

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

**USO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS
OXIDATIVAS POR ROTA BIOTECNOLÓGICA**

MAHARA PEREIRA DE MELO

Joinville
2015

MAHARA PEREIRA DE MELO

**USO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS
OXIDATIVAS POR ROTA BIOTECNOLÓGICA**

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. Dra. Sandra Aparecida Furlan

Co-orientadora: Prof. Dra. Mariane Bonatti Chaves

Joinville

2015

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

M528u Melo, Mahara Pereira
Uso de resíduos agroindustriais para produção de enzimas oxidativas por rota biotecnológica / Mahara Pereira Melo; orientadora Dra. Sandra Aparecida Furlan, Co-orientadora Dra. Mariane Bonatti Chaves – Joinville: UNIVILLE, 2015.

95 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Processos – Universidade da Região de Joinville)

1. Enzimas oxidativas. 2. Resíduos agroindustriais. 3. Processos industriais. 4. Biotecnologia. 5. Sustentabilidade ambiental. I. Furlan, Sandra Aparecida. II. Chaves, Mariana Bonatti (co-orient.). III. Título.

CDD 660.6

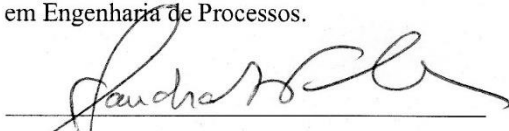
Termo de Aprovação

“Uso de Resíduos Agroindustriais para Produção de Enzimas Oxidativas por Rota Biotecnológica”

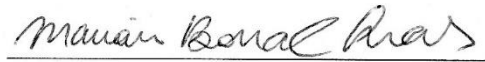
por

Mahara Pereira de Melo

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)

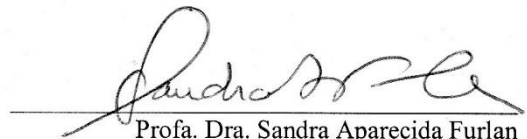


Profa. Dra. Mariane Bonatti Chaves
Coorientadora (UNIVILLE)

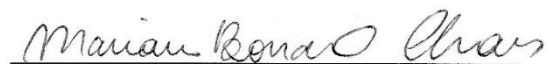


Profa. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Coordenadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Processos (UNIVILLE)

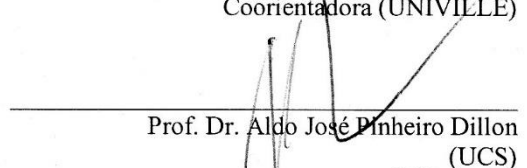
Banca Examinadora:



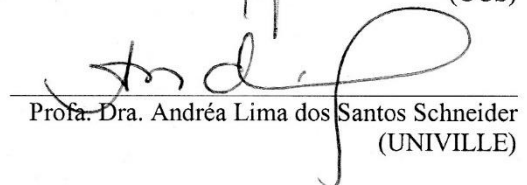
Profa. Dra. Sandra Aparecida Furlan
Orientadora (UNIVILLE)



Profa. Dra. Mariane Bonatti Chaves
Coorientadora (UNIVILLE)



Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon
(UCS)



Profa. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
(UNIVILLE)

Joinville, 27 de março de 2015.

*Dedico este trabalho à minha
Família: meu porto seguro,
fonte de luz, inspiração e exemplo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente às professoras Sandra Aparecida Furlan e Mariane Bonatti Chaves pela orientação, oportunidade, ensinamentos, apoio e incentivo deste trabalho.

À professora, colega de trabalho e acima de tudo amiga, Jamile Rosa Rampinelli, que sempre esteve ao meu lado me incentivando, ajudando, aconselhando e compartilhando comigo mais este momento especial em minha vida.

À minha estagiária e parceira de laboratório, Auriciane Arbighaus, sempre disposta e pronta para o que viesse, não importando horários nem dias da semana.

Às minhas amigas: Ana Carolina Fanton e Simone Hopfner, pela amizade, compreensão, carinho e parceria destes dois anos de luta.

Aos professores e colegas do Programa de Mestrado em Engenharia de Processos.

À UNIVILLE e a CAPES pelo apoio estrutural e financeiro.

Aos meus pais, Jorge e Lucimara por sempre acreditarem no meu potencial, me incentivando e apoiando acima de tudo, emocionalmente, durante todos esses anos. Amo vocês.

À minha irmã, Tayná por me aturar nos meus momentos de loucura sempre me apoiando e me descontraindo. Amo você pretinha.

A minha família e aos meus amigos que de alguma forma contribuíram para a concretização desta jornada

A Deus, que sem Ele nada seria possível!

Obrigada!

*Sem sonhos a vida não tem brilho.
Sem metas, os sonhos não tem alicerces.
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.
Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades
e corra riscos para executar seus sonhos.
Melhor é errar tentando que errar por se omitir.*

Augusto Cury

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos estudar a produção de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase, provenientes do cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju*, sua caracterização e utilização na capacidade de degradação do composto interferente endócrino Bisfenol-A. Inicialmente foram realizados ensaios em Erlenmeyer a fim de determinar o melhor meio de cultivo para produção das enzimas, sendo os meios testados Solução Manachini, Solução Manachini Modificada e OXI. O meio de cultivo que propiciou os maiores valores de produção enzimática foi o meio OXI, com atividade de lacase de 2.416,5 U L⁻¹ e de manganês peroxidase de 7,62 U L⁻¹, meio o qual foi o escolhido para os ensaios em biorreator, em duas condições de cultivo (pH livre e pH controlado em 5,5). A enzima lacase que apresentou os maiores valores de atividade foi a escolhida para os ensaios de caracterização (pH e temperatura ótimos, estabilidade com pH, temperatura e tempo de estocagem, determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$) e de capacidade de degradação do Bisfenol-A. Os experimentos em frascos agitados, utilizando-se meio de cultivo OXI, propiciaram atividade de lacase e manganês peroxidase 22 e 4 vezes, respectivamente, superiores aos obtidos utilizando-se os meios Solução Manachini e Manachini Modificada. A enzima lignina peroxidase, independentemente do meio de cultivo utilizado, não apresentou atividade. Os experimentos em biorreator apresentaram atividades de lacase (210,3 e 205,8 U L⁻¹ para os experimentos conduzidos em pH livre e controlado em 5,5, respectivamente) inferiores as obtidas em frascos agitados. O pH ótimo encontrado para a lacase foi de 3,0 e a temperatura ótima de 50 °C. Em relação aos testes de estabilidade com o pH, observou-se maior estabilidade da enzima na faixa de pH entre 5 e 8. Em relação aos testes de estabilidade com a temperatura, observou-se queda brusca da estabilidade entre 2 e 4 horas de incubação, observando-se perda de aproximadamente 60% da atividade, nas temperaturas de 20, 30 e 40°C e de aproximadamente 90% a 50°C. Com relação ao tempo de estocagem, a enzima apresentou maior estabilidade quando estocada em freezer, se comparado à estocagem em geladeira e à temperatura ambiente. Em freezer, após 90 dias, observou-se atividade enzimática em torno de 60%. Os valores de K_m e $V_{máx}$ encontrados neste trabalho para a enzima produzida foram iguais a 3,78 mM e 1.111,11 $\mu\text{M L}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectivamente, utilizando ABTS como substrato. O extrato enzimático bruto propiciou a degradação de aproximadamente 100% do Bisfenol-A, na concentração de 500 mg L⁻¹, em 48 horas de incubação, independentemente da relação extrato enzimático bruto:Bisfenol-A.

