



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA – MBT**

**ASPECTOS DO CRESCIMENTO E INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS FÍSICOS NA
ATIVIDADE DA LACASE DO FUNGO AMAZÔNICO**
Trametes lactinea

ÂNGELA LÚCIA CARVALHO DE ANDRADE

**MANAUS – AMAZONAS
2011**



ÂNGELA LÚCIA CARVALHO DE ANDRADE

**ASPECTOS DO CRESCIMENTO E INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS FÍSICOS NA
ATIVIDADE DA LACASE DO FUNGO AMAZÔNICO**
Trametes lactinea

Dissertação apresentada à Universidade de Estado do Amazonas – UEA, para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, junto ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Uso sustentável da biodiversidade.

Orientadora: Dr^a. Helena Camarão Telles Ribeiro
Universidade do Estado do Amazonas - UEA

Co - Orientador: Dr. Ademir Castro e Silva
Universidade do Estado do Amazonas - UEA

**MANAUS – AM
2011**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha existência e por tudo que Ele tem proporcionado.

A Universidade do Estado do Amazonas – UEA, pelo ensino recebido.

Aos professores do curso de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, pela dedicação, carinho e conhecimentos transmitidos.

A Prof. Dr^a Helena Camarão Telles Ribeiro e ao Prof. Dr^o Ademir Castro e Silva, pela orientação, apoio, incentivo e dedicação durante todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho.

A amiga Dolores Fonseca e Patrícia Andrade pela amizade, apoio, força e companheirismo sempre prestados.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Meu Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURA.....	i
LISTA DE TABELA.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS.....	vii
INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	24
3.1 Fungo.....	24
3.1.1 Importância ecológica dos fungos.....	25
3.1.2 Importância econômica dos fungos.....	27
3.1.3 Fungos deterioradores de madeira.....	28
3.1.4 Biomassa fúngica.....	29
3.2 Basidiomicetos	31
3.2.1 Basidiomiceto do Gênero <i>Trametes</i>	31
3.2.2 Basidioma do Gênero <i>Trametes</i>	31
3.2.3 Morfofisiologia do Gênero <i>Trametes</i>	32
3.2.4 Enquadramento Taxonômico do fungo <i>Trametes lactinea</i>	32
3.2.5 Distribuição e habitat de <i>Trametes lactinea</i>	32

3.2.6 Sinonímia.....	33
3.3 Enzimas.....	33
3.3.1 Lacase.....	38
3.3.2 Lacases fúngicas.....	41
3.3.3 Indutor da lacase.....	43
3.3.4 Etanol	45
3.3.5 Estrutura e função das lacases fúngicas.....	45
3.4 Meios de cultura	51
3.4.1 Fontes de nutrientes regionais da Amazônia	52
3.4.2 Cupuacú – <i>Thebroma granoliformum</i>	52
3.4.3 Abriçó – <i>Mammea americana</i>	53
3.4.4 Batata – <i>Solanum tuberosum</i>	54

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Avaliação do pH no crescimento micelial.....	56
4.1.1 Fungo <i>Trametes lactinea</i>	57
4.1.1.1 Obtenção do material biológico.....	57
4.1.1.2 Isolamento e repicagem do fungo.....	57
4.2 Avaliação do crescimento micelial.....	58
4.3 Condições de crescimento	58
4.3.1 Meios de Cultura.....	58
4.3.2 Avaliação do pH.....	59
4.4 Taxa de crescimento do fungo.....	59
4.5 Produção de biomassa fúngica.....	59
4.5.1 Meios de cultura para obtenção de biomassa.....	59
4.6 Padronização do cultivo em meio líquido.....	60

4.6.1 Meios de cultura líquida.....	60
4.6.1.1 Preparo do inoculo.....	60
4.7 Determinação de biomassa micelial.....	60
4.8 Atividade enzimática da lacase.....	62
4.9 Análise estatística.....	63

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do pH no crescimento micelial do fungo <i>Trametes lactinea</i>	64
5.2 Produção de biomassa sob condição de agitação sem indutor.....	67
5.2.1 Produção de biomassa sob condição de agitação sem Indutor.....	67
5.2.2 Produção de biomassa sob condição de agitação com indutor.....	67
5.2.3 Produção de biomassa sob condição estacionária sem indutor.....	68
5.2.4 Produção de biomassa sob condição estacionária com indutor.....	69
5.2.5 Produção de Biomassa Micelial: Condição Estacionária versus Agitação e Com Indutor versus Sem indutor.....	70
5.3 Atividade Enzimática da Lacase de <i>Trametes lactinea</i>	74
5.3.1. Atividade da lacase de <i>Trametes lactinea</i> nos diferentes meios de cultura no período de vinte e dois dias.....	74
5.3.2. Produção da Lacase sob Condição de Agitação Sem Indutor.....	86
5.3.3 Produção de Lacase sob Condição de Agitação com Indutor.....	87
5.3.4. Produção de Lacase sob Condição Estacionária Sem Indutor.....	87
5.3.5. Produção de Lacase sob Condição Estacionária Com Indutor.....	88
5.3.6. Produção da lacase de <i>Trametes lactinea</i> nos diferentes meios de cultura nas duas condições de crescimento (agitação e estacionária) e na presença ou ausência de indutor.....	88
6. DISCUSSÃO	98

6.1. Desenvolvimento micelial em função do pH do meio.....	98
6.2. Efeitos dos meios de cultura na produção de Biomassa do fungo <i>Trametes lactinea</i> , sob condição estacionária e de agitação, e na presença e ausência do indutor.....	99
6.3. Atividade da lacase do <i>Trametes lactinea</i> em diferentes meios de condição estacionária e de agitação e na presença e ausência de indutor.....	102
7. CONCLUSÕES.....	105
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
9. ANEXOS.....	118

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Reação de oxidação da serigaldazina até formação da correspondente quinona.....51
- Figura 2:** Esquema da biomassa fúngica.....61
- Figura 3:** Esquema da atividade enzimática – lacase.....63
- Figura 4:** Gráfico de dispersão em torno da média comparando o crescimento micelial do fungo *Trametes lactinea* em meio suplementado com resíduos de cupuaçu nos diferentes pHs (4, 6 e 9).....64
- Figura 5:** Gráfico de dispersão em torno da média comparando o crescimento micelial do fungo *Trametes lactinea* em meio suplementado com batata nos diferentes pHs (4, 6 e 9).....65
- Figura 6:** Gráfico de dispersão em torno da média comparando o crescimento micelial do fungo *Trametes lactinea* em meio suplementado com abricó nos diferentes pHs (4, 6 e 9).....66
- Figura 7:** Produção de biomassa de *Trametes lactinea* em diferentes meios de cultura sob condição de agitação sem indutor.....67
- Figura 8:** Produção de biomassa de *Trametes lactinea* em diferentes meios de cultura sob condição de agitação com indutor.....67
- Figura 9:** Produção de biomassa de *Trametes lactinea* em diferentes meios de cultura sob condição estacionária sem indutor.....68
- Figura 10:** Produção de biomassa de *Trametes lactinea* em diferentes meios de cultura sob condição estacionária com indutor.....69
- Figura 11:** Gráfico comparando a produção de biomassa na condição estacionária e agitação do fungo *Trametes lactinea*.....72
- Figura 12:** Gráfico comparando a produção de biomassa com indutor e sem indutor do fungo *Trametes lactinea*.....73
- Figura 13:** Atividade da lacase de *Trametes lactinea* no meio suplementado com abricó, na condição estacionária sem indutor.....75
- Figura 14:** Atividade da lacase de *Trametes lactinea* no meio suplementado com abricó, na condição estacionária com indutor 100ul.....75

Figura 15: Atividade da lacase de <i>Trametes lactinea</i> no meio suplementado com abricó, na condição estacionária com indutor 200ul.....	76
Figura 16: Atividade da lacase de <i>Trametes lactinea</i> no meio suplementado com abricó, na condição de agitação, sem indutor	77
Figura 17: Atividade da lacase de <i>Trametes lactinea</i> no meio suplementado com abricó, na condição de agitação, com indutor 100ul.....	77
Figura 18: Atividade da lacase de <i>Trametes lactinea</i> no meio suplementado com abricó, na condição de agitação, com indutor 200ul.....	78
Figura 19: Atividade da lacase de <i>Trametes lactinea</i> no meio suplementado com batata, na condição estacionária, sem indutor	79
Figura 20: Atividade da lacase de <i>Trametes lactinea</i> no meio suplementado com batata, na condição estacionária, com indutor 100ul.....	79
Figura 21: Atividade da lacase de <i>Trametes lactinea</i> no meio suplementado com batata, na condição estacionária, com indutor 200ul.....	80
Figura 22: Atividade da lacase de <i>Trametes lactinea</i> no meio suplementado com batata, na condição de agitação, sem indutor	81
Figura 23: Atividade da lacase de <i>Trametes lactinea</i> no meio suplementado com batata, na condição de agitação, com indutor 100ul.....	81
Figura 24: Atividade da lacase de <i>Trametes lactinea</i> no meio suplementado com batata, na condição de agitação, com indutor 200ul.....	82
Figura 25: Atividade da lacase de <i>Trametes lactinea</i> no meio suplementado com cupuacú, na condição estacionária, sem indutor	83
Figura 26: Atividade da lacase de <i>Trametes lactinea</i> no meio suplementado com cupuacú, na condição estacionária, com indutor 100ul.....	83
Figura 27: Atividade da lacase de <i>Trametes lactinea</i> no meio suplementado com cupuacú, na condição estacionária, com indutor 200ul.....	84
Figura 28: Atividade da lacase de <i>Trametes lactinea</i> no meio suplementado com cupuacú, na condição de agitação, sem indutor	85
Figura 29: Atividade da lacase de <i>Trametes lactinea</i> no meio suplementado com cupuacú, na condição de agitação, com indutor 100ul	85
Figura 30: Atividade da lacase de <i>Trametes lactinea</i> no meio suplementado com cupuacú, na condição de agitação, com indutor 200ul	86

Figura 31: Gráfico de dispersão em torno da média comparando a produção da lacase de <i>Trametes lactinea</i> nos diferentes meios de cultura (abricó, batata e cupuaçu).....	90
Figura 32: Gráfico boxplot e da curva de densidade comparando os três meios de cultura na produção de lacase do fungo <i>Trametes lactinea</i>	91
Figura 33: Gráfico de dispersão em torno da média comparando a produção da lacase de <i>Trametes lactinea</i> na condição estacionária e de agitação.....	93
Figura 34: Gráfico boxplot e da curva de densidade comparando a condição de agitação e estacionária na produção da lacase do fungo <i>Trametes lactinea</i>	94
Figura 35: Gráfico de dispersão em torno da média comparando a produção da lacase de <i>Trametes lactinea</i> na presença e na ausência de indutor.....	96
Figura 36: Gráfico boxplot e da curva de densidade comparando a presença do indutor e a ausência do indutor na produção de lacase do fungo <i>Trametes lactinea</i>	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de enzimas comerciais obtidas a partir de microrganismos.....	34
Tabela 2: Exemplos de enzimas terapêuticas.....	35
Tabela 3: Exemplos de enzimas empregadas em análises clínicas.....	36
Tabela 4: Exemplos de enzimas empregadas em diagnóstico clínico de doença.....	37
Tabela 5: Exemplos de patentes relacionadas com o uso de enzimas em produtos cosméticos.....	37
Tabela 6: Exemplos de indutores para produção de lacase fúngica.....	42
Tabela 7: Produção de biomassa de <i>Trametes lactinea</i> em diferentes meios de cultivos sob condição de agitação/estacionária/indutor/sem indutor.....	70
Tabela 8: Teste de kruskal-Wallis para produção de biomassa do fungo <i>Trametes lactinea</i> , dos meios de culturas testados.....	71
Tabela 9: Teste de kruskal-Wallis para produção de biomassa do fungo <i>Trametes lactinea</i> nas condições de crescimento (agitação e estacionária) nos diferentes meios.....	71
Tabela 10: Teste de kruskal-Wallis para produção de biomassa do fungo <i>Trametes lactinea</i> com indutor e sem indutor nos diferentes meios.....	73
Tabela 11: Parâmetros descritivos da lacase dos fungos testados sob condição de agitação, sem indutor no período de 22 dias.....	86
Tabela 12: Parâmetros descritivos da lacase dos fungos testados sob condição de agitação, com indutor no período de 22 dias.....	87

Tabela 13: Parâmetros descritivos da lacase dos fungos testados sob condição estacionária, sem indutor no período de 22 dias.....	87
Tabela 14: Parâmetros descritivos da lacase dos fungos testados sob condição estacionária, com indutor no período de 22 dias.....	88
Tabela 15: Teste de kruskal-Wallis, para avaliação da diferença mínima significativa da atividade da lacase do fungo <i>Trametes lactinea</i> dos meios de cultura testados.....	89
Tabela 16: Teste de kruskal-Wallis para avaliação do fungo <i>Trametes lactinea</i> condições de crescimento (agitação e estacionária) nos diferentes meios.....	92
Tabela 17: Teste de kruskal-Wallis para avaliação do fungo <i>Trametes lactinea</i> na presença ou ausência do indutor nos diferentes meios.....	95

RESUMO

A aplicação dos fungos basidiomicetos nos diferentes setores da indústria e da biotecnologia é significativamente crescente devido ao seu emprego em um grande número de áreas, incluindo a química, alimentação, combustível, agricultura, papelaria, têxtil, cosmético, fármacos e outros mais. Estes fungos possuem também uma função essencial na ecologia das florestas e o seu envolvimento na regulação da energia e no fluxo de nutrientes são de importância ímpar para estes ecossistemas. Porém, devido ao pouco conhecimento da inexplorada biodiversidade brasileira, especialmente na região amazônica, esta pesquisa teve como objetivo o estudo da cepa amazônica (UEA_10202)do fungo *Trametes lactinea*. Este trabalho se propôs a estudar a influência de três meios de cultivo (abricó, batata e resíduos de cupuaçu) na produção de biomassa fúngica e secreção da lacase do *T.lactinea*. O fungo *T.lactinea* apresentou o maior crescimento micelial no pH 4 e menor no pH 9. Tanto para a maior produção de biomassa como para a máxima atividade da lacase foram obtidas no meio suplementado com resíduo de cupuaçu. A condição de agitação e a presença do indutor não influenciaram a produção de biomassa de *T. lactinea*. Já para a produção de lacase a agitação afetou positivamente a atividade desta enzima para o fungo *T. lactinea*. Em relação ao indutor etanol este teve um efeito negativo na produção de lacase de *Trametes lactinea* em todos os meios e condições testadas. A análise dos resultados demonstraram que tanto a

produção de biomassa como a atividade da lacase foram influenciadas diretamente pelos nutrientes presentes nos meios de cultivo do fungo *Trametes lactinea*.

ABSTRACT

The application of basidiomycetes in different sectors of industry and biotechnology is increasing significantly due to its use in a wide range of areas, including chemical, food, fuel, agriculture, paper, textiles, cosmetics, pharmaceuticals and more. These fungi also have an essential role in the ecology of forests and their involvement in the regulation of energy and nutrient flow are of unique importance for these ecosystems. However, due to poor knowledge of unexplored Brazilian biodiversity, especially in the Amazon region, this research aimed to study the Amazonian strain (UEA_10202) of the fungus *Trametes lactinea*. This work aimed to study the influence of three culture media (abricó, potato and cupuaçu residual) in biomass production and secretion of fungal laccase from *T. lactinea*. The fungus showed the highest mycelial growth at pH 4 and lower at pH 9. So much for higher biomass production as for maximum activity of laccase was obtained in medium supplemented with "cupuaçu residual" The condition of agitation and the presence of inducer did not affect the biomass of *T.lactinea*. As for the production of laccase agitation positively affected the activity of this enzyme for the fungus *T. lactinea*. In relation to this inducer ethanol had a negative effect on laccase production from *Trametes lactinea* in all media and conditions tested. The results showed that both biomass production and laccase activity were influenced by the nutrients present in the culture media of the fungus *Trametes lactinea*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BDA – Batata dextrose Agar
BOD – Demanda de oxigênio bioquímico
 H_2O_2 – Água oxigenada
pH – Potencial de hidrogênio
mm – Milímetro
Kg – Kilograma
O – Oxigênio
C – Carbono
Cu – Cobre
 Mn^{+2} - Cátion manganês
N - Nitrogênio
Fe – Ferro
g – Grama
ml – Mililitro
M – Molar
NaOH – Hidróxido de sódio
HCl – Ácido clorídrico
mM – Milimolar
nm – Nanômetro
 μ l – Microlitro
manganês peroxidase (MnP)
lignina peroxidase (LiP)
 C_2H_5OH – Etanol
MM – Massa micelial
Pf – Peso final
Pi – Peso inicial
rpm – Rotação por minuto
UEA – Universidade do Estado do Amazonas

INTRODUÇÃO

Os fungos têm sido usados há séculos como fonte de produção de muitos metabólitos e enzimas. Eles estão envolvidos no processamento de frutas e legumes, na classificação de sucos de frutas e na produção de adoçantes.

Na medicina, os fungos receberam especial atenção a partir do desenvolvimento de alguns antibióticos, destacando-se a penicilina sintetizada a partir de metabólitos do fungo *Penicillium chrysogenum*. Esteróides e hormônios para o crescimento vegetal são oriundos também de metabólitos desses organismos. Um dos exemplos notáveis da utilização dos metabólitos fúngicos na medicina é a administração de ciclosporina em pessoas submetidas a transplante. Essa substância foi isolada a partir de fungos de solo (*Tolypocladium inflatum* e *Cylindrocarpon lucidum*) na década de 70.

Os fungos tem grande importância também no setor agrícola e ecológico, decompondo restos vegetais, degradando substâncias tóxicas na simbiose com as plantas. Devido a esta grande versatilidade, os fungos vem sendo estudados, recentemente principalmente quanto a sua aplicabilidade biotecnológica (Azevedo et al., 2009; Espósito & Azevedo, 2004).

Muitos fungos secretam enzimas no substrato onde se encontram e absorvem as moléculas resultantes da ação dessas enzimas. Com isso, além de obterem nutrientes para seu crescimento também disponibilizam os produtos resultantes da degradação para a ação de outros microorganismos, e por essa razão são os degradadores primários de material orgânico na natureza, participando ativamente nos ciclos de carbono, nitrogênio, e fósforo além de outros nutrientes e têm sido explorados comercialmente como “fábricas” de enzimas, tanto as originadas de fungos como as heterólogas, originalmente presentes em outros organismos (Putzke & Putzke, 2004).

Com a crescente demanda mundial por enzimas industriais e terapêuticas, os fungos têm despertado a atenção de várias indústrias biotecnológicas ligadas a diversos setores da economia, pelo fato, de que as enzimas industriais são na sua maior parte, obtidas a partir de microorganismos (Antranikian, 2005; Olempska-Beer et al, 2006; Sant’ Anna Jr., 2001).

As enzimas estão presentes em todas as células vivas, onde exercem a função de catalisadores das reações que compõem as vias catabólicas e anabólicas do metabolismo celular. Esses biocatalisadores são moléculas de proteínas e seu poder catalítico está associado a conformação nativa, que depende de condições específicas de pH, temperatura e força iônica do meio (Martinez et al, 2005).

As enzimas são catalisadores muito eficientes. A catalase, por exemplo, encontrada abundantemente no fígado e nos glóbulos vermelhos do sangue, é

capaz de catalisar a transformação de 5.000.000 moléculas de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, por minuto. Em contraste, com os catalisadores inorgânicos, como ácidos, bases, metais pesados e óxidos metálicos, as enzimas têm alta especificidade, isto é, formam produtos seletivamente. Esta característica é muito útil nos processos industriais, porque se forma quantidades mínimas de produtos secundários, o que representa benefícios econômicos e ambientais com a eliminação da necessidade de separação de subprodutos com redução qualitativa e quantitativa de efluentes industriais. Outra vantagem muito útil do ponto de vista industrial é o baixo consumo energético requerido para os processos por via enzimática em comparação com os de via química. Ressalta-se, também, o caráter de menor impacto ambiental dos efluentes gerados nos processos biocatalisados. Adicionalmente, as próprias enzimas são prontamente biodegradadas e absorvidas pela natureza. Em contraposição a este fato, a maior parte dos catalisadores químicos acumula-se na natureza, poluindo o meio ambiente. As enzimas têm função principal de degradar macromoléculas presentes no meio ambiente, como a celulose, o amido, a lignina e proteínas, para a absorção de seus componentes como nutrientes (Bon, et al, 2008).

O avanço da tecnologia enzimática no Brasil é favorecido pela enorme quantidade e variedade de matérias-primas renováveis e passíveis de serem transformadas em produtos úteis para setores estratégicos para economia. A maior biodiversidade do planeta como fonte de biocatalisadores concentra-se na região amazônica e estudos da diversidade biotecnológica com ênfase nos fungos amazônicos com potencial biotecnológico enzimático contribuirão assim para expansão da produção de enzimas no Brasil.

Lacases são enzimas com um grande interesse industrial. Dentre as várias aplicações da lacase podemos destacar: em tinturas capilares oxidativas, a descoloração de corantes têxteis, descoloração de polpa em indústrias de papeis e celulose (como clareador, potencial substituto do cloro, que é ambientalmente nocivo devido á geração de compostos clorados altamente tóxicos), síntese de polímeros, biossensores amperométricos para detecção de fenol e também no processamento de alimentos e bebidas, remoção de xenobióticos em sistemas de águas, remoção de compostos fenólicos de vinhos, análises de drogas e produção de etanol (Mayer & Staples, 2002; Maciel et al., 2010).

No presente trabalho pretende-se verificar a produção de lacase do fungo amazônico basidiomiceto *Trametes lactinea* observando aspectos do crescimento, e influência dos parâmetros físicos da atividade desta enzima como potencial biotecnológico que atua nos vários componentes da madeira.

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliação da produção de biomassa e secreção da enzima lacase de um isolado amazônico do fungo *Trametes lactinea* quando cultivado em três meios de cultura, nas condições de agitação e estacionária e na presença ou ausência do indutor.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Verificar o crescimento micelial do fungo *Trametes lactinea* em cultura sólida e líquida.
- Determinar a faixa de pH ótimo necessário ao crescimento do fungo *Trametes lactinea*.
- Analisar a influência das condições de crescimento (agitação e estacionária) na produção de biomassa micelial e na secreção da lacase do fungo *Trametes lactinea*.
- Verificar a ação do indutor etanol sobre a produção da biomassa micelial e da atividade da lacase.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fungo

Os fungos são seres eucariontes, heterotróficos, aclorofilados, aeróbios, unicelulares ou pluricelulares. Possuem pigmentos responsáveis pelas cores variadas que apresentam, mas nenhum capaz de absorver energia para síntese de carboidratos a partir do dióxido de carbono. Assim, são heterotróficos, mas se nutrem por absorção, podendo viver como saprófitos, parasitas ou simbiontes com outros organismos (Lacaz, 2002; Putzke & Putzke, 2004).

Estes organismos são amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados na água, no ar atmosférico, no solo, sobre animais e vegetais vivos parasitando-os, na matéria orgânica em decomposição, nos produtos alimentícios e produtos industriais. Para o seu desenvolvimento, necessitam de carboidratos. Estes são necessários para a construção do corpo do fungo e, fonte de energia. Num fungo típico, 50% do peso seco são representados por carbono. Dos carboidratos, os fungos utilizam glicose, frutose, maltose. A sacarose é também boa fonte de carbono para algumas espécies. Alguns fungos utilizam proteínas, lipídeos e certos ácidos orgânicos como fontes de energia. Além do carbono, os fungos necessitam de nitrogênio. Na natureza, os fungos decompõem proteínas e outras matérias para obterem seu suprimento de nitrogênio. Muitos fungos, entretanto, obtêm o nitrogênio a partir de fontes inorgânicas, como nitratos e sais de amônia. Eles não têm celulose na sua parede celular, exceto alguns aquáticos e não armazenam amido como substância de reserva (Espósito & Azevedo, 2004).

3.1.1 Importância Ecológica dos Fungos

Na cadeia alimentar, os fungos ocupam a posição de decompositores, tendo, portanto, um papel muito importante na manutenção do equilíbrio ambiental. A diversidade fungica é muito ampla sendo que existem algumas espécies que podem causar doenças aos seres vivos, bem como a deteriorização de vários tipos de materiais causando prejuízos econômicos. No entanto, a maioria das espécies é benéfica para diversos setores humanos (Espósito & Azevedo, 2004).

Os fungos juntamente com as bactérias heterotróficas são os principais decompositores de materiais lignocelulósicos da biosfera. Ecologicamente podem ser considerados os “lixeiros” do mundo, por degradarem todo tipo de restos orgânicos, transformando-os em elementos assimiláveis pelas plantas (Putzke & Putzke, 2004), deste modo a atividade fúngica é amplamente responsável pela fertilidade do solo.

Um dos grandes problemas que o mundo industrializado vem enfrentando nos dias atuais são a contaminação de solos, lençóis freáticos e sedimentos por compostos orgânicos tóxicos. Esses poluentes são potenciais ameaça à saúde pública e ao ambiente. A biorremediação está se tornando muito pesquisada e testada principalmente no caso de poluição por hidrocarbonetos. Os sistemas mais utilizados na biorremediação são os microbiológicos, principalmente fungos filamentosos e leveduras (Silva & Esposito, 2004).

