



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA  
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA  
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS - MBT**

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE E CRESCIMENTO MICELIAL  
DE TRÊS FUNGOS AMAZÔNICOS DEGRADADORES DE MADEIRA**

**Mestrando: Ezequias Andrade da Silva  
Orientador: Prof. Dr. Ademir Castro e Silva**

**MANAUS  
2006**

Ezequias Andrade da Silva

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE E CRESCIMENTO MICELIAL DE TRÊS  
FUNGOS AMAZÔNICOS DEGRADADORES DE MADEIRA

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção  
do título de Mestre ao Curso de Mestrado em  
Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do  
Estado do Amazonas – UEA.

Orientador: Prof. Dr. Ademir Castro e Silva

MANAUS – AMAZONAS

2006

Ezequias Andrade da Silva

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE E CRESCIMENTO MICELIAL DE TRÊS  
FUNGOS AMAZÔNICOS DEGRADADORES DE MADEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:

DATA DA APROVAÇÃO: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA:**

1 \_\_\_\_\_

2 \_\_\_\_\_

3 \_\_\_\_\_

4 \_\_\_\_\_

SILVA, Ezequias Andrade da

Atividade Enzimática da Lacase em Três Fungos Amazônicos  
Degradadores de Madeira /Ezequias Andrade da Silva – Manaus,  
2006.

112 p.

Dissertação de Mestrado – UEA, 2006.

1. Fungos ligninolíticos. 2. Lacases.
3. Degradação da madeira. 4. Biotecnologia

#### Sinopse

Neste trabalho estão envolvidos fatores que podem influenciar na indução para o crescimento e a produção de lacase em fungos amazônicos, como temperatura, pH, glicose/ extrato de levedura, seringaldazina e biotina.

Palavras-chaves: Basidiomicetos, lignina e lacase.

Dedico este trabalho, em primeiro lugar, a **Deus** que me deu a vida e que sempre tem me iluminado em todos os momentos de minha vida e durante toda a minha caminhada vitoriosa.

Aos meus queridos pais **Benedito Aguiar da Silva** (*in memoriam*) e **Cleonice dos Santos Silva**, pelos princípios e pelo amor ao qual me dedicaram e dedica, aos ensinamentos para uma vida honesta e honrosa, por serem responsáveis pela minha formação e por sempre acreditarem em minha capacidade

À minha noiva **Andréa**, na convicção de que, apesar das dificuldades, valeu a pena, pois a satisfação pessoal é essencial na relação humana.

A minha querida filha **Swênnya**, apesar de todas as dificuldades existentes, eu creio que ela é uma dádiva de Deus.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade do Estado do Amazonas que possibilitou através do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais a realização deste mestrado.  
À SUFRAMA pelo apoio na alocação de recursos que foram imprescindíveis para o andamento do curso e o desenvolvimento das pesquisas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, pelo apoio e incentivo a pesquisa.

Aos professores do curso de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, pela transmissão de conhecimentos, troca de experiências, paciência e sabedoria.

Ao corpo técnico e administrativo do curso de Mestrado em Biotecnologia, pelo apoio e dedicação prestados ao curso para o sucesso do mesmo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao Prof. Dr. Ademir Castro e Silva pela valiosa orientação, dedicação, compreensão e paciência no início desta importante caminhada.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Patrícia Zanotto pelos ensinamentos iniciais de elaboração de um projeto de pesquisa.

À minha noiva Andréa, pela compreensão nos momentos de ausência, “mesmo quando presente fisicamente”.

Aos técnicos Emerson Bacelar e Nazaré Oliveira, pela colaboração e ajuda nas práticas de laboratório.

Aos colegas de laboratório de Biotecnologia da Universidade do Estado do Amazonas, Ernesto, Marlíbia, Carlos Augusto, Fernanda e Lílian pela convivência harmoniosa e cercada de companheirismo.

À minha querida família, alicerce de toda essa minha caminhada.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

**MUITÍSSIMO OBRIGADO.**

Adquire a sabedoria, adquiere o entendimento; não  
te esqueças nem te desvies das palavras da minha boca.

**Provérbios 4:5**

## **SUMÁRIO**

LISTA DE FIGURAS. ....	<b>XII</b>
LISTA DE TABELAS. ....	<b>XIV</b>
RESUMO. ....	<b>XVI</b>



ABSTRACT. . . . .	XVII
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS. . . . .	XVIII
<b>1.INTRODUÇÃO. . . . .</b>	<b>1</b>
<b>2.OBJETIVOS. . . . .</b>	<b>5</b>
<b>3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. . . . .</b>	<b>6</b>
3.1Características Gerais dos Fungos. . . . .	6
3.1.1 Condições para o Desenvolvimento dos Fungos . . . . .	7
3.2 Potencial de Degradação dos Basidiomicetos. . . . .	11
3.3 Os Fungos e a sua Importância Biotecnológica. . . . .	13
3.4 Fungos que Atuam na Deterioração da Madeira . . . . .	20
3.5 Produção de Enzimas Ligninolíticas. . . . .	23
3.5.1 Fenoloxidasas (Lacase e Peroxidasas). . . . .	24
3.5.1.1 Lacase (EC.1.10.3.2). . . . .	24
3.5.1.2 Lignina Peroxidase ou Ligninase (LiP). . . . .	33
3.5.1.3 Manganês-Peroxidase (MnP) . . . . .	34
3.6 Influência da Biotina na Velocidade de Crescimento Micelial em Fungos Amazônicos. . . . .	36
3.6.1 Biotina (vitamina H). . . . .	36
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS. . . . .</b>	<b>38</b>
4.1 Coleta dos Fungos. . . . .	38
4.2 Conservação das Cepas. . . . .	39
4.3 Produção do Inócuo. . . . .	39
4.3.1 Inoculação. . . . .	39
4.3.2 Sistema em Placa de Petri. . . . .	39
4.3.3 Sistema em Erlenmayer. . . . .	40
4.4 Materiais de Laboratório . . . . .	40
4.4.1 Meio de Cultura. . . . .	40
4.4.2 Reagentes. . . . .	40
4.4.3 Vidrarias e Utensílios. . . . .	40
4.4.4 Equipamentos. . . . .	41
4.5 Cinética do Crescimento Micelial. . . . .	43

4.5.1	Influência do pH . . . . .	43
4.5.2	Influência da Temperatura no Crescimento Micelial . . . . .	43
4.5.3	Análise da Cinética do Crescimento Micelial. . . . .	43
4.6	Planejamento Estatístico. . . . .	44
4.7	Determinação da Atividade Enzimática. . . . .	44
4.7.1	Preparo do Meio de Cultivo. . . . .	44
4.7.2	Atividade de Lacase. . . . .	46
<b>5</b>	<b>RESULTADOS. . . . .</b>	<b>48</b>
5.1	Condições Favoráveis ao Crescimento dos Fungos. . . . .	48
5.1.1	Velocidade do Crescimento Micelial em função do Tempo. . . . .	48
5.1.2	Índice de Crescimento Micelial. . . . .	48
5.1.3	Influência da Biotina no Crescimento Micelial. . . . .	48
5.1.4	Crescimento Micelial dos Fungos sem Biotina (controle) . . . . .	61
5.2	Atividade Enzimática dos Fungos. . . . .	63
5.2.1	Atividade Enzimática com alta Dosagem de Seringaldazina. . . . .	63
5.2.2	Atividade Enzimática com Baixa Dosagem de Seringaldazina. . . . .	72
5.3	Comparação entre as Atividades Enzimáticas dos três fungos estudados. . . . .	83
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO. . . . .</b>	<b>85</b>
6.1	Temperatura. . . . .	85
6.2	Influência do pH. . . . .	86
6.3	Influência da Biotina no Crescimento Micelial. . . . .	87
6.4	Produção Enzimática. . . . .	88
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO. . . . .</b>	<b>92</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS . . . . .</b>	<b>93</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. . . . .</b>	<b>94</b>
<b>10</b>	<b>ANEXOS. . . . .</b>	<b>111</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Reação de oxidação da seringaldazina até a formação da correspondente quinona . . . . .	<b>25</b>
<b>Figura 2.</b> Estrutura tridimensional da lacase de <i>T. versicolor</i> . . . . .	<b>27</b>
<b>Figura 3.</b> Esquema mostrando o ciclo catalítico da lacase . . . . .	<b>31</b>
<b>Figura 4.</b> Papel do mediador na atividade enzimática de lacase . . . . .	<b>32</b>
<b>Figura 5.</b> Ciclo catalítico simplificado de lignina peroxidase. . . . .	<b>34</b>

<b>Figura 6.</b> Ciclo catalítico simplificado da Manganês peroxidase. . . . .	<b>35</b>
<b>Figura 7.</b> Estrutura molecular da biotina . . . . .	<b>36</b>
<b>Figura 8.</b> Ciclo da biotina . . . . .	<b>37</b>
<b>Figura 9.</b> Fotos de fungos amazônicos. <i>P. sanguineus</i> (A e C) <i>Trametes sp</i> (B e D). . . . .	<b>38</b>
<b>Figura 10.</b> Balança analítica e dessecador. . . . .	<b>42</b>
<b>Figura 11.</b> Autoclave. . . . .	<b>42</b>
<b>Figura 12.</b> Bomba a vácuo . . . . .	<b>42</b>
<b>Figura 13.</b> Crescimento micelial para o fungo FSF7, em meio BDA em diferentes concentrações de biotina . . . . .	<b>51</b>
<b>Figura 14.</b> Crescimento micelial para o fungo FSF11, em meio BDA com diferentes concentrações de biotina . . . . .	<b>55</b>
<b>Figura 15.</b> Crescimento micelial para o fungo <i>P. sanguineus</i> , em meio BDA com diferentes concentrações de biotina . . . . .	<b>58</b>
<b>Figura 16.</b> Atividade enzimática do fungo <i>P. sanguineus</i> , na concen tração 3:2 (glicose/ extrato de levedura) e alta dosagem de seringaldazina . . . . .	<b>67</b>
<b>Figura 17.</b> Produção enzimática de lacase para o fungo FSF7 e concentra ção 3:2 (glicose/ extrato de levedura) . . . . .	<b>70</b>
<b>Figura 18.</b> Atividade enzimática do fungo FSF11 em concentração 3:2 (glicose/ extrato de levedura) e alta dosagem de seringalda zina (2,5g) . . . . .	<b>71</b>
<b>Figura 19.</b> Atividade enzimática do fungo <i>P. sanguineus</i> , concentração 3:3 (glicose/ extrato de levedura) e baixa dosagem de serin galdazina (25mg) . . . . .	<b>72</b>
<b>Figura 20.</b> Atividade enzimática de lacase para o fungo FSF7 em concentração 3:3 e baixa dosagem de seringaldazina . . . . .	<b>75</b>
<b>Figura 21.</b> Produção enzimática do fungo FSF7 em concentração e baixa dosagem de seringaldazina . . . . .	<b>75</b>
<b>Figura 22.</b> Atividade enzimática de lacase do fungo FSF7 em concen tração 3:5 em baixa dosagem de seringaldazina . . . . .	<b>76</b>
<b>Figura 23.</b> Atividade enzimática de lacase para o fungo FSF7 em baixa	

dosagem de seringaldazina e concentração 2:3 . . . . .	77
<b>Figura 24.</b> Atividade enzimática de lacase para o fungo FSF11 em concentração 3:3 e baixa dosagem de seringaldazina . . . . .	79
<b>Figura 25.</b> Atividade enzimática do fungo FSF11, concentração 4:3 em baixa dosagem de seringaldazina (25mg) . . . . .	80
<b>Figura 26.</b> Média de atividade enzimática de lacase comparativa para os três fungos testados . . . . .	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Temperatura ótima de lacases de alguns basidiomicetos. . . . .	8
<b>Tabela 2.</b> Valores de pH ótimo para lacases de alguns basidiomicetos. . . . .	10
<b>Tabela 3.</b> Exemplos de vários antibióticos processados a partir de microrganismos . . . . .	19
<b>Tabela 4.</b> Diferentes concentrações de glicose/ extrato de levedura em meio ágar-malte . . . . .	46
<b>Tabela 5.</b> Média do crescimento micelial em diferentes concentrações de biotina para os fungos FSF7 ( <i>Trametes sp</i> ), FSF11 ( <i>Trametes sp</i> ) e <i>Pycnoporus sanguineus</i> . . . . .	50

<b>Tabela 6.</b> Análise de variância nas diferentes concentrações de biotina para o fungo FSF7 ( <i>Trametes sp.</i> ) . . . . .	<b>52</b>
<b>Tabela 7.</b> Teste de Tukey para o crescimento micelial do fungo FSF7 em diferentes concentrações de biotina . . . . .	<b>53</b>
<b>Tabela 8.</b> Análise de variância para as diferentes concentrações de biotina para o fungo FSF11. . . . .	<b>56</b>
<b>Tabela 9.</b> Análise de variância para verificar diferenças na atividade de lacase para o fungo <i>P. sanguineus</i> . . . . .	<b>59</b>
<b>Tabela 10.</b> Teste de Tukey para comparação entre dois tratamentos para o fungo <i>P. sanguineus</i> em crescimento micelial e em presença de diferentes concentrações de biotina . . . . .	<b>60</b>
<b>Tabela 11.</b> Média do crescimento micelial em meio BDA sem biotina (contrôle) para os três fungos testados . . . . .	<b>61</b>
<b>Tabela 12.</b> Análise descritiva do crescimento micelial sem presença de biotina para os três fungos testados . . . . .	<b>62</b>
<b>Tabela 13.</b> Parâmetros descritivos da atividade enzimática dos fungos em estudo com diferentes concentrações de glicose/ extrato de levedura . . . . .	<b>64</b>
<b>Tabela 14.</b> Atividade enzimática média de lacase obtida para o fungo <i>P. sanguineus</i> em diferentes concentrações de glicose/ extrato de levedura . . . . .	<b>66</b>
<b>Tabela 15.</b> Atividade enzimática de lacase em concentração 3:2 (glicose/ extrato de levedura para os fungos testados em alta dosagem de seringaldazina (2,5g) . . . . .	<b>67</b>
<b>Tabela 16.</b> Análise de variância da atividade enzimática de lacase para os fungos testados sob alta dosagem de seringaldazina . . . . .	<b>68</b>
<b>Tabela 17.</b> Média da atividade enzimática de lacase obtida para o fungo FSF7, em diferentes concentrações de glicose/ extrato de levedura . . . . .	<b>69</b>
<b>Tabela 18.</b> Valores médios da atividade enzimática para o fungo FSF11	

em diferentes concentrações (glicose/ extrato de levedura) . . . . .	71
<b>Tabela 19.</b> Análise de variância da atividade enzimática de lacase para o fungo <i>P. sanguineus</i> . . . . .	73
<b>Tabela 20.</b> Teste de Tukey para comparação entre dois tratamentos para o fungo <i>P. sanguineus</i> . . . . .	74
<b>Tabela 21.</b> Análise de variância para verificar a existência de diferenças na atividade enzimática de lacase para o fungo FSF7. . . . .	78
<b>Tabela 22.</b> Análise de variância para verificação de diferenças entre tratamentos para o fungo FSF11 . . . . .	81
<b>Tabela 23.</b> Teste de Tukey para comparação entre dois tratamentos para o fungo FSF11.. . . .	82
<b>Tabela 24.</b> Atividade enzimática para três fungos amazônicos testados em diferentes concentrações (glicose/ extrato de levedura) . . . . .	84

## RESUMO

Fungos pertencentes à classe basidiomicetos têm conferido maior eficiência no processo de biodegradação de materiais lignocelulósicos em função das enzimas que possuem para essa atividade. Essas enzimas têm potencial comercial podendo ser utilizadas em diversas aplicações industriais. O presente trabalho avalia o crescimento micelial e a atividade enzimática de lacase de três fungos amazônicos (*Pycnoporus sanguineus*, FSF7 (*Trametes sp*) e FSF11 (*Trametes sp*) deterioradores de madeira. O crescimento micelial foi avaliado através do avanço da fronteira micelial em meio sólido BDA, com diferentes concentrações (30, 90, 120 e 300 mcg) de biotina. Para a atividade enzimática de lacase, foi utilizado meio líquido (ágar-malte) obtendo-se diferentes concentrações de glicose/ extrato de levedura, preparado e previamente esterilizado em autoclave à 120°C por 15 minutos e pH 6.

Posteriormente, inoculou-se os fungos através de 5 mm de massa micelial retirados da extremidade da colônia mantendo-se a cultura submersa sob agitação em estufa Sheker a 180 rpm à 28°C. Foi utilizado meio com alta (2,5g) e baixa (25mg) dosagem de seringaldazina. Após três dias de cultivo, o meio foi filtrado e a atividade enzimática determinada em espectrofotômetro. *P. sanguineus* apresentou em média maior crescimento micelial em concentração de 120 mcg de biotina e FSF11 a menor média. De modo geral, a presença de biotina no meio contribuiu para o maior crescimento micelial. A produção de lacase aumentou significativamente quando se utilizou uma concentração maior do indutor seringaldazina. Para o fungo *P. sanguineus* a atividade de lacase aumentou significativamente quando se utilizou uma concentração maior de seringaldazina em proporção 5:3 de glicose/ extrato de levedura. Conclui-se portanto que o uso de vitaminas, como por exemplo a biotina, contribui para o crescimento micelial mais rápido e maior, assim como uma maior concentração de indutor de crescimento (seringaldazina) contribui para o aumento da atividade enzimática de lacase.

## SUMMARY

Fungi belong to basidiomycete class have been conferred efficiency in the biodegradation process of ligninocelulosic materials due to their enzymes. These enzymes have commercial potential that could be utilized to many industrial applications. This paper evaluate the micelial growth and enzymatic activity of laccase of three amazonic white-rot fungi (*Pycnoporus sanguineus*, FSF7 (*Trametes sp*) e FSF11 (*Trametes sp*). Micelial growth was evaluated through the micelial progress in solid media BDA with different concentrations (30, 90, 120 and 300 mcg) of biotin. To enzymatic activity of laccase was used liquid medium (agar-malt) with different concentrations of glucose/yeast extract, previously autoclaved at 120°C during 15 minutes and pH 6. 5mm of fungi removed from colony edge was used to inoculate in submerged culture under agitation in Sheaker at 180 rpm and 28°C. High (2.5g) and low (25mg) dosage of seryngaldazine was used. After three days of cultivation, the media was filtrated and enzymatic activity determined by



spectrophotometer. *P. sanguineus* had higher micelial growth and FSF11 lower at concentration of 120 mcg of biotin. On the whole, biotin in the medium contribute to add micelial growth. Laccase increase when use higt concentration of inductor seryngaldazine. Laccase activity to *P. sanguineus* increase significantly when higher dosage of seryngaldazine at 3:5 glucose/ yeast extract was used. Hence it follows that vitamin, as for example biotin, contribute to micelial growth more rapid and higher as well as a major concentration of inductor (seryngaldazine) contribute to increase laccase activity.

### ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>ABTS</b>	Sal diamônio 2,2' - azino – bis (3 – etilbenzotriazolina – 6 – sulfônico)
<b><math>\alpha</math></b>	constante de regressão linear
<b>BDA</b>	Batata – dextrose – ágar
<b><math>\beta</math></b>	velocidade de crescimento micelial radial da colônia
<b>CBA</b>	Centro de Biotecnología da Amazônia
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfóxido
<b>EPR</b>	Ressonância Paramagnética Eletrônica
<b>ESA</b>	Escola Superior de Ciências da Saúde
<b><math>\epsilon</math></b>	coeficiente de extinção molar
<b>Hyp</b>	hidroxiprolina

<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LiP</b>	Lignina Peroxidase
<b>MnP</b>	Manganês Peroxidase
mV	milivolt
nm	nanômetro
<b>P.E.</b>	Potencial Energético
<b>Probem</b>	Programa brasileiro de ecologia molecular
<b>PhOH</b>	Phenol
<b>Ph</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>r</b>	raio da colônia
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>Ser – Hyp</b>	Serina hidroxiprolina
<b>UEA</b>	Universidade do Estado do Amazonas
<b>USA</b>	Estados Unidos da America
<b>U.L</b>	Unidades por litro
<b>UV</b>	Ultra violeta
<b>µM</b>	micromol
<b>ZFM</b>	Zona Franca de Manaus

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, bilhões de dólares são gastos em pesquisas em todo o mundo para localizar, etiquetar e identificar os genes e suas funções nos seres de todo o reino biológico. Uma enorme quantidade de informações genéticas sobre plantas, animais, microrganismos e a própria espécie humana está sendo coletada e registrada em bancos de dados genéticos para serem usados como primeiro recurso primário bruto do século XXI (RIFKIN, 1999).

Toda essa potencialidade de negócios, estabelecidos a partir dos genomas amazônicos, se bem administrado, trará um promissor desenvolvimento regional. Esta é a questão que mais uma vez se coloca entre tantas outras oportunidades que surgiram como propulsoras do desenvolvimento amazônico. Uma das realizações mais recentes e importantes para o progresso da região amazônica, é a criação do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), que foi planejado para ser a mais avançada e inovadora instituição de pesquisa e desenvolvimento dessa natureza, fora dos chamados países do primeiro mundo, segundo o Programa Brasileiro de Ecologia Molecular (Probem/Amazônia), tendo como objetivo importante o aproveitamento da estrutura industrial da Zona Franca de Manaus (ZFM), para o estabelecimento de bioindústrias.

A Amazônia brasileira situa-se na faixa geográfica do planeta denominada trópico úmido. Em 1982, o Committee on Selected Biological Problems in the Humid Tropics definiu o trópico úmido como

aquela área da superfície terrestre onde a biotemperatura média anual nas terras baixas é superior a 24<sup>o</sup> C e a precipitação anual se iguala ou excede o potencial de retorno de água para a atmosfera pela evapotranspiração “ , *apud* Simpósio (1986).

A estrutura da comunidade biológica que compõe o ecossistema florestal amazônico é extremamente complexa, sendo caracterizada por uma grande heterogenicidade de flora e de fauna. Naturalmente, a sua fisionomia é determinada pelas árvores;

porém, existe além dessas, toda uma gama de outras formas de vida vegetal ecologicamente adaptadas, tais como as plantas herbáceas, os arbustos escandentes, diversas formas de palmeiras, as plantas epífitas, sobretudo da família das bromeliáceas e das orquídeas, os líquens e musgos que crescem sobre as folhas dos arbustos e plantas herbáceas, vegetais parasitas, saprófagas, além daquelas inferiores, os decompositores e inoculadores, como fungos, bactérias, entre outras (SHUBART, 1983).

Estima-se que metade dos 25 medicamentos mais vendidos no mundo tem sua origem em produtos naturais de plantas, incluindo os fungos (PLETSCH, 1998). É nessa diversidade que se apoiará a grande indústria do futuro, a biotecnologia. Entre a diversidade fúngica, encontram-se aqueles que têm a capacidade de atacar os componentes químicos das células vegetais.

A madeira, por exemplo, em suas diversas formas, está submetida a distintos tipos de deterioradores. Entre os agentes de biodeterioração os fungos (podridão) se destacam pela intensidade e frequência de seu ataque. Dentre as diversas patologias fúngicas associadas a produtos florestais consideram-se as seguintes: mofos, manchas e podridões. Estas últimas apresentam diversos tipos: branca, parda e branda.

Ramirez (2001), assinala que no sistema enzimático dos fungos, a secreção de exoenzimas da madeira faz a troca do substrato insolúvel para o solúvel. Na troca, as endoenzimas penetram de forma intracelular nas hifas e regulam os processos do metabolismo interno. O sistema enzimático revela que cada fungo de podridão branca produz enzimas oxidativas e hidrolíticas, que atuam na degradação dos componentes da parede celular, no caso da lignina e hemicelulose (SILVA, 2002).

Os fungos de podridão branca podem ser considerados os organismos mais eficientes na degradação da lignina (MESSNER, 1998). Até agora, quatro tipos de enzimas degradadoras de lignina tem sido isoladas destes fungos: lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase e outras peroxidases.

O estudo da ação de fungos de podridão branca na degradação da lignina, constitui-se na principal aplicação industrial destes fungos como biobranquiadores de polpa de madeira (GONZÁLEZ y CARMONA, 1998). Os grandes avanços da

biotecnologia florestal nos últimos anos tem se concentrado na indústria da polpa de papel, particularmente nos processos de biopolpação e biobranqueamento, demonstrando que estes processos podem conter uma baixa taxa de contaminação com vantagens econômicas (GONZALÉZ y DONOSO, 1999).

A biopolpação é definido como o tratamento de fragmentos de madeira com fungos de podridão branca que degradam seletivamente lignina antes da polpação (AKHTAR et al., 1997), sendo um processo experimental que tem sido investigado extensamente durante os últimos anos. Este tem sido estudado principalmente como um pré-tratamento para a polpação mecânica. A aplicação deste pré-tratamento acopla consigo uma série de vantagens, como a redução do consumo de energia elétrica, a qual para o caso da polpação termo-mecânica, corresponde a um maior custo; um aumento da qualidade do papel, melhorando suas propriedades e a redução do impacto do meio ambiental negativo do processo de polpação, devido a diminuição do uso de reativos.

Na maior parte dos países, a crescente preocupação com o meio ambiente, está causando um grande impacto sobre a indústria de polpa e papel. Conseqüentemente, esta indústria está movimentando-se rapidamente no sentido de criar alternativas tecnológicas para amenizar este e outros problemas relacionados ao meio ambiente (AKHTAR et al., 1997).

Por outro lado, os negócios relacionados à produção enzimática, movimentam milhões de dólares todos os anos. Esse mercado tem um faturamento estimado em cerca de U\$ 1,5 bilhões de dólares, com um aumento anual de 12% na quantidade de enzimas produzidas nos últimos dez anos (CASTRO e SILVA; SILVA & CAVALCANTE, 2002).

O potencial biotecnológico de microrganismos existentes na biodiversidade amazônica, desperta o interesse de pesquisadores de todo o mundo a desenvolver estudos, que espera-se contribuir com a produção de enzimas, criando novas fontes alternativas para a área de medicamentos, agropecuária, alimentos e biorremediação de efluentes ambientais e pela perspectiva de dias melhores para a população desta região. Baseado nesta afirmação, considera-se necessário um maior investimento em pesquisas científico-tecnológicas, com a finalidade de conhecer e melhor explorar a nossa biodiversidade, de certa forma desconhecida.