ABSTRACT

The present work aimed to study the production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase, obtained from the submerged cultivation of *Pleurotus sajor-caju*, its characterization and utilization in the degradation capacity of endocrine interfering compound Bisphenol-A. Initially, trials in Erlenmeyer were conducted, in order to determine the best environment for the enzymes production, being tested Manachini Solution, Modified Manachini Solution and OXI. The cultivation media that favored the highest levels of enzymatic production was OXI, with laccase activity of 2416.5 U L⁻¹ and manganese peroxidase of 7.62 U L⁻¹. This was the media chosen for bioreactor experiments in two cultivation conditions (pH free and pH controlled at 5.5). The enzyme laccase that presented the higher activity levels was selected for the characterization trials (great pH and temperature, stability with pH, temperature and storage time, determination of kinetics parameters K_m and V_{max}) and the degradation capacity of Bisphenol-A. The experiments in shaken bottles, using OXI environment, provided laccase and manganese peroxidase activities 22 and 4 times, respectively, superior to the ones obtained using Machini and Modified Machini Solutions. The lignin peroxidase enzyme, regardless of the environment, did not present activity. The experiments in bioreactor presented laccase activities (210.3 and 205.8 U L⁻¹ for the experiments conducted in pH free and controlled pH in 5.5, respectively) lower than the ones obtained in shaken bottles (2416.5 U L⁻¹). The pH control of the environment did not influence the production of laccase by *P. sajor-caju*. The great pH found for laccase was 3.0 and the great temperature of 50 °C. Regarding the stability tests with pH, the enzyme presented higher stability in the pH range between 5 and 8. Regarding the stability tests with the temperature, it was observed a sharp decrease of stability between 2 and 4 hours of incubation, being observed about 60% of activity loss, in the temperatures of 20, 30 and 40 °C, and about 90% in 50 °C. Regarding storage time, the enzyme presented higher stability when stored in freezer, if compared to the storage in refrigerator and at room temperature. In freezer, after 90 days, the enzyme activity was around 60%. The K_m and V_{max} values found for the enzyme produced were 3.78 mM and 1111,11 $\mu\text{M L}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectively, using ABTS as substrate. The gross enzyme extract provided degradation of approximately 100% of Bisphenol-A, in the concentration of 500 mg L⁻¹, within 48 hours of incubation, regardless of the gross enzyme extract relation: Bisphenol-A.

ÍNDICE

RESUMO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OBJETIVOS.....	16
Objetivo geral.....	16
Objetivos específicos	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Fungos	19
2.1.1 Gênero Pleurotus	19
2.1.2 Cultivo de Pleurotus	21
2.2 Resíduos lignocelulósicos	22
2.3 Enzimas Oxidativas.....	26
2.3.1 Lignina peroxidases (LiPs)	27
2.3.2 Manganês peroxidases (MnPs)	28
2.3.3 Lacases (Lacs).....	28
2.4 Produção de LiPs, MnPs e Lacs	29
2.5 Aplicações de LiPs, MnPs e Lacs	32
2.5.1 Degradação Biológica de Compostos Interferentes Endócrinos	34
2.5.1.1 Bisfenol-A (BPA)	36
3. METODOLOGIA	40
3.1 Microrganismo e Manutenção	40
3.2 Meio de Cultivo	40
3.3 Estudo da Influência do Meio de Cultivo sobre a Produção de Enzimas - Experimentos em Frascos Agitados	41
3.4 Estudo da Influência do pH Controlado em 5,5 e sua Evolução Espontânea sobre a Produção de Enzimas - Experimentos em Biorreator	41
3.5 Determinação das Atividades Enzimáticas.....	42
3.6 Metodologias Utilizadas nos Cálculos	43
3.6.1 Variação da atividade enzimática	43
3.6.2 Fator de conversão de glicose em atividade enzimática.....	44

3.6.3 Produtividade enzimática global	44
3.6.4 Produtividade enzimática máxima	44
3.7 Construção das curvas cinéticas e análises estatísticas	45
3.8 Determinação do pH ótimo e Temperatura ótima	45
3.9 Estabilidade das Enzimas com o pH, a Temperatura e o Tempo de Estocagem	45
3.10 Determinação da Constante de Michaelis-Menten (K_m) e da Velocidade Máxima de Reação ($V_{máx}$)	46
3.11 Degradação do composto interferente endócrino Bisfenol-A	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Estudo da Influência do Meio de Cultivo sobre a Produção de Enzimas - Experimentos em Frascos Agitados	48
4.2 Estudo da Influência do pH controlado em 5,5 e sua evolução espontânea sobre a Produção de Enzimas - Experimentos em Biorreator	52
4.2.1. pH livre	52
4.2.2 <i>pH controlado em 5,5</i>	53
4.3 Determinação do pH ótimo e Temperatura ótima	58
4.3.1 Determinação do pH ótimo	58
4.3.2 Determinação da temperatura ótima	60
4.4 Estabilidade das Enzimas com pH, Temperatura e Tempo de Estocagem	61
4.4.1 Estabilidade com o pH	61
4.4.2 Estabilidade com a temperatura	63
4.4.3 Tempo de estocagem	65
4.5 Determinação da Constante de Michaelis-Menten (K_m) e da Velocidade Máxima de Reação ($V_{máx}$)	66
4.6 Degradação do composto interferente endócrino Bisfenol-A	67
CONCLUSÕES	70
PERSPECTIVAS	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Concentração da produção de banana por microrregião geográfica de Santa Catarina – Safra de 2012 (EPAGRI, 2013).....	24
Figura 2. Estrutura molecular do Bisfenol-A (HARO, 2013).	37
Figura 3. Composição dos meios de cultivo para produção das enzimas oxidativas.	41
Figura 4. Valores médios de atividade de lacase (Lac) obtidos no cultivo de <i>P. sajor-caju</i> nos meios de cultivo OXI, Solução Manachini e Solução Manachini Modificada.	48
Figura 5. Valores médios de atividade de manganês peroxidase (MnP) obtidos no cultivo de <i>P. sajor-caju</i> nos meios de cultivo OXI, Solução Manachini e Solução Manachini Modificada.	50
Figura 6. Variações da concentração de glicose (–, ● e ○), atividade de lacase (⋯, ▲ e Δ) e pH (·-·, ◆ e ◇) em função do tempo (horas) de cultivo de <i>P. sajor-caju</i> , em meio de cultivo OXI, sem controle do pH. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas.	53
Figura 7. Variações da concentração de glicose (–, ● e ○) e atividade de lacase (⋯, ▲ e Δ) em função do tempo (horas) de cultivo de <i>P. sajor-caju</i> , em meio de cultivo OXI, com controle do pH em 5,5. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas.....	54
Figura 8. Atividade relativa de lacase proveniente de <i>P. sajor-caju</i> em relação ao pH. As barras representam o erro padrão das médias das replicatas.....	58
Figura 9. Atividade relativa de lacase proveniente de <i>P. sajor-caju</i> em relação à temperatura. As barras representam o erro padrão das médias.	60
Figura 10. Cinética da estabilidade da enzima lacase, proveniente do cultivo de <i>P. sajor-caju</i> , em meio de cultivo OXI, em diferentes valores de pH. As barras representam o erro padrão das médias.....	62
Figura 11. Perfil de estabilidade térmica da lacase, proveniente do cultivo de <i>P. sajor-caju</i> em meio de cultivo OXI, com o tempo. As barras representam o erro padrão das médias.	63
Figura 12. Cinética da estabilidade da enzima lacase, proveniente do cultivo de <i>P. sajor-caju</i> , em meio de cultivo OXI, em diferentes condições de estocagem:	