A contaminação de solos por metais pesados tem diversas origens, incluindo emissão de veículos automotores e de indústrias (Gray, 1998). A remoção de metais

pesados do solo e da água tem sido um grande desafio. Devido à preocupação ambiental, vem aumentando o interesse por métodos alternativos, como o uso de fungos para a biorremediação de áreas contaminadas por metais pesados (Kotrba & Ruml, 2000). Os macrofungos que são fungos filamentosos com capacidade de produzir corpos de frutificação (Espósito & Azevedo, 2004), e apresentam um grande potencial na remediação de solos contaminados por metais pesados devido principalmente a sua característica miceliar, além do fato de suportarem a toxidez causada por esses compostos. Os fungos filamentosos têm a capacidade de acumular metais pesados e de translocá-los por meio do micélio. Essa concentração, no caso de Basidiomicetos, ocorre nos basidiocarpos. Dessa forma, esses fungos introduzidos em solos contaminados por metais, absorveriam esses metais e, por meio de translocação, os concentrariam nos basidiocarpos, que eventualmente, seriam colhidos e os metais, extraídos e reutilizados, ou ainda eliminados de maneira apropriada (Gray, 1998).

3.1.2 Importância Econômica dos Fungos

A maioria dos processos biotecnológicos utilizando fungos baseia-se nos seus produtos metabólicos como: fermentação, enzimas e polissacarídeos, que podem ser utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. Além dessas aplicações as enzimas produzidas pelos fungos são utilizadas na biodegradação de compostos xenobióticos, como, por exemplo, na biorremediação de solos contaminados e no tratamento de efluentes da indústria papelreira e têxtil (Ribeiro da Silva & Coelho, 2006).

A vantagem de métodos biotecnológicos é que suas reações são altamente específicas, não acarretando efeitos adversos ao ambiente, são mais econômicos e podem ser utilizados onde processos químicos são impraticáveis. Do ponto de vista biotecnológico, fungos são microorganismos atraentes por possuírem metabolismo dinâmico e rápido, produtores de metabólitos secundários de interesse, heterótrofos e adsorptivos e são bons degradadores de substratos (Boominathan e Reddy, 1992).

Os fungos são também utilizados como fonte de alimentação por possuírem até cinco vezes mais proteínas que as carnes de bovinos e suínos (Ribeiro da Silva & Coelho, 2006).

Os produtos finais da degradação do substrato pelas enzimas fúngicas podem ser utilizados como fertilizantes em plantações, suplementos para reação de animais ou ainda serem reciclados e misturados a outros materiais orgânicos para cobertura de plantações.

No mercado encontra-se, por exemplo, o tofu, que é queijo fermentado da soja, e os cogumelos que são utilizadas na alimentação, entre outros benefícios dos fungos.

As leveduras são de grande importância econômica na produção de bebidas alcoólicas e pães, por liberarem etanol e dióxido de carbono a partir de sua fermentação.

Os fungos também foram os pioneiros na descoberta dos antibióticos, a penicilina que foi descoberta em 1928 por Alenxader Fleming, isolado do fungo do gênero *Pennicilium* (Laurense, 2005).

3.1.3 Fungos Deterioradores de Madeira

De modo geral, os fungos são classificados com base na forma do corpo frutífero e nas estruturas sob os quais os esporos são formados (estágio sexual). Os fungos deterioradores de madeira estão classificados na classe dos Basidiomicetos, principalmente nas ordens Polyporales e Agaricales (Putzke & Putzke, 2004).

Os fungos deterioradores de madeira podem ser classificados em três grupos ecofisiológicos: os causadores de podridão branca, os de podridão parda e de podridão mole. Os basidiomicetos atuam na deterioração da madeira, decompondo a matéria orgânica, dinamizando a ciclagem de nutrientes e regulando o equilíbrio energético dos ecossistemas terrestres (Tuomela et al, 2000). Os basidiomicetos são os únicos organismos capazes de mineralizar a molécula da lignina presente na madeira (Kirk e Farrel, 1987).

3.1.4 Biomassa Fúngica

Os fungos são microrganismos eucariontes que obtêm sua energia pela ruptura de moléculas orgânicas, podendo ocupar diversos nichos ecológicos (Tortora et al., 2000). No ambiente terrestre, os fungos tem um papel importante nos ciclos biogeoquímicos do carbono, nitrogênio ou fósforo (Boswell et al., 2003). Como fitopatógenos, esses organismos possuem mecanismos de adesão ao hospedeiro onde as moléculas de reconhecimento e união são, na maior parte dos casos, de

natureza protéica ou glicoprotéica (Xiao et al., 1994) e por isso, a produção de proteínas polissacarídeos extracelulares tem sido associados à capacidade de microrganismos causar doenças (Doss, 1999; Gil-Ad et al., 2001; Leite et al., 2001).

Os fungos podem ser considerados como os agentes mais importantes de degradação da terra, principalmente quando se estuda os ecossistemas florestais, onde esses microrganismos são os principais decompositores de celulose e lignina. A produção de biomassa em um ecossistema florestal é em grande parte controlada por fungos degradadores de madeira, que determinam as taxas dos nutrientes liberados e seu retorno ao ecossistema após a morte das árvores (Esposito & Azevedo, 2004).

Além de sua atuação nos ecossistemas, os fungos também apresentam um grande potencial de aplicação nas diferentes áreas industriais, como alimentos, cosméticos, medicamentos, assim como na área ambiental na detoxificação de compostos em ambientes contaminados (Rezende et al., 2005). A utilização destes microrganismos pode ser através de sua biomassa ou então de macromoléculas isoladas.

A biomassa excedente da produção industrial de antibióticos por *Penicillium chrysogenum*, além de ser aproveitada para ração para gado e ou no preparo de fertilizantes (Muzzarelli et al., 2000), também vem se mostrando uma fonte viável de moléculas importantes, como os polissacarídeos do tipo glucanas (Wang et al., 2007), aplicados na área medicinal devido a suas atividades antitumorais e imunomoduladoras.

Durante um processo fermentativo para a produção de exopolissacarídeos (EPS), um grande percentual de biomassa também é obtido. Entretanto, as quantidades de massa micelial e EPS não são necessariamente proporcionais, sendo dependentes dos diferentes fatores utilizados no cultivo, tais como fontes de carbono e de nitrogênio, pH, temperatura, agitação, grau de aeração, entre outros. Estes parâmetros podem interferir tanto na produção da biomassa quanto dos compostos isolados desse substrato. Segundo Magnelli (2005), o resultado esperado no final do procedimento, se biomassa ou EPS, determinará como essas variáveis serão aplicadas no cultivo microbiano.

3.2 Basidiomicetos

O grupo dos basidiomicetos inclui os fungos que produzem esporos (basidiósporos) de origem sexuada em uma estrutura especializada denominada de basídio e popularmente chamadas de cogumelos e orelhas de pau. A fase vegetativa dos basidiomicetos é denominada de micélio, que por sua vez é formada por muitos filamentos septados chamados hifas. Os basidiomicetos são caracterizados por possuírem dois tipos básicos de basidiósporos. Os denominados balistósporos, que são liberados violentamente dos basídios e os denominados estatismosporos que são liberados passivamente (Gugliotta & Campelari, 1998).

3.2.1 Basidiomiceto do Gênero *Trametes*

O basidiomiceto do gênero *Trametes* é provavelmente o mais ativamente investigado no filo *Basidiomycota* pelas aplicações biotecnológicas. A pesquisa está direcionada para o gênero *Trametes* principalmente pela sua utilização na biorremediação de solos. O gênero *Trametes* tem aproximadamente 335 espécies (Nyanhongo et al, 2007).

3.2.2 Basidioma do gênero *Trametes*

O basidioma do gênero *Trametes* se caracteriza por ser anual e de consistência flexível consistem de pileus semicircular, com cerca de 4 cm de comprimento e 6 cm de espessura. Enquanto fresco, torna-se cinzo e a medida que amadurece adquire cor amarelada. (Reck, 2009).

3.2.3 Morfofisiologia do gênero *Trametes*

Crescimento rápido em meio de cultura (5,5 cm em 1 semana). Pileus com 7,5 cm no raio, séssil, algumas vezes com a base discóide. Esporos medindo (5,5-6,6 x 2,5-3 um), branco, elipsoide para subcilíndrico. É constituído por hifas trimiticas (Ryvarden & Johansen, 1980).

3.2.4 Enquadramento taxonômico do fungo *Trametes lactinea*

De acordo com Ryvarden & Johansen, (1980) o fungo *Trametes lactinea* (Berk) apresenta o seguinte enquadramento taxonômico:

Reino: Fungi

Divisão: *Eumycota*

Filo: *Basidiomycota*

Classe: *Basidiomycetes*

Ordem: *Polyporales*

Família: *Polyporaceae*

Gênero: *Trametes*

Espécie: *lactinea*

3.2.5 Distribuição e habitat de *Trametes lactinea*

A distribuição do *Trametes lactinea* é pantropical. Segundo Ryvarden & Johansen (1980) *T. lactinea* é uma espécie rara, e é conhecida no Sul da África, Austrália e Filipinas. Também foi registrada na China, nas regiões neotropicais da Guiana, Jamaica, Venezuela e no Brasil.

3.2.6 Sinonímia

- *Polyporus lactineus* (Berk) 1843
- *Coriolus lactineus* (Berk) 1843
- *Trametes lamaoensis* (Murrill) 1907
- *Trametes levis* (Berk) 1847

3.3 Enzimas

A palavra enzima do grego énzymo (em: na; zymos: levedura) foi sugerida por Kunhe, no seu primeiro trabalho, como nome genérico para “fermentos” que atuavam na ausência de organismos ou fora deles. Hoje sabe-se que as enzimas são catalisadores ou seja, aumento de várias ordens da grandeza a velocidade das reações que catalisam podendo ser de natureza protéica e de RNAs e DNAs catalíticos. As ribozimas que tem como catalisadores moléculas específicas de RNA. Embora algumas enzimas sejam até hoje extraídas de tecidos animais e vegetais, sendo as mais notáveis, pepsina, tripsina e quimosina, a grande maioria das enzimas industriais é obtida de microorganismos (fungos e leveduras) (Bon, et al., 2008).

Microorganismos tem sido coletados de ambientes extremamente hostis como o ártico, fontes termais, floresta tropical e desertos. O espectro de atividades enzimáticas é grande. Técnicas de engenharia genética tem contribuído com a indústria de enzimas aumentando a produtividade de fermentação enzimática. (Archer et al., 2001)

Tabela 1 Exemplos de enzimas comerciais obtidas a partir de microrganismos

Enzima	Microrganismos produtores
Aminopeptidase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Rhizopus oryzae</i>
Alfa-amilase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>B. Subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>
Catalase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Micrococcus luteus</i>
Celulase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>B. Subtilis</i> , <i>Humicola isolens</i> , <i>Streptomyces lividans</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>T. viridae</i>
Dextranase	<i>Chaetomium erraticum</i> , <i>Penicillium lilacinum</i>
Alfa-galactosidase	<i>Aspergillus niger</i>
Beta-glicanase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. aculeatus</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Humicola isolens</i> , <i>Talaromyces emersonii</i>
Fitase	<i>Aspergillus niger</i>
Glicoamilase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus deleamar</i> , <i>R. niveus</i> , <i>R. oryzae</i>
Glicose-isomerase	<i>Streptomyces murinus</i> , <i>S. olivochromogenes</i>
Hemicelulase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i>
Inulase	<i>Aspergillus niger</i>
Invertase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Lactase	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>
Lipase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium camembertii</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>Rhizopus oryzae</i>
Pectinase	<i>Aspergillus aculeatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. Pulverulentuns</i> , <i>Penicillium funiculosum</i>
Protease	<i>Bacillus halodurans</i> , <i>Aspergillus melleus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Rhizopus niveus</i> , <i>S. fradiae</i>
Pululanase	<i>Bacillus acidopullulyticus</i> , <i>B. circulans</i>
Xilanase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Humicola insolens</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> , <i>Trichoderma reesei</i>

Fonte: European Comission, 2002.

Atualmente, verifica-se uma grande expansão da aplicação da tecnologia enzimática a muitos setores industriais, como por exemplo, na indústria

farmacêutica, onde temos os seguintes usos: enzimas como medicamentos. A tabela relaciona algumas enzimas com importantes atividades terapêuticas.

Tabela 2 Exemplos de enzimas terapêuticas

Enzima	Número EC	Reação	Uso/indicação terapêutica
Asparaginase*	3.5.1.1	$L\text{-asparagina} + H_2O \rightarrow L\text{-aspartato} + NH_3$	Leucemia
Colagenase	3.4.24.3	Hidrólise de colágeno	Úlceras de pele
Fator VII	3.4.21.21	Plasminogênio \rightarrow plasmina	Coágulo sanguíneo
Hialuronidase	3.2.1.35	Hidrólise do hialuronato	Ataque cardíaco
Lisozima	3.2.1.17	Hidrólise da parede celular bacteriana	Antibiótico
Rodanase	2.8.1.1	$S_2O_3^{2-} + CN^- \rightarrow SO_3^{2-} + SCN^-$	Envenenamento com cianeto
Ribonuclease	3.1.26.4	Hidrólise de RNA	Antiviral
β -lactamase	3.5.2.6	Penicilina \rightarrow peniciloato	Alergia à penicilina
Estreptoquinase	3.4.22.10	Plasminogênio \rightarrow plasmina	Coágulo sanguíneo
Tripsina	3.4.21.4	Hidrólise de proteína	Inflamação
Uricase*	1.7.3.3	Urato + $O_2 \rightarrow$ alantoína	Gota
Uroquinase	3.4.21.31	Plasminogênio \rightarrow plasmina	Coágulo sanguíneo
Superóxido-dismutase	1.15.1.1	Radical superóxido \rightarrow peróxido de hidrogênio + O_2	Inflamação
β -Glicosidase*	3.2.1.45	Terapia de reposição enzimática	Doença de Gaucher
Galactosidase*	3.2.1.23	Terapia de reposição enzimática	Doença de Fabry
Catalase	1.11.1.6	Peróxido de hidrogênio \rightarrow $H_2O + O_2$	Inflamação / estresse oxidativo

*Aprovadas para uso clínico

A aplicação das enzimas no mercado de diagnósticos pode ser dividido em duas categorias principais: método enzimático em análises clínicas e enzimas avaliadas em diagnósticos clínicos de doenças. Exemplos de enzimas empregadas para métodos enzimáticos em análises clínicas são apresentados na tabela 3 e tabela 4 apresenta exemplos de enzimas avaliadas em diagnósticos clínicos de doenças.

Tabela 3 Exemplos de enzimas empregadas em análises clínicas

Enzima	Substrato avaliado
Álcool-desidrogenase	Álcool
Álcool-oxidase	Álcool
Aldeído-desidrogenase	Indicador para reações que produzem acetaldeído
Catalase/aldeído-desidrogenase	Ácido úrico
Colesterol-oxidase/peroxidase	Colesterol
Colesterol oxidase	Colesterol total
Creatinase	Creatinina e creatina
Creatininase	Creatinina
Glicose-6-P-desidrogenase/hexoquinase	Glicose e ATP
Glicose oxidase (peroxidase)	Glicose
α -glicosidase	α -amilase
β -glicosidase	α -amilase
β -glicuronidase	Esteróides
Glutamato-desidrogenase/urease	Uréia
Glicerol-3-P-desidrogenase	Triglicérides e glicerol, indicador em ensaios de aldolase, triose-P isomerase e glicerol quinase
Lactato-desidrogenase	Indicador em ensaios de GPT
Lactato-desidrogenase/piruvato quinase	Indicador em reações em que ADP, ATP ou piruvato são produtos
Lipase/glicerol-quinase/glicerol-3-P-oxidase/peroxidase	Triglicérides e glicerol
Malato-desidrogenase	Oxaloacetato e malato
Malato-desidrogenase/fosfoenolpiruvato-carboxilase	CO ₂ /carbonato
Maltose-fosforilase	α -amilase
Mutarotase/glicose-oxidase/peroxidase	Glicose
Sarcosina-oxidase	Creatinina e creatina
Sacarose-fosforilase	Fosfato inorgânico
Urease	Uréia
Uricase/peroxidase/aldeído-desidrogenase	Ácido úrico

Tabela 4 Exemplos de enzimas empregadas em diagnósticos clínicos de doenças

Enzima avaliada	Doença-alvo
Fosfatase ácida	Câncer de próstata, doença de Gaucher
Alanina-aminotransferase	Problemas hepáticos
Fosfatase alcalina	Problemas hepatobiliares e ósseos
Amilase	Pancreatite aguda
Enzima conversora de angiotensina	Doença de Gaucher, leprose, cirrose biliar
Aspartato-aminotransferase	Tecidos danificados (coração, fígado, rim)
Colinesterase	Exposição a organofosfatos
Creatinina quinase	Problemas cardíacos/musculares
Gamaglutamiltransferase	Problemas hepáticos
Lactatodesidrogenase	Infarto do miocárdio, câncer de testículo
Renina	Hiperaldosteronismo

Ultimamente, é crescente a utilização de enzimas em produtos cosméticos (Xu,2005). A tabela 5 relaciona algumas patentes depositadas na área:

Tabela 5 Exemplos de patentes relacionadas com o uso de enzimas em produtos cosméticos

Patente	Depositante	Ano	Descrição
US5476607	Warner Lambert Co	1993	Pó efervescente para limpeza de dentaduras com enzimas proteolíticas
JP7316035	Usuki Seiyaku	1994	Cultura de basidiomicetos como despigmentante em manchas de pele
FR2725898	L'Oreal	1994	<i>Frasco A</i> – precursor de hidróxi-ácido <i>Frasco B</i> – lipase: mistura de ambos no momento da aplicação, gerando um hidróxi-ácido para o combate do envelhecimento cutâneo
FR2719215	Yves Rocher	1994	Lipase para uso capilar no tratamento da seborréia
JP7304648	Kyoei Chemical	1994	Tripsina, papaína, peptidase e bromelina como despigmentantes em manchas de pele
E710478	L'Oreal	1994	Lipase associada a ésteres C2-25 como despigmentante
WO9507686	Unilever PLC	1995	Proteases (catepsinas) para o cuidado da pele seca
US5490980	Chesebrougs-Pond's	1996	Transglutaminase que promove a ligação de substâncias ativas na pele, unhas e cabelo
US5441740	Longevity Network Ltd	1996	Papaína, bromelina e alfa-hidróxi-ácidos para o cuidado da pele
WO97444005E	Protopapa <i>et alii</i>	1997	Enzimas proteolíticas incorporadas em microemulsão depilatória

Patente	Depositante	Ano	Descrição
WO9830682	Novo-Nordisk	1998	Enzima acoplada com um polímero para cuidado da pele
WO9906071	Procter & Gamble Co.	1999	Proteases conjugada com polímero, com baixa alergenicidade
WO9936036	L'Óreal	1999	Corante de cabelo contendo lacase como oxidante
EP970691	L'Óreal	2000	Lipase com precursor de vitamina e álcool graxo
EP1004289	Pugliese, PT e Pugliese, S.M	2000	Preparação para o cuidado da pele contendo catalase
US20034488	Kravtchenko, S.	2002	Oxidoredutases e peroxidases em oxidantes para tinturas, onduladores e descolorantes de cabelo
US6537328	L'Óreal	2003	Lacase em tinturas capilares oxidativas

A vantagem da utilização de enzimas em muitos processos deve-se a menor produção de subprodutos residuais, o que propicia a obtenção de produtos de melhor qualidade e com menor probabilidade de poluição do meio ambiente.

Outras vantagens da aplicação de enzimas são um claro exemplo de atividades relacionadas como desenvolvimento sustentável, em que os procedimentos industriais, baseados no uso de recursos naturais devolvem a natureza, em uma dinâmica cíclica, os recursos extraídos.

3.3.1 Lacase

A primeira descrição da enzima lacase foi feita em 1883 por Yoshida, originada de uma árvore japonesa *Rhus vernicifera* e em 1985 foi caracterizada como uma oxidase contendo metal (Mayer & Staples 2002). A distribuição de lacase é bastante ampla sendo reconhecidos dois grupos principais, as lacases extraídas de plantas superiores e as produzidas por fungos, apresentando estes grupos

claras diferenças, mas há também relatos da presença de lacase em bactérias (Baldrian, 2006).

Lacases, p-difenol:dioxigênio oxidoreductase (EC 1.10.3.2), fazem parte de um grupo de enzimas denominadas enzimas multicobre, que inclui entre outras ácido ascórbico oxidase e ceruloplasmina (Mayer & Staples, 2002). Oxidoreductases são enzimas que catalisam processos de oxidação e redução, e constituem um grupo que compreende quase um quarto de todas as enzimas conhecidas, entre as quais estão lacases e peroxidases.

Lacase é uma polifenol oxidase que atua sobre uma variedade de doadores de hidrogênio aromáticos (Leonowicz et al. 2001) e também espécies inorgânicas, incluindo íons Mn^{+2} . As fenol-oxidases são óxido-redutases que catalisam a oxidação de fenóis onde possuem uma característica comum de serem capazes de oxidar compostos aromáticos, tendo comoceptor terminal de elétrons o oxigênio molecular (Mayer & Staples, 2002).

A enzima lacase catalisa a remoção de um elétron e um próton de grupos hidroxi-fenólicos ou amino-aromáticos formando seus respectivos radicais livres. Além disso, a lacase que contém em seu sítio ativo 4 átomos de cobre, não somente oxida ácidos fenólicos e metoxifenólicos, mas também os descarboxila e ataca seus grupos metoxila através de desmetilação ou desmetoxilação (Leonowicz et al. 2001). O mecanismo geral de atuação das lacases é a oxidação do substrato através da abstração de um elétron de um composto fenólico gerando um radical fenoxila (Higuchi, 1990).

a) $2 \text{ (Cu [II])} - \text{ lacase} + \text{ fenol} \rightarrow 2 \text{ (Cu [I])} - \text{ lacase} + \text{ radical fenolato} + 2 \text{ H}^+$

b) $2 \text{ (Cu [I])} - \text{ lacase} + \text{ O}_2 + 2 \text{ H}^+ \rightarrow 2 \text{ (Cu [II])} - \text{ lacase} + \text{ H}_2\text{O}$

O ciclo catalítico da lacase compreende três passos principais: a) redução do cobre tipo 1 pelo substrato; b) transferência interna de elétrons do cobre tipo 1 para os cobres tipo 2 e 3; c) redução de oxigênio molecular para água através de sua interação com os cobres de tipo 2 e 3 (Gianfreda et al. 1999).

De uma maneira geral a lacase reduz o oxigênio molecular à água e promove simultaneamente a oxidação de vários substratos aromáticos. Lacases fúngicas tipicamente catalisam a oxidação de difenóis simples como hidroquinona e catecol, assim como vários metoxifenóis (guaiacol, 2,6 – DMP) e aminas aromáticas (Thurston 1994). Essas enzimas não catalisam a oxidação de tirosina que é o único substrato específico para tirosinase enquanto que a seringaldazina (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído azina) é considerado um substrato específico para lacase, desde que o peróxido de hidrogênio seja totalmente eliminado, uma vez que este composto é também oxidado pela enzima manganês peroxidase (MnP), enzima produzida por muitos basidiomicetos lignolíticos (Mayer & Staples 2002). A lacase tem um potencial redox mais baixo que lignina peroxidase (LiP) e MnP e por isso oxida somente fragmentos fenólicos de lignina. O emprego de mediadores apropriados pode aumentar consideravelmente o espectro de substratos oxidados pela lacase, possibilitando a oxidação de compostos não-fenólicos (Couto & Herrera, 2006). Diversos compostos têm sido utilizados com este propósito, podendo-se citar entre os mais comuns ABTS (ácido 2,2 azino-bis(3-etilbenzotriazolina-6-sulfônico), HBT (1-hidroxilbenzotriazol), TEMPO

(N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidima) e ácido violúrico. (Higuchi, 2004). A lacase amarela é capaz de oxidar compostos não fenólicos mesmo na ausência de mediadores, sendo postulado que este tipo de lacase pode conter mediadores endógenos, derivados da lignina. Apesar dos vários estudos já realizados, as funções biológicas da lacase nos organismos produtores ainda não estão muito claras. Em fungos há relatos sobre sua participação no rápido crescimento celular, controle da patogenicidade (Leonowicz et al. 2001), controle de virulência (Mayer & Staples 2002), pigmentação de esporos (Leonowicz et al. 2001, Mayer & Staples 2002), diferenciação sexual, esporulação (Thurston 1994) e degradação de lignina. Lacases originadas de plantas são relatadas como importantes no processo de recuperação de lesões e síntese de lignina. O papel da lacase na degradação da lignina ainda não está totalmente elucidado, mas sabe-se que esta degradação pode ocorrer mesmo na ausência de LiP e MnP (Leonowicz et al. 2001, Mayer & Staples, 2002). Sabe-se também que ela está envolvida tanto na polimerização como na despolimerização da lignina (Thurston, 1994).

3.3.2 Lacases fúngicas.

Lacases fúngicas têm sido encontradas em diferentes gêneros de ascomicetos, *Aspergillus*, *Neurospora* e *Podospora*, alguns deuteromicetos, *Botrytis* e principalmente basidiomicetos, *Collybia*, *Fomes*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Trametes* particularmente aqueles associados com madeira deteriorada ou em estágio terminal de decomposição (Baldrian, 2006). Os melhores produtores de lacase são basidiomicetos pertencentes ao grupo dos fungos de decomposição branca, eficientes degradadores de madeira (Mayer & Staples 2002; Thurston, 1994). Quase todos esses fungos produzem MnP e lacase, mas somente

alguns produzem LiP (Hatakka, 1994). O sistema de degradação de materiais ligninocelulósicos envolve uma série de reações, apresentando essas enzimas, diferentes papéis na degradação da lignina. A lacase oxida os anéis fenólicos em radicais fenoxílicos. Essas enzimas são amplamente estudadas por suas aplicações industriais e ambientais. As lacases fúngicas têm um enorme potencial de aplicação na indústria devido à grande diversidade de substratos que podem oxidar. Assim, pode se salientar a sua utilização na modificação de ligninas industriais para obtenção de produtos de valor agregado, na indústria da polpa e do papel para redução do volume de produtos químicos utilizados e a possibilidade do fechamento do circuito, nas indústrias têxtil e dos detergentes, para inibição da transferência dos corantes sintéticos, e na produção de resinas fenólicas. É particularmente interessante o tratamento de águas residuais, em que os poluentes oxidados pela lacase fúngica originam polímeros insolúveis em água, de remoção mais fácil. A utilização das lacases fúngias em escala industrial já é uma realidade (Baldrian, 2006).

