

NELSON LIBARDI JUNIOR

**ESTUDO DE LACASES FÚNGICAS
PARA DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS INTERFERENTES ENDÓCRINOS**

JOINVILLE

2010

NELSON LIBARDI JUNIOR

**ESTUDO DE LACASES FÚNGICAS
PARA DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS INTERFERENTES ENDÓCRINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Engenharia de Processos da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Aparecida Furlan

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Maria Miranda Gern

JOINVILLE

2010

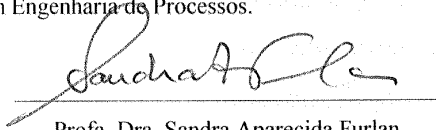
Termo de Aprovação

“Estudo de lacases fúngicas para degradação de compostos interferentes endócrinos”

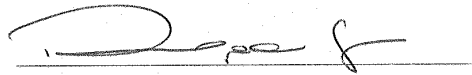
por

Nelson Libardi Junior

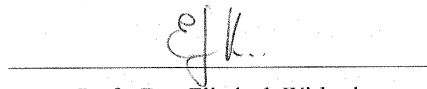
Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, área de concentração Engenharia de Processos e Tecnologias Limpas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Engenharia de Processos.



Profa. Dra. Sandra Aparecida Furlan
Orientadora (UNIVILLE)

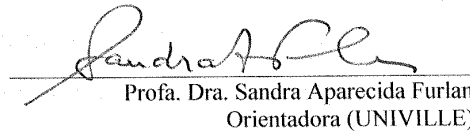


Profa. Dra. Regina Maria Miranda Gern
Co-Orientadora (UNIVILLE)

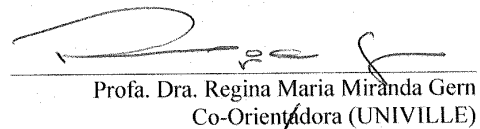


Profa. Dra. Elisabeth Wisbeck
Coordenadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Processos (UNIVILLE)

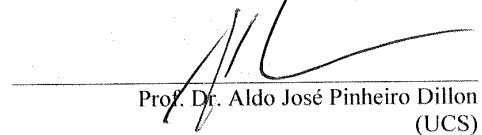
Banca Examinadora:



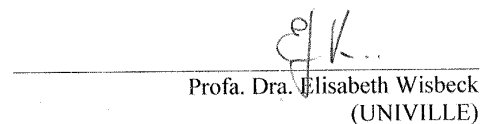
Profa. Dra. Sandra Aparecida Furlan
Orientadora (UNIVILLE)



Profa. Dra. Regina Maria Miranda Gern
Co-Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon
(UCS)



Profa. Dra. Elisabeth Wisbeck
(UNIVILLE)

Joinville, 30 de julho de 2010.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente às professoras Sandra Aparecida Furlan e Regina Maria Miranda Gern pela orientação neste trabalho e aos parceiros de projeto da Universidade da Região de Joinville.

Faço um agradecimento especial ao Dr. Dietmar Schlosser, pelo seu empenho para me orientar neste trabalho, interesse pelo meu esforço e pela sua paciência. Não posso deixar de lembrar das pessoas que estavam sempre dispostas a uma boa conversa nos momentos de solidão: “Frau” Renate Böetz, Kathrin Bochentin, Susan Irmayani, Anja Hanh e Yao Hu.

Ao Professor Rainer Jonas, pelo seu apoio, não somente profissional, mas também como conselheiro e amigo. Aos participantes do curso “Industrielle Biotechnologie”, que se tornaram uma família pela união. Em especial aos amigos Juliano e Yeda, que compartilharam comigo muitos momentos especiais.

À minha família, que muito além do apoio financeiro, me apoiou emocionalmente e me manteve com força para ir até o fim. À minha namorada Nicole, que apesar da distância se manteve presente.

Agradeço à InWent, órgão do governo Alemão, que me proporcionou o apoio financeiro e a incrível experiência de vivenciar 1 ano na Alemanha.

Dedico este trabalho a todo o povo brasileiro, que mesmo sem saber, contribuiu para o pagamento da minha bolsa de estudos concedido por intermédio da Fapesc, possibilitando que eu pudesse fazer este curso de mestrado. Espero que os resultados obtidos em qualquer pesquisa científica possam sempre ser revertidos em benefícios para a população.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos estudar a produção da enzima lacase proveniente dos fungos *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 e *Phoma* sp. UHH 5-1-03, bem como a posterior purificação, caracterização e utilização na avaliação de sua capacidade de degradação de compostos interferentes endócrinos. Inicialmente foram testados meios de cultivo, compostos por água ou meio Kirk ou Czapeck-Dox adicionados de materiais lignocelulósicos como papel filtro, raspas de madeira ou cascas de banana. Os caldos brutos produzidos a partir dos meios selecionados foram concentrados em 10 vezes e utilizados em ensaios de estabilidade com o pH e com a temperatura, além da determinação do pH ótimo. Utilizando-se o caldo concentrado também foi determinada a constante cinética de Michaelis-Menten para os substratos ABTS, 2,6-dimetoxifenol, siringaldazina, guaiacol, e os corantes Acid blue 62 e Remazol Brilliant Blue R. Parte dos caldos concentrados foi utilizada para a determinação da massa molar das lacases através de cromatografia de exclusão molecular e eletroforese em condições desnaturantes e não-desnaturantes. Foram realizados testes de avaliação da capacidade de degradação dos compostos interferentes endócrinos t-nonilfenol, bisfenol-A e 17 α -etinilestradiol pela lacase de *Pleurotus ostreatus* e *Phoma* sp. Os compostos foram preparados numa concentração de 250 μ M e incubados em frascos âmbar, na presença do caldo concentrado do cultivo de cada espécie, à temperatura ambiente e sob agitação recíproca de 160 min^{-1} , sendo suas concentrações monitoradas num período de 3 dias. As formulações de substratos selecionadas para a produção de lacase tomaram por base o meio Kirk para *Pleurotus ostreatus* e Czapeck-Dox para *Phoma* sp., adicionados de cascas de banana, levando à produção de lacase de $1575 \pm 93 \text{ U L}^{-1}$ e $1699,39 \pm 36 \text{ U L}^{-1}$, respectivamente. Em relação aos testes de estabilidade, a lacase oriunda de *Phoma* sp. apresentou maior estabilidade com o tempo em pH 4,0 e 4°C e a lacase oriunda de *Pleurotus* em pH 6,0 e 4°C. O pH ótimo encontrado para a lacase de *Phoma* sp. foi de 2,5 utilizando-se ABTS como substrato da reação e de 4,5 para *Pleurotus ostreatus*, com o mesmo substrato. As lacases provenientes de *Phoma* sp. e *Pleurotus ostreatus* tiveram, ambas, maior afinidade pela siringaldazina, apresentando os valores de K_m de 15 μ M e de 34 μ M, respectivamente. Com base na massa molar, o caldo de cultivo com cascas de banana induziu a produção de duas isoformas de lacase de *Pleurotus ostreatus* (58,7 e 21 kDa) e uma de *Phoma* sp. (72 kDa). Nos testes de degradação dos compostos interferentes endócrinos foi possível observar que no primeiro dia de incubação, a concentração de bisfenol-A e 17 α -etinilestradiol foi reduzida a valores muito próximos de zero e, após 3 dias, a concentração de t-nonilfenol foi reduzida em 90% pelo caldo concentrado contendo lacase de *Pleurotus ostreatus*, sendo que não houve redução na sua concentração pelo caldo concentrado contendo lacase de *Phoma* sp.

ABSTRACT

This work aimed to study the production of the enzyme laccase from the fungi *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 and *Phoma* sp. UHH 5-1-03, and the subsequent purification, characterization and the evaluation of their ability to degrade endocrine disruptors. We initially tested various alternative cultivation medium consisting of water or Kirk or Czapeck-Dox medium supplemented with lignocellulosic materials as filter paper, wood chips or banana peels. The crude broths produced from the selected medium were concentrated 10 times and then used for testing stability with pH and temperature, as well as the determination of the optimum pH. It was also determined the Michaelis-Menten constant using the substrates ABTS, 2,6-dimethoxyphenol, syringaldazine, guaiacol, and the dyes Acid Blue 62 and Remazol Brilliant Blue R. Part of the concentrated broth was used to determine the molar mass of laccase by size-exclusion chromatography and electrophoresis under denaturing and non-denaturing conditions. Tests were conducted for assessing the ability of degradation of the endocrine disruptors t-nonylphenol, bisphenol-A and 17 α -ethinylestradiol by laccase from *Pleurotus ostreatus* and *Phoma* sp. The compounds were prepared at a concentration of 250 μ M and incubated in amber bottles in the presence of the concentrated broth of each fungus species at room temperature and 160 min⁻¹. The concentration was monitored during 3 days. The selected formulations of substrate for the production of laccase were the Kirk medium for *Pleurotus ostreatus* and Czapeck-Dox for *Phoma* sp., both supplemented with banana peels. Laccase production of 1575 \pm 93 U L⁻¹ and 1699.39 \pm 36 U L⁻¹, were obtained for *Pleurotus ostreatus* and *Phoma* sp., respectively. Regarding the stability tests, laccase from *Phoma* sp. showed greater stability with pH 4.0 and 4 $^{\circ}$ C and the laccase from *Pleurotus ostreatus* at pH 6.0 and 4 $^{\circ}$ C. The laccases from *Pleurotus* and *Phoma* had both greater affinity by syringaldazine, with a K_m value of 15 and 34, respectively. Based on the molecular mass, the culture broth with banana peels induced the production of two isoforms of *Pleurotus ostreatus* laccase (58.7 and 21 kDa) and one of *Phoma* sp. (72 kDa). According to the results of the endocrine disruptor degradation, it was possible to observe that in the first day of incubation, the concentrations of bisphenol-A and 17 α -ethinylestradiol were reduced to values close to zero and after 3 days the concentration of t-nonylphenol was reduced by 90% by the concentrated broth containing laccase of *Pleurotus ostreatus*, but there was no reduction in its concentration with the concentrated broth containing laccase from *Phoma* sp.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação tridimensional da estrutura da isoenzima POXA1b da lacase proveniente de <i>Pleurotus ostreatus</i> , evidenciando os aminoácidos H476 e D225, além do cobre T1 (esfera violeta).	17
Figura 2 - Ciclo catalítico da lacase.....	19
Figura 3 - Estruturas moleculares dos substratos de lacase.....	20
Figura 4 - Representação esquemática do ciclo redox catalisado por lacase na ausência (a) e na presença (b) de mediadores químicos.....	21
Figura 5 - Estrutura molecular do Nonilfenol.	33
Figura 6 - Estrutura molecular do Bisfenol-A.....	36
Figura 7 - Estrutura molecular do 17 α -etinilestradiol.	38
Figura 8 - Crescimento micelial de <i>Phoma</i> sp. UHH 5-1-03 em placa de Petri.	44
Figura 9 - <i>Pleurotus ostreatus</i> em seu ambiente natural.....	45
Figura 10 - Fluxograma geral de todos os experimentos.	56
Figura 11 - Cinética de produção de lacase pelo fungo <i>Phoma</i> sp. UHH 5-1-03 utilizando-se água e resíduos/materiais lignocelulósicos	76
Figura 12 - Cinética de produção de lacase pelo fungo <i>Phoma</i> sp. UHH 5-1-03 utilizando-se meio Czapeck-Dox e resíduos/materiais lignocelulósicos.....	77
Figura 13 - Cinética de produção de lacase pelo fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> DSM 1833 utilizando-se água e resíduos/materiais lignocelulósicos	78
Figura 14 - Cinética de produção de lacase pelo fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> utilizando-se meio Kirk e resíduos/materiais lignocelulósicos	79
Figura 15 - Cinética de produção de lacase por <i>Phoma</i> sp. UHH 5-1-03 em meio Czapeck-Dox e <i>Pleurotus ostreatus</i> em meio Kirk	81
Figura 16 - Caldos filtrados provenientes do cultivo de <i>Phoma</i> sp. (E) e <i>Pleurotus ostreatus</i> (D).....	83
Figura 17 - Agregação do farelo das cascas de banana nos <i>pellets</i> de <i>Pleurotus ostreatus</i>	84
Figura 18 - Atividade das frações de lacase de <i>Phoma</i> sp. eluídas da cromatografia de exclusão por tamanho.	87
Figura 19 - Atividade das frações de lacase de <i>Pleurotus ostreatus</i> eluídas da cromatografia de exclusão por tamanho.	87

Figura 20 - Determinação da massa molar das lacases provenientes de <i>Phoma</i> sp. e <i>Pleurotus ostreatus</i> por meio de cromatografia de exclusão por tamanho.....	89
Figura 21 - Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes da amostra do pico de atividade de lacase de <i>Phoma</i> sp., proveniente da gel filtração.....	89
Figura 22 - Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes da amostra dos picos de atividade de lacase de <i>Pleurotus ostreatus</i> , proveniente da gel filtração.....	90
Figura 23 - Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições não-desnaturantes das amostras dos picos de atividade de lacase de <i>Phoma</i> sp. e <i>Pleurotus ostreatus</i>	91
Figura 24 - Atividade relativa da lacase proveniente de <i>Phoma</i> sp. e de <i>Pleurotus ostreatus</i> em relação ao pH, para diferentes substratos (ABTS, DMP, GUA, SGZ, RBBR e Abu62).....	93
Figura 25 - Cinética da estabilidade da lacase proveniente de <i>Phoma</i> sp. em diferentes valores de pH.	96
Figura 26 - Cinética da estabilidade da lacase proveniente de <i>Pleurotus ostreatus</i> em diferentes.....	97
Figura 27 - Perfil de estabilidade térmica da lacase proveniente de <i>Phoma</i> sp. com o tempo.	98
Figura 28 - Perfil de estabilidade térmica da lacase proveniente de <i>Pleurotus ostreatus</i> com o tempo.....	99
Figura 29 - Cinética da degradação de nonilfenol pelos caldos concentrados contendo lacases provenientes de <i>Phoma</i> sp. e <i>Pleurotus ostreatus</i>	104
Figura 30 - Cinética da degradação de bisfenol-A pelos caldos concentrados contendo lacases provenientes de <i>Phoma</i> sp. e <i>Pleurotus ostreatus</i>	105
Figura 31 - Cinética da degradação de 17 α -etinilestradiol pelos caldos concentrados contendo lacases proveniente de <i>Phoma</i> sp. e <i>Pleurotus ostreatus</i>	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Patentes registradas no INPI, com relação à enzima lacase.	23
Tabela 2 – Classificação de substâncias com potencial interferente endócrino.....	30
Tabela 3 – Fontes e locais onde há a presença de hormônios.	39
Tabela 4 – Isoformas de lacases provenientes da espécie <i>Pleurotus ostreatus</i>	54
Tabela 5 – Composição dos meios de cultivo Kirk e Czapek-Dox sem fonte de carbono.	58
Tabela 6 – Meios de cultivo e substratos/materiais lignocelulósicos utilizados nos cultivos de <i>Phoma</i> sp. UHH 5-1-03.	59
Tabela 7 – Meios de cultivo e substratos/materiais lignocelulósicos utilizados nos cultivos de <i>Pleurotus ostreatus</i> DSM 1833.....	60
Tabela 8 – Composição dos reagentes utilizados na preparação dos géis de eletroforese.	67
Tabela 9 – Concentração dos substratos e seus respectivos parâmetros fotométricos.....	71
Tabela 10 – Rendimentos de atividade da lacase do caldo filtrado e após o processo de congelamento/descongelamento para os caldos de <i>Phoma</i> sp. e <i>Pleurotus ostreatus</i>	84
Tabela 11 – Atividade de lacase do caldo submetido ao congelamento/descongelamento e após o processo de ultrafiltração para <i>Phoma</i> sp. e <i>Pleurotus ostreatus</i>	85
Tabela 12 – Atividade de lacase do caldo submetido à ultrafiltração e após o processo de precipitação para <i>Phoma</i> sp. e <i>Pleurotus ostreatus</i>	86
Tabela 13 – Atividade de lacase após o processo de precipitação e após a separação por cromatografia para <i>Phoma</i> sp. e <i>Pleurotus ostreatus</i>	88
Tabela 14 – pH ótimo das isoformas de lacase provenientes de <i>Pleurotus ostreatus</i>	95
Tabela 15 – Parâmetros cinéticos da enzima lacase de <i>Phoma</i> sp. sobre diferentes substratos, de acordo com o modelo de Michaelis e Menten.....	100
Tabela 16 – Parâmetros cinéticos da enzima lacase de <i>Pleurotus ostreatus</i> sobre diferentes substratos, de acordo com o modelo de Michaelis e Menten.	102
Tabela 17 – Constante de Michaelis-Menten das diferentes isoformas de lacase de <i>Pleurotus ostreatus</i> , em reação com diferentes substratos.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotriazolína-6-sulfónico)
Abu62	acid blue 62
AE _o	Atividade enzimática inicial
AE _f	Atividade enzimática medida no final do processo
AE _m	Atividade enzimática no ponto em que a produtividade é máxima
APS	persulfato de amônio
BCCM/MUCL	Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/Mycoteque de L'Université Catholique de Louvain
BDA	Meio batata-dextrose-ágar
BPA	bisfenol – A
DMP	2,6-dimetoxifenol
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Coleção Alemã de Microorganismos)
EC	Enzyme Commission
EDC	composto interferente endócrino (endocrine disruptor compound)
EE	17 β -etinilestradiol
ETE	Estação de Tratamento de Esgotos
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GUA	guaiacol
hEr	Receptor de estrogênio humano
kDa	quilo-Dalton
K _m	constante cinética de Michaelis-Menten
kPa	kilo-Pascal
Native-PAGE	eletroforese em gel de poli-acrilamida em condições não-desnaturantes
NPEO	nonilfenol-etoxilatos
ox	oxidação
Q _p	produtividade total

Q_{pmax}	produtividade máxima
R	rendimento
RBBR	Remazol Brilliant Blue R
red	redução
SDS	sódio-dodecil-sulfato
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
SGZ	siringaldazina
TEMED	n,n,n,n tetrametiletilenodiamino
t-NP	nonilfenol técnico
$t_{1/2}$	tempo em que a atividade enzimática é metade da máxima.
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano-HCL
U	unidade internacional de atividade enzimática
UFZ	Helmholz Umwelt Forschung Zentrum (Centro de Pesquisas Ambientais Helmholtz)
UHH	Urban Hydrogeology Halle
$U L^{-1}$	unidades de atividade enzimática por litro
$U mL^{-1}$	unidades de atividade enzimática por mililitro
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
$V_{máx}$	velocidade máxima de reação enzimática
V_c	volume da coluna
V_e	volume de eluição
V_o	volume vazio
λ	comprimento de onda
\square	coeficiente de extinção molar

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Propriedades da enzima lacase	16
2.1.1 Propriedades moleculares da lacase	16
2.1.2 Mecanismos de catálise	18
2.2 Aplicações da lacase	21
2.2.1 Indústria alimentícia	23
2.2.2 Deslignificação	25
2.2.2.1 Indústria de papel e polpa	26
2.2.3 Indústria têxtil	26
2.2.4 Catálise na síntese química	27
2.2.5 Nanobiotecnologia.....	28
2.2.6 Biorremediação e Tratamento de Efluentes	29
2.2.6.1 Compostos Interferentes Endócrinos (EDCs).....	30
2.3 Mercado	39
2.4 Produção de lacase	40
2.4.1 Meios e condições de cultivo.....	41
2.4.2 Fungos produtores	43
2.4.2.1 <i>Phoma</i>	43
2.4.2.2 <i>Pleurotus</i>	45
2.4.3 Concentração do extrato enzimático bruto.....	48
2.5 Caracterização de lacases	50

2.5.1 Influência do pH e da temperatura na atividade de lacases de <i>Phoma</i> e <i>Pleurotus</i>	50
2.5.2 Determinação da massa molar da lacase	52
3 MATERIAL E MÉTODOS	56
3.1 Microrganismos e manutenção	57
3.1.1 <i>Phoma</i> sp.	57
3.1.2 <i>Pleurotus ostreatus</i>	57
3.2 Meios de cultivo.....	58
3.3 Inóculo.....	61
3.3.1 Inóculo de <i>Phoma</i> sp.....	61
3.3.2 Inóculo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	61
3.4 Estudo cinético de produção de lacase.....	61
3.5 Produção de lacase em escala ampliada.....	62
3.6 Determinação da atividade de lacase	63
3.7 Concentração do caldo filtrado.....	65
3.8 Precipitação do caldo concentrado	65
3.9 Cromatografia de exclusão por tamanho.....	66
3.10 Eletroforese	66
3.11 Metodologia dos cálculos dos parâmetros cinéticos, eficiência catalítica e rendimento.	68
3.12 Estabilidade com o pH.....	72
3.13 Estabilidade com a temperatura.....	72
3.14 Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e da velocidade máxima de reação ($V_{máx}$).	72
3.15 Degradação de compostos interferentes endócrinos (EDC)	74
3.15.1 Análises quantitativas da degradação dos EDCs.....	75
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.1 Cinética de produção de lacase em diferentes meios de cultivo.	76
4.3 Concentração do caldo filtrado.....	82
4.4 Precipitação do caldo concentrado	86
4.5 Cromatografia de exclusão por tamanho.....	86

4.6 Determinação da massa molar.....	88
4.7 Determinação do pH ótimo.....	92
4.8 Cinética de estabilidade com o pH.....	95
4.9 Cinética de estabilidade com a temperatura.....	98
4.10 Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e da velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$).	100
4.11 Degradação de compostos interferentes endócrinos.....	103
5. CONCLUSÕES.....	108
6. PERSPECTIVAS.....	111
7. REFERÊNCIAS.....	112
ANEXO A – Correlação entre a oxidação de ABTS (U) e o volume do caldo enzimático.	129
APÊNDICE A - Fotografias originais dos géis da eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e não-desnaturantes (Native-PAGE)	129
APÊNDICE B – Curvas de Michaelis-Menten e Hill da lacase proveniente de <i>Phoma</i> sp. e <i>Pleurotus ostreatus</i> em reação com os substratos ABTS, GUA, SGZ, DMP, RBBR e Abu62.	131

INTRODUÇÃO

As enzimas estão entre os mais importantes produtos biotecnológicos. Possuem um vasto campo de aplicação e o mercado se apresenta cada vez mais promissor.

A enzima lacase vem sendo foco de muitas pesquisas nos últimos anos devido, principalmente, a sua elevada capacidade de decompor compostos fenólicos altamente recalcitrantes. Sua aplicação vai desde a degradação de lignina, visando à produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos agroindustriais, degradação de poluentes em tratamento de resíduos e biorremediação, até aplicações em tecnologias de ponta como nanobiotecnologia aplicada a biosensores e células de combustível.

Atualmente, o interesse na utilização de resíduos agroindustriais para a produção de lacase vem crescendo, visto que alguns microrganismos produtores desta enzima podem desenvolver-se neste tipo de substrato. A utilização destes resíduos pode reduzir o custo de produção das enzimas, considerado um dos principais obstáculos para sua produção em escala industrial. Além disso, o reaproveitamento de resíduos contribui para o desenvolvimento de processos sustentáveis.

Dentre os microrganismos produtores de lacase, encontram-se alguns fungos aquáticos e terrestres.

Os fungos aquáticos podem ser considerados fonte de lacases, levando-se em consideração a grande variedade de ambientes aquáticos e, conseqüentemente, de parâmetros físico-químicos aos quais estes microrganismos estão adaptados. Dentre os fungos aquáticos, o da espécie *Phoma* UHH 5-1-03 foi isolado do rio Saale, localizado no centro da Alemanha, pelo grupo de pesquisa “Micologia Ambiental” do centro de pesquisas ambientais “Helmoltz Umwelt Forschung Zentrum - UFZ” e apresenta-se como um bom produtor de lacases com capacidade de oxidar poluentes recalcitrantes.

Entre os fungos terrestres, os fungos do gênero *Pleurotus* pertencentes à classe dos Basidiomicetos, destacam-se como potenciais produtores de lacases, adaptando-se facilmente às condições ambientais, sendo considerados

decompositores eficientes do material lignocelulósico presente em resíduos agroindustriais.

Folhas de bananeira e cascas de banana são resíduos agroindustriais que têm sido estudados intensamente pelo grupo de pesquisa “Processos Biotecnológicos” da Universidade da Região de Joinville na produção de corpos frutíferos e compostos bioativos de fungos do gênero *Pleurotus*, incluindo a linhagem *Pleurotus ostreatus* DSM 1833, sendo que seu cultivo neste substrato mostra-se promissor. Além disso, é um resíduo gerado em elevada quantidade na região Nordeste de Santa Catarina (Brasil) devido ao expressivo cultivo de banana na região e constitui um substrato potencial para produção de lacases.

Compostos interferentes endócrinos são substâncias liberadas em grande quantidade no ambiente, capazes de mimetizar a ação de hormônios e causar problemas relacionados ao sistema endócrino de organismos, entre eles os seres humanos. Devido à sua elevada toxicidade e persistência, mesmo em baixas concentrações, é de extrema importância o estudo de métodos para a degradação destes compostos. A utilização de enzimas fúngicas na biodegradação dos compostos interferentes endócrinos vem se mostrando uma interessante alternativa.

Sendo assim, este trabalho teve como propósito investigar o potencial de produção da enzima lacase, por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 e *Phoma* UHH 5-1-03 em meio contendo materiais lignocelulósicos além da purificação, caracterização e validação da eficácia desta enzima na degradação de compostos interferentes endócrinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Propriedades da enzima lacase

Lacase (Benzenodiol: oxigênio oxireductase, EC 1.10.3.2) foi inicialmente identificada na árvore japonesa produtora de laca *Toxicodendron vermiciflua*. Posteriormente, também foi identificada sua presença em outras plantas, muitos insetos e em vários fungos, especialmente em basideomicetos ligninolíticos, como os do gênero *Pleurotus* (MIKOLASCH e SCHAUER, 2009).

Do ponto de vista fisiológico, as lacases fúngicas estão envolvidas em processos de morfogênese, degradação de lignina, patogênese, destoxificação e formação de pigmentos (MOROZOVA *et al.*, 2007).

Na degradação de lignina, as lacases atuam em sinergia com outras enzimas, ou na remoção de compostos tóxicos formados durante o processo de degradação mediado por outras enzimas (BALDRIAN, 2006).

2.1.1 Propriedades moleculares da lacase

Lacases possuem massa molar variando de 50 a 130 kDa. A fração de carboidratos em lacases fúngicas (10-20 %) se constitui principalmente de manose, N-acetilglicosamina e galactose (MOROZOVA *et al.*, 2007).

As variadas isoformas de lacase com diferentes massas molares parecem estar associadas às condições de cultivo, ao estado fisiológico do microrganismo e, essencialmente, à presença de algum indutor no meio de cultivo, como íons de cobre (MOROZOVA *et al.*, 2007; PEZZELA *et al.*, 2009).

Lacases são polifenol-oxidases que contém geralmente três tipos de átomos de cobre em seu centro catalítico e são também conhecidas como multicobre-oxidases. Um destes átomos é responsável pela coloração tipicamente azul.

Enzimas similares, porém sem este átomo são conhecidas como lacases amarelas ou brancas (BALDRIAN, 2006).

Quase todas as lacases fúngicas são monômeros ou dímeros com grau de glicosilação variando entre 10 e 25%, o que contribui para a estabilidade da enzima (SOLOMON *et al.*, 1996). Na Figura 1 é mostrada a representação tridimensional da estrutura da isoenzima POXA1b da lacase proveniente do fungo *Pleurotus ostreatus* (GARZILLO *et al.*, 2001).

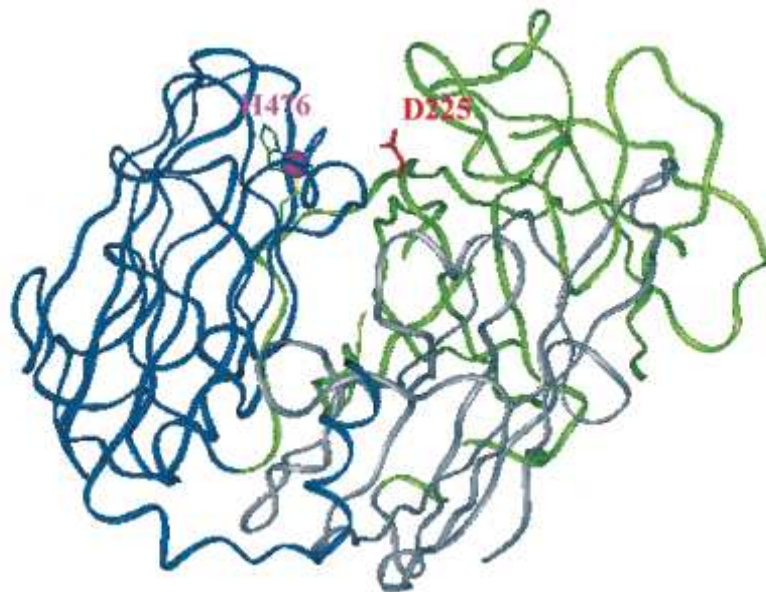


Figura 1 – Representação tridimensional da estrutura da isoenzima POXA1b da lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus*, evidenciando os aminoácidos H476 e D225, além do cobre T1 (esfera violeta).

Fonte: GARZILLO *et al.* (2001).

A glicosilação de lacases fúngicas é um dos maiores problemas quanto à sua produção heteróloga, sendo difícil manter a enzima em sua forma ativa. Já foi proposto que a glicosilação está envolvida não somente com a estrutura protéica, como também na proteção contra a degradação proteolítica. Devido a modificações pós-traducionais, lacases só podem ser expressas em microrganismos eucarióticos que permitem estas modificações após a tradução da sequência genética em proteína. Entre os diversos microrganismos usados para a expressão de lacase, encontram-se fungos filamentosos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma reesei*, e leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Kluyveromyces lactis* e *Yarrowia lipolytica* (COUTO e TOCA-

HERRERA, 2007). Conforme Baldrian (2006), baixos níveis de glicosilação já foram encontrados em lacases de *Pleurotus pulmonarius*.

2.1.2 Mecanismos de catálise

Lacases são enzimas capazes de catalisar a oxidação de compostos fenólicos, carreando elétrons que são utilizados na redução de oxigênio molecular a água (THURSTON, 1994; MESSERSCHMIDT, 1997; BALDRIAN, 2006). Além disso, catalisam diversas reações, como a clivagem da ligação alquil-fenol, de ligações C α -C β e de dímeros fenólicos de lignina, desmetoxilação, desmetilação, polimerização e despolimerização.

O centro catalítico da molécula de lacase consiste em três tipos de átomos de cobre com diferentes funções: o cobre do tipo 1 (T1), que possui banda de absorção na região da luz visível, em torno de 600 nm, o que confere a coloração azul; o cobre do tipo 2 (T2), que apresenta baixa absorção na região da luz visível; e o cobre do tipo 3 (T3), que é formado por um par de íons de cobre ligados antiferromagneticamente (SOLOMON *et al.*, 1996).

Os substratos fenólicos são oxidados pelo cobre T1, e os elétrons são transferidos para T2 e T3 que, juntos, formam um centro trinuclear, onde o oxigênio molecular é reduzido a água, conforme esquematizado na Figura 2 (BALDRIAN, 2006).

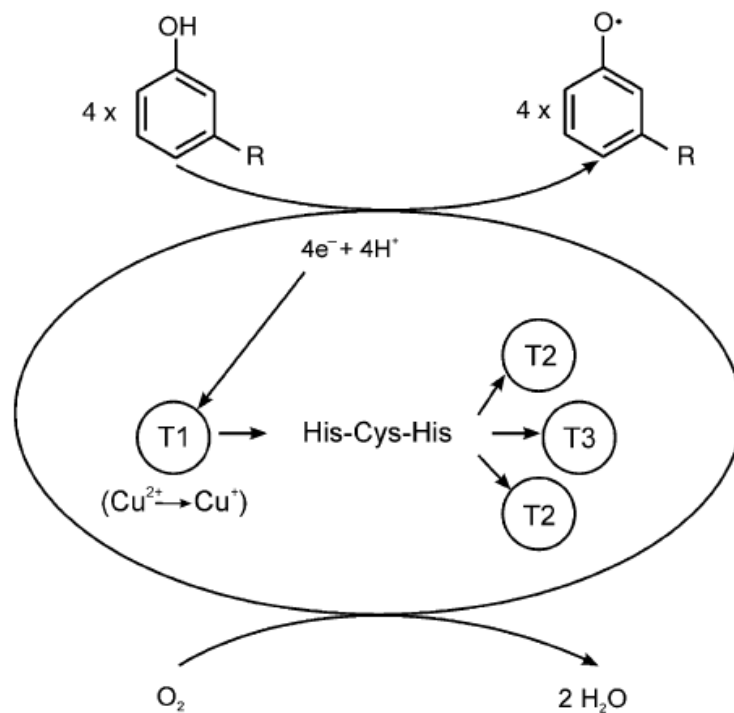


Figura 2 - Ciclo catalítico da lacase
Fonte: BALDRIAN (2006).

Estas enzimas são divididas em lacases com alto potencial redox e lacases com baixo potencial redox. Lacases com alto potencial redox ocorrem principalmente em fungos da “podridão branca”, enquanto que as de baixo potencial redox são comumente encontrados em insetos, bactérias, leveduras e vegetais (MIKOLASCH e SCHAUER, 2009).

Lacases têm a capacidade de oxidar uma ampla diversidade de compostos. Alguns substratos naturais são os fenóis, polifenóis, fenóis metoxilados e outros. Como substratos sintéticos, é possível citar o ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) e a siringaldazina (4-Hidroxi-3,5-Dimetoxibenzaldeidazina). Embora lacases sejam boas oxidantes de difenóis, monofenóis como o 2,6-dimetoxifenol (1,3-dimetoxi-2-hidroxibenzeno) e o guaiacol (2-metoxifenol) são substratos sobre os quais a lacase também tem um bom poder de oxidação (ARORA e SHARMA, 2009). As estruturas destes compostos são mostradas na Figura 3.

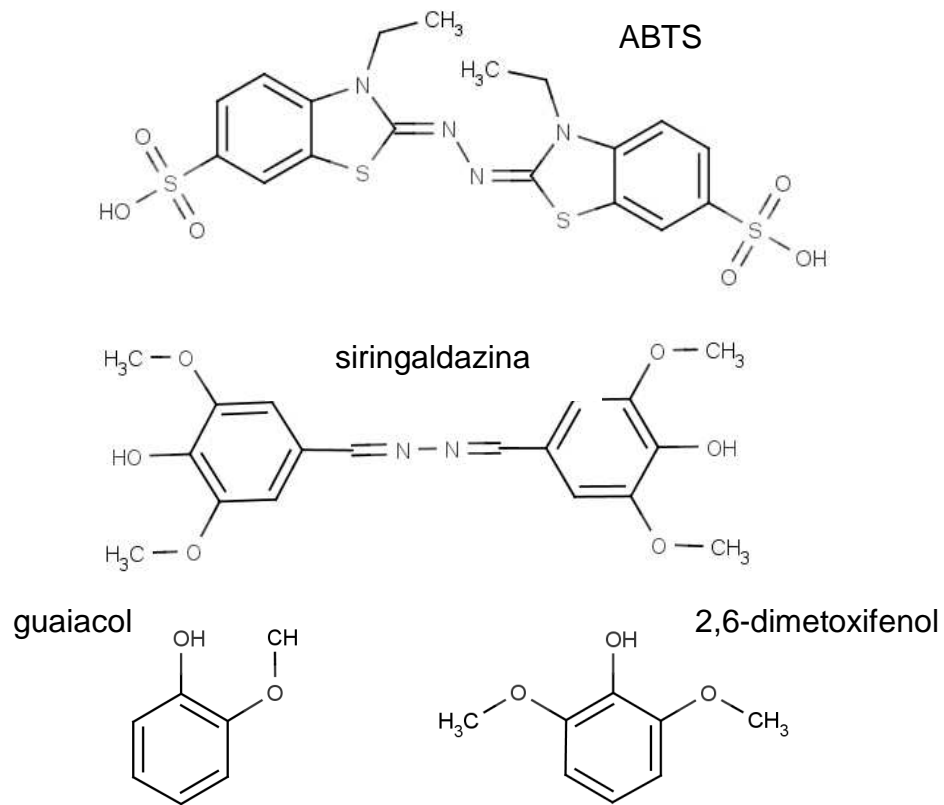


Figura 3 – Estruturas moleculares dos substratos de lacase.
Fonte: CHEMIDPLUS (2010).

Lacases pertencem a uma classe de oxidases que não necessitam da adição ou síntese de cofatores de baixa massa molar, como no caso do peróxido de hidrogênio para a peroxidase. A enzima utiliza como cosubstrato o oxigênio molecular, já disponível no ambiente, reduzindo os custos de produção (ARORA e SHARMA, 2009).

Embora estas enzimas não necessitem da presença de um cofator, alguns substratos não conseguem ser oxidados diretamente pelas lacases, ou devido ao fato de serem muito grandes para penetrar no sítio ativo da enzima, ou porque possuem um potencial redox muito elevado. Os “mediadores químicos” atuam intermediando as reações da lacase com o substrato, conforme esquematizado na Figura 4 (RIVA, 2006).