temperatura ambiente, geladeira e freezer. As barras representam o erro padrão das médias.65

Figura 13. Reta da equação de linearização de Lineweaver-Burk para obtenção de K_m e $V_{máx}$ da lacase obtida do cultivo de *P. sajor-caju*, em meio de cultivo OXI.66

Figura 14. Percentual de degradação de bisfenol-A pelo caldo bruto contendo lacase proveniente de *P. sajor-caju*.....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização físico-química água de imersão da palha de bananeira...25	25
Tabela 2. Composição físico-química da farinha ou pó de casca de banana (variedades prata, pacovan e maçã).....25	25
Tabela 3. Propriedades físico-químicas do BPA.....37	37
Tabela 4. Parâmetros obtidos do cultivo de <i>P. sajor-caju</i> em meio de cultivo OXI, em biorreator, em pH livre e em pH controlado em 5,5.55	55
Tabela 5. Valores de pH e temperatura ótimos das soluções de lacase provenientes de diferentes espécies de <i>Pleurotus</i>58	58
Tabela 6. Parâmetros cinéticos da enzima lacase proveniente de diferentes espécies de <i>Pleurotus</i>67	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS – Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotriazolína-6-sulfônico)

BPA – Bisfenol-A

CCB – Centro de Cultivo de Basidiomicetos

dP – Variação entre as atividades de lacase nos tempos t e no início do cultivo

dP_m – Variação entre as atividades de lacase nos tempos t_p e no início do cultivo

K_{La} - Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h⁻¹)

K_m – Constante cinética de Michaelis-Menten

Lac – Lacase

LiP – Lignina Peroxidase

MnP – Manganês peroxidase

P₀ - Atividade de lacase no início do cultivo

pH – Potencial hidrogeniônico

P_{máx} – Atividade de lacase máxima obtida no cultivo

PP_{máx} – Atividade de lacase no tempo em que a produtividade em enzima é máxima (t_p)

Q_p – Produtividade global em lacase (U L⁻¹)

Q_{pm} – Produtividade máxima em lacase (U L⁻¹)

t – Tempo no qual observa-se maior atividade de lacase

TDA – Meio trigo-dextrose-ágar

t_p - Tempo no qual observa-se maior produtividade em lacase

Y_{P/S} – Fator de conversão global de substrato (glicose) em produto (lacase) (U L⁻¹ g⁻¹)

OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar a produção das enzimas oxidativas lacases (Lacs), manganês peroxidases (MnPs) e lignina peroxidases (LiPs) por *Pleurotus sajor-caju* em cultivo submerso utilizando os resíduos agroindustriais pó de cascas de banana e água de imersão de palha de bananeira na composição do meio de cultivo, caracterização de parâmetros enzimáticos e aplicação da enzima na degradação do composto interferente endócrino Bisfenol-A.

Objetivos específicos

1. Estudar a influência do meio de cultivo na síntese das enzimas oxidativas LiPs, MnPs e Lacs por *Pleurotus sajor-caju*, em frascos agitados, utilizando água de imersão de palha de bananeira e pó de cascas de banana na composição do meio de cultivo;
2. Estudar, em biorreator de bancada, a influência do pH controlado em 5,5 e sua evolução espontânea, na síntese das enzimas;
3. Determinar a temperatura ótima e o pH ótimo para atuação das enzimas produzidas;
4. Determinar a estabilidade das enzimas produzidas em função do pH, da temperatura e do tempo de estocagem;
5. Determinar a constante de Michaelis & Menten e a velocidade máxima de reação das enzimas produzidas;
6. Estudar a capacidade das enzimas produzidas na degradação do composto interferente endócrino Bisfenol-A.

1. INTRODUÇÃO

A crescente exigência global por uma indústria sustentável tem impulsionado as pesquisas em biotecnologia e bioprocessos. A necessidade premente de produção industrial que provoque pouco ou nenhum dano ambiental e ainda mantenha suas características de lucratividade são demandas atuais e que prometem impulsionar o mercado e a sociedade de modo geral e particularmente o mercado mundial de enzimas (DO VALLE, 2012).

Nos últimos anos, uma série de processos industriais, ambientais e em química fina vem sendo consideravelmente aprimorados graças ao desenvolvimento da tecnologia enzimática, permitindo a utilização de biocatalizadores em conversão química com elevada eficiência. Como tecnologia voltada para a aplicação ambiental, enzimas livres ou imobilizadas, associadas ou não ao microrganismo produtor, podem ser empregadas com sucesso, *in situ* ou em biorreatores, na recuperação de áreas contaminadas e no tratamento de efluentes de alta complexidade ou contendo compostos xenóticos, minimizando a geração de subprodutos e resíduos (HENN, 2009).

As enzimas são amplamente utilizadas em diversos segmentos industriais como nas indústrias de detergente e cuidados pessoais, têxtil, papel e celulose, amido e biocombustível, alimentos e laticínios, panificação, bebidas, ração animal, biopolímeros, síntese orgânica e couro (KIRK *et al.*, 2002; NOVOZYMES, 2008).

Reduzir os custos de produção destas enzimas é uma forma de ampliar ainda mais o uso de enzimas em processos industriais, principalmente em setores onde o custo desses processos é um fator limitante de produção (PANDEY *et al.*, 2000).