3.3.3 Indutor da Lacase

Como as aplicações biotecnológicas requerem grande quantidade de enzima, e normalmente lacases extracelulares são produzidas em pequenas quantidades (Baldrian, 2006), para melhorar a produção de lacase, vários indutores têm sido utilizados, destacando-se compostos aromáticos ou fenólicos relacionados à lignina ou derivados da lignina. Bons resultados obtidos com alguns compostos têm estimulado pesquisas para a produção de lacase em larga escala, considerando a vasta aplicabilidade industrial e ambiental desta enzima. Não existe um ótimo indutor de lacase comum a todos os fungos, havendo grande variação do indutor de acordo

com o fungo estudado. Na tabela 1 os principais indutores de lacatoses estudados nos últimos anos .

Tabela 6 Exemplos de indutores para produção de lacase fúngica

Composto	Referências
Aminoácidos	Dong et al. (2005); Levin & Forchiassin (2001); Dhawan & Kuhad (2002) .
Biotina	Dhawan & Kuhad (2002).
CuSO ₄ (Cu ⁺⁺)	Klonowska et al. (2001), Galhaup & Haltrich (2001), Galhaup et al. (2002), Levin et al. (2002), Saparrat et al. (2002a), Iyer & Chattoo (2003), Chen et al. (2004), Jaouani et al. (2005)
Ácido 3,4-dimetoxicinâmico	Sethuraman et al. (1999)
Guaiacol	Koroljova-Skorovogat'ko et al. (1998), Lee et al. (1999), Souza et al. (2004).
Etanol	Lee et al. (1999), Dekker et al. (2001), Lomascolo et al. (2003), Jaouani et al. (2005)
Brometo de etídio	Dhawan et al. (2003)
Cafeína	Souza et al. (2004)
Ácido caféico	Koroljova-Skorovogat'ko et al. (1998); Souza et al. (2004)
Ácido gálico	Lee et al. (1999), Souza et al. (2004)
Ácido benzóico	Souza et al. (2004)
Ácido p-cumárico	Souza et al. (2004)
Ácido tânico	Souza et al. (2004)
Ácido ferúlico	Sigoillot et al. (1999), Herpöel et al. (2000), Lomascolo et al (2002 e 2003), Xiao et al. (2003), Farnet et al. (2004), Souza et al. (2004)
Ácido p-hidroxibenzóico	Klonowska et al. (2001), Klonowska et al. (2002) Riboflavina Dhawan & Kuhad (2002) Tween 80 Pointing et al. (2000), Lomascolo et al. (2002); Giese et al. (2004)

Ácido vanílico	Muñoz et al. (1997), Souza et al. (2004)
Vanilina	Pérez et al. (1996), Lo et al. (2001), Xiao et al. (2003), Souza et al. (2004)
Álcool veratrílico	Munõz et al. (1997), Perié et al. (1998), Vasconcelos et al. (2000), Dekker & Barbosa (2001), Dekker et al. (2001), Couto et al. Jm yui(2003), Souza et al. (2004), Arana-Cuenca et al. (2004)
Resíduos agrícolas diversos	Rodríguez et al. (1997), Arora & Gill (2000), Hatvani & Mécs (2001), Lorenzo et al. (2002), Vikineswary et al.(2006).
Farelos diversos	Lomascolo et al. (2002), Souza & Peralta (2003), Souza et al. (2004), Moldes et al. (2004)
Lignina	Dong et al. (2005)
Ácido siríngico	Xiao et al. (2003), Souza et al. (2004) Seringaldazina Koroljova-Skorovogat'ko et al. (1998), Souza et al. (2004)
2,5-xilidina	Eggert et al. (1996b), Muñoz et al. (1997), Perié et al(1998), Lee et al. (1999), Pikard et al. (1999), Pointing et al. (2000), Min et al. (2001), Lomascolo et al. (2002), Antorini et al. (2002), Jung et al. (2002), Couto et al. (2003), Ryan et al. (2003), Souza et al. (2004), Jaouani et al. (2005)
Kraft lignin; efluente	kraft Xiao et al. (2003), Esposito et al.(1993).

Fonte: European Comission, 2002.

3.3.4 Etanol

O etanol (C₂H₅OH) é uma substância orgânica obtida da fermentação de açúcares, hidratação do etileno ou redução de acetaldeído.

O etanol é o mais comum dos alcoóis caracterizados pelo grupo hidroxila (OH) ligados a átomos de carbono sp^3 (ligações simples).

O etanol está sendo utilizado como indutor da lacase fungica, devido a seu baixo custo e baixa toxicidade e tem apresentado bons resultados. Segundo Lomascolo e colaboradores (2003) a utilização do etanol como indutor para produção de lacase é bastante interessante para aplicação industrial.

O etanol como indutor de lacase fúngica apresenta perspectivas promissoras do ponto de vista econômico e ambiental, quando comparado com a maioria dos indutores utilizados no aumento da produção de lacase fúngica (Valeriano et al, 2009).

3.3.5 Estrutura e função das lacases fúngicas

Lacases fúngicas, notadamente de fungos de decomposição branca, são produzidas tipicamente como isoenzimas que oligomerizam para formar complexos multiméricos, tanto de forma constitutiva como induzida (Claus, 2004).

Segundo Claus (2004), a massa molecular de cada monômero varia de 50 a 100 kDa, tendo estas enzimas como característica importante, a presença de carboidratos covalentemente ligados (10 – 45 %) que podem contribuir para a alta estabilidade da enzima. Para Thurston (1994), os carboidratos presentes em lacases fúngicas podem corresponder a 15 – 20 % de sua massa total. Há uma grande variação no grau de glicosilação das lacases e também controvérsias sobre a relação entre a glicosilação e presença de isoformas. Em alguns estudos, a diferença na extensão de glicosilação da enzima parece ser responsável pela presença de múltiplas isoformas, como sugerido para as três

isoformas de lacase de *Ganoderma lucidum* e como descrito para lacase B do basidiomiceto *Trametes sp.* AH28-2 (Xiao et al. 2003), mas para Palonen e colaboradores (2003) esta não seria a justificativa para a presença de oito isoformas na lacase produzida por *Mauginiella sp.* pois a deglicosilação praticamente não modificou o padrão isoelétrico da enzima.

Segundo Mayer & Staples (2002), do ponto de vista evolucionário, a lacase fúngica é uma enzima bastante antiga e a ligação da atividade enzimática associada a três diferentes sítios de cobre é um processo evolucionário muito precoce. A atividade catalítica das lacases está relacionada à presença de quatro átomos de cobre por unidade de proteína, sendo os mesmos denominados de acordo com suas características espectrofotométricas (Claus, 2004) Cobre tipo 1: apresenta absorvância em torno de 600 nm, sendo detectável em EPR. Confere típica coloração azul às enzimas multicobre que resulta da intensa absorção eletrônica causada pela ligação covalente entre cobre e cisteína. Ligados a este átomo de cobre estão duas histidinas e uma cisteína como ligantes conservados, e um ligante variável que pode ser metionina em bactérias e leucina ou fenilalanina em lacases fúngicas (Claus 2004). Discute-se bastante sobre a influência deste último ligante no potencial de oxidação da enzima e conseqüentemente na regulação da atividade da mesma (Kumar et al. 2003). O cobre tipo 1 é o local do sítio ativo da enzima onde ocorre a oxidação do substrato (Claus, 2004).

Cobre tipo 2: não é detectável espectrofotometricamente e revela propriedades paramagnéticas em estudos de EPR. Localiza-se próximo ao cobre

tipo 3 e está ligado a duas histidinas. Funciona como acceptor de um elétron (Garcia, 2006).

Cobre tipo 3: este sítio é formado por um par de átomos de cobre que apresenta uma fraca absorvância no UV próximo (330 nm) e nenhum sinal em EPR, por estarem antiferromagneticamente acoplados por meio de uma ponte de ligação hidroxila, Ligados aos átomos de cobre tipo 3 estão seis moléculas de histidina. Funcionam como acceptor de dois elétrons (Claus, 2004).

A oxidação de substratos pela lacase é catalisada pelo cobre tipo 1 sendo os elétrons destes substratos redutores transferidos posteriormente para o centro tri nuclear formado pelos átomos de cobre tipo 2 e 3, que estão fortemente unidos, formando um sítio para onde os elétrons são encaminhados levando à redução do oxigênio molecular e liberação da água (Claus 2004). Thurston (1994) propôs que os íons cobre estão fortemente ligados na lacase, sendo o cobre tipo 2 relativamente instável. Para Nagai e colaboradores (2002), íons de cobre tipo 2 podem ser removidos pelos procedimentos experimentais, inclusive durante as etapas de purificação. Segundo Gianfreda et al. 1999, os átomos de cobre diferem entre si pelo seu estado de oxidação. Esta reação de oxidação gera radicais livres que podem sofrer reações enzimáticas (Thurston 1994) ou não-enzimáticas (Claus 2004). Considerando o interesse biotecnológico desta enzima, duas reações não-enzimáticas podem ser destacadas: o cross-linking de monômeros, em que a oxidação de compostos fenólicos e anilinas por lacase geram radicais que reagem entre si para formar dímeros, oligômeros ou polímeros e assim, no solo, xenobióticos fenólicos e aminas aromáticas podem se ligar à matriz orgânica; a outra reação é a clivagem de anéis aromáticos que

possibilita a degradação de xenobióticos como corantes sintéticos e nitro aromáticos (Durán & Esposito 2000, Claus et al. 2002).

A espectroscopia combinada com cristalografia, dicroísmo circular magnético e raios-X têm possibilitado uma descrição detalhada do sítio ativo da lacase fúngica. O fato das lacases fúngica muitas vezes apresentarem múltiplas isoformas dificulta, ou acrescenta etapas de purificação até obtenção de material apto à cristalografia (Olempska-Beer et al, 2006), pois esta técnica requer amostras absolutamente purificadas, com carga homogênea, ou seja, não pode haver a presença de isoformas de diferentes pl na amostra a ser cristalizada. Nos últimos anos algumas lacases foram cristalizadas (Antranikian, 2005) inclusive isoenzimas de *P. cinnabarinus* (Olempska-Beer et al, 2006). Segundo Mayer & Staples (2002), a estrutura do sítio ativo parece bem conservada nas lacases fúngicas, mas há uma grande diversidade quanto ao restante da estrutura da proteína e quanto ao seu conteúdo de açúcares. Estudos de alinhamento da seqüência de aminoácidos de diversas lacases identificaram 4 regiões conservadas como específicas de lacases (L1 – L4), sendo que os 12 aminoácidos ligantes dos átomos de cobre encontram-se nestas regiões (Antranikian, 2005; Olempska-Beer et al, 2006).

Trabalhos recentes sobre lacases fúngicas de diferentes origens têm mostrado divergências no número de átomos de cobre e em seu espectro característico (Xiao et al. 2003). Couto & Herrera (2006) mencionaram a ocorrência das seqüências típicas de aminoácidos para os três sítios de cobre em lacase de *Gaeumannomyces*

graminis apesar de não apresentar o característico pico de absorção próximo a 600 nm.

O cobre tipo 3 está ausente nas duas lacases de *Pleurotus florida* e na lacase de *P. eryngii*. Há outros relatos de enzimas denominadas lacases que não apresentam a típica absorção próximo a 600 nm, indicando ausência do cobre tipo 1, sendo estas denominadas de lacase branca ou lacase amarela. Para Mayer & Staples (2002), estas enzimas não deveriam ser consideradas lacases porque nas mesmas o cobre encontra-se na forma reduzida. A lacase branca estudada por Antranikian, (2005) não apresentou os típicos quatro átomos de cobre, mas sim um átomo de cobre, dois de zinco e um de ferro. O fungo *Pleurotus ostreatus* D1, quando cultivado em meio sólido (Pozdnyakova et al. 2006) produziu uma lacase amarela que difere da lacase azul quanto à ausência do pico próximo a 600 nm, o espectro de EPR e o espectro de dicroísmo circular (DC), mas que por outro lado, além de atuar sobre substratos tipicamente estudados para lacase, é capaz de oxidar compostos não fenólicos mesmo na ausência de mediadores. Resultado semelhante já havia sido relatado por Leontievsky e colaboradores (2001) para lacase do fungo *Panus tigrinus* quando este foi cultivado em meio sólido rico em lignina, sugerindo que a lacase amarela seja o resultado de uma modificação da lacase azul pelos produtos originados da degradação da lignina.

Entre a diversidade de compostos oxidados pela lacase, a oxidação da seringaldazina na ausência de H_2O_2 é típica para identificação de lacase fúngica. 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. A reação com a seringaldazina gera inicialmente um radical livre. Em seguida ocorre a liberação do segundo elétron através de ação enzimática e/ou desprotonação, formando uma quinona de coloração púrpura intensa e que aparentemente não é propensa à polimerização (Thurston 1994), figura 1.

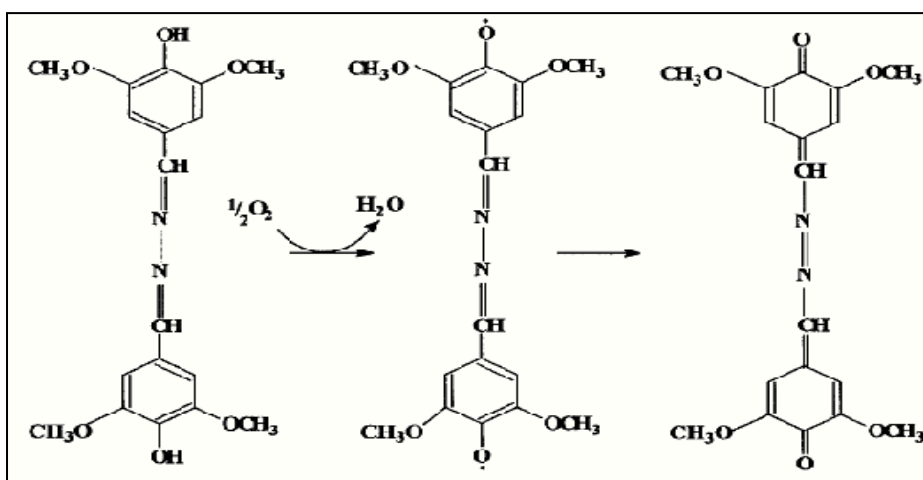


Figura 1. Reação de oxidação da seringaldazina até formação da correspondente quinona. Fonte: Sanchez-Amat & Solano, 1997.

3.4 Meios de Cultura.

Os meios de cultura são utilizados com a finalidade de cultivar e manter microrganismos viáveis no laboratório, sob a forma de culturas puras (Neder, 2004).

Os meios de culturas devem ter na sua composição, os nutrientes indispensáveis ao crescimento do organismo em questão, sob forma assimilável e em concentração não inibitória do crescimento. Além disso, após a sua preparação, cada meio de cultura deve ser submetido a esterilização, para eliminar qualquer organismo vivo contaminante (Lima et al., 2005).

Por outro lado, para manter uma cultura pura é necessário que o meio de cultura que se pretende utilizar seja mantido desprovido de qualquer organismo vivo contaminante. Para prevenção de contaminações durante a manipulação de culturas puras recorre-se a técnicas de assepsia (Neder, 2004)

De um ponto de vista geral, os meios de cultura podem ser classificados tendo em conta o seu estado físico, a sua composição química e os objetivos funcionais a que se destinam (Lima et al., 2005).

A especificidade dos meios de cultura é muito importante, nomeadamente no isolamento e identificação de certos microrganismos (por exemplo, no isolamento de microrganismo do solo) ou em testes de sensibilidade a antibióticos ou na análise microbiológica de águas, de alimentos, e outros (Neder, 2004).

3.4.1 Fontes de nutrientes regionais da Amazônia

3.4.2 Cupuaçu - *Theobroma grandiflorum*

Quadro taxonômico

Reino: Plantae

Família: Malvaceae

Gênero: *Theobroma*

Espécie: *grandiflorum*

A árvore pode chegar a 15 metros de altura. É uma fruta típica da região da floresta amazônica. Os frutos apresentam forma esférica ou ovóide e medem até 25 cm de comprimento. A casca da fruta é de consistência dura e lisa. Sua cor é

castanho-escuro, quase preta. A época da fruta é de janeiro a maio. A fruta é rica em proteínas, cálcio e fósforo. Possui vitamina A, B₁, B₂ e C. É rica em pectina, além das vitaminas e sais minerais. A fruta é muito usada para fabricação de sucos, sorvetes, geléias, vinhos e licores. As flores são grandes de cor vermelha escura, são as maiores do gênero. As sementes da fruta ficam envoltas por uma polpa branca, ácida e aromática (Vasconcelos et al, 2005).

O cupuaçu pertence a mesma família do cacau (*Theobroma cacao*), espécie da qual se obtêm o chocolate. O cultivo do cupuaçu é restrito aos estados da região Norte. Desenvolve-se em solos pobres, pode ser cultivado em plantios homogêneos ou em consórcio com outras espécies em sistemas agroflorestais (Lourido et al, 2007).

Porém, a casca do fruto do cupuaçuzeiro é resíduo de biomassa agrícola que em produtores utilizam para fabricação de adubo orgânicos, mais na maioria das vezes são aglomerados em um lugar perto da área de processamento dos frutos, contribuindo para proliferação de pragas e doenças que incidem sob a cultura do cupuaçuzeiro. A casca do cupuaçu “in natura” apresenta percentual de carbono 45,1%, hidrogênio 5,82% e nitrogênio 0,84% segundo Vasconcelos et al, (2005).

3.4.3 Abricó - *Mammea americana*

Quadro Taxonômico

Reino: Plantae

Família: Guttiferae

Gênero: *Mammea*

Espécie: *Americana*

Nomes Populares: abricó, abricoteiro, albricoque, abricó-selvagem, abricó-do-Pará, abricó-de-São Domingos, e abricó das Antilhas.

É cultivado em toda Amazônia. Sua polpa é consumida geralmente em maceração com açúcar ou em salada de frutas, podendo servir para o preparo de licor. O teor de proteína da fruta é baixo, não alcançando os 8% necessários para satisfazer às necessidades diárias humanas. A quantidade de zinco atinge o nível necessário de ingestão recomendada por dia para um adulto que é de 5 mg/1000 cal e o abricó contém 9,8 mg/1000 cal. O abricó mostra um alto conteúdo de umidade, cerca de 85% e também um alto conteúdo energético (64,2 K cal). O abricó demonstrou que é portador de um elevado teor de vitamina A (carotenóides - 5130 ug/100 g; retinol 855 ug/100 g e retinol 13318 ug/1000 cal), apresentando assim um grande potencial para o enriquecimento da dieta Amazônica, segundo Aguiar e colaboradores (2003).

Os frutos de abricó são drupas globosas e volumosas, de 12-18 cm de diâmetro, peso de até 1Kg casca rugosa, coriáceo-flexível de cor pardo-alaranjada, mesocarpo constituído de uma polpa compacta, firme, fibrosa, cor de abóbora, sementes ovaladas, planoconvexas, com 6-8 cm de comprimento, imersas na polpa e envolvidas pelo endocarpo rugoso (Vasconcelos et al, 2005).

3.4.4 Batata – *Solanum tuberosum*

Quadro Taxonômico

Reino: Plantae

Família: Solanaceae

Gênero: *Solanum*

Espécie: *Tuberosum*

A batata é originária do Peru, e é um dos vegetais mais utilizados no mundo. Existem seis outras espécies do gênero *Solanum*, com menor importância. Já a relação com a batata-doce é pequena, pois não compartilham gênero ou família, fazendo parte apenas da mesma ordem. Cultivam-se atualmente milhares de variedades de batatas.

Recente pesquisa baseada no DNA comprovou que todas as variedades da batata descendem de uma única variedade de planta originária do sul do Peru. Esta mesma pesquisa evoca evidências arqueológicas de que o vegetal ali já era cultivado há 7.000 anos para efeito de alimentação humana.

Em 1570 a batata foi levada para a Espanha, de lá se disseminando para a Europa e depois para todo o mundo. Atualmente, a cultura mundial atinge a cifra de cerca de 300.000.000 toneladas/ano. A batata é rica em grãos de amido, tem vitamina B e C e é rica em ferro e zinco (Bernardi, 2008).

4 MATERIAL E METÓDOS

O desenvolvimento metodológico da pesquisa foi dividido em três etapas: A 1º etapa está relacionada com a avaliação do pH no crescimento micelial, 2º etapa produção de biomassa fúngica sob condição de agitação e estacionária e na presença e ausência do indutor e a 3º etapa concerne a atividade da lacase sob condição de agitação e estacionária e na presença e ausência do indutor.

1º ETAPA

4.1 Avaliação do pH no crescimento micelial

Este experimento foi realizado nos laboratórios de biorgânica e proteômica ambos na Universidade do Estado do Amazonas – UEA, no departamento do programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia – MBT/UEA.

4.1.1 Fungo *Trametes lactinea* (UEA_10202).

4.1.1.1 Obtenção do material biológico

Carpóforos do fungo *Trametes lactinea* com seus respectivos substratos (porção de madeira usada como fonte de nutriente do fungo) foram coletados no perímetro urbano da cidade de Manaus, na qual foram acondicionados em sacos de papel com as devidas informações sobre o local, data de coleta, coletor e tipo de substratos identificados e levados ao Laboratório de Biorgânica e Recursos Naturais

da Amazônia – UEA, onde foram armazenados em câmara de refrigeração científica em temperatura de 28 °C. No dia seguinte, após a coleta, os fungos foram identificados e secos à temperatura ambiente para que posteriormente possam ser utilizadas.

4.1.1.2 Isolamento e Repicagem do Fungo

Para efetuar a inoculação do material fúngico foi utilizada a metodologia proposta por Bettucci & Guerrero (1971). Utilizou-se um estilete no qual foi retirado de cada carpóforo fúngico pedaços de 3mm de uma de suas extremidades, a qual passou por um procedimento de assepsia através de lavagens sucessivas em solução de álcool 70% (1 ou 2 minutos), hipoclorito de sódio a 3% (1 ou 2 minutos) e água destilada (2 minutos).

Seguindo a metodologia proposta por Castro e Silva (1996), a inoculação do fungo ocorreu em meio de cultura agar acrescido de ampicilina (200g), procedimento este executado em ambiente estéril (interior da câmara de fluxo laminar). Para evitar contaminação foram armazenadas em estufa incubadora (BOD) à temperatura de 28 °C por um período de 7 dias, para o crescimento do fungo.

Após este procedimento, foi realizada uma nova repicagem em meio BDA, para obtenção de uma cultura pura. As placas foram novamente incubadas em BOD por um período de 7 dias para o crescimento do fungo em toda a superfície do meio de cultura.

4.2 Avaliação do Crescimento Micelial

O crescimento micelial foi avaliado através da observação do fungo na placa de petri, onde foi mensurado o crescimento pela progressão linear da fronteira micelial, sendo as medidas tomadas em duas direções perpendiculares, a cada 24 horas até que atinja todo o diâmetro da placa. A mensuração do raio da colônia permitiu avaliar o crescimento micelial que ocorreu pela extensão da ponta da hifa.

4.3 Condições de Crescimento

4.3.1 Meios de Cultura

Para obtenção da avaliação do crescimento micelial foi feito o cultivo em meio sólido, no qual foram utilizados três meios de cultura (dois regionais da Amazônia) tais como: Abriçó (*Mammea americana*), Batata (*Solanum tuberosum*) e resíduo de Cupuaçu (*Theabroma granoliflorum*).

No preparo dos meios de cultura utilizou-se 200g de polpa regional exceto do cupuaçu que utilizou-se 200g do resíduo da casca do cupuaçu, adicionado a 1000ml de água destilada e, cozidos durante 30 minutos. O caldo foi filtrado em papel de filtro e adicionado 10g de glicose e 15g de ágar. Os meios de cultura foram previamente esterilizados em autoclave 121°C por 15 minutos.

4.3.2 Avaliação do pH

A avaliação da influência do pH no crescimento micelial foi testada em placa de petri inoculada com pequenos fragmentos da cultura do fungo *Trametes lactinea* contendo os meios de cultura (abriçó, batata e resíduo de cupuaçu) conforme

descrito no item 4.3.1 com os seguintes valores de pH 4, 6 e 9. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4 Taxa de Crescimento do Fungo

A taxa de crescimento do fungo foi definida como a razão entre a média da progressão da fronteira micelial e o número de dias de crescimento do fungo.

2° ETAPA

4.5 Produção de Biomassa Fúngica

4.5.1 Meios de Cultura para Obtenção de Biomassa

Para obtenção de biomassa foi feito o cultivo em meio líquido, no qual foram utilizados três meios de culturas (abricó, batata e resíduo de cupuaçu).

No preparo dos meios de cultura utilizou-se 200g de polpa, exceto do cupuaçu que utilizou-se 200g do resíduo da casca, acrescido a 700ml de água destilada e, cozidos durante 30 minutos. O caldo foi filtrado em papel de filtro e 15g de glicose foi adicionada a solução e o volume completado com uma quantidade suficiente para 1000ml de água destilada.