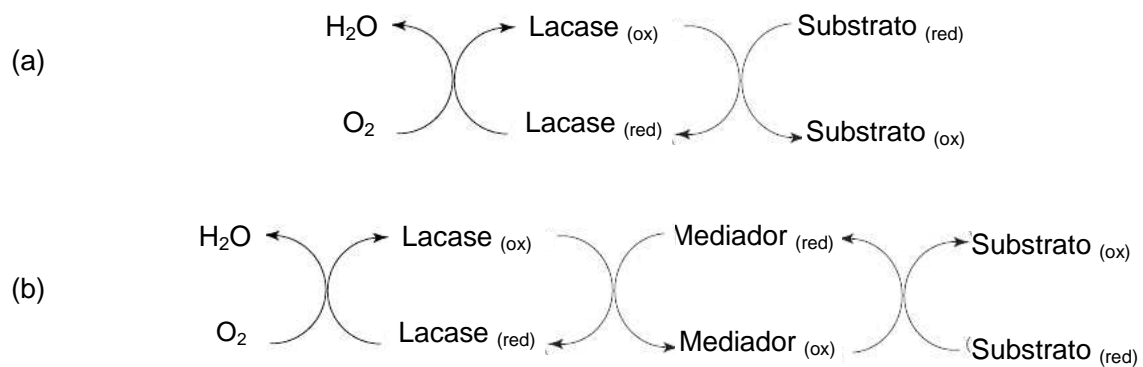


Figura 4 - Representação esquemática do ciclo redox catalisado por lacase na ausência (a) e na presença (b) de mediadores químicos.
Fonte: adaptado de RIVA (2006).

O primeiro mediador sintético desenvolvido para atuar em reações de oxiredução, objetivando a degradação de lignina, foi o ABTS (BOURBONNAIS e PAICE, 1990). Este composto é primeiramente oxidado e, em seguida, oxida a lignina, atuando como um carreador de elétrons (ROCHEFORT *et al.*, 2004).

2.2 Aplicações da lacase

As tecnologias convencionais de oxidação utilizadas em processos industriais geram problemas como reações não específicas e indesejáveis ou o uso de produtos tóxicos que agredem o meio ambiente. Tecnologias de oxidação modernas são baseadas na oxidação enzimática, que é mais específica e menos agressiva ao meio ambiente. Segundo Riva (2006) o interesse por processos mais eficientes e ambientalmente favoráveis para os diversos setores da indústria tem impulsionado a pesquisa por catalisadores “verdes” que utilizam ar e liberam água como subproduto.

As lacases têm sido extensivamente pesquisadas devido suas propriedades, que as tornam altamente úteis em diversos processos biotecnológicos. Seu campo de aplicação vai desde a destoxificação de efluentes das indústrias petroquímica, têxtil, alimentícia e de papel, biorremediação, produção de drogas e cosméticos, até como ferramenta para diagnósticos médicos, entre outras. Segundo Mikolasch e

Schauer (2009), devido sua versatilidade e especificidade pelo substrato, sendo capaz de catalisar grande variedade de reações, a lacase pode se tornar uma das mais importantes enzimas fúngicas.

O potencial de aplicação de lacases pode ser observado através das diversas patentes que vêm sendo depositadas no “United States Patent Office - USPTO (2009)” e no “European Patent Office - EPO (2009)”. No primeiro foram encontrados 37 registros de patentes com a palavra “lacase” no título. No órgão europeu foram encontrados 371 registros de patentes provenientes de diversos países, principalmente China e Estados Unidos e, em especial, de empresas de biotecnologia. Na Tabela 1 são mostradas as patentes registradas no Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI (2009).

Tabela 1 – Patentes registradas no INPI, com relação à enzima lacase.

Processo	Ano	Título
PI0516773-6	2005	Enzima lacase e uso da mesma
PI0516946-1	2005	Enzimas lacase e seus usos
PI0111040-3	2001	Enzima de lacase e o gene codificando a enzima
PI0004323-0	2001	Biossensor amperometrico para determinação de compostos fenólicos -
PI0004038-0	2000	Produção de aromas naturais por lacase
PI0002329-9	2000	Processo de tratamento de efluente papelheiro kraft e1 pelo sistema de enzima-mediador: lacase-hidroxamatos.
PI0009302-5	2000	Utilização de n-acetilcisteína como agente redutor e de uma lacase como agente oxidante, processo de tintura de fibras queratínicas, composição, e, dispositivo com vários compartimentos
PI9708995-8	1997	Composições detergente e amaciante compreendendo enzima lacase e uso das mesmas.
PI9709247-9	1997	Composição detergente compreendendo uma celulase e uma lacase.
PI9508113-5	1995	Construção de dna, enzima, vetor recombinante, célula hospedeira recombinante, processos para obter uma enzima de lacase, para polimerizar um substrato de lingnina ou lingossulfato em solução, para despolimerizar in situ pasta kraft, para oxidar corantes ou precursores de corante, para tingir cabelo e para polimerizar ou oxidar um composto fenolico ou anilina, composição de corante e recipiente.
PI9507817-7	1995	Lacase de <i>myceliophthora</i> substancialmente pura, construção de dna, vetor recombinante, célula hospedeira recombinante, processo para obter uma enzima de lacase, processo para melhorar o rendimento de lacase recombinante, processo para polimerizar um substrato de lignina ou lignossulfato em solução, processo para despolimerizar <i>in situ</i> pasta kraft, para oxidar corantes ou percursos de corantes, processo para pintar cabelo, composição de corante, recipiente, e processo para polimerizar ou oxidar um composto fenólico ou anilina.

Fonte: Adaptado de: Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI, 2009.

2.2.1 Indústria alimentícia

O uso de lacase em processos da indústria alimentícia tem se mostrado promissor, pois pode aumentar a produtividade, eficiência e qualidade de produtos alimentares, com a vantagem de não ser um processo agressivo. Estudos da

produção, purificação e imobilização desta enzima são necessários para implementar sua aplicação a baixo custo neste setor (MINUSSI *et al.*, 2002).

Lacases podem ser utilizadas em processos industriais alimentícios que visam a modificação da aparência de bebidas ou alimentos. Diversas pesquisas conduzidas nesta área visam o melhoramento destes processos (COUTO e TOCA-HERRERA, 2006).

A Resolução N° 26, de 26 de maio de 2009, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, aprova a utilização da enzima lacase proveniente de *Myceliophthora thermophila* expressa em *Aspergillus oryzae* em alimentos destinados ao consumo humano (BRASIL, 2010).

A aplicação de enzimas na indústria alimentícia pode aumentar a qualidade dos produtos, quer seja pela produção de aromas ou pela eliminação de aromas indesejáveis. A hidrólise de moléculas como proteínas, lipídios ou carboidratos já vêm contribuindo para a melhor qualidade de produtos alimentícios. Entretanto, o processo de oxidação também pode ser utilizado. Schroeder *et al.* (2008) testaram a utilização de lacase na eliminação de aromas indesejáveis produzidos por contaminações no processo produtivo do suco de maçã. Os resultados mostraram eliminação quase completa destes aromas indesejáveis após o tratamento do suco com as enzimas.

Flander *et al.* (2008) avaliaram o efeito de lacase e xilanase provenientes do fungo *Trametes hirsuta* na textura de pães. Houve um incremento na rigidez da massa e na firmeza do pão fresco, características benéficas à aparência do produto.

Na produção de vinhos, enquanto o álcool e os ácidos orgânicos são responsáveis pelo aroma, a cor e o sabor dependem particularmente de compostos fenólicos de cada tipo de vinho. Enzimas podem ser empregadas alternativamente aos adsorventes físico-químicos na remoção seletiva destes compostos, sem alterar as características organolépticas desejáveis ao vinho (MINUSSI *et al.*, 2002). Conforme Minussi *et al.* (2007), a utilização de lacase do fungo da espécie *Trametes versicolor* na remoção de compostos fenólicos específicos permite a redução dos custos de processo e maior tempo de armazenagem dos vinhos sem a alteração de sabor e cor.

Outro problema relacionado à produção de bebidas é a formação de turbidez em cervejas durante seu armazenamento. Esta turbidez é causada pela precipitação

de proteínas, estimulada pela presença de polifenóis. No tratamento convencional para a retirada de polifenóis é utilizada a polivinil pirrolidona (PVP), produto de difícil manuseio que pode afetar a saúde dos trabalhadores. Este produto pode ser substituído pela lacase, a qual não gera os problemas de saúde (MINUSSI *et al.*, 2002).

2.2.2 Deslignificação

A estrutura da madeira é composta por fibras longas e finas, que são a celulose e a hemicelulose. A lignina mantém unidas as cadeias de celulose e hemicelulose, atuando como uma cola natural. A lignina é um polímero complexo composto por subunidades de hidroxipropano unidas por vários tipos de ligações químicas (MARTINEZ *et al.*, 2005).

A presença de lignina na forragem utilizada na alimentação de ruminantes dificulta o processo de digestão dos animais. A deslignificação destes resíduos por lacase ou por fungos portadores destas enzimas aumenta não somente sua digestibilidade como também seu valor nutricional. A utilização de resíduos agroindustriais na produção de cogumelos comestíveis como os das espécies *Lentinus edodes* e *Pleurotus ostreatus* permitem, ao mesmo tempo, a geração de produtos de alto valor agregado, e o reaproveitamento dos resíduos na alimentação de ruminantes, pois ao se reproduzir, estas espécies degradam lignina (BONATTI *et al.*, 2004; ARORA e SHARMA, 2009).

O estudo dos processos enzimáticos de deslignificação tem sido intensificado nos últimos anos, principalmente, visando a produção de combustíveis de segunda geração, como o etanol produzido a partir de bagaço de cana-de-açúcar (ARORA e SHARMA, 2009).

Uma nova aplicação para a tecnologia enzimática mediada por lacases é o desenvolvimento de características desejáveis às fibras da madeira, tecnologia conhecida por *tailoring*. É possível utilizar a lacase na adesão enzimática de compósitos de materiais lignocelulósicos ou mesmo para melhorar suas

propriedades mecânicas através da ativação das ligações entre as fibras, substituindo adesivos sintéticos (COUTO e TOCA-HERRERA, 2006).

2.2.2.1 Indústria de papel e polpa

Na produção do papel, a lignina precisa ser eliminada, seja por métodos mecânicos ou químicos, principalmente para a produção de polpa *kraft*. Nos processos de polpação e branqueamento, em que a lignina é eliminada, são utilizados produtos químicos com elevado grau de toxicidade, como cloro, óxido de cloro, além do hidróxido de sódio e sulfato de sódio. Entretanto, atualmente a utilização de cloro foi proibida e a de óxido de cloro está restrita, devido ao impacto ambiental gerado. Sendo assim, novas tecnologias para o processo de branqueamento vêm sendo desenvolvidas, com a utilização de enzimas oxidativas, incluindo lacases, provenientes principalmente de fungos da podridão branca (RIVA, 2006).

Com a tecnologia do “Sistema Mediador de Lacase” (*laccase mediator system* – *LMS*), utilizam-se mediadores químicos no processo de oxidação de compostos lignocelulósicos, sendo possível um incremento no seu uso para a indústria de papel e celulose, tendo maior aplicabilidade até mesmo que outras enzimas lignocelulolíticas como a lignina-peroxidase e a manganês-peroxidase (COUTO e TOCA-HERRERA, 2006).

Com a utilização de lacase nos processos de biopolpação e biobranqueamento, é possível economizar energia no processo, melhorar as propriedades do produto, além de ser um processo com um potencial poluidor bem reduzido (ARORA e SHARMA, 2009).

2.2.3 Indústria têxtil

A utilização de lacase na indústria têxtil vem ganhando cada vez mais espaço, nos processos de estonagem, de lavação dos tecidos e de degradação dos corantes

que permanecem no efluente. No processo de estonagem, compostos químicos tóxicos como o hipoclorito podem ser substituídos por lacase (ARORA e SHARMA, 2009).

Zille (2005) estudou o potencial de degradação de corantes industriais presentes em efluente têxtil, com a utilização de lacase proveniente do fungo *Trametes villosa*. Devido à capacidade de lacase de catalisar processos de polimerização para a síntese de corantes, também foi possível comprovar a possibilidade de realizar o tingimento de lã com a utilização da enzima, mostrando ser uma alternativa economicamente viável e atrativa em comparação aos processos tradicionais de tingimento.

2.2.4 Catálise na síntese química

As reações de oxidação mediadas por lacase levam à formação de radicais, que subsequentemente levam à formação de dímeros, oligômeros e eventualmente polímeros. A desprotonação do grupo hidróxido gera um radical, que pode levar à formação de derivados quinônicos ou ao ataque nucleofílico intermolecular, gerando por si só dímeros homomoleculares. Estes dímeros podem ser do tipo C-C ou C-O, e estas reações são chamadas de acoplamento oxidativo, condensação oxidativa ou de acoplamento oxidativo fenólico. Após longo tempo de reação, estes dímeros formados podem dar origem a oligômeros ou a polímeros. Além destas reações, a lacase ainda pode dar origem a reações de acoplamento de substrato, levando à formação de diversas estruturas. Estes compostos podem ser interessantes do ponto de vista da síntese de compostos (RIVA, 2006; MIKOLASCH e SCHAUER, 2009).

Reações oxidativas de lacase também podem ser utilizadas para a síntese de compostos biologicamente ativos, como novos antibióticos do tipo penicilinas e cefalosporinas. Na derivatização de aminoácidos, com a utilização das reações oxidativas de lacase é possível criar ligações entre proteínas que contenham elevada quantidade de lisina, o que pode ser importante para o desenvolvimento de novos tipos de adesivos e biomateriais (MIKOLASCH e SCHAUER, 2009).

Reações catalisadas por lacase também já foram utilizadas para a produção de pigmentos como a melanina. Como os polifenóis são os blocos construtivos dos pigmentos naturais do cabelo, é possível criar versões sintéticas deste pigmento no cabelo, desenvolvendo melaninas pretas, marrons etc. (COVINGTON *et al.*, 2005). Além disso, também é possível colorir outros produtos como couro, lã e algodão e dar propriedades antimicrobianas a estes produtos, preservando-os (MIKOLASCH e SCHAUER, 2009).

Outro exemplo é a produção de polifenóis com a utilização da reação de oxidação de lacase, processo em que tradicionalmente é utilizado formaldeído. Desta forma produz-se compostos fenólicos por um processo não tão agressivo e ambientalmente amigável (UYAMA *et al.*, 2003).

Kobayashi *et al.* (2001) utilizaram reações de polimerização por lacase na preparação de um produto similar à tradicional laca japonesa “urishi”, que foi chamada de “urishi artificial”.

2.2.5 Nanobiotecnologia

A nanobiotecnologia contribui para o desenvolvimento de biosensores cada vez menores e mais eficientes, através da deposição controlada e adsorção específica de biomoléculas em diferentes superfícies. Por meio da reação de oxiredução de lacase já foi possível desenvolver biosensores para a detecção de morfina, codeína, catecolamina, flavonóides vegetais e compostos fenólicos em vinhos. Em aplicações médicas essa área tem especial aplicação, como no desenvolvimento de biosensor de lacase capaz de detectar catecolamina, neurotransmissores de dopamina, epinefrina e norepinefrina (COUTO e TOCA-HERRERA, 2006; ARORA e SHARMA, 2009).

Outra aplicação nanobiotecnológica da lacase é no desenvolvimento de células de biocombustível. A enzima pode ser imobilizada em cátodos, sendo capaz de gerar energia, devido ao carreamento de elétrons durante o processo de catálise. Esta é uma tecnologia que atrai muito a atenção, pois é uma possibilidade

interessante de gerar energia sem a queima de combustíveis fósseis (COUTO e TOCA-HERRERA, 2006).

2.2.6 Biorremediação e Tratamento de Efluentes

Lacases fúngicas possuem um grande potencial de aplicação na área de tratamento de efluentes e biorremediação. Como estas enzimas possuem pouca especificidade a diferentes tipos de substratos, elas podem ser utilizadas nos mais diversos processos de tratamento. Além disso, lacases utilizam o oxigênio molecular comoceptor final de elétrons, reduzindo o custo de sua aplicação quando comparada a outras enzimas utilizadas em tratamento de efluentes, como as peroxidases que necessitam da adição de peróxido de hidrogênio (VISWANATH *et al.*, 2008; ARORA e SHARMA, 2009).

Lacases são capazes de oxidar uma grande variedade de compostos xenobióticos como fenóis clorados, pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, tornando interessante sua aplicação para a biorremediação de áreas contaminadas (VISWANATH *et al.*, 2008).

Há uma crescente preocupação com os efeitos adversos ao meio ambiente e à saúde resultantes da produção, uso e disposição de substâncias presentes no cotidiano das pessoas e que afetam a economia. Produtos químicos em geral, medicamentos e outros bens de consumo, bem como hormônios são liberados no meio ambiente após passarem por processos de tratamento ineficazes e não projetados para a sua remoção (CABANA *et al.*, 2007).

Neste contexto, os compostos interferentes endócrinos vêm sendo foco da atenção e preocupação de órgãos ambientais de países desenvolvidos, devido aos resultados alarmantes que pesquisas científicas vêm confirmando em relação à sua toxicidade aos seres humanos e ao meio ambiente (GHISELI e JARDIM, 2007; FERREIRA, 2008; BARNABÉ *et al.*, 2009; HOLMSTRUP *et al.*, 2009).

2.2.6.1 Compostos Interferentes Endócrinos (EDCs)

Da língua inglesa *Endocrine Disruptor Compounds* – EDC, os interferentes endócrinos são compostos ou misturas exógenas que têm o potencial de interferir na regulação hormonal e no sistema endócrino, conseqüentemente, causando efeitos adversos à saúde de animais e humanos (CEC, 1999; USEPA, 2009;).

Estes compostos podem ser antropogênicos, denominados xenoestrogênios, ou de origem natural, por exemplo, os fitoestrogênios. Fontes conhecidas de interferentes de origem antrópica são pesticidas, adesivos plásticos, bifenilas policloradas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, compostos de organoestanho, alquilfenóis e subprodutos industriais como dioxinas e furanos (GHISELLI e JARDIM, 2007). Na Tabela 2 estão listadas substâncias classificadas como interferentes endócrinos por várias organizações.

Tabela 2 – Classificação de substâncias com potencial interferente endócrino.
Fonte: GHISELLI e JARDIM, 2007.

SUBSTÂNCIAS	UKEA	USEPA	OSPAR		JEA	WWF
			<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>		
Esteróides						
Etinilestradiol	x		x			
17 β -Estradiol	x		x			
Estrona	x		x			
Mestranol	x		x			
Dietilestilbestrol	x		x			
Alquilfenóis						
Nonilfenol	x	x	x		x	x
Nonilfenol Etoxilado	x			x		
Octilfenol	x	x	x		x	
Octilfenol Etoxilado	x					
Compostos Poliaromáticos						
Bifenilas Policloradas	x	x	x		x	x
Retardantes de Chama				x	x	x
Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAH)		x		x		
Compostos com Oxigênio						
Ftalatos	x	x		x	x	x
Bisfenol A	x	x			x	x
Pesticidas						
Atrazina	x	x		x	x	x
Simazina	x	x		x	x	x
Diclorvos	x					
Endossulfan	x	x		x	x	x
Trifluralina	x	x				x
Demeton-S-metil	x					
Dimetoato	x					x
Linuron						x
Permetrina	x	x			x	
Lindano	x	x	x			x
Clordano	x			x	x	x
Dieldrin	x	x		x	x	x
Hexaclorobenzeno	x			x	x	x
Pentaclorofenol	x	x			x	x
Outros						
Dioxinas e Furanos	x		x		x	x
Tributilestanho	x	x	x		x	x

UKEA: Agência Ambiental do Reino Unido; USEPA: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos;
OSPAR: Comissão de Paris e Oslo; JEA: Agência Ambiental do Japão; WWF: Organização não Governamental

Alterações no sistema endócrino ocorrem quando um interferente endócrino interage com um receptor hormonal, modificando sua resposta natural. Esta alteração pode ser agonista, quando o interferente mimetiza a ação do hormônio, ou antagonista, quando o interferente bloqueia a ligação natural do hormônio ao receptor (GHISELLI e JARDIM, 2007).

Os interferentes podem ser estrogênicos, quando exercem efeitos de “feminilização”, competindo com o hormônio natural feminino estradiol, ou androgênicos, exercendo efeitos de “masculinização”, competindo com o hormônio natural masculino dihidrotestosterona (GHISELLI e JARDIM, 2007).

Os contraceptivos orais são EDCs sintéticos desenvolvidos com a intenção de atuar como estrogênicos. Entretanto há EDCs que possuem atividade estrogênica acidentalmente, como no caso de alguns compostos químicos industriais (BONEFELD-JORGENSEN *et al.*, 2007).

Devido à elevada quantidade liberada no ambiente, a alta toxicidade mesmo em baixas concentrações e a tendência de serem adsorvidos pelos sedimentos ou partículas dos ambientes aquáticos, EDCs têm recebido atenção quanto aos seus efeitos na saúde e no meio ambiente (CATJHAML *et al.*, 2009a).

Sua ocorrência no meio ambiente tem sido descrita em afluentes e efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE), lodos provenientes de ETEs, sedimentos marinhos, solo, águas superficiais, subterrâneas e potáveis (FERREIRA, 2008). Recentemente, vêm sendo estudadas as possibilidades de reaproveitamento do lodo de águas residuárias para a síntese de produtos de valor agregado através de bioconversão, como biopesticidas, bioplásticos e enzimas industriais. Entretanto, a presença de EDCs no lodo restringe sua utilização a algum tratamento prévio para a remoção destes poluentes, pois, podem acabar sendo reintroduzidos no meio ambiente (BARNABÉ *et al.*, 2009).

O efeito dos EDCs sobre a saúde humana pode estar desencadeando diversas doenças como o câncer de mama e de útero, incidência de ovários policísticos (FERREIRA, 2008), deficiências no sistema imunológico (AHMED, 2000), redução da fertilidade masculina e câncer de próstata (WARRING e HARRIS, 2005) alteração de glândulas tireóides (HARRISON *et al.*, 1997), disfunções do ovário (crescimento folicular e ovulação), no processo de fertilização e gravidez (DASTON *et al.*, 1997), além de efeitos neurocomportamentais (FERREIRA, 2008).

EDCs tipicamente de origem antropogênica que atuam mimetizando o estrogênio são o nonilfenol técnico (t-NP), o bisfenol-A (BPA) e o 17 α -etinilestradiol (EE) (CATJHAML *et al.*, 2009a,b).

Ainda existem divergências, principalmente entre pesquisa e indústria, quanto ao estabelecimento de alguma legislação internacional relacionada a estes compostos, entretanto Barnabé *et al.* (2009) esclarecem muito bem os pontos-chave a serem discutidos. É necessário a identificação de produtos químicos que contenham EDCs; a análise da interação de produtos químicos que, individualmente não tenham atividade interferente endócrina, mas que atuando em combinação possam apresentar; o tempo em que estes compostos persistem no ambiente; a análise dos subprodutos da degradação destes compostos, pois pode haver até uma toxicidade maior e; a determinação dos níveis de exposição de humanos e da vida selvagem a estes compostos e em que níveis podem causar efeitos adversos.

Os Estados Unidos iniciaram recentemente um programa chamado “Endocrine Screening Program” que tem por objetivo colecionar informações de produtos químicos que contenham EDCs e métodos para a detecção destes compostos (USEPA, 2009).

Na União Européia e na Suíça a utilização de nonilfenol já está proibida por lei, porém, conforme Gabriel e Kohler (2009), nos Estados Unidos e na maioria dos outros países, ainda não existe qualquer tipo de legislação. Segundo Ghiselli e Jardim (2007), no Brasil ainda há poucos grupos de pesquisa trabalhando nesta temática.

Conforme Auriol *et al.* (2007), há um interesse relativamente recente na utilização de enzimas fúngicas na degradação de nonilfenóis, bisfenol e etinilestradiol.

a) Nonilfenóis

Nonifenol-etoxilatos (NPEOs) representam o maior grupo de surfactantes não-iônicos utilizados industrialmente. Para a produção de NPEOs, utiliza-se o nonifenol técnico (t-NP), que é composto por um anel aromático com uma hidroxila, em cerca

de 85 % dos casos na posição *para*, ligado a uma cadeia nonil (GUENTHER *et al.*, 2006; MARTIN *et al.*, 2007). Na Figura 5 é possível observar a estrutura molecular do nonilfenol.

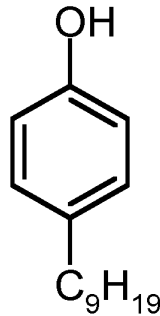


Figura 5 - Estrutura molecular do Nonilfenol.
Fonte: MÜLLER e SCHLATTER, 1998.

Sua aplicação vai desde dispersante em processos da indústria de papel e celulose, agente emulsificante em tintas a base de látex, componente da formulação de pesticidas, agentes flotantes, aditivos em óleos lubrificantes, agente catalítico na cura de resinas epóxicas, até produtos de limpeza industriais e domésticos (CEC, 1999; GUENTHER *et al.*, 2006).

A maior parte dos NPEOs é utilizada em soluções aquosas. Sendo assim, são descartados nas águas residuárias industriais e municipais e, conseqüentemente, nas plantas de tratamento (GABRIEL *et al.*, 2005b). A degradação incompleta dos NPEOs em plantas de tratamento de efluentes leva à formação dos t-NPs, considerados altamente recalcitrantes (BARNABÉ *et al.*, 2009).

Devido a sua ação negativa aos hormônios sexuais, t-NP é classificado, assim como outros compostos químicos, como um componente interferente endócrino (GHISELLI e JARDIM, 2007).

NPs têm baixo potencial de biodegradabilidade em condições aeróbias, sendo que concentrações de até 398 $\mu\text{g.L}^{-1}$ já foram encontradas em plantas de tratamento de efluentes. São descritas somente algumas culturas puras de bactérias aeróbias (TANGHE *et al.*, 1999; FUJII *et al.*, 2001; SOARES *et al.*, 2003; USHIDA *et al.*, 2003; GABRIEL *et al.*, 2005a), uma espécie de levedura (CORTI *et al.*, 1995), um consórcio anaeróbio (CHANG *et al.*, 2004) e duas espécies de fungos aquáticos (JUNGHANNS *et al.*, 2005) capazes de utilizar NP como única fonte de carbono.

Devido a sua elevada hidrofobicidade, este composto tende a ser adsorvido no lodo de estações de tratamento de efluentes levando, conseqüentemente, a uma redução de sua concentração no efluente. Porém, o composto está somente sendo transferido para outra matriz, e não decomposto, gerando outro problema ambiental (AHAEL *et al.*, 1994; CABANA *et al.*, 2007). Em corpos hídricos, conseqüentemente, se acumula nos sedimentos e tecidos de animais (UGUZ *et al.*, 2003).

Peixes em contato com águas contaminadas com NPEOs têm apresentado modificações do sistema reprodutivo, como o estímulo da produção de algumas proteínas e inibição de outras, mas não se conhece ainda exatamente quais são as conseqüências destas alterações (SCHWAIGER *et al.*, 2002).

A literatura relata alguns experimentos que têm sido conduzidos para degradação dos NPEOs. Tanaka *et al.* (2001) utilizaram lacase do basideomiceto *Trametes versicolor* e obtiveram mais de 90 % de remoção de nonilfenol após 8 horas de tratamento do EDC em um reator rotativo.

Saito *et al.* (2004) realizaram experimentos de degradação de NP com lacase purificada proveniente de uma linhagem de fungo da família *Chaetomiaceae*. Os autores conseguiram 70,2 % de degradação de NP após 1 hora de tratamento, 90,2 % após 3 horas e após 1 dia de tratamento já não havia mais NP em níveis detectáveis.

Junghanns *et al.* (2005) isolaram de um rio localizado na Alemanha central, contaminado com t-NP, um fungo aquático denominado *Mirioconium* sp. UHH 1-6-18-4. O caldo concentrado proveniente do cultivo deste fungo foi utilizado em ensaios de degradação de t-NP. Foi possível degradar 63,5 % da concentração inicial de 250 μ M de t-NP presente no sistema, num período de 24 horas. Sendo o ABTS acrescentado (mediador para reações de lacase), a porcentagem de degradação aumentou para 97,2 % no mesmo período. Os produtos provenientes da degradação de t-NP pelos fungos foram detectados por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa e por cromatografia por permeação em gel, sendo observada a formação de dímeros, trímeros, tetrâmeros e pentâmeros.

A degradação de 1-Naftol pelo fungo aquático *Heliscus lugdunensis* também foi acompanhada por cromatografia gasosa, sendo possível detectar a presença de 1-naftilsulfato, 1 metoxinaftaleno, 1,4-naftoquinona, além de outros, como produtos da degradação enzimática (AUGUSTIN *et al.*, 2006).

Cabana *et al.* (2007) testaram o extrato bruto do cultivo do fungo da “podridão branca” *Coriolopsis polyzona* para a degradação de t-NP (22 μ M). Após 4 horas de tratamento, mais de 95 % do t-NP presente no sistema tinha sido eliminado e 80 % após 1 hora, utilizando lacase numa concentração de 1 U L⁻¹.

Catjhaml *et al.* (2009a), em seus ensaios de degradação de compostos estrogênicos adicionados durante o cultivo dos fungos, constataram que *Pleurotus ostreatus*, no terceiro dia de ensaio, foi capaz de reduzir a concentração de t-NP a níveis inferiores ao limite de detecção. Entretanto, houve a formação de intermediários estrogênicos durante o experimento. Cabana *et al.* (2007) já tinha relatado a formação de intermediários de massa molar maior do que a do t-NP, sem a decomposição do anel fenólico.

Os autores supracitados (CABANA *et al.*, 2007; CATJHAML *et al.*, 2009a), além dos testes de degradação enzimática, também realizaram ensaios de atividade estrogênica nas amostras submetidas ao tratamento enzimático. Neste ensaio, os autores utilizaram *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada para expressar o receptor de estrogênios humano (hER). Quando hER se liga a um composto estrogênico, o receptor é co-expressado com o gene lacZ, o qual se liga a enzima b-galactosidase. Esta enzima é secretada no meio de cultivo e catalisa a transformação da substância cromogênica clorofenol vermelho-b-D-galactopiranosídeo, a qual é subsequentemente medida colorimetricamente no meio. Cabana *et al.* (2007) verificaram uma remoção da atividade estrogênica do NP de 95% após as 4 horas de tratamento enzimático. Catjhaml *et al.* (2009a) observaram uma redução de 98,8 % na atividade estrogênica de NP após 3 dias de tratamento.

b) Bisfenol-A

Bisfenol-A (2,2-bis(4-hidroxifenil)propano), da língua inglesa *bisphenol-A* (BPA) é um intermediário na produção de policarbonatos e resinas epóxicas, resinas de poliéster-estireno e retardador de chama. É utilizado também em embalagens de alimentos e bebidas, tintas em pó e produtos odontológicos. Por ser bastante empregado em processos industriais e também por participar na formulação de

produtos domésticos, suas maiores fontes no meio ambiente são os efluentes industriais e domésticos e, conseqüentemente, o lodo de estações de tratamento (CABANA *et al.*, 2007; BARNABÉ *et al.*, 2009). Sua estrutura molecular é mostrada na Figura 6.

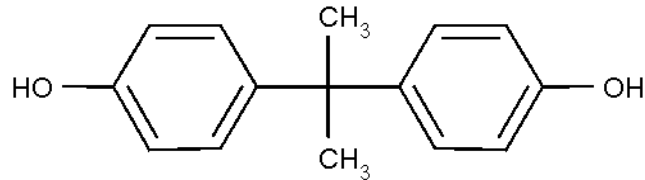


Figura 6 - Estrutura molecular do Bisfenol-A.
Fonte: CHEMIDPLUS, 2010.

As permissões para a descarga de BPA no ambiente estão se tornando cada vez mais restritivas, fazendo com que se busque alternativas para um tratamento eficiente de efluentes, com maior grau de eliminação destes compostos (MODARESSI *et al.*, 2005), entretanto, já existe disponível na rede mundial de computadores, uma página dedicada exclusivamente a informações sobre o BPA (www.bisphenol-a.org), tornando disponível muitas informações sobre a segurança à saúde e ao ambiente, apoiando a continuidade de seu uso industrial.

Entre os artigos mais citados em relação ao BPA está Staples *et al.* (1998). Os autores tornam disponível muitas informações sobre o composto, suas características, usos e segurança. Há a necessidade de se relatar que os autores referidos pertencem a companhias químicas americanas como: The Dow Chemical Company, Shell Development Company, Aristech Chemical Corporation, GE Plastics Inc., The Society of the Plastics Industry and Assesment Technologies Inc.

A utilização da enzima lacase na oxidação de BPA tem sido aceita como uma alternativa nos processos de degradação deste poluente em face da sua capacidade de oxidação de compostos fenólicos, além de que as novas tecnologias para produção, isolamento e purificação de enzimas têm tornado seu uso mais competitivo (MODARESSI *et al.*, 2005).

Tanaka *et al.* (2001) utilizaram lacases provenientes dos fungos *Trametes versicolor* e *Pycnoporus coccineus* visando a degradação de BPA entre outros EDCs em solos contaminados. A lacase de *P. coccineus* não foi capaz de oxidar o BPA, entretanto, a lacase proveniente de *T. versicolor* degradou cerca de 75 % do BPA

após cerca de 5 horas de reação. Kim e Nicell (2006b) também realizaram experimentos de degradação de BPA por lacase de *Trametes versicolor*, relacionando a oxidação de BPA com o pH e a temperatura do sistema. O pH ótimo para a degradação de BPA foi 5,0, em temperatura ambiente, na presença de 120 μM de BPA e 0,15 U mL^{-1} de lacase, 60 % de degradação de BPA. Este valor de pH é próximo dos pontos isoelétricos encontrados para lacases. A temperatura ótima para a conversão foi de 45 $^{\circ}\text{C}$.

Modaressi *et al.* (2005) realizaram experimentos utilizando lacase comercial numa concentração de 0,001 U mL^{-1} na degradação de BPA. Após 3 horas de tratamento, a concentração de BPA foi reduzida de 0,5 mM para 0,0332 mM , redução de cerca de 93 %. Os autores também mostraram que o uso de polietilenoglicol no sistema pode proporcionar um efeito protetor à lacase, aumentando seu poder de oxidação.

Cabana *et al.* (2007) conseguiram eliminar 100 % dos 22 μM de BPA inicial, utilizando lacase de *Coriolopsis polyzona* na concentração de 10 U L^{-1} após 4 horas de reação. Os autores também testaram a atividade estrogênica remanescente após o tratamento enzimático, e constataram uma redução de 90 % na atividade estrogênica em 4 horas de reação.

Nos experimentos de Cajthaml *et al.* (2009a), *Pleurotus ostreatus* foi, dentre todas as espécies testadas, a mais eficiente na degradação de BPA, sendo que após 3 dias, a concentração do composto estrogênico, inicialmente de 10 mg L^{-1} , encontrava-se abaixo dos limites de detecção. Além disso, a atividade estrogênica do BPA sofreu uma redução de 72,8 % após 3 dias de tratamento

c) 17 α -etinilestradiol

Estrogênios sintéticos como o 17 α -etinilestradiol (EE) são utilizados como contraceptivos sintéticos e em terapias de reposição hormonal. Quando não são completamente metabolizados pelo organismo, são excretados nas águas residuárias, chegando às plantas de tratamento. Quando não degradados nas

plantas de tratamento, são liberados no ambiente (FERREIRA, 2008; CAJTHAML *et al.*, 2009b).

Segundo Auriol *et al.* (2008), águas residuárias municipais apresentam elevada quantidade de compostos interferentes endócrinos naturais e sintéticos, como estrona, 17β -estradiol, estriol e 17α -etinilestradiol. Na Figura 7 é apresentada a estrutura do estrogênio 17α -etinilestradiol.

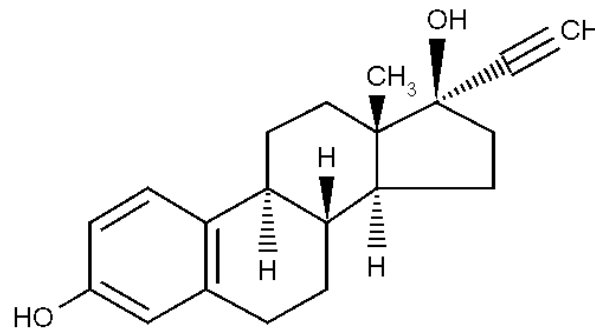


Figura 7 - Estrutura molecular do 17α -etinilestradiol.
Fonte: CHEMIDPLUS, 2010.

Estrogênios são considerados os maiores contribuintes para a atividade estrogênica presente nas plantas de tratamento de efluentes, devido ao elevado uso e, conseqüentemente, descarga quando não metabolizados integralmente. Além disso, cabe ressaltar a ineficiência que os processos de tratamento apresentam diante destes compostos (CAJTHAML *et al.*, 2009b). Na Tabela 3 são apresentados algumas fontes e locais onde há a presença de hormônios.

Tabela 3 – Fontes e locais onde há a presença de hormônios.