Destaca-se a necessidade de desenvolver estudos sobre a produção de enzimas, principalmente de fungos amazônicos, devido a grande quantidade desses microrganismos que se disseminam, encontrando condições favoráveis ao seu crescimento, pelos fatores climáticos da região e também pela grande importância do mercado mundial de enzimas. Assim, o presente trabalho visa contribuir com os estudos sobre os fatores que interferem no crescimento e na atividade enzimática de fungos amazônicos, degradadores de madeira, visando o seu potencial em produzir enzimas, como por exemplo, a lacase.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

- Avaliar a atividade ligninolítica, bem como aspectos relacionados ao crescimento dos fungos amazônicos *Trametes sp* e *Pycnoporus sanguineus*.

### 2.2 Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Verificar a influência da biotina em diferentes concentrações no crescimento micelial dos três fungos testados.
- Testar diferentes concentrações de glicose/ extrato de levedura em meio líquido sob agitação, na produção enzimática de lacase.

- Verificar o comportamento/ atividade enzimática dos fungos amazônicos em alta e baixa dosagem de seringaldazina.
- Avaliar o comportamento/ dia da atividade enzimática dos fungos.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Características Gerais dos Fungos**

Os fungos são seres eucariontes, heterótrofos, aclorofilados, aeróbios a microaerófilos, uni ou pluricelulares, constituído de parede celular composta geralmente de quitina e/ou celulose, além de outros carboidratos complexos, com glicogênio como substância de reserva, nutrição por absorção, podendo viver como sapróbios, parasitas ou simbiontes com outros organismos (LACAZ 2002; PUTZKE, 2004).

São geralmente considerados como uma classe de organismos altamente especializados. Estes seres, igualmente aos animais, não são capazes de sintetizar açúcar e amido a partir de dióxido de carbono presente na atmosfera, conseqüentemente, devem buscar outras matérias orgânicas para alimentarem-se. Praticamente, qualquer material orgânico obtido de plantas ou animais pode sustentar algumas espécies de fungos (FINDLAY, 1967).

São organismos geralmente filamentosos e multicelulares. O crescimento é em geral apical, mas normalmente qualquer fragmento hifálico pode dar origem a outra formação micelial quando destacado e colocado em meio apropriado. As estruturas reprodutivas são diferenciadas das vegetativas, o que constitui a base sistemática dos fungos (PUTZKE e PUTZKE, 1998). Alguns podem ser



microscópicos em tamanho, enquanto outros são muito maiores, como os cogumelos e fungos que crescem em madeira úmida ou solo. Os fungos formam esporos, que são dispersos por correntes de ar (PELCZAR et al., 1996), encontrando-se no solo, na água, nos vegetais, em animais, no homem e em detritos em geral (TRABULSI e TOLEDO, 1996).

A reprodução dos fungos, em termos gerais, se processa através de corpos microscópicos chamados esporos, equivalentes as sementes nas plantas, só que em dimensões muito menores e, usualmente, reproduzidas em grande número. Em condições adequadas de umidade, o esporo germina dando origem a uma hifa, que em conjunto, formam uma malha de tecido conhecido como micélio. Uma vez que o fungo tenha desenvolvido suficiente micélio, forma corpos frutíferos (esporóforos) em que se produzem novos esporos, para assim completar o ciclo. A classificação dos fungos está baseada nas diversas formas de corpos frutíferos, que geralmente se desenvolvem na superfície externa do substrato de onde o fungo cresce.

### **3.1.1 Condições para o Desenvolvimento dos Fungos**

No que diz respeito ao crescimento, existem quatro condições que são essenciais para o desenvolvimento dos fungos: a existência de substrato, umidade, oxigênio e temperatura adequada. A ausência ou eliminação de qualquer um destes fatores, evitaria ou inibiria, em grande escala, o crescimento dos fungos.

**Oxigênio** - Assim como os animais, os fungos necessitam de oxigênio para sua respiração, ou seja, para a oxidação dos açúcares que utilizam para crescer e para seu consumo de energia. Como resultado de sua respiração, os fungos

produzem dióxido de carbono e, se não existisse um intercâmbio de ar ao redor das hifas o dióxido de carbono se acumularia e, finalmente, o fungo morreria por sufocação.

**Temperatura** – Os fungos, assim como as plantas, crescem mais rápido em climas quentes do que em climas frios. A temperatura ótima de lacase de alguns basidiomicetos estão mostradas na tabela 1. O crescimento fúngico diminui rapidamente para a maioria dos fungos de podridão, a medida que a temperatura aumenta acima dos 32°C (RAMIREZ, 2001). Segundo Eslyn e Clark (1979), temperaturas maiores que 38°C são letais para a maioria dos fungos; (existem os fungos termofílicos que sobrevivem a temperatura que pode chegar a 65°C). Ao contrário, temperaturas abaixo do ponto de congelamento, provocam a latência do fungo, mas não sua morte.

**Tabela 1.**

Temperatura ótima de lacases de alguns basidiomicetos

<b>Fonte de lacase</b>	<b>Temperatura ótima (°C)</b>	<b>Referência</b>
Cerrena maxima	>50	Shleev et al. (2004)
Coprinus cinereus	60-70	Schneider et al.(1999)
Coriopsis fulvocinerea	>50	Shleev et al. (2004)
Coriolus hirsutus	45	Shin & Lee (2000)
Linhagem I-4 (família Chaetomiaceae)	42	Saito et al. (2003)
Linhagem UD4	70	Jordaan et al. (2004)
Pleurotus ostreatus	45-65	Palmieri et al. (1997)
Psilocybe castanella CCB444	55	Coelho et al. (2005)
Sclerotium rolfsii	62	Ryan et al. (2003)
Trametes hirsuta	>50	Shleev et al. (2004)
Trametes ochraceae	>50	Shleev et al. (2004)
Trametes sp. linhagem AH28-2	50	Xiao et al. (2003)

**Substrato** – O fungo requer uma fonte de carbono para a síntese dos constituintes protoplasmáticos, além de outros elementos como hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, fósforo e enxofre. Diferente das plantas superiores, o fungo utiliza uma fonte de carbono orgânico em lugar do dióxido de carbono. A maioria dos fungos tem a capacidade de utilizar a glicose, havendo outros que utilizam o carbono, através de sacarose, maltose, amido e celulose (SMITH, 1970).

O alimento requerido para a nutrição do fungo é fornecido principalmente pela mesma matéria que constitui as paredes das células do hospedeiro, como também podem facilitar o alimento das substâncias armazenadas nas cavidades celulares, tais como amidos, açúcares e outros.

**Umidade** - A umidade é outro fator necessário para a atividade fisiológica dos fungos, como a germinação de esporos, a atividade enzimática, a absorção e transportes de substâncias. De um modo geral, a umidade ideal para o desenvolvimento destes microrganismos varia entre 30% e 50% (TUSET e DURAN, 1986). Segundo Findlay (1967), este é, sem dúvida, o fator mais importante que controla o desenvolvimento dos fungos da madeira e outros produtos orgânicos. Os fungos se desenvolvem com maior facilidade num teor de umidade maior que 28-30%, do que quando geralmente imunes ao ataque àquelas madeiras com teor de umidade menor que 20%.

Outros fatores que afetam o crescimento dos fungos é a luz e a acidez ou alcalinidade do substrato. A luz, em geral, tem um efeito retardador de crescimento dos fungos, porém, muitas espécies não podem frutificar normalmente em total escuridão. Assim como é essencial para a esporulação de muitas espécies, a luz também desempenha um papel na dispersão dos esporos, que em muitos fungos, os órgãos portadores são positivamente fototrópicos e descarregam seus esporos na direção da luz (ALEXOPOULOS, 1966).

O crescimento dos fungos pode também ser afetado pelo grau de acidez ou alcalinidade do substrato. Em geral, os fungos prosperam em materiais que são ligeiramente ácidos, com pH entre 4,5 e 5,5, como o normal de madeiras. Os fungos de podridão produzem, geralmente, quantidades apreciáveis de ácidos orgânicos como resultados de seu crescimento, o que tende a aumentar a acidez do substrato

em que se desenvolvem (FINDLAY, 1967). Valores de pH para lacases de alguns basidiomicetos estão mostrados na tabela 2.

**Tabela 2.**

Valores de pH ótimo para lacases de alguns basidiomicetos

<b>Fonte de lacase</b>	<b>Substrato</b>	<b>pH ótimo</b>	<b>Referência</b>
Linhagem 1-4			
(família <i>Chaetomiaceae</i> )	Seringaldazina	7	Saito et. Al.(2002)
<i>Lentinus tigrinus</i>	DMF	3	Lechner & Papinutti (2006)
<i>Psilocybe castanella</i>			
(CCB444)	ABTS	2,5	Coelho et al.(2005).
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Guaiacol	4	Eggert et al.(1995).
<i>Trametes versicolor</i>	ABTS	5,5	Brown et al.(2002).
<i>Trametes villosa</i>	Seringaldazina	5 a 5,5	Yaver et al.(1996).
<i>Sclerotium rolfsii</i>	ABTS	2,4	Ryan et al.(2003).
<i>Trichophyton rubrum</i> LKY-7	ABTS	3	Jung et al.(2002).

Os fungos se reproduzem em ciclos assexuais, sexuais e parassexuais. A reprodução assexuada ocorre através de brotamento, fragmentação e produção de conídios. A reprodução sexuada culmina na produção de basidiósporos, no caso de basidiomicetos. A reprodução parassexuada consiste na fusão de hifas e formação de um heterocarion que contém núcleos haplóides. Apesar de ser raro, o ciclo parassexual é importante na evolução de alguns fungos (PELCZAR et al., 1996).

De acordo com a nutrição, os fungos são classificados em duas categorias: saprófitas (ou sapróbios) e parasitas. Os saprófitas se alimentam de matéria orgânica animal ou vegetal morta e os parasitas vivem dentro ou sobre organismos vivos (animais ou vegetais), deles retirando seus alimentos, absorvem nutrientes em vez de ingeri-los, secretando enzimas digestivas no substrato onde se desenvolvem. Essas enzimas catalisam a quebra de moléculas grandes em moléculas suficientemente menores para serem absorvidas pela célula fúngica. Por essa razão, os fungos crescem dentro ou sobre os alimentos (RAVEM, 2001).

Desenvolvem-se geralmente em meios contendo um pH baixo, uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio orgânico ou inorgânico e alguns minerais. Alguns necessitam de vitaminas (PELCZAR et al., 1996).

### **3.2 Potencial de degradação dos Basidiomicetos**

Os fungos, em particular os Basidiomicetos, são conhecidos desde os primórdios da história, seja pela sua toxidez, causando muitas vezes acidentes fatais, ou ainda por suas propriedades nutricionais e medicinais, tornando-os utilizados por diversos povos. Apesar de suas propriedades descobertas empiricamente, os fungos guardam em si um grande potencial econômico, agora revelado pelos recentes avanços da biotecnologia (URBEN, 2001).

Muitos dos fungos basidiomicetos produzem corpos frutíferos comestíveis e de valor nutricional, sendo ricos em proteínas, fibras, minerais, vitaminas e apresentam baixo teor de lipídios e carboidratos (WASSER e WEISS, 1999).

A maioria dos basidiomicetos pode utilizar os componentes da madeira para seu crescimento, porque possuem um sistema enzimático que os torna capazes de degradar fontes complexas de carbono como a celulose, a hemicelulose e a lignina. Os fungos lignocelulolíticos têm recebido atenção especial dos pesquisadores nas últimas décadas devido a sua aplicabilidade no tratamento de efluentes (indústrias têxtil e papelaria), biorremediação e inclusive na produção de antibióticos (KOTTERMAN et al., 1994; BLANCHETTE, 1995; SMÂNIA et al., 1997; ZJAWIONY, 2003). Também vem sendo discutido o papel desses organismos na produtividade das florestas, as quais são estritamente dependentes da reciclagem de nutrientes imobilizados na madeira e, portanto, da dinâmica dos processos da decomposição (RAYNER e BODDY, 1998).

Um terço de toda biomassa produzida no planeta consiste em lignocelulose, também denominada de fibra. Segundo Tsao (1986), 65% dessa biomassa é produzido nas florestas e 15% gerado em pastagens e áreas cultivadas, sendo que apenas 20% da produção é inserida em processos produtivos, especificamente produção de alimentos e de energia.

Os fungos lignocelulolíticos, também denominados xilófagos, são aqueles que conseguem degradar os três componentes químicos da parede celular dessa biomassa e são chamados fungos de podridão branca (*White-rot*), enquanto que aqueles que só degradam a celulose e a hemicelulose são chamados fungos de podridão parda (*Brown-rot*) (MATHEUS e OKINO, 1998).

Este material orgânico lignocelulínico é geralmente, considerado como resíduo nos processos industriais de beneficiamento dos produtos agrícolas e sua presença é abundante nas palhas de trigo, arroz, no bagaço de cana-de-açúcar e na extração de óleos vegetais (PAULI, 1996).

No caso do material lignocelulósico "madeira", a sua biodegradação ocorre quando exposta ao ambiente, criando assim, condições favoráveis ao crescimento microbiano. Seu complexo enzimático é formado, principalmente, pelas exoenzimas lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase. As duas primeiras compreendem uma família de pelo menos dez isoenzimas estreitamente relacionadas, algumas já possuindo seus genes clonados e seqüenciados (GRIFFIN, 1994).

Os organismos que apresentam grande atividade na degradação da lignina são os fungos de podridão branca que apresentam a capacidade de completar a mineralização dos componentes da madeira juntamente com a lignina e os carboidratos (REID, 1995).

Os materiais lignocelulósicos são insolúveis em água, implicando na vantagem de sua fermentação sólida. Apesar de necessária hidratação do substrato com uma fina camada de água na superfície das partículas, o substrato não chega a formar uma mistura fluída. Os teores de água no substrato em fermentações sólidas devem permanecer entre 1:1 e 1:10 (substrato:água). A biodegradação, através da fermentação sólida, apresenta diversas vantagens em relação aos cultivos submersos, dentre as quais: menor volume de fermentador (sem o excesso de água); gastos menores com energia para esterilização; aeração facilitada; menor custo em equipamentos e manutenção para promover a agitação e homogeneização; baixos custos de recuperação do produto e desidratação; meio mais adequado para degradação fúngica da lignina e meio menos favorável à contaminação bacteriana (RAJARATHNAM, 1992; Apud SANTOS, 2000).

Sendo a celulose e a hemicelulose componentes de diversos processos produtivos industriais, torna-se necessário o pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos de forma a permitir sua hidrólise para o aproveitamento das frações. Este pré-tratamento pode ser químico, físico ou biológico (PAULI, 1997). A possibilidade de tratamento biológico depende de organismos que possuam complexos enzimáticos lignocelulósicos específicos, os quais são encontrados apenas em basidiomicetos. Estes fungos, através de complexo lignocelulolítico formado por celulasas, lignases, peroxidases, lacases, proteases, manganases e fenol oxidases dentre outras enzimas, possuem a capacidade de degradar a lignina, retirando seus grupos metaoxílicos e fazendo a ruptura das ligações éster, liberando substâncias mais solúveis e expondo as cadeias restantes à ação das demais

enzimas (GARZILLO et al., 1992, 1994; BUSWELL e CHANG, 1994; ORTEGA et al., 1997 e GHOSH et al., 1998, Apud SANTOS, 2000).

### 3.3 Os Fungos e a sua Importância Biotecnológica

A biotecnologia encontra muitas e diferentes aplicações em vários segmentos de atividade como, agricultura, mineração, pecuária, saúde e indústria. Suas aplicações na indústria constituem o objetivo principal da chamada biotecnologia industrial.

Os fungos são muito utilizados industrialmente como é o caso do *Penicillium*, utilizado na indústria farmacêutica na fabricação da penicilina e o *Aspergillus niger*, usado na fabricação da progesterona e ácido cítrico, na obtenção de exopolissacarídeos com potencial terapêutico (ROSADO et al., 2003; WISBECK et al., 2002; FAN et al., 2001; MAZIERO et al., 1998; BURNS et al., 1994), como integradores e aromatizadores de alimentos como sopas e cremes (SOLOMONS, 1975), na maturação de queijos do tipo roque fort e camembert, e na fabricação do saque vinho de arroz pelo fungo *Aspergillus oryzae*.

A biotecnologia, como ciência, tem emergido como uma área de grande potencial. O uso eficiente da maquinária microbiana para produzir os mais variados tipos de metabólitos (enzimas, vitaminas, fármacos, outros), tornou-se um campo de pesquisa inalienável. Os conhecimentos obtidos nestas pesquisas estão sendo utilizados nas áreas de energia, alimentação, farmacologia, agricultura, indústrias químicas e ciência do desenvolvimento ambiental, sendo esta última de extrema importância em função dos graves problemas que enfrentamos com a poluição do meio ambiente.

O rápido desenvolvimento da produção industrial coincide com um interesse crescente da biotecnologia, a qual envolve a utilização de processos biológicos ou enzimáticos em diversas áreas industriais. Isto tem chegado a ser possível pelo desenvolvimento de microrganismos altamente especializados, o que podem ser diretamente empregados nos processos ou através de isolamento das enzimas que eles produzem.



Nos últimos anos tem se intensificado o aproveitamento de resíduos agroindustriais tais como, polpa e folhas de café, resíduos de frutas, bagaço de mandioca, farelo de soja, bagaço de cana-de-açúcar, polpa de beterraba, entre outros. Vários processos biotecnológicos foram desenvolvidos para utilizar estes materiais na produção de álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos e fungos, gerando produtos de maior valor agregado (ESPINOZA e CABRERA, 1976; ROTZ et al., 1982; PANDEY et al., 2000; RAINHO et al., 2003).

O uso de fungos no processo de bioconservação pode reduzir a quantidade de resíduos, minimizar a poluição, formar produtos de interesse das indústrias de alimentos, de papel e na biorremediação. Para otimizar o processo produtivo, pesquisas têm sido realizadas visando o estudo das condições ótimas do crescimento e da produção de basidiocarpo de várias espécies de fungos em substratos alternativos (HASSEGAWA, 1998).

Lagoas aeróbicas lodos ativados são técnicas atualmente empregadas para minimizar a poluição de efluentes (DURÁN et al., 1995). Os lodos ativados proporcionam maior redução dos compostos clorados (40%) em comparação com as lagoas aeróbicas (25%). A ultrafiltração do efluente da extração alcalina, associada a outro método de tratamento, parece ser uma alternativa de custo razoável (US\$ 3 a 4/ton. de polpa) e de grande significado. Após a ultrafiltração, o efluente permanece com toxicidade aguda, tendo necessariamente que passar por um tratamento biológico como complemento do processo de ultrafiltração. Os tratamentos que usam seqüencialmente uma fase anaeróbica e outra aeróbica representam a tendência atual em todo o mundo, já que aumenta consideravelmente a eficiência do processo global, reduzindo o tamanho das estações e os tempos de residência (DURÁN et al., 1995).

A biotecnologia em geral e as enzimas em particular, ganharam um lugar importante na tecnologia da produção de celulose, branqueamento de polpas, na reciclagem de papel e, se utilizada de maneira ágil e fundamentada, muito deverão contribuir para a indústria papeleira em nosso país.

O reconhecimento da capacidade dos microrganismos de degradar compostos orgânicos vem sendo utilizada ao longo do tempo em processos de tratamento de efluentes líquidos e de resíduos sólidos. Graças a essa habilidade,

têm sido desenvolvidos processos biotecnológicos destinados a diversas finalidades, dentre as quais destacam-se a degradação de poluentes, a lixiviação de minerais, a desobstrução de poços de petróleo e a recuperação de locais contaminados como, solo, águas superficiais e subterrâneas (DE OLIVEIRA, 2002).

Estudos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver tecnologia capaz de minimizar o volume e a toxidez dos efluentes industriais. Atualmente, por exemplo, existe uma forte tendência dentro do âmbito da indústria de papel e celulose pelo estabelecimento de tecnologias limpas, as quais poderiam permitir, em princípio, atingir o estado de descarga zero (HABETS e HEINS, 1997).

Várias tentativas de utilização de fungos foram exitosas (Durán e col., 1995), entretanto, todas se mostraram muito lentas para serem aplicadas na indústria papelreira. Todas as promessas oriundas de todos estes ensaios com diferentes fungos ligninolíticos, com diferentes tipos de madeiras e variadas condições de processo se tornam mais ou menos inúteis quando se considera o longo tempo de processo para obtenção dos desejáveis níveis de deslignificação. A lentidão destes processos fúngicos os inviabiliza totalmente na indústria papelreira (REID e PAICE, 1994). Estudos de otimização e de seleção de novas cepas devem ser feitos de maneira a encurtar esses períodos de ação e, conseqüentemente, trazer a viabilidade técnica e econômica. Alguns avanços foram apresentados pelo Consortia Research em Wisconsin, Estados Unidos da América, USA (Akhtar e col., 1996) e uma nova técnica de compressão de cavacos dariam maior eficiência aos fungos para atuarem (CHEN et al., 1995; HOFF, 1996). Um trabalho recente indica a necessidade de um bom manejo na deslignificação biológica (WOLFAARDT et al., 1996). Estudos recentes com polpas Kraft pré-branqueadas por fungos, aumentam significativamente a alvura (LIMORE et al., 1996).

Para superar tal dificuldade, a estratégia lógica é o uso da tecnologia enzimática. As enzimas que degradam a lignina (lignina peroxidase) foram as primeiras a serem experimentadas com vistas à diminuição do uso de produtos químicos e de energia na produção de polpas de celulose. Com preparações ainda não obtidas em larga escala, alcançou-se redução significativa do valor Kappa de algumas polpas Kraft, enquanto resultados de outros mostraram reduções pouco significantes em outras (KANTELINEN et al., 1993; VIKARI et al., 1994).

Estudos recentes com Mn-peroxidases têm se mostrado muito eficiente no pré-tratamento de polpas Kraft de madeiras duras (KONDO et al., 1994; KANEKO et al., 1995; KONDO et al., 1996; HARAZONO et al., 1996ab; KANEKO et al., 1996).

Estudos têm mostrado que uma mistura de enzimas compostas de celulases e hemicelulases apresenta um efeito notável sobre o processamento das fibras secundárias. Em baixas concentrações de enzimas, o escoamento aumenta rapidamente após o contato, sem perdas das propriedades mecânicas do papel. As enzimas atuam sobre a superfície das fibras produzindo o efeito de descascamento ( "peeling" ). Se este descascamento é limitado e controlado, as enzimas fazem uma remoção adequada dos componentes superficiais removem aqueles com grande afinidade pela água, mas que contribuem pouco para a formação de pontes de hidrogênio entre as fibras e o dipolo água. Esta redução das interações polpa-água permitem melhor drenagem da suspensão de fibras secundárias, sem afetar as propriedades finais do papel.

Dentro do contexto da biotecnologia moderna, uma das maiores contribuições para a questão do tratamento de resíduos é representada pelo desenvolvimento de processos fundamentados em fungos, principalmente os de decomposição branca. Trata-se de uma família de fungos que apresenta elevada eficiência para degradação de lignina e de inúmeros substratos de natureza fenólica similar (DITTMANN, 2002; RUIZ-AGUILAR et al., 2002; ZHONGMING e OBBARD, 2002).

Fungos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes villosa* e *Trametes versicolor*, têm sido utilizados com sucesso na degradação de inúmeros substratos de relevância ambiental como lignina, fenol, fenóis clorados, pesticidas, corantes entre outros.

É sabido que estas espécies de fungos, em meios limitados de carbono e nitrogênio, produzem uma família de enzimas extracelulares, principais responsáveis pela enorme capacidade degradativa dos fungos. Assim, enzimas como lacase, lignina e manganês peroxidase têm sido utilizadas com sucesso em inúmeros estudos de degradação. Nestes casos, a necessidade de desenvolver sistemas imobilizados tem se tornado uma prioridade, principalmente para garantir o reaproveitamento das enzimas (XIA et al., 2003; PERALTA-ZAMORA et al., 2003).

Devido à capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, lacases fúngicas estão recebendo grande atenção em várias aplicações industriais como na deslignificação, na produção de etanol, na modificação de fibras da madeira, no clareamento de corantes, na síntese de produtos químicos / medicinais e na remediação de solos e águas contaminadas. Pesquisas recentes têm sido intensas e muito tem sido elucidado sobre a diversidade de lacases e suas utilidades (SCHNEIDER et al., 1999; DURÁN et al., 2002; MAYER & STAPLES, 2002).

A lacase apresenta um importante papel na degradação da lignina, segundo e altamente recalcitrante biopolímero mais abundante na natureza após a celulose. Esta enzima apresenta varias aplicações em processos que se baseiam na utilização de materiais ligninocelulósicos (BOURBONNAIS & PAICE 1996; MAYER & STAPLES 2002), como agente branqueador natural para a indústria têxtil e papelreira (JORDAAN et al, 2004), na produção de etanol através do emprego de microrganismos engenheirados (MAYER & STAPLES 2002), na indústria alimentícia onde seu emprego é diversificado como, por exemplo, na produção de bebidas sendo empregado como agente estabilizante de vinhos, sucos de frutas e de cerveja (MINUSSI et al., 2002).e na indústria de panificação para melhorar o sabor do produto (MINUSSI et al., 2002). Há um crescente desenvolvimento de biosensores contendo lacase para imunoensaio como o desenvolvido por Bauer e colaboradores (1999) para distinção entre morfina e codeína em amostras de drogas. Têm-se ainda relatos na literatura sobre o emprego de lacase na degradação de pesticidas ou inseticidas (AMITAI et al., 1998) e também seu uso para síntese orgânica como, por exemplo, na síntese enzimática de vimblastina, uma importante droga anti-câncer, a partir de precursores presentes em larga quantidade em plantas (FRITZ-LANGHALS et al., 1998; JORDAAN & LEUKES 2003).

Por outro lado, desde a descoberta do primeiro antibiótico por Alexander Fleming em 1929, a indústria farmacêutica desponta como uma das áreas mais exploradas em biotecnologia. A produção de biomoléculas de origem microbiana cresce a cada ano, exploradas por empresas de países industrializados.