Apesar da peculiaridade de alguns setores, a maior parte das enzimas empregadas em processos industriais constitui-se de enzimas extracelulares microbianas obtidas em processos de fermentação. Estas enzimas são produzidas por uma ampla variedade de microrganismos (leveduras, bactérias e fungos filamentosos) (BINOD, 2008).

Os fungos filamentosos têm a capacidade de crescer em uma ampla gama de substratos, desde os mais simples até os mais complexos como troncos de madeira e resíduos vegetais. Esta capacidade está relacionada à sua habilidade em produzir e excretar grande variedade de enzimas, e também à sua forma de crescimento capaz

de penetrar no substrato proporcionando sua degradação (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

A região nordeste de Santa Catarina é grande produtora de banana e, conseqüentemente, grande geradora de resíduos lignocelulósicos provenientes desta cultura, os quais podem ser reaproveitados em rotas biotecnológicas. Dentre estas, sua utilização na forma de substrato para o cultivo de fungos do gênero *Pleurotus* para a produção de enzimas oxidativas como lacases (Lacs), manganês peroxidases (MnPs) e lignina peroxidases (LiPs) tem se mostrado uma alternativa interessante com vistas à uma futura redução dos custos de produção destes biocatalisadores.

Considerando os aspectos ambientais, a vasta aplicação comercial destas enzimas e sua produção biotecnológica por fungos da classe dos basideomicetos, o objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade do fungo *Pleurotus sajor-caju* em produzir estas enzimas utilizando resíduos agroindustriais (cascas de banana e água de imersão de palha de bananeira) na formulação dos meios de cultivo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fungos

Os fungos são pertencentes ao Reino Fungi, o qual se caracteriza por organismos heterótrofos que obtém seu alimento da matéria orgânica viva ou em decomposição, através de suas células por meio da absorção (PLAZA, 2004). São organismos eucarióticos quimioorganotróficos apresentando dois tipos morfológicos principais, os fungos filamentosos, capazes de formar hifas, e as leveduras, fungos normalmente unicelulares (LOGUERCIO-LEITE & ESPOSITO, 2004).

Os fungos são importantes para a humanidade por diversas razões. Eles e as bactérias formam o grupo de degradadores mais eficazes de todos os ecossistemas, assimilando elementos e transformando-os em substâncias mais simples, permitindo a reciclagem dos nutrientes na natureza (PLAZA, 2004).

Segundo Loguercio-Leite & Esposito (2004), os fungos constituem um grupo muito diversificado no que diz respeito à forma, à estrutura e à capacidade metabólica. A maior parte deles desenvolve-se de matéria orgânica morta e seu crescimento é afetado por fatores físicos e químicos como temperatura, umidade, concentração de oxigênio, pH, micronutrientes, fontes de carbono e nitrogênio, entre outros.

Caracteriza-se a existência de três classes de fungos filamentosos: basidiomicetos, ficomicetos e ascomicetos. Os fungos basidiomicetos possuem habilidade de se desenvolver em qualquer substância orgânica, fazendo uso de substratos variados. Fontes de carbono como lignina, polissacarídeos, glicose, frutose, óleos e ácidos orgânicos são importantes provedores de energia para atividade metabólica destes fungos (MODA, 2003; PERALTA *et al.*, 2004).

De acordo com Karp *et al.* (2012), os basidiomicetos utilizam celulose e hemicelulose como substrato para seu crescimento, enquanto que a degradação da lignina ocorre durante o metabolismo secundário, quando há escassez de nutrientes ou situações de estresse. O ataque do fungo à lignina é um processo aeróbio oxidativo e acontece em grupos fenóis, alifáticos e metóxi tendo como resultado a despolimerização da lignina.

2.1.1 Gênero *Pleurotus*

O grupo dos fungos do gênero *Pleurotus* é um grupo cosmopolita, representado por cogumelos comestíveis de grande valor nutricional, que apresentam propriedades terapêuticas e medicinais, além de várias aplicações ambientais e biotecnológicas (COHEN *et al.*, 2002; STAJIC *et al.*, 2006).

Os corpos frutíferos dos fungos do gênero *Pleurotus* apresentam uma grande variedade de cores como branco, marrom, azul claro e rosa, que variam de acordo com a espécie, assim como com a incidência de luz durante a frutificação, necessidades nutricionais e tempo de incubação. Neste gênero são encontradas muitas espécies comestíveis como *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju*, *P. oeus*, dentre outros (EIRA & MINHONI, 1997).

O cultivo de *Pleurotus* spp. é economicamente importante para a indústria alimentícia. Nutricionalmente possui um sabor único e propriedades aromáticas, sendo considerado uma fonte rica de fibras e proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais (COHEN *et al.*, 2002). Segundo MATTILA *et al.* (2002), são alimentos saudáveis possuindo baixo teor de calorias e gorduras, ricos em proteínas, vitaminas e minerais.

Recentemente, várias substâncias originárias de cogumelos do gênero *Pleurotus*, especialmente polissacarídeos, foram isoladas e identificadas por apresentarem atividades e propriedades fisiológicas importantes como capacidade de modular o sistema imunológico (REFAIE *et al.*, 2009), de diminuir a pressão arterial (TAM *et al.*, 1986), diminuir o colesterol sanguíneo, possuindo também ação antitumoral (ZHANG *et al.*, 2004; WOLFF *et al.*, 2008; DALONSO *et al.*, 2010; DE BARBA *et al.*, 2011) e antimicrobiana (WISBECK *et al.*, 2005; WOLFF *et al.*, 2008).

Na área ambiental estes fungos destacam-se pela sua capacidade na biorremediação de solos contaminados (PURNOMO *et al.*, 2010), biodegradação de compostos poluentes (KAMIDA & DURRANT, 2005; FURLAN *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009; LIBARDI JÚNIOR *et al.*, 2012), biodescoloração de efluentes (MUNARI *et al.*, 2008; SARNTHINA & KHAMMUANG, 2008); descoloração de efluentes sintéticos (DORALICE *et al.*, 2001, JAROZ *et al.*, 2002; HAVTANI & MÉES, 2002) e na bioconversão de resíduos agroindustriais (SHASHIREKHA *et al.*, 2002; HOLTEZ *et al.*, 2009, AGUIAR *et al.*, 2010, RAMPINELLI *et al.*, 2010, CESA *et al.*, 2013, SCHULZ *et al.*, 2013).

Cogumelos do gênero *Pleurotus*, comumente conhecidos como cogumelos ostra, são cultivados em áreas tropicais e subtropicais sendo também facilmente

cultivados artificialmente (AKINDAHUNSI & OYETAYO, 2006).

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* apresentam grande potencial de cultivo no Brasil em razão de sua maior rusticidade e facilidade de cultivo em comparação com outros gêneros como *Agaricus*. Estes fungos são classificados como fungos de podridão branca devido à aparência esbranquiçada do substrato após a remoção da lignina, celulose e hemicelulose no processo de degradação e desenvolvimento (SCHWARZE *et al.*, 2000).