Ajustou-se o pH com hidróxido de sódio (NaOH 0,1N) e ácido clorídrico (HCl 0,1N) com auxílio de um pHmetro para pH 4 e posteriormente os meios foram esterilizados a 121°C durante um período de 15 minutos.

4.6 Padronização do Cultivo em Meio Líquido

4.6.1 Meios de Cultura Líquida

4.6.1.1 Preparo do Inóculo

Foram retiradas frações de 10mm de diâmetro do micélio de fungo e transferidos para 200ml de caldo do meio (abricó, batata e resíduo de cupuaçu) em erlenmeyer com capacidade de 250ml, no qual posteriormente foram incubadas em estufa BOD sob condição estacionária na presença e ausência do indutor etanol na concentração (20 mol.L^{-1}) em uma temperatura padrão de 28°C , na condição de agitação (Shaker – 180rpm) e estacionária, por um período de 22 dias. Foi feita triplicata para cada meio de cultura tanto em relação na condição estacionária quanto na de agitação, na presença e ausência do indutor.

4.7 Determinação da Biomassa Micelial

A obtenção da biomassa seca foi obtida através do processo de filtração do caldo de cultivo seguido do processo de secagem após o período de 22 dias. Para filtração utilizou-se o filtro Watman nº1 previamente pesado e a secagem foi realizada em estufa elétrica com circulação forçada à temperatura de 50°C até peso constante.

A massa micelial será expressa pela seguinte equação:

$$\text{MM (\%)} = \frac{\text{Pf} - \text{Pi}}{\text{Pi}} \times 100, \text{ onde:}$$

Pi = Peso seco do papel filtro (peso inicial)

PF= Peso seco do papel filtro após filtragem (peso final)

M M = Peso micelial em porcentagem

Esta etapa metodológica é observada de forma resumida abaixo:

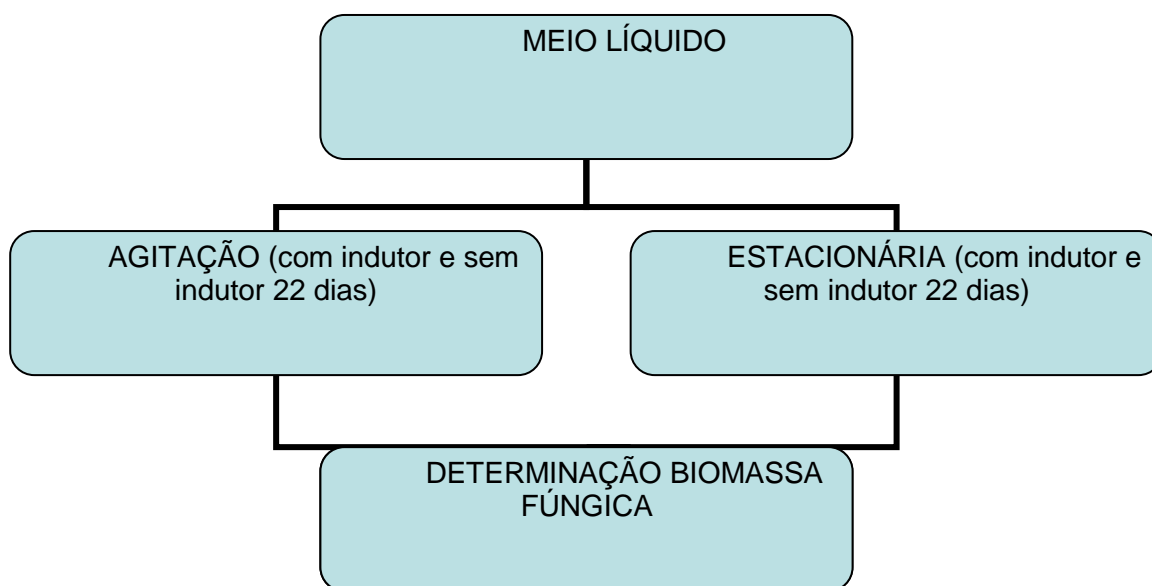


Figura 2: Esquema da Biomassa Fúngica

3º ETAPA

4.8 Atividade Enzimática da Lacase

O isolado amazônico do fungo *Trametes lactinea* foi cultivado nos três meios de cultura propostos (abricó, batata e resíduo de cupuaçu). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e sob duas condições distintas: 1) Condição de agitação a 180 rpm; com indutor e sem indutor a 28°C e pH 4; 2) Condição estacionária com indutor e sem indutor a 28°C e pH 4.

Amostra de 2ml de cada meio de cultivo foram consideradas como fonte enzimáticas. Essas amostras foram coletadas a cada dois dias durante 22 dias (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22) para observação da produção enzimática da lacase.

A atividade da lacase segue metodologia proposta por Szklarz et al (1989). O método baseia-se na oxidação do substrato enzimático de siringaldazina para sua forma quinona, que apresenta absorção a 525 nm (ϵ 65.000 M⁻¹ cm⁻¹). Uma unidade de atividade da lacase corresponde à quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μ mol de substrato por minuto. Para determinação de atividade lacase utilizou-se: 0,5 ml de caldo de cultura filtrado; 0,3 ml tampão citrato fosfato a pH5; 0,1 ml de solução etanólica de siringaldazina (1,0 mM) e 0,1 ml de água destilada.

Em seguida, os reagentes foram misturados em um tubo de eppendorf e colocados em uma cubeta de vidro para espectrofotômetro. O branco para zerar o espectrofotômetro deverá conter todos os reagentes exceto caldo (trocar por água destilada).

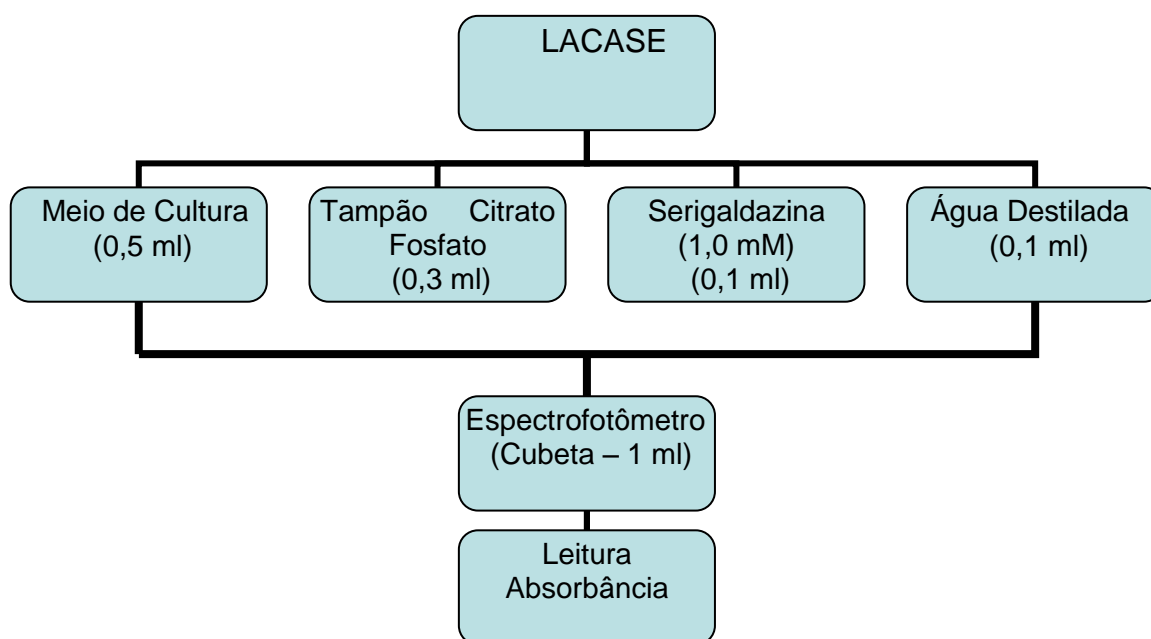


Figura3: Esquema da atividade enzimática - lacase

4.9 Análise Estatística

Para análise estatística dos dados foi utilizado o software R Development Core Team, versão 2.10.1. O Teste de Kruskal-Wallis foi usado para determinação da diferença mínima estatística dos dados, a nível de 1% de significância.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do pH no crescimento micelial do fungo *Trametes lactinea*.

Os resultados demonstraram (figura 4, 5 e 6) que o melhor pH para o crescimento micelial do fungo *Trametes lactinea* foi o pH4, em todos os meios utilizados.

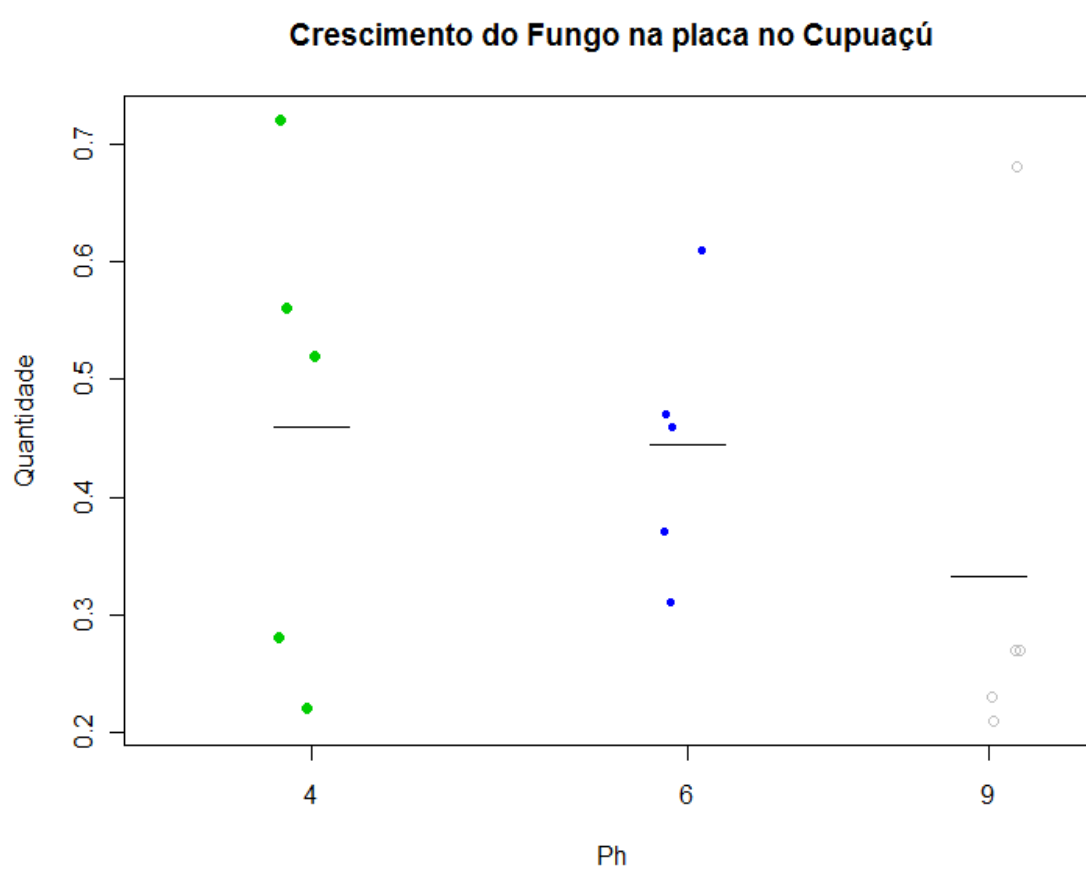


Figura 4 – Gráfico de dispersão em torno da média comparando o crescimento micelial do fungo *Trametes lactinea* em meio suplementado com resíduo de cupuaçu nos diferentes pHs (4, 6 e 9).

Crescimento do Fungo na placa na Batata

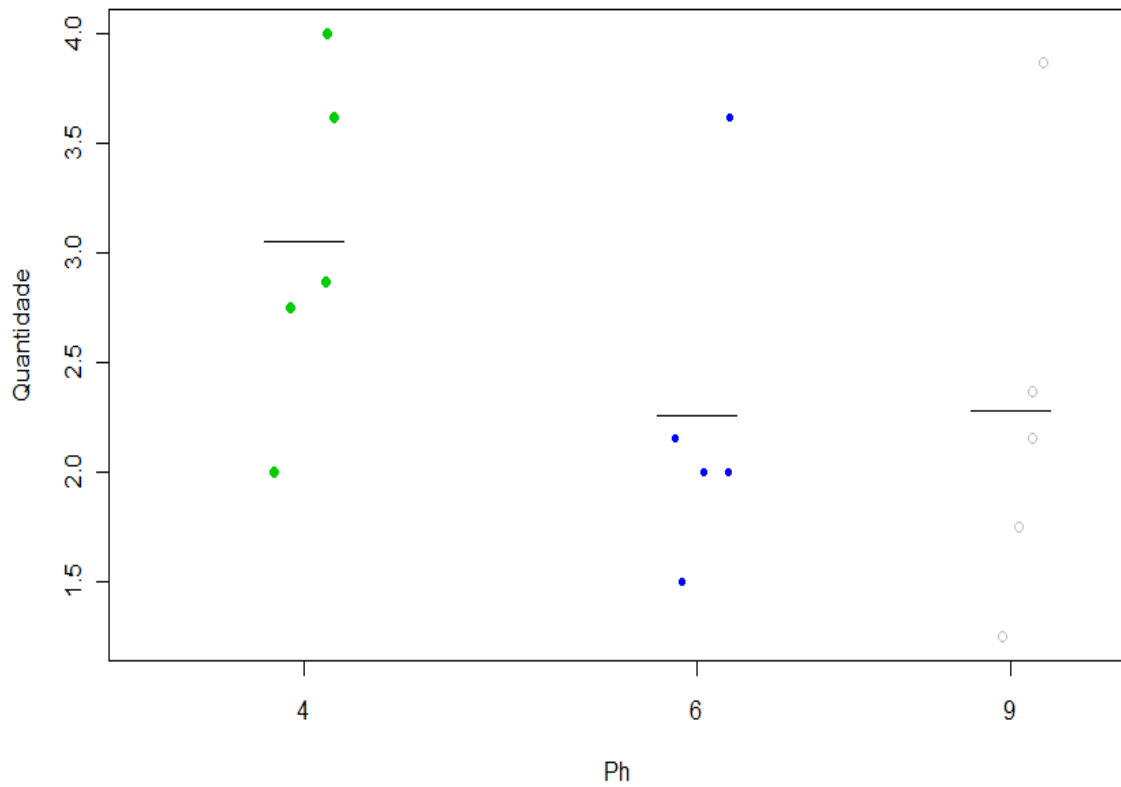


Figura 5 – Gráfico de dispersão em torno da média comparando o crescimento micelial do fungo *Trametes lactinea* em meio suplementado com batata nos diferentes pHs (4, 6 e 9).

Crescimento do Fungo na placa no Abricó

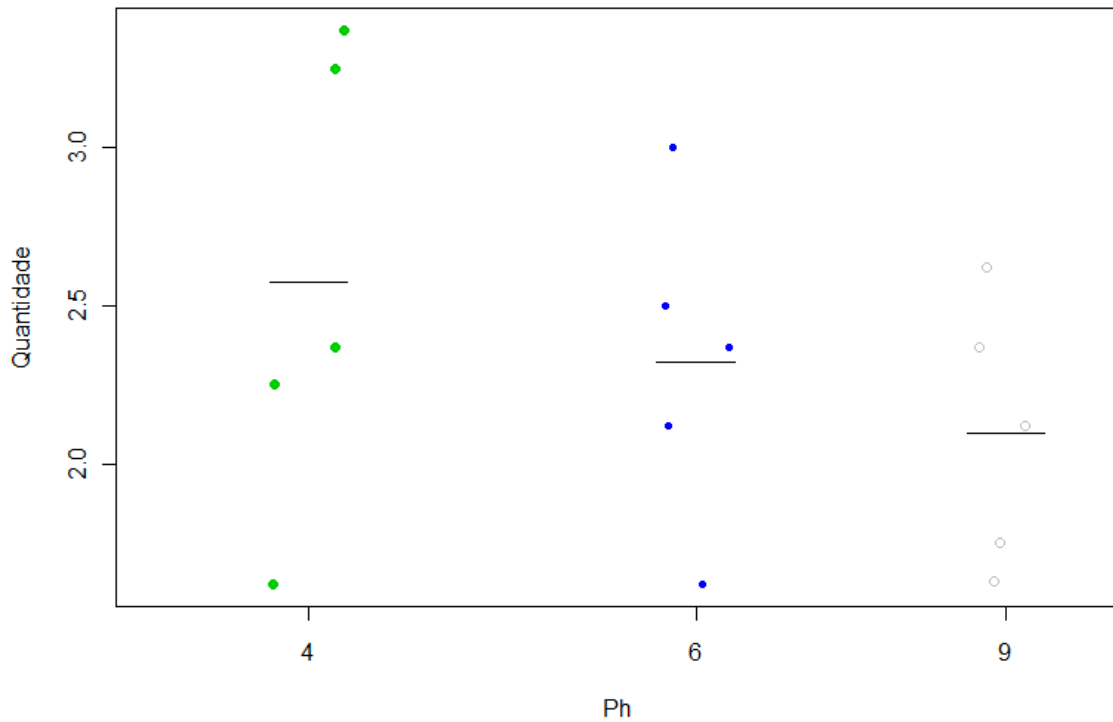


Figura 6 – Gráfico de dispersão em torno da média comparando o crescimento micelial do fungo *Trametes lactinea* em meio suplementado com abricó nos diferentes pHs (4, 6 e 9).

O teste de Kruskal-Wallis evidenciou ao nível de 1% de significância que ocorreu diferença estatística entre os pHs testados. Constatou-se nos experimentos realizados, que o crescimento micelial do fungo *Trametes lactinea* nos diferentes meios de cultura testados foi influenciado diretamente pela condição do pH.

5.2 Produção de Biomassa

5.2.1 Produção de Biomassa sob Condição de Agitação sem Indutor.

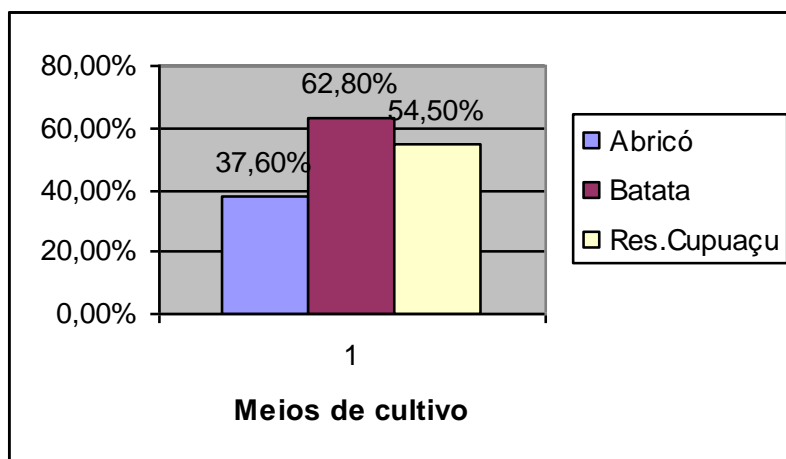


Figura 7 – Produção de Biomassa de *Trametes lactinea* em diferentes meios de cultura sob condição de agitação sem indutor.

Nos testes realizados sob condição de agitação sem indutor ocorreu produção de biomassa micelial em todos os meios testados para *Trametes lactinea*. O *Trametes lactinea* apresentou a maior produção de biomassa no meio suplementado com batata no período de vinte e dois dias de incubação, seguido dos meios de cupuaçu e abriçó

5.2.2 Produção de Biomassa sob Condição de Agitação com indutor

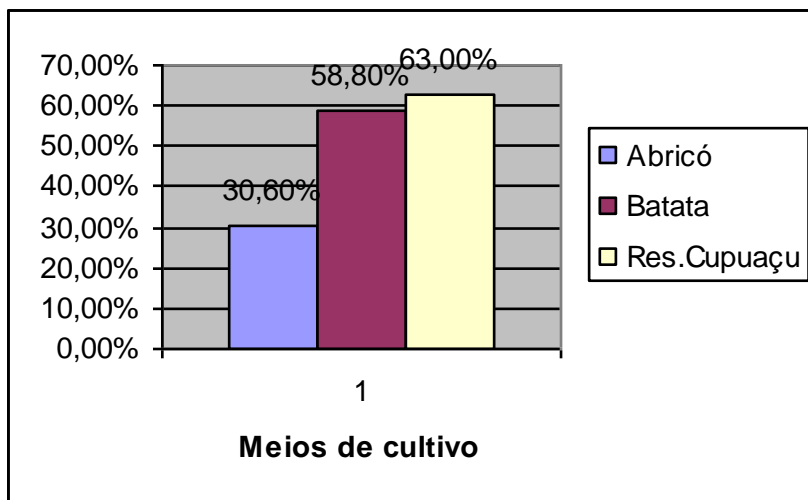


Figura 8 – Produção de Biomassa de *Trametes lactinea* em diferentes meios de cultura, sob condição de agitação com indutor.

Em todos os meios de cultura houve produção de biomassa para o fungo *Trametes lactinea*, na condição de agitação com indutor, no período de vinte e dois dias de incubação. Os dados demonstraram que nos testes realizados com os meios testados sob condição de agitação com indutor, a maior produção de biomassa do fungo *T. lactinea* ocorreu no meio suplementado com cupuaçu e já a menor produção de biomassa deu-se no meio acrescido de abrió.

5.2.3 Produção de biomassa sob condição estacionária sem indutor.

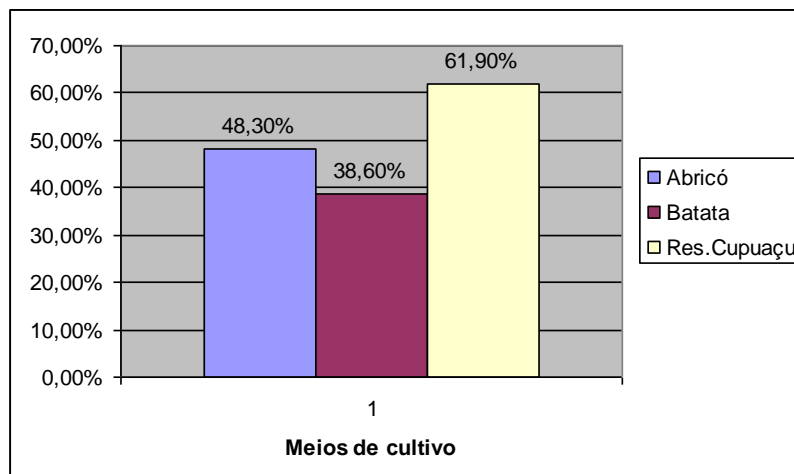


Figura 9 – Produção de Biomassa de *Trametes lactinea* em diferentes meios de cultura, sob condição estacionária sem indutor.

Os resultados mostraram que em todos os meios de cultura houve produção de biomassa na condição estacionária sem indutor para o fungo *Trametes lactinea*. A maior produção de biomassa do fungo *T.lactinea* ocorreu no meio suplementado com cupuaçu e a menor produção deu-se no meio acrescido de batata, na condição estacionária sem indutor, no período de vinte e dois dias de incubação.

5.2.4 Produção de biomassa sob condição estacionária com indutor.

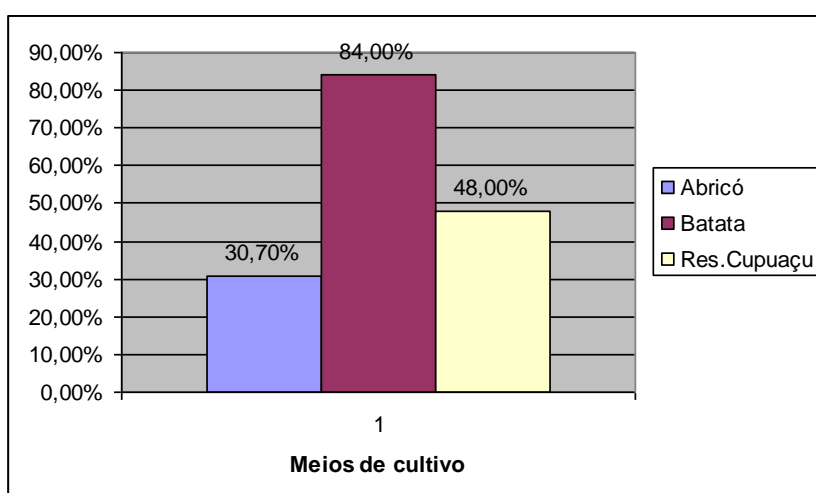


Figura 10 – Produção de Biomassa de *Trametes lactinea* em diferentes meios de cultura, sob condição estacionária com indutor.

Nos testes realizados com os meios de abricó, batata e cupuaçu sob condição estacionária com indutor ocorreu produção de biomassa em todos os meios testados para *Trametes lactinea*. A maior produção de biomassa do fungo *T.lactinea* ocorreu no meio suplementado com batata e a menor produção foi no meio acrescido de abricó, na condição estacionária com indutor, no período de vinte e dois dias de incubação.

5.2.5 Produção de Biomassa Micelial: Condição Estacionária versus Agitação e Com Indutor versus Sem indutor.

Tabela 7– Produção de Biomassa de *Trametes lactinea* em diferentes meios de cultivo sob condições de Agitação/Estacionária/Indutor/Sem Indutor.