A produção de penicilina, descoberta a partir do *Penicillium notatum* ou *Penicillium chrysogenum*, revolucionou toda a terapêutica antimicrobiana,

facilitando, com isso, a descoberta de outros compostos dessa natureza, algumas com especificidade para fungos, bactérias, protozoários, entre outros (LACAZ, 2002). A tabela 2 mostra vários microrganismos produzindo antibióticos com finalidades terapêuticas diversas.

Tabela 3.

Exemplos de vários antibióticos processados a partir de microrganismos

Antibióticos	Data	Microorganismos
Ácido fusídico	1960	<i>Fusidium coccineum</i>
Cefalosporina C, N e P	1948	<i>Cephalosporium sp</i>
Cloranfenicol	1947	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Clortetraciclina	1948	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Eritromicina	1952	<i>Streptomyces erithreus</i>
Espiramicina	1954	<i>Streptomyces ambofaciens</i>
Estreptomicina	1944	<i>Streptomyces griseus</i>
Framicetina	1947-1953	<i>Streptomyces lavendulae</i>
Gentamicina	1963	<i>Microsmonospora purpurea</i>
Griseofulvina	1939	<i>Penicillium griseofulvum</i>
Kanamicina	1957	<i>Streptomyces kanamiceticus</i>
Lincomicina	1962	<i>Streptomyces lincolnensis</i>
Neomicina	1949	<i>Streptomyces fradiae</i>
Nistatina	1950	<i>Streptomyces noursei</i>
Oxitetraciclina	1950	<i>Streptomyces rimosus</i>
Penicilina	1929-1940	<i>Penicillium notatum</i>
Tobramicina	1968	<i>Streptomyces tenebraeus</i>
Vancomicina	1956	<i>Streptomyces orientalis</i>

Fonte: LACAZ, 2002.

### 3.4 Fungos que atuam na deterioração da madeira

Vários microrganismos, como bactérias e fungos, são capazes de atacar e degradar a madeira, em ecossistemas terrestres naturais e os fungos superiores especialmente os da classe Basidiomicetos, são os mais eficientes degradadores (BLANCHETE, 1991 e ERIKSSON, 1990).

Os fungos basidiomicetos são geralmente classificados com base nas diferenças dos respectivos padrões de degradação da madeira que apresentam, levando-se em consideração características macroscópicas da degradação. Fungos de degradação branca preferencialmente colonizam madeiras da subdivisão *Angiospermas* (folhosas, madeira dura) e degradam os três componentes principais, celulose, hemicelulose e lignina, deixando a região da madeira degradada com uma coloração clara. No entanto, existem variações dentre as espécies degradadoras de podridão branca (ou clara) que são providos de sistema enzimático que os tornam capazes de utilizar fontes complexas de carbono, sendo os mais eficientes na degradação da lignina, quebrando-a em moléculas menores até CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, deixando a celulose praticamente intacta (KIRK, FARRELI, 1987; HATAKKA, 1994; TUOR, 1995).

Fungos de degradação parda, em geral, preferencialmente degradam polissacarídeos, celulose e hemicelulose, deixando não degradada parte da lignina inicialmente existente, a qual é então responsável pela coloração observada nas regiões da madeira degradada pelo fungo.

Os fungos são seres que têm afinidade em atacar e deteriorar a madeira, localizados em ambientes terrestres naturais e, em particular, os da classe Basidiomicetos têm conferido maior eficiência no processo de biodegradação de material lignocelulósicos (HATAKKA, 1994; HIGUCHI, 1990; Apud SOARES, 1998). Estas espécies de fungos, segundo seu modo de vida, podem ser saprófitas, simbióticos, parasitas e micorrízicos, sendo aproveitados na indústria alimentícia, na produção de enzimas, na biopolpação, no biobranqueamento de efluentes, na formação de ectomicorrizas, entre outros (HAMLIN et al., 1998).

Os fungos capazes de promover a degradação enzimática das paredes celulares são divididos em três grupos: fungos de podridão mole (soft-rot), fungos de

podridão parda (brow-rot) e fungos de podridão branca (White-rot) (OLIVEIRA et al., 1986).

A principal subdivisão em podridão branca e parda foi feita em 1874 por Harting, baseada na coloração da madeira residual, assumindo o material esbranquiçado (celulose) como podridão branca e o material acastanhado (lignina) como podridão parda (ZABEL, 1992).

A podridão parda é causada por fungos pertencentes à subdivisão *Basidiomycota*, que em geral apresentam alta capacidade de degradação (OLIVEIRA et al., 1986). Segundo Nilsson (1988), estes fungos despolimerizam a celulose, sendo a lignina pouco afetada. A madeira colonizada por fungos de podridão parda apresenta coloração marrom escura e em estágios avançados de apodrecimento, ocorre craqueamento cuboidal (EATON, 1993).

Segundo Anagnost (1998), a principal característica observada sob microscopia de luz nas madeiras de coníferas deterioradas por podridão parda é a presença de orifícios nas paredes celulares do parênquima radial, desde o início do processo. Na secção transversal, as células de lenho inicial perdem a forma e, em estágios avançados de deterioração, a parede celular aparece mais fina do que na madeira sadia.

A podridão branca, assim como a podridão parda, é causada por fungos pertencentes à subdivisão *Basidiomycota*, com alta capacidade de degradação. Porém, neste caso a lignina é removida da parede da célula, sendo a celulose e a hemicelulose degradadas em proporções variadas, dependendo da espécie de fungo envolvida (OLIVEIRA et al., 1986). A madeira apodrecida apresenta-se mais clara e macia do que a sadia.

Segundo Eaton (1993), nos estágios iniciais de deterioração, as áreas apodrecidas podem ser delimitadas por linhas escuras. Oliveira et al. (1986), citam a existência de um tipo de ataque, onde pequenas áreas apodrecidas encontram-se intermeadas por áreas sadias. Nesses casos o apodrecimento recebe o nome de “podridão branca em bolsas”.

A madeira deteriorada por estes fungos tem suas propriedades físicas e mecânicas afetadas, havendo diminuição na resistência e aumento da permeabilidade (OLIVEIRA et al., 1986).



A madeira atacada por fungos de podridão mole apresenta a camada superficial escurecida e com pequenas fissuras paralelas e perpendiculares a grã (OLIVEIRA et al., 1986). Este ataque foi descrito por Savory em 1954, sendo caracterizado macroscopicamente pela superfície amolecida e microscopicamente pelo ataque seletivo no interior da parede secundária da célula (ZABEL, 1992).

Uma das características intrínsecas da madeira é ser um material biodegradável em razão de sua origem orgânica, o que pode ser considerado como uma vantagem ou desvantagem dependendo do ponto de vista considerado.

Na destruição da madeira, geralmente participa mais de um organismo, estabelecendo-se uma sucessão que é iniciada por bactérias, seguida por fungos de mancha e podridão branda e que culmina com a ação de fungos de podridão branca e parda, provocando a destruição total da madeira (DEL POZO e PARRA, 1984).

É importante recordar que a composição química da madeira baseado em seu peso seco, corresponde a celulose (40-55%), lignina (17-35%), hemicelulose (15-30%), produtos extraíveis (1-10%) e minerais ou cinzas (cerca de 1%). A proporção destes componentes varia dependendo da espécie, localização da árvore, sítio, idade e outros fatores ecológicos (TORRES, 1971).

Os fungos ligninolíticos podem classificar-se em três grupos de acordo com a natureza de seu desenvolvimento na madeira e o tipo de deterioração que ocasionam. Os fungos ligninoníticos são os mais importantes e são capazes de desintegrar as paredes da célula e, portanto, alterar as características físicas e químicas da madeira; tal desorganização da matéria dá lugar ao estado chamado de podridão. Em contrapartida, os fungos de mancha e os de mofos tendem a alimentar-se dos compostos orgânicos facilmente digeríveis armazenados na madeira e com freqüência, exercem escassa ou nenhuma influência sobre as propriedades desta. Os primeiros causam colorações que podem ser classificadas como defeitos, enquanto que os mofos colorem poucas vezes a madeira, exceto na superfície (HUNT e GARRAT, 1962).

Os fungos de podridão, degradam preferencialmente um ou mais componentes da madeira, causando três tipos de podridão conhecidas como podridão branca, podridão parda e podridão mole conforme comentado anteriormente.

Os fungos que causam podridão parda exibem preferência por celulose e hemicelulose. Em contrapartida, os causadores de podridão branca são os únicos capazes de atacar todos os componentes da parede das células (KUHAD et al., 1997). A podridão mole têm menor importância, uma vez que se desenvolve geralmente a nível superficial.

### 3.5 Produção de Enzimas Ligninolíticas

Os microrganismos fitopatogênicos produzem enzimas extracelulares capazes de superar a resistência natural dos componentes da madeira, em especial a lignina, que é constituída por uma estrutura aromática complexa (GRIFFIN, 1994; MESSERSCHMIDT, 1997).

As principais enzimas envolvidas na degradação da lignina são a lignina-peroxidase (Li-P), manganês-peroxidase (Mn-P) e as lacases (LEONOWICZ et al., 2001).

Existe o fungo ascomiceto *Botryosphaeria sp.*, que embora seja dito ligninolítico, não produz Li-P e Mn-P. Entretanto, esse microrganismo é produtor constitutivo de lacases, as quais são polifenol oxidases e também estão envolvidas na degradação da lignina (BARBOSA et al., 1995, 1996; DEKKER e BARBOSA, 2001).

RAMIREZ (2001) assinala que o sistema enzimático dos fungos, a secreção de ectoenzimas na madeira têm transformado o substrato, de insolúvel a solúvel. Na transformação, as endoenzimas ocorrem de forma intracelular nas hifas e regulam os processos do metabolismo interno.

O sistema enzimático revela, por outro lado, que cada fungo de podridão branca produz enzimas oxidativas e hidrolíticas, que atuam na degradação de certos componentes da parede celular, no que diz respeito à lignina e holocelulose (SILVA, 2002).

Segundo Messner (1998), os fungos de podridão branca podem ser considerados os organismos mais eficientes na degradação da lignina. Até agora, quatro tipos de enzimas degradadoras de lignina tem sido isoladas a partir destes fungos: lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase e outras peroxidases.

Por outro lado, a velocidade pela qual os fungos ligninocelulósicos são decompostos na natureza é bastante variável e depende das condições de umidade e temperatura as quais estão expostos, bem como da biodiversidade fúngica existente no local. Assim, a decomposição completa de um fragmento de um material ligninocelulósico pode demorar meses ou vários anos, sendo que em condições frias e secas, os ligninocelulósicos podem permanecer décadas antes de serem decompostos (FERRAZ, 2004).

### **3.5.1 Fenoxidases (Lacase e Peroxidases).**

#### **3.5.1.1 Lacase (EC 1.10.3.2)**

Até recentemente lacase era estabelecida somente em eucariotos (fungos, plantas superiores e insetos), mas agora há evidência de sua distribuição em procariotos, e a primeira estrutura cristalina de uma lacase bacteriana foi obtida. Em plantas, lacase estão envolvidas na lignificação. Em fungos, além da degradação de lignina, lacases parecem estar envolvidas na esporulação, produção de pigmentos e patogenicidade de plantas. Em insetos, lacase catalisa a união oxidativa de catecóis com proteínas envolvidas na esclerotização da cutícula (YAVER et al., 1996, ENGUITA et al., 2003, CLAUS, 2004).

Filogeneticamente, lacases são membros da família de proteínas multi-cobre, que incluem ascorbato oxidase, ceruloplasmina e bilirrubina oxidases. Lacases geralmente são codificadas por uma família de genes. A expressão destes genes pode ser constitutiva ou indutiva. Conseqüentemente, em diferentes fungos, a produção desta enzima pode ser acentuada sob condições de cultura apropriadas (KLONOWSKA et al., 2002; MAYER & STAPLES 2002; CLAUS, 2004).

Lacases são proteínas globulares contendo entre 10-25% de carboidrato N-ligado e podem ter estruturas monoméricas, diméricas ou multiméricas, compreendendo subunidades de 45 a 80 kDa, dependendo da espécie e isoforma (PIONTEK, et al., 2002). Fungos ligninolíticos frequentemente expressam múltiplos genes de lacases, codificando isoenzimas com alta similaridade na estrutura

primária, mas diferentes características físico-químicas (BROWN et al., 2002). Não há dúvidas que as propriedades bioquímicas e físico-químicas de lacase (atividade, estabilidade, pH e temperatura ótimos, etc.) fornecem muitas informações iniciais importantes para estudos básicos e para a aplicação de lacases na biotecnologia (MOUG et al., 2003; SHLEEV et al., 2004). Algumas características de lacases como, massa molecular, pH ótimo de atividade e substrato específico são extremamente diversos (MAYER & STAPLES, 2002).

Entre a diversidade de compostos oxidados pela lacase, a oxidação da seringaldazina na ausência de H<sub>2</sub>O é típica para identificação de lacase. A seringaldazina é um substrato fenólico dimetoxilado apresentando em sua estrutura dois átomos de nitrogênio ligados por uma dupla ligação, caracterizando assim um composto azo (Figura 4). A reação com a seringaldazina gera inicialmente um radical livre. Em seguida, ocorre a liberação do segundo elétron através de reação enzimática e/ou desprotonação, formando uma quinona de coloração púrpura intensa e que aparentemente não é propensa à polimerização (THURSTON, 1994).

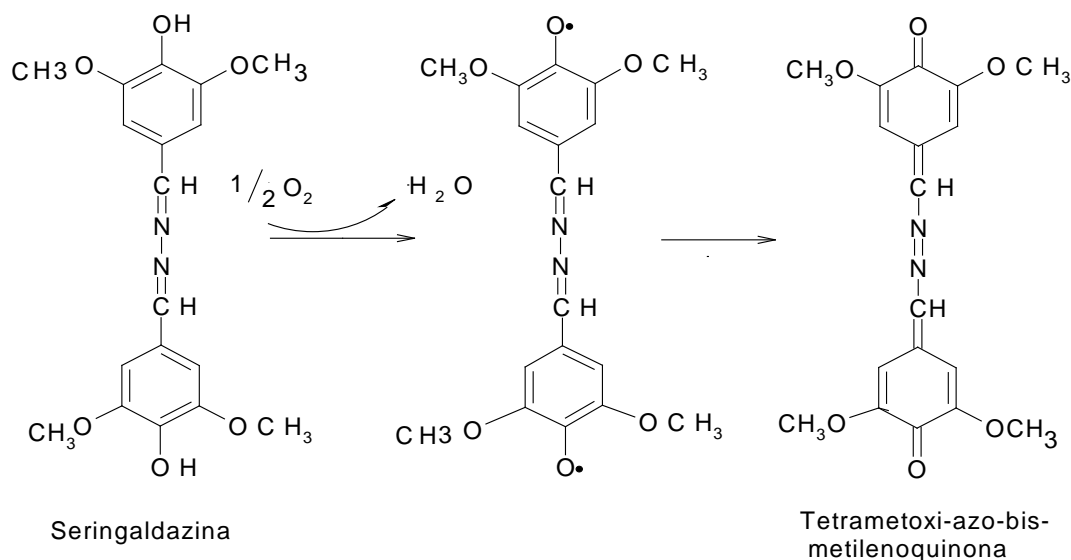


Figura 1. Reação de oxidação da seringaldazina até formação da correspondente quinona.

Fonte: SANCHEZ-AMAT & SOLANO, 1997.

Para a atividade catalítica de lacase são necessários quatro átomos de cobre por unidade de proteína ativa: tipo 1 (T1) – usualmente exibe um grande pico no espectro visível, próximo de 610 nm, quando o cobre está no estado cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ); tipo 2 (T2) – não é detectado no espectro visível, pode ser observado por espectroscopia de ressonância para-magnética (EPR); TIPO 3 (T3) – consiste em um par de cobre centralizados, com máxima absorvância em 330 nm e são anti-ferromagneticamente emparelhados por uma ligação atravessada (BROWN et al., 2002)

O cobre T1 é o aceptor primário de elétrons durante a catálise. Este cobre tipo 1 possui uma coordenação trigonal, com duas histidinas e uma cisteína com ligações equatoriais conservadas e uma outra posição usualmente variável. Esta última ligação axial é com metionina em bactérias e leucina ou fenilalanina em fungos (CLAUS, 2004). Estas observações têm sido amplamente discutidas, pois esta ligação na posição axial influencia fortemente o potencial de oxidação da enzima, possivelmente regulando a atividade da enzima. Uma mutação de fenilalanina para metionina reduziu significativamente o potencial de oxidação de lacase de *Trametes villosa* (KUMAR et al., 2003).

O cobre T1 confere a coloração azul, típica de proteínas multi-cobres, que resultam da absorvância eletrônica intensa causada pela ligação covalente cobre-cisteína. Devido ao seu alto potencial redox, de cerca de aproximadamente 790 mV, o cobre tipo 1 é o sítio onde ocorre a oxidação do substrato. O cobre tipo 2 não apresenta absorvância no espectro visível e revela propriedades paramagnéticas em estudos de EPR. Este cobre tipo 2 é posicionado estrategicamente perto do cobre tipo 3. Juntos, os sítios de cobre tipo 2 e 3 formam um centro trinuclear onde ocorre a redução de  $\text{O}_2$  e liberação de  $\text{H}_2\text{O}$ .

O cobre tipo 2 é coordenado por duas histidinas e o tipo 3 por seis. A forte união anti-ferromagnética entre os dois átomos de cobre tipo 3 é mantida por uma ponte hidroxila (BROWN et al., 2002; ENGUITA et al.; CLAUS, 2004) (Figura 9).

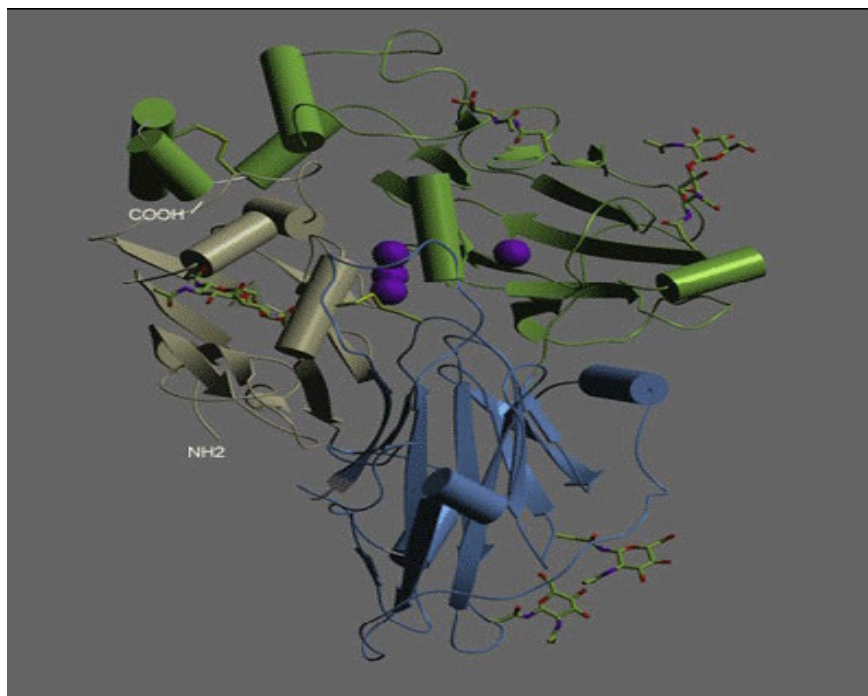


Figura 2. Estrutura tridimensional da lacase de *Trametes versicolor*. Os três domínios (T1, T2 e T3) estão mostrados em cores diferentes. Os átomos de cobre são as esferas azuis e a porção de hidrato de carbono são os modelos em bola e bastão. A parte cinza é a porção N-terminal e a verde, a C-terminal. O sítio T1 é a esfera isolada (PIONTEK et al., 2002).

A lacase é uma cuproproteína do pequeno grupo de enzimas chamadas cuproproteínas azuis, cuprooxidases azuis, oxidases azuis (THURSTON, 1994) ou ainda enzimas fenoloxidasas (*p*-difenoil: dioxigenio oxido-redutase e fazem parte de um grupo de enzimas oxidases que complexam o cobre. São produzidas por plantas superiores e por fungos, sendo secretadas pela maioria dos basidiomicetos. As lacases fúngicas em geral possuem 3 átomos de cobre, no caso do *Trametes versicolor* são encontradas 4 átomos de cobre, todos no estado de oxidação  $\text{Cu}^{2+}$  na enzima nativa. As lacases catalisam oxidações por extração de um elétron de

substratos fenólicos, gerando radicais fenoxilos (HIGUCHI, 1990; DURÁN, 1997; MAYER, 2002).

Os radicais formados atuam em reações não catalíticas acoplando radical-radical, desproporção, desprotonação e ataques nucleofílicos pela água. Essas reações múltiplas levam a polimerização, quebras de ligações alquilarílicas e oxidações no C $\alpha$  e desmetilações (DURÁN, 1997). A oxidação de modelos não fenólicos de lignina foi observada na presença de outros substratos mediadores como 2,2 azobis (3-ethyibenzotiazol-6-ácido sulfônico)/ABTS e seringaldeido (Bourbonnais et al., 1995), bem como 1-hidroxibenzotriazol (DURÁN, 1997).

A lacase corresponde a uma oxidase que contém cobre, com um peso molecular entre 60 e 80 kDa. Esta enzima catalisa quatro oxidações de um elétron da maioria dos compostos fenólicos, formando radicais fenoxi livres como moléculas intermediárias (MESSNER, 1998). É produzida (secretada) pela maioria, mas não por todos os fungos de podridão branca. Como a LiP, a lacase não é aparentemente, requerida para a degradação da lignina em todos os fungos. A lacase oxida unidades fenólicas na lignina a radicais fenoxi (AKHTAR et al., 1997).

Atualmente se aceita que a maior parte das enzimas que degradam a lignina parecem ser capazes de atuar a distância da hifa, na profundidade da parede celular da madeira, através de complexos de manganês ou por via de outros compostos de baixa massa molecular chamados mediadores (MESSNER, 1998).

Os basidiomicetos de podridão branca têm um complexo mecanismo que envolve enzimas que atacam diretamente a lignina, como LiP, MnP e lacase, assim como também possui enzimas que produzem peróxido de hidrogênio para ajudar na ação catalítica das peroxidases (como glicose oxidase e glioxal oxidase), enzimas que podem participar da ruptura dos fenóis, aldeídos, outros derivados da lignina (como quinona oxidoreductase), ou hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Estas enzimas são necessárias para prevenir a eventual acumulação excessiva de peróxido de hidrogênio e também, as enzimas pertencentes aos ciclos redox das hidroquinonas (como catalase, superóxido desmutase, glutathione peroxidase). Porém, os estudos das oxidases e, sobre todos os referidos a lacases e manganês peroxidases, parecem possuir um maior interesse ao haver demonstrado sua

atividade lignolítica uma vez purificadas (Zabel e Morrel, 1992). Por outro lado, há estudos que demonstram que não é necessária a purificação (SILVA, 2002).

Akhtar e colaboradores (1997), assinalam que diversos estudos indicam que três enzimas oxidativas, lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase são responsáveis pela fragmentação inicial do polímero de lignina e produção de compostos de baixo peso molecular em fungos de podridão branca. Nem todos estes fungos produzem aparentemente as três enzimas, mesmo que alguns, incluindo *Trametes versicolor*. Outros, como *Phanerachaeete chrysosporium*, produzem somente LiP e MnP, enquanto que *Ceriporiopsis subvermispora* produz somente MnP e lacase, e *Phlebia ochraceofulva* produz somente LiP e lacase.

Os carboidratos são despolimerizados inicialmente por uma série de enzimas hidrolíticas, enquanto que a lignina é degradada de início, por enzimas oxidativas. A decomposição deste polímero fenilpropanoídeo tridimensional unido por diferentes ligações de carbono-carbono e éter entre monômeros de unidades de fenilpropano (HIGUCHI, 1990), ocorre por reações oxidativas que separam as ligações de carbono-carbono, cadeias de éter e também vários grupos funcionais (ZABEL e MORRELL, 1992).

Kirk e Chang (1975) citado em Galvéz (2001), sugere ao menos três modelos de reações degradativas envolvidas na despolimerização da molécula de lignina:

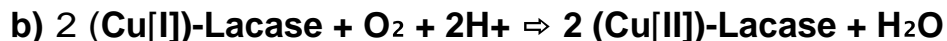
- 1) Divisão oxidativa da cadeia lateral de propil entre os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$  conduzindo à formação de ácido benzóico.
- 2) Divisão da ligação  $\beta$ -aryl-éter e modificação da estrutura da cadeia lateral.
- 3) Degradação do núcleo aromático por meio da abertura oxidativa do anel.

Segundo Zabel e Morrel (1992), as maiores alterações estruturais que ocorrem pela ação dos fungos de podridão branca e sua ação degradadora, incluem desmetilação, oxidação de átomos de carbono  $\alpha$ , modificação das cadeias entre carbonos  $\alpha$  e carbono  $\beta$  das unidades fenil propano, modificações diretas de uma cadeia arylglicerol- $\beta$ -aryl éter e hidroxilação e modificação dos anéis aromáticos. Estes autores, além disso, destacam que na análise de lignina residual, em diversos estados de podridão, se aprecia uma constante perda de grupos metoxi e incrementos em oxigênio e conteúdo de hidroxil. O anterior é corroborado por Eaton e Hale (1993), os quais indicam, além disso, que a lignina degradada por fungos de



podridão branca contém menos carbono, hidrogênio e grupos metoxi, porém mais oxigênio, grupos carbonilos e carboxílicos.

Embora as lacases sejam produzidas principalmente por basidiomicetos de degradação branca, também são detectadas em fungos de degradação parda e em fungos de degradação mole (DURÁN e ESPÓSITO, 1997). As lacases catalisam oxidação por extração de um elétron de um substrato fenólico gerando um radical fenoxila (HIGUCHI, 1990):



Os radicais formados atuam em reações não catalíticas como acoplamento de radicais, desprotonação e ataque nucleofílico por água. Logo, estas reações múltiplas produzem: a) polimerização, b) quebras alquil-aril, c) oxidação carbono  $\alpha$  e desmetilação (KATASE e BOLLAG, 1991).