Até a década de 70 a obtenção destes fungos era baseada na coleta direta da natureza. A partir de então, começou-se a produção em escala industrial. No final da década de 50, iniciaram-se os primeiros estudos utilizando-se serragem como substrato para o cultivo e, no início da década de 60, começou-se a utilizar diversos tipos de palhas secas, como capim, palha de arroz e palha de trigo (BONONI *et al.*, 1995).

Os fungos de podridão branca têm demonstrado ser bons produtores de xilanase, carboximetil celulases (CMCase), lacases (Lac), lignina peroxidases (LiP), manganês peroxidases (MnP), aril álcool oxidase, dentre outras enzimas. A secreção destas enzimas ocorre durante o crescimento apical das hifas, sendo liberadas pela parede celular recém-sintetizada para degradação do substrato (MOREIRA NETO, 2006).

2.1.2 Cultivo de *Pleurotus*

O crescimento de fungos filamentosos se dá pelo alongamento das células e ramificação das hifas, que crescem sobre o meio que será colonizado, e ocorre nas suas extremidades, as quais se expandem continuamente devido à chegada do novo material celular, que é transportado às pontas por correntes citoplasmáticas, sendo sintetizado nas zonas subapicais do micélio com capacidade de crescimento. À medida que as hifas crescem em comprimento, contribuem para a biossíntese por adsorção e metabolização dos nutrientes do meio (RASERA, 2006). Alguns fatores ambientais podem afetar o crescimento dos fungos, tais como temperatura, grau de umidade, pH e aeração (FERRAZ, 2004).

Cultivos em estado sólido são caracterizados pelo desenvolvimento de microrganismos em meio úmido, com baixo teor de água livre, contendo materiais insolúveis, que exerçam a função de suporte e fonte de nutrientes (COUTO &

SANROMÁM, 2006). Para o cultivo sólido de cogumelos, podem ser aproveitados resíduos agroindustriais como substratos a base de cana-de-açúcar, palha de trigo, palha de arroz, gramíneas, serragens, polpa e casca de frutas, folhas de bananeira etc. (DONINI *et al.*, 2005).

O cultivo de fungos do gênero *Pleurotus* pode ser realizado tanto em meio sólido quanto em meio líquido já que as enzimas são produzidas e excretadas nas duas formas de cultivo. Entretanto, o cultivo em meio líquido apresenta vantagens em relação ao cultivo em meio sólido, destacando-se menor área para o cultivo, maior controle de parâmetros como pH, temperatura etc. e facilidade de extração dos produtos excretados para o meio de cultivo. A composição do meio de cultivo, tem sido objeto de estudo de vários autores, com o objetivo de maximizar a produção de enzimas e diminuir custos de produção (REDDY *et al.*, 2003; RAMPINELLI *et al.* 2007; ELISASHVILI *et al.* 2008; Gern *et al.* 2008; GREGORI *et al.*, 2008; GARCIA *et al.* 2009; ABO-STATE *et al.* 2011; LIBARDI JÚNIOR *et al.* 2012; CESA *et al.* 2013).

2.2 Resíduos lignocelulósicos

A geração de resíduos e subprodutos é inerente a qualquer setor produtivo. O aumento da conscientização ecológica, iniciado no final do Século XX, deixou claro que o grande desafio da humanidade para as próximas décadas é equilibrar a produção de bens e serviços, crescimento econômico, igualdade social e sustentabilidade ambiental (PINTO *et al.*, 2005).

Praticamente qualquer substrato orgânico pode ser utilizado para o cultivo de *Pleurotus*, sendo que geralmente são utilizados resíduos agroindustriais com elevada relação carbono/nitrogênio, contudo cada tipo de substrato gera Eficiência Biológica específica para o cultivo (EIRA, 2004).

Os resíduos agroindustriais são gerados após o processamento e beneficiamento de algumas culturas, sendo exemplos a casca de arroz, a casca de banana e o caroço de algodão. Já os resíduos agrícolas são resíduos vegetais, que são produzidos no próprio campo no momento da colheita, sendo exemplos os caules, as palhas e as folhas. Tanto os resíduos agrícolas quanto os agroindustriais apresentam em suas composições diferentes constituintes que geram diversas oportunidades de agregação de valor (ABIB, 2011; MOERS *et al.*, 2011; ROSA *et al.*, 2011).

Várias estratégias têm sido desenvolvidas para utilizar parte da vasta quantidade de resíduos lignocelulósicos gerados pelas atividades agrícolas e pelas indústrias de processamento de alimentos. Diversos bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando estes resíduos como substratos na produção de moléculas com alto valor agregado, como proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos (ALEXANDRINO *et al.*, 2007). Segundo os autores, este uso além de economicamente viável, pode ajudar a resolver problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza. A banana destaca-se na primeira posição no ranking mundial de comercialização de frutas, com uma produção de 106,5 milhões de toneladas/ano. É a segunda fruta mais consumida no planeta, superada pela maçã, com 11,4 kg/habitante/ano, sendo produzida na maioria dos países tropicais (FAO, 2013). O Brasil produz 7,3 milhões de toneladas/ano, com participação de 6,9% do mercado mundial (EMBRAPA, 2006).

Segundo dados da EPAGRI, são mais de 125 países que se dedicam ao cultivo da banana no mundo. Em alguns deles, a atividade se destaca como uma das principais fontes de arrecadação e geração de emprego e renda. O continente asiático lidera a produção dessa fruta, com 58% do volume produzido; o americano vem em segundo lugar, com 26% (América do Sul, com 17% e a América Central, com 8%) e o africano, em terceiro lugar, com 14% (EPAGRI, 2013).

As exportações brasileiras de banana somaram 82 mil toneladas de janeiro a outubro de 2013, alta de 8% frente ao mesmo período de 2012, segundo a Secretaria de Comércio Exterior (Secex). Um destaque, segundo o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea), naquele ano, foi para os parceiros do Mercosul, que aumentaram em 22% as compras de banana, somando pouco mais de 40 mil toneladas, sendo que a Argentina foi um importante comprador. Importante salientar que a região produtora que vende para o Mercosul é a região Norte/Nordeste de Santa Catarina (SILVA, 2014).

A bananicultura é cultura da maioria dos estados brasileiros. As condições de clima (temperatura, umidade relativa, precipitação e insolação) favorecem a produção o ano todo, atendendo de forma regular as necessidades de consumo (EPAGRI, 2013).

Em Santa Catarina, o município de Joinville é responsável na região Norte por 41% da produção de arroz, 22% da produção de banana, 54% da produção de cana-de-açúcar e 47% da produção de aipim. A base do setor primário do município de

Joinville é a agricultura familiar. Nesta, cerca de 97% das propriedades tem menos de 50 hectares. Destaca-se o cultivo do arroz irrigado, de banana e hortaliças (IPPUJ, 2011). A Figura 1 apresenta a produção de banana no Estado de Santa Catarina - Safra de 2012 (EPAGRI, 2013).