Local	Hormônios
Alimentos – carne, peixes, ovos, carne de porco e derivados do leite	17 β -estradiol, estrona, progesterona, testosterona
Efluentes de plantas de tratamento de efluentes	17 β -estradiol, estrona, estriol, 17 α -etinilestradiol
Lodo de estação de tratamento de esgoto	17 β -estradiol, estrona, estriol, 17 α -etinilestradiol
Pílulas anticoncepcionais	17 α -etinilestradiol, mestranol
Resíduos agrícolas	17 β -estradiol, estrona

Fonte: Adaptado de FERREIRA, 2008.

Auriol *et al.* (2008) testaram a lacase proveniente de *Trametes versicolor* em experimentos de degradação de diversos hormônios sintéticos, entre eles o 17 α -etinilestradiol, presentes em um efluente de estação de tratamento de água e em um efluente preparado em laboratório. Utilizando-se lacase na concentração de 20 U L⁻¹ foi possível eliminar todos os estrogênios sintéticos, tanto do efluente real como do preparado, em 1 hora de tratamento. Também foram testadas concentrações inferiores de lacase que, entretanto, não levaram à remoção total dos estrogênios. O uso de 2 U mL⁻¹ de lacase levou à redução de cerca de 80 % de EE do efluente real e cerca de 72 % de EE do efluente sintético, no mesmo período de reação.

Assim como para BPA, EE, preparado na concentração inicial de 10 mg L⁻¹ não foi mais detectado após tratamento com lacase de *Pleurotus ostreatus* durante três dias de incubação, mostrando a alta capacidade de degradação deste composto pela lacase deste fungo (CAJTHAML *et al.*, 2009a).

2.3 Mercado

Conforme a empresa finlandesa produtora de enzimas MetGen, o mercado atual de enzimas está validado em 2 bilhões de dólares com um potencial de

crescimento anual de 3 a 5 %. As lacases compõem cerca de 40 % deste mercado, correspondendo a 800 milhões de dólares (METGEN, 2010).

No Brasil, em 2005, as importações de enzimas chegaram a 31 milhões de dólares e as exportações a 3 milhões de dólares. As enzimas mais importadas foram as amilases (4 milhões de dólares), seguidas de proteases (2,5 milhões de dólares). O mercado brasileiro de enzimas, embora ainda pouco representativo (cerca de 2% do total mundial), revela grande potencial devido à enorme geração de resíduos agroindustriais e ao dinamismo das indústrias de alimentos, medicamentos, tecidos e papel/celulose. A redução do custo de produção de enzimas é favorecida no Brasil pela possibilidade de bioconversão de resíduos agroindustriais como farelo de trigo, farelo de algodão, casca de soja, bagaço de cana-de-açúcar e outros (MUSSATTO *et al.*, 2007).

A empresa dinamarquesa Novozymes lançou em 1996 no mercado uma enzima lacase chamada “DeniLite” para ser utilizada no processo de acabamento do tecido denim (www.novozymes.com; 2010). Em 2001 a companhia indiana Zytex desenvolveu a lacase “Zylite”, que utiliza o sistema mediador de lacase na degradação do corante índigo (ZYTEX, 2010).

2.4 Produção de lacase

Para o desenvolvimento de tecnologias de baixo custo e comercialmente interessantes de produção de enzimas lignocelulolíticas, alguns pontos devem ser explorados. Um deles é a busca de bons microrganismos produtores de enzimas, além da utilização de resíduos lignocelulósicos, alguns dos quais contém concentrações significativas de indutores, levando a uma produção eficiente de enzimas lignocelulolíticas (ELISASHVILLI *et al.*, 2006).

A otimização de processos para a produção de lacase em termos de aumento da produtividade e diminuição dos custos do processo tornou-se alvo de estudos tanto em cultivo sólido como em cultivo submerso, devido ao grande número de aplicações atribuídas a estas enzimas. A falta de enzimas e o custo de produção são obstáculos à aplicação comercial de lacase. As duas principais vertentes nos

estudos da otimização da produção de lacase são a busca por meios de cultivo de baixo custo e a sua expressão heteróloga (COUTO e HERRERA, 2006).

Apesar da produção de lacases poder ser realizada tanto em cultivo sólido como submerso, a maior parte da produção industrial de enzimas ainda é realizada em cultivo submerso (COUTO e HERRERA, 2007). De acordo com Rosado *et al.* (2002), o cultivo submerso de fungos tem a vantagem de produzir grandes quantidades de micélio e, conseqüentemente, de enzimas, num curto período de tempo e em qualquer época do ano, obtendo-se produtos de qualidade uniforme, uma vez que as condições de cultivo (pH, concentração de nutrientes, aeração etc.) podem ser controladas.

Conforme Tavares (2006), diversos fatores afetam a produção destas enzimas: espécie do microrganismo, concentração de inóculo, composição do meio de cultura, concentração e proporções relativas de carbono e nitrogênio, pH, temperatura, agitação e transferência de oxigênio, estratégia de produção (processo em batelada; batelada alimentada; semicontínuo ou contínuo), tipo de biorreator, presença de indutores e ausência de inibidores.

2.4.1 Meios e condições de cultivo

Em aplicações industriais e ambientais normalmente é requerida elevada quantidade de lacases, entretanto a baixo custo. Então torna-se necessário a pesquisa por novos microrganismos produtores destas enzimas e paralelamente o desenvolvimento de estratégias que levem à elevada produtividade (SONGULASHVILI *et al.*, 2006; ELISASHVILI *et al.*, 2008 a, b). Uma estratégia é diminuir o custo de produção utilizando substratos lignocelulósicos como resíduos agroindustriais, florestais, de alimentos e outros que possam induzir a expressão desta enzima (SONGULASHVILI *et al.*, 2006; ELISASHVILI *et al.*, 2008 a, b).

Segundo Elisashvili *et al.* (2006), o tipo e a composição do substrato lignocelulósico determina o tipo e a concentração de enzimas produzidas por fungos da podridão branca.

Para que a produção de lacase seja viável, é necessária a obtenção de elevada quantidade da enzima. Sendo assim, além do estudo dos fatores ambientais, é importante o estudo do efeito da adição de indutores no meio de cultivo (TAVARES, 2006).

Um indutor pode ser o próprio substrato da enzima ou um composto análogo, como 2,5-xilidina, álcool veratrílico, álcool felúrico, guaiacol, e outros compostos aromáticos. Compostos naturais complexos como lignina e compostos derivados de lignina também são usados como indutores (TAVARES, 2006).

Materiais lignocelulósicos são indutores naturais da produção de enzimas lignocelulolíticas, sendo que a escolha do substrato adequado para a expressão de determinada enzima é uma das estratégias para uma produção mais viável de enzimas. Ao mesmo tempo em que induzem a expressão de lacase, estes materiais já disponibilizam para o microrganismo os nutrientes necessários para seu crescimento, reduzindo os custos de produção (ELISASHVILLI *et al.*, 2008a).

Moldes *et al.* (2004) obtiveram aumento significativo na produção de lacases por *Trametes versicolor* utilizando diversos resíduos agroindustriais como indutores em cultivo submerso. Foram utilizadas sementes e talos de uvas, palha e farelo de cevada e sabugo de milho, obtendo-se aumentos de até 50 vezes na atividade enzimática com a utilização de farelo de cevada, quando comparada com o controle que não continha o resíduo.

Cruz (2007) utilizou cascas de banana como suporte e substrato para realizar o cultivo sólido de *Trametes pubescens*, objetivando a produção de lacase e a posterior utilização da enzima na descoloração de corantes antraquinônicos.

O sulfato de cobre é um dos indutores mais utilizados para o aumento da produção de lacase, conforme apontado por diversos autores. Um estudo realizado por Giardina *et al.* (1999) mostrou que a adição de sulfato de cobre no cultivo de *Pleurotus ostreatus* promoveu o aumento da atividade desta enzima, que foi proporcional à quantidade de sulfato de cobre adicionado, atingindo máxima atividade (30.000 U L⁻¹) quando 150 µM de CuSO₄ foi utilizado. Baldrian *et al.* (2002) também realizaram cultivos com *Pleurotus ostreatus* adicionando 1mM de CuSO₄ ao meio de cultivo, o que resultou num aumento de 8 vezes na atividade de lacase, que chegou a 400.000 U L⁻¹. Baldrian *et al.* (2005) analisaram a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus*, em meio de cultivo sólido em presença de

diferentes metais indutores, como o Cu, Mn, Pb e Zn. A utilização de Cu na forma de CuSO_4 resultou na máxima atividade para a enzima lacase, de $1,274 \text{ U g}^{-1}$. Junghanns *et al.* (2008b) utilizaram suco de tomate como meio de cultura e $50 \mu\text{M}$ de sulfato de cobre como indutor da produção de lacase por diversos fungos, entre eles *Phoma* sp. UHH 5-1-03, alcançando uma atividade enzimática de cerca de 1.200 U L^{-1} .

2.4.2 Fungos produtores

Entre os fungos produtores de lacase estão os das classes dos Basideomicetos, Ascomicetos e Deuteromicetos, sendo que até o momento, os Basideomicetos conhecidos por “fungos da podridão branca” são os mais eficientes na produção da enzima (ARORA e SHARMA, 2009). Entretanto, Ascomicetos aquáticos, como os do gênero *Phoma* ainda foram pouco explorados quanto à produção de lacases (JUNGHANNS *et al.*, 2009).

2.4.2.1 *Phoma*

O gênero *Phoma* pertence ao filo *Ascomicota*, ordem *Pleosporales* e família *Pleosporaceae* e é composto por fungos cosmopolitas, compreendendo cerca de 80 espécies. Massas de esporos muito pequenos encontrados dentro do micélio fúngico é frequentemente indicativo de *Phoma*. A coloração da colônia, morfologia do conídio, existência e estrutura do clamidiospóro são indicativos de diferenciação de uma espécie de *Phoma* para outra (EMLAB, 2010; DOCTORFUNGUS, 2010).

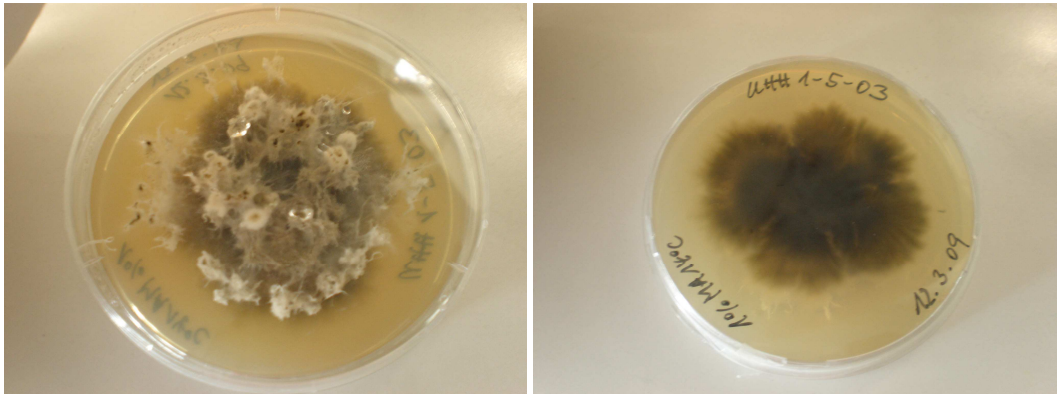


Figura 8 – Crescimento micelial de *Phoma* sp. UHH 5-1-03 em placa de Petri.
Fonte: Autor, 2009.

A classe dos Ascomicetos aquáticos representa a maior porção de fungos pertencentes a este ambiente, sendo que os ecossistemas aquáticos constituem uma fonte potencial de microrganismos de interesse biotecnológico. Cerca de 2900 espécies de fungos já foram isoladas de ambientes marítimos, águas salobras, águas doces, bem como de manguezais (SHEARER *et al.*, 2007).

Ascomicetos aquáticos atuam como saprófitas decompositores de material vegetal submerso, como parasitas em vegetais e algas, e servindo como alimento para invertebrados (SHEARER *et al.*, 2004). Basideomicetos são quase ausentes neste tipo de ambiente. Um exemplo disto é a ocorrência de apenas 21 basideomicetos aquáticos, contrastando com 1500 ascomicetos já descritos na literatura (SHEARER *et al.*, 2007).

Considerando-se a enorme diversidade de ambientes aquáticos e de suas propriedades físico-química, fungos aquáticos estão sujeitos à adaptações fisiológicas, o que os tornam uma vasta fonte de novas enzimas de interesse biotecnológico (JUNGHANNS *et al.*, 2009).

Junghanns *et al.* (2008a) realizaram o cultivo de *Phoma* sp. UHH 5-1-03 objetivando a produção de lacase utilizando extrato de malte a 2% e suco de tomate a 12,5 %, testando a influência de indução na produção de lacase pelo corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR) em comparação com ácido vanílico e sulfato de cobre. O cultivo utilizando ácido vanílico e sulfato de cobre como estimulantes da produção de lacase resultou numa atividade de $1219 \pm 475 \text{ U L}^{-1}$, sendo que a substituição por RBBR aumentou esta atividade em 4,1 vezes.

Em outro estudo com a espécie *Phoma* sp. UHH 5-1-03, foi realizado o cultivo em biorreator de 2 L, entretanto utilizando meio de cultivo composto somente por extrato de malte. Para estimular a produção de lacase foi adicionado ácido vanílico e sulfato de cobre, resultando na atividade máxima de 540 U L^{-1} no 7º dia de cultivo (JUNGHANNS *et al.*, 2009).

2.4.2.2 *Pleurotus*

O gênero *Pleurotus*, pertencentes à classe dos basideomicetos, é composto por diversas espécies cosmopolitas, saprofíticos ou parasitas, decompositores de madeira e outros resíduos vegetais (ZADRAZIL, 1978).



Figura 9 – *Pleurotus ostreatus* em seu ambiente natural.
Fonte: VOLK, 2003.

Estes fungos têm a habilidade de secretar várias enzimas, como peroxidases, lacases, celulases, hemicelulases e xilanases, tornando possível o seu cultivo em substratos lignocelulósicos sem a necessidade de um pré-tratamento (COHEN *et al.*, 2002).

O gênero *Pleurotus* constitui um grupo de fungos com alto valor nutricional e propriedades terapêuticas, com várias aplicações ambientais e biotecnológicas (COHEN *et al.*, 2002).

Este gênero destaca-se pelo fato de ser de fácil cultivo e de baixo custo de produção comparado a todos os cogumelos cultivados industrialmente, apresentando grande adaptabilidade, agressividade e produtividade (GUNDE-CIMERMAN, 1999).

Partindo do princípio que são fungos que podem decompor a lignina e a celulose eficientemente, sem nenhum tratamento prévio como a compostagem, torna-se disponível uma grande variedade de materiais lignocelulósicos que podem ser utilizados como substrato (COHEN *et al.*, 2002). Assim, os resíduos de atividades agroindustriais como palha de arroz, serragem, bagaço de cana-de-açúcar e muitos outros podem ser, portanto, utilizados para a produção de cogumelos e seus metabólitos (QUIMIO, 2004; DAS e MUKHERJEE, 2007).

Morais *et al.* (2002) cultivaram *P. ostreatus* em diferentes substratos, como pimentas secas, batatas secas e palha. Bonatti *et al.* (2004) utilizaram cascas de arroz e palha de bananeira como substrato para a produção de corpos frutíferos de *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju*, para posterior avaliação nutricional dos mesmos. Extrato de trigo e milhocina foram utilizados por Gern *et al.* (2008) na produção de polissacarídeos e biomassa provenientes de *Pleurotus ostreatus* em cultivo submerso. Rani *et al.* (2008) utilizaram palha de arroz, caule de sorgo e pseudocaule de bananeira na produção de *Pleurotus eous* em cultivo sólido.

a) Produção de lacase por *Pleurotus* sp.

A produção de lacase pelo gênero *Pleurotus* pode ser realizada tanto em cultivo sólido quanto submerso. O tipo de substrato e o método de cultivo do fungo

são fatores determinantes para a expressão das enzimas lignocelulolíticas e para a proporção de enzimas produzidas (ELISASHVILLI *et al.*, 2008a).

Stagic *et al.* (2006) testaram a utilização de casca de tangerina na produção de lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* e *Pleurotus pulmonarius*, em cultivo sólido e submerso. O cultivo submerso foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de um meio de cultivo sintético composto por: glicose, 10,0 g L⁻¹; NH₄ NO₃, 2,0 g L⁻¹; KH₂PO₄, 0,8 g L⁻¹; Na₂HPO₄ · 7 H₂O, 0,75 g L⁻¹; MgSO₄ · 7 H₂O, 0,5 g L⁻¹ e extrato de levedura, 2,0 g L⁻¹. Ao meio de cultivo sintético foi adicionado 4 % de cascas secas de tangerina como fonte alternativa de carbono. A atividade máxima de lacase foi detectada no 7º dia de cultivo de *P. eryngii* (999,5 ± 20,7 U L⁻¹) e no 5º dia de cultivo de *P. ostreatus* (256 ± 19 U L⁻¹).

Flores *et al.* (2009) realizaram o cultivo submerso de *Pleurotus ostreatus* em meio constituído de 2% de extrato de malte, sendo possível observar uma atividade máxima de cerca de 200 U L⁻¹ no 2º dia de cultivo, decrescendo nos sucessivos dias.

Pleurotus ostreatus, *Trametes versicolor* e *Piptoporus betulinus* cultivados por Valášková e Baldrian (2006), em meio líquido contendo celulose e em meio sólido composto por palha de trigo, foram avaliados quanto à atividade de enzimas degradadoras de material lignocelulósico. No cultivo líquido de *Pleurotus ostreatus* foi avaliada a atividade de lacase tanto no caldo fermentado (17,30 ± 2,39 U L⁻¹) quanto nas frações sólidas remanescentes devido a degradação incompleta da celulose acrescida ao meio de cultivo (422,4 ± 32,4 mU g⁻¹). No cultivo sólido, em fração extraível da palha de trigo foi detectada uma atividade de 1360 ± 22,2 mU g⁻¹ e na fração associada aos sólidos 4,5 ± 0,6 mU g⁻¹.

Tlecuitl-Beristain *et al.* (2008) cultivaram *Pleurotus ostreatus* em frascos Erlenmeyer utilizando um meio de cultivo complexo composto por: glicose, 10,5 g L⁻¹; extrato de levedura, 5 g L⁻¹; (NH₄)₂SO₄, 2 g L⁻¹; K₂HPO₄, 0,5 g L⁻¹; MgSO₄·7H₂O, 0,5 g L⁻¹; FeSO₄, 0,02 g L⁻¹; CaHPO₄, 0,3 g L⁻¹; ZnSO₄, 0,2 g L⁻¹; MnSO₄, 0,2 g L⁻¹; CuSO₄, 0,25 g L⁻¹. Os autores constataram uma correlação positiva entre a atividade de lacase e a fase de crescimento do fungo, sendo que no início da fase logarítmica de crescimento a atividade foi de 1000 U L⁻¹, chegando a 12200 U L⁻¹ no início da fase estacionária.

Elisashvili *et al.* (2008a) comparam a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Lentinus edodes*, *Pleurotus dryinus* IBB 903, *P. ostreatus* IBB 8, *P. ostreatus* IBB 108, *P. ostreatus* 2175, *P. ostreatus* 2191 e *P. tuberregium* INN 624 em cultivos sólido e submerso, usando como substrato palha de trigo, folhas de árvores e casca de banana, maçã e tangerina. Os autores realizaram os cultivos submersos em frascos Erlenmeyer de 125 mL, a uma temperatura de 27 °C e agitação de 150 rpm, utilizando 40 g L⁻¹ de um dos substratos lignocelulósicos acima, combinado com um meio de cultivo constituído de : 1 g L⁻¹ de NH₄NO₃; 0,8 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 0,2 g L⁻¹ de Na₂HPO₄; 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄ · 7H₂O e 2 g L⁻¹ de extrato de levedura. Para as linhagens de *Pleurotus* estudadas, a atividade de lacase ficou na faixa de 80 a 220 U L⁻¹ utilizando folhas de árvore; 340 a 4100 U L⁻¹ utilizando cascas de tangerina; 500 a 1720 U L⁻¹ para cascas de maçã e 200 a 640 U L⁻¹ para cascas de banana. A maior atividade foi detectada no cultivo da linhagem *P. dryinus* IBB 903 (4100 U L⁻¹). Em outro trabalho, Elisashvili *et al.* (2008b) realizaram o cultivo sólido e submerso de *Pleurotus ostreatus* 2191 no mesmo meio de cultivo e suas combinações, anteriormente reportado por Elisashvili *et al.* (2008a), sendo que foram produzidas 73 ± 7 U L⁻¹ utilizando folhas de árvores, 340 ± 36 U L⁻¹ utilizando cascas de tangerina, 507 ± 37 U L⁻¹ utilizando cascas de maçã e 631 ± 78 U L⁻¹ utilizando cascas de banana. Os autores puderam concluir que o cultivo submerso favoreceu a produção de lacases em comparação com o cultivo sólido, para os cultivos em que foram utilizadas cascas de maçã (231 ± 19 U L⁻¹) e cascas de banana (183 ± 24 U L⁻¹). O tempo necessário para atingir a atividade máxima foi, em média, de 3 a 5 dias inferior ao tempo necessário em cultivos sólidos, e a relação entre a atividade enzimática e a massa de substrato foi muito maior, em cultivo submerso, levando em consideração que para este cultivo foi utilizada duas vezes menos substrato que nos cultivos sólidos.

2.4.3 Concentração do extrato enzimático bruto

No caso de enzimas extracelulares presentes em caldo de cultivo, a concentração é importante para facilitar as etapas seguintes do processo de

purificação, o que impacta profundamente o custo final de produção (ILLANES, 2008).

Existem vários métodos de concentração de enzimas, como por exemplo, a evaporação a vácuo, o congelamento, a liofilização, a concentração por formação de espuma e a ultrafiltração. Cada um destes métodos possui vantagens e desvantagens em aspectos técnicos e econômicos, entretanto, Illanes (2008) aponta que, diante destes aspectos, a melhor opção ainda é a ultrafiltração.

A ultrafiltração é um processo de separação por membrana no qual a diferença de pressão através da membrana é a força que separa moléculas pelo seu tamanho, numa faixa de 1 a 100 kDa. Como é uma separação de proteínas pelo tamanho, a ultrafiltração já tem um potencial de uso para purificação, fracionando as proteínas, entretanto seu uso é quase exclusivo para a remoção de água e pequenas partículas (ILLANES, 2008). De acordo com o autor, as membranas são compostas de materiais como poliacrilonitrila, polisulfonato, poliamida e polivinilideno e são classificadas de acordo com sua densidade. A pressão empregada pode variar de 100 a 500 kPa . Segundo o autor, a ultrafiltração trata-se de uma operação suave, que não causa perdas significativas e os avanços na ciência dos materiais e na engenharia de processos provém opções flexíveis para a seleção das membranas e do equipamento mais adequado para cada caso.

O método de ultrafiltração por fluxo tangencial utilizando uma membrana de polisulfonato com densidade de 10 kDa foi empregado por Martin *et al.* (2007), como parte do processo de purificação de lacase do ascomiceto aquático *Mirioconium* sp. Anteriormente à ultrafiltração, o caldo foi submetido a uma filtração simples para remoção de biomassa, resultando num fator de concentração de 13 vezes, apresentando um rendimento de 47 %.

Junghanns *et al.* (2009) utilizaram a mesma técnica para a concentração de um caldo fermentado por *Phoma* sp. UHH 5-1-03 para posterior caracterização da lacase excretada. Foi alcançado um rendimento na ultrafiltração de 11 %.

Liers *et al.* (2007) realizaram o cultivo do ascomiceto *Xylaria Polymorpha* para posterior concentração, purificação e caracterização das lacases excretadas no meio de cultivo. Na etapa de concentração foi utilizada a técnica de ultrafiltração, com um rendimento de 75 %.

Munoz *et al.* (1997) purificaram o extrato bruto proveniente do cultivo de *Pleurotus eryngii*, sendo que previamente foi realizada uma ultrafiltração, alcançando-se um rendimento de 95%.

Mansur *et al.* (2003) purificaram e caracterizaram 4 isoformas de lacase provenientes de *Pleurotus ostreatus*, sendo realizada concentração por ultrafiltração como uma das etapas iniciais do processo de purificação. Foi alcançado nesta etapa um rendimento de 125 %.

2.5 Caracterização de lacases

2.5.1 Influência do pH e da temperatura na atividade de lacases de *Phoma* e *Pleurotus*.

Segundo Baldrian (2006) as lacases são mais estáveis, em geral, em pH ácido. Frequentemente o pH ótimo para a oxidação do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotriazolina-6-sulfônico) (ABTS) é inferior a 4,0 e para a oxidação de outros compostos como o dimetoxifenol (DMP), guaiacol (GUA) e a siringaldazina (SGZ) apresenta-se na faixa de 4,0 a 7,0. O perfil de pH na forma de sino é comum para a oxidação de compostos fenólicos.

Junghanns *et al.* (2009) determinaram o pH ótimo da lacase purificada, produzida por *Phoma* sp. UHH 5-1-03 em 2,5 para a oxidação de ABTS, 4,5 para DMP e 5,5 para SGZ. Os mesmos autores também avaliaram a estabilidade desta enzima. Para tanto, a lacase foi incubada por 355 h em valores de pH iguais a 4,0, 7,0 e 8,0, mantendo 57, 62 e 65 % da atividade inicial, respectivamente. Os autores consideram que a existência da forma monomérica da lacase permitiu a estabilidade em pH 4,0 e a forma dimérica permitiu a estabilidade em pH 7,0 e 8,0. As duas formas foram identificadas através de cromatografia de exclusão por tamanho, onde foram observados dois picos. Conforme os autores, este comportamento pode estar associado à adaptação do fungo ao ambiente aquático.

A lacase de *Pleurotus ostreatus* também apresenta baixos valores de pH ótimo. As isoformas POXA3a e POXA3b, identificadas por Palmieri *et al.* (2003), apresentaram pH ótimo de 3,0 utilizando ABTS como substrato, e faixa ótima de pH entre 5,5 e 6,5 na oxidação de DMP e GUA. Para o substrato SGZ, ambas as enzimas mostraram ausência de atividade. Ambas as isoenzimas apresentaram um tempo de meia vida de 168 h quando incubadas em pH 7,0, sendo que em pH 5,0 o tempo de meia vida de POXA3b foi aumentado para 240 h.

Os valores de pH ótimo das isoenzimas POXA1w, POXA2 e POXC de *P. ostreatus* também foram determinados (PALMIERI *et al.*,1997) utilizando-se diversos substratos, sendo que foi encontrado o pH ótimo igual a 3,0 para todas as isoenzimas quando utilizado ABTS como substrato. As isoenzimas POXA1w e POXC apresentaram pH ótimo entre 3,0 e 5,0 com o DMP, sendo que POXA2 apresentou pH ótimo igual a 6,5. Para o substrato GUA, apenas POXA1w não apresentou atividade, sendo que as outras isoformas tiveram um pH ótimo igual a 6,0. As isoformas apresentaram um tempo de meia vida de 24, 2 e 0,5 h para POXA1w, POXA2 e POXC, respectivamente.

A isoforma POXA1b de *P. ostreatus* (GIARDINA *et al.*,1999) apresentou pH ótimo de 3,0 para ABTS, 4,5 para DMP e 6,0 para SGZ, não tendo sido detectada atividade com o GUA. A isoforma manteve estabilidade com um tempo de meia vida de 20 h em pH 3,0, sendo que com o aumento do pH para o valor 9,0, sua estabilidade aumentou para 720 h.

Liu *et al.* (2009), caracterizaram bioquimicamente a lacase purificada de *Pleurotus ostreatus* e encontraram o pH ótimo igual a 4,0 para a oxidação de ABTS. Neste mesmo valor de pH foi testada a estabilidade da lacase durante 1 h, sendo que a enzima manteve mais de 80 % da atividade inicial.

Tlecuitl-Beristain *et al.* (2008) reportaram o pH ótimo de 4,5 para uma isoforma de lacase (L₁) excretada por *Pleurotus ostreatus*. Hublik e Shinner (2000) encontraram o valor de pH ótimo de 5,8 para a lacase de *Pleurotus ostreatus* utilizando SYR como substrato.

Em relação à temperatura, as lacases não diferem muito de outras enzimas extracelulares lignocelulolíticas, com valor ótimo variando entre 50 e 70 °C. Algumas lacases possuem temperaturas ótimas incomuns, como 35°C, entretanto, não existe relação entre a temperatura ótima da enzima e a temperatura de crescimento do

microrganismo produtor (BALDRIAN, 2006). A estabilidade destas enzimas com a temperatura pode variar muito. A lacase de *Ganoderma lucidum* (LALITHA KUMARI e SIRSI, 1972), por exemplo, foi totalmente inativada em 60 °C enquanto que a lacase de *Melanocarpus albomyces* (KIISKINEN, 2004) conservou pelo menos 50 % da atividade por mais de 5 h nesta mesma temperatura, mostrando alto potencial para aplicações biotecnológicas que exijam estabilidade enzimática em alta temperatura.

Para *Phoma* sp. UHH 5-1-03 Junghanns *et al.* (2009) observaram uma temperatura ótima de 65 °C. Entretanto, a enzima manteve-se mais estável a 15 °C, onde 57% da atividade inicial foi mantida por 288 h. No mesmo período, a lacase manteve 51 % da atividade inicial a 4 °C e 49% em temperatura ambiente. A 35 °C a enzima foi completamente inativada em 288 h, e a 45 °C em 24h já foi completamente inativada.

As diferentes isoformas de *Pleurotus ostreatus* apresentadas por Palmieri *et al.* (1997), Giardina *et al.*, (1999) e Palmieri *et al.* (2003) possuem temperatura ótima de 45 a 65 °C para POXA1w, 25 a 35 °C para POXA2, 35 °C para POXA3a e POXA3b, e 50 a 60 °C para POXC. A estabilidade térmica destas isoformas também foi investigada, sendo que, incubadas à 60 °C e em pH 7,0, POXA1w apresentou um tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de 200 minutos, POXC de 30 minutos e POXA2 de 10 minutos. As isoformas POXA3a e POXA3b, mantidas a 40 °C, apresentaram $t_{1/2}$ de 6 h e 14 h, respectivamente. A isoforma POXA1b apresentou um $t_{1/2}$ de 3 h quando submetida à temperatura de 60 °C.

2.5.2 Determinação da massa molar da lacase

Liu *et al.* (2009) utilizaram a técnica de cromatografia de exclusão por tamanho como etapa final do processo de purificação da lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus*. Os autores utilizaram uma coluna Sephadex G 100 (2,5 x 100 cm), equilibrada com tampão acetato de sódio em pH 4,5. Ao final do processo foi alcançado um rendimento de 34 %. O pico de lacase eluído apresentou atividade total de 2402,33 U, com uma massa molar de 40 kDa.

No processo de purificação e determinação da massa molar da lacase produzida por *Phoma* sp. UHH 5-1-03, Junghanns *et al.* (2009) utilizaram a cromatografia de exclusão por tamanho com uma coluna Hi Load 16/60 Superdex 200, com tampão acetado 10 mM em pH 6,0, com fluxo de eluição de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Além de predizer a massa molar da lacase, foi possível obter um rendimento no processo de purificação de 0,95 %. A lacase foi eluída como um único pico distinto, num volume de eluição de 77,1 mL, correspondendo a uma massa molar de aproximadamente 74 kDa. Esta etapa final de purificação foi precedida por uma cromatografia de interação hidrofóbica e uma ultrafiltração.

Já foram isoladas e caracterizadas 6 isoformas de lacase provenientes de *Pleurotus ostreatus*. Palmieri *et al.* (1997) purificaram e caracterizaram as isoformas POXA1w e POXA2, sendo heterodímeros com ponto isoelétrico de 6,7 e 4,0, respectivamente. As massas molares obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foram de 61 e 67 kDa, respectivamente, por cromatografia de exclusão por tamanho foram de 54 e 59 kDa, respectivamente, e por espectrometria de massa, foram de 61 kDa para POXA1w. As letra w no nome POXA1w indica que esta isoforma é uma lacase branca “white”, possuindo absorvância em torno de 400 nm. No mesmo estudo Palmieri *et al.* (1997) identificaram mais duas isoformas de lacase, POXB1 e POXB2, entretanto não foram purificadas e caracterizadas. Conforme estes autores, a designação POX significa *Phenol Oxidase*.

A isoforma POXA1b foi identificada por Giardina *et al.* (1999), apresentando massa molar de 62 kDa em SDS-PAGE e 57 kDa por cromatografia de exclusão por tamanho. O ponto isoelétrico foi de 6,9, similar ao de POXA1w.

POXC é a isoforma mais abundante, possuindo massa molar de 58 kDa, identificada por SDS-PAGE. Possui um ponto isoelétrico de 2,1 (PALMIERI *et al.*, 1997).

Palmieri *et al.* (2003) purificaram e caracterizaram duas outras isoformas de lacase provenientes de *Pleurotus ostreatus*. Por SDS-PAGE foram identificadas as isoformas POXA3a e POXA3b, que possuem duas subunidades, ambas com uma maior, de 67 kDa, e duas outras menores de 16 kDa para POXA3a e 18 kDa para POXA3b. Em eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes

(Native-Page) foi identificada apenas uma banda. Em cromatografia de exclusão por tamanho foi identificada somente uma subunidade de 56 kDa.

Existem diversas isoformas de lacase de *P. ostreatus*, sendo que 6 delas já foram purificadas e caracterizadas. A Tabela 4 apresenta um apanhado geral das lacases de *Pleurotus ostreatus*.

Tabela 4 – Isoformas de lacases provenientes da espécie *Pleurotus ostreatus*.

Lacase	Massa molar (kDa) (SDS-PAGE)	Massa molar (kDa) (Gel-filtração)	Ponto isoelétrico	Referência
POXA1w	61	54	6,7	
POXA2	67	59	4,0	Palmieri <i>et al.</i> , (1997)
POXB1	-----	-----	-----	
POXB2	-----	-----	-----	
POXA1b	62	57	6,9	Giardina <i>et al.</i> , (1999)
POXC	58		3,3	Palmieri <i>et al.</i> , (1997)
POXA3a	67; 16; 18	56	4,1	Palmieri <i>et al.</i> , (2003)
POXA3b	67; 16; 18	56	4,3	

As peculiaridades de cada isoenzima são interessantes para diversificadas aplicações biotecnológicas, que exijam características especiais da enzima (PEZZELA *et al.*, 2009).

Outros autores também identificaram lacases de *Pleurotus ostreatus* com outras massas molares, como no caso de Liu *et al.* (2009) que identificaram uma lacase com 40 kDa e Tlecuitl-Beristan *et al.* (2008), que obtiveram a enzima com 43,7 kDa, ambas identificadas por SDS-PAGE. Hublik e Schiner (2000) identificaram outra com 66 kDa e ponto isoelétrico de 3,6, valores próximos da isoforma POXA2 encontrada por Palmieri *et al.* (1997).

Outras lacases provenientes de outras espécies de *Pleurotus* também já foram identificadas, como a lacase de *Pleurotus sajor-caju*, apresentando 90 kDa (SAHAY *et al.*, 2008) e 61 kDa (KUMARASAMY *et al.*, 2006). Souza e Peralta (2003) identificaram a isoforma LCC2 que possui 46 kDa, proveniente da espécie *Pleurotus*

pulmonarius. Munoz *et al.* (1997) purificaram e caracterizaram duas isoformas de lacase provenientes do fungo da espécie *Pleurotus eryngii*. As isoformas I e II apresentaram, através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), massas molares de 65 e 61 kDa e pontos isoelétricos de 4,1 e 4,2, respectivamente.

Em relação ao fungo da espécie *Phoma* UHH 5-1-03, Junghanns *et al.* (2009) obtiveram 3 bandas com 85, 81 e 78 kDa, através das análises por SDS-PAGE. Por cromatografia de exclusão por tamanho, os autores obtiveram apenas um pico de 74 kDa. Também foi detectado o ponto isoelétrico alcalino para esta enzima, num valor aproximado de 8,3.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Na Figura 10 é mostrado um fluxograma dos experimentos realizados neste trabalho.