A lacase, como uma oxidase multicobre (p-difenil:dioxigênio oxidoreductase, (EC 1.10.3.2), catalisa uma redução de quatro elétrons de dioxigênio a água. Lacase contém quatro átomos de cobre (Cu) os quais tem sido classificados de acordo com seu aspecto no EPR: Tipo 1 ou azul, tipo 2 ou normal e tipo 3 ou sítio de acoplamento de cobre binuclear onde os átomos de cobre estão antiferromagneticamente acoplados por meio de uma ponte de ligação (não detectado por EPR) (SUNDARAN et al., 1997).

A espectroscopia combinada com cristalografia e dicroísmo circular magnético e raios-X tem dado uma descrição detalhada do sítio ativo da lacase (COLE et al., 1990; SUNDARAN et al., 1997). Os modelos de ponte entre o tipo 2 e tipo 3 (Sundaran et al., 1997) explicam a redução catalítica de  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ . Primeiro é claro porque o cobre tipo 2 é requerido para a redução de  $\text{O}_2$  já que a ponte a este centro está envolvida na estabilização do intermediário peróxido. A estrutura geométrica da ponte entre os sítios tipo 2 e tipo 3 no sítio trinuclear da oxidase multicobre é diferente ao modelo previamente sugerido (MAGNUS et al., 1993)

As lacases atuam diretamente sobre estruturas fenólicas através da oxidação dos fenóis pela abstração de um elétron, mediada pela redução de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ , que por sua vez, reduz  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ , permitindo que a enzima atue de forma cíclica. No ciclo catalítico da lacase, o grupo fenoxi ( $\text{PhO}^\bullet$ ) representa um substrato fenólico. A estequiometria do ciclo envolve 4  $\text{Cu}^{2+}$  (normalmente ligados a uma única proteína ou a 2 cadeias protéicas acopladas), 4 substratos fenólicos, 4 prótons e uma molécula de  $\text{O}_2$  (FERRAZ, 2004).

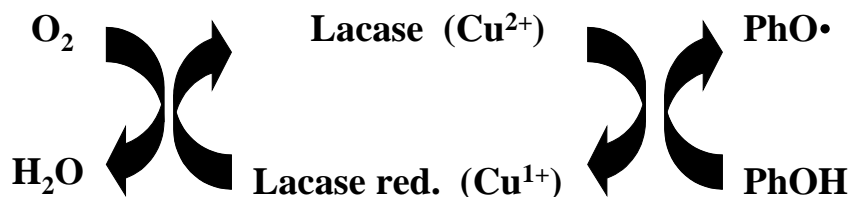


Figura 3. Esquema mostrando o ciclo catalítico da lacase

Fonte: FERRAZ (2004).

Por muitos anos, a participação de lacase na degradação da lignina foi considerada limitada à oxidação de unidades fenólicas, que compreendem unicamente de 10 a 20% do polímero. Entretanto, durante as últimas décadas tem sido demonstrado que lacase também pode oxidar unidades não fenólicas de lignina na presença de certos compostos, conhecidos como mediadores, que incluem substratos artificiais (Bourbonnais & PAICE, 1990; CALL & MUCKE, 1997) e metabólitos fúngicos (EGGERT et al., 1996).

Lacases oxidam muitas substâncias recalcitrantes como anilinas (HOFF et al., 1985), estruturas relacionadas à lignina (BOYLE et al., 1992; BOURBONNAIS et al., 1996), compostos organofosforados (AMITAI et al., 1998), compostos modelos não fenólicos de lignina (MAICHERCZYK et al., 1999), fenóis (BOLLAG et al.;

D'ACUNZO et al., 2002), clorofenóis (BOLLAG et al., 2003), HPAs (MOUGIN et al., 2003), corantes aromáticos (WESENBERG et al., 2003) e outras.

Os mediadores de baixa massa molecular são de grande importância para o processo de degradação de estruturas não fenólicas da lignina. O tamanho das enzimas ligninolíticas não permite a completa penetração delas na madeira (EVANS et al., 1994). Neste caso, as hifas fúngicas produzem os mediadores de baixa massa molecular, de alto potencial redox, de origem interna ou externa à hifa, que migram para longe das enzimas e oxidam a lignina ou outros componentes da madeira pela geração de radicais livres. A interação destes radicais com as estruturas não fenólicas de lignina facilita a quebra de anéis aromáticos. Este processo pode ocorrer em uma distância considerável da hifa, longe do local onde são secretadas as enzimas ligninolíticas, iniciando, assim, a decomposição da madeira (Leonowicz et al., 1999); Shumakovich et al., 2006). Entretanto, durante estudos de degradação de xenobióticos, mediadores naturalmente produzidos por alguns fungos podem estar ausentes nas condições de cultivo utilizadas, tendo como consequência, baixa taxa de degradação, evidenciando a estreita correlação entre atividade ligninolítica (na presença de mediadores) e degradação de poluentes (JOHANNES & MAJCHERCZYK, 2000). Os mediadores podem ainda prevenir a polimerização de produtos da degradação de xenobióticos (LEONTIEVSKY et al., 2001).

O papel dos mediadores em uma oxidação enzimática de lacase é demonstrado na Figura 11. Um mediador pode ser uma pequena molécula que atua como uma espécie de “ponte de elétrons”. Assim, o mediador oxidado pode desenvolver um mecanismo de oxidação não disponível à enzima, estendendo a oxidação a uma série de substratos inacessíveis às enzimas (FABRINNI et al., 2002).

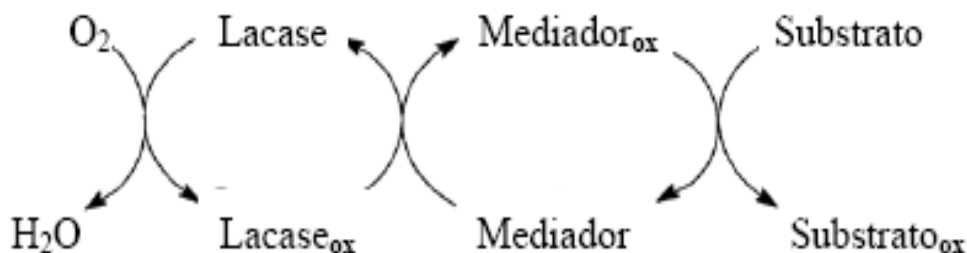


Figura 4. Papel do mediador na atividade enzimática de lacase (FABBRINI et al., 2002).

Diversos cuidados precisam ser tomados para a detecção da atividade de lacase. Por outro lado, a variedade de substratos oxidados pelas lacases é muito grande e ao mesmo tempo, muitos dos substratos utilizados para detectar a atividade de lacases são também oxidados por peroxidases e outras polifenoloxidasas, como é o caso de ABTS e seringaldazina. Para usar estes substratos é necessário remover H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do meio, o que frequentemente é omitido nos trabalhos que supostamente quantificaram atividades de lacase (MAYER, 2002)

### 3.5.1.2 Lignina Peroxidase ou Ligninase (LiP) (EC.1.11.1.14)

A lignina peroxidase possui um peso molecular de 38 a 43 kDa e contém protoporfirina IX como grupo prostético (MESSNER, 1998). Esta enzima oxida o núcleo aromático (fenólico e não fenólico) pela remoção de um elétron, gerando radicais fenoxi e radicais cátions. Por último, reage espontaneamente com nucleotídeos (principalmente com água) e oxigênio molecular. O resultado é uma

“combustão enzimática” nas quais as ligações C-C e C-O são divididas, despolimerizando a molécula e abrindo os anéis aromáticos, formando, com isso, abundantes produtos aromáticos e alifáticos. LiP não é, aparentemente, produzida por alguns fungos de podridão branca, incluindo *Ceriporiopsis subvermispora*, o que faz pensar que não é requerida em todos os fungos, isto é, que os fungos de podridão branca possuem mais de um sistema enzimático para degradar a lignina. As lignina-peroxidases são constituídas de ácidos isoenzimáticos codificados por genes de estrutura múltipla, cuja expressão está regulada por nutrientes. A lignina-peroxidase exibe o ciclo comum de peroxidase catalítica, baseado em reações de oxidação sucessivas, produzindo a oxidação do substrato (AKHTAR et al, 1997).

As enzimas que produzem peróxido são acessórias às peroxidases. Essas enzimas geram peróxido de hidrogênio *in situ* e possibilitam que as peroxidases atuem (FERRAZ, 2004).

As principais enzimas produtoras de peróxido envolvidas na biodegradação de lignina são glicose oxidase e metanol oxidase (intracelulares) que utilizam glicose e metanol como substratos, respectivamente. A produção de  $H_2O_2$  por enzimas extracelulares também tem sido descrita em alguns fungos de decomposição branca. Entre elas estão a glicoxal oxidase e a aril-álcool oxidase. Mais recentemente, foi demonstrado que também MnP pode gerar  $H_2O_2$  a partir da oxidação de ácidos orgânicos como o malônico e o oxálico (FERRAZ, 2004).

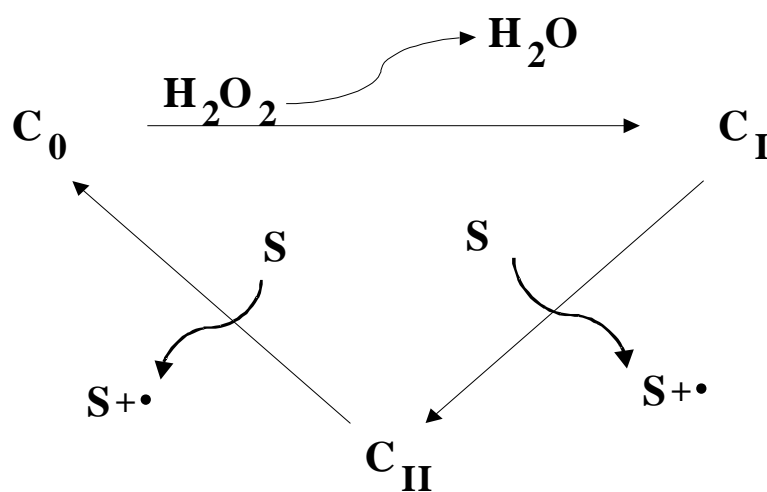


Figura 5. Ciclo catalítico simplificado de lignina peroxidase.

Fonte: FERRAZ, 2004.

### **3.5.1.3 Manganês - peroxidase (MnP) (EC.1.11.1.13).**

As Manganês-peroxidases são enzimas dependentes de manganês, com peso molecular similar ao das LiP. Também contêm protoporfirina IX e cataliza oxidações de um elétron em compostos fenólicos e não fenólicos, especificamente de  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$ , o qual, por sua vez, oxida lignina. O substrato primário é Mn(II) que se oxida a Mn(III) e é estabilizado formando complexos com ácidos orgânicos (MESSNER, 1998). Apesar desta enzima ter sido encontrada em quase todos os estudos com fungos de podridão branca, sua função exata e as reações químicas que resultam na oxidação da lignina ainda não está clara. As manganês-peroxidases são constituídas, assim como as LiP, de múltiplos ácidos isoenzimáticos codificados por genes de estrutura múltipla, cuja expressão está regulada por nutrientes; no caso de MnP, também ocorre uma regulação por  $Mn^{2+}$ . As manganês – peroxidases são ligeiramente maiores que as LiPs, mais exibem o mesmo ciclo catalítico das peroxidases (AKHTAR et al., 1997).

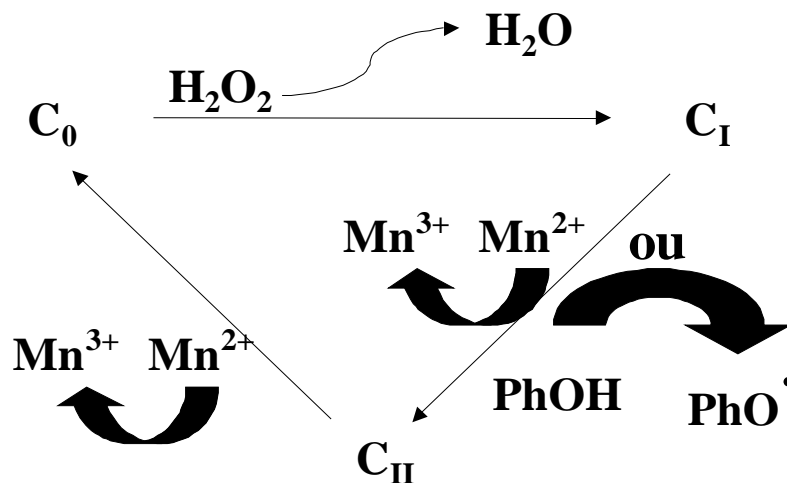
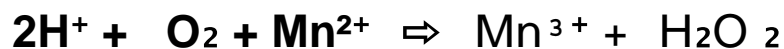


Figura 6. Esquema do ciclo catalítico simplificado da peroxidase dependente de manganês (MnP). PhOH.

Fonte: Ferraz, 2004.

O principal produto da reação Mn(II) o qual é oxidado pela MnPI e MnPII para Mn(III). Mn(III) é estabilizado, formando complexos com ácidos orgânicos, Por exemplo, lactato ou oxalato e, assim, oxida um substrato aromático gerando radicais fenoxi ou radicais aril (Messner, 1998). Tanto lignina-peroxidase como manganês-peroxidase, são importantes na descoloração de efluente Kraft (MICHEL et al., 1991).



Mn (II) é oxidada a Mn (III) por uma peroxidase dependente de Mn.

### 3.6 Influência da Biotina na Velocidade de Crescimento Micelial em Fungos Amazônicos

### 3.6.1 Biotina (Vitamina H).

A biotina é um co-fator enzimático, solúvel em água, presente em quantidades diminutas em toda célula viva. Ocorre principalmente ligada a proteínas ou polipeptídeos, e é abundante no fígado, pâncreas, levedura e leite.

A biotina é um fator essencial na nutrição animal e humana. Sua deficiência é muito rara, devido ao grande número de alimentos onde está presente e as pequenas quantidades de biotina que são requeridas pelo organismo, se comparados com outros nutrientes essenciais. Assim, as concentrações de biotina no plasma são baixas, tanto em humanos como em mamíferos (Bonjour, 1984). Sabe-se que a biotina atua como grupo prostético nas reações catalisadas por enzimas denominadas carboxilases dependentes de biotina (BONJOUR, 1984; WOLF e HEARD, 1989).

Wright et al (1954) descobriram uma enzima no plasma humano que hidrolisava a biocitina (produto da degradação proteolítica das carboxilases). Esta enzima presente no fígado de suíno e em plasma humano é denominada biotina-amida amidohidrolase (EC 3.5.1.12) e comumente denomina-se biotinidase.

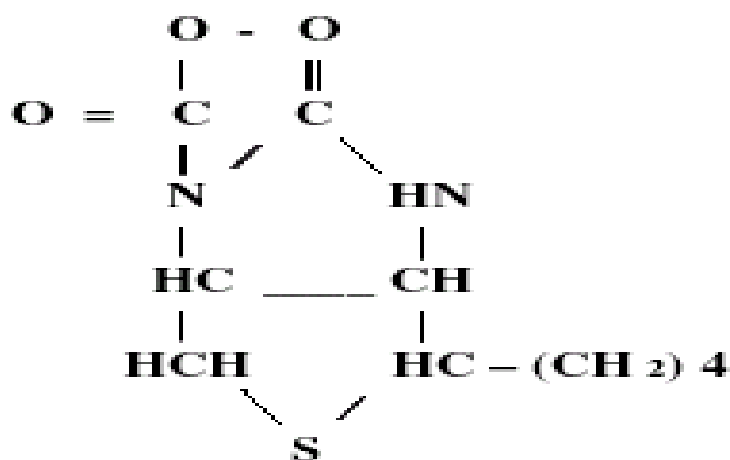


Figura 7. Estrutura molecular da **Biotina**.  
Fonte: González-Reyes, 2002.



A biotina pertence ao grupo de vitaminas hidrossolúveis do complexo B. É conhecida também como vitamina H, vitamina B8 e co-enzima R. Esta vitamina termoestável é absorvida, sem ser transformada, no intestino delgado e é distribuída a todos os tecidos do organismo. A biotina pode ser encontrada em altas concentrações no fígado e rins e se conhece muito pouco sobre o seu transporte e armazenamento.

A biotina é utilizada por todos os organismos, mas somente é sintetizada por bactérias, leveduras, algas e algumas plantas (MOCK, 1996). É uma vitamina do complexo B que se adquire através da dieta e da atividade sintética da microflora intestinal (absorção intestinal por difusão passiva), existindo evidência de que são necessárias estas duas fontes para satisfazer as necessidades totais. Ocorre em pequenas quantidades na grande maioria dos alimentos, especialmente no fígado, rim, gema de ovo e alguns vegetais. A biotina atua como co-enzima de quatro carboxilases relacionadas com o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (Chapman-Smith e Cronan, 1999). Existem outras duas enzimas relacionadas diretamente com o ciclo da biotina: a biotinidase, que degrada as moléculas que contêm biotina, liberando biotina (processo de reciclagem a nível endógeno e a nível do sistema digestivo) e a holocarboxilase sintetase, que catalisa a ativação das carboxilases a partir de sua forma inativa (apoenzima).

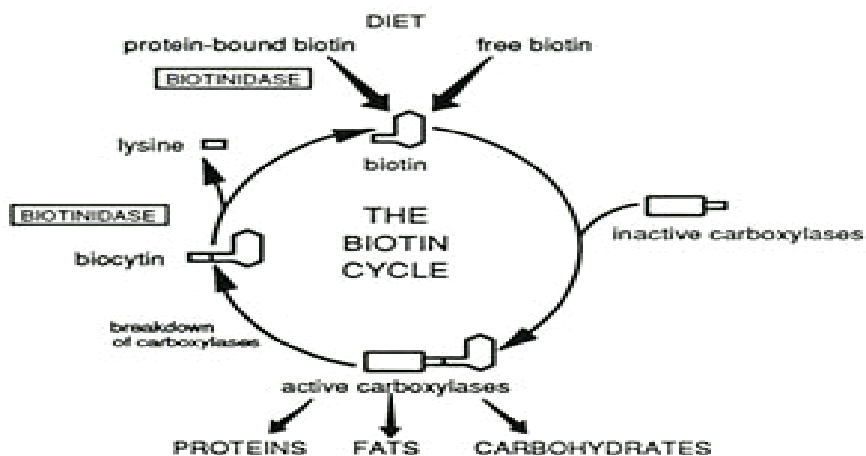


Figura 8. Ciclo da Biotina

Fonte: González-Reyes, 2002

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta dos Fungos.

Os fungos utilizados foram obtidos da micoteca do laboratório de Biotecnologia e Recursos Naturais da Escola Superior de Ciências da Saúde (ESA) da Universidade Estadual do Amazonas (UEA) armazenados em câmara de refrigeração científica (INDREL RC 1500 D) à temperatura de 3.5°C. Estes fungos correspondem ao *Trametes sp*, identificado com o código FSF11, ao *Pycnoporus sanguineus*, além do FSF7, ambos coletados nos arredores de Manaus (Figura 16).



(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 9. Fotos de fungos amazônicos. *P. sanguineus* (A e C). *Trametes sp* (B e D).

Foto: Maria Dolores, 2006.

## **4. 2 Conservação das Cepas**

As linhagens foram conservadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar + 500mg de cloranfenicol) e armazenadas em refrigerador a temperatura de  $3.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , no Laboratório de Biotecnologia e Recursos Naturais da Escola Superior de Ciências da Saúde (ESA) da Universidade Estadual do Amazonas (UEA).

## **4.3 Produção do Inoculo**

Foi utilizado um bisturi com cabo, para retirar cerca de 5mm de material das extremidades de cada placa. Em seguida, cada fragmento fúngico foi inoculado no centro de cada placa de Petri, contendo meio BDA , com procedimento executado em condições assépticas, no interior da câmara de fluxo laminar. As placas de petri foram identificadas, lacradas devidamente com fita crepe em suas bordas e colocadas em temperatura ambiente de  $28^{\circ}\text{C} (\pm 2^{\circ}\text{C})$ , na ausência de luz, até completo preenchimento da placa pela colônia, pelo período de sete dias. Estas placas denominadas cultura estoque, foram utilizadas para a obtenção dos fragmentos.

### **4.3.1 Inoculação**

### **4.3.2 Sistema em Placas de Petri**

Os meios de cultura foram esterilizados na autoclave e levados para a câmara de fluxo laminar para o plaqueamento, onde cada placa de Petri recebeu

aproximadamente 15 mL de meio de cultivo. Após resfriamento à temperatura ambiente, as placas receberam fragmentos de cerca de 5 mm de diâmetro os quais foram colocados no centro de cada placa de Petri e mantidas com a temperatura na faixa de 25 a 33°C e em ausência de luz.

### **4.3.3 Sistemas em Erlenmayer**

Após o período de 7 dias, os experimentos foram conduzidos em erlenmeyer de 200 mL transparentes, autoclaváveis, vedados com tampas de algodão envolvido por papel alumínio, sendo todos os ensaios realizados em duplicata. Os erlenmeyer, contendo meio ágar-malte, em condições assépticas e devidamente identificados, receberam cerca de 5 mm de fragmentos micelial, obtido através de um bisturi devidamente esterilizado, foi realizada a repicagem para a obtenção de uma cultura pura para o trabalho. Os três fungos cultivados, foram colocados em estufa Shaker a 180 rpm, a temperatura de 28°C e sob agitação.

## **4.4 Materiais de Laboratório**

### **4.4.1 Meios de Cultura**

- Meio BDA (batata-dextrose-ágar + antibiótico ).
- Meio Ágar-malte + antibiótico

### **4.4.2 Reagentes**

- Água destilada
- Álcool absoluto
- Tartarato de sódio
- Seringaldazina

#### 4.4.3 Vidraria e Utensílios

- Tubo de ensaio
- Pipeta graduada
- Proveta
- Erlenmeyer
- Becker
- Gral
- Cadinho
- Filtro de porcelana
- Pinça
- Tesoura
- Alça de platina
- Bisturi com cabo
- Papel de filtro e papel alumínio
- Algodão
- Compressa de gase
- Papel indicador de pH (0-14)

#### 4.4.4 Equipamentos

- Balança analítica
- Autoclave
- Bomba a vácuo
- Estufa de secagem
- Estufa Shaker
- Câmara de fluxo laminar
- Espectrofotômetro Cary 50 Varian.
- Destilador
- Dessecador



Figura 10. Balança analítica e dessecador



Figura 11. Autoclave



Figura 12. Bomba a vácuo

#### **4.5 Cinética do Crescimento Micelial**

A finalidade deste ensaio foi avaliar, em particular, o crescimento da fronteira micelial dos fungos FSF7, FSF11 e *Pycnoporus sanguineus* em placas de Petri (triplicata), contendo meio BDA, em presença de biotina nas concentrações de 30mcg, 90mcg, 120mcg e 300mcg.

##### **4.5.1 Influência do pH**

Neste estudo foi utilizado o meio de cultivo BDA, onde os fungos foram inoculados em placa de Petri (triplicata). Embora a finalidade deste trabalho não era avaliar diariamente o pH do crescimento micelial dos três fungos testados, ainda assim, foi verificado o pH inicial, a melhor faixa de pH do crescimento micelial e o pH ótimo.

##### **4.5.2 Influência da Temperatura**

Para investigar o efeito da temperatura no crescimento dos fungos em meio sólido, estes foram crescidos em placas com BDA, ao abrigo da luz, à temperaturas variáveis de 25°C; 28°C e 33°C para verificar a melhor faixa de temperatura para o

crescimento micelial dos três fungos testados, sendo o tamanho das colônias medido diariamente, como indicador da taxa de crescimento.

#### 4.5.3 Análise da Cinética de Crescimento Micelial

A determinação da velocidade de crescimento micelial radial em placa de Petri teve como base, verificar o suplemento nutricional (biotina) para o maior crescimento de micélio fúngico em menor espaço de tempo.

A velocidade de crescimento radial foi obtida pela declividade da equação matemática do raio da colônia em função do tempo, representada pela seguinte equação:

$$r(t) = \alpha + \beta \cdot t$$

Onde:

$r(t)$  = raio da colônia no tempo  $t$  (mm);

$\alpha$  = constante de regressão linear;

$\beta$  = velocidade de crescimento micelial radial da colônia (mm/d);

$t$  = tempo (d)

A equação tem validade para o intervalo de tempo compreendido entre o final da fase lag ou fase de latência e o final do experimento, que representa a fase logarítmica de crescimento (fase log). Início da fase log, obtém-se os valores do tempo de geração, para os referidos fungos.

#### 4.6 Planejamento Estatístico

O planejamento estatístico foi realizado através de uma análise de variância (ANOVA) e do teste de Tukey com nível de significância de 5%, onde se obteve os



parâmetros descritivos (média, desvio padrão, variância) utilizando-se o programa software STATÍSTICA 7.0, com desenvolvimento em planilha Excell.

## **4.7 Determinação da Atividade Enzimática**

### **4.7.1 Preparação do Meio de Cultivo**

O meio de cultivo que se utilizou para a atividade enzimática foi o ágar- malte, a uma concentração de 2% de ágar e 3% de malte . O meio de cultura foi preparado e previamente esterilizado em autoclave à 120°C por 15 minutos, o qual atingiu uma temperatura ótima para a realização do trabalho e verificado o grau de acidez em pH 6,0. Logo a seguir, em ambiente asséptico, colocou-se, inicialmente, 100 mL de meio ágar-malte e em seguida, foram utilizados 50 mL para cada um dos seis erlenmayer. Posteriormente, procedeu-se a inoculação dos fungos (FSF7, FSF11 e *P. sanguineus*) utilizando-se cerca de 5 mm de massa micelial retirados da extremidade da colônia, uma vez que o crescimento efetivo está restrito à extremidade da hifa.

Cada fungo foi inoculado em erlenmayer contendo dextrose (ágar-malte). Os recipientes foram etiquetados (identificados) e devidamente fechados com tampas de algodão envolvidos por papel alumínio e fita crepe.

Os recipientes (erlenmayer) contendo o meio ágar-malte, no qual está presente a glicose como fonte de carbono (como substrato), foram mantidos em estufa Shaker a 180 rpm e cultura submersa sob agitação a 28°C e a testemunha mantida sob refrigeração com pH inicial em torno de 6,0. Procedeu-se a determinação da atividade enzimática em alternância de dias para cada concentração (glicose/ extrato de levedura) preparado a partir do meio ágar-malte, conduzidos em seis ensaios para cada concentração. Foram utilizadas sete concentrações diferentes de glicose e extrato de levedura utilizando o meio ágar-malte, como demonstrado na tabela 4.