MEIOS DE CULTURA			
Condições de Crescimento	Abricó	Batata	Resíduo de Cupuaçu
Agitação/ Sem indutor	37,6%	62,8%	54,5%
Agitação/ Com Indutor	30,6%	58,8%	63,0%
Estacionária/ Sem Indutor	48,3%	38,6%	61,9%
Estacionária/ Com Indutor	30,7%	84,0%	48,8%

De modo geral, a produção de biomassa mostrou-se diferenciada nas condições de crescimento testadas e na presença ou ausência de indutor, nos diferentes meios utilizados. A maior produção de biomassa do fungo *Trametes lactinea* ocorreu no meio suplementado com batata na condição estacionária com indutor, em comparação com os demais meios e condições testadas. A menor produção de biomassa de *T.lactinea* se deu no meio suplementado com abricó sob condição de agitação com indutor. Comparando todos os experimentos realizados, de modo geral, constatou-se que o meio suplementado com abricó, foi o que menos produziu biomassa em todas as condições testadas, com exceção da condição estacionária sem indutor.

Tabela 8 – Teste de Kruskal-Wallis para a produção de biomassa do fungo *Trametes lactinea*, dos meios de cultura testados.

Fontes de Variação	Grau de Liberdade (GL)	Diferença Mínima Significativa (LSD)	(p)	Variáveis	Médias da ordem
TRATAMENTO	2	4,43	0,0581		
GRUPOS				Abricó (b)	3
				Batata (a)	8,5
				Cupuaçu (a)	8,0

*Letras iguais significam que não existe diferença estatística ($p > 0,01$) ao nível de 1% de significância

O Teste de Kruskal-Wallis, evidenciou ao nível de 1% de significância (tabela 8) que não há diferença estatística significativa entre a biomassa produzida pelo meio suplementado com batata em relação aquele com cupuaçu. A produção de biomassa do meio suplementado com abricó é estatisticamente menor aos demais meios testados para o basidiomiceto *Trametes lactinea*.

Tabela 9 – Teste de Kruskal-Wallis para a produção de biomassa do fungo *Trametes lactinea* nas condições de crescimento (agitação e estacionária) nos diferentes meios.

Fontes de Variação	Grau de Liberdade (GL)	Diferença Mínima Significativa (LSD)	(p)	Variáveis	Médias da ordem
TRATAMENTO	1	4,77	0,522		
GRUPOS				Agit(a)	7.17
				Est (a)	5,83

*Letras iguais significam que não existe diferença estatística ($p > 0,01$) ao nível de 1% de significância

A produção de biomassa do fungo *Trametes lactinea* não apresentou diferença estatística entre a condição de crescimento de agitação e estacionária (tabela9), avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, nos diferentes meios testados (figura 11).

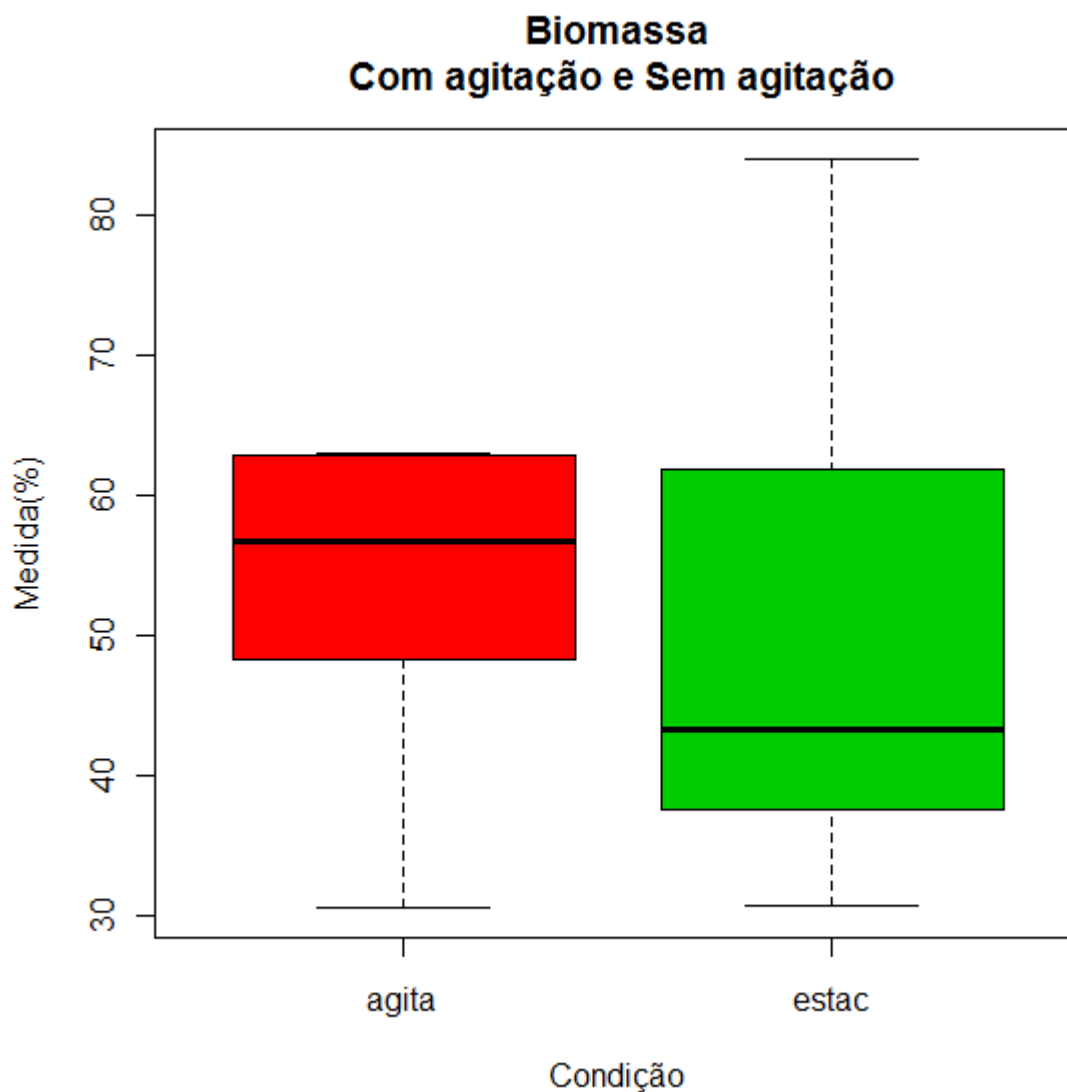


Figura 11 – Gráfico comparando a produção de biomassa na condição estacionária e agitação do fungo *Trametes lactinea*

Tabela 10 – Teste de Kruskal-Wallis para a produção de biomassa do fungo *Trametes lactinea* com indutor e sem indutor nos diferentes meios.

Fontes de Variação	Grau de Liberdade (GL)	Diferença Mínima Significativa (LSD)	(p)	Variáveis	Médias da ordem
TRATAMENTO	1	4,86	1		
GRUPOS				Ind(a)	6,5
				Sem Ind (a)	6.5

*Letras iguais significam que não existe diferença estatística ($p > 0,01$) ao nível de 1% de significância

O teste de Kruskal-Wallis demonstrou (tabela 10) que não há diferença mínima estatística entre os meios de cultura testados com indutor e sem indutor para o fungo *Trametes lactinea* (tabela 10 – figura 12).

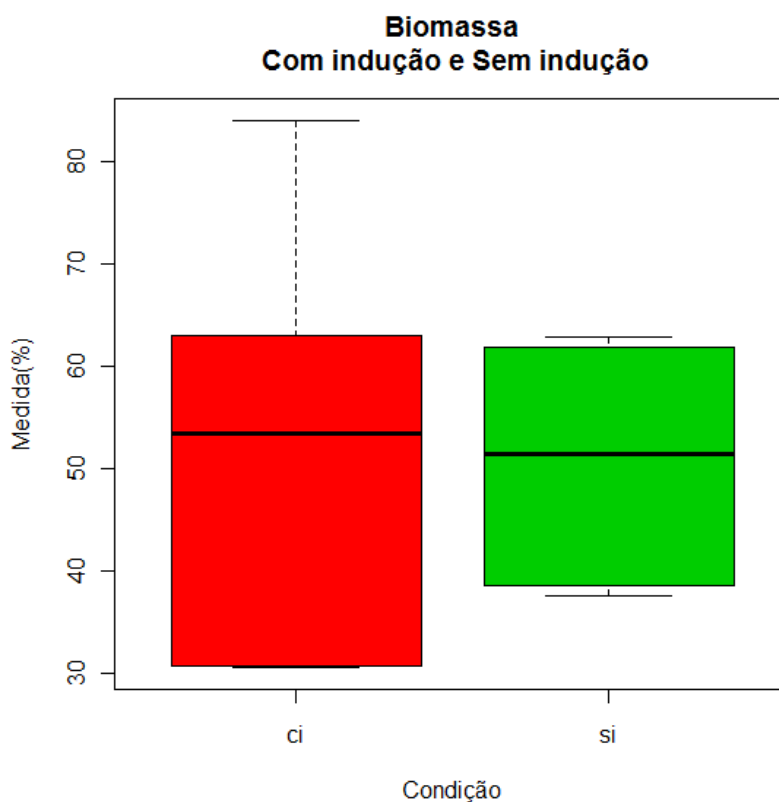


Figura 12 – Gráfico comparando a produção de biomassa com indutor e sem indutor do fungo *Trametes lactinea*

De modo geral, os resultados indicaram que a produção de biomassa micelial do fungo *Trametes lactinea* não foi afetada pelas condições de crescimento (agitação e estacionária) e nem pela adição de indutor, somente pelos meios de cultura diferentes.

5.3 Atividade Enzimática da Lacase de *Trametes lactinea*.

5.3.1. Atividade da lacase de *Trametes lactinea* nos diferentes meios de cultura no período de vinte e dois dias.

As figuras 13, 14 e 15 mostram a atividade da lacase no meio suplementado com abricó, na condição estacionária, na presença e ausência do indutor, no período de vinte e dois dias de incubação do fungo *Trametes lactinea*. Os resultados demonstraram (figuras 13, 14 e 15) que a produção de lacase foi maior no meio suplementado com abricó, na condição estacionária, sem indutor, em comparação ao indutor na dose de 100ul e com indutor na dose de 200ul (figuras 13, 14 e 15). O padrão da atividade da lacase na dose de 100ul do indutor mostrou-se similar do da dose de 200ul, na condição estacionária no período de vinte e dois dias do fungo *Trametes lactinea*.

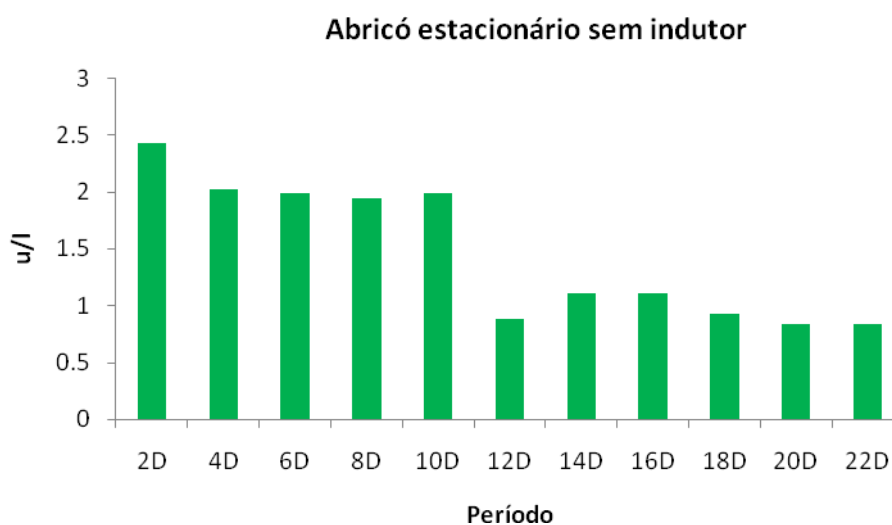


Figura 13 – Atividade da lacase de *Trametes lactinea* no meio suplementado com abricó, na condição estacionária, sem indutor.

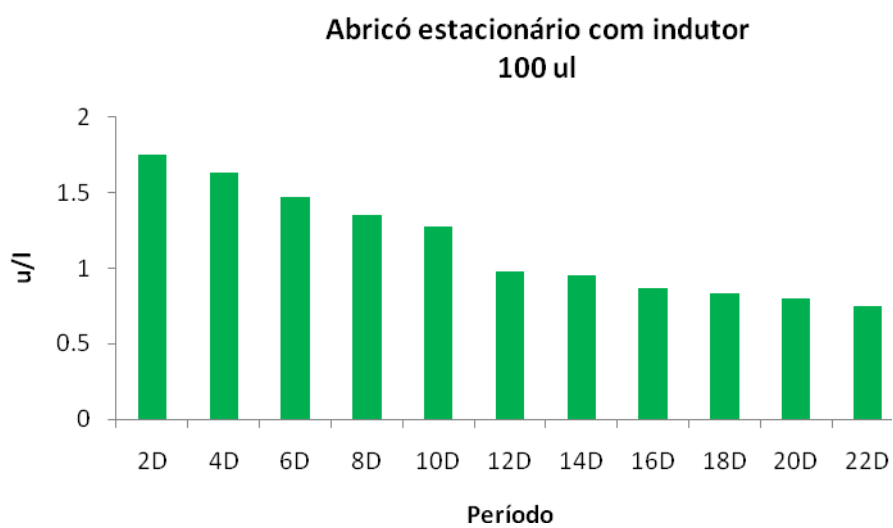


Figura 14 – Atividade da lacase de *Trametes lactinea* no meio suplementado com abricó, na condição estacionária, com indutor (100ul)

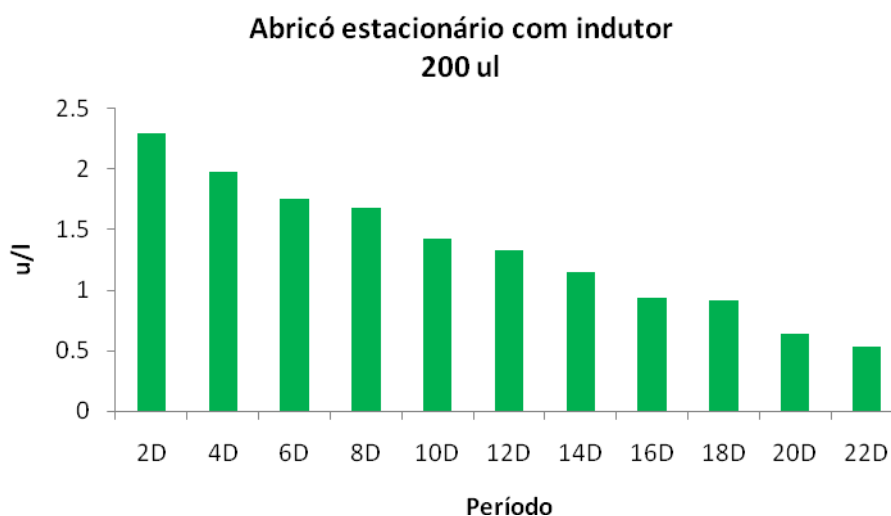


Figura 15: Atividade da lacase de *Trametes lactinea* no meio suplementado com abricó, na condição estacionária, com indutor (200ul)

O meio suplementado com abricó, apresentou a maior atividade de lacase, na condição de agitação, sem indutor durante todo o período de vinte e dois dias de incubação do fungo *T.lactinea*. Os dados demonstraram que ocorreu maior produção da lacase na dose de 200ul em relação a dose de 100ul do indutor, no meio de abricó (figuras 16,17 e 18), na condição de agitação para o fungo *T.lactinea*. Por outro lado, o padrão da atividade da lacase na dose de 100ul do indutor mostrou-se similar do da dose de 200ul (figuras 17 e 18) na condição de agitação, no período de vinte e dois dias de *T.lactinea*.

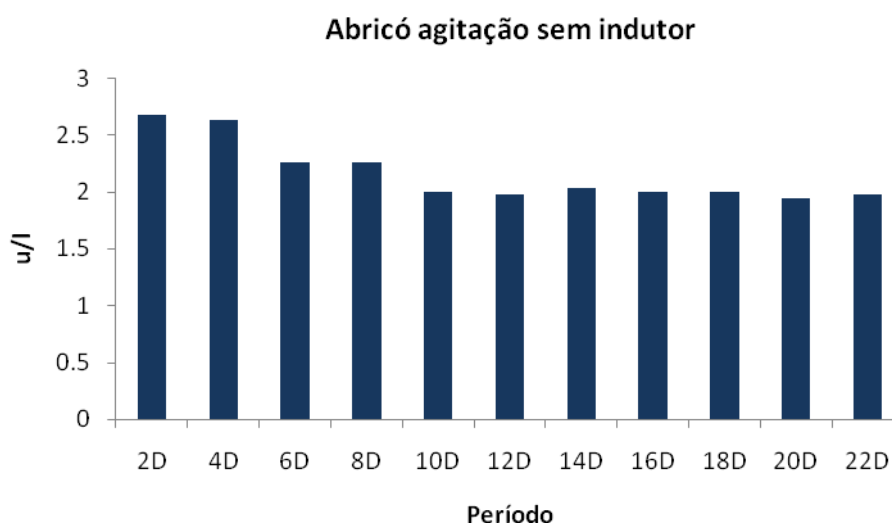


Figura 16: Atividade da lacase de *Trametes lactinea* no meio suplementado com abricó, na condição de agitação, sem indutor.

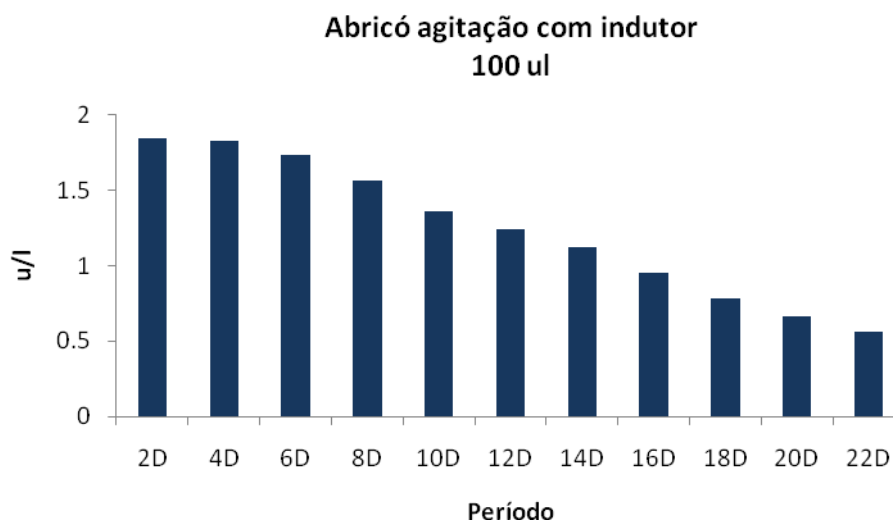


Figura 17: Atividade da lacase de *Trametes lactinea* no meio suplementado com abricó, na condição de agitação, com indutor (100uI)

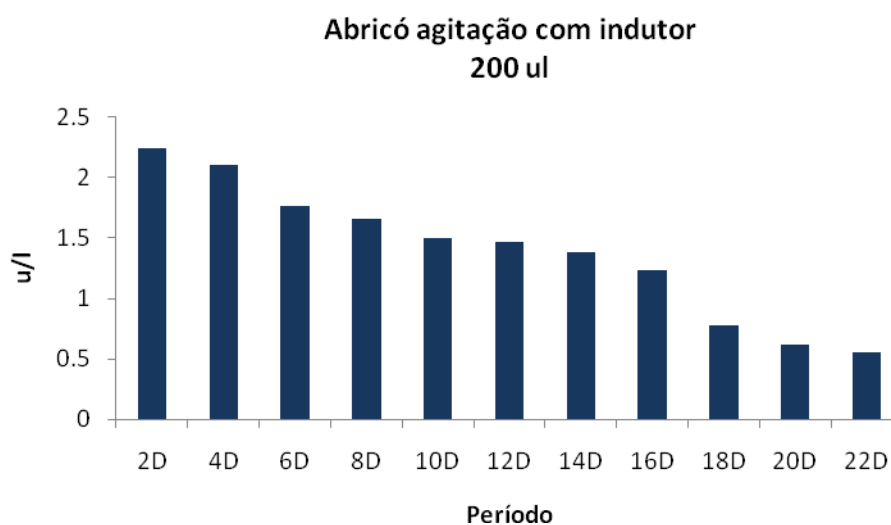


Figura 18: Atividade da lacase de *Trametes lactinea* no meio suplementado com abricó, na condição de agitação, com indutor (200ul)

As figuras 19, 20 e 21 mostram a atividade da lacase no meio suplementado com batata, na condição estacionária, na presença e ausência do indutor, no período de vinte e dois dias de incubação do fungo *Trametes lactinea*. A atividade da lacase foi maior no meio suplementado com batata, na condição estacionária, na dose de 200ul do indutor, durante todo o período de incubação do fungo *T.lactinea* (figuras 19, 20 e 21). Na dose de 100ul do indutor, o pico máximo de atividade enzimática ocorreu no décimo segundo dia de incubação, enquanto que na dose de 200ul foi no segundo dia de incubação do fungo *T.lactinea*.

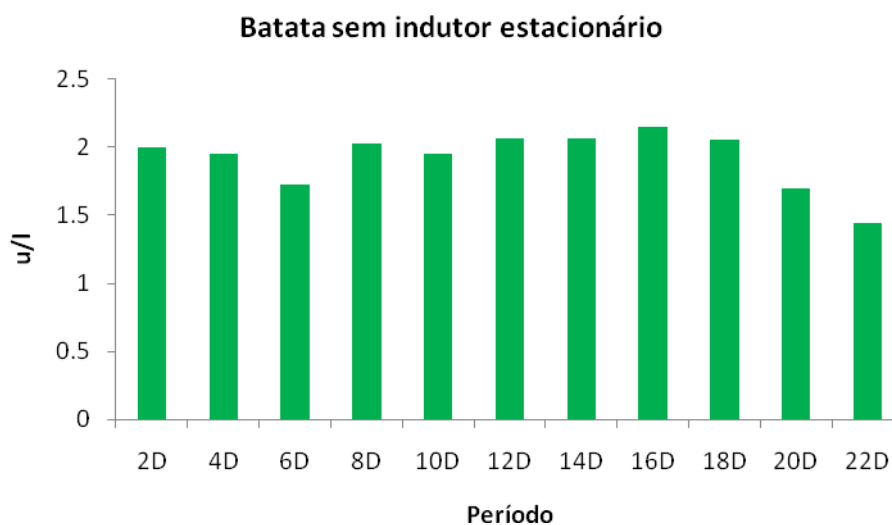


Figura 19: Atividade da lacase de *Trametes lactinea* no meio suplementado com batata, na condição estacionária, sem indutor.

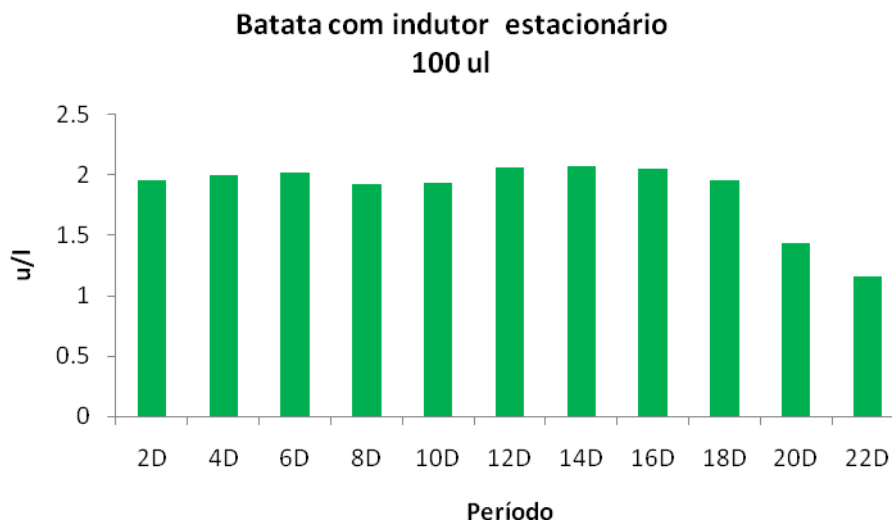


Figura 20: Atividade da lacase de *Trametes lactinea* no meio suplementado com batata, na condição estacionária, com indutor (100ul).

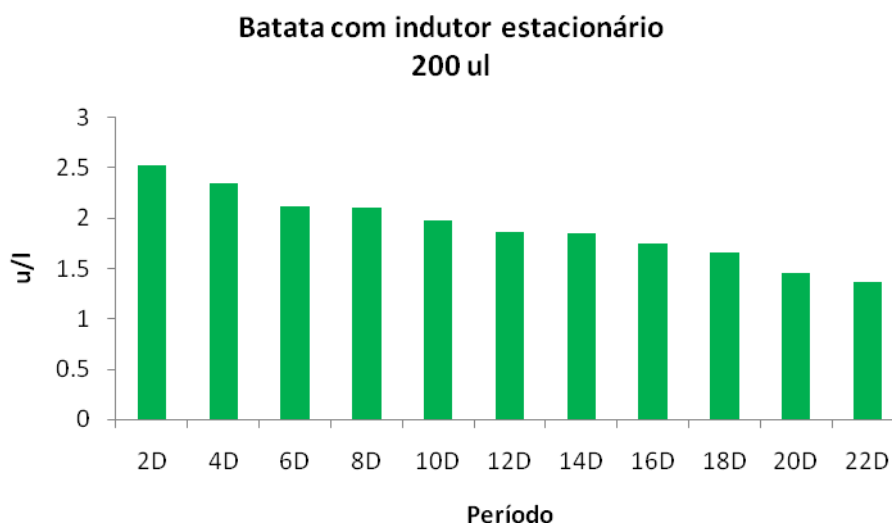


Figura 21: Atividade da lacase de *Trametes lactinea* no meio suplementado com batata, na condição estacionária, com indutor (200ul).