Figura 1. Concentração da produção de banana por microrregião geográfica de Santa Catarina – Safra de 2012 (EPAGRI, 2013)

A região nordeste de Santa Catarina por ser grande produtora de banana, torna-se também grande geradora de resíduos lignocelulósicos provenientes desta cultura. Estes resíduos podem ser reaproveitados em rotas biotecnológicas para, por exemplo, produção de enzimas por espécies de Basidiomicetos.

De acordo com Poffo (2013), em estudo para a caracterização da água de imersão da palha de bananeira, este resíduo, originado durante a etapa de umidificação do substrato no processo de cultivo sólido de fungos do gênero *Pleurotus*, apresenta os seguintes açúcares em sua composição: glicose (31,6%), galactose (31,5%), xilose (25,1%) e manose (11,8%). Estes açúcares, liberados pela palha de bananeira na água de imersão, representam nos meios de cultivo a fonte de carbono solúvel mais facilmente metabolizável pelo fungo. Além disso, este resíduo apresentou pH variando de 5,7 a 6,4; considerada interessante por compreender a faixa de pH sugerida para produção da enzima lacase, em torno de 6,0. O teor médio de cinzas nas amostras foi de 28,6% e os percentuais médios de matéria orgânica e carbono orgânico foram de 70,4 e 39,1%, respectivamente. Os percentuais médios de nitrogênio e proteína bruta foram de 2,8 e 12,4%, respectivamente e a relação carbono/nitrogênio foi de 13,8 (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização físico-química água de imersão da palha de bananeira.

pH	5,7 a 6,4
Teor de Cinzas	28 %
Teor de Matéria Orgânica	70,4%
Teor Carbono Orgânico	39,1%
Açúcares	
Glicose	31,6 %
Galactose	31,5 %
Xilose	25,1 %
Manose	11,8 %
Nitrogênio	2,8 %
Relação Carbono:Nitrogênio	13,8

Fonte: Poffo (2013).

Com relação à caracterização do resíduo casca de banana, mais especificamente a composição centesimal da casca de banana *in natura* foi estudada por Florêncio *et al.* (2011). Este resíduo apresentou teor de umidade de 87,7%, 1,59% de cinzas, 0,32% de lipídios, 1,54% de proteínas e 8,85% de carboidratos. Segundo os autores, a farinha ou pó de cascas de banana apresentou teor de umidade de 7,36%, 9,91% teor de cinzas, 14,47% de lipídios 7,61% de proteínas e 60,65% de carboidratos. A composição físico-química da farinha ou pó de cascas de banana, de três variedades (prata, pacovan e maçã), foi estudada por Pessoa (2009) (Tabela 2) e evidencia a possibilidade de reaproveitamento deste resíduo como matéria-prima para outros processos produtivos.

Tabela 2. Composição físico-química da farinha ou pó de casca de banana (variedades prata, pacovan e maçã).

Análise	Valor Médio		
	Prata	Pacovan	Maçã
Atividade de água (%)	0,434 ± 0,01	0,451 ± 0,01	0,448 ± 0,01
Conteúdo de umidade (%)	4,44 ± 1,44	4,04 ± 4,94	5,97 ± 6,54
Açúcares redutores (%)	7,60 ± 0,00	7,18 ± 0,00	7,38 ± 0,14
Açúcares totais (%)	9,14 ± 0,00	9,55 ± 0,00	17,64 ± 0,67

Acidez (%)*	4,99 ± 0,14	6,15 ± 0,014	4,87 ± 0,26
pH	5,56 ± 0,02	5,53 ± 0,01	5,44 ± 0,02
Amido (%)	12,14 ± 0,00	12,70 ± 0,69	1,65 ± 0,76
Cinzas (%)	7,91 ± 0,40	9,37 ± 0,24	7,97 ± 0,30
Potássio (mg/100g de produto)	623,91 ± 0,00	590,73 ± 0,00	845,74 ± 27,34
Cálcio (mg/100g de produto)	386,76 ± 37,92	356,82 ± 83,80	488,26 ± 49,00
Magnésio (mg/100g de produto)	99,78 ± 4,24	93,36 ± 4,03	138,01 ± 5,59
Sódio (mg/100g de produto)	18,48 ± 0,00	16,38 ± 0,48	26,99 ± 0,67
Proteínas (%)	6,58 ± 0,32	4,59 ± 0,08	8,77 ± 0,11
Lipídios (%)	10,59 ± 0,94	10,24 ± 0,40	7,49 ± 1,56

Fonte: (PESSOA, 2009).

A utilização de resíduos agroindustriais para crescimento fúngico e a consequente produção de enzimas tem sido estudada por diversos autores como forma de agregar valor a estes resíduos e reduzir os custos dos processos.

A produção de enzimas celulolíticas por *P. ostreatus* e *P. sajor-caju*, por exemplo, foram estudadas por Reddy *et al.* (2003), utilizando resíduos lignocelulósicos provenientes do cultivo da banana como substrato em cultivo semi-sólido.

Elisashvili *et al.* (2008) estudaram a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Lentinus edodes* e espécies de *Pleurotus* em cultivo sólido e submerso, utilizando vários resíduos lignocelulósicos na composição do meio de cultivo dentre os quais, as cascas de banana. Os autores observaram atividade para as seguintes enzimas: carboximetil celulase, xilanase, celulase e lacase.

2.3 Enzimas Oxidativas

Enzimas são proteínas globulares que atuam como catalisadores biológicos conduzindo as reações bioquímicas nas células dos organismos vivos. Estão largamente distribuídas na natureza (PEREIRA, 2011).

Quimicamente, as enzimas contêm uma ou mais cadeias de centenas de aminoácidos numa complexa estrutura tridimensional, que é muito importante para a sua ação. Como em toda a catálise, a catálise enzimática é caracterizada pelo aumento da velocidade de uma reação química, sem que o catalisador sofra mudanças em todo o processo. Este conceito implica que uma única molécula de

enzima é capaz de converter muitas moléculas de substrato durante o seu tempo de vida (PEREIRA, 2011).

O setor de enzimas é considerado, na atualidade, um dos maiores setores da indústria biotecnológica. A exploração vem sendo feita da forma bruta, a partir de origem animal ou vegetal, ou ainda pelo aproveitamento da expressão enzimática decorrente do crescimento microbiano sobre determinados substratos (COLEN, 2006).

Segundo Mendes *et al.* (2011), as pesquisas nessa área envolvem a otimização do processo de produção, além da própria síntese de enzimas com potencial industrial visando à diversificação do comércio mundial.