Tabela 4.

Diferentes concentrações de **glicose/ extrato de levedura**, em meio ágar-malte.

	<b>Glicose</b>	<b>Extrato de levedura</b>
<b>Concentração 3:2</b>	15g	7g
<b>Concentração 3:3</b>	15g	15g
<b>Concentração 3:4</b>	15g	20g
<b>Concentração 3:5</b>	15g	25g
<b>Concentração 2:3</b>	7g	15g
<b>Concentração 4:3</b>	20g	15g

---

<b>Concentração 5:3</b>	15g	25g
-------------------------	-----	-----

---

#### 4.7.2 Atividade de Lacase

A atividade de lacase foi calculada utilizando um espectrofotômetro modelo Bio Cary, 50 UV-Visible Spectrophotometer Varian, no comprimento de onda de 525 nm, específico para a reação de oxidação da seringaldazina.

No caldo extracelular de cultura dos microrganismos, foi avaliada a atividade enzimática, o qual foi filtrado por meio de um filtro de porcelana Kitasato, revestido por um filtro de papel específico.

A atividade enzimática da lacase foi determinada em caldo de cultivo (extrato de malte) acrescido de glicose como fonte de carbono.

Para verificarmos a produção de lacase utilizou-se a metodologia proposta por SZKLARZ et al., (1989). O método tem como base a oxidação do substrato enzimático de seringaldazina para a sua forma de quinona, que apresenta um espectro de absorção de 525 nm ( $\epsilon = 65000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). De acordo com a atividade enzimática, uma unidade ativa de lacase corresponde à quantidade de enzimas necessárias para oxidar 1 $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto. Para a determinação da atividade de lacase, utilizou-se 50 $\mu\text{L}$  de caldo de cultivo filtrado, 0,95 mL de substancia tampão de tartarato de sódio em pH = 4.2, 1 mL de seringaldazina (solução indutora, estoque, concentração de 5 mg/10 mL de etanol), 1 mL de água destilada.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Condições Favoráveis ao Crescimento dos Fungos**

#### **5.1.1 Velocidade do Crescimento Micelial em Função do Tempo**

O avanço do crescimento micelial dos fungos apresentou um melhor resultado linear da massa fúngica em função do tempo, entre 24 e 96 horas e em temperatura ótima de 28°C, com pH inicial ( 5,5) e ótimo de 6,4.

### 5.1.2 Índice de Crescimento Micelial

A determinação da velocidade de crescimento micelial em placa de Petri, verificou o suplemento nutricional para o maior crescimento de micélio fúngico em menor espaço de tempo.

A condição de crescimento micelial dos fungos está restrito à extremidade da hifa, a qual se desenvolve mais ou menos a uma taxa linear constante e, assim, aumenta a margem da colônia a uma taxa linear. No presente estudo, houve variação da taxa de crescimento micelial em presença de diferentes temperaturas.

### 5.1.3 Influência da Biotina no Crescimento Micelial

A tabela 6 mostra o avanço da fronteira micelial dos fungos testados em diferentes concentrações de biotina. De modo geral, a maior influência no crescimento aconteceu na concentração de 120 mcg de biotina para o fungo *Pycnoporus sanguineus*. Entretanto, em termos individuais nas diferentes concentrações, observou comportamentos diferentes entre os fungos. O fungo FSF7, por exemplo, apresentou maior valor absoluto de crescimento na concentração de 90 mcg de biotina, enquanto que para fungos FSF11 e *P. sanguineus* o maior crescimento aconteceu na concentração de 120 mcg de biotina.

Comparando-se o crescimento micelial dos fungos dentro de uma mesma concentração, verificou-se também comportamento diferente do crescimento micelial. Nas concentrações de 30, 90 e 300 mcg, por exemplo, o fungo FSF7 apresentou maior valor médio de crescimento micelial. Por outro lado, na concentração de 120 mcg de biotina, o fungo *P. sanguineus* é o que apresentou maior valor para o crescimento micelial.

De modo geral, o fungo FSF11 é o que apresentou menor valor absoluto para crescimento micelial nas várias concentrações testadas quando comparado com os outros dois fungos estudados, enquanto que o *P. sanguineus* obteve o maior valor.

Para a concentração de 90 mcg de biotina, o fungo apresentou uma média de crescimento micelial maior, enquanto que na concentração de 120 mcg, verificou-se a menor média (Tabela 5).

Tabela 5.

Média do crescimento micelial em diferentes concentrações de biotina para os fungos FSF7, FSF11 e *Pycnoporus sanguineus*.

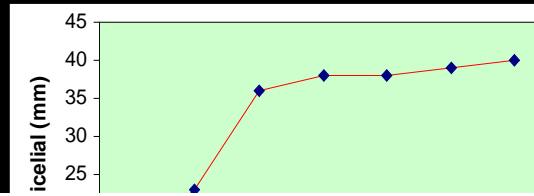
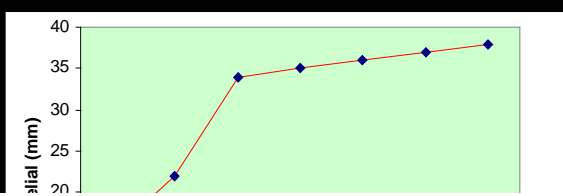
Fungo/ Concentração	Crescimento micelial (mm)			
	30mcg	90mcg	120mcg	300mcg

<i>FSF7</i>	31	32,9	18,6	30
<i>FSF11</i>	19,3	19,5	20,2	20
<i>P. sanguineus</i>	24,3	23,1	34,4	21,2

O crescimento micelial no período de sete dias para o fungo *FSF7*, na concentração 30 mcg de biotina, apresentou-se crescente com um aumento significativo no terceiro dia de crescimento. Ocorre a partir daí, uma velocidade de crescimento menor até atingir um pico máximo no sétimo dia (Figura 13a). Resultado similar foi encontrado para a concentração de 90 mcg de biotina (Figura 13 b).

Em comparação com as demais concentrações, a concentração 90 mcg de biotina foi a que apresentou maior valor médio de crescimento micelial. Por outro lado, na concentração de 120 mcg foi onde ocorreu o menor valor para o crescimento micelial desse fungo, embora o crescimento contínuo seguiu-se como padrão similar às outras concentrações. Nesta concentração nas vinte e quatro horas iniciais, o crescimento micelial foi menor do que nas outras concentrações (Figura 13 c).

Ocorreu o mesmo padrão de crescimento micelial para a concentração de 300 mcg de biotina no período de sete dias (Figura 13 d).







Buscando verificar a existência ou não de diferença estatística entre o crescimento micelial dos fungos nas diferentes concentrações de biotina, realizou-se o teste ANOVA para cada um dos fungos.

A tabela 6 mostra a análise de variância para o fungo FSF7. O teste mostrou que a nível de 5% de significância existe diferença entre o crescimento micelial nas diferentes concentrações de biotina.

Tabela 6.

Análise de variância nas diferentes concentrações de biotina para o fungo FSF7.

<b>Causas de variação</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>F</b>	<b>(p)</b>
Tratamentos	3	878,10	292,70	3,41	0,033 <sup>(*)</sup>
Resíduo	24	2058,57	85,774		
<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>2936,67</b>	<b>378,474</b>		

(\*) Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Com a finalidade de verificar quais concentrações apresentavam crescimento micelial diferente, realizou-se o teste de Tukey para a comparação de duas médias (Tabela 7).

Tabela 7.

Teste de Tukey para crescimento micelial do fungo FSF7 em diferentes concentrações de biotina.

Concentração	Crescimento micelial (mm)			
	30mcg	90mcg	120mcg	300mcg
Média	{31}	{32,9}	{18,6}	{30}
{30}		--	--	--
{90}	--	--	( * )	--
{120}	--	--	--	--
{300}	--	--	--	--

( \* ) Significativo ao nível  $\alpha = 0,05$  ( $p < 0,05$  significativo).

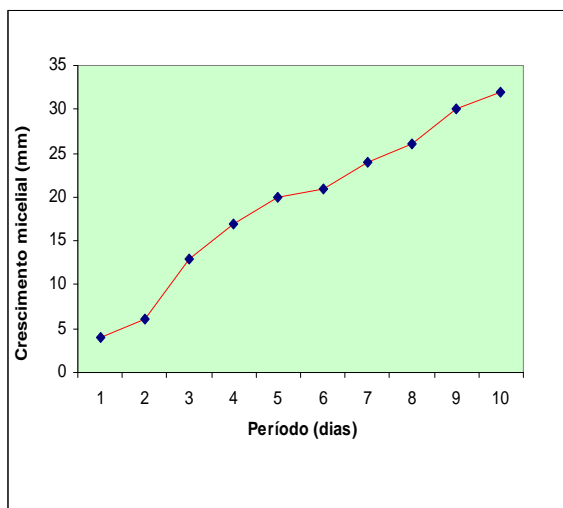
O mesmo resultado obteve-se para o fungo *P. sanguineus* enquanto que para o fungo FSF11 não houve diferença significativa no crescimento micelial nas diferentes concentrações de biotina (Tabela 8).

Em relação ao fungo FSF11 para a concentração 30 mcg de biotina, apresentou um crescimento lento e progressivo até o décimo dia de atividade. No primeiro dia de atividade, obteve um crescimento micelial abaixo de 5mm. A partir daí, verificou-se um crescimento lento mais de forma ascendente até o décimo dia, onde atingiu um pico máximo de crescimento (Figura 14a).

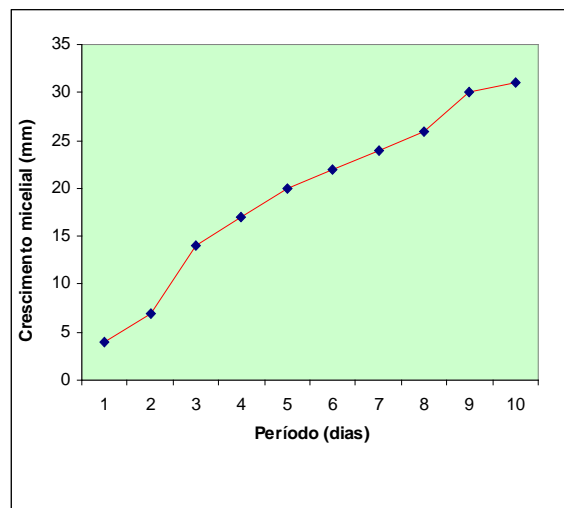
Na concentração 90 mcg de biotina, o crescimento micelial do fungo FSF11 foi similar àquele na concentração de 30 mcg de biotina. Obteve-se um crescimento micelial lento e ascendente do primeiro dia até o décimo dia de cultivo, onde se verificou um pico máximo de crescimento (Figura 14b).

Para a concentração 120 mcg de biotina, obteve-se um pequeno crescimento inicial, com aumento lento e progressivo a partir de então até atingir um pico máximo no décimo dia de crescimento (Figura 14c).

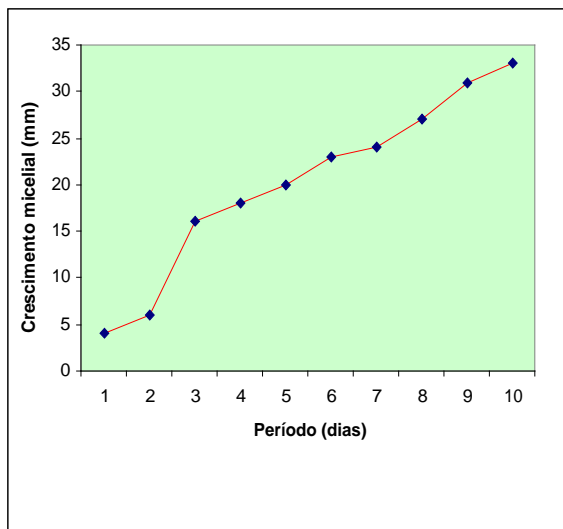
Na concentração de 300 mcg de biotina, o fungo FSF11 apresentou um baixo crescimento micelial nas vinte e quatro horas iniciais de cultivo, atingindo, entretanto, um pico máximo no décimo dia (Figura 14d).



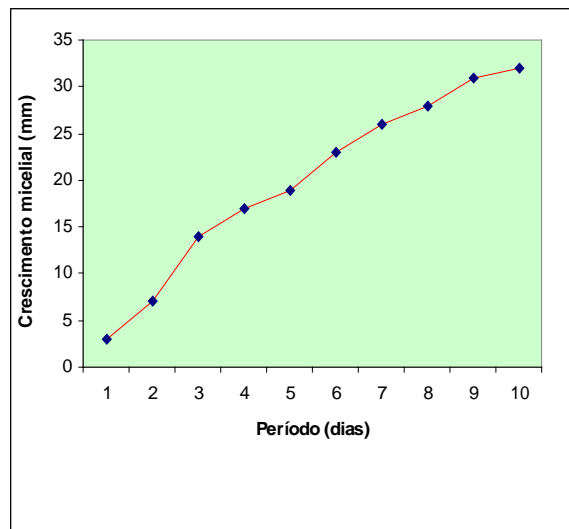
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 14. Crescimento micelial para o fungo FSF11, em meio BDA com diferentes concentrações de biotina. Crescimento micelial do fungo com 30 mcg de biotina (A) e crescimento micelial com 90 mcg de biotina (B). Crescimento micelial do fungo com 120 mcg de biotina (C) e com 300 mcg de biotina (D).

Com o objetivo de se verificar a existência de diferenças nas concentrações de biotina testadas no crescimento micelial do fungo FSF11, realizou-se o teste ANOVA (Tabela 8). Ao nível de 5% de significância, o teste mostrou que não existe diferença entre os tratamentos.

A tabela 8 mostra os dados da análise de variância para o fungo FSF11 nas diferentes concentrações de biotina.

Tabela 8.

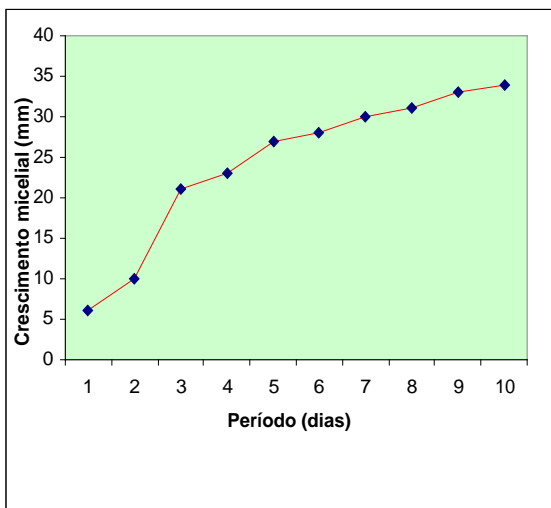
Análise de variância para as diferentes concentrações de biotina para o fungo FSF11.

<b>Causas de variação</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>F</b>	<b>(p)</b>
Tratamentos <sup>3</sup>	5,3	1,76		0,0195	0,9958 <sup>(*)</sup>
Resíduo	36	3260,2	90,56		
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>326,55</b>	<b>92,32</b>		

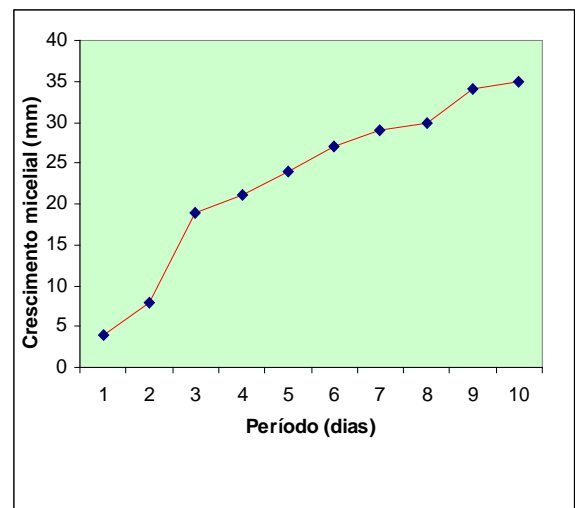
(\*) Não significativo a nível de 5% de probabilidade.

Para o fungo FSF11, não se detectou diferença significativa entre as médias das diferentes concentrações testadas. Dessa forma, não seria necessário saber quais das concentrações analisadas apresentariam diferenças ao nível de 5% de significância. Neste sentido, não se aplicou o teste de Tukey para comparar as diferenças existentes entre as concentrações testadas.

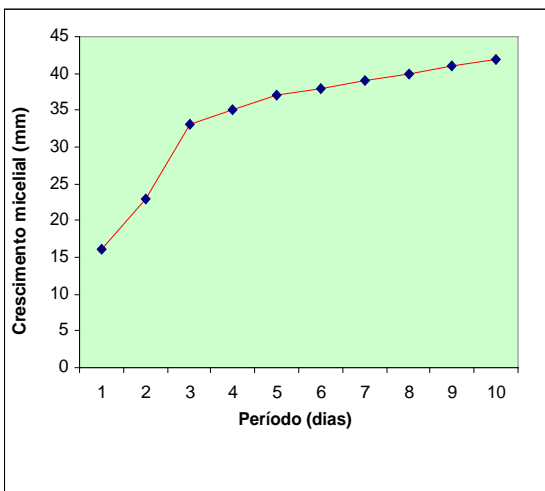
O fungo *Pycnoporus sanguineus* na concentração de 30 mcg e 90 mcg de biotina, por sua vez, apresentou um padrão de crescimento micelial similar aos outros fungos (Figuras 15a e 15b, respectivamente). Na concentração de 120 mcg, apresentou o maior crescimento em valores absolutos com valor máximo de 40 mm no último dia de estudo (Figura 15c). Na concentração de 300 mcg, o fungo *P. sanguineus* obteve um crescimento micelial menor que o da concentração do fungo anterior (Figura 15 d).



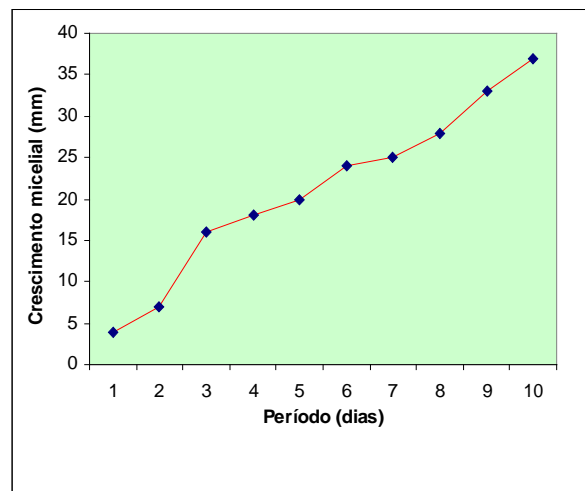
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 15. Crescimento micelial para o fungo *P. sanguineus*, em meio BDA com

Ao nível de significância de 5%, o teste ANOVA evidenciou diferença no crescimento micelial nas diferentes concentrações de biotina utilizadas para o fungo *P. sanguineus* (Tabela 9).

Tabela 9.

Análise de variância para verificar diferença na atividade de lacase para o fungo *P. sanguineus*.

<b>Causas de variação</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>F.</b>	<b>(p)</b>
Tratamentos	3	1046,5	348,833		
				3,6602	0,0208( *)
Resíduo	36	3431	95,306		
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>4477,5</b>	<b>444,139</b>		

( \*) Significativo ao nível de 5% de probabilidade

Com o intuito de verificar quais concentrações mostravam crescimento micelial diferente, realizou-se o teste de Tukey para comparação de duas médias (Tabela 10).



A comparação entre dois tratamentos mostrou ao nível de 5% de significância, diferenças do crescimento micelial dos tratamentos 3 e 4, isto é, na concentração com 120mcg de biotina, o fungo *P. sanguineus* teve um crescimento maior do que na concentração com 300mcg de biotina.

Tabela 10.

Teste de Tukey para comparação entre dois tratamentos do fungo *P. sanguineus* em crescimento micelial e em presença de diferentes concentrações de biotina.

Concentração	Crescimento micelial (mm)			
	30mcg	90mcg	120mcg	300mcg
Média	24,3	23,1	34,4	21,2
{30}		--	--	--
{90}	--	--	--	--
{120}	--	--	--	(*)
{300}	--	--	--	

(\*) Significativo ao nível  $\alpha = 0,05$  ( $p < 0,05$  significativo).

---

#### 5.1.4 Crescimento Micelial dos Fungos sem Biotina (contrôle).

De modo geral, o crescimento micelial para os fungos testados sem biotina foi menor, quando comparados com o crescimento micelial para os mesmos fungos crescidos em diferentes concentrações de biotina.

Dos três fungos testados, o fungo que obteve um maior crescimento micelial em média, foi o *Pycnoporus sanguineus*. Por outro lado, a menor média de crescimento micelial foi detectado pelo fungo FSF7, conforme demonstrado na tabela 11.

Tabela 11.

Média do crescimento micelial em meio BDA sem biotina (contrôle) para os três fungos testados

	Crescimento micelial (mm)	Desvio
Fungo	(Média)	Padrão

FSF7	6,7	( 5,8)
FSF11	11,0	(4,7)
<i>P. sanguineus</i>	18,7	(11,0)

Em comparação ao crescimento micelial realizado com diferentes concentrações de biotina, foi demonstrado uma análise descritiva do crescimento micelial sem biotina dos três fungos testados conforme observado na tabela 12.

Tabela 12.

Análise descritiva do crescimento micelial sem presença de biotina para os três fungos testados

<b>Fungo</b>	<b><u>Crescimento micelial (mm)</u></b> <b>(Média)</b>	<b>Variância</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<i>P. sanguineus</i>	6,7	33,6	5,8
FSF7 ( <i>Trametes sp</i> )	11,0	21,8	4,7
FSF11 ( <i>Trametes</i> )	18,7	121,5	11,0

## **5.2 Atividade Enzimática dos Fungos**

### **5.2.1 Atividade Enzimática com Alta Dosagem de Seringaldazina**

O crescimento do fungo *Pycnoporus sanguineus* em meio líquido se deu sob agitação, pois, estudos anteriores mostraram que o crescimento e a produção de lacase por *P. sanguineus* CY788 foi melhor em culturas submetidas à agitação do que naquelas mantidas na condição estática (POINTING et al., 2000).

Para determinar o melhor meio de produção de lacase, o fungo foi crescido em meio líquido sob agitação, em duplicata e em presença de seringaldazina como indutor.

A tabela 13 mostra a média da atividade enzimática dos fungos testados nas diferentes concentrações de glicose/ extrato de levedura em baixa concentração de seringaldazina. Em valores absolutos, a concentração 5:3 para o *Pycnoporus sanguineus* é onde ocorreu a maior atividade enzimática.

À medida que se aumenta a concentração de glicose, mantendo-se constante a de extrato de levedura, observa-se uma maior atividade enzimática desse fungo. De outra forma, mantendo-se constante a concentração de glicose e aumentando-se a de extrato de levedura, observa-se um ligeiro aumento na média da atividade de lacase para esse fungo.

Tabela 13.

Parâmetros descritivos da atividade enzimática dos fungos testados em diferentes concentrações de glicose/ extrato de levedura.

Fungo	Conc	Atividade Enzimática (média) (U.L. <sup>-1</sup> )	Desvio padrão	Variância	Coeficiente de variação (%)
-------	------	--	---------------	-----------	-----------------------------

<b><i>P. sanguineus</i></b>	3:3	7,47	1,68	2,83	22,5
	3:4	4,49	2,12	4,52	47,3
	3:5	8,15	3,17	10,06	38,9
	2:3	5,57	1,05	1,10	18,8
	4:3	9,35	3,21	10,32	34,3
	<b>5:3</b>	<b>10,57</b>	4,45	20,20	42,5
<b>FSF7</b>	3:3	3,69	2,22	4,90	60,4
	3:4	3,69	2,16	4,67	58,5
	3:5	1,82	1,26	1,60	69,6
	2:3	1,71	1,02	1,05	59,8
	<b>4:3</b>	<b>4,12</b>	0,99	0,98	24,07
	5:3	2,10	0,80	0,64	38,2
<b>FSF11</b>	3:3	5,02	0,94	0,90	18,8
	3:4	5,95	2,93	8,64	49,3
	3:5	7,66	3,76	14,13	49,0
	2:3	6,58	1,64	2,70	24,9
	4:3	1,24	0,60	0,36	48,9
	<b>5:3</b>	<b>8,19</b>	4,44	19,78	54,2

Com o intuito de verificar a influência de uma alta concentração do indutor (seringaldazina) na atividade de lacase, testou-se 2,5g de desse indutor, criteriosamente pesado em balança analítica, na concentração de 3:2 (glicose/ extrato de levedura). Constatou-se que nesta concentração a atividade de lacase é percentualmente maior quando comparada ao da concentração de 25 mg desse indutor.

Nestas condições, obteve-se uma atividade de lacase muito maior do que o controle onde não se utilizou nenhum elemento indutor (Tabela 14). Nas demais concentrações onde se utilizou 2,5g de seringaldazina, a atividade de lacase também se mostrou maior do que no controle.

Ressalta-se, entretanto, que em valores médios absolutos, a atividade enzimática foi maior naquele meio com alta concentração de seringaldazina.

Tabela 14.

Atividade enzimática média de lacase obtida para o fungo *P. sanguineus* em diferentes concentrações de glicose/ extrato de levedura.

Atividade Lacase (U.L <sup>-1</sup> )							
Fungo/ Contrôlo	Glicose (g)/ Extrato de levedura (g)						
	3:2 *	3:3	3:4	3:5	2:3	4:3	5:3
<i>P.sanguineus</i>	42,74	7,47	4,49	8,15	5,57	9,35	10,57

\* Alta dosagem de seringaldazina (2,5 g).

A figura 16 mostra a atividade enzimática/dia do *P. sanguineus* na concentração de 3:2 (glicose/ extrato de levedura) na presença de alta dosagem (2,5g) de seringaldazina.

A presença da lacase foi detectada somente no terceiro dia de crescimento, apresentando-se crescente até o sétimo dia, quanto então apresentou pequena flutuação nos valores até o último dia de crescimento (Figura 16).