No meio suplementado com batata, na condição de agitação, com indutor, o padrão de atividade da lacase foi diferente nas duas doses de indutor (figuras 23 e 24). Na dose de 100ul do indutor, o pico máximo de atividade enzimática ocorreu no oitavo dia, enquanto que na dose de 200ul foi no décimo segundo dia de incubação do fungo *Trametes lactinea*. Notificou-se que a atividade da lacase foi maior na dose de 100ul do que na de 200ul de indutor. Outrossim, constatou-se que o fungo *T.lactinea* sem indutor produziu mais lacase do que com indutor, no meio suplementado com batata, na condição de agitação (figuras 22, 23 e 24).

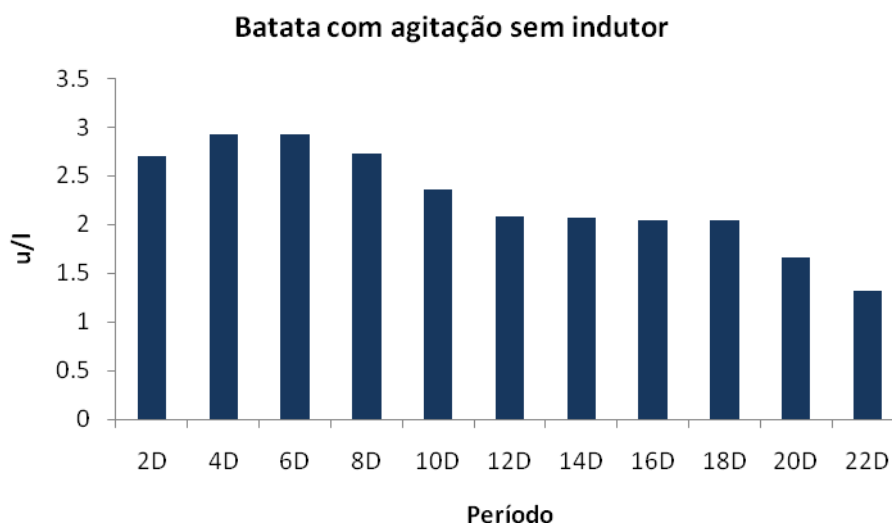


Figura 22: Atividade da lacase de *Trametes lactinea* no meio suplementado com batata, na condição de agitação, sem indutor.

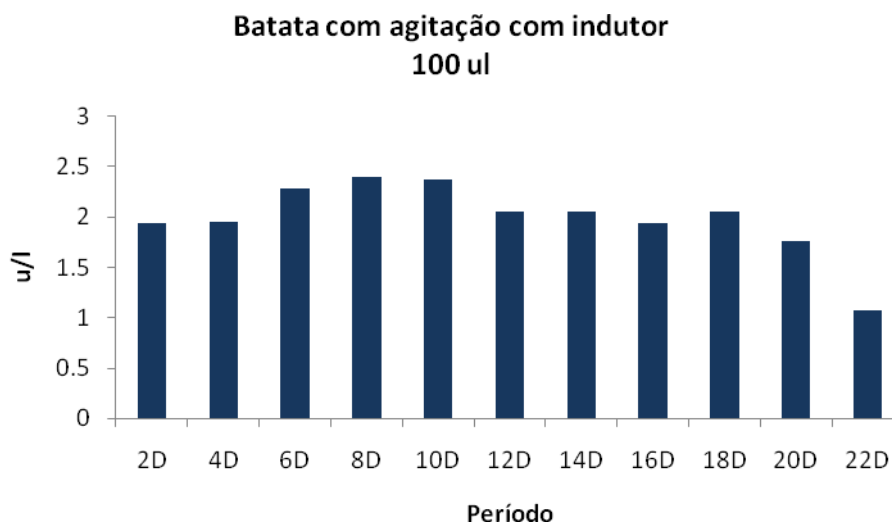


Figura 23: Atividade da lacase de *Trametes lactinea* no meio suplementado com batata, na condição de agitação, com indutor (100ul).

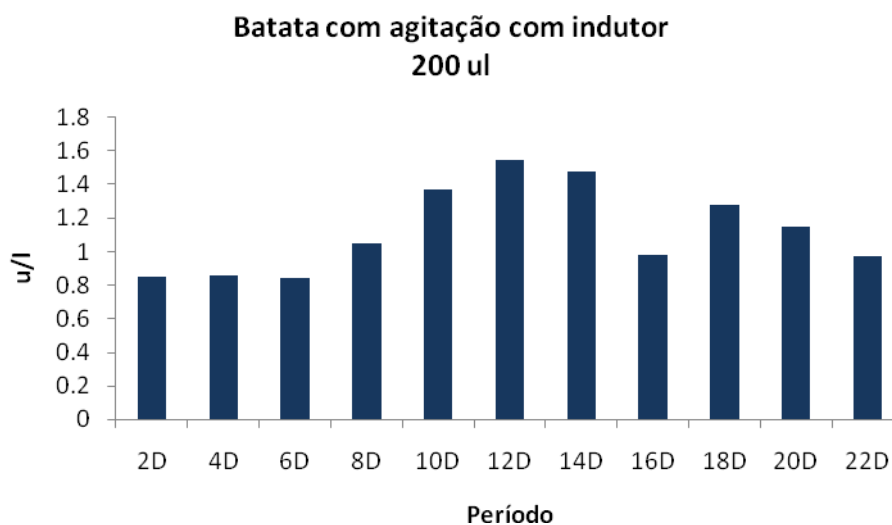


Figura 24: Atividade da lacase de *Trametes lactinea* no meio suplementado com batata, na condição de agitação, com indutor (200ul).

As figuras 25, 26 e 27 exibem a atividade da lacase no meio suplementado com cupuaçu, na condição estacionária na presença e ausência do indutor, no período de vinte e dois dias de incubação do fungo *Trametes lactinea*. No meio suplementado com cupuaçu, na condição estacionária, com indutor, verificou-se diferenças no perfil da atividade da lacase nas duas doses testadas (figuras 26 e 27). Na dose de 100ul do indutor, o pico máximo de atividade da lacase foi no vigésimo dia, enquanto que na dose de 200ul ocorreu no sexto dia de incubação do fungo *Trametes lactinea*. A maior produção da lacase, no meio suplementado com cupuaçu, na condição estacionária ocorreu com indutor na dose de 200ul.

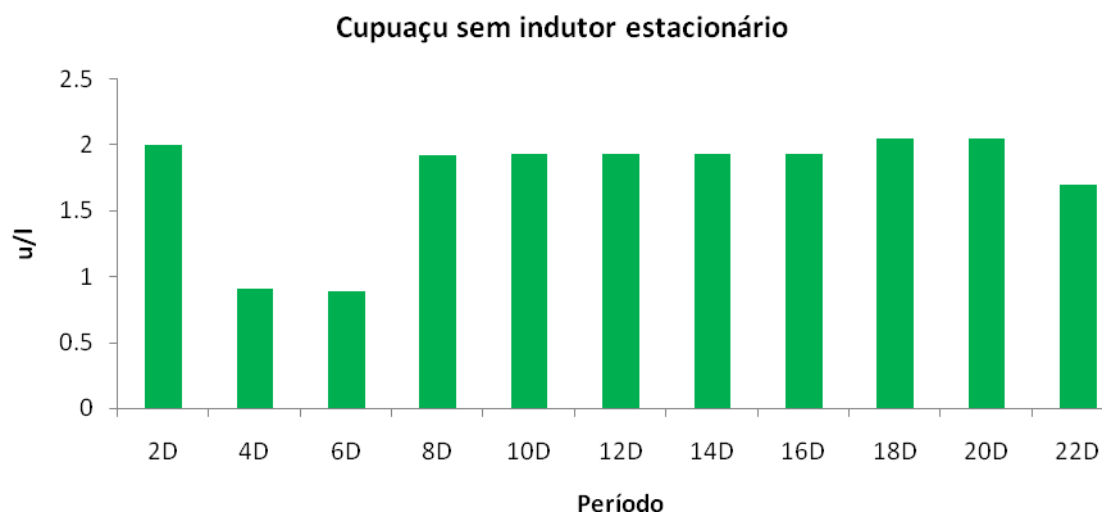


Figura 25: Atividade da lacase de *Trametes lactinea* no meio suplementado com cupuaçu, na condição estacionária, sem indutor.

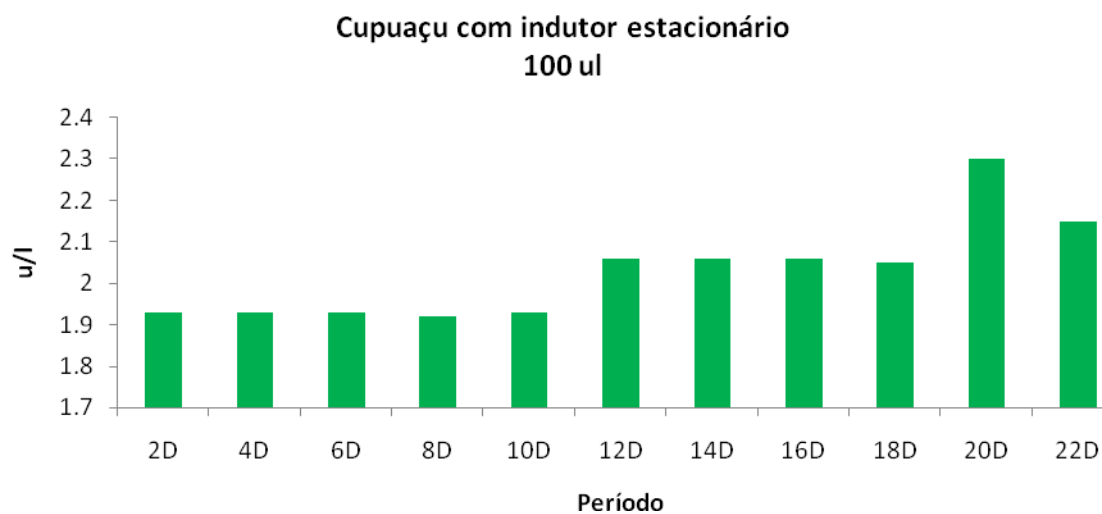


Figura 26: Atividade da lacase de *Trametes lactinea* no meio suplementado com cupuaçu, na condição estacionária, com indutor (100ul).

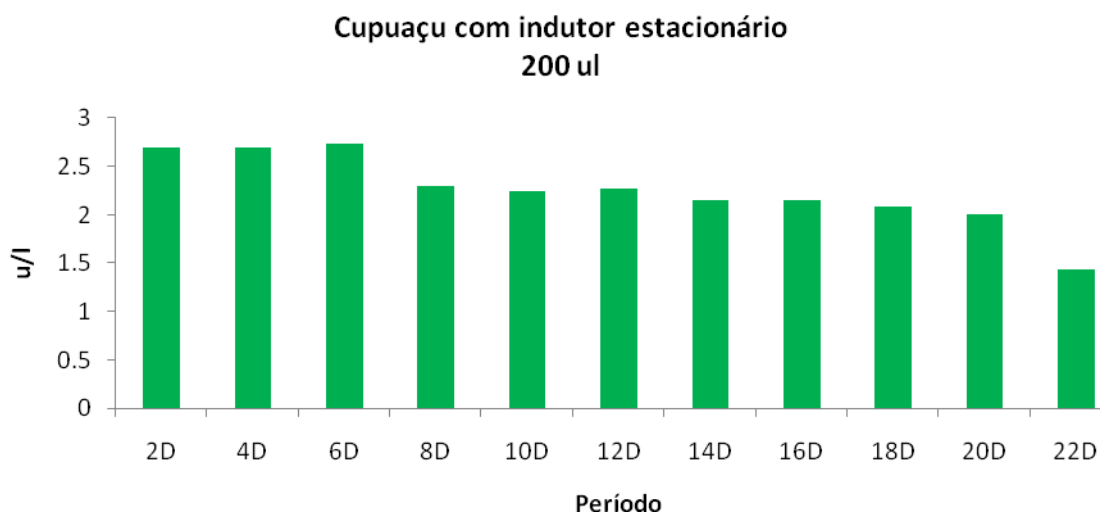


Figura 27: Atividade da lacase de *Trametes lactinea* no meio suplementado com cupuaçu, na condição estacionária, com indutor (200ul).

No meio suplementado com cupuaçu, na condição de agitação, com indutor, o padrão de atividade da lacase não foi similar nas duas doses para o fungo *Trametes lactinea* (figuras 29 e 30). Na dose de 100ul do indutor, o pico máximo de atividade enzimática ocorreu no décimo dia, enquanto que na dose de 200ul foi no quarto dia de incubação do fungo *Trametes lactinea*. Constatou-se que a atividade da lacase foi maior na dose de 100ul do que na de 200ul (figuras 29 e 30). Verificou-se também que o fungo *T.lactinea* sem indutor produziu mais lacase do que com indutor na dose de 200ul e indutor na dose de 100ul, no meio suplementado com cupuaçu, na condição de agitação (figuras 28, 29 e 30).

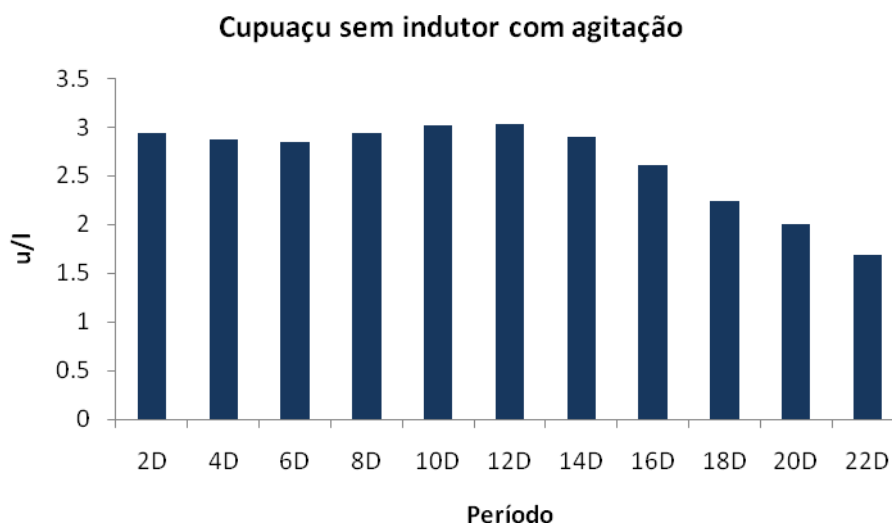


Figura 28: Atividade da lacase de *Trametes lactinea* no meio suplementado com cupuaçu, na condição de agitação, sem indutor.

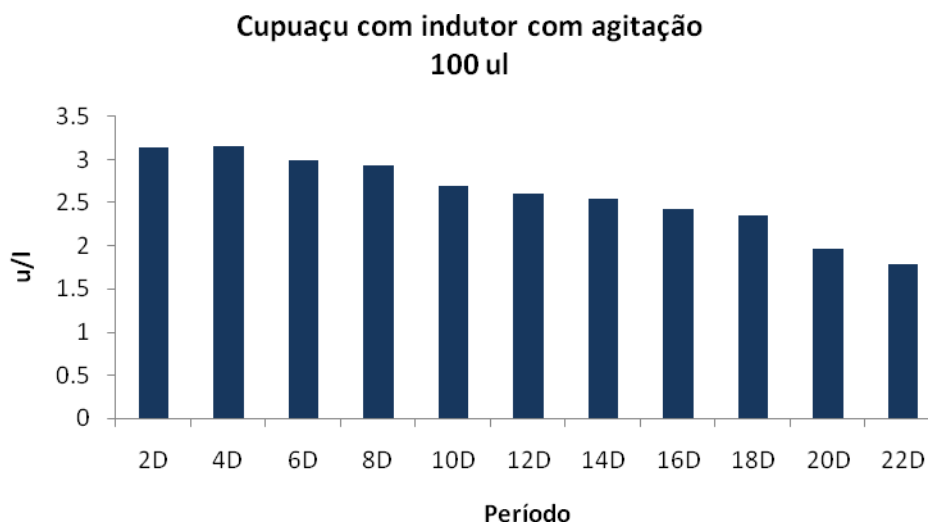


Figura 29: Atividade da lacase de *Trametes lactinea* no meio suplementado com cupuaçu, na condição de agitação, com indutor (100ul)

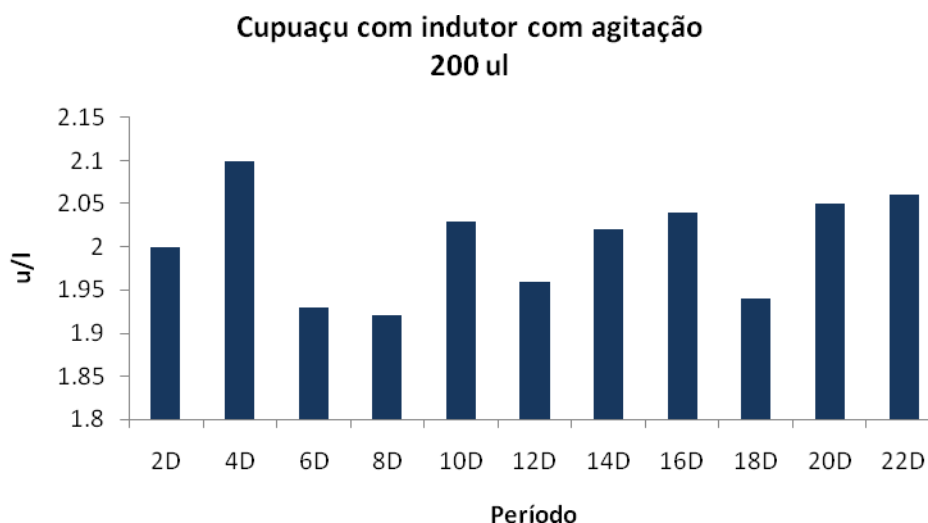


Figura 30: Atividade da lacase de *Trametes lactinea* no meio suplementado com cupuaçu, na condição de agitação, com indutor (200ul).

5.3.2. Produção da Lacase sob Condição de Agitação Sem Indutor

Tabela 11: Parâmetros descritivos da lacase dos fungos testados sob condição de agitação, sem indutor, no período de 22 dias.

Meios de Cultura	Média Aritimética	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação
Abricó	2,15	0,27	12,40
Batata	2,26	0,52	23,03
Cupuaçu	2,64	0,46	17,33

Nos testes realizados em meios de cultivo sob condição de agitação sem indutor houve produção de lacase em todos os meios testados para *Trametes lactinea* (tabela 11). Verificou-se que a maior média de produção de lacase do fungo *T.lactinea* ocorreu no meio suplementado com cupuaçu. Os resultados indicaram ainda que a menor produção observada foi no meio suplementado com abricó para o fungo *T.lactinea* (tabela 11) nas condições testadas.

5.3.3 Produção de Lacase sob Condição de Agitação com Indutor

Tabela 12: Parâmetros descritivos da lacase dos fungos testados sob condição de agitação, com indutor, no período de 22 dias.

Meios de Cultura	Média Aritimética	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação
Abricó	1,31	0,51	38,91
Batata	1,56	0,54	34,59
Cupuaçu	2,30	0,44	19,05

Em todos os meios de cultura na condição de agitação com indutor houve produção de lacase para o fungo *Trametes lactinea* (tabela 12). Os dados indicaram que na condição de agitação, com indutor, o meio suplementado com cupuaçu foi o que apresentou o melhor resultado e o meio suplementado com abricó mostrou a menor produção de lacase do fungo *Trametes lactinea*, nos experimentos realizados (tabela 12).

5.3.4. Produção de Lacase sob Condição Estacionária Sem Indutor

Tabela 13: Parâmetros descritivos da lacase dos fungos testados sob condição estacionária, sem indutor, no período de 22 dias.

Meios de Cultura	Média Aritimética	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação
Abricó	1,45	0,61	41,74
Batata	1,91	0,21	11,00
Cupuaçu	1,74	0,43	24,65

Verificou-se nos resultados, que em todos os meios de cultivo testados na condição estacionária sem indutor, o fungo *T.lactinea* apresentou produção de

lacase (tabela 13). Em valores absolutos a produção de lacase do fungo *T.lactinea* foi maior no meio suplementado com batata e menor naquele de abricó (tabela 13).

5.3.5. Produção de Lacase sob Condição Estacionária Com Indutor

Tabela 14: Parâmetros descritivos da lacase dos fungos testados sob condição estacionária, com indutor, no período de 22 dias.

Meios de Cultura	Média Aritimética	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação
Abricó	1,24	0,46	37,7
Batata	1,89	0,32	16,84
Cupuaçu	2,14	0,29	13,75

Em todos os meios de cultura, na condição estacionária com indutor houve produção de lacase para o fungo *T.lactinea* (tabela 14). Em valores absolutos *T.lactinea* apresentou a maior produção de lacase no meio suplementado com cupuaçu no período de vinte e dois dias, seguido dos meios de batata e abricó (tabela 14).

5.3.6. Produção da lacase de *Trametes lactinea* nos diferentes meios de cultura nas duas condições de crescimento (agitação e estacionária) e na presença ou ausência de indutor.

De modo geral, o meio de cultura que ocorreu maior produção de lacase foi o meio suplementado com cupuaçu, e já a menor produção desta enzima do fungo *T.lactinea* foi no meio suplementado com abricó, nas condições utilizadas nos experimentos. Os dados apresentados na tabela 11 demonstraram que ocorreu diferença estatística significativa entre os meios suplementados com abricó, batata e cupuaçu para o basidiomiceto *T.lactinea*, utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 15: Teste de Kruskal-Wallis para avaliação da diferença mínima significativa da atividade da lacase do fungo *Trametes lactinea*, dos meios de cultura testados.

Fontes de Variação	Grau de Liberdade (GL)	Diferença Mínima Significativa (LSD)	(p)	Variáveis	Médias da ordem
TRATAMENTO	2	17.14186	0.02966		
GRUPOS				Abriçó (a)	133.575
				Batata (B)	101.030
				Cupuaçu (c)	63.893

*Letras iguais significam que não existe diferença estatística ($p > 0,01$) ao nível de 1% de significância

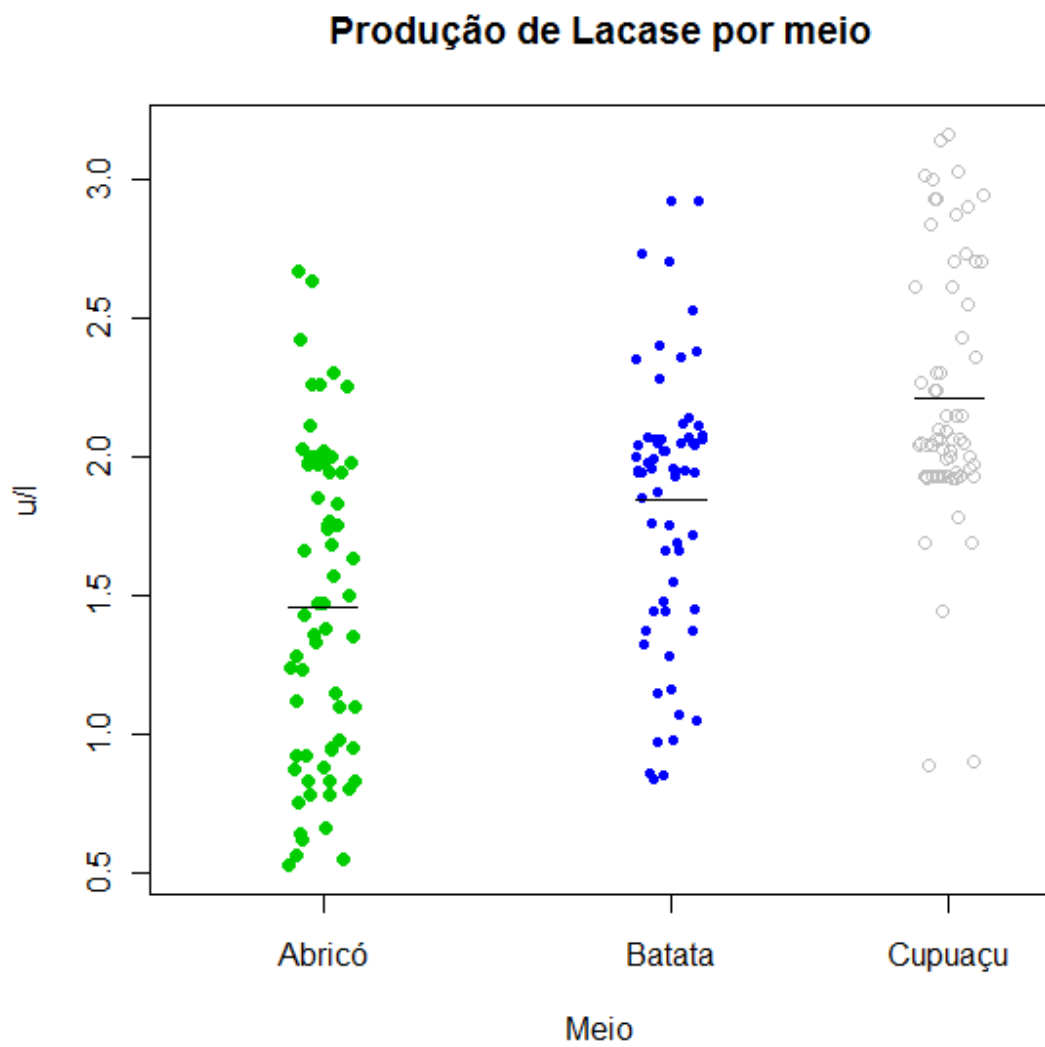


Figura 31 – Gráfico de Dispersão em torno da média comparando a produção da lacase de *Trametes lactinea* nos diferentes meios de cultura (abricó, Batata e cupuaçu).