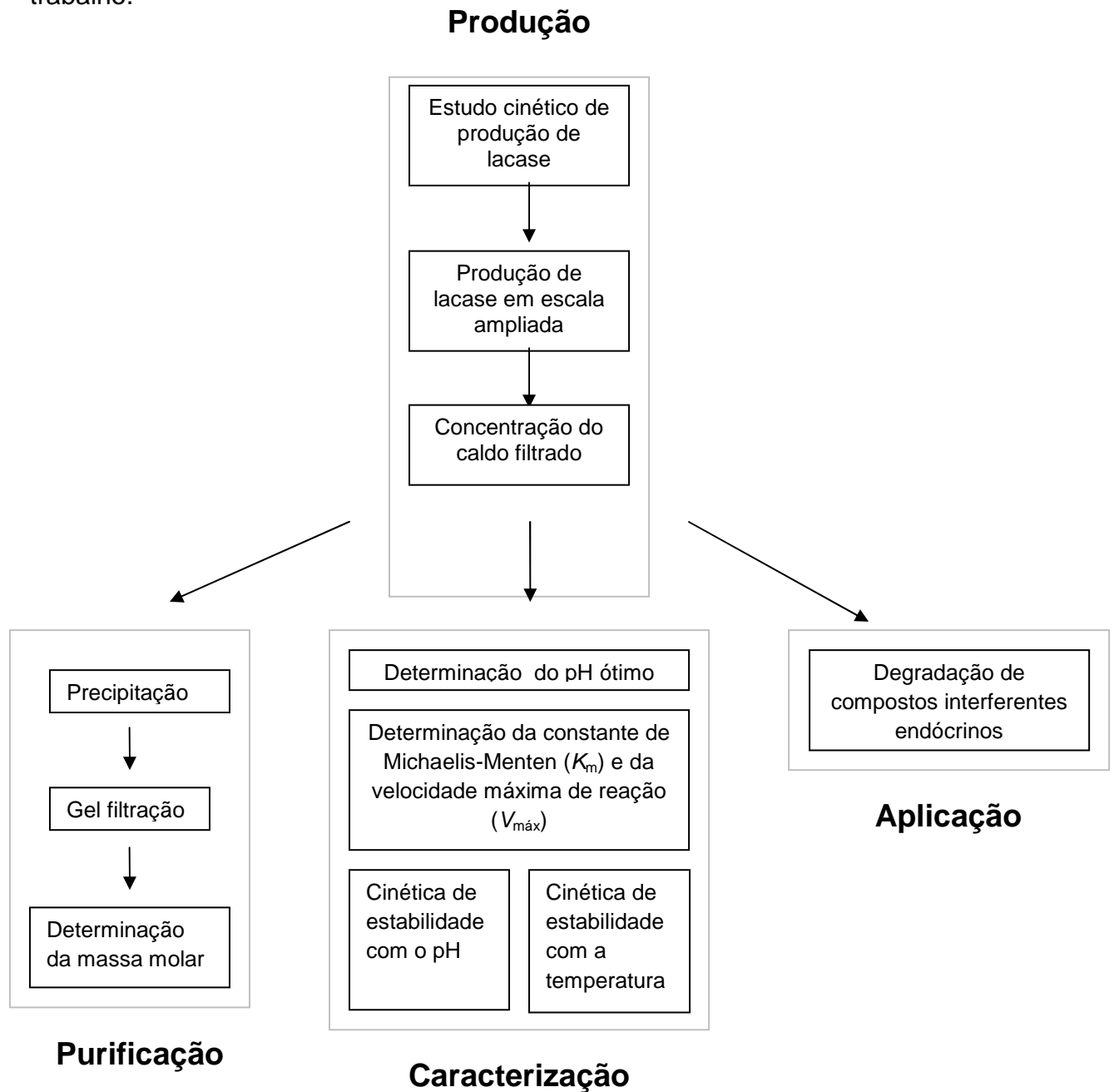


Figura 10 – Fluxograma geral de todos os experimentos.

3.1 Microrganismos e manutenção

3.1.1 *Phoma* sp.

A linhagem *Phoma* sp. UHH 5-1-03 isolada da água superficial do rio Saale, localizado a nordeste da cidade de Halle, na Alemanha central (JUNGHANNS *et al.*, 2008a), foi obtida da coleção de culturas “Helmholz Umwelt Forschung Zentrum” (UFZ, Leipzig, Alemanha). Esta linhagem também se encontra depositada na coleção de culturas da “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH” (DSMZ, Braunschweig, Alemanha) sob o código DSM 22425.

A cultura foi propagada em placas de Petri contendo meio Ágar-Extrato de Malte a 2 % (Merck), incubada por cerca de 10 dias, até que o micélio cobrisse toda a superfície do ágar, a 14 °C e, em seguida, armazenada à temperatura de 4° C (JUNGHANNS *et al.*, 2005).

3.1.2 *Pleurotus ostreatus*

A espécie *Pleurotus ostreatus* foi obtida da coleção de culturas “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH” (DSMZ, Braunschweig, Alemanha), sob o código DSM 1833.

A cepa foi propagada em placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA), tendo a seguinte composição: extrato de batata (2 g L⁻¹), dextrose (10 g L⁻¹), ágar (15 g L⁻¹). As placas foram incubadas por cerca de 7 dias, até que o micélio cobrisse toda a superfície do ágar, a 28 °C e, em seguida, armazenadas à temperatura de 4°C (MORAIS *et al.*, 2002).

3.2 Meios de cultivo

A tabela 5 apresenta a composição dos meios de cultivo Kirk e Czapek-Dox, utilizados nas formulações apresentadas nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 5 – Composição dos meios de cultivo Kirk e Czapek-Dox sem fonte de carbono.

Composição	Kirk (g L⁻¹)	Czapeck-Dox (g L⁻¹)
KH ₂ PO ₄	2	1
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,5	0,5
CaCl ₂	0,1	
Tartarato de amônio dibásico	0,5	
extrato de levedura	0,2	0,2
FeSO ₄ * 7 H ₂ O		0,01
NaNO ₃		3
KCl		0,1
pH	5,6-5,8	7,2

Na Tabela 6 são apresentados os meios de cultivo e as combinações com os substratos lignocelulósicos, objetivando a utilização de fontes alternativas de carbono para o estudo cinético da produção de lacase pelo fungo *Phoma* sp.

Tabela 6 – Meios de cultivo e substratos/materiais lignocelulósicos utilizados nos cultivos de *Phoma* sp. UHH 5-1-03.

<i>Phoma</i> sp. UHH 5-1-03		
formulação	meio	fonte de carbono
1	água	papel filtro (pedaços 1cm X 1cm; 10 g L ⁻¹)
2	água	papel filtro (pedaços 1cm X 1cm; 10 g L ⁻¹) + 50 µM CuSO ₄ **
3	água	papel filtro (pedaços 1cm X 1cm; 10 g L ⁻¹) + madeira (raspas 1cm x 1cm; 10 g L ⁻¹)
4	água	madeira (raspas 1cm x 1cm; 10 g L ⁻¹)
5	água	cascas de bananas (secas e em pó; 40 g L ⁻¹) + 50 µM CuSO ₄ ** ***
6	meio Czapeck-Dox *	papel filtro (pedaços 1cm X 1cm; 10 g L ⁻¹)
7	meio Czapeck-Dox *	papel filtro (pedaços 1cm X 1cm; 10 g L ⁻¹) + 50 µM CuSO ₄ **
8	meio Czapeck-Dox *	papel filtro (pedaços 1cm X 1cm; 10 g L ⁻¹) + madeira (raspas 1cm x 1cm; 10 g L ⁻¹)
9	meio Czapeck-Dox *	madeira (raspas 1cm x 1cm; 10 g L ⁻¹)
10	meio Czapeck-Dox *	cascas de bananas (secas e em pó; 40 g L ⁻¹) + 50 µM CuSO ₄ ** ***

*Meio de cultivo Czapeck-Dox: (NARANJO *et al.*, 2007)

**50 µM CuSO₄ : (JUNGHANNS *et al.*, 2008b)

***40 g/L de cascas de banana: (ELISASHVILI *et al.*, 2008a)

Na Tabela 7 são apresentados os meios de cultivo e as combinações com os substratos lignocelulósicos, para o estudo cinético da produção de lacase pelo fungo *Pleurotus ostreatus*.

Tabela 7 – Meios de cultivo e substratos/materiais lignocelulósicos utilizados nos cultivos de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833.

<i>Pleurotus ostreatus</i> DSM 1833		
formulação	meio	fonte de carbono
1	água	papel filtro (pedaços 1cm X 1cm; 10 g L ⁻¹)
2	água	papel filtro (pedaços 1cm X 1cm; 10 g L ⁻¹) + 150 µM CuSO ₄ **
3	água	papel filtro (pedaços 1cm X 1cm; 10 g L ⁻¹) + madeira (raspas 1cm x 1cm; 10 g L ⁻¹)
4	água	madeira (raspas 1cm x 1cm; 10 g L ⁻¹)
5	água	cascas de bananas (secas e em pó; 40 g L ⁻¹) + 150 µM CuSO ₄ ** ***
6	meio Kirk *	papel filtro (pedaços 1cm X 1cm; 10 g L ⁻¹)
7	meio Kirk *	papel filtro (pedaços 1cm X 1cm; 10 g L ⁻¹) + 150 µM CuSO ₄ **
8	meio Kirk *	papel filtro (pedaços 1cm X 1cm; 10 g L ⁻¹) + madeira (raspas 1cm x 1cm; 10 g L ⁻¹)
9	meio Kirk *	madeira (raspas 1cm x 1cm; 10 g L ⁻¹)
10	meio Kirk *	cascas de bananas (secas e em pó; 40 g L ⁻¹) + 150 µM CuSO ₄ ** ***

*Meio de cultivo Kirk : (EICHLEROVÁ *et al.*, 2003)

**150 µM CuSO₄: (GIARDINA *et al.*, 1999)

***40 g/L de cascas de banana: (ELISASHVILI *et al.*, 2008a)

O meio Czapek-Dox original possui glicose na sua composição, numa concentração de 30 g L⁻¹, enquanto que o meio Kirk original possui 10 g L⁻¹ de glicose. A modificação feita na composição desses meios foi a substituição da glicose por pedaços de papel filtro e/ou raspas de madeira na concentração de 10 g L⁻¹ ou por cascas de banana secas e em pó, na concentração de 40 g L⁻¹.

Os pedaços de papel filtro e as raspas de madeira foram cortados manualmente, com uma tesoura, enquanto que as cascas de banana foram previamente secas em estufa a 70° C por cerca de 48 h e em seguida maceradas manualmente com o auxílio de cadinho e almofariz.

3.3 Inóculo

3.3.1 Inóculo de *Phoma* sp.

Discos de ágar de aproximadamente 7 mm de diâmetro, contendo micélio fúngico, retirados de placas incubadas por cerca de 10 dias foram, em condições assépticas, homogeneizados em 20 mL de meio de extrato de malte, previamente esterilizado (2% m/v extrato de malte, pH 5,6-5,8), utilizando-se um homogeneizador Ultraturrax modelo T25 (Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen, Alemanha). A proporção utilizada foi de um disco de ágar por mL de meio (JUNGHANNS *et al.*, 2008b).

3.3.2 Inóculo de *Pleurotus ostreatus*

Condições idênticas às de preparação do inóculo de *Phoma* sp. (item 3.3.1) foram utilizadas para o preparo do inóculo de *Pleurotus ostreatus*, porém, o meio utilizado foi o BDA (batata-dextrose-ágar).

3.4 Estudo cinético de produção de lacase

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 100 mL, contendo 37 mL de meio de cultivo e 0,37 g dos resíduos lignocelulósicos, exceto para casca de banana, em que utilizou-se 1,48 g. Os frascos foram cobertos com papel alumínio e esterilizados a 121°C por 20 min. Em seguida, foram inoculados com 1mL do inóculo previamente preparado, correspondendo a 2,7 % do volume de trabalho. Foram incubados sem iluminação, em agitação orbital a 120 min⁻¹, em agitador HT (Infors,

Bottmingen, Suíça), com temperatura controlada em 14 °C para *Phoma* sp. (JUNGHANNS *et al.*, 2008b) e 28°C para *Pleurotus ostreatus* (LIU *et al.*, 2009).

Foram realizadas amostragem retirando-se alíquotas de 1mL do caldo utilizando-se uma pipeta automática, a cada 2 dias, para a quantificação da atividade da lacase. A extremidade das ponteiras utilizadas nas pipetas foram cortadas para aumentar o orifício e evitar o entupimento pela sucção das células. Os cultivos foram realizados em triplicata para cada formulação de meio, conforme descrito nas Tabelas 6 e 7 e as análises de atividade enzimática foram realizadas em triplicata para cada amostra. O tempo total de cultivo para *Phoma* sp. utilizando-se água e materiais lignocelulósicos, foi de 26 dias (com cascas de banana foi de 21 dias) e utilizando-se meio Czapeck-Dox e resíduos lignocelulósicos foi de 14 dias (com cascas de banana foi de 21 dias). Para *Pleurotus ostreatus* o tempo total de cultivo utilizando-se água e resíduos lignocelulósicos foi de 16 dias (com cascas de banana foi de 21 dias) e utilizando-se meio Kirk e materiais lignocelulósicos foi de 19 dias (com cascas de banana foi de 21 dias). Houve variação no tempo final de cada cultivo, dependendo da formulação de meio utilizada, devido ao esgotamento da atividade de lacase.

3.5 Produção de lacase em escala ampliada

A formulação de meio de cultivo e resíduos lignocelulósicos que proporcionou os melhores resultados no estudo cinético de produção de lacase, foi selecionada para a sua produção em escala ampliada.

Foram utilizados frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 185 mL do meio de cultivo selecionado no item 3.4

Os frascos foram inoculados conforme descrito no item 3.4, porém, utilizando-se 3 mL de inóculo, correspondendo a 1,62 % do volume de trabalho. Os frascos foram mantidos sem iluminação, em agitação orbital a 120 min⁻¹, em agitador HT (Infors, Bottmingen, Suíça), com temperatura controlada em 14 °C para *Phoma* sp. e 28°C para *Pleurotus ostreatus*.

A atividade enzimática foi acompanhada, sendo realizadas amostragens conforme apresentado no item 3.4, para a quantificação da atividade da lacase. Os experimentos foram realizados utilizando-se 5 frascos Erlenmeyer para cada fungo, sendo que as análises de atividade foram realizadas em triplicata para cada frasco.

No momento previsto para que a atividade enzimática de lacase atingisse seu valor máximo, conforme resultados do item 3.4, os cultivos foram interrompidos, os meios de cultivo foram filtrados a vácuo em papel Whatman nº 1, e o caldo filtrado estocado a -20°C para conservação da atividade de lacase e para sua utilização nos experimentos posteriores.

3.6 Determinação da atividade de lacase

A atividade de lacase foi determinada através da oxidação de 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) - ABTS (98 %, Sigma, Deisenhofen) em solução tampão McIlvaine (ácido cítrico 100 mM, K_2HPO_4 200 mM, pH 4.0).

Para as medições foram utilizadas placas de microtitulação de 96 orifícios com fundo chato (VWR, Darmstadt, Alemanha) e um fotômetro (GENios+, Tecan, Grailsheim).

Para a determinação da atividade de lacase foi utilizado um volume total de 200 µL, composto por:

- 160 µL de solução Tampão McIlvaine pH 4,0, em temperatura ambiente
- 20 µL de solução ABTS 20 mM
- 20 µL de amostra

Para o preparo do “branco”, a amostra foi substituída por 20 µL de solução tampão.

A oxidação do ABTS foi realizada em temperatura ambiente, durante 6 minutos, sendo que através da oxidação é formado um radical monocatiônico

(ABTS⁺) com coloração verde escura, o qual pode ser medido fotometricamente a 420 nm. Os teste foram realizados em temperatura ambiente.

Os valores lidos foram corrigidos com base nos valores obtidos para os “brancos” e os cálculos para determinação da atividade enzimática foram realizados conforme a Equação 1.

$$\text{Atividade enzimática (U L}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta E * V}{\varepsilon * d * v} \quad (1)$$

onde:

ΔE (min⁻¹): aumento da absorbância no comprimento de onda específico no intervalo de tempo de 1 minuto

V (μL): volume total de reação

v (μL): volume de amostra

\square ($\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$): coeficiente de extinção molar ($36 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

d (cm): comprimento do passo (diâmetro da fossa da placa = 0,6027 cm)

A atividade enzimática foi expressa em unidades internacionais (U), sendo considerado 1 U igual a 1 μmol de produto formado por minuto de reação. Entretanto, neste trabalho, convencionou-se expressar a oxidação de ABTS em μM de ABTS por minuto de reação por litro, ou seja, U L^{-1} . Para isso, foi feita anteriormente pelo grupo de pesquisa uma curva padrão (Anexo A) plotando-se os valores de atividade obtidos com a utilização de 20, 60 e 80 μL de amostra de caldo enzimático para o mesmo volume final de reação. Foi obtida uma reta com coeficiente de correlação no valor de 0,9991, comprovando que a oxidação de ABTS é linearmente proporcional ao volume de amostra utilizado no teste, permitindo sua expressão na unidade U L^{-1} .

Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo que cada amostra foi analisada em triplicata, utilizando-se a média dos valores das leituras para o cálculo da atividade.

3.7 Concentração do caldo filtrado

O caldo filtrado, previamente armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi descongelado, permitindo a precipitação de polissacarídeos. Aguardou-se até que os polissacarídeos sedimentassem e, em seguida, o caldo foi submetido a ultrafiltração.

No processo de ultrafiltração, utilizou-se uma célula de ultrafiltração de 150 mL com membrana de polisulfonato com densidade de membrana de 10 kD (Pall GmbH Life Sciences, Dreieich). O extrato enzimático foi concentrado 10 vezes, possuindo um volume inicial de 150 mL e volume final de 15 mL, utilizando-se nitrogênio comprimido a uma pressão de aproximadamente 3 bar como força motriz.

3.8 Precipitação do caldo concentrado

Considerando que o caldo proveniente dos cultivos possui coloração, sua aplicação em uma coluna de exclusão por tamanho exige um processo prévio de purificação para evitar a obstrução da coluna, sendo a precipitação utilizada como método para remoção da coloração dos caldos concentrados.

Foram adicionados 1600 μL de uma solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 400 μL de caldo concentrado (80 % de saturação) proveniente de *Phoma* sp. e de *Pleurotus ostreatus*. As misturas foram agitadas suavemente em Thermomixer (5436, Eppendorf) pelo período de uma hora, a temperatura ambiente.

Após a precipitação, amostras foram retiradas e centrifugadas a 3373 g por 20 minutos, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Microcentrifuga Eppendorf 5418). O sobrenadante foi coletado e a atividade de lacase medida. O precipitado resultante da centrifugação foi ressuspenso em 400 μL de solução tampão acetato (10 mM, pH 5), retornando ao volume inicial de reação, sendo medida a atividade de lacase.

3.9 Cromatografia de exclusão por tamanho

Para a determinação da massa molar das lacases provenientes de *Phoma* sp. e *Pleurotus ostreatus*, foi utilizada a técnica de cromatografia de exclusão por tamanho, utilizando-se uma coluna com uma matriz de agarose-dextrana (300 x 10 mm; Superdex 200 GL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Grã-bretanha), conectada a um sistema FPLC (Fast Liquid Protein Chromatography) BioLogic HR Workstation (Bio-Rad, München).

Como amostras, foram utilizados 1 mL do caldo precipitado de *Phoma* sp. e 1 mL do caldo precipitado de *Pleurotus ostreatus*.

O eluente utilizado foi a solução tampão acetato de sódio 10 mM (pH 6,0, com HCl adicionado) contendo 0,15 M NaCl.

O eluído foi submetido ao comprimento de onda de 280 nm de um detector UV para a detecção de proteínas. Em seguida, foi analisada a atividade de lacase com as frações coletadas pelo equipamento.

3.10 Eletroforese

O perfil da lacase presente nos caldos concentrados e precipitados de ambos os fungos foi avaliado através de gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme Laemmli (1970).

Foram preparados os géis de separação (12%) e de concentração (4%), com 0,75 mm de espessura, misturando-se acrilamida (30%), solução tampão tris(hidroximetil)-aminometano-HCl (Tris-HCl; pH 6,8; 0,5M; gel de concentração), solução tampão tris-HCl (pH 8,8; 1,5M; gel de separação), dodecilsulfato de sódio (SDS), persulfato de amônio (APS), n,n,n,n tetrametiletilenodiamino (TEMED) e água bidestilada, conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8 – Composição dos reagentes utilizados na preparação dos géis de eletroforese.

Gel de separação 8 %	Volumes	Gel de concentração 4 %	Volumes
acrilamida 30%	2,7 mL	acrilamida 30%	1,3 mL
solução tampão Tris-HCL (pH 8,8; 1,5M)	2,5mL	solução tampão Tris-HCL (pH 6,8; 0,5M)	2,5 mL
água bidestilada	4,8 mL	água bidestilada	6,1 mL
solução SDS 10 %	125 µL	solução SDS 10 %	100 µL
solução APS 10 %	100 µL	solução APS 10 %	50 µL
TEMED	10 µL	TEMED	10 µL

Os géis foram injetados entre as placas de vidro de eletroforese, com o auxílio de uma seringa. Foi utilizado o pente para a formação dos fossos onde as amostras foram injetadas. Todos os reagentes utilizados foram do fabricante BioRad (München, Alemanha).

As frações correspondentes aos picos de atividade na gel filtração foram ressuspensas em solução tampão de amostra desnaturante (tampão tris-HCl 1M pH 6,8, 1,2 % [v/v]; SDS 0,4 % [m/v]; glicerol 10 % [v/v]; azul de bromofenol 0,02 % [m/v]), aquecidas a 100 °C durante 5 minutos e apli cadas no gel.

Foi utilizada para a corrida a solução tampão tris-glicina-SDS (pH 8,3; BioRad, München, Alemanha), diluída 10 vezes, e utilizada uma cuba de eletroforese MiniPROTEAN[®] 3 (BioRad, München, Alemanha), sendo que a voltagem aplicada para a etapa de concentração foi de 120 V e para a etapa de separação 170 V. A corrida foi feita até que fosse possível visualizar as bandas no final do gel de separação.

Após o término da corrida eletroforética, o gel foi submetido à coloração com o corante “coomassie” coloidal (NEUHOFF *et al.*, 1988). Coomassie coloidal foi preparado a partir de 6 mL de uma solução aquosa a 4%, composta de 3 % (m/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250 e 1% (m/v) Coomassie R-250, juntamente com 4 g de ácido ortofosfórico 85%, 20 g de sulfato de amônio e água bidestilada, completando um volume final de 200 mL. A mistura foi deixada em repouso por 3

horas e no momento de sua utilização, a solução foi diluída em metanol na proporção 4:1 (solução : metanol) .

Os géis foram deixados em contato com a solução Coomassie durante cerca de 30 minutos. Em seguida, foram colocados em solução descolorante, preparada a partir de 50 % de metanol, 40 % de água bidestilada e 10 % de ácido acético, até que fosse possível a visualização das bandas.

Na eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não- desnaturantes (Native-PAGE), a composição dos géis utilizados foi a mesma apresentada na Tabela 8, porém o reagente desnaturante SDS foi substituído por água bidestilada e a solução tampão desnaturante por solução tampão Mcllvain em pH 4.0. Todos os equipamentos utilizados foram os mesmos da eletroforese desnaturante. A voltagem aplicada na corrida foi de 60 V no gel de concentração e de 120 V para o gel de separação. Utilizou-se na corrida a solução tampão tris-glicina (BioRad), diluída 10 vezes. Foram utilizadas alíquotas de 0,015; 0,05 e 0,1 U de lacase. Após a corrida, os géis foram incubados com ABTS 3 mM preparado com tampão Mcllvain pH 4,0 durante 15 minutos, sendo então possível a visualização das bandas.

3.11 Metodologia dos cálculos dos parâmetros cinéticos, eficiência catalítica e rendimento.

Os cálculos de produtividade total (Q_p) em relação à atividade de lacase foram realizados utilizando-se a equação 2:

$$Q_p = \frac{AE_f - AE_0}{t_f} \quad (2)$$

onde:

AE_f : atividade enzimática medida no final do processo, considerando o ponto no qual a atividade enzimática atinge seu valor máximo.

AE_0 : atividade enzimática inicial.

t_f : tempo de processo, considerando o tempo no qual a atividade enzimática máxima é atingida.

A produtividade máxima ($Qp_{m\acute{a}x}$) foi calculada conforme a equação 3.

$$Qp_{m\acute{a}x} = \frac{AE_m - AE_0}{t_m} \quad (3)$$

onde:

AE_m : atividade enzimática no ponto em que a produtividade é máxima.

AE_0 : atividade enzimática inicial.

t_m : tempo para o qual a produtividade é máxima.

Os resultados de produtividade total e máxima foram expressos em $U L^{-1} h^{-1}$.

O cálculo de eficiência catalítica foi realizado conforme a equação 4.

$$\text{Eficiência catalítica} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m} \quad (4)$$

onde:

$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu M L^{-1} min^{-1}$): Velocidade máxima de reação.

K_m (μM): Coeficiente de Michaelis-Menten.

Os rendimentos das etapas de congelamento/descongelamento, ultrafiltração, precipitação e filtração em gel foram calculados através da equação 5.

$$R(\%) = \frac{AE_c * 100}{AE_f} \quad (5)$$

Onde:

$R(\%)$: Rendimento expresso em porcentagem

AE_c : Atividade enzimática presente na etapa posterior

AE_f : Atividade enzimática presente na etapa anterior

Para o cálculo da massa molar das lacases, foi utilizada uma curva de calibração com os seguintes padrões de proteínas: 3 mg mL⁻¹ de Ribonuclease A (RNase A; 13,7 kDa), 3 mg mL⁻¹ de Carboanidrase (29 kDa), 4 mg mL⁻¹ de Ovalbumina (43 kDa), 3 mg mL⁻¹ de Conalbumina (75 kDa), 4 mg mL⁻¹ de Aldolase (158 kDa) e 0,3 mg mL⁻¹ de Ferritina (440 kDa).

Para a estimativa do tempo de retenção entre a injeção da amostra e a detecção pelo detector UV, foi utilizado Blue Dextran 2000 (1 mg mL⁻¹; 2000 kDa). Para os cálculos foram utilizados os Volumes de eluição (16 e 16,5 para *Phoma* sp. e *Pleurotus ostreatus*, respectivamente), Volume da coluna (24 mL) e o Volume vazio (8,5 mL) entre o tempo de injeção de Blue Dextran 2000 e detecção. O fluxo de eluição utilizado foi de mL min⁻¹. Sendo assim foi calculado K_{AV} utilizando-se a Equação 6.

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o} \quad (6)$$

onde:

V_e (mL): Volume de eluição

V_o (mL): Volume vazio

V_c (mL): Volume da coluna

Plotando-se uma curva semi-logarítmica dos valores de K_{AV} contra as massas molares dos padrões de proteínas foi possível, através de uma regressão linear determinar o valor da massa molar das proteínas desconhecidas.

3.12 Determinação do pH ótimo

A determinação do pH ótimo foi realizada em solução tampão McIlvain com os valores de pH de 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, e 7,5. Os ensaios foram realizados em tubos Eppendorf® de 1,5 mL, incubados a temperatura ambiente e sem agitação, num volume total de reação de 1mL, numa concentração final de lacase de 0,5 U. Após a homogeneização da mistura, foram retiradas alíquotas de 20 μ L para a determinação da atividade de lacase. A medição de atividade de lacase foi realizada conforme apresentado no item 3.6, porém, além do ABTS, foram utilizados os substratos 2,6-Dimetoxifenol (DMP, 97 %; Fluka, Buchs, Suíça), Guaiacol (GUA, 99,5 %; Merck, Darmstadt, Alemanha), Siringaldazina (SGZ, 99 %; Sigma-Aldrich, St. Louis /MO, EUA), e os corantes Acid blue 62 (Abu62, \geq 98 %; Yorkshire Europe, Tetre, Bélgica) e Remazol Brilliant Blue R (RBBR, 50 %, technical grade; Acros Organics, Geel, Bélgica). As concentrações e parâmetros fotométricos de cada substrato, utilizados nos testes, são apresentados na Tabela 9. Os testes foram realizados em duplicata para cada valor de pH testado.

Tabela 9 – Concentração dos substratos e seus respectivos parâmetros fotométricos. ¹Johannes e Majcherczyk (2000); ^{2,4}Martin *et al* (2007); ³Das *et al.* (1997) ^{5,6}Junghanns *et al.* (2008a).

Substrato	Concentração (mM)	λ (nm)	\square ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	t (min)
ABTS	20	420	36 ⁽¹⁾	6
DMP	20	470	27,52 ⁽²⁾	30
GUA	20	470	6,74 ⁽³⁾	30
SGZ	0,5	530	65 ⁽⁴⁾	14
ABu62	5	590	15,2 ⁽⁵⁾	60
RBBR	3	590	12,7 ⁽⁶⁾	60

3.12 Estabilidade com o pH

Os testes de estabilidade com o pH foram realizados com os valores de pH de 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0. As condições do teste foram idênticas às descritas no item 3.12, entretanto, os ensaios foram conduzidos num período total de 72 horas, sendo que para a medição da atividade de lacase foram retiradas amostras de 20 μ L nos intervalos de tempo de 2, 4, 6, 8, 24, 48 e 72 horas. Para a medição da atividade de lacase, foi utilizado o ABTS 20 mM. Os testes foram realizados em triplicata para cada valor de pH testado.

3.13 Estabilidade com a temperatura

Os testes de estabilidade com a temperatura foram realizados a 4, 14, 28, 40, 50 $^{\circ}$ C e a temperatura ambiente (25 $^{\circ}$ C). As temperaturas de 4, 14 e 28 foram mantidas utilizando-se refrigeradores. As temperaturas de 40 e 50 $^{\circ}$ C foram mantidas com o auxílio de um Thermomixer (5436, Eppendorf) e um banho termostático (Ultraschallbad USR 90H Bandelin Sonorex), respectivamente. Os ensaios e as amostragens foram realizados de acordo com o item 3.13, entretanto o valor de pH foi mantido em 5,0. Para a medição da atividade de lacase, foi utilizado ABTS 20 mM. Os testes foram realizados em triplicata para cada valor de temperatura testado.

3.14 Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e da velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$).

A constante cinética de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$) de lacase dos caldos concentrados de *Pleurotus ostreatus* e *Phoma* sp. foram determinadas pela oxidação dos substratos ABTS, DMP, GUA, SGZ e dos

corantes Abu62 e RBBR (Tabela 9). K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram determinadas nos instantes iniciais da reação, onde a taxa de oxidação é linear, pelo método de Linewear-Burk.

Soluções estoque de cada um dos substratos foram preparadas, a partir das quais foram preparadas diferentes concentrações em tampão citrato 0,1 M, nos valores de pH ótimo (item 3.11). O programa OriginPro 8G (Originlab, Northampton, MA, USA) foi utilizado para o cálculo dos valores aparentes de K_m e de $V_{m\acute{a}x}$, através da regressão não-linear da atividade enzimática contra as diferentes concentrações de substrato preparadas, utilizando-se o modelo de Michaelis-Menten para ABTS, DMP, GUA, and SGZ. Para Abu62 e RBBR foi utilizado o modelo de Hill, devido aos melhores resultados obtidos. As concentrações dos substratos (μM) com seus respectivos valores de pH ótimo para a determinação dos parâmetros cinéticos da lacase proveniente de *Phoma* sp. são descritas abaixo:

ABTS: 700, 500, 300, 200, 100, 50, 25, 10, 5, 1; – pH 2,5

DMP: 2000, 1000, 500, 200, 100, 50, 20, 10; – pH 5,0

GUA: 2000, 1000, 500, 200, 100, 50; – pH 5,0

SGZ: 50, 20, 10, 5; – pH 5,5

ABU: 100, 50, 30, 10, 5, 3; – pH 4,5

RBBR: 300, 150, 100, 50, 30; – pH 4,0

Para *Pleurotus ostreatus*, as concentrações (μM) de substrato e valores de pH ótimo foram os seguintes:

ABTS: 500; 300; 200; 100; 50; 30; 10; 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05; – pH 4,5

DMP: 2000; 1000; 500; 200; 100; 50; 20; 10; - pH 5,0

GUA: 2000; 1000; 500; 200; 100; 50; - pH 5,5

SGZ: 200; 100; 50; 20; 10; 5; - pH 6,5

ABU: 100; 50; 30; 10; 5; 3; - pH 3,5

RBBR: 150; 100; 50; 30; 10; 5; 2,5; - pH 4,0

As demais condições de medição de atividade enzimática foram mantidas conforme descrito no item 3.12.

3.15 Degradação de compostos interferentes endócrinos (EDC)

Soluções estoque de 5 mL com concentração de 25 mM de nonilfenol técnico (85%, Fluka Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), bisfenol-A (95%, Fluka Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) e 17 β -etinilestradiol (98%, Fluka Sigma-Aldrich Chemie GmbH) foram preparadas em Tween 80 (0,1%) e metanol (1%), para a melhor dissolução dos EDCs (JUNGHANNS, 2003). As soluções estoques foram mantidas a 4°C.

Os experimentos de degradação foram realizados em frascos âmbar de 7 mL, num volume final de reação de 3 mL. Os frascos continham o EDC dissolvido (30 μ L) numa concentração final de 250 μ M, solução tampão McIlvain pH 5,0 num volume de 2595 μ L e o caldo concentrado contendo lacase, num volume 375 μ L para o experimento com *Phoma* sp. Para o experimento com lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus* foi utilizado o volume de tampão de 2782,5 μ L e volume de caldo concentrado contendo lacase de 187,5 μ L. Os volumes foram utilizados de forma que a concentração de lacase para ambos os casos ficasse na concentração de 0,5 U L⁻¹. Os volumes variaram devido à diferença de atividade de lacase obtida para cada fungo.

Para cada composto foram preparados 3 frascos teste e 3 frascos controle, sendo que para os controles foi utilizada lacase previamente fervida em banho-maria, durante 30 min, garantindo a total perda de atividade. Os frascos foram incubados em temperatura e iluminação ambiente, com agitação recíproca de 160 min⁻¹, durante o período de 3 dias.

Amostragens foram realizadas a partir do início do experimento, antes da lacase ser adicionada e em 1, 2 e 3 dias de reação. Foram retiradas amostras de 0,5 mL para as análises da degradação dos EDCs (item 3.16.1) e amostras de 0,2 mL para as análises de atividade enzimática (item 3.6). Às amostras para análise da degradação dos EDCs foi adicionado 0,5 mL de etanol, evitando assim o

congelamento da amostra. Em seguida, todas as amostras foram armazenadas a – 20 °C até o momento das análises.

3.15.1 Análises quantitativas da degradação dos EDCs

As amostras foram descongeladas e centrifugadas a 3373 g, a 4°C por 10 minutos. Foram coletados 500 µL do sobrenadante e transferidos para frascos apropriados.

Para as análises quantitativas de degradação dos compostos, foi utilizada cromatografia líquida de ultra performance (UPLC[®]) utilizando-se um cromatógrafo ACQUITY Ultra Performance[™] (UPLC, Waters, USA), equipado com um detector PDA (Photodiode Array Detector; λ - 190 a 800 nm).

Os componentes foram separados utilizando-se uma coluna Acquity UPLC[®] BEH (Ethylene Bridged Hybrid, partículas de 1,7 µm), 2,1 x 50 mm. Todas as análises foram realizadas a 40 °C, utilizando-se eluição isocrática de 50 % metanol e 50 % água, em um fluxo de 0,5 mL min⁻¹.

Todas as análises foram realizadas em triplicata, inclusive dos controles. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística de diferença entre as médias (ANOVA), com nível de confiança de 95 %.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cinética de produção de lacase em diferentes meios de cultivo.

A cinética de produção de lacase pelo fungo *Phoma* sp. UHH 5-1-03 foi avaliada em diferentes meios de cultivo para identificação, num primeiro momento, do meio capaz de propiciar maiores valores de atividade enzimática.

As cinéticas de produção de lacase utilizando-se água e meio Czapeck-Dox, acrescido das diferentes fontes de carbono são apresentadas nas Figuras 11 e 12, respectivamente. Os experimentos com as formulações de meio de cultivo 1 a 5 (Tabela 6), foram realizados para avaliar a possibilidade de produção da enzima reduzindo-se o custo de produção e o meio Czapeck-Dox foi escolhido por ser referenciado na literatura (NARANJO *et al.*, 2008) como um meio utilizado no cultivo deste gênero de fungos.

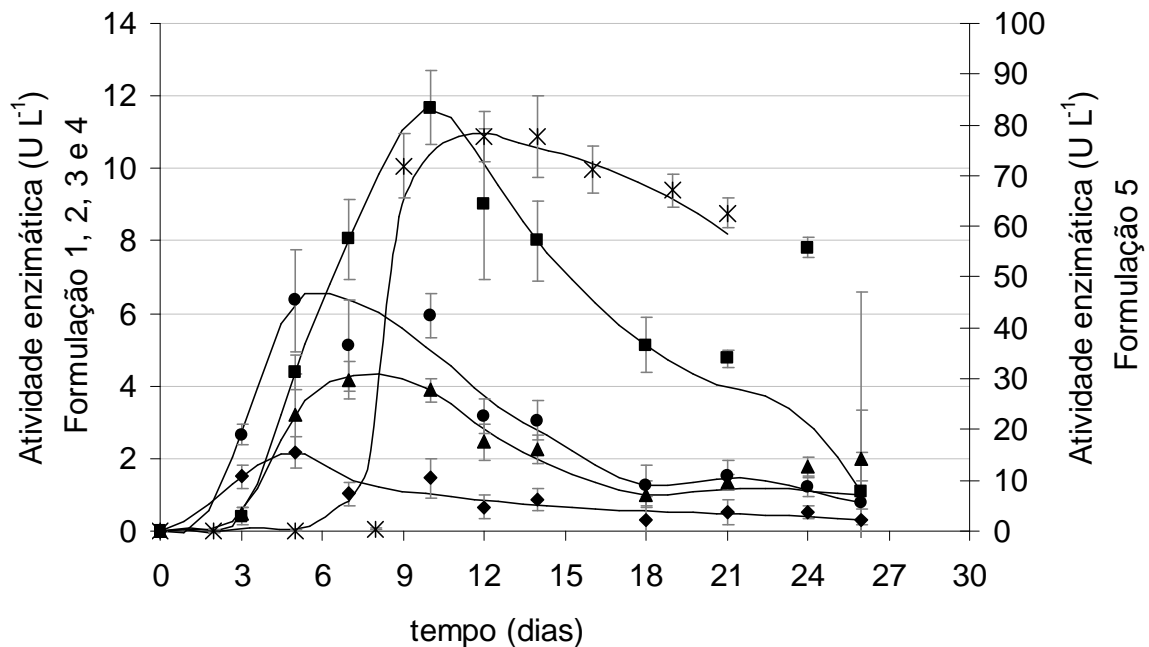


Figura 11 - Cinética de produção de lacase pelo fungo *Phoma* sp. UHH 5-1-03 utilizando-se água e resíduos/materiais lignocelulósicos (♦1: papel; ●2: papel + CuSO₄; ▲3: papel + raspas de madeira; ■4: raspas de madeira; x5: cascas de banana + CuSO₄). As barras representam o desvio padrão das médias.