Como as enzimas são aplicadas em diversos processos industriais, esse setor apresenta muitas iniciativas de pesquisa e desenvolvimento, resultando na geração de diversos produtos, além de melhoramento do desempenho dos processos já existentes no mercado. No entanto, o custo das enzimas é o que limita sua aplicação em grande escala. Reduzir os custos de produção é, portanto, fundamental para amplificar essa aplicação (PARK *et al.*, 2005).

Dentre a grande variedade de enzimas, diferentes combinações de lignina peroxidases (EC 1.11.1.14), lacases (EC 1.10.3.2) e manganês peroxidases (1.11.1.13) constituem a base do sistema enzimático dos fungos ligninolíticos (RITTMANN & McCARTY, 2001, MACCHEERONI *et al.*, 2004).

2.3.1 Lignina peroxidases (LiPs)

A LiP é uma glicoproteína portadora de grupo prostético ferro-protoporfirina IX (heme), exibindo atividade dependente de H₂O₂, que catalisa reações envolvendo uma variedade de compostos fenólicos, não fenólicos, hidratos de carbono aromáticos e outros compostos que são resistentes ao ataque microbiano (TIEN & KIRK, 1984; GARG & MODI, 1999). Com massa molar variando entre 38 e 45 kDa, são muito semelhantes às peroxidases dependentes de manganês (MnP) em estrutura e função (KUWAHARA *et al.*, 1984). A especificidade catalítica inerente a cada uma delas seria resultante de diferenças sutis nos sítios de ligação aos substratos (CAMERON *et al.*, 2000; MACCHERONI *et al.*, 2004).

Uma das peculiaridades da lignina peroxidase em relação a outras peroxidases é a sua capacidade de oxidar substratos aromáticos não fenólicos, produzindo radicais catiônicos arílicos que convergem para oxidações de alcoóis benzílicos, clivagem de ligações carbono-carbono, hidroxilações, demetilações, abertura de anéis aromáticos e dimerizações ou polimerizações entre fenóis (POINTING, 2000; MACCHERONI *et al.*, 2004).

2.3.2 Manganês peroxidases (MnPs)

A enzima manganês peroxidase (MnP) foi descoberta em *P. chrysosporium* (REYS, 2003) e, segundo Durán (2004), é uma enzima extracelular, glicosilada de massa molar de 45-47 kDa e possui grupo prostético heme. Entretanto, a MnP é dependente de H₂O₂ e do íon Mn²⁺, e os α -cetoácidos como lactato estabilizam sua atividade oxidativa.

A importância da MnP na degradação da madeira se deve ao seu sistema enzimático, que gera espécies oxidantes pequenas e de fácil penetração. Por essas qualidades, estas enzimas iniciam a penetração na madeira, porém a característica de oxidação apenas de estruturas fenólicas limita sua capacidade de degradar integralmente lignina de alta massa molecular (SOARES, 1998)

A MnP pode oxidar uma grande faixa de substratos através da oxidação de Mn²⁺ a Mn³⁺, ligando-se a substâncias quelantes excretadas também pelo fungo (WESENBERG *et al.*, 2003).

2.3.3 Lacases (Lacs)

Entre as enzimas mais estudadas se encontram as lacases (EC 1.10.3.2), as quais têm mostrado participar ativamente na decomposição da lignocelulose (ARORA, 2000). Esta enzima está associada com uma rápida adaptação do fungo a um novo substrato, assim como na produção de metabólitos que impedem e/ou diminuem a ocorrência de muitos antagonistas (HERNÁNDEZ *et al.*, 2002).

As lacases são multicobre oxidases que possuem função de catalisar a oxidação de diversos compostos aromáticos, utilizando como aceptor de elétrons o oxigênio molecular. O mecanismo geral de atuação da lacase é a oxidação do

substrato através da abstração de um elétron de um composto fenólico, gerando um radical fenoxila, agindo na clivagem das cadeias laterais e anéis aromáticos das porções fenólicas da lignina. Esta enzima atua na destoxificação de compostos e também pode oxidar grupos fenólicos, agindo como enzima inicial na clivagem de cadeias laterais e anéis aromáticos das porções fenólicas da lignina. Sendo assim, são enzimas de grande potencial em aplicações industriais como no biobranqueamento, clarificação de vinho, análise de drogas, biosensores e descoloração de corantes sintéticos (BALDRIAN, 2006; RABONATO, 2013).

A lacase tem sido encontrada em diferentes gêneros de ascomicetos, alguns deuteromicetos e principalmente basidiomicetos. Os melhores produtores de lacase são basidiomicetos pertencentes ao grupo de decomposição branca, sendo eficientes degradadores de madeira. Sua especificidade depende do fungo, podendo oxidar diferentes substratos (SZKLARZ *et al.*, 1989).

2.4 Produção de LiPs, MnPs e Lacs

Atualmente, vários estudos têm sido realizados a cerca da produção de enzimas lignocelulolíticas utilizando fungos basidiomicetos em diferentes substratos. Sahay *et al.* (2008) avaliaram a influência da adição de sabugo de milho, pó de fibra de coco, serragem, palha de trigo e partículas de bagaço como fontes naturais de lignina nos cultivos de *Pleurotus sajor-caju* MTCC 141 sobre a produção de Lac. O meio de cultivo foi composto por 0,5 g de substrato em 25 mL de meio constituído por 10 g L⁻¹ de glicose, 1 g L⁻¹ de asparagina, 0,5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 0,01 g L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O e 0,01 g L⁻¹ de FeSO₄·7H₂O. Dentre os substratos testados o que propiciou maior atividade de Lac foi aquele contendo partículas de bagaço (~0,29 U mL⁻¹, em 9 dias de cultivo). Posteriormente, foram testados diferentes concentrações deste substrato, sendo observado maior atividade de Lac quando utilizado 500 mg L⁻¹ (0,3 U mL⁻¹, em 9 dias) e 800 mg L⁻¹ (0,32 U mL⁻¹, em 9 dias de cultivo).

A produção de enzimas oxidativas em cultivo submerso utilizando bagaço de cana-de-açúcar na composição do meio foi estudada por Menezes *et al.* (2009). Os estudos indicaram produção de Lac por duas linhagens de *Pleurotus*: *Pleurotus sp.* BCCB068 apresentou atividade de Lac de 6,23 U L⁻¹ no 15º dia de cultivo e *P. sajor-caju* apresentou atividade de Lac de 3,52 U L⁻¹ no 10º dia de incubação. Os autores verificaram também atividade de MnP por *Pleurotus sp.* BCCB068 igual a 31,56 U L⁻¹

no 5º dia de cultivo e de 23,58 U L⁻¹ por *P. thailandia*, no 15º dia de incubação. Os autores concluíram que estes resultados mostram a possibilidade de utilização do resíduo de bagaço de cana-de-açúcar como fonte de enzimas ligninolíticas para aplicação na área biotecnológica.

