading Enzymes of *Pleurotus sapidus*. **Middle East Journal of Agriculture Research**, v. 3, n. 4, pp. 1205-1213, 2014.
- SALES-CAMPOS, C. **Aproveitamento de resíduos madeireiros e da agroindústria regional para o cultivo de fungos comestíveis de ocorrência na região amazônica**. 2008. 182f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.
- SALES-CAMPOS, C.; EIRA, A.F.; JESUS, M.A.; CAMPAGNOLLI, F.; ANDRADE, M.C.N. Crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus* em resíduo de *Simarouba amara*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.11, p.1633-1635, 2008.
- SANTHANAM, N.; VIVANCO, J. M.; DECKER, S. R.; REARDON, K. F. Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style. **Trends Biotechnol.**, v. 29, p. 408-489, 2011.
- SAPARRAT, M.C.N.; MARTÍNEZ, M.J.; CABELLO, M.N.; ARAMBARRI, A.M. Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. **Rev. Iberoam. Micol.** v. 19, n. 3, p.181–5, 2002.
- SAPARRAT, M. C. N.; MOCCHIUTTI, P.; LIGGIERI, C. S.; AULICINO, M. B.; CAFFINI, N. O.; BALATTI, P. A.; MARTÍNEZ, M. J. Ligninolytic enzyme ability and potential

- biotechnology applications of the white-rot fungus *Grammothele subargentea* LPSC no. 436 strain. **Process Biochemistry**, v.43, n. 4, p. 368–375, 2008.
- SAPARRAT, M.C.N.; BALATTI, P.A.; ARAMBARRI, A.M; MARTÍNEZ, M.J. *Coriolopsis rigida*, a potential model of white-rot fungi that produce extracellular laccases. **J. Ind Microbiol Biotechnol** v. 41, p. 607–617, 2014.
- SARDROOD, B. P.; GOLTAPPEH, E.M.; VARMA, A Ecophysiology of Fungal Bioremediation. In: GOLTAPPEH, E. M.; DANESH, Y.R.; EDITORS, A.V. **Fungi as Bioremediators**, Springer, 2013, p. 3-28.
- SARTORI, S. B. **Atividade enzimática e valores nutricionais de Pleurotus spp. Cultivados em vinhaça**. 2011. 134 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- SCHMIDT, OLAF. Wood Cell Wall Degradation, In:_____. **Wood and Tree Fungi Biology**, Spriger, Hamburg, 2006. p.87-104.
- SCHWARZE, F.W.M.R.; ENGELS, J.; MATTHECK, C. **Fungal Strategies of Wood Decay in Trees**. (n.d.) Springer-V erlag Berlin Heidelberg GmbH, New York, 2000. 185p.
- SI, J.; PENG, F.; CUI, B. Purification, biochemical characterization and dye decolorization capacity of an alkali-resistant and metal-tolerant laccase from *Trametes pubescens*. **Bioresource Technology**, v. 128, pp. 49–57, 2013.
- SILES, J. A.; GONZÁLEZ-MENÉNDEZ, V.; PLATAS, G.; SAMPEDRO, I.; GARCÍA-ROMERA, I.; BILLS, G. F. Effects of dry olive residue transformed by *Coriolopsis floccosa* (Polyporaceae) on the distribution and dynamic of a culturable fungal soil community. **Microbial Ecology**, v.67, n. 3, p. 648–58, 2014.
- SILVA, S.M. **Formulação de meios de crescimento para cultivo sólido de Pleurotus sajor-caju à base de serragem de Pinus sp.p**. 2004. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Biotecnologia). Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS.
- SILVA, S.M. **Crescimento e Capacidade de Absorção de Metais por Pleurotus sajor-caju, em Cultivo Líquido e em Cultivo Sólido**. 2007. Tese de Doutorado (Pós-graduação em Biotecnologia). Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS.