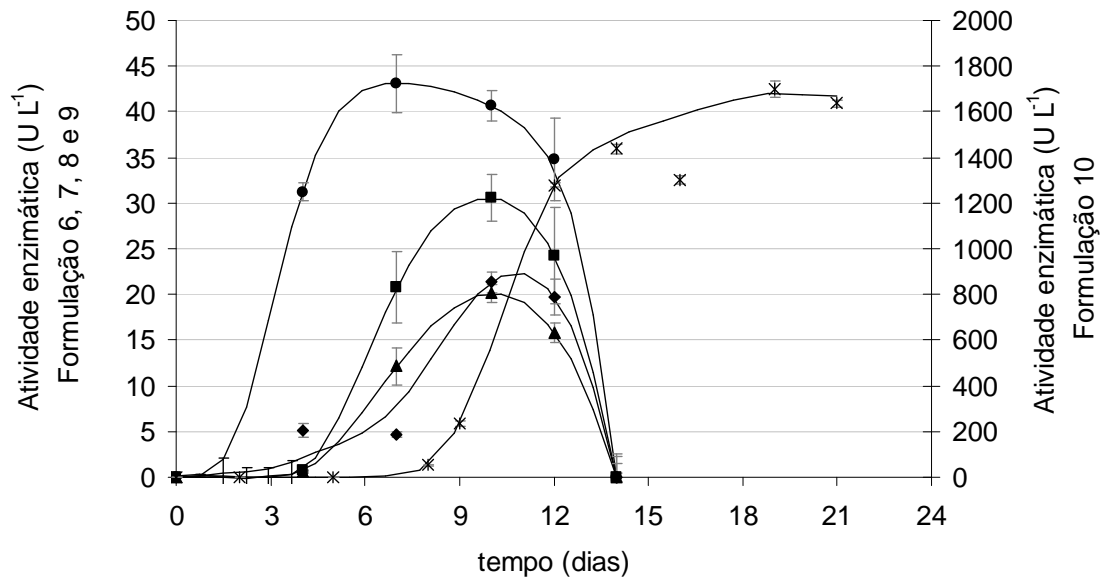


Figura 12 - Cinética de produção de lacase pelo fungo *Phoma* sp. UHH 5-1-03 utilizando-se meio Czapeck-Dox e resíduos/materiais lignocelulósicos (♦6: papel; ●7: papel + CuSO₄; ▲8: papel + raspas de madeira; ■ 9: raspas de madeira; x 10: cascas de banana + CuSO₄). As barras representam o desvio padrão das médias.

As atividades máximas encontradas para o cultivo com água (Figura 11) são muito baixas quando comparadas com os cultivos em meio Czapeck-Dox (Figura 12), mostrando que os nutrientes presentes no meio Czapeck-Dox influenciam a produção de lacase. Mesmo nas formulações contendo sulfato de cobre (2 e 5), conhecido como indutor da expressão de lacase, a atividade enzimática máxima em meio com água foi inferior a 80 U L⁻¹. Além disso, por meio de observações visuais, verificou-se pouca quantidade de *pellets* e de tamanhos menores que os do cultivo contendo meio Czapeck-Dox. A pouca biomassa formada ainda pode estar relacionada somente aos nutrientes residuais do inóculo.

Comparando as Figuras 11 e 12, é possível observar acréscimos na atividade máxima de lacase de 927 % (formulações 1 e 6), 583 % (formulações 2 e 7), 366 % (formulações 3 e 8) e 161 % (formulações 4 e 9), quando a água foi substituída pelo meio Czapeck-Dox.

No entanto, a grande indução da enzima foi observada com o uso de cascas de banana, que associado ao meio Czapeck-Dox (formulação 12) levou a um incremento de 2085 % na atividade enzimática em relação ao meio 5 (com água) e

de 3847 % em relação à formulação 7 que promoveu o 2º melhor resultado obtido com o próprio meio Czapeck-Dox.

O cultivo com água (formulação 5) apresentou atividade máxima de lacase de $77,77 \pm 5,02 \text{ U L}^{-1}$, no 12º dia de cultivo, sendo que no cultivo com o meio Czapeck-Dox (formulação 10) a máxima atividade enzimática observada ($1699,39 \pm 36,24 \text{ U L}^{-1}$) foi alcançada em 19 dias de cultivo

O fungo *Phoma* sp. UHH 5-1-03 já foi cultivado por Junghanns *et al.* (2008b) utilizando um meio de cultivo composto por suco de tomate, tendo o corante Remazol Brilliant Blue R como indutor da lacase, e foram alcançadas atividades de lacase de até 6322 U L^{-1} . Os autores também discutem que a utilização de meios de cultivo alternativos podem levar à produção de lacase com propriedades diferenciadas, além de reduzido custo de produção. No entanto, o melhor resultado obtido neste trabalho até o momento ($AE= 1699,39 \pm 36,24 \text{ U L}^{-1}$) foi 272 % inferior ao reportado pelos autores.

Assim como para *Phoma* sp., as cinéticas de atividade de lacase foram determinadas para *Pleurotus ostreatus* DSM 1833. As Figuras 13 e 14 apresentam as cinéticas de produção de lacase pelo fungo *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 utilizando-se água e meio Kirk, respectivamente, acrescidos de resíduos/materiais lignocelulósicos conforme descrito na Tabela 7.

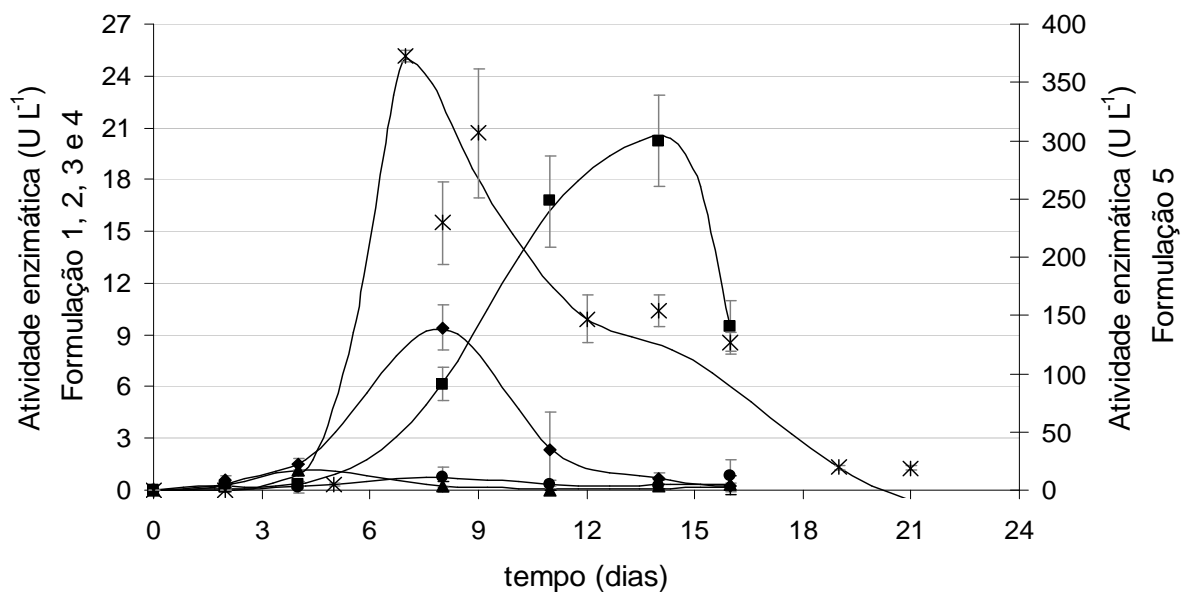


Figura 13 - Cinética de produção de lacase pelo fungo *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 utilizando-se água e resíduos/materiais lignocelulósicos (♦1: papel; ●2: papel + CuSO₄; ▲3: papel + raspas de madeira; ■ 4: raspas de madeira; x 5: cascas de banana + CuSO₄). As barras representam o desvio padrão das médias.

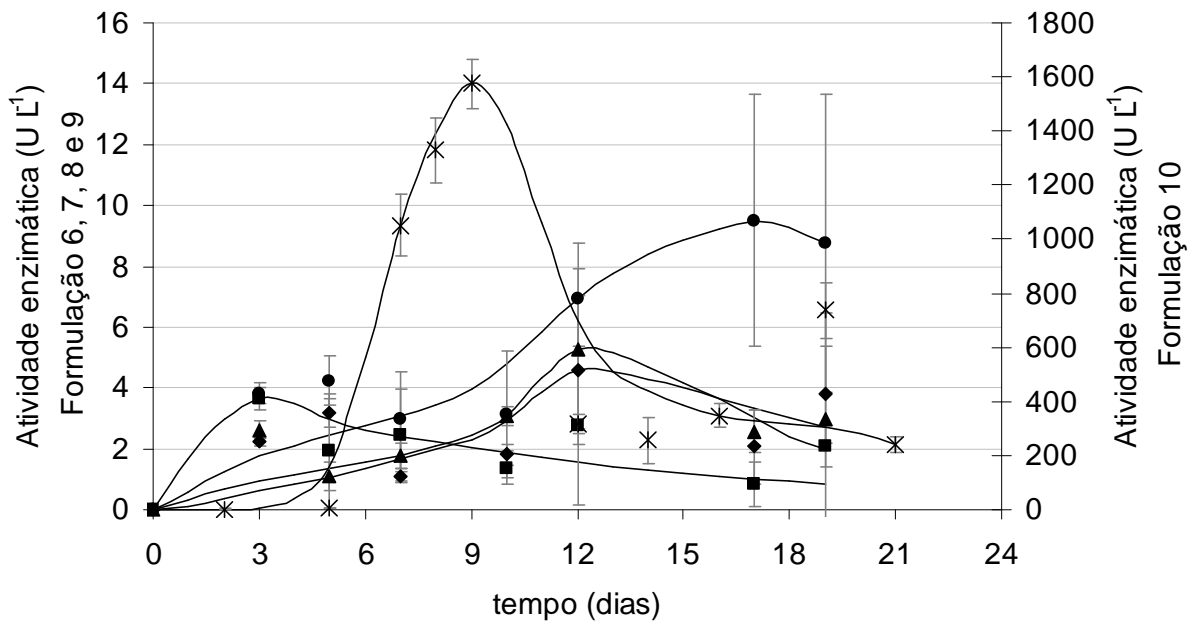


Figura 14 - Cinética de produção de lacase pelo fungo *Pleurotus ostreatus* utilizando-se meio Kirk e resíduos/materiais lignocelulósicos (◆6: papel; ●7: papel + CuSO₄; ▲8: papel + raspas de madeira; ■9: raspas de madeira; x 10: cascas de banana + CuSO₄). As barras representam o desvio padrão das médias.

A maior produção de lacase encontrada no cultivo com água e resíduos/materiais lignocelulósicos foi de $372,49 \pm 5,40 \text{ U L}^{-1}$ para a formulação 5 (cascas de banana e CuSO₄) no 7º dia de cultivo, seguida de $20,24 \pm 2,63 \text{ U.L}^{-1}$ no 14º dia de cultivo, utilizando as raspas de madeira (formulação 4, Figura 13).

Já a atividade máxima de lacase encontrada foi de $1575 \pm 93,02 \text{ U L}^{-1}$, no 9º dia de cultivo, quando utilizadas as cascas de banana com o meio Kirk (formulação 10; Figura 14).

O cultivo de *Phoma* sp. gerou atividade de lacase ($1699,39 \pm 36,24 \text{ U L}^{-1}$) similar a de *Pleurotus ostreatus* ($1575 \pm 93,02 \text{ U L}^{-1}$) nos cultivos utilizando cascas de banana em Czapeck-Dox e Kirk, respectivamente. Entretanto, para os cultivos com cascas de banana e água, a produção de lacase por *Pleurotus* ($372,48 \pm 5,40 \text{ U L}^{-1}$) foi cerca de 4,8 vezes superior a de *Phoma* ($77,77 \pm 5,02 \text{ U.L}^{-1}$).

Elisashvilli *et al.* (2008a) alcançaram maior produção de lacase por *P. ostreatus* utilizando como parte do substrato cascas de frutas (banana, tangerina e maçã) em relação à folhas de árvores, adicionadas a um meio de cultivo composto por: 10 g L^{-1} de glicose, $1 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$, $0,8 \text{ g L}^{-1}$ de KH_2PO_4 , $0,2 \text{ g L}^{-1}$ de NH_2HPO_4 ,

0,5 g L⁻¹ de MgSO₄ · 7H₂O e 2 g L⁻¹ de extrato de levedura. As atividades máximas ficaram entre 32 e 88 U L⁻¹ para os cultivos com folhas de árvores. No cultivo com cascas de tangerina, as atividades máximas ficaram entre 136 e 256 U L⁻¹, com cascas de maçã entre 200 e 688 U L⁻¹ e com cascas de banana entre 104 e 256 U L⁻¹. A maior produção de lacase utilizando cascas de frutas, segundo os autores, pode estar relacionada a presença de açúcares solúveis e a disponibilidade de polissacarídeos, o que levou a um crescimento abundante do fungo. Também não foi descartada pelos autores a hipótese de que este tipo de resíduo possui indutores da produção de lacase, como compostos aromáticos ou microelementos que podem ter sido liberados durante o processo.

Em outro trabalho, Elisashvili *et al.* (2008b), realizaram cultivo de diversos basideomicetos, inclusive de *Pleurotus ostreatus*, utilizando os mesmos substratos descritos anteriormente. As atividades máximas de lacase de *Pleurotus ostreatus* atingidas foram de 631 U L⁻¹ no cultivo com cascas de banana, 507 U L⁻¹ com cascas de maçã, 340 U L⁻¹ com cascas de tangerina e 73 U L⁻¹ com folhas de árvores. A maior atividade de lacase encontrada pelos autores foi de 7620 U L⁻¹ no cultivo do fungo *Cerrena maxima* também com o uso de cascas de banana como substrato.

Moldes *et al.* (2004) realizaram cultivo submerso do fungo *Trametes versicolor* em meio de cultivo contendo substratos lignocelulósicos como sementes de uvas e talos dos cachos de uvas, palha e farelo de cevada e sabugo de milho. Farelo de cevada foi o substrato que levou à maior produção de lacase, chegando a valores de 2500 e 3200 U L⁻¹, no 20º e 35º dia de cultivo, respectivamente.

Sendo assim, não somente as peculiaridades de cada espécie de fungo, como também a natureza do material lignocelulósico constituem fatores determinantes na expressão de lacases.

Conforme Moldes *et al.* (2004), a razão pela qual os materiais lignocelulósicos estimulam a atividade de lacases ainda não foi elucidada. A composição dos materiais/resíduos lignocelulósicos, a solubilização e/ou a liberação de substâncias podem ser fatores que contribuem para a expressão de lacase. Schlosser *et al.* (1997) propuseram que o mecanismo pelo qual a atividade de lacase pode ser estimulada é a presença de pequenas quantidades de compostos fenólicos solúveis.

4.2 Ampliação da escala de produção de lacase em meio contendo cascas de banana.

Conforme pode ser observado nas cinéticas de produção de lacase no item 4.1, a utilização de cascas de banana levou a uma produção mais elevada de lacase, tanto para o fungo *Phoma* sp. quanto para *Pleurotus ostreatus*. Sendo assim foram realizados cultivos em frascos Erlenmeyer de 500 mL com 185 mL de meio de cultivo composto por 40 g L⁻¹ de cascas de banana em meio Czapek-Dox para *Phoma* sp. e meio Kirk para *Pleurotus ostreatus*. As cinéticas de atividade de lacase podem ser observadas na Figura 13.

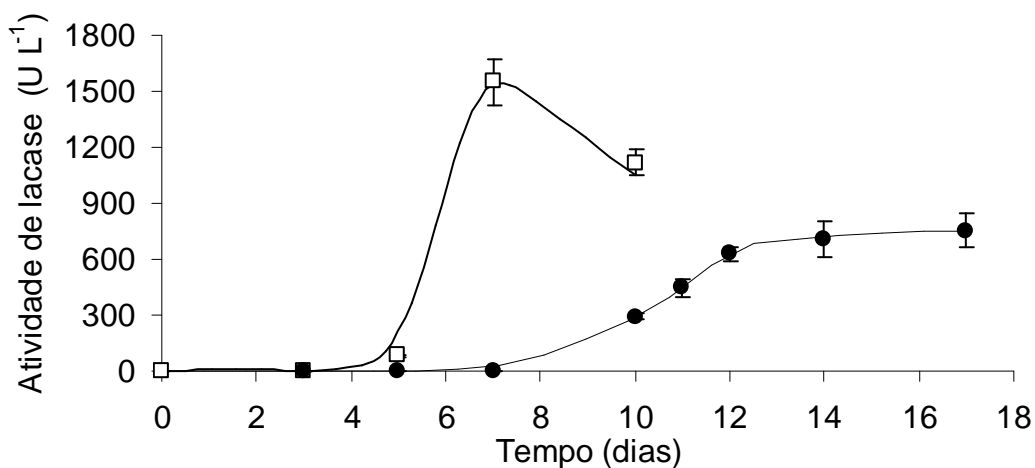


Figura 15 - Cinética de produção de lacase por *Phoma* sp. UHH 5-1-03 em meio Czapeck-Dox (●) e *Pleurotus ostreatus* em meio Kirk (□), com 40 g L⁻¹ de cascas de banana. As barras representam o desvio padrão das médias.

O cultivo de *Phoma* sp. foi realizado até o 17º dia, momento em que o processo foi interrompido, sendo o caldo de cultivo filtrado e posteriormente armazenado a -20 °C. Observa-se, pela Figura 15, que a partir do 12º dia de cultivo há uma queda na velocidade de produção de lacase por *Phoma* sp. A atividade máxima não pôde ser observada, pois até o dia em que o cultivo foi interrompido, a atividade se mantinha crescente, porém, com um incremento muito baixo, que não justificava a continuidade do cultivo em função da perda progressiva em

produtividade. A produtividade máxima em termos de atividade enzimática para o processo de produção de lacase por *Phoma* sp. foi de $2,18 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para 13 dias de cultivo, e a produtividade global para 17 dias de cultivo foi de $1,84 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Na Figura 15 se observa a cinética de produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*, sendo que este processo foi interrompido no 10º dia de cultivo, embora a atividade máxima tenha sido atingida no 7º dia ($1548,77 \pm 120,20$). Além da similaridade com o valor de atividade máxima (1575 U L^{-1}) do experimento de produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* em menor escala (Figura 13, Formulação 10), o valor de produtividade máxima calculado para este experimento ($9,21 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foi superior ao valor calculado para o experimento em menor escala ($7,29 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). O cálculo de produtividade global em termos de atividade enzimática para este experimento ficou comprometido pela falta de amostragens entre 7 e 10 dias de cultivo.

4.3 Concentração do caldo filtrado

Os caldos filtrados oriundos dos cultivos de *Phoma* sp. e *Pleurotus ostreatus* foram armazenados a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ para as etapas posteriores. Ambos podem ser visualizados na Figura 16, onde pode-se observar claramente a diferença em sua coloração. As cascas de banana utilizadas no preparo do meio de cultivo produziram uma coloração escura, similar à mostrada no caldo bruto de *Phoma* sp. (Figura 16 E). Sendo assim, durante todo o processo de cultivo de *Phoma*, não houve muita alteração na coloração do caldo. No caso de *Pleurotus ostreatus* houve uma mudança significativa da coloração durante o cultivo.



Figura 16 – Caldos filtrados provenientes do cultivo de *Phoma* sp. (E) e *Pleurotus ostreatus* (D).

Durante o bioprocesso foi possível observar que o farelo de casca de banana aderiu-se aos *pellets* de *Pleurotus ostreatus*, diminuindo a coloração do meio, ao contrário do que aconteceu no cultivo de *Phoma* sp. O farelo foi quase ausente no caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus* durante o processo, apresentando-se claramente como duas fases, a fase líquida e o aglomerado de *pellets* com o farelo de cascas de banana. Este fato também pôde ser observado durante a etapa de filtração do caldo bruto, em que houve maior facilidade de filtração no caso de *Pleurotus ostreatus*, devido a esta prévia separação de fases, não gerando assim problemas de colmatação durante a filtração.

Também foi observado que próximo aos *pellets* de *Pleurotus ostreatus* havia a presença de uma substância com característica de gel, o que provavelmente eram polissacarídeos extracelulares, conforme já foi descrito anteriormente por Wisbeck (2003). Estes polissacarídeos extracelulares ficaram aderidos aos *pellets* e ao farelo de cascas de banana, fazendo com que o farelo não ficasse em suspensão no meio de cultivo, conforme pode ser observado na Figura 17. No cultivo de *Phoma* sp. foi observada pouca formação destes polissacarídeos extracelulares, fazendo com que o farelo não aderisse aos *pellets*, permanecendo em suspensão no meio de cultivo.



Figura 17 - Agregação do farelo das cascas de banana nos pellets de *Pleurotus osteratus*.

24 h após o congelamento, os caldos foram descongelados, sendo possível visualizar os polissacarídeos precipitados.

Após o descongelamento e a sedimentação dos polissacarídeos, também foi possível observar que o sedimentado do caldo de *Pleurotus ostreatus* tinha um aspecto mais similar a um gel do que o sedimentado de *Phoma* sp., sendo que o sedimentado de *Phoma* sp. apresentava-se como pequenas partículas do farelo de casca de banana ao invés de um gel.

A etapa de congelamento e descongelamento dos caldos levou a um aumento na concentração de lacase de 181,11 % para *Phoma* sp. e de 92,2 % para *Pleurotus ostreatus* em relação à concentração de lacase presente nos caldos filtrados (Tabela 10).

Tabela 10 – Rendimentos de atividade da lacase do caldo filtrado e após o processo de congelamento/descongelamento para os caldos de *Phoma* sp. e *Pleurotus ostreatus*.

<i>Phoma</i> sp.	Atividade (U L ⁻¹)	Volume (mL)	Atividade total (U)	Rendimento (%)
Caldo filtrado	752	10	7,52	100
congelamento/descongelamento	2115	10	21,14	281,11
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Atividade (U L ⁻¹)	Volume (mL)	Atividade total (U)	Rendimento (%)
Caldo filtrado	1116,6	10	11,16	100
congelamento/descongelamento	2146	10	21,46	192,29

O aumento da atividade de lacase após o descongelamento das amostras (Tabela 10) pode estar associado ao efeito protetor que o polissacarídeo extracelular exerceu sobre a enzima. O envolvimento da superfície da lacase pelo polissacarídeo extracelular pode reduzir o contato entre o substrato e o sítio ativo da lacase. Após o descongelamento, há a precipitação dos polissacarídeos, expondo o sítio ativo da enzima, aumentando a atividade enzimática. Outra hipótese é que o processo de congelamento e descongelamento pode ter levado à precipitação de polifenóis liberados pelas cascas de banana, que são inibidores competitivos da lacase, levando à um aumento na atividade da lacase na ausência destes compostos.

Trabalhos realizados no laboratório do grupo de pesquisa em micologia ambiental do instituto de pesquisas ambientais Helmholtz (dados não publicados) mostram que os polissacarídeos extracelulares produzidos têm uma ação protetora na enzima lacase proveniente de *Phoma* sp. UHH 5-1-03, e que a estabilidade da enzima se reduz após a precipitação dos polissacarídeos.

Após a etapa de congelamento/descongelamento, os caldos foram submetidos à ultrafiltração. Após este processo, a atividade de lacase proveniente de *Phoma* sp. teve um aumento de 391,7 % e a concentração de lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus* um aumento de 304,5 %, em relação à concentração de lacase resultante do processo de congelamento/descongelamento, conforme pode ser visualizado na Tabela 11. No entanto, o volume foi reduzido a um décimo do volume original.

Tabela 11 – Atividade de lacase do caldo submetido ao congelamento/descongelamento e após o processo de ultrafiltração para *Phoma* sp. e *Pleurotus ostreatus*.

<i>Phoma</i> sp.	Atividade (U L ⁻¹)	Volume (mL)	Atividade total (U)	Rendimento (%)
congelamento/descongelamento	2115	10	21,14	139,44
Ultrafiltração	10400	1	10,4	68,6
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Atividade (U L ⁻¹)	Volume (mL)	Atividade total (U)	Rendimento (%)
congelamento/descongelamento	2146	10	21,46	192,29
Ultrafiltração	8680	1	8,68	77,77

4.4 Precipitação do caldo concentrado

A etapa de precipitação levou à remoção de parte da coloração presente nos caldos concentrados, entretanto, houve uma redução de 63,4 % na atividade de lacase de *Phoma* sp. e uma redução de 44,3 % na atividade de lacase de *Pleurotus ostreatus*, conforme pode ser observado na Tabela 12.

Tabela 12 – Atividade de lacase do caldo submetido à ultrafiltração e após o processo de precipitação para *Phoma* sp. e *Pleurotus ostreatus*.

<i>Phoma</i> sp.	Atividade (U L ⁻¹)	Volume (mL)	Atividade total (U)	Rendimento (%)
Ultrafiltração	10400	1	10,4	68,6
Precipitação	3800	1	3,8	25,06
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Atividade (U L ⁻¹)	Volume (mL)	Atividade total (U)	Rendimento (%)
Ultrafiltração	8680	1	8,68	77,77
Precipitação	4832	1	4,83	43,27

4.5 Cromatografia de exclusão por tamanho

Amostras do precipitado ressuspensas provenientes da etapa de precipitação foram aplicadas em uma coluna de exclusão por tamanho, sendo que parte do pigmento escuro que ainda permanecia no caldo, ficou retido no gel da coluna. Frações do eluído foram coletadas e a atividade remanescente de lacase medida, sendo possível visualizar claramente um pico de atividade para *Phoma* sp. (Figura 18) e dois picos para *Pleurotus ostreatus* (Figura 19).

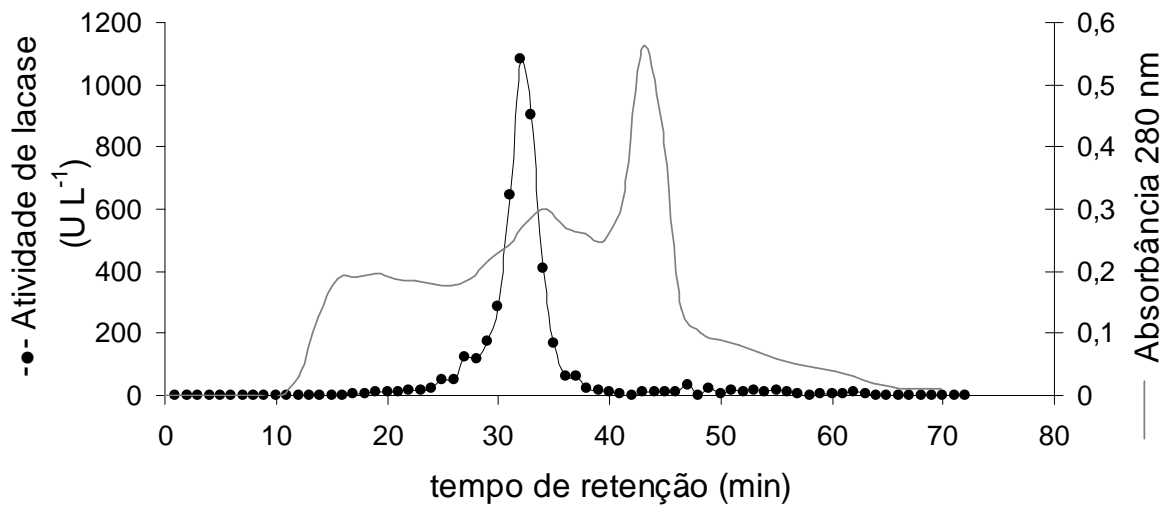


Figura 18 – Atividade das frações de lacase de *Phoma* sp. eluídas da cromatografia de exclusão por tamanho.

Na Figura 18 é possível observar que o pico de atividade de $1083,8 \text{ U L}^{-1}$ corresponde à fração eluída no tempo de retenção de 32 minutos. O pico de absorção UV foi detectado no tempo de retenção de 42,9 minutos, com uma absorção de 0,56 UA (Unidades de Absorção), num volume de retenção de 16 mL.

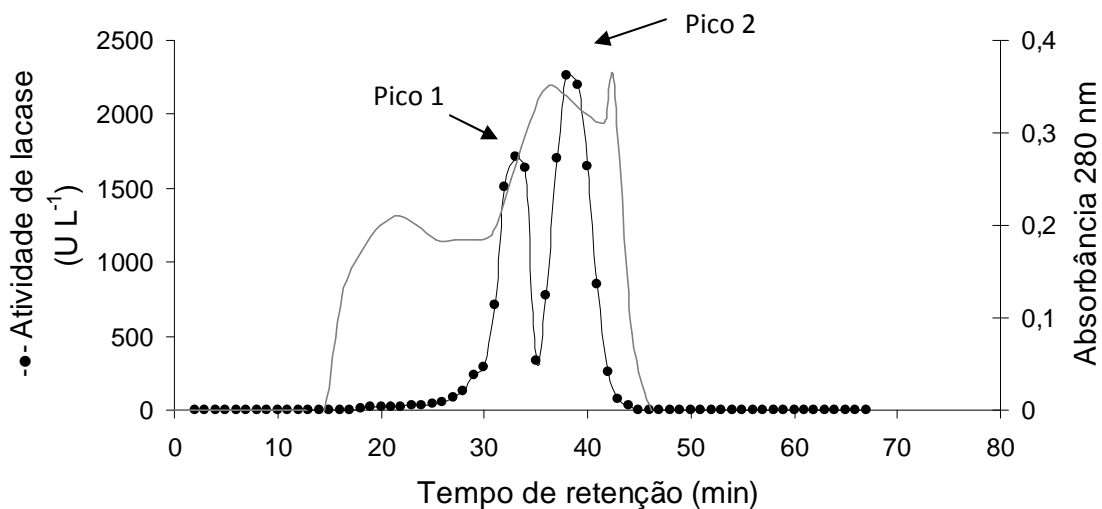


Figura 19 – Atividade das frações de lacase de *Pleurotus ostreatus* eluídas da cromatografia de exclusão por tamanho.

Na Figura 19 é possível observar dois picos de atividade de lacase. Um pico menor com atividade de 1708,97 U L⁻¹ no tempo de retenção de 33 minutos e um volume de retenção de 16,5 mL. O segundo pico com atividade de 2266,50 U L⁻¹ foi detectado no tempo de retenção de 38 minutos e num volume de eluição de 19 mL. No cromatograma de absorção de UV foi possível visualizar dois picos de 0,35 e 0,36 UA, detectados nos tempos de 36,2 minutos e 42,8 minutos, respectivamente.

Após o processo de cromatografia, houve uma redução de 71,57% na atividade de lacase de *Phoma* sp. e de 64,81 % na atividade de lacase de *Pleurotus ostreatus*, conforme pode ser visualizado na Tabela 13.

Tabela 13 – Atividade de lacase após o processo de precipitação e após a separação por cromatografia para *Phoma* sp. e *Pleurotus ostreatus*.

<i>Phoma</i> sp.	Atividade (U L ⁻¹)	Volume (mL)	Atividade total (U)	Rendimento (%)
Precipitação	3800	1	3,8	25,06
Gel filtração	1080	0,5	0,54	3,56
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Atividade (U L ⁻¹)	Volume (mL)	Atividade total (U)	Rendimento (%)
Precipitação	4832	1	4,83	43,27
Gel filtração	1700	0,5	0,85	7,61

4.6 Determinação da massa molar

As massas molares das lacases identificadas pelos picos obtidos no processo de cromatografia (Item 4.6) foram determinadas por cromatografia de exclusão por tamanho e por eletroforese. Na determinação da massa molar das lacases por cromatografia de exclusão por tamanho, mostrada na Figura 20 ,foi encontrado para *Phoma* sp. o valor de 72 kDa. No caso de *Pleurotus ostreatus*, em que foram obtidos dois picos (Figura 17), os valores das massas molares obtidos foram de 58,7 kDa e 21,1 kDa para os picos 1 e 2, respectivamente.

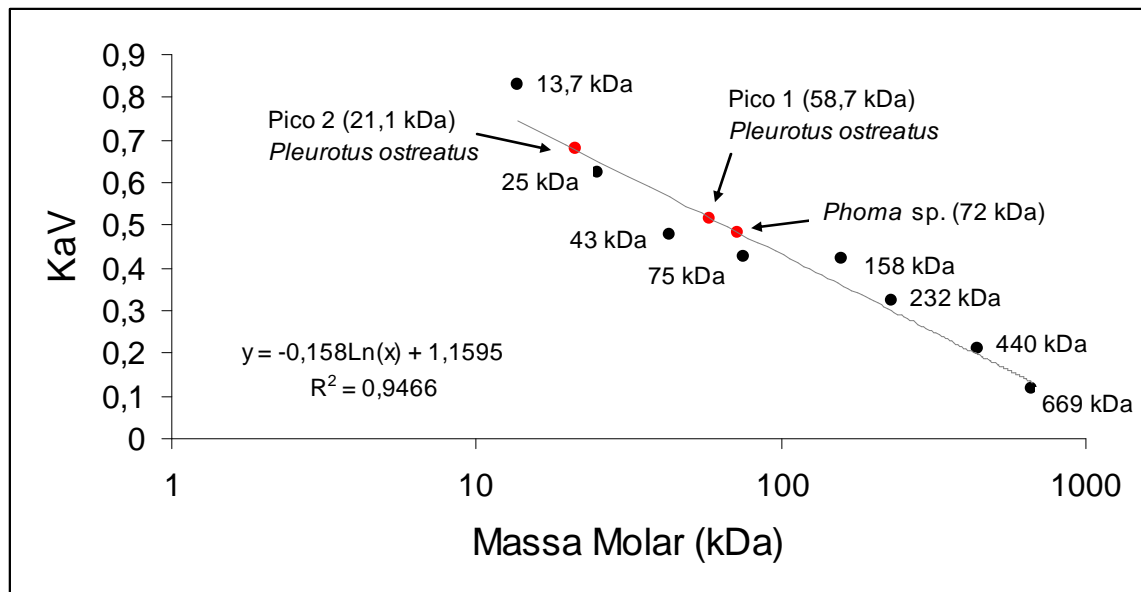


Figura 20 – Determinação da massa molar das lacases provenientes de *Phoma* sp. e *Pleurotus ostreatus* por meio de cromatografia de exclusão por tamanho (massa molar representada em escala logarítmica).

Na determinação das massas molares por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturante (SDS-PAGE), foram obtidas, para *Phoma* sp., uma banda correspondente ao valor de massa molar de 81,3 kDa, conforme pode ser visualizado na Figura 21.

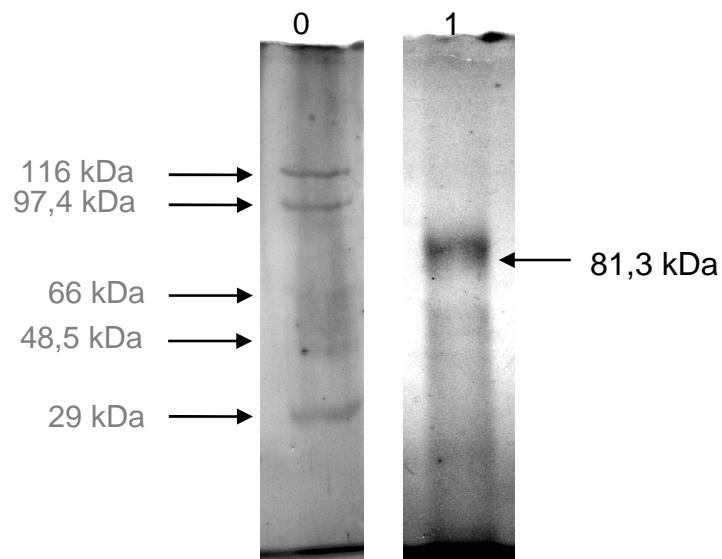


Figura 21 – Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes da amostra do pico de atividade de lacase de *Phoma* sp., proveniente da gel filtração. Coluna 0: Marcadores de massa molar; coluna 1: eluato da gel filtração (pico de atividade).