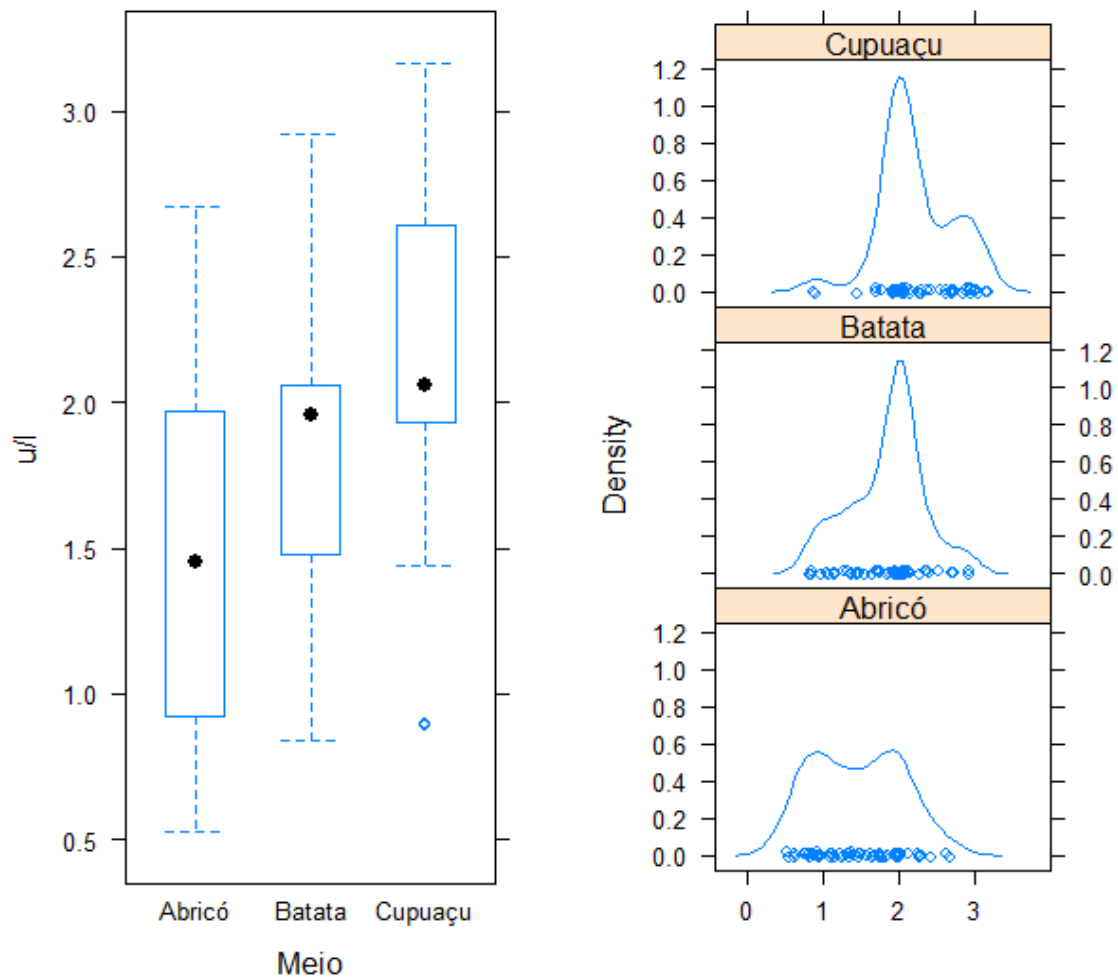


Figura 32 – Gráfico boxplot e da curva de densidade comparando os três meios de cultura na produção de lacase do fungo *Trametes lactinea*

Os resultados indicaram que de modo geral na condição de agitação ocorreu maior produção de lacase do que na condição estacionária para o fungo *Trametes lactinea*, em todos os experimentos realizados (figura 31 e 32).

Tabela 16: Teste de Kruskal-Wallis para avaliação do fungo *Trametes lactinea* nas condições de crescimento (agitação e estacionária) nos diferentes meios.

Fontes de Variação	Grau de Liberdade (GL)	Diferença Mínima Significativa (LSD)	(p)	Variáveis	Médias da ordem
TRATAMENTO	1	15.90564	0.02966		
GRUPOS				Agit(a)	108.353
				Est (b)	90.646

*Letras iguais significam que não existe diferença estatística ($p > 0,01$) ao nível de 1% de significância

Os resultados exibidos na tabela 16 demonstraram que ocorreu diferença estatística significativa entre as condições de agitação e estacionária do fungo *Trametes lactinea*, nos experimentos realizados, utilizando o teste de Kruskal- Wallis.

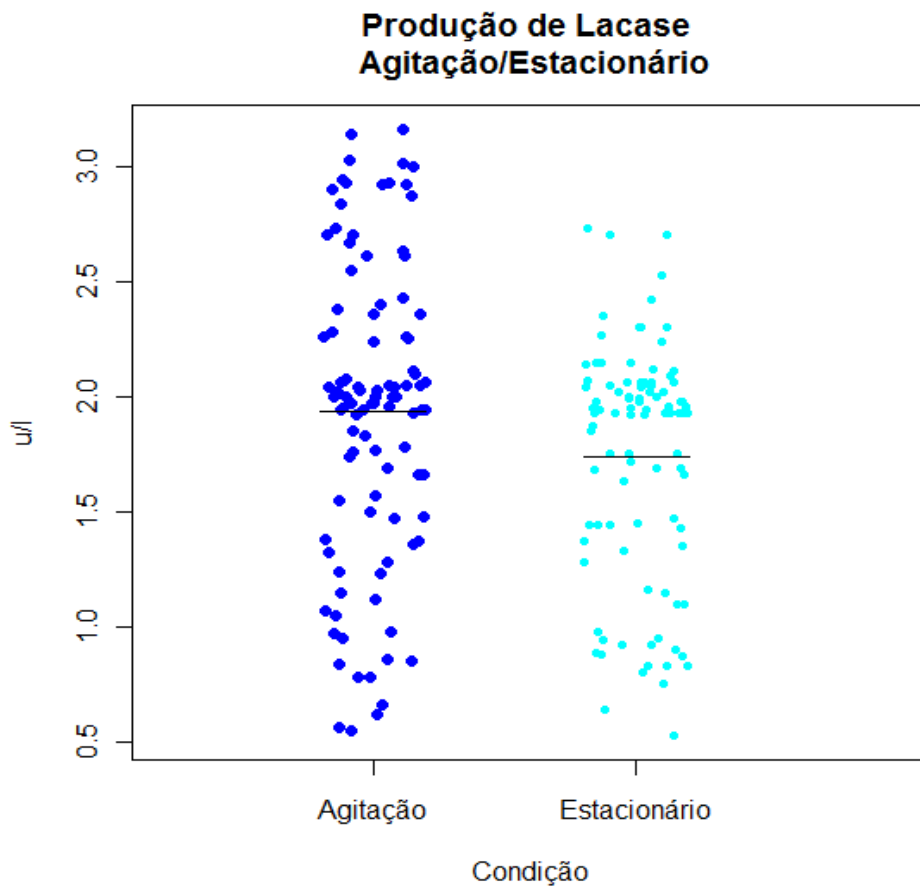


Figura 33 – Gráfico de Dispersão em torno da média comparando a produção da lacase de *Trametes lactinea* na condição estacionária (Estat) e de agitação (Agitac)

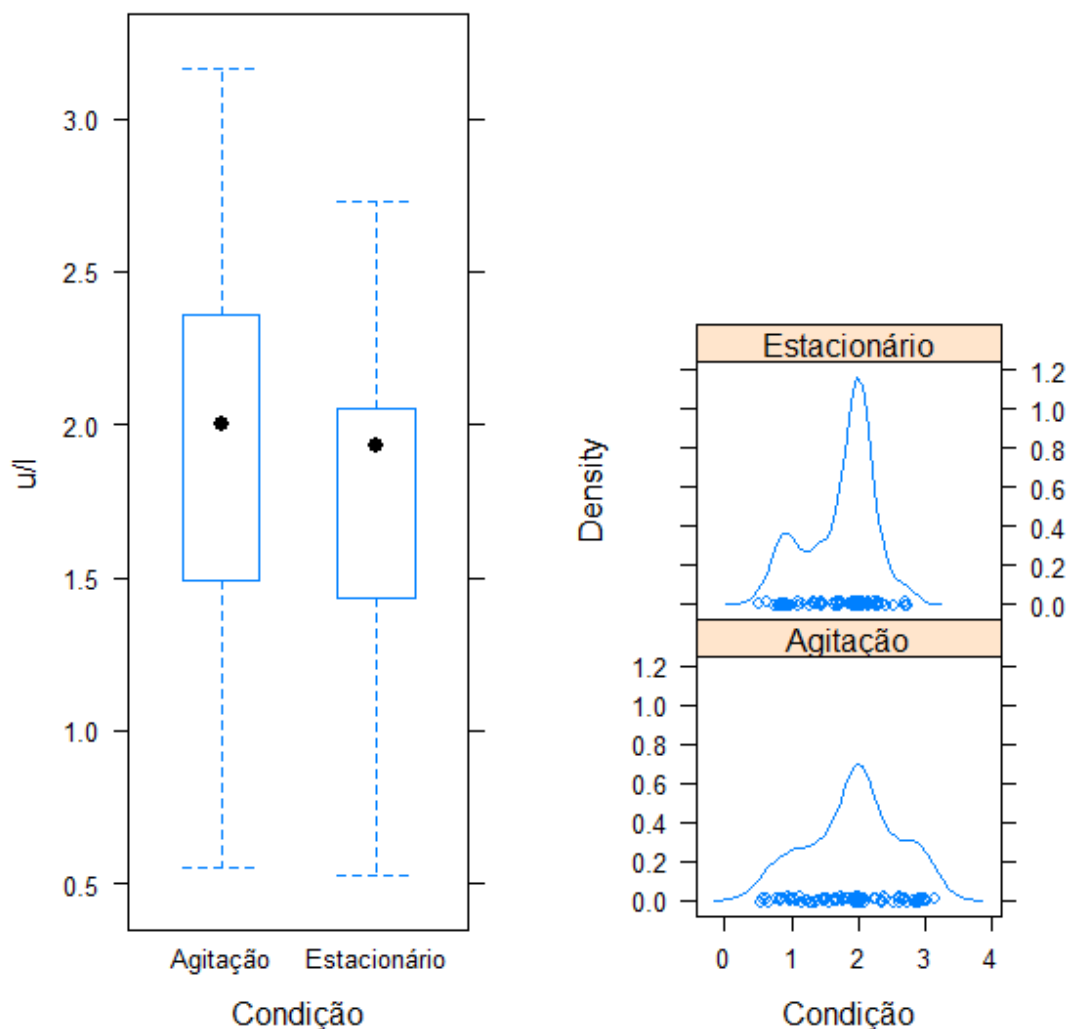


Figura 34 – Gráfico boxplot e da curva de densidade comparando a condição de agitação e estacionária na produção de lacase do fungo *T.lactinea*.

Verificou-se que o fungo *T.lactinea* na condição de agitação produziu mais lacase sem o indutor, em todos os meios testados (Figuras 33 e 34). O fungo *T.lactinea* sob a condição estacionária também produziu mais lacase sem indutor, em todos os meios testados, com exceção do meio suplementado com cupuaçu (figuras 33 e 34).

Tabela 17: Teste de Kruskal-Wallis para avaliação do fungo *Trametes lactinea* na presença ou ausência do indutor nos diferentes meios.

Fontes de Variação	Grau de Liberdade (GL)	Diferença Mínima Significativa (LSD)	(p)	Variáveis	Médias da ordem
TRATAMENTO	1	16.70076	0.00340		
GRUPOS				Ind(b)	91.0681
				Sem Ind (a)	116.363

*Letras iguais significam que não existe diferença estatística ($p > 0,01$) ao nível de 1% de significância

Os dados apresentados na tabela 17 mostraram que ocorreu diferença estatística significativa entre a presença e ausência do indutor, para o fungo *T.lactinea*, nos experimentos realizados, usando o teste de Kruskal-Wallis.

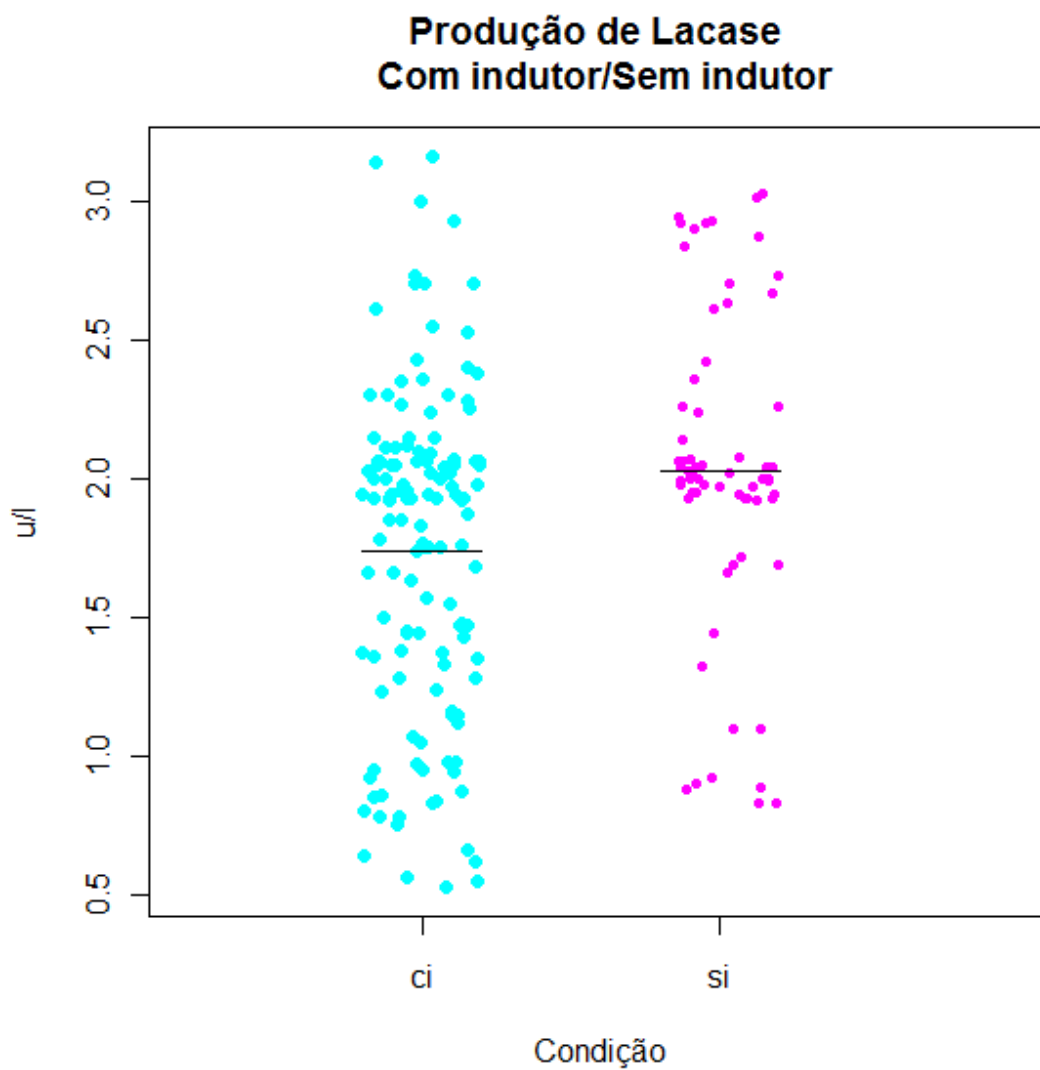


Figura 35 – Gráfico de Dispersão em torno da média comparando a produção de lacase de *Trametes lactinea* na presença (Ci) e na ausência de indutor (Si).

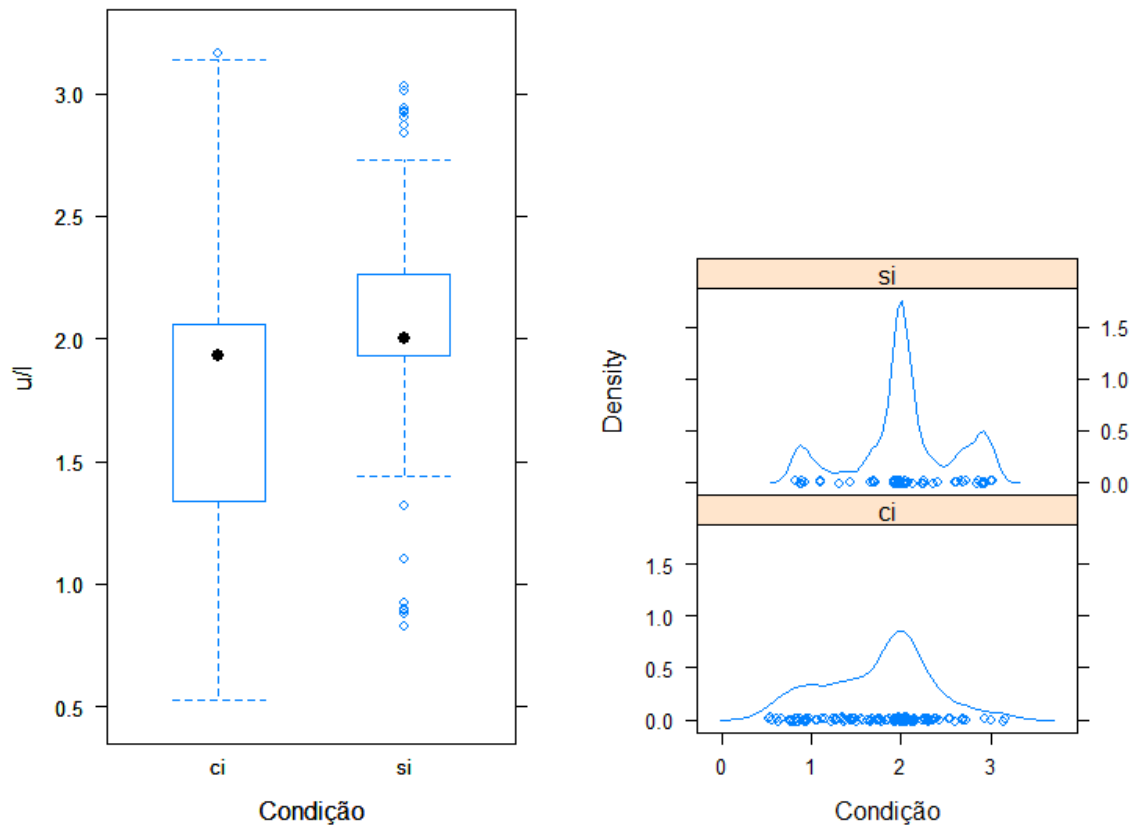


Figura 36 – Gráfico boxplot e da curva de densidade comparando a presença do indutor (Ci) e ausência (Si) do Indutor na produção de lacase do fungo *Trametes lactinea*.

De modo geral, os resultados mostraram que o indutor teve um efeito negativo sobre a produção de lacase no basidiomiceto *Trametes lactinea*, nas condições testadas. A produção da lacase de *T.lactinea* foi influenciada pelas condições de crescimento (agitação e estacionária), pela adição de indutor e pelos meios de cultura testados, em todos os experimentos realizados.

6. DISCUSSÃO

6.1. Desenvolvimento micelial em função do pH do meio

O fungo *Trametes lactinea* apresentou crescimento micelial em todos os pHs dos meios testados, contudo seu maior crescimento ocorreu no pH 4 e o menor no pH9. Os dados demonstraram que o pH ótimo para o crescimento micelial de *Trametes lactinea* foi o pH 4. na faixa ácida. Os nossos resultados estão de acordo com o relatado na literatura para os fungos basidiomicetos estudados, cujo melhor crescimento micelial ocorre de modo geral na faixa ácida do pH 4 – 5 (Fonseca, 2009; Vukojevic et al, 2006). Porém, esses dados estão em desacordo com Fang e Zhong (2002) e Hsieh e colaboradores (2005) que obtiveram o crescimento micelial máximo com o basidiomiceto *Ganoderma lucidum* em pHs 6.0 – 6.5, faixa menos ácida.

Constatou-se que o pH do meio de cultura influenciou diretamente o crescimento micelial do basidiomiceto *T.lactinea*. Cada espécie fúngica é afetada de modo diferente pelo pH do meio no qual se desenvolve. No *Trametes lactinea*, o crescimento micelial é reduzido logo que o pH é superior a 4, independente do meio testado.

6.2. Efeitos dos meios de cultura na produção de Biomassa do fungo *Trametes lactinea*, sob condição estacionária e de agitação, e na presença e ausência do indutor.

É fundamental o estudo das condições de cultivo de espécies fúngicas, porque pode ocorrer incremento tanto da biomassa, quanto nos metabólitos secundários importantes em várias atividades biológicas dos fungos (Nepomucena, 2010). Assim, foram pesquisadas neste trabalho alguns fatores que otimizem a produção da biomassa do *Trametes lactinea*, tais como as condições de crescimento, presença ou ausência de indutor e diferentes substratos.

No que concerne as condições de crescimento, a produção de biomassa do fungo *Trametes lactinea* não apresentou diferenças estatísticas significativas sob a condição estacionária e de agitação nos três meios de cultura testados. Os nossos dados estão de acordo com o relatado na literatura para o fungo *Pleurotus ostreatus*, cuja a condição estacionária e de agitação nos meios de cultivo não tiveram nenhuma influência na produção de biomassa deste basidiomiceto (Rezende et al, 2005). Para outros fungos, porém, tem sido descrito que a agitação constante dos meios de cultivo líquidos proporciona um aumento significativo na produção de biomassa pelos microrganismos (Martins da Silva, 2010; Nepomucena, 2010; Papagianni et al, 2001). Destaca-se ainda que para alguns fungos a condição de agitação pode afetar negativamente a produção de biomassa, como para os isolados de *Colletothicum spp* e do basidiomiceto *Hexagonia glabra* (Martinez et al, 2009; Santos, 2009). Pode-se sugerir com os resultados obtidos, e os comparando com a literatura, que as condições estacionária e de agitação variam conforme a espécie fúngica, o meio estudado e a presença ou ausência de indutor.

Por outro lado, de modo geral, em todos os experimentos realizados neste trabalho, o indutor etanol não estimulou a produção de biomassa do fungo *Trametes lactinea* nos meios de cultivo testados. Ou seja, os resultados mostraram que a presença ou ausência do indutor não influenciou a produção da biomassa micelial do *Trametes lactinea*. Em oposição aos nossos dados, a produção da biomassa fúngica do *Botryosphaeria sp*, diminuiu consideravelmente em cerca de 65% na presença do indutor (Giese et al, 2004; Vasconcelos, 2000). Estes autores constataram que o indutor utilizado teve um efeito negativo na produção de biomassa fúngica do *Botryosphaeria SP* nos meios testados. Poucas pesquisas foram realizadas no sentido de verificar o efeito de diferentes indutores na produção de biomassa fúngica e assim há uma necessidade premente de se investigar para contribuir no conhecimento fisiológico destes microrganismos, tão importantes na manipulação dos mesmos na biotecnologia.

Já em relação aos meios de cultivo, com base nos resultados obtidos, verificou-se que a produção de biomassa de *Trametes lactinea* foi diretamente afetada por fatores nutricionais. Segundo Santos (2009), os requisitos nutricionais de qualquer organismo são determinados pelo seu metabolismo energético característico e pela sua capacidade biosintética. No caso específico dos fungos a adaptação evolutiva à diferentes situações ecológicas, conduziu a um alto grau de especialização com referência a forma química particular em que certos elementos podem ser usados como nutrientes (Martins da Silva, 2010; Nepomucena, 2010). Para o fungo *Trametes lactinea*, em todos os meios nutricionais utilizados ocorreu produção de biomassa micelial, indicando provavelmente que os meios continham a presença de macromoléculas requeridas por esses organismos para o seu crescimento. Vários trabalhos comprovaram que cada fungo tem suas exigências nutricionais específicas

(Fonseca, 2009; Garcia, 2006; Martins da Silva, 2010; Nepomucena, 2010; Santos, 2009). Todos os organismos precisam encontrar em seu ambiente, unidades estruturais bem como fontes de energia para a construção e manutenção de sua estrutura e organização. Alguns elementos são essenciais para o crescimento dos fungos. Carbono e nitrogênio são elementos essenciais no crescimento micelial dos fungos e estão diretamente relacionados a produção de biomassa destes microrganismos. As quantidades de carbono e nitrogênio necessárias mostram variações de acordo com a espécie e o meio estudado (Garcia, 2006). O fungo *Trametes lactinea* produziu maior biomassa no meio suplementado com casca de cupuaçu em todas as condições testadas. Pode-se inferir que o meio suplementado com casca de cupuaçu foi o mais eficiente por causa do seu alto teor de carbono (49,7%) que foi o elemento químico essencial para o desenvolvimento do *Trametes lactinea*. Devido a melhor eficiência do meio suplementado com a casca do cupuaçu, em comparação com os demais meios testados, sugere-se estudos posteriores visando identificar o elemento ou os elementos responsáveis pela maior produção de biomassa de *T.lactinea*.

A possibilidade de utilização da biomassa em processos biotecnológicos tais como o da tecnologia de biorremediação para absorção de metais pesados, remoção de substâncias xenobióticas e outros processos industriais e biotecnológicos torna o estudo de otimização da produção de biomassa de fundamental importância.