- SILVA, B.N.S; **Seleção de fungos apodrecedores de madeira e caracterização de basidiomicetos associados à podridão de árvores vivas.** 2014, 91f. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas gerais.
- SILVA, M.C.; CORRÊA, A. D.; TORRES, J.A.; AMORIM, M.T.S.P.Descoloração de corantes industriais e efluentes têxteis simulados por peroxidase de nabo (*Brassica campestris*). **Quim. Nova**, v. 35, n. 5, p. 889-894, 2012.
- SCHMIDT, Olaf. 2006. *Wood and Tree Fungi Biology*,. ed. Olaf Schmidt. Hamburg.
- SODEN, D. M.; DOBSON, A. D. W. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. **Microbiology**, v.147, p.1755-763, 2001.
- SONGULASHVILI, G.; ELISASHVILI, V.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; HADAR, Y. Purification and Particular Characterization of Laccase from the Ling Zhi or Reishi Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. 447 (Aphyllophoromycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.10, n.4, p.361 –368, 2008.
- SPINA F., ROMAGNOLO A., PRIGIONE V., TIGINI V., VARESE G.C. A scaling-up issue: the optimal bioreactor configuration for effective fungal treatment of textile wastewaters. **Chemical Engineering Transactions**, v. 38, p. 37-42, 2014.
- STRONG, P.J.; CLAUS, H. Laccase: a review of its past and its future in bioremediation. **Crit Rev. Environ Sci Technol**, v. 41, p.373–434, 2011.
- SUWANNAWONG, P.; KHAMMUANG, S.; SARNTHIMA, R. Decolorization of Rhodamine B and Congo Red by partial purified laccase from *Lentinus polychrous* Lev. **J. Biochem. Technol.** v. 3, p. 182-186, 2010.
- TAVARES, A.P.M. **Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papeleira.** 2006. 78f. Tese apresentada à Universidade de Aveiro, 2006.
- TEGLI, S.; CERBONESCHI, M.; CORSI, M.; BONNANNI, M.; BIANCHINI, R. Water recycle as a must: decolorization of textile wastewaters by plant-associated fungi **J. Basic Microbiol.** v. 54,p. 120–132, 2014.
- TIEN, M.; KIRK, T.T. "Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium* purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 81, n. 8, p. 2280–2284,1984.
- TIŠMA, M.; ZELIĆ, B.; VASIĆ-RAČKI, D. White-rot fungi in phenols, dyes and other xenobiotics treatment – a brief review. **Croat. J. Food Sci. Technol**, v. 2, n. 2, p. 34-47, 2010.

- TOUAHAR, I. E.; LOUNÈS, H.; BA, S.; BELLENGER, J.P.; CABANA, H. Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals. **Science of the Total Environment**. v. 481, p. 90–99, 2014.
- ULLRICH R.; HUONG, L.M.; DUNG, N.L.; HOFRICHTER, M. Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization, **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 67, p. 375-363, 2005.
- URBEN, A.F.; URIARTT, A.H.; AMAZONAS, M.A.L.; OLIVEIRA, H.C.B.; CORREA, M.J.; VIEIRA, V. Cultivo de cogumelos comestíveis e medicinais. Brasília: EMBRAPA/Brasília, 2003. 169p.
- VASCONCELLOS, J.R.T. **Diversidade e Seleção de Fungos Basidiomicetos Afiloforóides para produção de enzimas lignocelulolíticas em Área de Mata Atlântica do Sul da Bahia**. Feira de Santana, BA. 2010. 72f. Dissertação de mestrado Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. 2010.
- WARD, G.; HADAR, Y.; DOSORETZ, C.G. The Biodegradation of Lignocellulose by White Rot Fungi. In: ARORA, D. K. **Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental application**, Nova York, 2012, cap. 3, p. 393- 407.
- WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S.N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnol. Adv.** v. 22, p.161–187, 2003.
- WILLERDING, A.L.; BARBOSA, M. F.; BULAMAQUI, T. C.2005. Diversidade de macromicetos lignolíticos, p.135-140. In: NELSON, E.; MARQUES, F.; VISIONS, V.; MELO, S. **Meio Físico, Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central**. Vol. 2. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas
- WOLFENDEN, R. S.; WILSON, R. L. 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. Chem. Soc. Perkin. Trans.** v. 02, p. 805-812, 1982.
- WONG, D.W.S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 157, p.174–209, 2009.
- WORRALL, J. J.; ANAGNOST, S.E.; ZABEL, R.A. Comparison of wood decay among diverse lignicolous fungi. **Mycologia**, v. 89, n. 2, p. 199-219, 1997.

YANG, S.; HAI, F. I.; NGHIEM, L. D.; PRICE, W. E.; RODDICK, F.; MOREIRA, M. T.; MAGRAM, S. F. Understanding the factors controlling the removal of trace organic contaminants by white-rot fungi and their lignin modifying enzymes: a critical review. **Bioresource Technology**, v. 141, p. 97–108, 2013.

YAN, J.; CHEN, D.; YANG, E.; NIU, J.; CHEN, Y.; CHAGAN, I. Purification and characterization of a thermotolerant laccase isozyme from *Trametes trogii* strain and its potential in dye decolorization. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 93, pp.186-194, 2014.

YOSHIDA, H. Chemistry of lacquer (Urushi). **Journal Chem. Soc.** v. 43, p. 472–486, 1883.

ZANELLA, W.C. **Efeito da temperatura e do pH na estabilidade de corantes naturais utilizados em alimentos**. 2014. 32f. Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas/MG, 2014.

ZENG, X.; CAIA, Y.; LIAOA, X.; ZENGA, X.; LIA, W.; ZHANG, B.; D. Decolorization of synthetic dyes by crude laccase from a newly isolated *Trametes trogii* strain cultivated on solid agro-industrial residue. **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, p. 517–525, 2011.

ZHOU, L. W.; WEI, Y.L.; DAI, Y.C. Phylogenetic analysis of ligninolytic peroxidases: preliminary insights into the alternation of white-rot and brown-rot fungi in their lineage. **Mycology: An International Journal on Fungal Biology**, v.5, n.1, p. 29-42, 2014.