Junghanns *et al.* (2009), por cromatografia de exclusão por tamanho, detectaram um único pico com massa molar de 74 kDa, valor bem próximo ao valor encontrado neste trabalho. Por SDS-PAGE, os autores encontraram três bandas de lacase de 85, 81 e 78 kDa.

A análise eletroforética das lacases de *Pleurotus ostreatus* foi realizada utilizando-se amostras dos picos 1 e 2 (Figura 19). Os valores de massa molar obtidos foram de 66,7 kDa para o pico 1 e de 18 e 23,1 kDa para o pico 2, conforme pode ser visualizado na Figura 22.

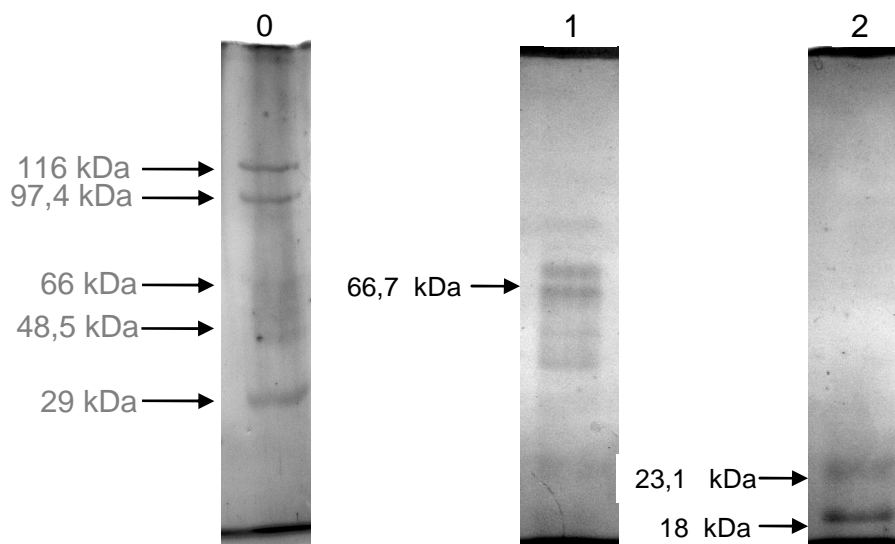


Figura 22 – Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes da amostra dos picos de atividade de lacase de *Pleurotus ostreatus*, proveniente da gel filtração. Coluna 0: Marcadores de massa molar; coluna 1: eluato referente ao pico 1 da gel filtração; coluna 2: eluato referente ao pico 2 da gel filtração.

A lacase de *Pleurotus ostreatus* com massa molar de 58,7 kDa obtida por cromatografia de exclusão por tamanho e 66,7 kDa obtida por SDS-PAGE pôde ser comparada à isoforma POXA2 obtida por Palmieri *et al.* (1997), com as massas molares de 59 kDa (cromatografia de exclusão por tamanho) e 67 kDa (SDS-PAGE). Giardina *et al.* (1999) identificaram a isoforma POXA1b com massa molar de 57 kDa (cromatografia de exclusão por tamanho) e 62 kDa (SDS-PAGE), muito parecida com o que foi encontrado neste trabalho. Entretanto, Palmieri *et al.* (2003) caracterizaram as isoformas POXA3a e POXA3b, que possuem duas subunidades,

ambas com uma maior de 67 kDa, e duas outras menores de 16 kDa para POXA3a e 18 para POXA3b. Sendo assim, o resultado encontrado neste trabalho possui muita similaridade com a isoforma POXA3b, por possuir uma subunidade maior (66,7 kDa) e uma menor (18 kDa). A banda de 23,1 kDa detectada por SDS-PAGE neste trabalho, bem como o pico com 21,1 kDa podem ter origem nas modificações que o meio de cultivo pode ocasionar na estrutura da lacase produzida.

Em paralelo à eletroforese em condições desnaturantes, foram realizados ensaios de eletroforese em condições não-desnaturantes (Native-PAGE), por meio dos quais foi possível identificar até que ponto do gel a banda migrou. A Figura 23 mostra o perfil eletroforético da corrida com a lacase proveniente de *Phoma* sp. e de *Pleurotus ostreatus*.

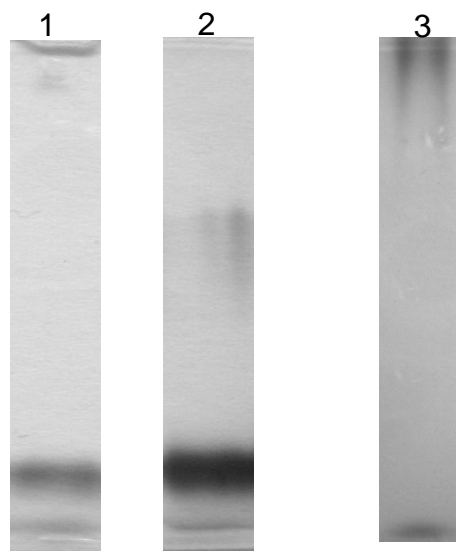


Figura 23 – Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições não-desnaturantes das amostras dos picos de atividade de lacase de *Phoma* sp. e *Pleurotus ostreatus*. Coluna 1: eluato referente ao pico 1 da gel filtração de *Pleurotus ostreatus*; coluna 2: eluato referente ao pico 2 da gel filtração de *Pleurotus ostreatus*; coluna 3: eluato referente ao pico da gel filtração de *Phoma* sp.

Nas colunas 1 e 2 da Figura 23 é possível identificar somente uma única banda. Palmieri *et al.* (2003) também identificaram apenas uma única banda no Native-PAGE das isoenzimas purificadas POXA3a e POXA3b, sendo que os pontos isoelétricos identificados pelos autores foram nos pHs 4,1 e 4,3, respectivamente.

Pode-se dizer que nas colunas 1 e 2 da Figura 23 presume-se um ponto isoelétrico ácido, devido ao local em que as bandas se fixaram no gel.

No caso da coluna 3, é possível visualizar a presença de apenas uma banda, que permaneceu na parte superior do gel. Este resultado pode ser comparado com os resultados obtidos por Junghanns *et al.* (2009), em que, pela técnica de focalização isoelétrica, foi possível detectar apenas uma banda com um ponto isoelétrico alcalino acima do pH 8,3. Como a banda detectada na coluna 3 da Figura 23 está bem próxima da superfície do gel, pode-se dizer que possui o mesmo perfil encontrado por Junghanns *et al.* (2009), em que a lacase proveniente de *Phoma* sp. possui um ponto isoelétrico alcalino não muito comum. Isto é exatamente o contrário do que é encontrado para a maioria das lacases fúngicas, em que o ponto isoelétrico é ácido, conforme exposto por Baldrian (2006), e em comparação com as bandas de lacase de *Pleurotus ostreatus*, mostradas nas colunas 1 e 2 da Figura 23.

4.7 Determinação do pH ótimo

Na Figura 24 é mostrado o perfil de atividade de lacase proveniente de *Phoma* sp. e *Pleurotus ostreatus*, em relação ao pH, para os diferentes substratos testados, (ABTS, SGZ, GUA, DMP, RBBR e Abu62).

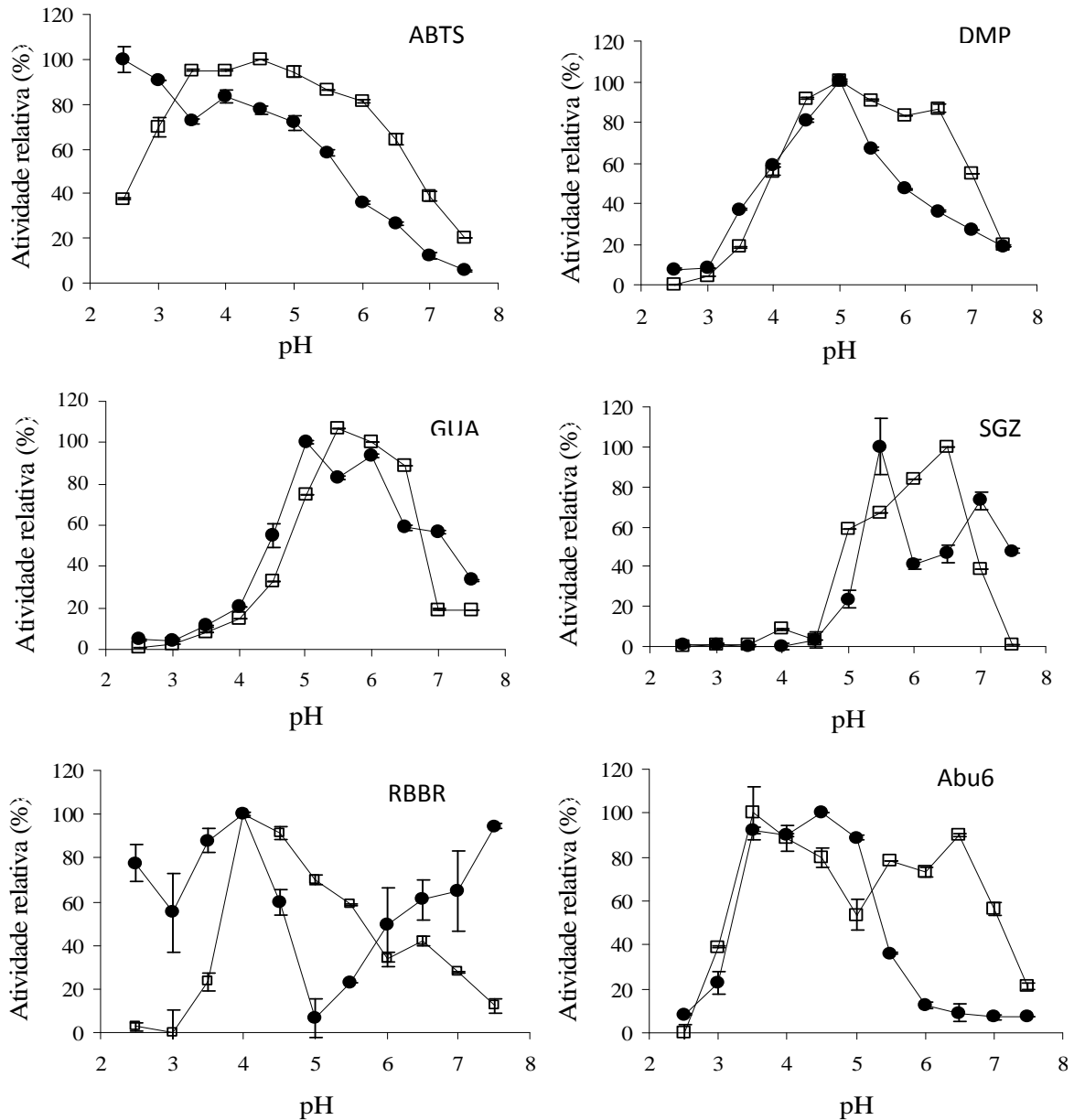


Figura 24 – Atividade relativa da lacase proveniente de *Phoma sp.* (●) e de *Pleurotus ostreatus* (□) em relação ao pH, para diferentes substratos (ABTS, DMP, GUA, SGZ, RBBR e Abu62). As barras representam o desvio padrão das médias.

Conforme Xu (1996), o formato de sino para a curva de pH é típico para a oxidação de compostos fenólicos, como foi observado para DMP e GUA na Figura 24. No caso da oxidação do ABTS, a curva obtida caracteriza-se pela redução da velocidade de reação com o aumento do pH, o que pode ser observado para a curva da lacase proveniente de *Phoma sp.* e, em parte, para a lacase de *Pleurotus ostreatus*. Conforme Galhaup *et al.* (2002), este tipo de curva é característica de reações com substratos não fenólicos. Diferentemente da oxidação de compostos

fenólicos em que há a formação de quinonas, a oxidação do ABTS se processa em uma única etapa, resultando no radical (ABTS^{•+}) (JOHANNES e MAJCHERCZYK, 2000).

É possível visualizar que para cada substrato a enzima possui uma faixa ideal de pH específica. Na reação com o ABTS, o pH ótimo de reação para a lacase de *Phoma* sp. é bem ácido, no valor de 2,5, mesmo resultado encontrado por Junghanns *et al.* (2009). Os mesmos autores também encontraram resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho para outros substratos, sendo 4,5 para DMP, 5,5 para SGZ e 5,0 para GUA. Com relação ao corante Abu62, os autores observaram atividade máxima em pH 5,5, sendo que neste trabalho encontram-se numa faixa ideal entre 3,0 e 5,0.

Em pH 7,0 foi observada uma perda de cerca de 86 % em relação a taxa máxima de oxidação de ABTS, 70 % para DMP, 52 % para GUA, 54 % para SGZ, 22 % para RBBR e cerca de 92 % para Abu62. Junghanns *et al.* (2009) encontraram os valores de 83%, 76%, 66%, 77% e 79 % para ABTS, DMP, GUA, SGZ e ABU, respectivamente.

Na Figura 24 é possível observar, ainda, que as faixas ideais de pH no caso da lacase de *Pleurotus ostreatus* são mais amplas, não sendo tão específicas como no caso da lacase proveniente de *Phoma* sp. Isto pode estar relacionado à produção de diferentes isoformas de lacase por este fungo, sendo que cada uma pode reagir melhor em um pH específico, ampliando assim a faixa de pH ideal.

Mesmo havendo uma faixa mais ampla de pH ideal para as reações, foi possível identificar os valores ótimos de pH para a reação com os diferentes substratos. Assim, o pH ótimo para a reação foi 4,5 com ABTS, 5,0 para DMP, 5,5 para GUA, 6,5 para SGZ, 4,0 para RBBR e 3,0 para Abu62. Estes valores podem ser comparados com os valores de pH ótimo encontrados por vários autores (Tabela 14) utilizando ABTS, DMP, GUA e SGZ como substratos para diversas isoformas de lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus*.

Palmieri *et al.* (2003) identificaram que a isoforma POXA3b possui pH ótimo no valor de 3,6 para a reação com ABTS, 5,5 para DMP e 6,2 para GUA, valores próximos aos encontrados neste trabalho.

Tabela 14 – pH ótimo das isoformas de lacase provenientes de *Pleurotus ostreatus*.

Espécie	ABTS	DMP	GUA	SGZ	Autores
<i>P. ostreatus</i> POXA1b	3.0	4.5		6.0	Giardina <i>et al.</i> (1999)
<i>P. ostreatus</i> POXA1w	3.0	3.0 - 5.0		6.0	Palmieri <i>et al.</i> (1997)
<i>P. ostreatus</i> POXA2	3.0	6.5	6.0	6.0	Palmieri <i>et al.</i> (1997)
<i>P. ostreatus</i> POXA3a	3.6	6.5	6.2		Palmieri <i>et al.</i> (2003)
<i>P. ostreatus</i> POXA3b	3.6	5.5	6.2		Palmieri <i>et al.</i> (2003)
<i>P. ostreatus</i> POXC	3.0	3.0 - 5.0	6.0	6.0	Palmieri <i>et al.</i> (1993, 1997); Sannia <i>et al.</i> (1986)

Liu *et al.* (2009) caracterizaram bioquimicamente a lacase purificada de *Pleurotus ostreatus* e encontraram pH ótimo igual a 4,0 em reação com o ABTS.

4.8 Cinética de estabilidade com o pH

As cinéticas de estabilidade das lacases provenientes de *Phoma* sp. e *Pleurotus ostreatus* com o pH foram realizadas buscando-se identificar por quanto tempo a enzima permanece ativa em diferentes valores de pH.

A Figura 25 mostra o perfil de estabilidade da lacase proveniente de *Phoma* sp. com o tempo em diferentes valores de pH, em temperatura ambiente.

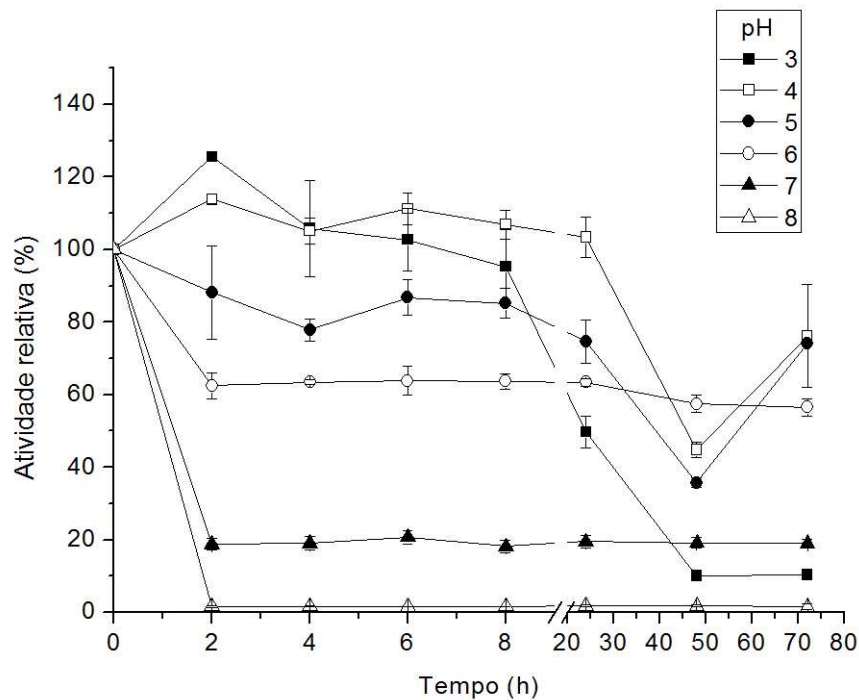


Figura 25 - Cinética da estabilidade da lacase proveniente de *Phoma* sp. em diferentes valores de pH. As barras representam o desvio padrão das médias.

Na Figura 25 é possível visualizar que em pH 3,0 e pH 4,0, valores muito próximos do pH ótimo para o substrato ABTS, a enzima mantém cerca de 100 % de sua atividade por 8 e 24 horas, respectivamente. A partir destes momentos a atividade começou a diminuir, chegando a 10 % e 48%, respectivamente, após 48 horas. Junghanns *et al.* (2009), em pH 2,0, observaram que a lacase de *Phoma* sp. manteve apenas 30 % da atividade em 8 horas e 20 % após 48 horas de reação. Os mesmos autores também identificaram que a lacase foi mais estável nos valores de pH 7,0 e 8,0 e ao mesmo tempo, em pH 4,0, o que é discutido como sendo devido a existência conjunta da forma monomérica da lacase (que permitiu a estabilidade em pH 4,0) e da forma dimérica (permitindo a estabilidade em pH 7,0 e 8,0). Conforme os autores, este comportamento pode estar associado à adaptação do fungo ao ambiente aquático. Na Figura 25 não foi possível observar este tipo de comportamento, provavelmente devido ao fato de que, neste caso, a enzima não tinha sido previamente purificada, e ao fato de que o meio de cultivo utilizado foi diferente daquele utilizado pelos autores.

A Figura 26 mostra o perfil de estabilidade com o tempo, em diferentes valores de pH, da lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus*, em temperatura ambiente.

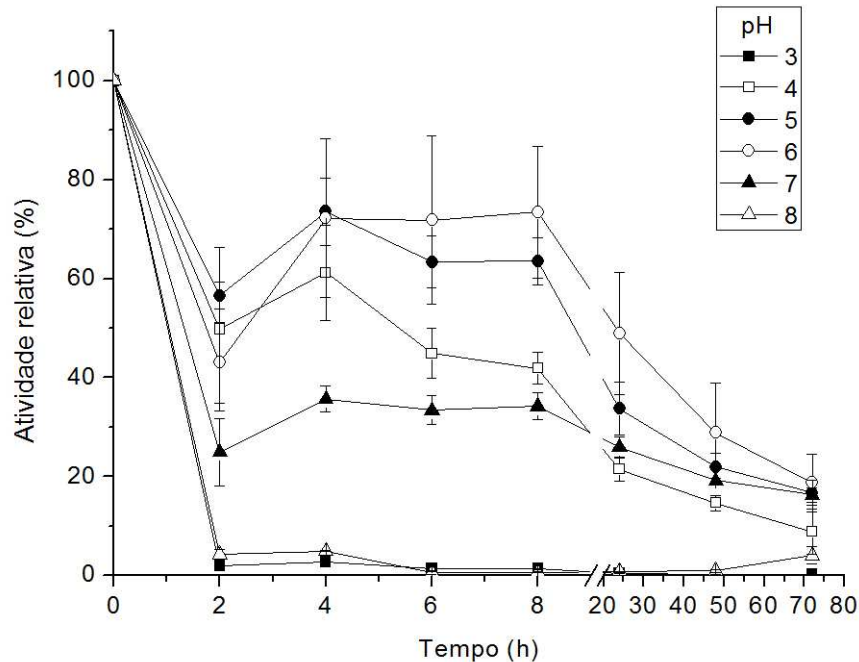


Figura 26 - Cinética da estabilidade da lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus* em diferentes valores de pH. As barras representam o desvio padrão das médias.

Na Figura 26 observa-se que a lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus* se mantém estável por um menor período que a de *Phoma* sp. Apesar da queda brusca que ocorre no início do teste de estabilidade, a enzima apresenta menor perda de atividade nos valores de pH 5,0 e 6,0, valores próximos ao pH ótimo (4,5), mantendo cerca de 63 % e 73 % de sua atividade inicial, respectivamente, após 8 horas de incubação. Em valores extremos de pH (3,0 e 8,0), a enzima perde a estabilidade muito rapidamente. Liu *et al.* (2009) caracterizaram a lacase purificada proveniente de *Pleurotus ostreatus* e observaram que a enzima manteve mais de 80% da sua atividade em pH 4,0, após 60 minutos de incubação. Entretanto, em pH 6,0 a enzima manteve-se estável somente com cerca de 40 % de sua atividade inicial, 30 % inferior ao obtido nos resultados apresentados neste trabalho. Em valores extremos de pH os autores também identificaram a queda brusca de

atividade, já nos primeiros 10 minutos de incubação, o que eles atribuem à ligação do íon hidróxido aos sítios T2 e T3 da enzima.

4.9 Cinética de estabilidade com a temperatura

A cinética de estabilidade com a temperatura foi realizada para as lacases provenientes dos caldos concentrados de *Phoma* sp. (Figura 27) e *Pleurotus ostreatus* (Figura 28).

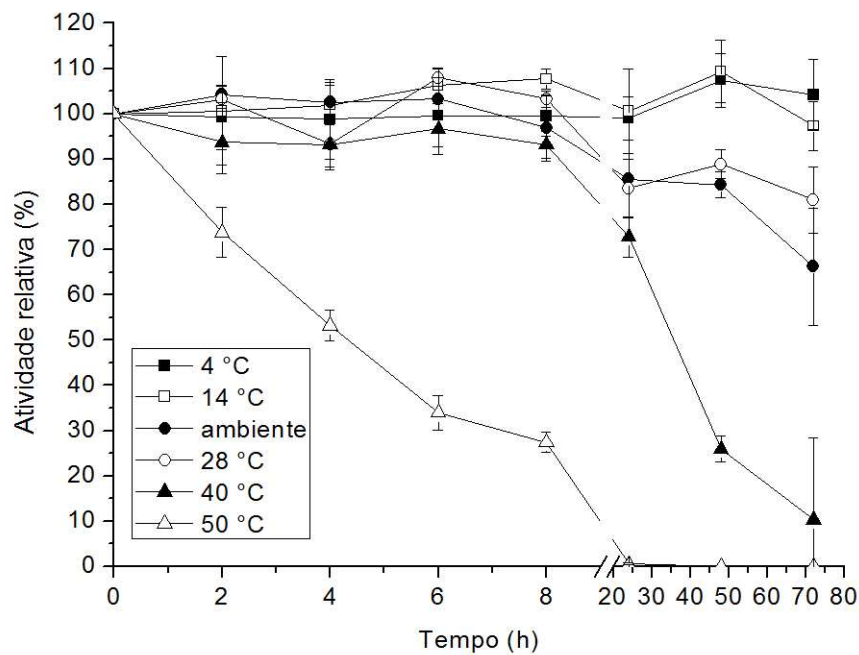


Figura 27 – Perfil de estabilidade térmica da lacase proveniente de *Phoma* sp. com o tempo. As barras representam o desvio padrão das médias.

Conforme pode ser visualizado na Figura 27, a lacase de *Phoma* sp. permaneceu mais tempo estável quando mantida a 4°C e 14°C, mantendo cerca de 100 % de sua atividade mesmo após 72 horas de incubação. Na temperatura de 28 °C e na temperatura ambiente a enzima ainda apresentou 80 % e 66% de sua atividade inicial, respectivamente, após 72 horas. A inativação completa da enzima só foi observada após 24 horas de incubação na temperatura de 50°C. Entretanto, a

40°C a atividade foi mantida em 93 % após 8 horas e 73 % após 24 horas de incubação. Junghanns *et al.* (2009) identificaram que somente 50 % da atividade foi mantida após 72 horas de reação nas temperaturas de 4°C e ambiente. Conforme os autores, a estabilidade em baixas temperaturas pode estar relacionada a adaptação do fungo ao seu ambiente natural, que não excede cerca de 20 °C.

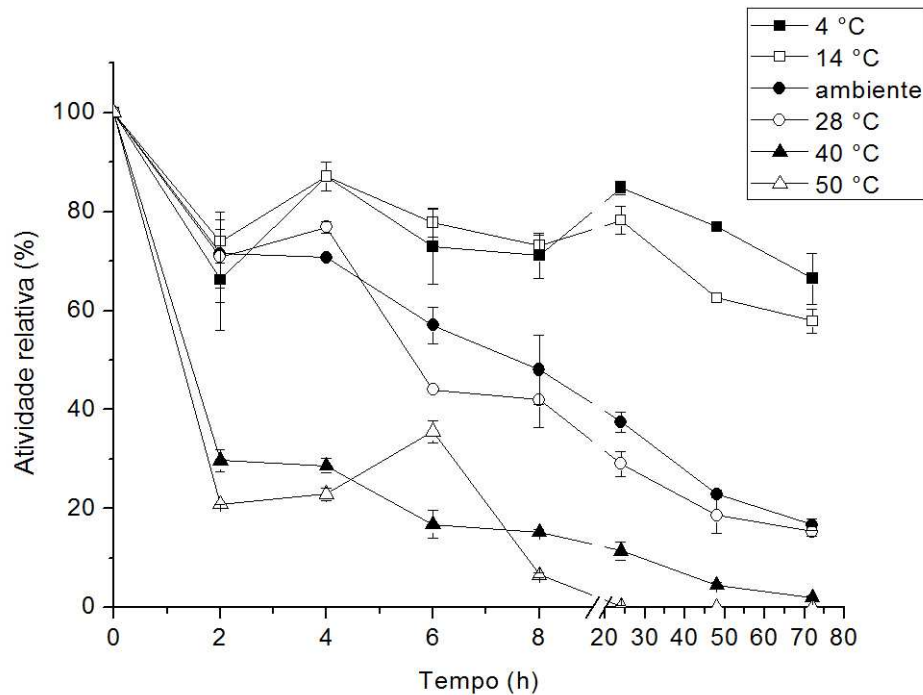


Figura 28 – Perfil de estabilidade térmica da lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus* com o tempo. As barras representam o desvio padrão das médias.

Na Figura 28 é possível observar que há uma rápida perda na atividade nas primeiras duas horas de incubação. Até 72 horas de incubação, apenas nas temperaturas de 14°C e 4°C é que foi mantida uma atividade relativa acima de 50%. Em temperatura ambiente, no mesmo período, a atividade foi reduzida para menos de 20 % da atividade inicial, no mesmo período e, nas altas temperaturas a enzima já tinha sido quase completamente desativada.

4.10 Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e da velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$).

As constantes de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$) foram determinadas utilizando ABTS, DMP, GUA, SGZ, RBBR e ABU como substratos.

As Tabelas 15 e 16 apresentam os parâmetros cinéticos da enzima lacase proveniente de *Phoma* sp. e *Pleurotus ostreatus*, respectivamente.

Tabela 15 – Parâmetros cinéticos da enzima lacase de *Phoma* sp. sobre diferentes substratos, de acordo com o modelo de Michaelis e Menten.

Substrato	K_m (μM)	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{M L}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Eficiência Catalítica
ABTS	94	6292	67
DMP	88	4174	48
SGZ	15	1930	132
GUA	859	506	0,6
RBBR	1619	0,04	0,00003
ABU	63	139	2

O valor de $V_{m\acute{a}x}$ mais elevado foi aquele obtido pela reação com o substrato ABTS. Lacase proveniente de *Phoma* sp. teve maior afinidade e maior eficiência catalítica com o substrato SGZ, enquanto que a menor afinidade e menor eficiência catalítica foram observadas com o substrato RBBR. Junghanns *et al.* (2009) avaliaram as constantes cinéticas de *Phoma* sp. UHH 5-1-03 e obtiveram valores de K_m iguais a 8 μM para ABTS, 266 μM para DMP, 20 μM para SGZ, 648 μM para GUA e 284 μM para Abu62. Apesar de os valores obtidos pelos autores não apresentarem muita similaridade com os observados neste trabalho, pode-se dizer que em ambos os casos a afinidade da lacase proveniente da linhagem *Phoma* sp. UHH 5-1-03 pelo substrato SGZ é elevada. O que pode também ter interferido na diferença nestes valores é que os autores realizaram o cultivo de *Phoma* sp. em um

meio diferente do utilizado neste trabalho, utilizaram também a lacase previamente purificada para a determinação dos parâmetros cinéticos, além da possibilidade de inibição competitiva que compostos fenólicos liberados pelas cascas de banana podem causar. Cada um destes fatores pode interferir no poder catalítico da lacase, conforme exposto por diversos autores (ELISASHVILLI *et al.*, 2006; MOROZOVA *et al.*, 2007; PEZZELA *et al.*, 2009).

Liers *et al.* (2007) obtiveram, para lacase purificada produzida pelo ascomiceto *Xylaria polymorpha* em meio de cultivo constituído basicamente por suco de tomate, os seguintes valores de K_m : para ABTS, 20 μM , para DMP, 97,5 μM , para SGZ, 3,5 μM e para GUA, 2625 μM . Assim como nos resultados obtidos neste trabalho, a lacase teve maior afinidade por SGZ. A menor afinidade verificada no trabalho de Liers *et al.* (2007) foi com o GUA. Segundo Baldrian (2006), esse perfil de elevados valores de K_m para GUA e baixos para SGZ e ABTS é típico de lacases fúngicas.

A lacase de *Phoma* sp., em relação ao substrato SGZ apresentou o mais baixo coeficiente de correlação à curva de Michaelis-Menten, sendo encontrado o valor de 0,95. Quando em reação com o substrato RBBR, seguiu a cinética de Hill, apresentando um coeficiente de correlação de 0,97 e valores de K_m de 137 μM e V_{max} de 0,0078 $\mu\text{M L}^{-1} \text{min}^{-1}$. A lacase em reação com o substrato GUA e o corante Abu62 apresentou maior coeficiente de correlação para o modelo de Hill, com valores de 0,99 ($K_m = 14094 \mu\text{M}$ e $V_{\text{máx}} = 1190 \mu\text{M L}^{-1} \text{min}^{-1}$) e 0,98 ($K_m = 46 \mu\text{M}$ e $V_{\text{máx}} = 120 \mu\text{M L}^{-1} \text{min}^{-1}$), respectivamente. Os outros substratos seguiram a cinética de Michaelis-Menten, apresentando os coeficientes de correlação de 0,96 para ABTS e 0,99 para DMP. Conforme Junghanns *et al.* (2009), é comum que corantes antraquinônicos como o Abu62 não siga a cinética de Michaelis-Menten. As curvas de Michaelis-Menten e Hill estão apresentadas no Apêndice B.

Tabela 16 – Parâmetros cinéticos da enzima lacase de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes substratos, de acordo com o modelo de Michaelis - Menten.

Substrato	K_m (μM)	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{M L}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Eficiência Catalítica
ABTS	216	19940	92
DMP	66	6045	92
SGZ	34	5186	151
GUA	356	1033	3
RBBR	61	0,03	0,0005
ABU	79	2	0,025

Como pode ser observado na Tabela 16, a lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus* também apresentou maior afinidade por SGZ, seguida de RBBR, DMP, Abu62, ABTS e GUA. Entretanto, quando se analisa a eficiência catalítica, parâmetro dependente da velocidade máxima de reação, observa-se que RBBR e Abu62 foram os substratos com os menores valores, devido suas baixas velocidades máximas de reação. SGZ continuou proporcionando a maior eficiência catalítica para a lacase de *Pleurotus ostreatus*, assim como observado para *Phoma* sp.

Os coeficientes de correlação para a cinética de Michaelis-Menten foram todos acima de 0,98, com exceção da reação com o substrato Abu62, que foi de 0,93. A cinética foi recalculada pelo modelo de Hill, chegando-se a um coeficiente de correlação de 0,98 ($K_m = 30 \mu\text{M}$ e $V_{m\acute{a}x} = 1,07 \mu\text{M L}^{-1} \text{min}^{-1}$). A cinética de reação da lacase com o corante RBBR, recalculada pelo modelo de Hill, teve seu coeficiente de correlação aumentado de 0,98 para 0,99 ($K_m = 34 \mu\text{M}$ e $V_{m\acute{a}x} = 0,02 \mu\text{M L}^{-1} \text{min}^{-1}$).

Para o caso de *Pleurotus ostreatus*, assim como para *Phoma* sp., o meio e as condições de cultivo interferiram nos valores de K_m , principalmente, devido às diferentes isoenzimas produzidas por *Pleurotus ostreatus* que vem sendo descritas na literatura, conforme pode ser visualizado na Tabela17, além da possível presença de compostos inibidores da atividade de lacase.

Tabela 17 – Constante de Michaelis-Menten das diferentes isoformas de lacase de *Pleurotus ostreatus*, em reação com diferentes substratos.

Isoenzima	K_m (μM)				Autores
	ABTS	SGZ	GUA	DMP	
<i>P. ostreatus</i> POXA1b	370	220		260	Giardina <i>et al.</i> (1999)
<i>P. ostreatus</i> POXA1w	90	130		2100	Palmieri <i>et al.</i> (1997)
<i>P. ostreatus</i> POXA2	120	140	3100	740	Palmieri <i>et al.</i> (1997)
<i>P. ostreatus</i> POXA3a	70	36		14000	Palmieri <i>et al.</i> (2003)
<i>P. ostreatus</i> POXA3b	74	79		8800	Palmieri <i>et al.</i> (2003)
<i>P. ostreatus</i> POXC	280	20	1200	230	Palmieri <i>et al.</i> (1997)

Considerando-se que os autores tenham usado enzima purificada para determinação do K_m , que para cada isoforma existe um valor de K_m diferente e que a presença de inibidores pode afetar a reação, ainda é possível observar certa similaridade com alguns valores encontrados no caldo bruto de *Pleurotus* deste trabalho. Provavelmente estas semelhanças se devem à maior presença de alguma isoforma específica no caldo bruto. No caso do substrato ABTS, foi encontrado neste trabalho o valor de 216 μM , que mais se assemelha ao valor de K_m da isoforma POXC. Para o substrato SGZ foi encontrado o valor de K_m de 34 μM , próximo do valor de 36 μM correspondente a isoforma POXA3a.

4.11 Degradação de compostos interferentes endócrinos

Nas Figuras 29, 30 e 31 tem-se as cinéticas de degradação de nonilfenol, bisfenol-A e 17 β -etinilestradiol, respectivamente, pelos caldos concentrados contendo lacase de *Phoma* sp. ($0,5 \text{ U L}^{-1}$) e *Pleurotus ostreatus* ($0,5 \text{ U L}^{-1}$), sendo que a degradação está representada em função dos respectivos controles, na forma de porcentagem.

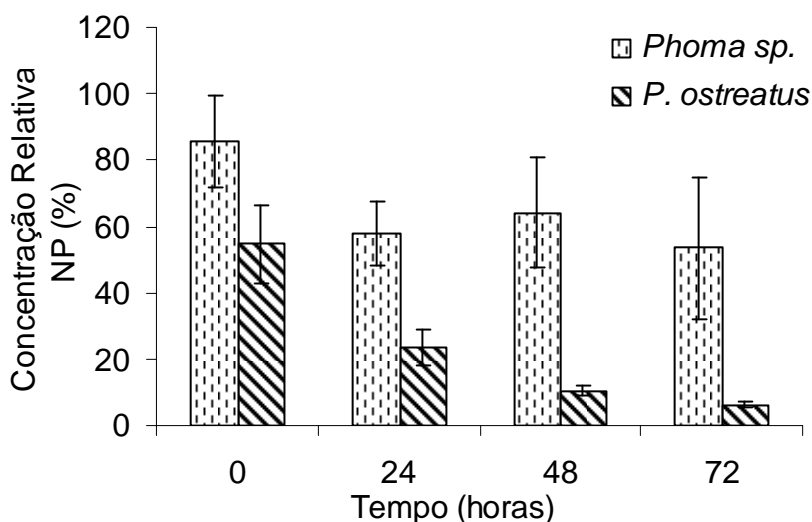


Figura 29 – Percentual de degradação de nonilfenol pelos caldos concentrados contendo lacases provenientes de *Phoma sp.* e *Pleurotus ostreatus*.