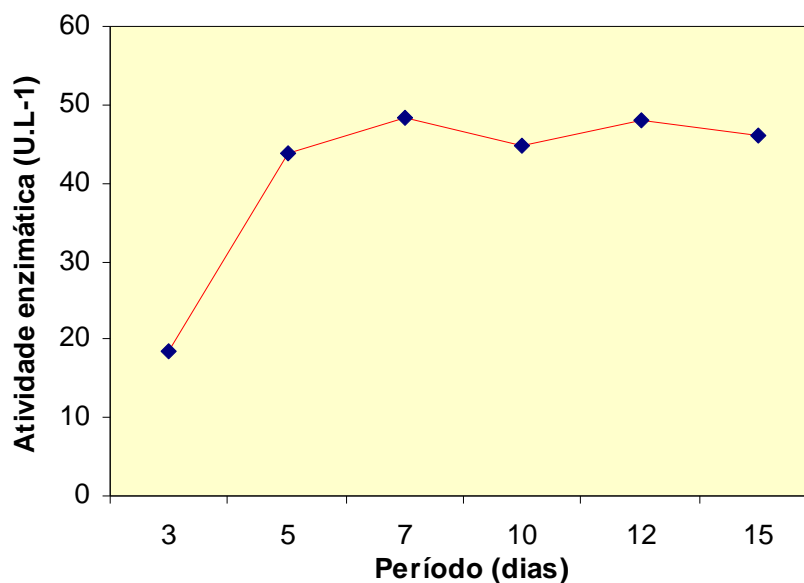




Figura 16. Atividade enzimática do fungo *P. sanguineus*, na concentração 3:2 (glicose/ extrato de levedura) e alta dosagem de seringaldazina

A tabela 15 mostra a média da atividade enzimática dos fungos na presença de alta dosagem (2,5g) do indutor seringaldazina.

Tabela 15..

Atividade enzimática de lacase na concentração de 3:2 (glicose/ extrato de levedura) para os fungos testados em alta dosagem de seringaldazina (2,5g).

<b>FUNGO</b>	<b>ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U. L. <sup>-1</sup>)</b>	
<i>P. sanguineus</i>	42,7*	(11,12)**
FSF7	46,2	(9,38)
FSF11	45,65	(12,40)

\* Valores médios para um período de quinze dias de crescimento.

\*\* Valores entre parênteses indicam o desvio padrão.

O fungo FSF7 na presença de alta dosagem do indutor seringaldazina, apresentou uma atividade enzimática maior de lacase do que os outros fungos testados.

De modo geral, não existe diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre a atividade dos fungos sob alta concentração de seringaldazina (Tabela 16).

Tabela 16.

Análise de variância da atividade enzimática de lacase dos fungos testados sob alta concentração de seringaldazina.

<b>Causas de variação</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>F.</b>	<b>(p)</b>
Tratamento	2	42,103	21,052		
				0,1698	0,8458 *
Resíduo	16	1983,114	123,94		
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>2025,217</b>			

(\*) Não significativo a 5% de probabilidade.

A atividade enzimática de lacase para o fungo FSF7 em meio ágar-malte, quando a este meio utilizou-se uma alta dosagem de indutor (2,5g) (seringaldazina), apresentou uma atividade muito maior para a concentração 3:2. Por outro lado, as demais concentrações as quais utilizou-se uma baixa concentração de seringaldazina (25mg), a atividade enzimática de lacase foi consideravelmente menor, conforme demonstrado na Tabela 17.

Tabela 17.

Média da atividade enzimática de lacase obtida para o fungo FSF7, em diferentes concentrações (glicose/ extrato de levedura).

<b>Fungo/ Contrôlo</b>	<b>Atividade Lacase (U.L<sup>-1</sup>)</b>						
	<b>Glicose (g)/ Extrato de levedura (g)</b>						
	<b>3:2*</b>	<b>3:3</b>	<b>3:4</b>	<b>3:5</b>	<b>2:3</b>	<b>4:3</b>	<b>5:3</b>

<b>FSF7</b>	<b>46,21</b>	<b>3,69</b>	<b>3,69</b>	<b>1,82</b>	<b>1,71</b>	<b>4,11</b>	<b>2,10</b>
-------------	--------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------

\* Alta dosagem de seringaldazina (2,5g).

A figura 17 mostra a atividade/ dia de lacase do fungo FSF7 na concentração 3:2 (glicose/ extrato de levedura) na presença de alta dosagem (2,5g) de seringaldazina. Diferentemente do *P. sanguineus* onde a maior atividade enzimática foi detectada no sétimo dia, para o fungo FSF7, a maior atividade ocorreu no décimo dia, quando a partir de então apresentou flutuação até atingir o décimo quinto dia de atividade.

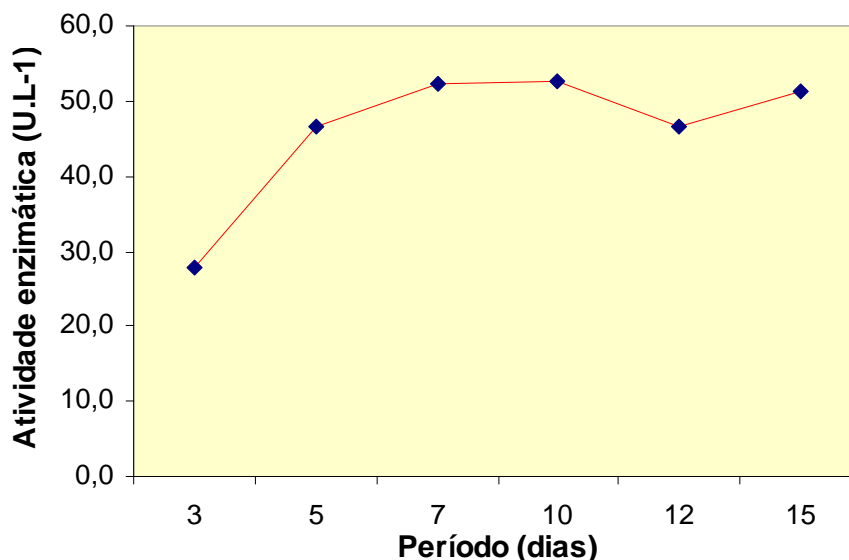


Figura 17. Produção enzimática de lacase para o fungo FSF7 e concentração 3:2 (glicose/ extrato de levedura).

O valor médio da atividade de lacase nas concentrações estudadas (glicose/ extrato de levedura) para o fungo FSF11 em meio ágar- malte, apresentou uma atividade máxima para a concentração (3:2), quando utilizou-se uma alta dosagem de seringaldazina (2,5g). As demais concentrações, apresentaram uma atividade enzimática de lacase menor quando utilizou-se uma dosagem menor de seringaldazina (Tabela 18). Resultado similar ocorreu com os demais fungos (*P. sanguineus* e FSF7), quando foi usado as mesmas dosagens de seringaldazina (Tabela 14 e 15).

Tabela 18.

Valores médios da atividade enzimática do fungo FSF11, em diferentes concentrações (glicose/ Extrato de levedura).

Atividade Lacase (U.L <sup>-1</sup> )							
Glicose (g)/ Extrato de levedura (g)							
Fungo/ Concentração	3:2*	3:3	3:4	3:5	2:3	4:3	5:3
<b>FSF11</b>	<b>43,66</b>	<b>20,56</b>	<b>5,95</b>	<b>7,66</b>	<b>6,58</b>	<b>1,24</b>	<b>8,19</b>

\* Dosagem alta de seringaldazina (2,5g).

Nas mesmas condições de concentração e alta dosagem de indutor, o fungo FSF11 apresentou comportamento similar aos dois fungos mencionados anteriormente, sendo que a sua maior atividade ocorreu no décimo terceiro dia de crescimento (Figura 18). Observou-se uma atividade inicial crescente até o quinto dia, quando a partir de então apresentou pequena diminuição, voltando a crescer e atingir atividade máxima no décimo terceiro dia de cultivo.

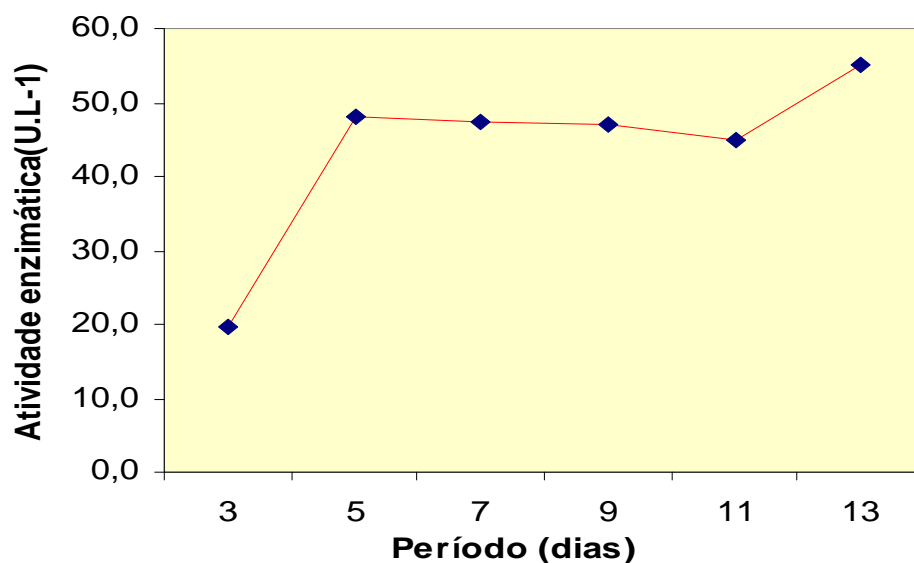


Figura 18. Atividade enzimática do fungo FSF11 em concentração 3:2 (glicose/ extrato de levedura) e alta dosagem de seringaldazina (2,5g).

### 5.2.2 Atividade Enzimática de Lacase com Baixa Dosagem de Seringaldazina

Após o terceiro dia de atividade do fungo *P. sanguineus* na concentração 3:3 e com a diminuição da dosagem do indutor (seringaldazina) do meio de cultura, a produção de lacase diminuiu, consideravelmente (Figura 19).

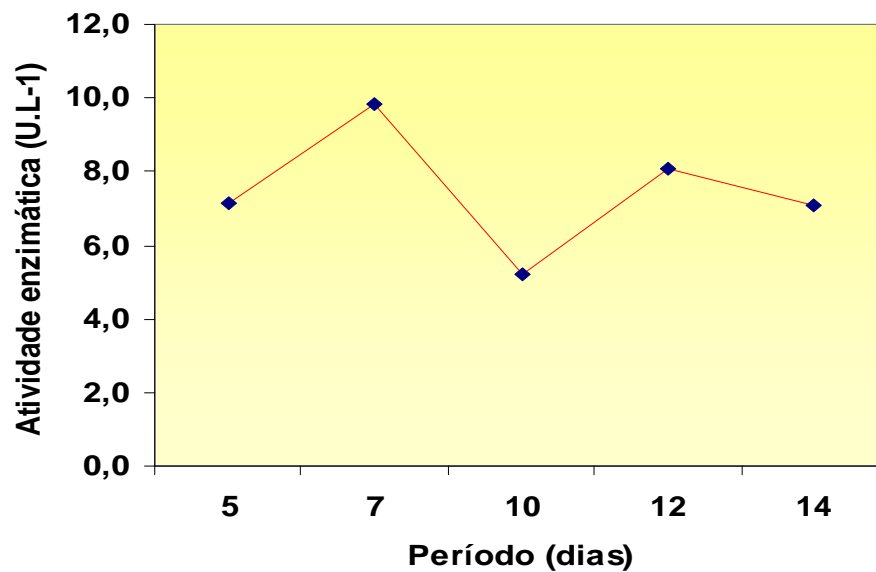


Figura 19. Atividade enzimática do fungo *P. sanguineus*, concentração 3:3 (glicose/ extrato de levedura) e baixa dosagem de seringaldazina (25mg).

No sentido de verificar a existência de diferenças na atividade enzimática do *P. sanguineus* nos diferentes tratamentos/ concentrações, realizou-se o teste ANOVA (tabela 19).

Tabela 19.

Análise de variância da atividade enzimática do *P. sanguineus*.

Causas de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.	(p)
--------------------	------	------	------	----	-----

Tratamento	5	156,15	31,23		
				3,74	0,0099 *
Resíduo	29	242,164	8,351		
<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>398,31</b>			

\* Significativo ao nível  $\alpha = 0,05$  ( $p < 0,05$  significativo)

Ao nível de significância de 5%, o teste ANOVA mostrou haver diferença na atividade enzimática nas diferentes concentrações utilizadas.

Com o intuito de verificar quais concentrações mostravam atividade enzimática diferente, realizou-se o teste de Tukey para comparação de duas médias.

A tabela 20 esquematiza o resultado do teste de Tukey para a comparação das diferentes concentrações. Observa-se que os tratamentos 3:4 e 5:3 mostram-se diferentes estatisticamente ao nível de 5% de significância (tabela 20).

De modo geral, aumentando-se a concentração de glicose e diminuindo-se a de extrato de levedura, obtém-se uma maior atividade enzimática deste fungo.



Teste de Tukey para comparação entre dois tratamentos para o fungo *Pycnoporus sanguineus*.

Concentração	(3:3)	(3:4)	(3:5)	(2:3)	(4:3)	(5:3)
Média	7,47	4,49	8,15	5,57	9,35	10,57
{3:3}	–	–	–	–	–	–
{3:4}	–	–	–	–	–	(*)
{3:5}	–	–	–	–	–	–
{2:3}	–	–	–	–	–	–
{4:3}	–	–	–	–	–	–
{5:3}	–	–	–	–	–	–

\* Significativo ao nível  $\alpha = 0,05$  ( $p < 0,05$  significativo).

A atividade enzimática de lacase para o fungo FSF7 em concentração 3:3, diminuiu drasticamente do terceiro para o quinto dia de atividade. No terceiro dia de atividade, utilizou-se uma alta dosagem de seringaldazina (2,5g), ao passo que a partir do quinto dia de atividade foi utilizado uma baixa dosagem deste indutor (25mg). Do quinto dia para o sétimo a produção enzimática estabilizou-se, vindo a diminuir novamente a quantidades menores até o décimo quinto dia de cultivo (Figura 20).

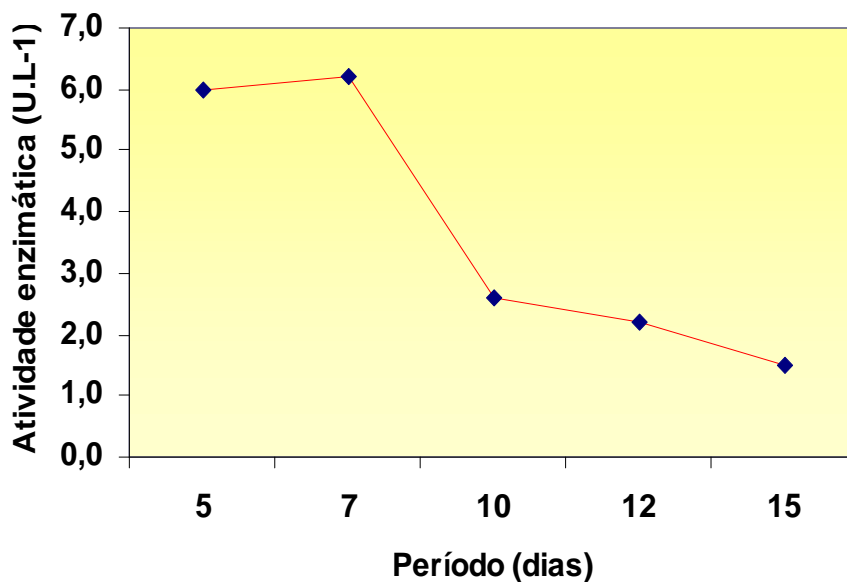


Figura 20. Atividade enzimática de lacase para o fungo FSF7 em concentração 3:3 e baixa dosagem de seringaldazina.

A atividade enzimática de lacase do fungo FSF7 em meio ágar-malte (concentração 3:4) sob agitação apresentou um forte declínio na produção de lacase, do quinto para o sétimo dia de cultivo. A partir do décimo primeiro dia ocorreu novamente um aumento na atividade enzimática (Figura 21).

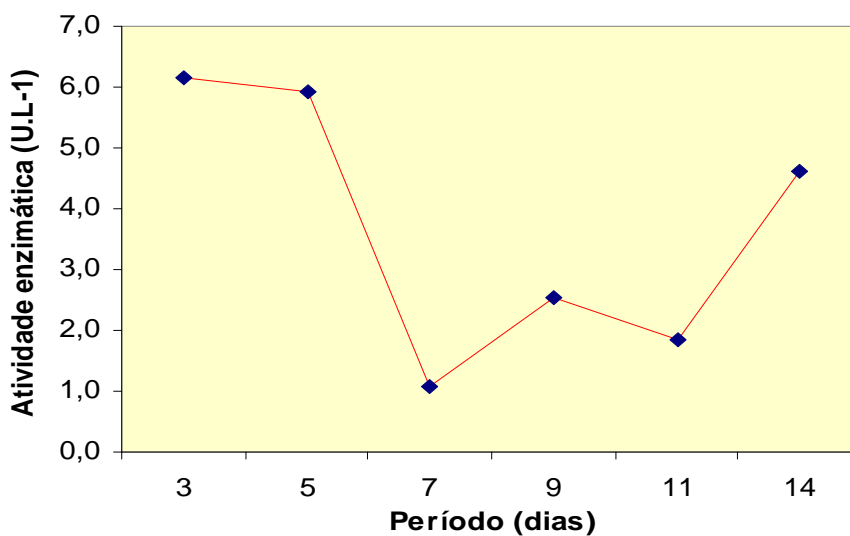


Figura 21. Produção enzimática do fungo FSF7 em concentração 3:4 (glicose/ extrato de levedura) e baixa dosagem de seringaldazina.

Na concentração seguinte (3:5), o evento mais importante ocorreu com um aumento na produção de lacase até o sétimo dia, onde se obteve o pico máximo de atividade, vindo a diminuir verticalmente a produção de lacase do nono dia de cultivo flutuando até o décimo terceiro dia (Figura 22).

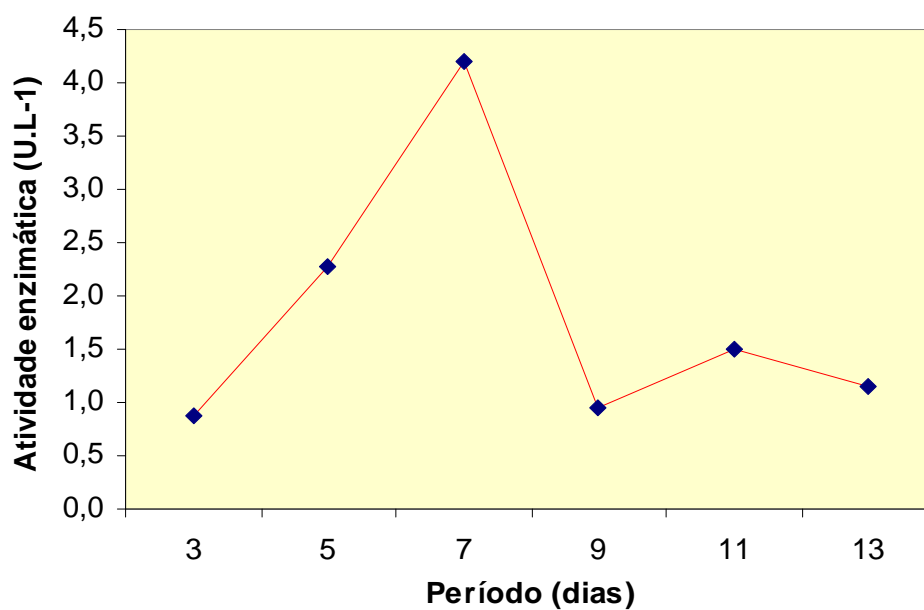


Figura 22. Atividade enzimática de lacase do fungo FSF7 em concentração 3:5 (glicose/ extrato de levedura) em baixa dosagem de seringaldazina.

Por outro lado, na concentração 2:3 observou-se um aumento na atividade enzimática a partir do terceiro dia de atividade, atingindo um pico máximo na produção de lacase no sexto dia, decrescendo novamente até o oitavo dia de cultivo (Figura 23).

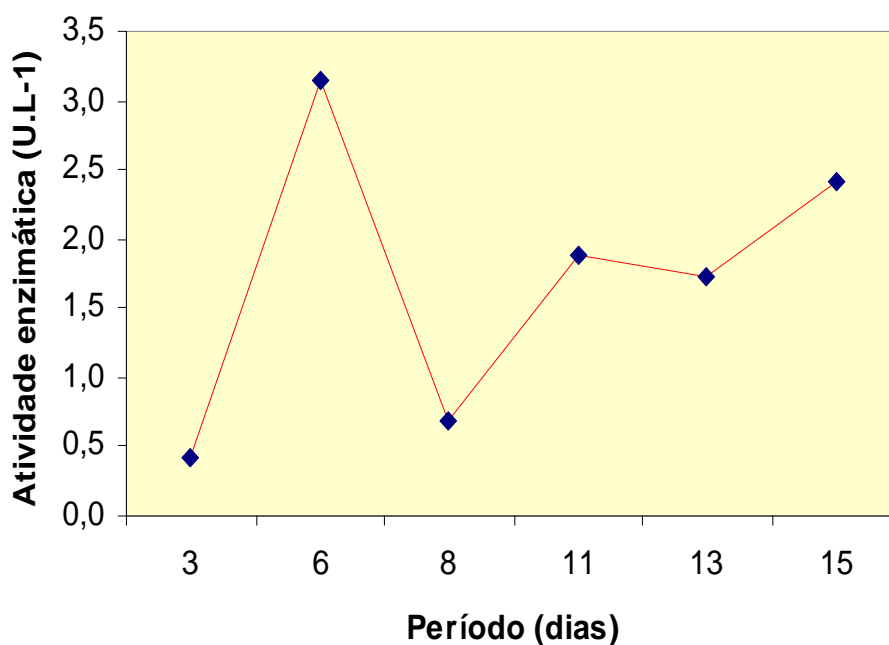


Figura 23. Atividade enzimática de lacase para o fungo FSF7 obtida em baixa dosagem de seringaldazina (25mg) e concentração 2:3 (glicose/ extrato de levedura).

O fungo FSF7 apresentou menor atividade enzimática nas concentrações testadas quando comparado com àquela dos fungos *Pycnoporus sanguineus* e FSF11. Em valores absolutos para o fungo FSF7, a maior atividade enzimática da lacase ocorreu na concentração 4:3. Entretanto, assim como ocorreu para *P. sanguineus*, uma maior taxa de glicose também contribuiu para uma maior atividade enzimática do fungo FSF7.

Com o objetivo de se verificar a existência de diferenças na atividade enzimática nas varias concentrações testadas, realizou-se o teste ANOVA (tabela 21). Ao nível de 5% de significância, o teste mostrou que existe diferença entre os tratamentos. Entretanto, a robustez do teste ANOVA não permitiu verificar através do teste de Tukey essa diferença.

Tabela 21.

Análise de variância para verificar a existência de diferenças na atividade enzimática de lacase para o fungo FSF7.

<b>Causas de variação</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q. M.</b>	<b>F.</b>	<b>(p)</b>
Tratamentos	5	34,993	6,999		
				3,1317	0,0219 *
Resíduos	29	64,809	2,235		
Total	34	99,802			

( \*) Significativo ao nível  $\alpha = 0,05$  ( $p < 0,05$  significativo)

Para a concentração 3:3 (glicose/ extrato de levedura) a atividade enzimática para o fungo FSF11 apresentou um discreto aumento do terceiro até o quinto dia de atividade (maior pico). A partir deste dia, detectou-se uma drástica diminuição na atividade enzimática de lacase até o sétimo dia estabilizando-se até o décimo quinto dia de cultivo (Figura 24).

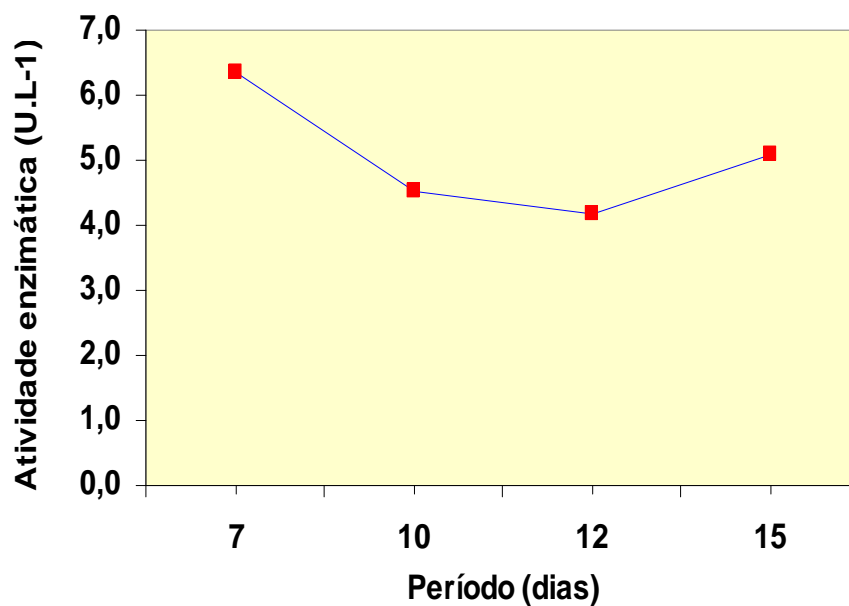


Figura 24. Atividade enzimática de lacase para o fungo FSF11 em concentração 3:3 (glicose/ extrato de levedura) e baixa dosagem de seringaldazina (25mg).

Por sua vez, a concentração 4:3 para o fungo FSF11 em baixa dosagem de seringaldazina, apresentou uma atividade enzimática que oscilou de um dia para outro a partir do terceiro até o décimo quinto dia. O terceiro e quinto dia de atividade caracterizou-se por uma diminuição brusca na atividade enzimática. Ao contrário, após o quinto dia de atividade, registrou-se um considerável aumento na atividade enzimática de lacase, apresentando uma variação cíclica de aumento e decréscimo até o décimo quinto dia. O décimo dia de atividade foi onde se detectou a maior produção de lacase (Figura 25).