6.3. Atividade da lacase do *Trametes lactinea* em diferentes meios de cultura, sob condição estacionária e de agitação e na presença e ausência de indutor.

Neste trabalho, verificou-se que em todos os meios de cultura testados houve produção da enzima lacase do fungo *Trametes lactinea* sob a condição estacionária e de agitação e na presença e ausência do indutor.

O basidiomiceto *Trametes lactinea* produziu a enzima lacase já após dois dias de crescimento e esta continuou a ser produzida durante todo o período testado (22 dias), em todos os experimentos realizados. Nossos dados estão de acordo com a literatura que relata que muitos basidiomicetos produzem a lacase após 2 ou 3 dias de crescimento e têm um tempo bastante variável durante o qual a enzima continua a ser produzida (Garcia, 2006; Jodaan & Leukes, 2003). Para a maioria dos meios e condições testadas, ocorreu um decréscimo da produção de lacase de *T.lactinea*, após dez dias de cultivo.

De modo geral, constatou-se que a produção da lacase pelo *T.lactinea* foi melhor nos meios de cultura submetidos à agitação do que naqueles mantidos sob condição estacionária. Os resultados desta pesquisa estão em concordância com a literatura a qual menciona que a agitação é um fator fundamental na produção de lacases fúngicas (Dekker et al, 2001; Garcia, 2006; Martins da Silva, 2010; Nepomucena, 2010; Papagianni et al, 2001; Pointing et al, 2000). Segundo Martinez e colaboradores (2009), o efeito negativo da agitação como inibidor da produção de lacases tem sido documentado para alguns fungos, o que não foi constatado em nossos experimentos.

Tanto sob a condição de agitação como na condição estacionária, na presença ou ausência de indutor, a maior produção de lacase do *Trametes lactinea* foi no meio suplementado com casca de cupuaçu, e a menor atividade desta enzima ocorreu no meio suplementado com abricó.

Neste estudo, verificou-se que a produção da lacase pode ser significativamente aumentada dependendo dos nutrientes presentes nos meios de cultivo testados, que influenciaram diretamente sua atividade. Os níveis de carbono e nitrogênio presentes no meio de cultivo do fungo são fatores de importância fundamental na produção da lacase e cujos valores ótimos são bastantes variáveis, dependendo do fungo em estudo (Fonseca, 2009; Garcia, 2006; Martins da Silva, 2010; Nepomucena, 2010). Os dados indicaram, em geral, que a produção de lacase foi aumentada em meios de cultivo com níveis altos de carbono, nos meios suplementados com casca de cupuaçu, em todas as condições testadas. Estes resultados são corroborados pelo trabalho de Pointing e colaboradores (2000), que demonstraram que o basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus* CY788 teve sua melhor produção de lacase em meios contendo altos níveis de carbono. Todavia, de maneira oposta, a produção de lacase por outros basidiomicetos como, por exemplo, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Trametes versicolor*, *Trametes gallica* e *Lentinus crinitus* foi aumentada em culturas com altos níveis de nitrogênio (Dong et al, 2005; Nepomucena, 2010).

Outro aspecto constatado neste estudo é que a presença do indutor etanol não aumentou a atividade da lacase em comparação ao tratamento controle em todos os meios utilizados na condição estacionária como na de agitação para o fungo *Trametes lactinea*. Embora, considerando as vantagens econômicas (baixo custo) e

ambientais (baixa toxicidade) do emprego do indutor etanol em comparação aos demais indutores descritos, este teve um efeito negativo sobre a produção de lacase do fungo *T.lactinea* em todos os experimentos realizados. Em oposição aos nossos dados, observou-se um grande aumento da atividade da lacase do fungo *Pycnoporus sanguineus* na presença do indutor etanol, nas várias concentrações (20, 30, 40 e 50g.L) testadas (Garcia et al, 2006). Já, para o fungo *Pycnoporus cinnabarinus*, os melhores resultados relativos a produção da lacase foram obtidos em baixa concentração do indutor etanol (35mg.L), visto que houve uma inibição da atividade desta enzima em concentrações maiores para este microrganismo. (Lomascolo et al, 2003). Outro aspecto interessante relatado na literatura foi o ocorrido no fungo *Pycnoporus sanguineus* que sofreu pequena alteração na coloração do meio durante o seu cultivo na presença do indutor etanol, provavelmente devido a inibição da formação do seu pigmento melanina (Valeriano et al, 2009), fato não constatado em todos os nossos experimentos realizados com este indutor.

Os dados obtidos neste trabalho sugerem que dependendo da espécie fúngica e das condições testadas o etanol pode agir como indutor negativo ou positivo. Segundo Garcia (2006), não existe um ótimo indutor de lacase comum a todos os fungos testados.

Como as aplicações biotecnológicas requerem grande quantidade de enzima, e normalmente lacases extracelulares são produzidas em pequenas quantidades (Garcia, 2006), faz-se necessário o estudo de indutores para melhorar a produção desta enzima fúngica, visto que a mesma tem uma vasta aplicabilidade industrial e ambiental.

7. CONCLUSÕES

- Em todos os meios testados ocorreu produção de biomassa e atividade da lacase do basidiomiceto *Trametes lactinea*.
- A produção de biomassa micelial do fungo *Trametes lactinea* foi maior no meio suplementado com resíduo de cupuaçu e menor naquele acrescido com abricó em todas as condições testadas e na presença e ausência do indutor.
- A agitação e a presença do indutor etanol não influenciaram a produção de biomassa de *Trametes lactinea*.
- O maior crescimento micelial do fungo *Trametes lactinea* ocorreu no pH 4 e o menor no pH 9.
- O pH ótimo para o crescimento micelial do basidiomiceto *Trametes lactinea* foi o pH 4.
- Tanto sob a condição de agitação como sob a condição estacionária, na presença e ausência de indutor, a maior produção de lacase de *T. lactinea* ocorreu no meio suplementado com resíduo de cupuaçu e a menor no meio suplementado com abricó.
- A agitação dos meios de cultivo afetou positivamente a produção de lacase do fungo *Trametes lactinea*.
- O indutor etanol teve um efeito negativo na produção de lacase de *Trametes lactinea* em todos os meios e condições testadas.

- Tanto a produção de biomassa como a atividade da lacase foram influenciadas diretamente pelos nutrientes presentes nos meios de cultivo do fungo *Trametes lactinea*.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L. P. J.; MARINHO, A. H.; REBÊLO, Y. S.; SHRIMPTON, R. Aspectos nutritivos de alguns frutos da Amazônia. **Acta Amazônica**, vol.10, n.4, p. 755-758, 2003.

ANTRANIKIAN, G.; VORGIAS, C.E.; BERTOLDO, C.E. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysis. **Advances Biochemistry Engineering of Biotechnology**, vol.96, p.219 – 262, 2005.

ARCHER, D. B.; MACKENZE, D. A.; JEENES, D. J. **Genetic engineering: yeasts and filamentous fungi**. In: Basic Biotechnology, Edited by Colin Ratledge and Bjorn Kristiansen, Cambridge University Press. Cambridge, UK, 2001,126p.

AZEVEDO, J.; RAMOS, I.; OLIVEIRA, C.; HENRIQUES, I.; CORREIA, A. Unraveling differences between bacterioplankton and bacterioneuston: universal or specific primers? **10th Symposium on Bacterial Genewtics and Ecology**, Uppsala, Sweden, 2009.

BALDRIAN, P. Fungal laccase – Occurrence and properties, **FEMS Microbiology Letters**, vol.30, p 215 – 242, 2006.

BAYNES, J.W; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica Médica**, 2^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, 234p.

BERNARDI, E.; DONINI, L. P.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J.S. Diferentes meios de cultivo e condições de luz no crescimento e massa miceliana de *Agaricus brasiliensis*. **Arquives Institute of Biology**. v. 75, n 3, p. 375-378, 2008.

BETTUCCI, L. & GUERRERO, R. T. Hongos xilófagos: estudo de cultivos. **Boletim da Faculdade de Agronomia**. v. 118, p. 1-40, 1971.

BON, E. P. S.; PEREIRA, N.; GOTTSCHALK, M.F.; SÁ-PEREIRA, P; ROSEIRO, J.C.; FERRARA, M.A. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT [Portugal], 2008, 532p.

BOOMINATHAN, K. e REDDY, A. In: Fungal degradation of lignin: biotechnological applications. **Handbook of Applied Mycology**. Vol 4, edited by Marcel Dekker Inc, New York 795-798. 1992

BOSWELL, G. P.; JACOBS, H.; DAVIDSON, F. A.; GADD, G. M.; RITZ, K. Growth and Function of fungal mycelia in heterogeneous environments. **Bulletin of Mathematical Biology**, vol. 65, n. 3, p. 447-449, 2003.

CASTRO & SILVA, A. **Micromorfologia da degradação de madeira da espécie Amazônica *Hura creptans* L. por fungos ligninolíticos pertencentes a classe Hymenomycetes**. Tese de Doutorado, INPA/FUA, Manaus, 1996, 180p.

CHANG, S.T. & BUSWELL, J.A. Mushrooms nutriceuticais. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n.5, p. 473-476, 1996.

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

COUTO, S. R. & HERRERA, J. L. T. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**, vol. 24, p. 500-513., 2006.

DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M.; GIESE, E.C.; GODOY, S.D.S.; COVIZZI, L.G. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, vol 28, p. 81 – 88, 2001

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

DOSS, R. P. Composition and enzymatic activity of the extracellular matrix secreted by germlings of *Botrytis cinerea*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, n. 2, p. 404-408, 1999.

DUCROS, V., BRZOZOWSKI, A.M., WILSON, K.S., OSTERGAARD, P., SHNEIDER, P., SVENDSON, A. & DAVIES, G.J.. The structure of laccase from *Coprinus cinereus* at 1.6 Å resolution: evidence for different type 2 u-depleted isoforms. **Acta Crystallography**,. Vol D 57, p. 333-336, 2001

DURÁN, N. & ESPOSITO, E. 1997. **Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos lignolíticos**. In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (Eds) Microbiologia Ambiental. Embrapa-CNPMA, Jaguariúna, 1997, pp. 269-292.

DURÁN, N. & ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental** , vol.28, p. 83-99, 2000.

DURÁN, N., ROSA, M.A., D'ANNIBALE, A. & GIANFREDA L. 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology** , vol. 3, p.907-931, 2002.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L.. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Orgs. Elisa Esposito e João Lúcio Azevedo. Caxias do Sul: EDUCS, 2004, 510p.

EUROPEAN COMMISSION. Final Report: Collection of Information on Enzymes. European Commission. Contract n. B4-3040/2000/278245/MAR/E2. Co-operation between the Federal Environment Agency Austria and Inter-University Research

Center for Technology, Work and the Culture, Austria. **Disponível em:** <http://europa.eu.int/comm/environ/dansb/enzymerepcomplete.pdf>, (2002).

FANG, Q.H.; ZHONG, J.J. Effect of initial pH on production of ganoderma acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. **Process Biochemistry**, vol. 37, p. 769 – 776, 2002.

FONSECA, M.D.P. **Produção de Enzimas Oxidativas por Fungos Amazônicos Degradadores de Madeira**. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (MBT), Universidade do Estado do Amazonas (UEA), 2009, 99p.

FRANCIS, J.K. 1989. *Mamamea americana* L. SO-ITF-SM-22, Rio Piedras, Institute of Tropical Forestry.

GARCIA, T.A. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus***. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Universidade Nacional de Brasília, 2006, 110p.

GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, J.M. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation J.** v. 3, p. 1-25, 1999.

GIESE, E.C.; COVIZZI, L.G.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria SP*, **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, vol. 26, n.4, p. 463 – 470, 2004.

GIL-AD, N. L.; BAR-NUN, N.; MAYER, A. M. The possible function of glucan sheath of *Botrytis cinerea*: Effects on the distribution of enzyme activities. **Microbiology Letters**, v. 199, n. 1, p. 109-113, 2001.

GOMES, S. A. S.S & REBELO, M. J.F. A new laccase biosensor for polyphenols determination. **Sensor**, vol 3:, p.166-175, 2003.

GRAY, S.N. 1998. Fungi as potencial bioremediation agents in soil contaminated with heavy or radioactive metals. **Biochemical Society Transactions**, vol.26, p.666 – 70, 2000.

GUGLIOTTA, A.M. e CAMPELARI, M. Taxonomia de basidiomicetos. In: Bonomi, V.L.R. Grgl. Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: **Noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**, Instituto de Botânica, São Paulo, 184p. 1998.

HATAKKA, A. et al. **Modification of lignin by laccase and manganese peroxidase**. Proceedings of the 6th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry Advances in Applied and Fundamental Research, Austria, 1994.

HIGUCHI, T. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. **Wood Science Technology**. v. 24, p. 23-63, 1990.

HIGUCHI, T. Microbial degradation of lignin: role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. **Proceedings of the Japan Academy**. v. 80, n. 5, p. 204-214, 2004.

HSIEH, C.; HSU, T.H.; YANG, F.C. Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (CCRC 36021) by reusing thin stillage. **Process Biochemistry**, vol. 40, p. 909 – 916, 2005.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I.; SMITH, D.W. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. **Journal Environmental Engineering Science**, vol. 3, p. 1 – 19, 2004.

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**, vol.33, p. 635 – 641, 2004.

KERSTEN, J.P., TIEN, M., KALYANARAMAN, B. & KIRK, T.K. 1985. The ligninase from *Phanerochaete Chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. **Journal of Biological Chemistry**, vol.260, p.2609-12, 1985.

KIRK, T.K e FARRELL, R.L. Enzymatic "combustion": The microbial degradation lignin. **Annual Review of Microbiology**, vol. 41, p. 465-505, 1987.

KOTRBA, P. : RUMIL, T. Bioremediation of heavy metal pollution exploiting constituents, metabolites and metabolic pathways of living. A review. **Coll. Czech. Chem. Comm.**, vol.65:, p. 1205-124, 2000.

LACAZ, C.L.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.. **Tratado de Micologia Médica**. 9º ed. São Paulo: SARVIER. 2002, 1104p.

LAURENSE, J. **Biologia**. Volume Único. 1 ed. São Paulo: Nova geração 2005, 167 p.

LEITE, B.; PASCHOLATE, S. F.; KITAJIMA, W.; ISHIDA, M.L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: v.9, p. 119-157, 2001.

LEONOWICZ, A.; ACHO, N. S.; LUTEREK, J.; WILKOLAZKA, A.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; MATUSZEWSKA, A.; HOFRICHTER, M.; WESENBERG, D.; ROGALSKI, J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. **Journal Basic Microbiology**. v. 41, p. 185-227, 2001.

LI, K., XU, F. & ERIKSSON, K-E.L. 1999. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 65, p. 2654 – 2660, 1999.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**. v. 3 p. 593, 2005

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

LOURIDO, G.; SILVA, N. M.; MOTTA, C. S. Biological parameters and damage by *Macrosoma tipulata* Hulener (Lepidoptera: Hedylidae) in cupuaçu tree in Amazonas Brazil. **Neotropical Entomology**, vol. 36, n.1, p.102 – 107, 2007.

MACIEL, M.J.M.; CASTRO E SILVA, A.; RIBEIRO, H.C.T. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol .13, n.6, <http://dx.doi.org/10.2225/vol13-issue6-fulltext-2>.

MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO. J. F.; ROBBINS, P. W. Glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Shizoccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. **Analytical Biochemistry**. v. 336, n. 2, p.202-212, 2005.

MARTÍNEZ, A.T., SPERANZA, M., RUIZ-DUEÑAS, F.J., FERREIRA, P., CAMARERO, S., GUILLÉN, F., MARTÍNEZ, M.J., GUTIÉRREZ, A. & DEL RIO, J.C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, vol. 8, p. 195-204, 2005

MARTINEZ, G.C.; GIESE, E.C.; PEREIRA, J.O.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. Seleção de isolados de *Colletotrichum* da biodiversidade da Amazônia como produtores de lacase utilizando uma metodologia simplificada. **Ciências Agrárias**, Londrina, vol. 30, n.2, p. 397-406, 2009.

MARTINS DA SILVA, N. **Avaliação do Potencial Antimicrobiano, Enzimático e de Crescimento de um Isolado Amazônico do Fungo *Pycnoporus sanguineus***. Dissertação de Mestrado, Pós- Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (MBT), Universidade do Estado do Amazonas (UEA), 2010, 180p.

MATEUS, D.R. e OKINO, L.K. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. In: VLR BONONI (ed.) *Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: Noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*. São Paulo. Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, p. 106-139. 1998.

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C. Laccases: New functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, vol. 60, n.6, p. 551- 565, 2002.

MUZZARELLI, R. A. A.; MILIANI, M.; CARTOLARI, M.; TARSI, R.; TOSI, G.; MUZZARELLI, C. Polyuronans obtained by regiospecific oxidation of polysaccharides from *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* and *Saprolegnia* sp. **Carbohydrate Polymers**. v. 43, n.1, p. 55-61, 2000.

NEDER, R. N. Microbiologia: **Manual de laboratório**. São Paulo: Nobel, p. 138, 2004.

NEPOMUCENA, R.M.P. **Avaliação do potencial microbiano de crescimento e secreção de lacase do fungo Amazônico *Lentinus crinitus***. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (MBT), Universidade do Estado do Amazonas (UEA), 2010, 140p.

NYANHONGO, G.S; GUBITZ, G; SUKYAI, P; LEITNER, C; HALTRICH, D; LUDWIG, R. Oxireductases from *Trametes* spp. In *Biotecnology: A wealth of catalytic activity*. **Food. Technolgy. Biotechnology**, vol.45, n.3, p. 250-268, 2007.

OLEMPСКА-BEER, Z.S.; MERKER, R.I.; DITTO, M.D.; DINOVI, M.J. Food-processing enzyme from recombinant microorganisms – a review. **Regulation. Toxicology. Pharmacy**, vol.45, n.2, p.144 – 158, 2006.

PAPAGIANNI, M.; NOKES, E.; FILER, K. Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger*: Effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculums performance. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, vol. 39, n.4, p 319 – 326, 2001.

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**, vol. 277, p.37663-37669, 2002

POINTING, S.B.; JONES, E.B.G.; VRIJMOED, L.L.P. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture, **Mycologia**, vol 92, n.1, p.139 – 144, 2000.

POZDNYAKOVA, N.N., TURKOVSKAYA, O.V., YUDINA, E.N & RODAKIEWICZ-NOWAK, Y. Yellow laccase from the fungus *Pleurotus ostreatus* d1: purification and characterization. **Applied Biochemistry and Microbiology**, vol.42, p.56-61, 2006

PUTZKE, J; PUTZKE, M.T.L. **Os Reinos dos Fungos**. Vol. 2 Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004, 521p.

RECK, M. A. **Poliporos (Basidiomycota) em remanescentes da mata atlântica** Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009, 88p.

REZENDE, M.I.; BARBOSA, A.M.; VASCONCELOS, A.F.D.; HADDAD, R.; DEKKER, R.F.H. Growth and production of laccases by the ligninolytic fungi *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina*, cultured on basal medium containing the herbicide, Scepter (imazaquin). **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, vol.45, n.6, p.232-240, 2005

RIBEIRO DA SILVA, R.; COELHO, G. D. **Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas**. Curso de Capacitação de Monitores e Educadores, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, São Paulo, 2006, 20p.

RYVARDEN, L. & JOHANSEN, I. A preliminary polypore flora of east Africa, *Fungiflora*, oslo, 1980, 636 p.

SACRAMENTO, C. K; SOUZA, F. X. Cajá (*Spondias mombin*, L). Jaboticubal: FUNEP, 2000, 42 p. (Funep. Série frutas nativas, 4).

SANT'ANNA Jr, G.L. Produção de Enzimas Microbianas. In: Lima, U.A.; Aquarone, E.E.; Borzani, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial, Processos Fermentativos Enzimáticos**, Editora Edgard Blucher Ltda, São Paulo, Brasil, 2001, 342p.

SANTOS, J.C. **Atividade Enzimática Oxidativa dos fungos Amazônicos *Pleurotus SP(F-31)*, *Lentinus crinitus* e *Hexagonia glabra***. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais (MBT), Universidade do Estado do Amazonas (UEA), 2009, 99p.

SAPARRAT, M.C.N., GUILLÉN, F., ARAMBARRI, A.M., MARTÍNEZ, A.T & MARTÍNEZ, M.J. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the White rot basidiomycete *Coriolopsis rígida* **Applied and Environmental Microbiology**, vol.68, p.1534-1540, 2002.

SHAH, V. & NERUD, F. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. **Canadian Journal of Microbiology**, vol. 48, p. 857-870, 2002

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**, vol. 384, p.109-115, 2000

SHLEEV, S.; JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; KHALUNINA, A.; MOROZOVA, O.; YAROLOV, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L. Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes. **Bioelectrochemistry**, vol. 67, p.115-124, 2005.

SILVA, M; ESPOSITO, E. **O papel dos fungos na recuperação ambiental** In: ESPOSITO, E; AZEVEDO, J.L. (Coords.) Fungos: Uma introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, 2004, 339p.

SILVEIRA, Verlande Duarte. *Micologia*. 4° Ed. Rio de Janeiro: Ed. Interamericana, 1981.

SZKLARZ, G. D.; ANTIBUS, R. K.; SINSABAUGH, R. L.; LINKINS, A. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. ***Mycologia***. v. 81, p. 234-240, 1989.

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

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. ***Microbiologia***, 6 ed, Porto Alegre: Artmed, 2000, 321 p.

TUOMELA, M.; VIRKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. ***Bioresource Technology***. vol. 72, p. 169-183, 2000.

TRABULSI, L.R. ***Microbiologia***. 2° ed. Editora Atheneu. São Paulo. SP. 1998, 208 p.

VALERIANO, V.S.; SILVA, A.M.F.; SANTIAGO, M.F.; BARA, M.T.F.; GARCIA, T.A. Production of laccase by *Pycnoporus sanguineus* using 2,5 – Xylidine and ethanol. ***Brazilian Journal of Microbiology***, vol.40, n.4, p.1 – 7, 2009.

VASCONCELOS, A.F.D. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria sp.* In the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. ***Processus Biochemical***, vol.35, p. 1131 – 1138, 2000.

VASCONCELOS, M. N. L.; SILVA, M. L.; MAIA, J. G. S.; GOTTLIEB, O. R. Estudo químico de sementes de cupuaçu. ***Acta amazônica***, vol. 5, p.293 – 295, 2005.

VUKOJEVIC, J.; STAJIC, M.; DULETIC-LAUSEVIC, S.; SIMONIC, J. Effect of medium pH and cultivation period on mycelial biomass, polysaccharide, and ligninolytic enzyme production by *Ganoderma lucidum* from Montenegro. **Archives of Biology Science**, Belgrade, vol. 58, n.31, p. 179 – 182, 2006.

WANG, T.; DENG, L.; LI, S.; TAN, T. Structural characterization of a water-insoluble (1 → 3) - α -D-glucan isolated from the *Penicillium chrysogenum*. **Carbohydrate Polymers**. v. 67, n.1, p. 133-137, 2007.

XIAO, J.; OHSHIMA, A.; KAMKURA, T.; ISHIYAM, T.; YAMAGUSHI, I. Extracellular glycoprotein(s) associated with cellular differentiation in *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-microbe Interactions**. Saint Paul, v. 7, n. 5, p. 639-649, 1994.

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**. v. 60, p. 700-707, 2003.

XU, F. Applications of oxiredoreductases: Recent progress. **Industrial Biotechnology**. v. 1, n. 1, p.38-50, 2005.

YAROLOV, A.I; SKOROBGATKO, O.V. & VAARTANOV, S.S. Laccase: properties, catalytic mechanism and applicability. **Applied and Biotechnology**, vol. 49, p. 257-280, 1994

ZHU, X., GIBBONS, J., GARCIA-RIVERA, J., CASADEVALL, A. & WILLIAMSON, P.R., Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. **Infection and Immunity**, vol. 69, p. 5589-5596, 2001.

ANEXOS

Artigo Submetido -2010

Avaliação de Meios de cultivo no crescimento micelial do basidiomiceto Amazônico *Lentinus crinitus* como potencial agente biológico nos ecossistemas florestais .

Autores Rafaelle Maria Paz Nepomucema, Marcia Jaqueline Mendonça Marciel, Natalia Martins da Silva, Ângela Lucia Carvalho de Andrade, Rogério Marialva Nunes, Ademir Castro e Silva, Helena Camarão Telles Ribeiro.

Trabalhos em Congresso

SBPC (Manaus- Am Julho/2009)

Avaliação dos Isolados do *Baculovirus* de Poliedrose nuclear de *Trichoplusia ni* em relação a virulência e padrão eletroforetico das suas proteínas virais.

Formato: Resumo

3º Congresso Sobre Diversidade Microbiana da Amazônia.

XII Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental.

Avaliação in vitro da produção de agentes antimicrobianos do fungo Amazônico *Lentinus crinitus* frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Formato: Resumo

Efeito das condições de cultivo do fungo Amazônico *Lentinus crinitus* em substrato liquido para produção de biomassa micelial.

Formato: Resumo

Enzimas ligninolíticas produzidas pelo fungo Amazônico *Hexagonia glabra* cultivado em bagaço de cana de açúcar

Formato: Resumo

Avaliação de meio de cultura em diferentes pHs nos crescimento micelial do basidiomiceto de *Trametes lactinea*.

Formato: Resumo

Avaliação da produção de biomassa do fungo Amazônico *Trametes lactinea* cultivados em meios contendo produtos regionais da Amazônia.

Formato: Resumo

Produção de Biomassa do Fungo Amazônico *Hexagonia glabra* a partir do aproveitamento de resíduo do bagaço de cana de açúcar.

Formato: Resumo