Na Figura 29 é possível observar os percentuais de degradação de nonilfenol pelas lacases de *Phoma sp.* e *P. ostreatus*. Após análise estatística, pode-se concluir que não houve diferença significativa entre os diferentes pontos, e conseqüentemente, que não houve degradação de nonilfenol pelo caldo concentrado contendo lacase de *Phoma sp.* Entretanto, foi possível concluir que a concentração de nonilfenol, submetida à ação do caldo concentrado contendo lacase proveniente de *P. ostreatus*, sofreu redução de 88,66 % após 72 h de reação, em relação a sua concentração inicial. Sabendo que não houve redução na concentração de nonilfenol utilizando-se o caldo concentrado contendo lacase proveniente de *Phoma sp.*, pode-se dizer que o caldo concentrado contendo a lacase de *P. ostreatus* foi superior em relação ao poder de degradação deste composto, nas condições testadas. Junghanns *et al.* (2005) utilizaram a lacase purificada do fungo aquático *Mirioconium sp.* UHH 1-6-18-4 em ensaios de degradação de nonilfenol (250 μM), sendo que foi alcançada uma redução na concentração do composto de 74,6 % após 24 h de reação. Catijhaml *et al.* (2009a), utilizando lacase purificada proveniente de *Pleurotus ostreatus*, conseguiram reduzir a concentração de t-NP (3 mg L^{-1}) a níveis inferiores ao limite de detecção após 72 h de reação, entretanto, estes autores não apresentaram qual a concentração de lacase utilizada no experimento. Cabana *et al.* (2007) testaram o extrato bruto do cultivo do fungo da “podridão branca” *Coriopsis polyzona* para a degradação de

nonilfenol ($22 \mu\text{M}$), uma concentração cerca de 10 vezes inferior à utilizada neste trabalho. Após 4 horas de tratamento, mais de 95 % do nonilfenol presente no sistema tinha sido eliminado e 80 % após 1 hora, utilizando lacase numa concentração de 1 U L^{-1} , o dobro da concentração enzimática utilizada neste trabalho. Auriol *et al.* (2008) conduziu testes para verificar a possibilidade de volatilização e a conversão espontânea dos EDCs e concluiu que não ocorreu a remoção dos estrogênios sem a presença da enzima lacase.

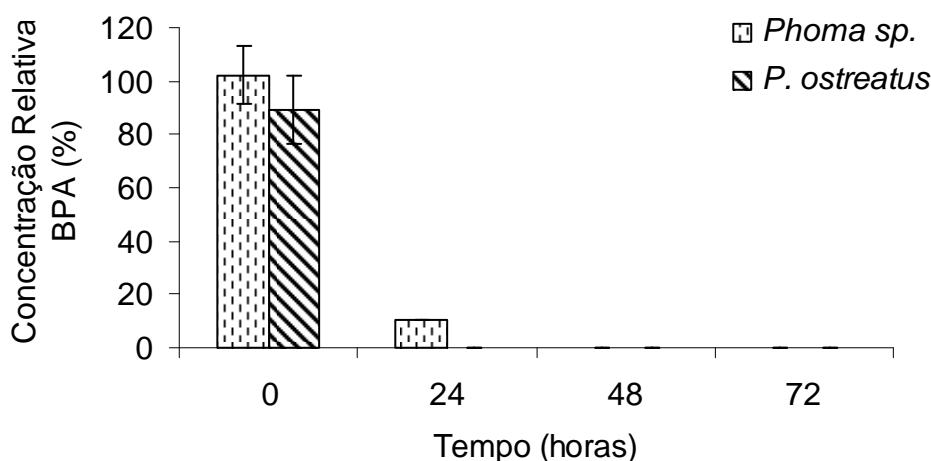


Figura 30 – Percentual de degradação de bisfenol-A pelos caldos concentrados contendo lacases provenientes de *Phoma sp.* e *Pleurotus ostreatus*.

Na Figura 30 pode-se observar que, com a utilização do caldo concentrado contendo lacase de *Phoma sp.* a concentração de bisfenol-A, após 24 h, teve um decréscimo de 89,75 % e após 48 h, já não foi mais possível sua detecção. Para a degradação de bisfenol-A com a utilização do caldo concentrado da lacase de *Pleurotus ostreatus* observa-se que a sua concentração já tinha se reduzido a zero, após 24 h de reação, mostrando sua maior velocidade no processo de degradação deste composto.

Cabana *et al.* (2007) conseguiram eliminar 100 % de bisfenol-A preparado em uma concentração inicial de $22 \mu\text{M}$, utilizando lacase purificada de *Coriolopsis polyzona* na concentração de 10 U L^{-1} após 4 horas de reação. A concentração de bisfenol-A utilizada pelos autores foi cerca de 10 vezes inferior à utilizada neste trabalho e a concentração de lacase foi 20 vezes superior, o que pode ter justificado a rápida degradação do composto, em comparação com o resultado apresentado neste trabalho, embora não tenha sido feita a quantificação no período entre 0 e

24 h. Tanaka *et al.* (2001) utilizaram lacase purificada provenientes de *Trametes versicolor* na degradação de bisfenol-A, sendo que cerca de 75 % do composto foi removido após cerca de 5 horas de reação.

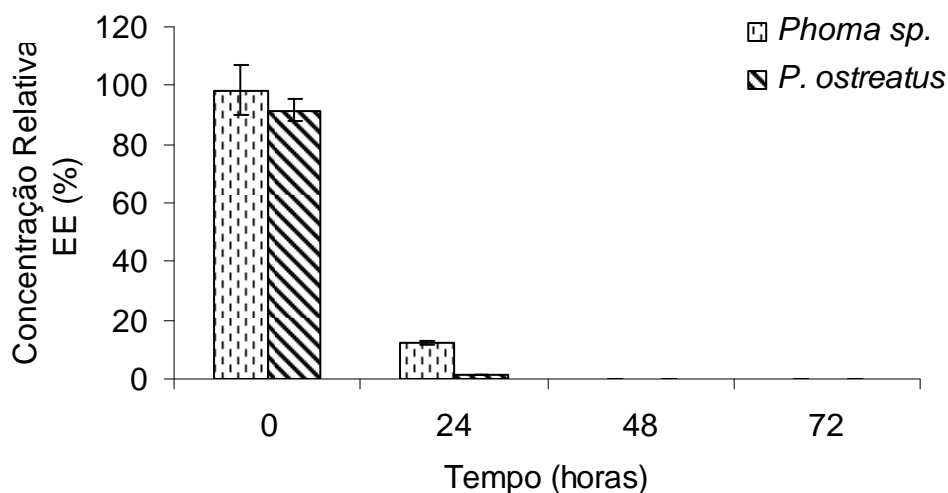


Figura 31 – Percentual de degradação de 17 β -etinilestradiol pelos caldos concentrados contendo lacases proveniente de *Phoma sp.* e *Pleurotus ostreatus*.

Os resultados apresentação na Figura 31 mostram que, em 24 h de reação com lacase proveniente de *Phoma sp.*, a concentração de 17 β -etinilestradiol foi reduzida em 87,54 % e, após 48 h de reação, a concentração de 17 β -etinilestradiol foi reduzida a zero. Na cinética de degradação de 17 β -etinilestradiol pelo caldo concentrado da lacase de *Pleurotus ostreatus*, é possível observar que a degradação completa do composto ocorreu em 24 h de reação.

Assim como para bisfenol-A, Catjhaml *et al.* (2009a) eliminaram completamente o composto 17 β -etinilestradiol preparado na concentração de 10 mg L⁻¹ após tratamento com lacase purificada de *Pleurotus ostreatus* durante 72 h. Auriol *et al.* (2008), em seus ensaios de degradação de 17 α -etinilestradiol com lacase, alcançaram uma redução de 100 % na concentração do poluente, em apenas 1 hora de tratamento. Entretanto, os autores utilizaram lacase comercial proveniente do fungo *Trametes versicolor*, com uma atividade inicial de 20000 U L⁻¹, e concentração inicial de 17 β -etinilestradiol de 0,00004 μ M. A lacase presente no caldo concentrado utilizada neste trabalho tinha uma atividade inicial de cerca de 0,5 U L⁻¹, 40000 vezes inferior à atividade utilizada pelos autores e concentração

inicial de 17 β -etinilestradiol (250 μ M) 6250000 vezes superior a utilizada pelos autores.

5. CONCLUSÕES

A utilização de cascas de banana e sulfato de cobre em combinação com os meios de cultivo Czapeck-Dox para o cultivo de *Phoma* sp. e Kirk para o cultivo de *Pleurotus ostreatus* induziu a uma maior produção de lacase em comparação com os outros meios de cultivo testados. No cultivo de *Phoma* sp. com água, a atividade máxima de lacase foi de $77,77 \pm 5,02 \text{ U L}^{-1}$, no 12º dia de cultivo, sendo que no cultivo com o meio Czapek-Dox a atividade máxima foi de $1699 \pm 36,24 \text{ U L}^{-1}$, alcançada no 19º dia de cultivo. Já a atividade máxima de lacase encontrada no cultivo de *Pleurotus ostreatus* foi de $1575 \pm 93,02 \text{ U L}^{-1}$ no 9º dia de cultivo quando utilizadas cascas de banana com o meio Kirk, e de $372 \pm 5,40 \text{ U L}^{-1}$ no 7º dia de cultivo, utilizando água.

Na ampliação de escala realizada em frascos Erlenmeyer de 500 mL, a atividade máxima alcançada no cultivo de *Phoma* sp. foi de $752 \pm 93,73$, no 17º dia de cultivo e de *Pleurotus ostreatus* foi de $1548 \pm 120,20$, no 7º dia de cultivo. A produtividade máxima em termos de atividade enzimática para *Phoma* sp. foi de $2,18 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para 13 dias de cultivo. Já para *Pleurotus ostreatus*, a produtividade máxima foi de $9,21 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para 7 dias.

Na processo de purificação, apesar da perda de atividade enzimática na gel-filtração, foi possível detectar a presença de 1 pico de atividade de lacase para *Phoma* sp. e 2 picos para *Pleurotus ostreatus*.

Na etapa de caracterização foi possível detectar a presença de uma isoforma de lacase proveniente de *Phoma* sp. com massa molecular de 72 kDa na gel filtração e de 81,3 na eletroforese. Além disso, por eletroforese em condições não-desnaturantes foi possível concluir que a lacase de *Phoma* sp. possui um ponto isoelétrico alcalino, incomum para lacases fúngicas. No caso de *Pleurotus ostreatus*, foi possível detectar 2 isoformas de lacase de 21,1 e 58,7 kDa por gel filtração e três bandas de 18, 23,1 e 66,7 kDa, detectadas por eletroforese.

As lacases presentes nos caldos de cultivo de *Phoma* sp. e de *Pleurotus ostreatus* apresentaram maior afinidade ao substrato SGZ (siringaldazina), nas

condições testadas, apresentando os valores de K_m de 15 e 34 μM , respectivamente.

O caldo concentrado de cada espécie de fungo apresentou características interessantes, como a elevada estabilidade da lacase de *Phoma* sp. em pH ácido (em pH 3,0 manteve 95% da atividade inicial após 72 horas), sendo que a estabilidade de *Pleurotus ostreatus* no mesmo valor de pH e mesmo período foi baixa (12 %). A lacase presente no caldo concentrado de *Phoma* sp. também apresentou maior estabilidade térmica em comparação a de *Pleurotus ostreatus*.

O pH ótimo encontrado para *Phoma* sp. foi de 2,5 para a reação com ABTS, 5,0 para DMP, 5,5 para SGZ, 5,0 para GUA, 4,0 para RBBR e 4,0 para Abu62. Para *Pleurotus ostreatus*, os valores de pH ótimo encontrados foram de 4,5 para ABTS, 5,0 para DMP, 5,5 para GUA, 6,5 para SGZ, 4,0 para RBBR e 3,5 para Abu62.

As lacases provenientes de ambas as espécies de fungos se mantiveram mais estáveis em baixas temperaturas sendo que, a lacase de *Phoma* sp. manteve 100 % de sua atividade mesmo após 72 horas de incubação, nas temperaturas de 4 e 14 °C. Entretanto, a lacase proveniente de *Pleurotus osteratus* mostrou-se muito menos estável, sendo que nas mesmas condições manteve cerca de 65 % de sua atividade após 72 horas de incubação.

Não foi observada degradação de nonilfenol pelo caldo concentrado contendo lacase de *Phoma* sp. No entanto, utilizando-se o caldo concentrado da lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus*, obteve-se uma redução na concentração de nonilfenol de 88,66 % em 72 h de reação. Em relação aos experimentos de degradação de bisfenol-A, o caldo concentrado contendo lacase de *Pleurotus ostreatus* mostrou-se superior ao caldo concentrado contendo lacase de *Phoma* sp., pois nas 24 h de reação todo o composto já encontrava-se eliminado, enquanto que no tratamento com o caldo concentrado contendo a lacase de *Phoma* sp., 10,25 % da concentração inicial de bisfenol-A ainda foi detectada. O composto 17 β -etinilestradiol, em 24 h de reação já encontrava-se eliminado, em reação com o caldo concentrado da lacase de *Pleurotus ostreatus*, enquanto que no mesmo período, ainda restava 12,45 % da concentração inicial de 17 β -etinilestradiol quando realizado o ensaio com o caldo concentrado da lacase proveniente de *Phoma* sp. Em geral a utilização do caldo concentrado contendo a lacase proveniente de

Pleurotus ostreatus mostrou-se superior quanto à degradação dos compostos interferentes endócrinos.

6. PERSPECTIVAS

À seguir são apresentadas algumas perspectivas de continuidade deste trabalho:

Pode ser realizado um aumento de escala na produção de lacase utilizando-se bioreatores de tanque agitado ou ainda testando-se outros modelos, como o “air-lift”. Também seria interessante a realização de estudos sobre a imobilização da lacase. O aspecto da produção de polissacarídeos e sua atuação como protetor da atividade enzimática pode ser explorado para aplicação em tecnologia de imobilização da enzima, aproveitando as características naturais do microrganismo. Ainda em relação à produção, poderiam ser testados outros substratos lignocelulósicos interessantes do ponto de vista da sustentabilidade do processo.

Quanto à etapa de caracterização da lacase, seria interessante realizar ensaios de focalização isoeétrica para determinar seu ponto isoeletrico. Para a determinação da massa molar, pode-se ainda realizar ensaios com espectrometria de massa.

Em relação à degradação de EDCs, podem ser realizados estudos para testar qual é a atividade estrogênica remanescente após o tratamento dos compostos interferentes endócrinos com lacase, utilizando-se a técnica de *screen* com leveduras recombinantes. Além disso, realizar ensaios para a identificação e quantificação dos produtos da degradação dos EDCs utilizando cromatografia gasosa em combinação com espectrometria de massa (GC-MS).

7. REFERÊNCIAS

AHEL, M., GIGER, W., KOCH, M. Behaviour of alkylphenol surfactants in the aquatic environment – I. Occurrence and transformation in sewage treatment. **Water Resv**, v. 28, p. 1131–1142, 1994.

AHMED, S. A. The Immune System as a Potential Target for Environmental Estrogens (Endocrine Disrupters): a New Emerging Field, **Toxicology**, v. 150, p. 191–206, 2000.

ARORA, D. S., SHARMA, R. K. Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2009.

AUGUSTIN, T., SCHLOSSER, D., BAUMBACH, R., SCHMIDT, J., GRANCHAROV, K., KRAUSS, G., KRAUSS, G. Biotransformation of 1-Naphthol by a Strictly Aquatic Fungus. **Current Microbiology**, v. 52, p. 216 – 220, 2006.

AURIOL, M., FILALI-MEKNASSI, Y., TYAGI, R. D., ADAMS, C. D. Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater. **Water research**, v. 41, p. 3281 – 3288, 2007.

AURIOL, M., FILALI-MEKNASSI, Y., ADAMS, C. D., TYAGI, R. D., NOGUEROL, T., PINA, B. Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: Efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*. **Chemosphere**, v. 70, p. 445–452, 2008.

BALDRIAN, P., GABRIEL, J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 206, p. 69-74, 2002.

BALDRIAN, P., VALÁŠKOVÁ, V., MERHAUTOVÁ, V., GABRIEL, J. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 670–676, 2005.

BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, p. 215 – 242, 2006.

BARNABÉ, S., BRAR, S.K., TYAGI, R.D., BEAUCHESNE, I., SURAMPALLI, R.Y. Pre-treatment and bioconversion of wastewater sludge to value-added products— Fate of endocrine disrupting compounds. **Science of the total environment** , v. 407, p. 1471 – 1488, 2009.

BONATTI, M., KARNOPP, P., SOARES, H. M., FURLAN, S. A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, v. 88., n. 3, p. 425 - 428, 2004.

BONEFELD-JØRGENSEN, E. C., LONG, M., HOFMEISTER, M. V., VINGGAARD, A. M.. Endocrine-Disrupting Potential of Bisphenol A, Bisphenol A Dimethacrylate, 4-n-Nonylphenol, and 4-n-Octylphenol in Vitro: New Data and a Brief Review. **Environmental Health Perspectives**, v. 115 p. 69 – 76, 2007.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução N° 26 de 26 de maio de 2009. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2009/res0026_26_05_2009.html>. Acesso em: 28 de jun. 2010.

CABANA, H., JIWAN, J. H., ROZENBERG, R., ELISASHVILI, V., PENNINGCKX, M., AGATHOS, S. N., JONES, J. Peter. Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*. **Chemosphere**, v. 67, p. 770–778, 2007.

CAJTHAML, T., KRĚSINOVÁ, Z., SVOBODOVÁ, K., MÖDER, M. Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. **Chemosphere**, v. 75, p. 745–750, 2009a.

CAJTHAML, T., KRĚSINOVÁ, Z., SVOBODOVÁ, K., SIEGLER, KRĚZANKA, T. Microbial transformation of synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 3325–3335, 2009b.

CEC—Commission of the European Communities, 1999. Community strategy for endocrine disrupters: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, Brussels, 17.12.1999, COM (1999) 706 final.

CHANG, B.V., YU, C.H., YUAN, S.Y. Degradation of nonylphenol by anaerobic microorganisms from river sediment. **Chemosphere**, v. 55, p. 493–500, 2004.

CHEMIDPLUS - U.S. National Library of Medicine, Bethesda/MD, USA. Disponível em: <www.chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus>. Acesso em 12 Mar, 2010.

COHEN, R., PERSKY, L., HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 5, p. 582 – 594, 2002.

CORTI, A., FRASSINETTI, S., VALLINI, G., DANTONE, S., FICHI, C., SOLARO, R., Biodegradation of nonionic surfactants. 1. Biotransformation of 4-(1-nonyl)phenol by a *Candida maltosa* isolate. **Environmental Pollutants**, v. 90, 83–87, 1995.

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

COUTO, S. R., TOCA-HERRERA J. L. Laccase Production at reactor scale by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 558–569, 2007.

COVINGTON, AD., EVANS CS., LILLEY, TH., SUPARNO, O. Collagen and polyphenols: new relationships and new outcomes. Part 2. Phenolic reactions for simultaneous tanning and coloring. **J AmLeather Chemistry Association**, v. 100, p. 336–343, 2005.

CUTLER, P. **Methods in Molecular Biology – Protein Purification Protocols**. New Jersey: Humana Press, 2004.

CRUZ, J. **Banana skin: a novel material for a low-cost production of laccase**. 2007. 28 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Ambiental e de Processos) UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI , Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Química, Departament d'Enginyeria Química, Tarragona, 2007.

DAS, N., SENGUPTA, S., MUKHERJEE, M. Importance of Laccase in Vegetative Growth of *Pleurotus florida*. **Applied and Environmental Microbiology** 63, 4120 – 4122, 1997.

DAS, N., MUKHERJEE, M. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* on weed plants. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2723 – 2726, 2007.

DOCTORFUNGUS. The Fungi – Descriptions. Disponível em: <<http://www.doctorfungus.org/Thefungi/Phoma.htm>>. Acesso em 12 mar. 2010.

DASTON, G. P., GOOCH, J. W., BRESLIN, W. J., SHUEY, D. L., NIKIFOROV, A. I., FICO, T. A., GORSUCH, J. W. Environmental Estrogens and Reproductive Health: a Discussion of the Human and Environmental Data. **Reproductive Toxicology**, v. 11, n. 4, p. 465-481, 1997.

ELISASHVILI, V., PENNINGCKX, M., KACHLISHVILI, E., ASATIANI, M., KVESITADZE, G. Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 998–1004, 2006.

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

ELISASHVILI, V., KACHLISHVILI, E., PENNINGCKX, M. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 1531–1538, 2008 b.

EMLAB. Fungal Library. Disponível em : <http://www.emlab.com/app/fungi/Fungi.po>>. Acesso em 12 mar. 2010.

EICHLEROVÁ, L., HOMOLKA, NERUD, F. Decolorization of Orange G by *Pleurotus ostreatus* Monokaryotic Isolates with Different Laccase Activity. **Folia Microbiology**, v.48, p. 775–779, 2003.

European Patent Office. Disponível em: <www.epo.org> . Acesso em 20 dez. 2009.

FERREIRA, M. G. M. **Remoção da atividade estrogênica de 17 β -estradiol e de 17 α -etinilestradiol pelos processos de ozonização e O₃/H₂O₂** . 2008. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) Programa de Pós-Graduação em Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

FLANDER, L., ROUAU, X., MOREL, M., AUTIO, K., SEPPANEN-LAAKSO, T., KRUUS, K., BUCHERT, J. Effects of Laccase and Xylanase on the Chemical and Rheological Properties of Oat and Wheat Doughs. **Journal of Food and Agricultural Chemistry**, v. 56, p. 5732–5742, 2008.

FLORES , C., VIDAL, C., TREJO-HERNANDEZ, M.R., GALINDO, E., SERRANO-CARREÓN, L. Selection of *Trichoderma* strains capable of increasing laccase

production by *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus* in dual cultures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 249–257, 2009.

FUJII, K., URANO, N., USHIO, H., SATOMI, M., KIMURA, S. *Sphingomonas cloacae* sp nov., a nonylphenol-degrading bacterium isolated from wastewater of a sewage-treatment plant in Tokyo. **International Journal System Evolution and Microbiology**, v. 51, p. 603–610, 2001.

GABRIEL, F. L. P., HEIDLBERGER, A., RENTSCH, D., GIGER, W., GUENTHER, K., KOHLER, H. E. A Novel Metabolic Pathway for Degradation of 4-Nonylphenol Environmental Contaminants by *Sphingomonas xenophaga* Bayram ipso-hydroxylation and intramolecular rearrangement. **THE Journal of biological chemistry**, v. 280, p. 15526–15533, 2005 a.

GABRIEL, F. L. P., GIGER, W., GUENTHER, K., KOHLER, H. E. Differential Degradation of Nonylphenol Isomers by *Sphingomonas xenophaga* Bayram. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1123–1129, 2005 b.

GABRIEL, F., KOHLER, H. Nonylphenole: Abbau und Östrogenität. **EAWAG News**, v. 66, p. 28 – 30, 2009.

GALHAUP, C., GOLLER, S., PETERBAUER, C. K., STRAUSS, J. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. **Microbiology**, v. 148, p. 2159 -2169, 2002.

GARCIA, T. **Purificação e Caracterização das Lacases de *Pycnoporus sanguineus***. 2006. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, Brasil. 2006.

GARZILLO, A., COLAO, M. C., BUONOCORE, V., OLIVA, R., FALCIGNO, L., SAVIANO, M., SANTORO, A., ZAPPALA, R., BONOMO, R., BIANCO, C., GIARDINA, P., PALMIERI, G., SANNIA, G. Structural and Kinetic Characterization of

Native Laccases from *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, and *Trametes trogii*. **Journal of Protein Chemistry**, v. 20, p. 192 - 201, 2001.

GE HEALTHCARE 2002. Gel Filtration: Principles and Methods. Handbook 18-1022-18. GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden.

GERN, R. M. M., WISBECK, E., RAMPINELLI, J. R., NINOW, J. L., FURLAN, S. A. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 76 – 82, 2008.

GHISELLI, G., JARDIM, W. F. Interferentes Endócrinos No Ambiente. **Química Nova**, v. 30, p. 695 -706, 2007.

GIARDINA, P., AURILIA, V., CANNIO, R., MARZULLO, L., AMORESANO, A., SICILIANO, R., FUCCI, P., and SANNIA, G. The gene, protein and glycan structures of laccase from *Pleurotus ostreatus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 235, p. 508 – 515, 1996.

GIARDINA, P., PALMIERI, G., SCALONI, A., FONTANELLA, B., FARACO, V., CENNAMO, G., SANNIA, G. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biochemistry Journal**, v. 341, p. 655 – 663, 1999.

GUENTHER, K., KLEIST, E., THIELE, B. Estrogen-active nonylphenols from an isomer-specific viewpoint: a systematic numbering system and future trends. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 542–546, 2006.

GUNDE-CIMERMAN, N. Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. (Agaricales s.l., Basidiomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.1., p. 69-80, 1999.

HARRISON, P. T. C., HOLMES, P., HUMFREY, C. D. N. Reproductive Health in Humans and Wildlife: Are Adverse Trends Associated With Environmental Chemical Exposure?, **The Science of the Total Environment**, v. 205, p. 97-106, 1997.

HOMSTRUP, M., BINDESBØL, A., OOSTINGH, G., DUSCHL, A., SCHEIL, V., KÖHLER, H., LOUREIRO, S., SOARES, A. M.V.M., FERREIRA, A. L.G., KIENLE, C., GERHARDT, A., LASKOWSKI, R., KRAMARZ, P. E., BAYLEY, M., SVENDSEN, C., SPURGEON, D. J. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. **Science of the Total Environment**, 2009.

HUBLIK, G., SCHINNER, F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 27, p. 330–336, 2000.

ILLANES, Andrés. **Enzyme Biocatalysis**. Valparaíso, Chile: Editora Springer, 2008.

Instituto Nacional de Propriedade Industrial. Disponível em : <www.inpi.gov.br> . Acesso em 20 dez. 2009.

JOHANNES, C., MAJCHERCZYK A. Laccase activity tests and laccase inhibitors. **Journal of Biotechnology**, v. 78, p. 193–199, 2000.

JUNGHANNS, C. 2003, 158 p. **Abbau von organischen Wasserkontaminanten durch aquatische Pilze und die Funktion der extrazellulären Oxidoreduktase Laccase für den Abbau**. (Diploma em biologia) Trabalho de conclusão de curso pela Universität Leipzig Fakultät für Biowissenschaften, Leipzig-Halle GmbH / Umweltforschungszentrum, Leipzig, Alemanha. 2003.

JUNGHANNS, C., MOEDER, M., KRAUSS, G., MARTIN, C., SCHLOSSER, D. Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. **Microbiology**, v. 151, p. 45 – 57, 2005.

JUNGHANNS, C., KRAUSS, G., SCHLOSSER, D. Potential of aquatic fungi derived from diverse freshwater environments to decolourise synthetic azo and anthraquinone dyes. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1225 – 1235, 2008a.

JUNGHANNS, C. P. R., KESHAVARZ, T., SCHLOSSER, D. Towards Higher Laccase Activities Produced by Aquatic Ascomycetous Fungi Through Combination of Elicitors and an Alternative Substrate. **Engineering of Life Sciences**, v. 8, p. 277–285, 2008b.

JUNGHANNS, C., PECYNA, M. J., BÖHM, D., JEHMLICH, N., MARTIN, C., BERGEN, M. von., SCHAUER, F., HOFRICHTER, M., SCHLOSSER, D. Biochemical and molecular genetic characterisation of a novel laccase produced by the aquatic ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2009.

KIISKINEN, L. **Characterization and heterologous production of a novel laccase from *Melanocarpus albomyces***. 2004. 95 p. Tese (Doctor of Science in Technology) Departamento de Tecnologia Química da Universidade de Tecnologia de Helsinki, Finlândia. 2004.

KIM, Y., NICELL, J. A. Laccase-catalyzed oxidation of bisphenol A with the aid of additives. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1029 – 1037, 2006a.

KIM, Y., NICELL, J. A. Impact of reaction conditions on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1431–1442, 2006b.

KOBAYASHI, S., UYAMA, H., IKEDA, R. Artificial urushi. **Chemistry**, v. 7, p. 4754–4760, 2001.

KUMARASAMY, M., MANAVANAN, A., IN-HYUN, N., YOUNG-MO, K., YOON-SEOK, C., THANGAVELU KALAIHELVAN, P. Purification and characterization of laccase produced by a white rot fungus *Pleurotus sajor-caju* under submerged culture condition and its potential in decolorization of azo dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 939–946, 2006.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LALITHA KUMARI, H., SIRSI, M. Purification and properties of laccase from *Ganoderma lucidum*. **Archives of Microbiology**, v. 84, p. 350–357, 1972.

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

LIU, L., LIN, Z., ZHENG, T., LIN, L., ZHENG, C., LIN, Z., WANG, S., WANG, Z. Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 426–433, 2009.

MANSUR, M., ARÍAS, M. E., COPA-PAUTINO, J. L., FLÄRDH, M., GONZALEZ, A. E. The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. **Mycologia**, v. 95, p. 1013–1020, 2003.

MARTIN, C., PECYNA, M., KELLNER, H., JEHLICH, N., JUNGHANNS, C., BENNDORF, D. VON BERGEN, M., SCHLOSSER, D. Purification and biochemical characterization of a laccase from the aquatic fungus *Myrioconium* sp. UHH 1-13-18-4 and molecular analysis of the laccase-encoding gene. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 77, p. 613–624, 2007.

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

MESSERSCHMIDT, A. **Multi-Copper Oxidases**, Singapore: World Scientific, 1997.

METGEN. Laccases. Disponível em: <www.metgen.fi/laccases> . Acesso em: dez. 2010.

MIKOLASCH, A., SCHAUER, F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. **Appl. Microbiol Biotechnol**, v. 82, p. 605 – 624, 2009.

MINUSSI, R. C., ROSSI, M., BOLOGNA, L., ROTILIO, D., PASTORE, G. M., DURÁN, N. Phenols removal in musts: Strategy for wine stabilization by laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, p. 102–107, 2007.

MINUSSI, R. C., PASTORE, G. M., DURÁN, N. Potential applications of laccase in the food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v.13, p. 205–216, 2002.

MODARESSI, K., TAYLOR, K. E., BEWTRA, J.K., BISWASA, N. Laccase-catalyzed removal of bisphenol-A from water: Protective effect of PEG on enzyme activity. **Water Research**, v. 39, p. 4309–4316, 2005.

MOLDES, D., LORENZO, M., SANROMÁN, Ma A. Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 327–330, 2004.

MORAIS, H., RAMOS, C., MATOS, N., FORGA´CS, E., CSERHA´TI, T., ALMEIDA, V., OLIVEIRA, J., DARWISH, Y., ILLE´S, Z. Liquid chromatographic and electrophoretic characterisation of extracellular b-glucosidase of *Pleurotus ostreatus* grown in organic waste. **Journal of Chromatography B**, v. 770, p. 111–119, 2002.

MOROZOVA, O. V., SHUMAKOVICH, G. P., GORBACHEVA, M. A., SHLEEV, S. V., YAROLOV, A. I. “Blue” Laccases. **Biochemistry**, v. 72, p. 1136 – 1150, 2007.

MUNOZ C, GUILLEN F, MARTINEZ AT & MARTINEZ MJ. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2166–2174, 1997.

MÜLLER e SCHLATTER. Natural and anthropogenic environmental oestrogens: The scientific basis of risk assesment. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, p. 1847 – 1853, 1998.

MUSSATTO, S. I., FERNANDES, M., MILAGRES, A. F. Enzimas – Poderosa Ferramenta na Indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, p. 28 - 33, 2007.

NARANJO, L., URBINA, H., DE SISTO, A., LEON, V. Isolation of autochthonous non-white rot fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, p. 341-349, 2007.

NEUHOFF, V., AROLD, N., TAUBE, D., EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255 – 262, 1988.

NOVOZYMES. Disponível em: <www.novozymes.com> . Acesso em : jan. 2010.

PALMIERI, G., GIARDINA, P., MARZULLO, L., DESIDERIO, B., NITTI, G., CANNIO, R., SANNIA, G. Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 632–636, 1993.

PALMIERI, G., GIARDINA, P., BIANCO, C., SCALONI, A., CAPASSO, A., SANNIA, G. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Journal Biology Chemistry**, v. 272, p. 31301–31307, 1997.

PALMIERI, G., GIARDINA, P., BIANCO, C., FONTANELLA, B., SANNIA, G. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Appl Environmental Microbiology**, v. 66, p. 920–924, 2000.

PALMIERI, G., CENNAMO, G., FARACO, V., AMORESANO, A., SANNIA, G., GIARDINA, P. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. **Enzyme Microb Technol** , v. 33, p. 220– 230, 2003.

PALMIERI G., CENNAMO, G., SANNIA, G. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 17–24, 2005.

PEZZELLA, C., AUTORE, F., GIARDINA, P., PISCITELLI, A., SANNIA, G., FARACO, V. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. **Current Genetics**, v. 55, p. 45 – 57, 2009.

PUTZKE, J., PUTZKE, M. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul, RS: EDUNISC, 1998.

QUIMIO, T. H. Why grow mushrooms *In: Oyster mushroom cultivation*. Seoul: mushworld– Heineart Inc., cap. 1, p. 4-12, 2004.

RANI, P., KALYANI, N., PRATHIBA, K. Evaluation of Lignocellulosic Wastes for Production of Edible Mushrooms. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 151, p. 151–159, 2008.

ROSADO, F. R., CARBONERO, E. R., KEMMELMEIER, C., TISCHER, C. A., GORIN, P. A. J., IACOMINI, M. A partially 3-O-methylated (1-4)-linked -D-galactan and -D-mannan from *Pleurotus ostreatus roseus* Sing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p. 261-265, 2002.

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

ROCHEFORT, D., LEECH, D., BOURBONNAIS, R. . Electron transfer mediator systems for bleaching of paper pulp. **Green Chemistry**, v. 6, p. 14 – 24, 2004.

SAITO, T., KATSUYA KATO, Y., YOKOGAWA, M, NOBUYOSHI, Y. Detoxification of Bisphenol A and Nonylphenol by Purified Extracellular Laccase from a Fungus Isolated from Soil. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 98, p. 64–66, 2004.

SANIA, G., GIARDINA, P., LUNA, M., ROSSI, M., BUONOCUORE, V. Laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnology Letters**, v. 8, p. 797–800, 1986.

SCHLOSSER, D., GREY, R., FRITSCH, W. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 47, p. 412-418, 1997.

SCHROEDER, M., PÖLLINGER-ZIERLER, B., AICHERNIG, N., SIEGMUND, B., GUEBITZ, G. M. Enzymatic Removal of Off-flavors from Apple Juice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, p. 2485–2489, 2008.

SCHWAIGER, J., MALLOW, U., FERLING, H., KNOERR, S., BRAUNBECK, Th. , KALBFUS, W., NEGELE, R.D. How estrogenic is nonylphenol? A transgenerational study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a test organism. **Aquatic Toxicology**, v. 59, p. 177–189, 2002.

SHEARER, C. A., LANGSAM, D. M., LONGCORE, J. E. Fungi in Freshwater Habitats. Chapter 23 In: **Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Fungi**. Mueller, G. M., G. F. Bills, and M. S. Foster, Eds. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. 777 p., 2004.

SHEARER, C. A., DESCALS, E., KOHLMAYER, B., KOHLMAYER, J., MARVANOVÁ, L., PADGETT, D., PORTER, D., RAJA, H. A., SCHMIT, J. P., THORTON, H. A., VOGLYMAYR, H. Fungal biodiversity in aquatic habitats. **Biodivers Conserv**, v. 16, p. 49–67, 2007.

SAHAY, R., YADAV, R. S. S., YADAV, K. D. F. Purification and Characterization of Extracellular Laccase Secreted by *Pleurotus sajor-caju* MTCC 141. **Chinese journal of biotechnology**, v. 24, 2008.

SOARES, A., GUIEYSSE, B., DELGADO, O., MATTIASSON, B. Aerobic biodegradation of nonylphenol by cold-adapted bacteria. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 731–738, 2003.

SOLOMON, E. I., SUNDARAM, U. M., MACHONKIN, T. E. Multicopper Oxidases and Oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 2563-2606, 1996.

SONGULASHVILI, G., ELISASHVILI, V., WASSER, S., NEVO, E., HADAR, Y. Laccase and manganese peroxidase activities of *Phellinus robustus* and *Ganoderma adspersum* grown on food industry wastes in submerged fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 1425–1429, 2006.

SOUZA, C., PERALTA, R. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. **Journal of Basic Microbiology**, v. 4, p. 278 – 288, 2003.

STAJIĆ, M., PERSKY, L., FRIESEM, D., HADAR, Y., WASSER, S. P., NEVO, E., VUKOJEVIĆ, J. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 65–73, 2006.

STAPLES, C.A., DORN, P.B., KLECKA, G.M., O'BLOCK, S.T., HARRIS, L.R. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. **Chemosphere**, v. 36, p. 2149–2173, 1998.

TANAKA, T., TONOSAKI, T., MASATAKA, N., NORIKO, T., NORIKO, K., TOMOWKI, F., MASAYUKI, T. Treatment of Model Soils Contaminated with Phenolic Endocrine-Disrupting Chemicals with Laccase from *Trametes* sp. in a Rotating Reactor. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 92, p. 312-316, 2001.