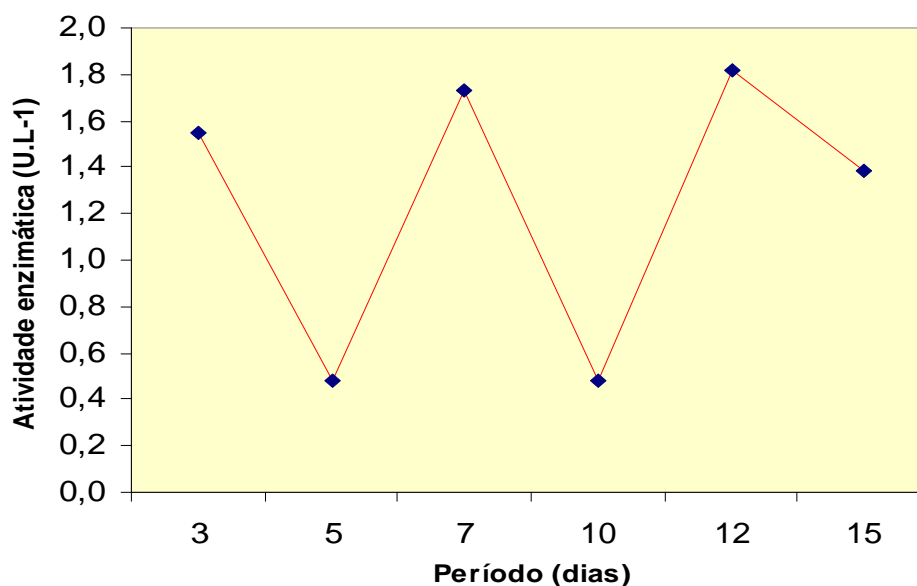


Figura 25. Atividade enzimática do fungo FSF11, concentração 4:3 (glicose/ extrato de levedura) em meio ágar-malte e indutor seringaldazina em baixa dosagem (25mg).

Assim como ocorreu para o *P. sanguineus*, a maior atividade enzimática para o fungo FSF11 ocorreu na concentração 5:3. Por outro lado, observou-se que mantendo constante a taxa de glicose e aumentando-se a de extrato de levedura, obteve-se um aumento na atividade enzimática deste fungo. Comportamento diferente foi, contudo, observado para os outros dois fungos em estudo. Por outro lado, mantendo-se constante a taxa de extrato de levedura e aumentando-se a de glicose, constatou-se uma maior atividade naquela maior taxa de glicose (tabela 22).

O teste ANOVA para verificar a diferença entre os tratamentos evidenciou diferenças significativas a nível de 5% de probabilidade entre eles (tabela 22).

Tabela 22.

Análise de variância para verificação de diferenças entre tratamentos para o fungo FSF11.

<b>Causas de variação</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>F.</b>	<b>(p)</b>
Tratamentos	5	186,108	37,222		
				4,5143	0,0219 *
Resíduos	28	230,865	8,245		
<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>416,973</b>	<b>45,467</b>		

\* Significativo ao nível  $\alpha = 0,05$  ( $p < 0,05$  significativo)



A comparação entre dois tratamentos realizada pelo teste de Tukey (tabela 23) mostrou ao nível de 5% de significância, diferença na atividade enzimática dos tratamentos 2:3 e 4:3, isto é, a taxa de glicose contribuiu para a maior atividade enzimática desse fungo.

Por outro lado, ao nível de 1% de significância, observou diferenças significativas entre as médias do tratamento 3:5 e 4:3, isto é, aumentando-se a taxa de glicose e diminuindo-se a de extrato de levedura levar-se-á a um decréscimo no valor absoluto da atividade enzimática.

Por sua vez, ao nível de 1% de significância, também se detectou diferença estatística entre os tratamentos 4:3 e 5:3. Neste caso, mantendo-se constante a taxa de extrato de levedura e aumentando-se a de glicose, obtêm-se uma maior atividade de lacase desse fungo.

Tabela 23.

Teste de Tukey para comparação entre dois tratamentos para o fungo FSF11.

Concentração	(3:3)	(3:4)	(3:5)	(2:3)	(4:3)	(5:3)
Média	5,03	5,95	7,66	6,58	1,24	8,19
{3:3}		–	–	–	–	–
{3:4}	–		–	–	–	–
{3:5}	–	–		–	(*)	–
{2:3}	–	–	–		(*)	–
{4:3}	–	–	–	–	–	(*)

(\*) Significativo ao nível de  $\alpha = 0,05$  ( $p < 0,05$  significativo).

### 5.3 Comparação entre as Atividades Enzimáticas dos Três Fungos Estudados

Dos três fungos (FSF7, FSF11 e *P. sanguineus*) utilizados neste estudo, o que mais produziu lacase foi o *P. sanguineus*, em relação aos demais.

O fungo FSF7, por sua vez, apresentou um valor médio maior de lacase do que os demais fungos estudados em (concentração 3:2) sob agitação, à 28°C e pH na faixa de 4,3 – 9,0 (Figura 26).

O fungo FSF7 obteve a atividade enzimática máxima de lacase no terceiro dia de cultivo (concentração 3:3). Em contrapartida, apresentou uma produção enzimática de lacase menor do que os demais fungos estudados.

Por outro lado, a menor média de atividade enzimática de lacase obtida em todas as concentrações estudadas, foi detectada pelo fungo FSF11 (concentração 4:3). Todos os valores médios da atividade enzimática de lacase obtidos pelos fungos em estudo, estão demonstrados na tabela 24.

O fungo *P. sanguineus* apresentou um melhor desempenho em pH na faixa de 4,0-6,5 (concentração 3:3), enquanto que o fungo FSF7 se desenvolveu melhor em pH 5,0 (concentração 3:3). O fungo FSF11, por sua vez, obteve um melhor desempenho em pH na faixa de 4,0 – 5,0 e concentração 3:3. Todos os fungos em estudo cresceram em meio líquido ágar-malte sob agitação a 28°C.

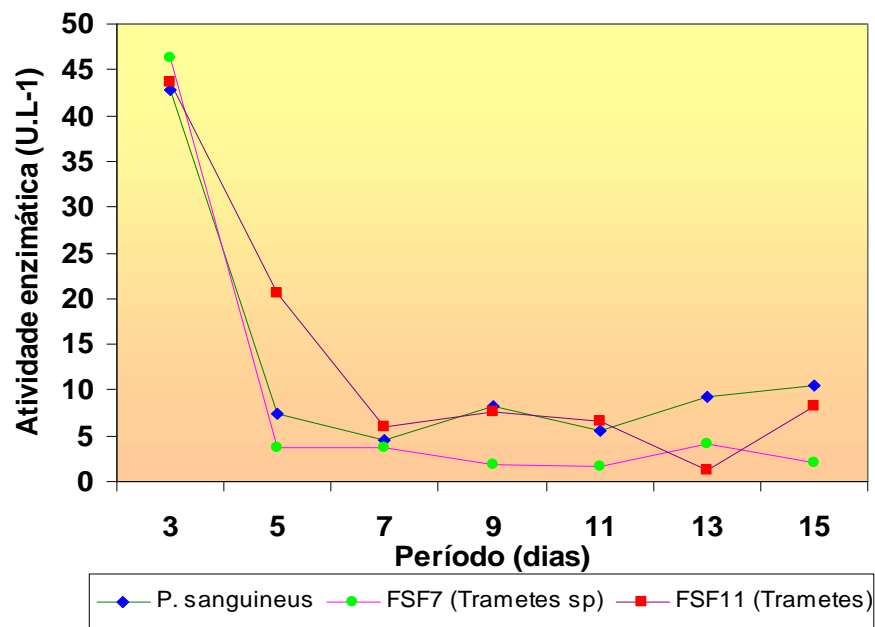


Figura 26. Média da atividade enzimática de lacase, comparativa para os três fungos testados.

Tabela 24.

Atividade enzimática para três fungos amazônicos (*P.sanguineus*, FSF7, e FSF11) em diferentes concentrações de glicose/ extrato de levedura.

Atividade Lacase (U.L <sup>-1</sup> )							
Fungo/ Contrôlo	Glicose (g)/ Extrato de levedura (g)						
	3:2*	3:3	3:4	3:5	2:3	4:3	5:3
<i>P. sanguineus</i>	42,74	7,47	4,49	8,15	5,57	9,35	10,57
FSF7	46,21	3,69	3,69	1,82	1,71	4,11	2,10
FSF11	43,66	20,56	5,95	7,66	6,58	1,24	8,19

(\*) Alta dosagem de seringaldazina.

## 6. DISCUSSÃO

O método utilizado para a mensuração linear das placas de Petri para avaliação do crescimento dos fungos foi considerado um método simples, prático, econômico e seguro, o que nos permite observar além do crescimento, alterações na massa micelial no decorrer das mensurações. A mensuração feita com auxílio de uma régua de metal milimetrada que foi medida do meio (início do inóculo) até a extremidade da placa, onde pode se constatar como um trabalho simples e prático.

### 6.1 Temperatura

De um modo geral, os fungos assim também como as plantas, crescem mais rápido em climas temperados ou quentes do que em climas frios. A taxa de crescimento dos fungos aumenta gradativamente desde temperaturas próximas do congelamento até um intervalo ótimo entre 24 e 32°C. Temperaturas acima de 32°C provoca uma considerável diminuição na taxa de crescimento em fungos de

podridão (RAMIREZ, 2001). Temperaturas acima de 38°C são letais para a maioria dos fungos (ESLYN & CLARK, 1979).

Segundo Ferraz (1991) a velocidade de crescimento apresenta certa variabilidade numa mesma condição de cultivo daí a necessidade de se conduzir um experimento em condições padronizadas.

O fungo FSF7 apresentou uma velocidade de crescimento maior em relação aos demais (FSF11 e *P. sanguineus*), a uma temperatura entre 25°C e 30°C, com uma temperatura ótima de 28°C. Os fungos amazônicos mostram um padrão de crescimento crescente à medida que aumenta a temperatura, compatível com o que já está documentada na literatura científica. Esta observação está baseada no fato de que, quando a temperatura aumenta, em geral, há um aumento na atividade enzimática, pela colisão que ocorre entre as moléculas da enzima e substrato resultando na formação de mais produto (MOORE-LANDECKER, 1982).

## 6.2 Influência do pH.

O pH ótimo de lacase é altamente dependente do substrato utilizado para determinação do crescimento do fungo e de sua atividade.

O crescimento dos fungos pode ser afetado pelo grau de acidez ou alcalinidade do substrato. Em geral, os fungos se desenvolvem em materiais que são ligeiramente ácidos, com pH entre 4,5 e 5,5, como é normal nas madeiras.

Barbosa (1997) explica que os fungos de podridão branca apresentam melhor crescimento em pH ácido em torno de 4,0 e 5,0. Entretanto, algumas espécies apresentam crescimento similar em meios de cultivo alcalino, semelhante aos meios ácidos, fato também observado pelo autor citado em seus experimentos.

Beux (1995), assim como Faria (2003), também pode observar em seus experimentos que *L. edodes* apresenta crescimento em meios de cultura com valores de pH ácidos e básicos, mais que a velocidade de crescimento aumentou em valores de pH em torno de 4,5 e 5,7.

Segundo Srivastava e Bano (1970), (Zadrazil 1978 apud Santos, 2000), algumas espécies de fungos possuem uma característica auto-reguladora do pH do

substrato, ou seja, a tendência é de que se estabilize no valor do pH ótimo, independentemente do valor de pH inicial. Isto ocorre dependendo do substrato e do microrganismo em estudo. Os fungos de podridão produzem geralmente quantidades apreciáveis de ácidos orgânicos, como resultado de seu crescimento, que tende a aumentar a acidez do substrato em que se desenvolvem (FINDLAY, 1967).

No caso dos fungos FSF7 (*Trametes sp*), FSF11 (*Trametes sp*) e *Pycnoporus sanguineus*, o crescimento micelial mais significativo para ambos os fungos foi observado quando o pH do meio estava na faixa de 5,5 a 7,5. Houve então um pequeno aumento desta faixa de pH em relação ao pH inicial que foi de 5,5. Com este resultado, verifica-se que o pH têm influência no crescimento micelial onde vários fungos preferem um pH pouco ácido para se desenvolverem. Para ambos os fungos, o pH ótimo foi de 6,4.

### **6.3 Influência da Biotina no Crescimento Micelial**

O equilíbrio de fontes de C., N., P., vitaminas e micronutrientes na composição do meio de cultura, são fatores decisivos para o crescimento e esporulação dos microrganismos, notadamente o tipo e a concentração de fontes de C e N. Muitos microrganismos pouco exigentes, podem crescer em meios de cultura com composição sintética simples, porém numerosos microrganismos necessitam de um ou mais micronutrientes, vitaminas ou outros compostos.

No presente estudo a suplementação do meio BDA com glicose como fonte de carbono, acrescido de biotina, em 6 diferentes concentrações, resultou em um avanço da fronteira micelial maior, principalmente no caso do fungo FSF7, o qual apresentou um crescimento bastante satisfatório em relação aos demais e quando comparado também com os fungos semeados em meio BDA sem biotina, os quais tiveram um crescimento micelial mais lento.

Os fatores de crescimento se relacionam aos metabólitos essenciais que certos microrganismos são capazes de sintetizar, porque não possuem enzima ou

ciclos metabólitos para isto. Por outro lado, alguns microrganismos como algumas espécies de bactérias, não necessitam de qualquer fator de crescimento.

Quando fatores de crescimento são necessários, estes geralmente são do grupo de vitaminas do complexo B ou substâncias relacionadas a este, de certos aminoácidos ou, às vezes, certos ácidos graxos.

No presente estudo, a concentração de biotina exerce influência no crescimento micelial especialmente para o fungo FSF7. Para este fungo, uma baixa concentração (30 mcg) de biotina contribui para o crescimento micelial que, em média, obteve 31mm contra 6,7mm em meio com ausência dessa vitamina.

Da mesma maneira ocorreu para os demais fungos testados. SILVA et al. (1999) suplementaram o meio com vitaminas + glicose + NH<sub>4</sub> Cl e constataram um crescimento micelial semelhante com as vitaminas biotina e piridoxina para o fungo *Alternaria alternata*.

Ressalta-se que a biotina exerce um efeito antagônico para a produção, por exemplo, do ácido glutâmico. Alguns melaços não podem ser usados como fonte de carbono para a produção do ácido glutâmico devido estes apresentarem uma alta concentração de biotina (LEVANON, 1990).

#### **6.4 Produção Enzimática**

Os fungos testados produziram atividade de lacase durante todo o período de cultivo em meio líquido sob agitação. A presença da maior concentração de siringaldazina influenciou a produção da atividade de lacase pelos referidos fungos.

A maior produção de lacase para os fungos testados ocorreu durante o metabolismo primário no sétimo dia de atividade. Segundo Ferreira (2003), a atividade máxima de lacase foi obtida no nono dia de atividade para o fungo *Trametes sp* utilizando dextrose como fonte de carbono. Utilizando *H. creptans* como fonte de carbono, a autora obteve uma produção máxima de lacase no décimo sexto dia, constituindo-se, portanto, em uma atividade enzimática máxima em um período de tempo maior. Por outro lado, utilizando dextrose como fonte de carbono para o *Pycnoporus sanguineus* foi obtido uma atividade máxima no décimo sexto dia de

atividade. Utilizando serragem de madeira de *H. creptans* como fonte de carbono para o mesmo fungo, foi obtido uma produção máxima de lacase no décimo quarto dia de atividade.

PAPPINUTI et al. (2001) observaram aumento da atividade de lacase para *Fomes sclerodermeus* até o décimo oitavo dia de crescimento desse fungo. O aumento da atividade de lacase em *Fomes sclerodermus* durante o metabolismo primário evidenciou que essas enzimas não são metabólitos secundários, mas parecem ser dependentes do crescimento fungico (PAPPINUTI et al. (2001). RODRIGUEZ et al. (2004) descreveram que, em contraste com *Phanerochaete crysosporium*, quatro espécies do gênero *Pleurotus* (*P. eryngii*, *P. ostreatus*, *P. pulmonaris* e *P. sajor-caju*) expressaram o sistema ligninolítico durante a fase de crescimento primário, e ainda a produção de enzimas ligninolíticas não foi inibida por altas concentrações de nitrogênio. *Ceriporiopsis subvermispora* e *Lentinus trigrinus* também produziram lacase e MnP durante todo o período de cultivo (LOBOS et al. 1994; LECHENER & PAPPINUTI, 2006). No meio com glicose como principal fonte de carbono, a produção de lacase por *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes sp* somente começou quando a glicose foi consumida do meio de cultura, uma característica também demonstrada por Galhaup et al. (2002), para o fungo *Trametes pubescens*. Galhaup et al. (2002b), mostrou que em *T. pubescens* quando a glicose está presente acima de certas concentrações, a síntese de lacase é inibida. A inibição da glicose em fungos e leveduras é grandemente conhecida e acredita-se que a glicose pode inibir ou induzir os genes de produção enzimática (RONNE, 1995).

Foi demonstrado em *Trametes versicolor* que ocorreu uma produção significativa de lacase a partir do quarto dia de cultivo, com atividades variando entre 100 e 500 U/L. A sua produção foi fortemente dependente da concentração inicial de glicose do meio de cultivo. As maiores atividades de lacase (entre 600 e 650 U/L) foram obtidas a partir do sétimo dia de atividade, quando a glicose não estava presente no meio de cultura, ou seja, em condições de limitação por carbono (TAVARES, 2006).

Outro fator importante é a agitação ou não do meio durante a produção da enzima. Enquanto que para *Phlebia radiata* a agitação reprimiu a produção de



lacase (NIKU-PAAVOLA et al., 1990), para *P. sanguineus* CY788 os melhores resultados foram obtidos com agitação (POINTING et al., 2000). O presente estudo com os fungos testados foi realizado em meio líquido somente sob agitação.

TERRON et al., (2004) observaram aumento da produção de lacase por *Trametes sp.* I-62 com a adição de diversos compostos fenólicos (ácido *p*-cumárico, ácido ferrúlico, guaiacol, siringol, *p*-metoxifenol, pirocatecol, ácido 3,5-dihidroxibenzóico e siringaldazina). Os resultados deste estudo demonstraram que estes compostos aromáticos parecem ter efeitos diferentes tanto na atividade de lacase quanto na expressão de genes desta enzima por *Trametes sp.* Muitos isômeros de xilidinas (dimetilanelinas, utilizadas como corantes na indústria) e pentaclorofenol atuam como indutores de lacases (LUTAREK et al., 1997; JUNG et al., 2002; KOLLMANN et al., 2005).

No caso dos fungos em estudo, observou-se uma expressiva indução da siringaldazina, constituindo-se como um elemento vital na atividade enzimática de lacase. Posteriormente, após a redução de siringaldazina como elemento indutor do meio de cultura, ocorreu uma acentuada redução na produção de lacase, demonstrando que uma quantidade maior de siringaldazina exerce uma relação linear e positiva na produção daquela enzima.

No presente estudo, os maiores picos de atividade enzimática de lacase foram obtidos em menos tempo (dias) em relação aos resultados observados por Ferreira (2003) trabalhando com os mesmos fungos, mesmo quando a dosagem de siringaldazina estava baixa, e a produção média de lacase obteve resultados maiores, utilizando dextrose como fonte de carbono.

Estudos mostram que a atividade enzimática de lacase está na dependência tanto da fonte de carbono quanto na fonte de nitrogênio e a sua produção também pode ser estimulada pela adição de Cu (II) em concentração milimolar ao meio de cultura em presença de glicose (GALHAUP et al., 2002).

A instabilidade das enzimas ligninolíticas pode ser atribuída a vários fatores tais como desnaturação por valores muito baixos de pH (BONOMO et al., 2001; KEUM & Li, 2004), degradação por proteases (STASZCZAK et al., 2000; PALMIERI et al., 2000), desnaturação irreversível pela exposição prolongada a radicais produzidos pelas enzimas (LI et al., 1999) e inativação por substâncias húmicas e

fúlvicas formadas durante a degradação de substratos ligninocelulósicos (AHN et al., 2002; KEUM & LI, 2004).

## 7. CONCLUSÃO

Em relação aos resultados obtidos, conclui-se que:

- Os fungos FSF7, FSF11 e *Pycnoporus sanguineus* em meio BDA na presença

de biotina, apresentaram um crescimento micelial mais rápido e maior quando comparado ao crescimento destes sem biotina (contrôle).

- A maior média de crescimento micelial foi obtida quando se utilizou a concentração 120 mcg de biotina para o fungo *Pycnoporus sanguineus*.
- O fungo FSF7 obteve a maior média de crescimento micelial de todas as concentrações em relação aos demais fungos estudados e o FSF11 a menor média.
- A produção enzimática de lacase aumentou significativamente quando se utilizou uma concentração maior de seringaldazina.
- A concentração 5:3 (glicose/ extrato de levedura) para o fungo *Pycnoporus sanguineus* apresentou a maior média de atividade enzimática de lacase em relação às demais concentrações.

## 8. PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar ensaios *in vitro* de limpezas de materiais domésticos pelas lacases de fungos amazônicos;
- ❖ Expedir laudos periciais na distinção entre drogas, através de biossensores de lacase;
- ❖ Tratamento limpo de efluentes da indústria química e farmacêutica, isto é, sem a produção de radicais tóxicos reativos no meio ambiente;
- ❖ Escolha de indutores que aumente a produção de lacase em escala industrial;

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINELLI, E.; CERVONI, L. A.; GIARTOSIO, A. & MORPURGO, L. Stability of Japanese-lacquer-tree (*Rhus vernicifera*) laccase to thermal and chemical denaturation: comparison with ascorbate oxidase. **Biochemical Journal**, 1995. v. 306, p. 697-702.

AHN, M. Y.; DEC, J.; KIM, J. E. & BOLLAG, J. M. Treatment of 2,4-dichlorophenol Polluted Soil with Free and Immobilized Laccase. **Journal of Environmental Quality**, 2002. v. 31, p. 1509-1515.

AKHTAR, M.; KIRK, T. K. e BRANCHETTE, R. A. **Em Biotechnol. In the Pulp and Paper Industry: Recent Adv. In Appl. And Fundam. Res.** (Fuacultas-Universitatsverlag, Atria Publ.). 187p (1996).

AKHTAR, M., BRANCHETTE, R.; KENT, T. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, “ **Fungal Delignification and Biomechanical Pulping or wood**”. vol. 57: p. 159-195.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C. W.; BRACKWELL, M. **Introductory Mycology 4<sup>a</sup> ed.** New York: John Wiley & Sons, 1966. 869b p.

ALEXOPOULOS, J. **Introducción a la micología.** Buenos Aires, 1966. Editorial Universitaria. 568 p.

AMITAI, G.; ADANI, R.; SOD-MORIAH, G. RABINOVITZ, I.; VINCZE, A.; LEADER, B.; CHEFETZ, L.; LEIBOVITZ-PERSKY, D.; FRIESEM & Y. HADAR. Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase, 1998. **FEBS Letter**, 438: p. 195-200.

ANAGNOST, S. E. **Light microscopic diagnosis of wood decay.** **Iawa Journal**, 1998. v. 19, n. 2, p. 141-167.

BARBOSA, A. M. et al., **In vivo decolorization of poly R-478 as a method for screening ligninolytic microorganisms for use in bioremediation.** Proc. 4<sup>a</sup> Pacific Rim Biotechn. Conference. Melbourne, Australia, 1995. p. 88-90.

BARBOSA, A. M. et al., **Veratryl alcohol as an inducer of laccase by the ascomycete *Botryosphaeria sp.*, when screened on polymeric dye poly R-478.** Lett. Appl. Microbiol., Oxford, 1996. v. 23, p. 93-96.

BEUX, M. R. **Biotransformação de resíduos agroflorestais do Estado do Paraná no cultivo do fungo saprófita comestível *Lentinula edodes*. (SHIITAKE).** 1995. 130 P. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BLANCHETE, R. A. Delignification by Wood-Decay Fungi. **Annu Rev. Phytopathol.**, 1991. v. 29, p. 381-398.

BLANCHETTE, R. A. Degradation of the lignocellulose complex in wood. **Can. Journal Bot.**, 1995. v. 73 (suppl.), p. 999-1010.

BONOMO, R. P.; BOUDET, A. M.; COZZOLINO, R.; RIZZARELLI, E.; SANTORO, A. M. & STERJIADIS, R. A comparative study of two isoforms of laccase secreted by the "white-rot" fungus *Rigidoporus lignosus*, exhibiting significant structural and functional differences. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 1998. v. 71, p. 205-211.

BONOMO, R. P.; CENNAMO, G.; PURRELLO, R.; SANTORO, A. M. & ZAPPALA, R. Comparison of three fungal laccases from *Rigidoporus lignosus* and *Pleurotus ostreatus*: correlation between conformation changes and catalytic activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2001. v. 83, (1), p. 67-75.

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

BOURBONNAIS, R. & PAICE, M. G. Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. **TAPPI Journal**, 1996. 79: p. 199-204.

BROWN, M. A.; ZHAO, Z. & MAUK, A. G. Expression and characterization of a recombinant multicopper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. **Inorganica Chimica Acta**, 2002. v. 331, p. 232-238.

BURNS, P. J.; YEO, P.; KESHAVARZ, T.; ROLLER, S.; EVANS, C. S. Physiological Studies of exopolysaccharide production from basidiomycetes *Pleurotus sp*, Flórida, effect of C and N souce on polysaccharide production for potencial as a hypocholesterolemic, antitumor and a fat mimetic. **Enzyme Microbiology Technology**, 1994. n. 34, p. 566-572.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T. Ligninolytic enzyme production and secretion in edible mushroom fungi. In **International Conference Mushroom Biology and Mushroom Products**, 2, 1996. Pennsylvania. Proceedings.: Pennsylvania, 1996. p. 113-122.

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

CASTRO E SILVA, A.; SILVA, M. B. C.; CAVALCANTI, M. A. **Fungos: O inexplorado potencial enzimático da biodiversidade amazônica**. 2002. Disponível em: <<http://www.geocities.com.br/biodiversidade2002/fungos>>. Acesso em 12/03/2006.

CHEN, Y. R. E SCHMODT, E. L. **Wood Fiber Sci**, 1995. v. 27, 198p.

CLAUS, H. **Laccases**: structure, reactions, distribution. *Micron.*, 2004. 35: p. 93-96.

COELHO, G. D.; CHU, E. P. & MACHADO, K. M. G. Purificação parcial e caracterização da lacase produzida por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo (Resumo) **Anais do V Congresso Latino Americano de Micologia**, Brasília-DF, 2005. p. 249.

DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botrosphaeria sp.* **Enzyme Microb. Technol.**, New York, 2001. v. 28, p. 81-88.

DEL POZO, C. E PARRA, P. **Durabilidad natural**. Análisis de algunos factores establecidos en la norma americana (ASTM) e en la norma británica (BS). Tesis Universidad de Chile, 1984. 117 p.

D' SOUZA, T. M.; MERRITT, C. S. & REDDY, C. A. Lignin-Modifying Enzymes of the white-rot Basidiomycete *Ganoderma lucidum*. **Applied and Environmental Microbiology**, 1999. v. 65, n. 12, p. 5307-5313.

DITTMANN, J.; HEYSER, W.; BUCKING, H. Biodegradation of aromatic compounds by white rot and ectomycorrhizal fungal species and the accumulation of chlorinated benzoic acid in ectomycorrhizal pine seedlings. **Chemosphere**, 2002. v. 49, n. 3, p. 297-306.

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

DUCROS, V.; BRZOZOWSKI, A. M.; WILSON, K. S.; OSTERGAARD, P.; SCHNEIDER, P.; SVENDSON, A. & DAVIES, G. J. The structure of laccase from *Coprinus cinereus* at 1.6. A resolution evidence for different type 2 Cu-depleted isoforms. **Acta Crystallogr. D57**, 2001. p. 333-336.



DURÁN, N. E MACHUCA, A. HOLZ ALS ROH-UND WERSTOFF, 1995. v. 53, 346 p.

DURÁN, N.; ESPÓSITO, E. **Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos.** In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.; (Eds). Microbiologia ambiental. Jaguariúna: Embrapa - CNPMA. Documentos, 1997. v. 11, p. 269-292.

DURÁN, N. E ESPÓSITO, E. In **Microbiologia Ambiental** (I.S. De Melo and J. L. De Azevedo, Eds.) EMBRAPA Publ., 1997. p. 268-292.

DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D' ANNIBALE, A. & GIANFREDA. Applications of laccases and tyrosinases (Phenoloxidases) immobilized of different supports: **A review. Enzyme and Microbial Technology**, 2002. 31(7): p. 907-931.

EGGERT, C.; TEMP, U.; DEAN, J. F. D. & ERIKSSON, K. L. Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid. **FEBS Letters**, 1995. n. 376, p. 202-206.

EGGERT, C; TEMP, U. & ERIKSSON, K.. E. L. The lignolytic system of the white- rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* : purification and characterization of the laccase. **Applied and Environmental Microbiology**, 1996b. n. 62, v. 4, p. 1115-1158.

ENGUITA, F. J.; MARTINS, L. O.; HENRIQUES, A. O. & CARRONDO, M. A. Crystal Structure of a Bacterial Endospore Coat Component. A laccase with enhanced thermostability properties. **The Journal of Biological Chem.**, 2003. 278(21): p. 19416-19425.

ERIKSSON, K. E. L. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. **Wood Sci Technol.**, 1990. v. 24, p. 79-101.

ESLYN, W. and CLARK, J. **Wood bridges. Decay Inspection and Control.** U. S., Dep. Agric. Handb., 1979. n. 557, 32 p.

ESPINOSA, R. E CABRERA, S. Protein from waste. **Chemtech**, 1976. p. 636-642.

FABBRINI, M.; GALLI, C. & GENTILI, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2002. v. 16, p. 231-240.

FAN, LEIFA et al. **Efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de biomassa de *Agaricus blazei* LPB03 em fermentação submersa.** VII Encontro Regional Sul de Ciências e Tecnologias de Alimentos, Paraná, 2001.

FERRAZ, ANDRÉ. **Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos.** In: Espósito, Elisa; Azevedo, João Lúcio. (Org.) *Biologia de fungos*. Caxias do Sul. 2004. p. 215-242.

FINDLAY, W. **Timber pests and Diseases.** Pergamon Press. 1º Edición. London, England, 1967. 280 p.

GARZILLO, A. M. V.; Di PAOLO, S.; BURLA, G. And BUONOCORE, V. Differently-induced extracellular phenol oxidases from *Pleurotus ostreatus*. **Phytochemistry**, 1992. v. 31, p. 3685-3690.

GONZALEZ, J.; CARMONA, R. El Biopulpaje, una alternativa para coníferas. El papel. **Revista de la Industria Papelera para España y América Latina**, 2000, n. 84, 1998.

GONZALEZ, J.; DONOSO, J. Biopulping in Radiata pine and Eucalyptus globulus. **32º Congresso Annual de Celulosa y Papel. ABTCP.** São Paulo, Brasil. 1999.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**, 2º ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 458 p.

HABETS, L. H.; KNELISSEN, H. J. In Line Biological water regeneration in a zero discharge recycle paper mill. **Water Science and Technology**, 1997. v. 35, n. 2-3, p. 41-48.

HAMLYN, P. F. Fungal biotechnology. **British Mycol. Soc. New letter** 3, 1998. p. 45-56.

HARAZONO, K.; KONDO, R. e SAKAI, K. **Kami Pa Gikyoshi**, 1996a. v. 50, 697 p.

HARAZONO, K.; KONDO, R e SAKAI, K. **Appl. Environ. Microbiol.**, 1996b. v. 62, 913 p.

HARPER, H. A.; RODWELL, V. W. & MAYES, P. A. **Manual de Química Fisiológica**, 1982. 5° ed. 736 p

HASSEGAWA, R. H. **Produção de micélio e atividade antibacteriana de *Lentinula edodes***. 1998. 35 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

HATAKKA, A. Lignin-Modifying Enzymes from Selected White- Rot Fungi: Production and Role in Lignin Degradation. **FEMS Microbiological Reviews**, 1994. v. 13, p. 125-135.

HEINZKILL, M.; BECH, L.; HALKIER, T.; SCHNEIDER, P. & ANKE, T. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (Family *Coprinaceae*). **Applied and Environmental Microbiology**, 1998. 64 (5): 1601-1606.

HOFF, M. **Spectrum**, 1996. v. 2, n. 3.

HOFRICHTER, M.; VARES, T.; KALSI, M.; GALKIN, S.; SCHEIBNER, K.; FRITSCH, W. & HATAKKA, A. Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of <sup>14</sup>C-labelled lignin (<sup>14</sup>C-DHP) during solidstate

fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. **Applied and Environmental Microbiology**, 1999. v. 65, p. 1864-1670.

IIMORE, T.; YOSHIKAWA, H.; KANEKO, R.; MIYAWAKI, S.; MACHIDA, M. E MURAKAMI, K. **Mokuzai Gakkaishi**, 1996. v. 42, 313 p.

JORDAAN, J. & LEUKES, W. D. Isolation of a thermoestable laccase with DMAP and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic white-rot fungus. **Enzyme and Microbial Technology**, 2003. v. 33, p. 212-219.

JORDAAN, J.; PLETSCHKE, B. I. & LEUKES, W. D. Purification and partial characterization of a thermostable laccase from an unidentified basidiomycete. **Enzyme and Microbial Technology**, 2004. v. 34, p. 635-641.

JUNG, H.; XU, F. & LI, K. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. **Enzyme and Microbial Technology**, 2002. v. 30, p. 161-168.

KANEKO, R.; LIMORI, T.; MIYAWAKI, S.; MACHIDA, M. e MURAKAMI, K. **Biosci. Biotech. Biochem.**, 1995. v. 59, 1584 p.

KANEKO, R.; IIMORE, T.; YOSHIKAWA, H.; MACHIDA, M.; YOSHIOKA, H e MURAKAMI, K. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho** JP 08116968, 1996.

KANTELINEN, A.; HORTLING, B.; RANUA, M. e VIKARI, L. **HOLZFORSCHUNG**, 1993. 47, 29.

KATASE, T. and BOLLAG, J. M. **Soil Science**, 1991. v. 151, p. 291-296.

KEUM, Y. S. & Li, Q. X. Popper dissociation as a mechanism of fungal laccase denaturation by humic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2004. v. 41, p. 588-592.

KIRK, T. K.; FARREL, R. L. Enzymatic Combustion: The microbial degradation of lignin. **Annu Rev. Microbial**, 1987. v. 41, p. 465-505.

KLONOWSKA, A.; GAUDIN, C.; FOURNEL, A.; ASSO, M.; PETIT, J. L.; GIORGI, M. & TRON, T. Characterization of a low redox potencial laccase from the basidiomycete C30. **European Journal of Biochemistry.**, 2002. v. 269, p. 6119-6125.

KOLLMANN, A.; BOYER, F. D.; DUCROT, P. H.; KERHOAS, L.; JOLIVALT, C.; TOUTON, I.; EINHORN, J. & MOUGIN, C. Oligomeric compounds formed from 2,5-xylydine (2,5-dimethylaniline) are potent enhancers of laccase production in *Trametes versicolor* ATCC 32745. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2005. v. 68, p. 251-258.

KONDO, R.; HARAZONO, K. e SAKAI, K. Appl. **Environ. Microbiol.**, 1994. v. 60, 4359 p.

KONDO, R.; TSUCHIKAWA, HARAZONO, K. e SAKAI, K. Em Biotechnol. In the Pulp and Paper Industry: Recent Adv. In Appl. And Fundam. Res. **(Fucultas-Universitatsverlag, Austria Publ.)**, 1996. v. 33.

KOTTERMAN, M.; E. HEESSELS; E. JONG & J. A. FIELD. The physiology of anthracene biogradation by the white rot fungus *Bjerkandera sp.* Strain BOS55. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1994. v. 42, p. 179-186.

KUMAR, S. V. S.; PHALE, P. S.; DURANI, S. & WANGIKAR, P. P. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. **Biotechnology Bioengineering**, 2003. v. 83, p. 386-394.

LACAZ, C. L. et al.; **Tratado de Micologia Médica**. 9ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LECHNER, B. E. & PAPINUTTI, V. L. Production of lignocelulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw. **Process Biochemistry**, 2006. 41: p. 594-598.

LEONOWICZ, A. et al. Fungal laccase: Properties and Activity on Lignin. **Journal Basic. Microbiol.**, Berlim, 2001. v. 41, p. 185-227.

LEVANON, Y. Biotecnologia. Caderno 1. Faculdade de Engenharia Química de Lorena. São Paulo, Lorena, 1990.

LI, K.; XU, F. & ERIKSSON, K. E. L. Comparison of Fungal Laccases and Redox Medoators in Oxidation of a Nonphenolic Lignin Model Compound. **Applied and Environmental Microbiology**, 1999. v. 65, n. 6, p. 2654-2660.

LOBOS, S.; LARRAIN, J.; SALAS, L.; CULLEN, D. & VICUNA, R. Isozymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. **Microbiology**, 1994. v. 140, p. 1691-1698.

LUTEREK, J.; GIANFREDA, L.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; ROGALSKI, J.; JASTEK, M. & MALARCZYK, E. Screening of the wood-rotting fungi for laccase production: Induction by ferulic acid, partial purification, and immobilization of laccase from the high laccase-producing strain. *Cerrana unicolor*. **Acta Microbiologica Polonica**, 1997. 46: 297-311.

MAGNUS, K. A.; TON-THAT, H.; and CARPENTER, J. E. In **Bioinorganic Chemistry of Copper**, Karlin, K. D.; Tyklar, Z.; Eds. Chapman & Hall, New York, 1993. p. 143.

MATHEUS, D. R.; OKINO, L. K. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. Em. V. L. R. BONONI (org.). *Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos. Noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*. São

Paulo: **Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente**, 1998. 184 p.

MAYER, A. M. STAPLES, R. C. **Lacase: New functions for an old enzyme phytochemistry**, 2002. v. 60, p. 551-565.

MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V. L.. R. Screening of basidiomycetes for other production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista de Microbiologia**, 1998. v. 30, p. 77-84.

MESSERSCHMIDT, A. Multi-copper oxidases. London: **World Scientific**, 1997.

MESSNER, K. **Forest Products Biotechnology**. Edit by Bruce, A. and Palfreyman, j. Chapter 3: Biopulping: 63-82 p. Taylor & Francis Publishers. Scottish Institute for Wood Technology. University of Abertay Dundee, Scotland. UK, 1998. 326 p.

MICHEL, F.C.; DASS, B.; GRULKE, E. A. et al. Role of manganese peroxidases and lignin peroxidases of *Phanerochaetes chrysosporium* in the decolorization of craft bleach plant effluent. **Appl. Env. Microbiol.**, 1991. 57(8) : 2368-2375.

MINUSSI, R. C.; PASTORE, G. M. & DURÁN, N. Potential applications of laccase in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, 2002. 13 (6-7): p. 205-216.

MOREY, P. R. O crescimento das árvores. São Paulo. **Coleção Temas de Biologia**, 1980. v. 12.

MOUGIN, C.; JOLIVALT, C.; BRIOZZO, P. & MADZAK, C. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. **Environmental Chemistry Letters**, 2003. v. 1, p. 145-148.

NIKU-PAAVOLA, M. L; KARHUNEN, E; KANTELINEN, A; VIIKARI, L; LUNDELL, T. & HATAKKA, A. The effect of culture conditions on the production of lignin modifying

enzymes by the white-rot fungus *Phebia radiata*. **Journal of Biotechnology**, 1990. v. 13, p. 211-221.

NILSSON, T. Defining fungal decay types – final proposal. In: ANNUAL MEETING, 19., Madrid, 1988. **Proceedings**. Stockholm: The International Research Group on Wood Preservation (IRG/WP/1355), 1988.

PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; BIANCO, C.; SCALONI, A.; CAPASSO, A. & SANNIA, G. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Biological Chemistry**, 1997. v. 50, p. 31301- 31307.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; MOHAN, R.; ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, 2000. v. 6, p. 153-162.

PAPINUTTI, V. L.; DIORIO, L. A. & FORCHIASSIN, F. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2001. v. 30, p. 157-160.

PARK, S. H.; LIM, S. T.; SHIN, T. K.; CHOI, H. J.; JHON, M. S. Viscoelasticity of biodegradable polymer blends of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (ethylene oxide). **Polymer**, 2001. v. 42, p. 5737-5742.

PAULI, G. **Emissão Zero: a busca de novos paradigmas: o que os negócios podem oferecer à sociedade**. EDIPUCRS, Porto Alegre, 1996. 312 p.

PAZARHOGLU, N. K.; SARIISIK, M. & TELEFONCU, A. Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. **Process Biochemistry**, 2005. v. 40, p. 1673-1678.

PELCZAR, M. J.; CHANG, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, v. 2, 2ª ed. São Paulo: Makron Books, 1996.



PERALTA-ZAMORA, P. et al. **Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase**. Applied Catalysis B: Environmental, 2003. v. 42, n. 2, p. 131-144.

PIONTEK, K.; ANTORINI, M.; CHOINOWSKI, T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. **The Journal of Biological Chemistry**, 2002. v. 277, n. 40, p. 37663-37669.

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, 1998. v. 1, n. 4, p. 12-15, jan./fev.

POINTING, S. B. & VRIJMOED, L. L. P. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenol oxidases. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2000. v. 16, p. 317-318.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L.; **Os Reinos dos Fungos**. Santa Cruz do Sul, RS: EDUNISC, 1998.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L.; **Os Reinos dos Fungos**. Vol. 1, 2ª ed. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004.

RABINOVICH, M. L.; BOLOBOVA, A. V. & VASILCHENKO, L. G. Fungal Decomposition Natural Aromatic Structures and Xenobiotics: **A review. Applied Biochemistry and Microbiology**, 2004. v. 40 (1), p. 1-17.

RAMIREZ, M. **Detección de la pudrición central en trozas de lenga (*Nothofagus pumilio* (Poepp et Endl.) Krasser) mediante técnicas ultrasónicas**. 2001. 208 p. Memória Ingeniero Forestal. Departamento de Ingeniería de la madera. Escuela de Cs. Forestales. Universidad de Chile.

RAINHO, J. C. N.; CHUONG, W.; EPOSITO E. Fermentação Sólida da Borra de Café para Produção de *Pleurotus ostreatus*. **SINAFERM**, 2003.

RAVEN, P. H.; et al. **Biología Vegetal**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara KOOGAN, 2001.

RAYNER, A. D. M. e BODDY. Fungal decomposition of wood, its biology and ecology. **John Wiley & Sons, Chichester etc**, 1998. 587 p.

REID, I. D. e Paice, M. G. **FEBS Microbiol.**, 1994. n. 13, 369 p.

RIFRIN, J. **O século da biotecnologia**. São Paulo: Markon, 1999.

RODRÍGUEZ, E.; PICKARD, M. A. & VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. **Current Microbiology**, 1999. v.38, p. 27-32.

ROLZ, C.; MENCHÚ, J. F.; CALZADA, F.; LEON, R.; De e GARCÍA, R. Biotechnology in washed coffee processing. **Process Biochemistry**, 1982. p. 8-10.

ROSADO, F.R. et al. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures *Pleurotus ostreatoroseus* sing and *Pleurotus ostreatus* florida (Jack:Fr) kummer. **Journal Basic. Microbiol.**, 2003. v. 43, n. 3, p. 230-237.

RYAN, S.; SCHNITZHOFER, W.; TZANOV, T.; CAVACO-PAULO, A. & GUBITZ, G. M. An acid-stable laccase from *Sclerotium rolfsii* with potential for wood dye decolourization. **Enzyme and Microbial Technology**, 2003. v. 33, p. 766-774.

SAITO, T.; HONG, P.; KATO, K.; OKAZAKI, M.; INAGAKI, H.; MAEDA, S. & YKOGAWA, Y. Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (Family *Chaetomiaceae*) isolated from soil. **Enzyme and Microbial Technology**, 2003. v. 33, p. 520-526.

SCHLOSSER, D. & HOFER, C. Laccase-Catalyzed Oxidation of Mn<sup>++</sup> in the Presence of Natural Mn<sup>+++</sup> Chelators as a Novel Source of Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Production and Its Impact on Manganese Peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, 2002. 68 (7): 3514-3521.

SHIN, K. S. & LEE, Y. J. Purification and Characterization of a New Member of the Laccase Family from the White-Rot Basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000. 384(1). P. 109-115.

SHLEEV, S. V.; MOROZOVA, O. V. NIKITINA, O. V.; GORSHINA, E. S.; RUSINOVA, T. S.; SEREZHENKOV, V. A.; BURBAEV, D. S.; GAZARYAN, I. & YAROPOLOV, A Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. **Biochimie.**, 2004. v. 86, p. 693-703.

SHNEIDER, P.; CASPERSEN, M. B.; MONDORF, K.; HALKIER, T.; SKOV, L. K & OSTERGAARD, P. R. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. **Enzyme Microbial Technology**, 1999. 25: p. 502-528

SHUBART, H. O. R. **Ecologia e utilização das florestas**. In: SALATI, E. et al. Amazônia: desenvolvimento, integração, ecologia. São Paulo: Brasiliense; Brasília: CNPq, 1983. p. 101-143.

SILVA, C. M. M. S. & MELO, I. S. Requisitos nutricionais para o fungo *Alternaria alternata*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 1999. 34(3): p. 343-348.

SILVA, R. **Antibiosis entre hongos lignívoros y hongos antagonicos para efecto del biopulpaje de madera de *Pinus radiata***. 2002. 120 p. Memória Ingeniero Forestal. Universidad de Chile.

SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA, A.; LOGUERCIO-LEITE, C.; GIL, M. L. Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. **Journal Chem. Tech. Biotechnol.**, 1997. v. 70 p. 57-59.

SOLOMONS, G. L.. SMITH, J. E.; BERRY, D. R. Submerged culture production of mycelial biomass. In.: **The Filamentous Fungi**, 1975. eds. v. 1, p. 249-264.

SREBOTNIK, E. & BOISSON, J. N. Peroxidation of linoleic acid during the oxidation of phenols by fungal laccase. **Enzyme and Microbial Technology**, 2005. 36: p. 785-789.

STASZCZAK, M.; ZDUNEK, E. & LEONOWICZ, A. Studies on the role of proteases in the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Effect of PMSF and chloroquine on ligninolytic enzyme activity. **Journal of Basic Microbiology**, 2000. v. 40, p. 51-63.

SUNDARAN, U. M.; ZHANG, H. H.; HEDMAN, B.; HODGSON, K. O. and SOLOMON, E. I. **Journal Am. Chem. Soc.**, 1997. v. 119, p. 12525-12540.

TERRÓN, M. C.; GONZÁLEZ, T.; CARBAJO, J. M.; YAGUE, S.; ARANA-CUENCA, A.; TÉLLEZ, A.; DOBSON, A. D. W. & GONZÁLES, A. E. Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on lcc gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes sp.* I – 62. **Fungal Genetics and Biology**, 2004. 41: p. 954-962.

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

TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F.; **Microbiologia**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

TSAO, G. T. Structures of cellulosic materials and their hydrolysis by enzymes. Em *Biotechnology and Applied Microbiology*, Alani, D. J. & Moo-Young, M. (ed) New York, **Elsevier Applied Science Publishers**, 1986. p. 205-212.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K. e FIECHER, A. Enzymes of White-Rot Fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood-decay. **Journal Biotechnology**, 1995. v. 4, p. 11-17.

URBEN, A. F. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. **Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2001. 123 p.

VIIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J. e LINCO, M. **FEMS Microbiol.**, 1994. v. 13, 335 p.

WALDRON, K. W. e SELVENDRAN, R. R. **Physiol. Plant**, 1990a. v. 80, p. 568-575.

WALDRON, K. W. e SELVENDRAN, R. R. **Physiol. Plant.**, 1990b. v. 80, p. 576-583.

WALDRON, K. W. e SELVENDRAN, R. R. **Phytochemistry**, 1992. v. 31, p. 1931-1940.

WASSER, P. S. e WEIS, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 1999. v. 1, p. 31-62.

WISBECK, E.; Furlan, S. A.; NINOW, J. **Influência do pH e do K<sub>la</sub> na produção de biomassa de *Pleurotus ostreatus* DMS 1833 em cultivo submerso**. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentação –SINAFERME. Florianópolis & ndash SC, 5 a 8/08/2003.

WOLFAARDT, J. F., BOSMAN, J. L.; JACOBS, A.; MALE, J. R. e RABIE, C. J. Em **Biotechnology in the pulp and Paper Industry: Recent Adv.** In Appl. And Fundam. Res. (Fuacultasd-Universitatsverlag, Austria Publ.), 1996. 211 p.

WOLLENBERG, U.; SCHELLER, F.; PFEIFFER, D.; BOGDANOVSKAYA, V. A.; TARASEVICH, M. R. & HANKE, G. Laccase/ glucose oxidase electrode for determination of glucose. **Analytica Chimica Acta**, 1986. 187: p. 39-45.

XIA, Z.; YOSHIDA, T.; FUNAOKA, M. Enzymatic degradation of highly phenolic lignin-based polymers (lignophenols). **European Polymer Journal**, 2003. v. 39, n. 5, p. 909-914.

XIAO, Y. Z.; TU, X. M.; WANG, J.; ZHANG, M.; CHENG, Q.; ZENG, W. Y. & SHI, Y. Y. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes sp.* strain AH28-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2003. v. 60, p. 700-707.

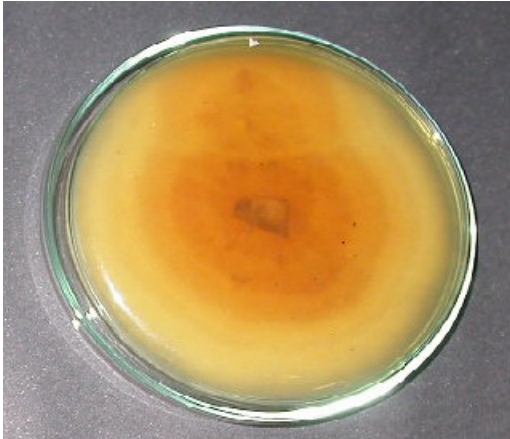
XU, F. Oxidation of phenols, anilines and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potential as well as halide inhibition. **Biochemistry**, 1996. 35: p. 7608-7614.

YAVER, D. S.; XU, F.; GOLIGHTLY, E. J. BROWN, K. M.; BROWN, S. H.; REY, M. W.; SCHNEIDER, P.; HALKIER, T.; MONDORF, K. & DALBOGE, H. Purification, characterization, Molecular Cloning and Expression of two laccases genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, 1996. 62(3), p. 834-841.

ZABEL, R. y MORRELL, J. **Wood Microbiology**. Decay and its prevention. Chapter 8 and 9. Harcourt Brace Jovanovich Publishers. Academic Press, Inc. USA, 1992. 476 p.

**10. ANEXOS : Fotos da Cultura de Fungos (*P. sanguineus*, FSF7 (*Trametes sp*, FSF11 (*Trametes sp*) em Placas de Petri, com diferentes concentrações de biotina**

**ANEXO:** Crescimento micelial de *Pycnoporus sanguineus*, FSF7 (*Trametes sp*) e FSF11 (*Trametes sp*) em diferentes concentrações de biotina.



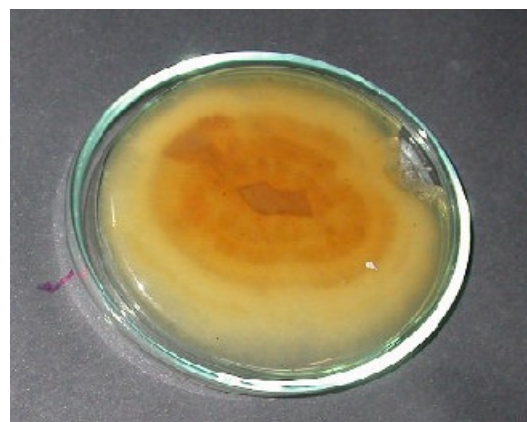
*Pycnoporus sanguineus* com 120 mcg de biotina



*Trametes sp* (FSF7) com 90 mcg de biotina



*Trametes sp* (FSF11) com 120 mcg de biotina



*Pycnoporus sanguineus* com 30 mcg de biotina





This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.