TANGHE, T., DHOOGHE, V., VERSTRAETE, W. Isolation of a bacterial strain able to degrade branched nonylphenol. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p. 746–751, 1999.

TAVARES, A. **Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papelreira**, 168 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Departamento de Química da Universidade de Aveiro, Portugal., 2006

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

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

UCHIDA, H., FUKUDA, T., MIYAMOTO, H., KAWABATA, T., SUZUKI, M., UWAJIMA, T. Polymerization of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. **Biochemistry Biophysics Res. Communities**, v. 287, p. 355–358, 2001

UGUZ, C., ISCAN, M., ERGUVEN, A., ISGOR, B., TOGAN, I. The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effect on the liver of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). **Environmental Res.**, v. 92, p. 262–270, 2003.

United States Patent and Trademark Office. Disponível em: <www.uspto.gov>. Acesso em 20 dez. 2009.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. Endocrine Disruptor Screening Program. Disponível em: <<http://www.epa.gov/endo/pubs/edspoverview/whatare.htm>> . Acesso em 21 dez. 2009.

UYAMA, H., KOBAYASHI, S. Enzymatic synthesis of polyphenols. **Current Organic Chemistry**, v. 7, p. 1387–1397, 2003.

VALÁŠKOVÁ, V., BALDRIAN, P. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 119–124, 2006.

VISWANATH, B., CHANDRA, M. S., KUMAR, K. P., REDDY, H., RAJASEKHAR, B. Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications with Special Reference to Bioremediation. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 2, p.1 – 13, 2008

VOLK, T. J. University of Wisconsin – La Crosse. Disponível em: <http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/oct98.html> . Acesso em 6 set. 2010.

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

WARING, R. H., HARRIS, R. M. Endocrine disrupters: A human risk?, **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 244, pp. 2–9, 2005.

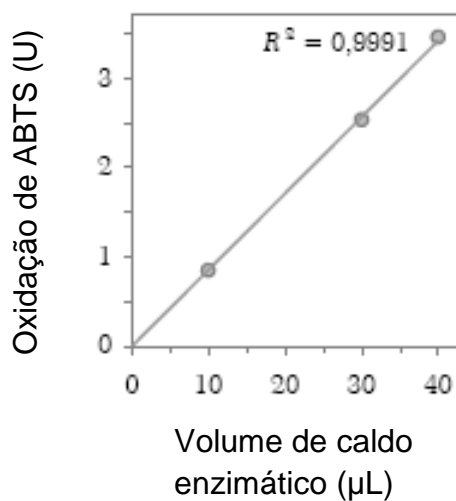
WISBECK, E. **Estudo do cultivo submerso de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 para a produção de biomassa e de exopolissacarídeos**. 2003. 175 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

ZADRAZIL, F. Cultivation of *Pleurotus*. In: S.T.CHANG; W.A.HAYES. **The biology and cultivation of edible mushrooms**. New York: Academic Press INC, p. 521-557, 1978.

ZILLE, A. **Laccase Reactions for Textile Applications**. 2005. 168 p. Tese (Doutorado em Engenharia Textil, àrea de conhecimento Química Textil) Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Minho (Portugal), 2005.

ZYTEX. Disponível em: <www.zytex.net> . Acesso em : jan. 2010.

ANEXO A – Correlação entre a oxidação de ABTS (U) e o volume do caldo enzimático.



APÊNDICE A - Fotografias originais dos géis da eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e não-desnaturantes (Native-PAGE)

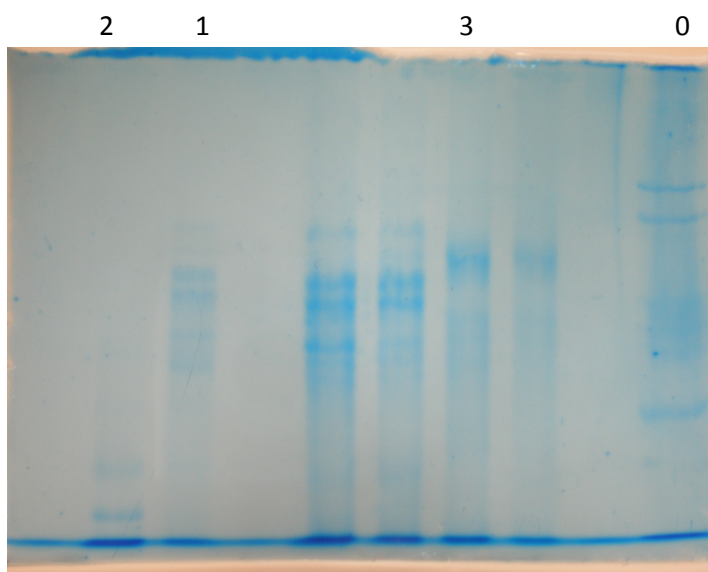


Foto original de SDS-PAGE, mostrando as bandas resultantes após a corrida com as amostras de *Phoma* sp. (coluna 3), *Pleurotus ostreatus* (coluna 1: pico 1; coluna 2: pico 2) e os padrões (coluna 0).

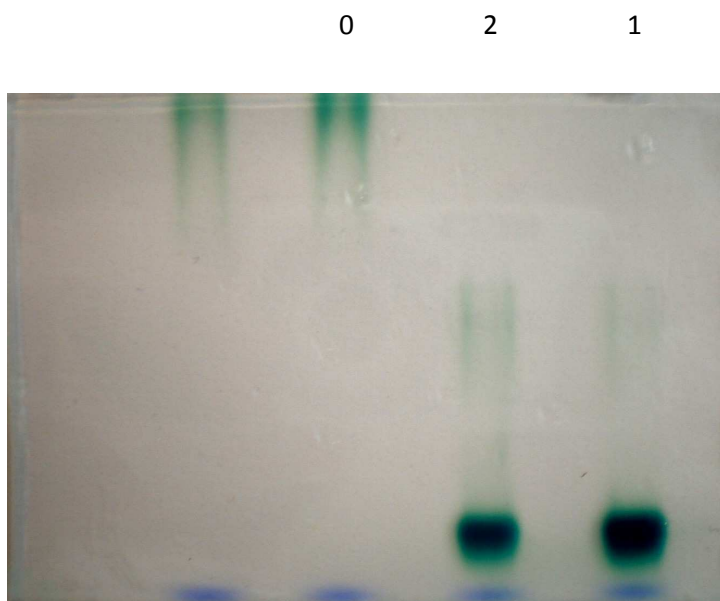
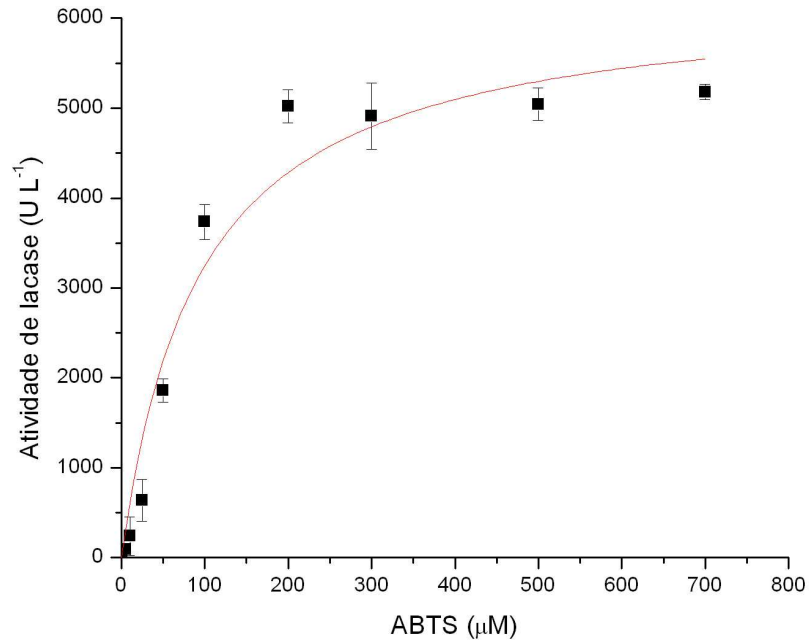
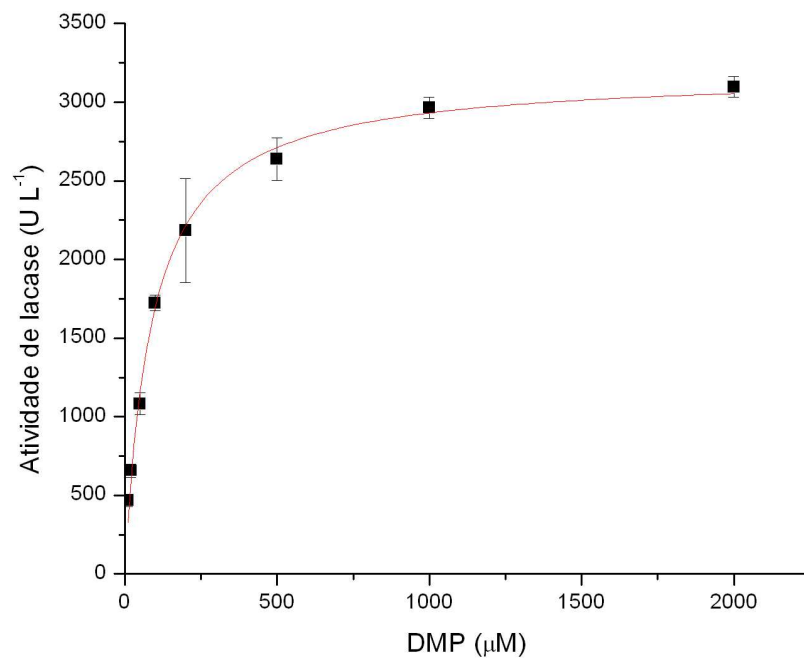


Foto original de Native-PAGE, mostrando as bandas resultantes após a corrida com as amostras de *Phoma* sp. (coluna 0) e *Pleurotus ostreatus* (coluna 2: pico 2; coluna 1: pico 1).

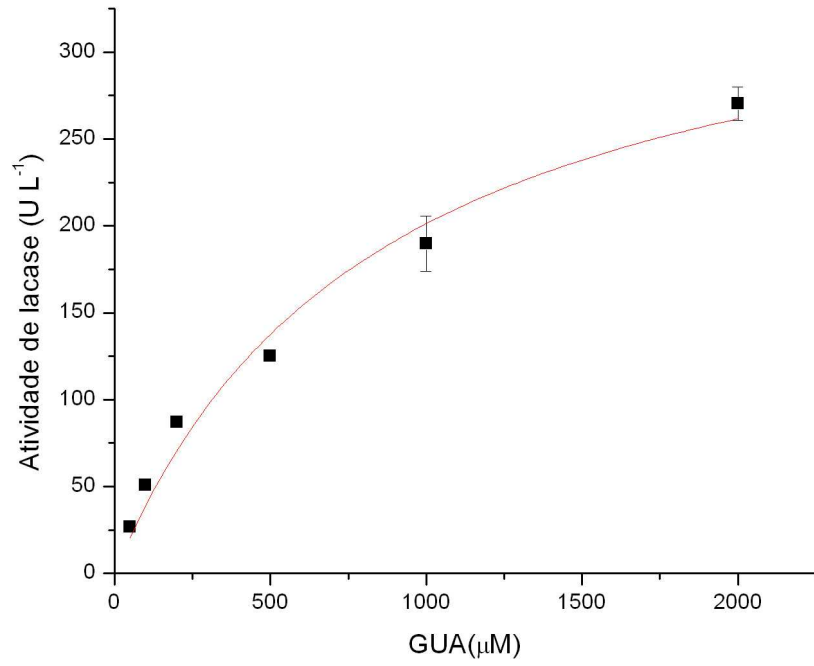
APÊNDICE B – Curvas de Michaelis-Menten e Hill da lacase proveniente de *Phoma* sp. e *Pleurotus ostreatus* em reação com os substratos ABTS, GUA, SGZ, DMP, RBBR e Abu62.



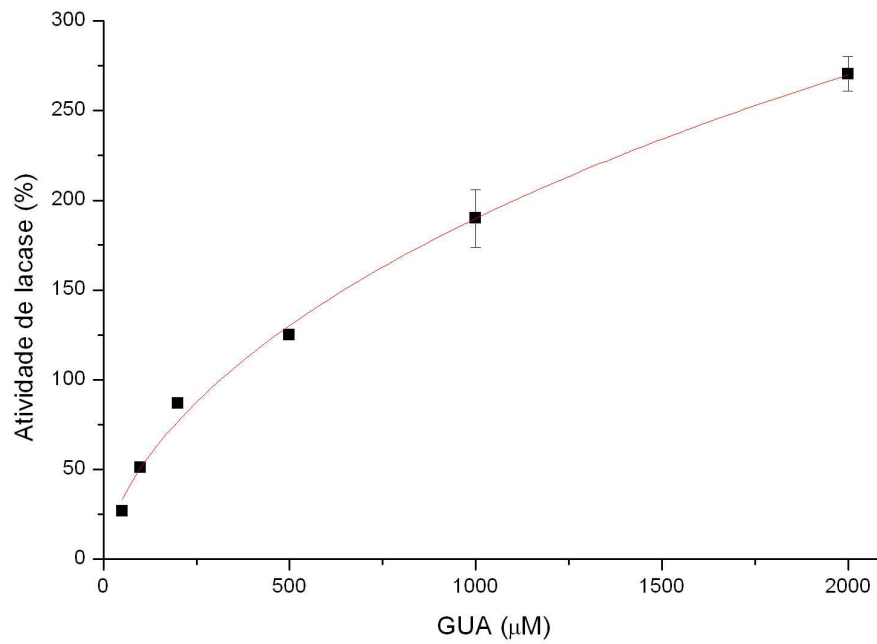
Curva de Michaelis-Menten da lacase proveniente de *Phoma* sp. em reação com ABTS.



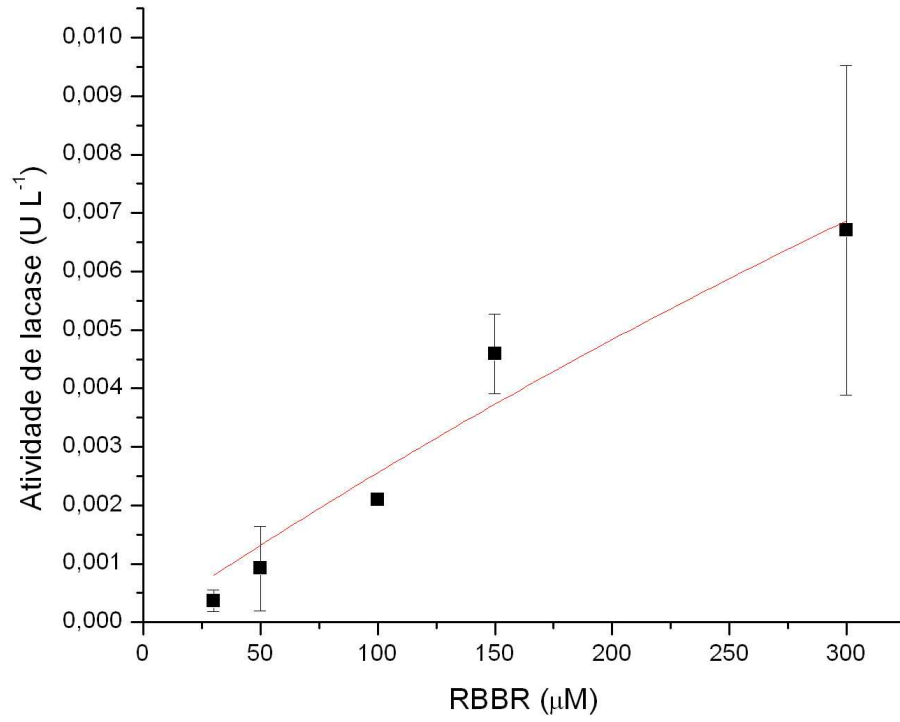
Curva de Michaelis-Menten da lacase proveniente de *Phoma* sp. em reação com DMP.



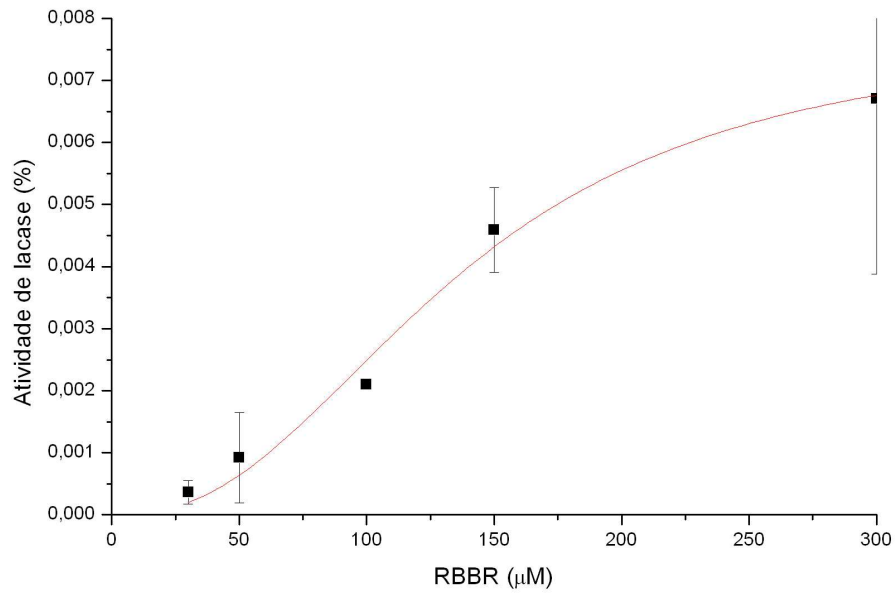
Curva de Michaelis-Menten da lacase proveniente de *Phoma* sp. em reação com GUA.



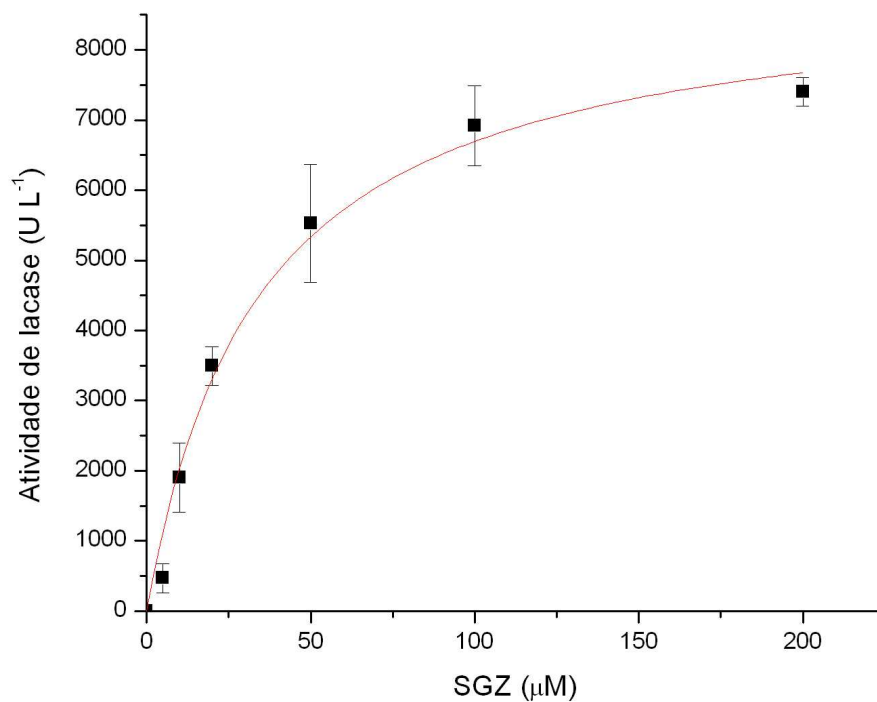
Curva de Hill da lacase proveniente de *Phoma* sp. em reação com GUA.



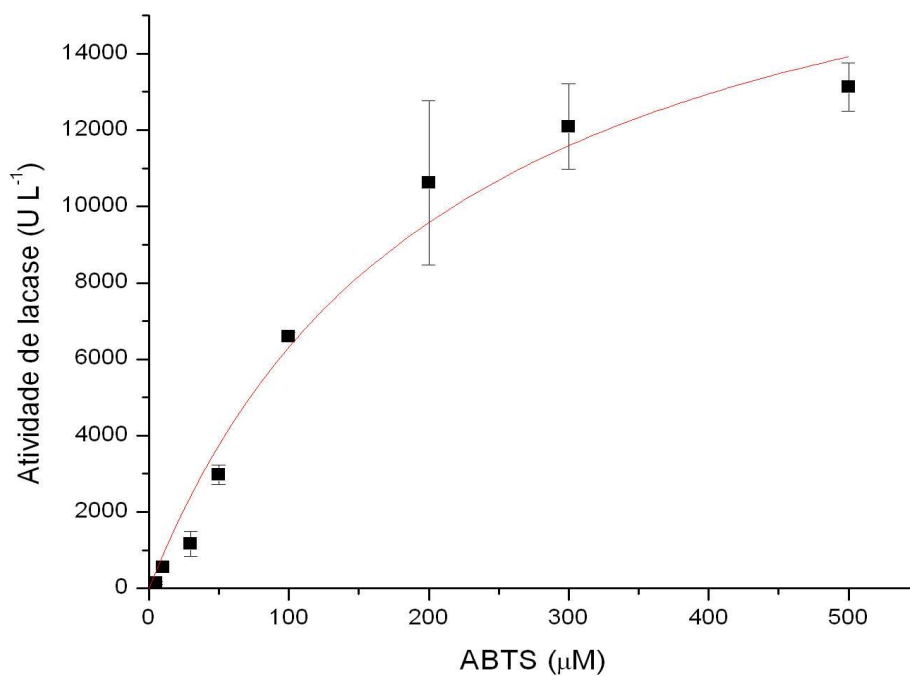
Curva de Michaelis-Menten da lacase proveniente de *Phoma* sp. em reação com RBBR.



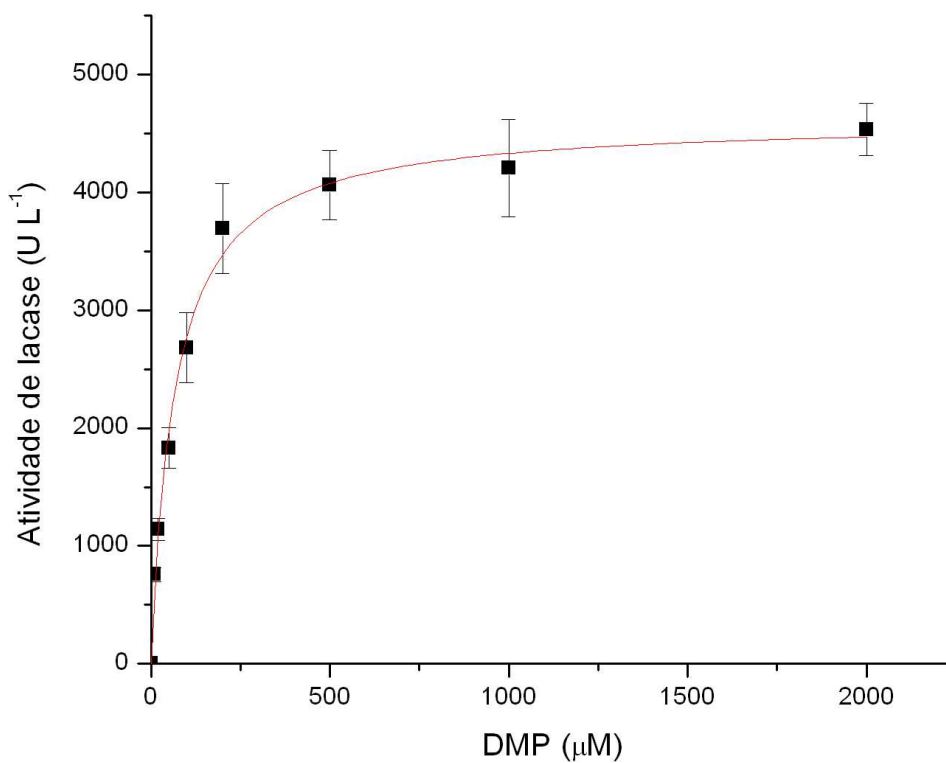
Curva de Hill da lacase proveniente de *Phoma* sp. em reação com RBBR.



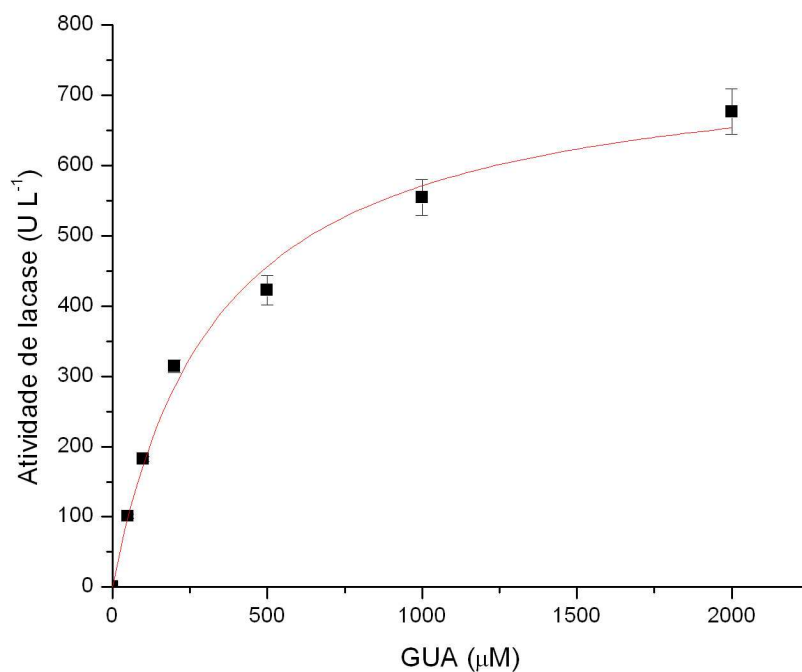
Curva de Michaelis-Menten da lacase proveniente de *Phoma* em reação com SGZ.



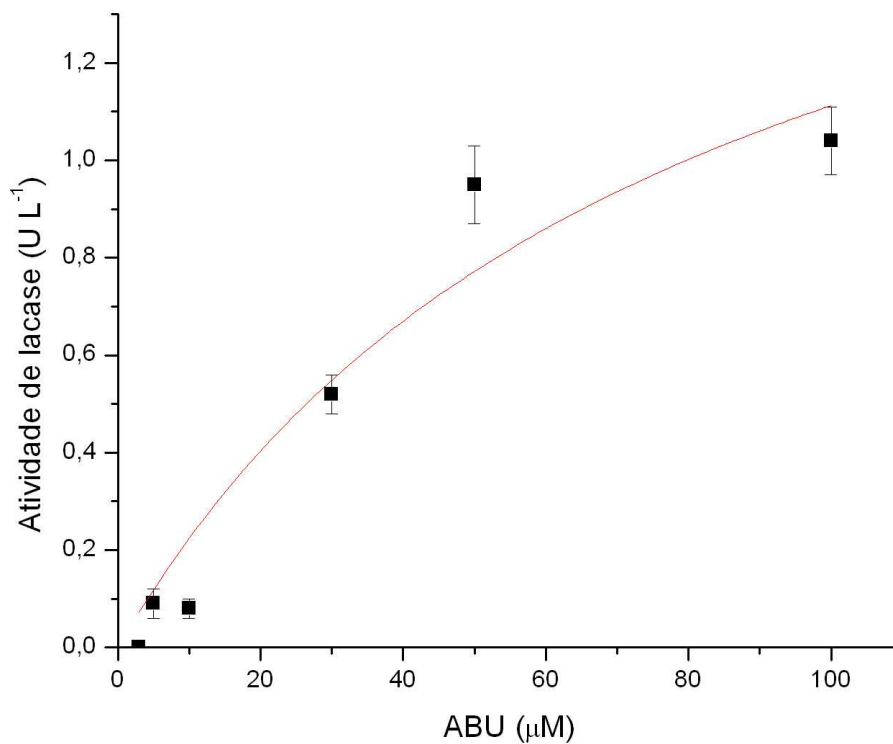
Curva de Michaelis-Menten da lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus* em reação com ABTS.



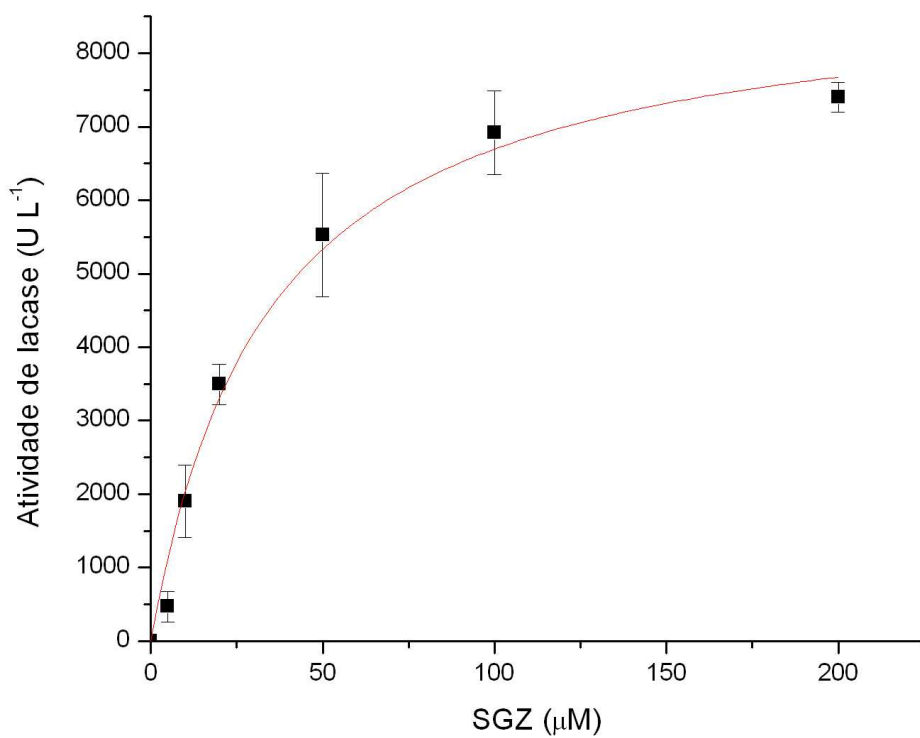
Curva de Michaelis-Menten da lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus* em reação com DMP.



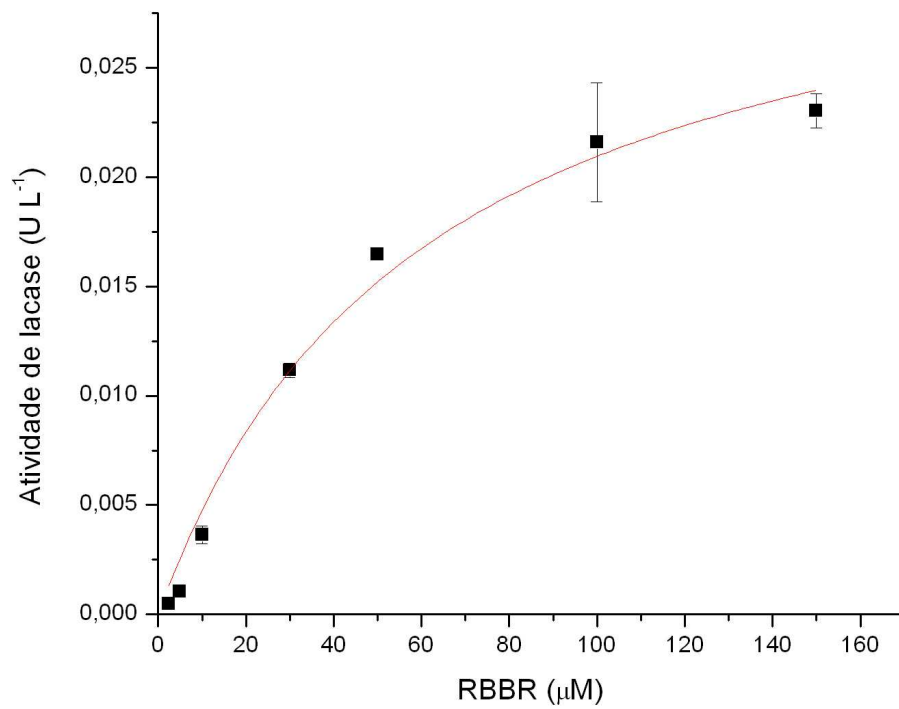
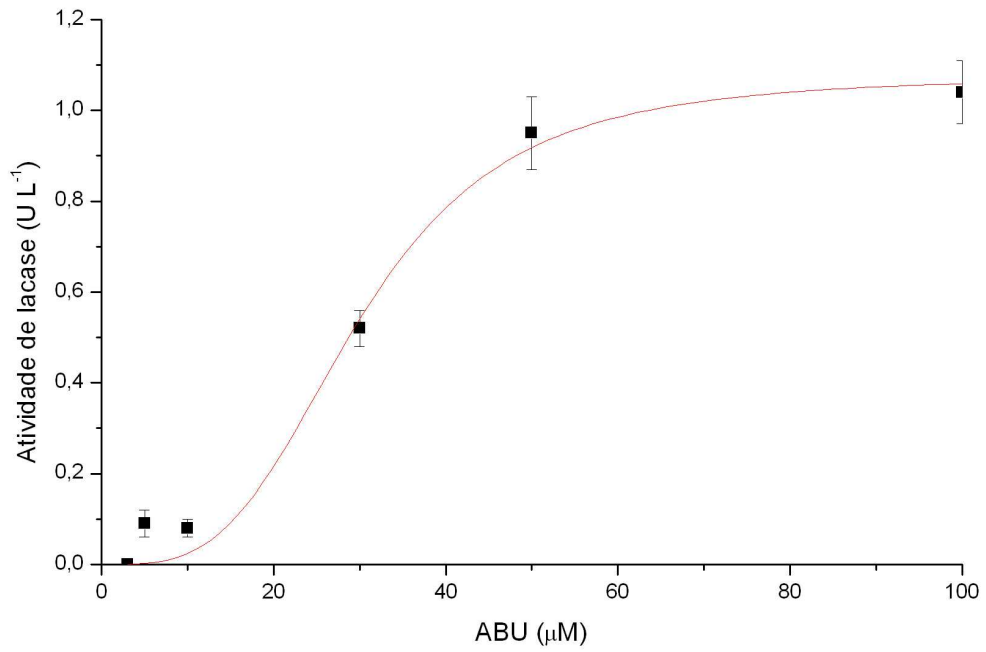
Curva de Michaelis-Menten da lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus* em reação com GUA.



Curva de Michaelis-Menten da lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus* em reação com Abu62.

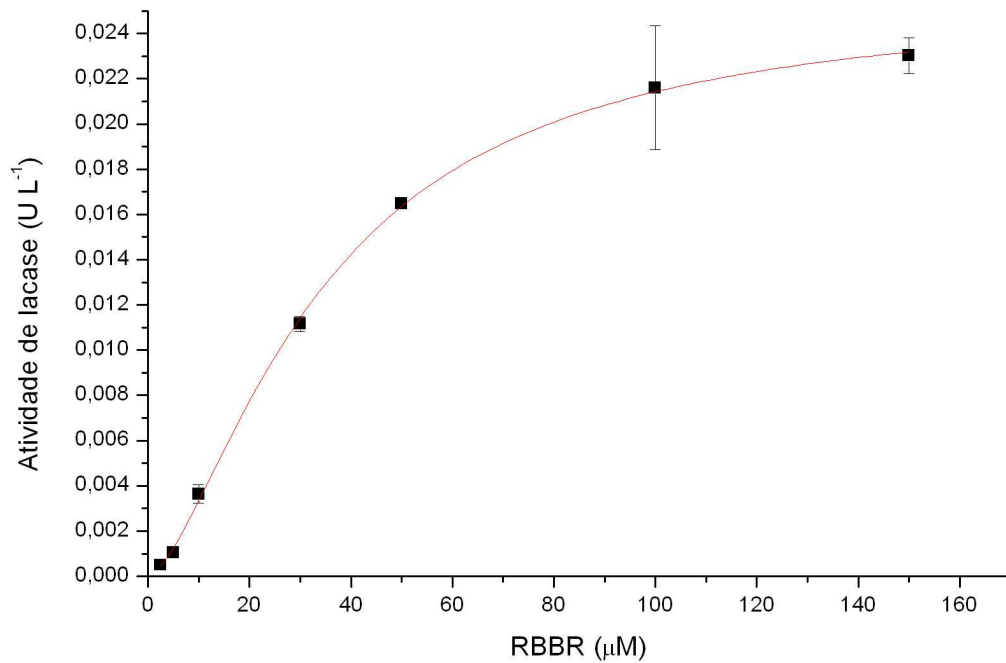


Curva de Michaelis-Menten da lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus* em reação com SGZ.



Curva de Hill
da lacase
proveniente
de *Pleurotus
ostreatus*
em reação
com Abu62.

Curva de Michaelis-Menten da lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus* em reação com RBBR.



Curva de Hill da lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus* em reação com RBBR.