Aguiar *et al.* (2010) estudaram a utilização de vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar para produção de enzimas por *P. ostreatus*, *P. ostreatoroseus* e *Trichoderma reesei*. O meio de cultivo em estudo foi composto de 0,33 g de cana-de-açúcar por litro de vinhaça, pH 6,0 e temperaturas de cultivo de 24, 30, 35 e 40°C. O meio de cultivo controle foi composto por 0,33 g de bagaço por litro de meio mineral ((NH₄)₂SO₄ 1,4 g L⁻¹; KH₂PO₄ 2 g L⁻¹; ureia 0,3 g L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,3 g L⁻¹; ZnSO₄.7H₂O 0,0014 g L⁻¹; FeSO₄.7H₂O 0,005 g L⁻¹; MnSO₄ 0,0016 g L⁻¹; CoCl₂ 0,002 g L⁻¹; CaCl₂ 0,002 g L⁻¹; 2 mL de Tween-80 e 1 mL de peptona). As maiores atividades de Lac e MnP foram encontradas nos cultivos de *P. ostreatus* (325,23 U L⁻¹ e 27,69 U L⁻¹ respectivamente) a 30°C, em 21 dias de cultivo.

Abo-State *et al.* (2011) avaliaram a produção de Lac por *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju* utilizando três diferentes meios de cultivo, suplementados com CuSO₄.5H₂O como indutor, por um período de 15 dias. As maiores atividades de Lac foram obtidas em meio contendo 16 g L⁻¹ de glicose, 0,25 g L⁻¹ de tartarato de amônio e 0,25 g L⁻¹ de extrato de levedura, obtendo-se atividade de Lac de 0,190 U mL⁻¹ para *P. ostreatus* e 0,612 U mL⁻¹ para *P. sajor-caju*. Com relação a influência da concentração do indutor, os autores constataram que a maior atividade de Lac foi obtida quando utilizou-se 300 µM de CuSO₄.5H₂O, sendo esta igual a 1,850 U mL⁻¹ para *P. ostreatus* e 1,368 U mL⁻¹ para *P. sajor-caju*, ambas em 21 dias de cultivo.

A otimização do meio de cultivo para a produção de Lac e MnP por *Pleurotus sajor-caju* foi também objeto de estudo de Patrick *et al.* (2011). Para otimização da produção de Lac foi utilizado meio de cultivo Kirk modificado (DHOUIB *et al.*, 2005) e pH 6,0; para a produção de MnP foi utilizado meio de cultivo proposto por Asther *et al.* (1988) modificado e pH 5,5. Foi avaliado o efeito da concentração da fonte de carbono (glicose: 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 g L⁻¹ para Lac, e glicerol: 2, 4, 6, 8 e 10 g L⁻¹ para MnP) e da de nitrogênio (tartarato de amônio: 2,7, 5,4, 10,9, 16,3, 21,7, 24,4 e 27,1 mM) sobre a produção enzimática. Além disso, para a produção de Lac foram avaliados os seguintes indutores: CuSO₄ (0,1, 0,15, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 1,0 e 2,0 mM), 2,5-xilidina (0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mM) e ácido ferúlico (0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mM). Para a produção de MnP foi avaliado MnSO₄.H₂O (0,05, 0,1, 0,2,

0,4, 0,6, 0,8, e 1,0 mM). Utilizando meio de cultivo não otimizado os autores obtiveram atividades máximas de Lac e MnP, em 7 dias de cultivo, de 0,62 e 0,0003 U mL⁻¹, respectivamente. Quando otimizado o meio de cultivo (10 g L⁻¹ de glicose e 2,0 mM de 2,5-xilidina para a produção de Lac e 4 g L⁻¹ de celulose e 0,05 mM de MnSO₄.H₂O para a produção de MnP), os autores observaram atividades máximas de Lac e MnP de 80 e 0,94 U mL⁻¹, respectivamente. As atividades foram aumentadas em 129 vezes para Lac e 133 vezes para MnP, em 8 e 24 dias de cultivo, respectivamente.

Silva *et al.* (2012) estudaram a produção de Lac por fungos basidiomicetos em cultivo submerso, utilizando cascas de café como fonte de carbono na composição do meio de cultivo. Os fungos utilizados foram *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus florida*. Os autores também avaliaram o efeito do tipo da fonte de nitrogênio (extrato de levedura, peptona, ureia, nitrato de sódio e sulfato de amônio) e da adição de cobre ao meio de cultivo sobre a produção de Lac. Peptona, ureia e extrato de levedura foram as fontes de nitrogênio que propiciaram efeito mais expressivo sobre a produção de Lac pelas linhagens. Utilizando-se extrato de levedura como fonte de nitrogênio os autores obtiveram atividade de Lac de 22,5 U mL⁻¹ para *P. ostreatus* e 22,2 U mL⁻¹ para *L. edodes*, em 12 dias de cultivo. A adição de cobre ao meio de cultivo produziu efeito positivo na produção de Lac em todos os meios testados, sendo o resultado mais expressivo observado no meio contendo extrato de levedura (5 g L⁻¹) e CuSO₄ (9 g L⁻¹, maior concentração testada deste indutor). Os autores relataram precisar efetuar mais estudos acerca da concentração de CuSO₄, já que a maior concentração testada por eles foi a que apresentou a maior produção de Lac.

A influência da adição de sabugo de milho e carvão ativado sobre a produção de Lac por basidiomicetos foi estudada por Regina *et al.* (2012). Foram utilizadas três linhagens fúngicas: *Pleurotus sp.*, *P. ostreatus* (branco e CCD) e *P. eryngii*. A linhagem *P. ostreatus* branco foi a que se destacou em produção de Lac (1,2 U L⁻¹ em 14 dias) em meio líquido utilizando sabugo de milho como substrato. Nos cultivos em meio sólido os autores obtiveram maior atividade de Lac (~2,8 U Kg⁻¹) no 8º dia de cultivo com a mesma espécie. O parâmetro Eficiência Biológica foi utilizado para avaliar os cultivos com adição de carvão ativado. *P. eryngii* foi a única linhagem que apresentou aumento na atividade de Lac, passando de 12,67% na ausência de carvão ativado para 30,29% quando este componente estava presente no meio de cultivo. Os autores concluíram que a adição destes substratos na composição dos meios de cultivo apresenta influência positiva sobre a produção de Lac.

Os efeitos da adição de CuSO_4 e de compostos aromáticos no meio de cultivo para a produção de Lac por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 foram estudados por Bettin *et al.* (2014). Os cultivos submersos foram realizados em meio composto por 5 g L^{-1} de sacarose ou glicose, 1,5 g L^{-1} de caseína pura e 100 mL de solução mineral (20 g KH_2PO_4 , 14 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g ureia, 3 g CaCl_2 , 15,6 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 50 mg FeSO_4 , 14 mg ZnSO_4 e 20 mg CoCl_2 por litro). Os autores avaliaram a adição ao meio de cultivo de CuSO_4 , etanol absoluto e/ou compostos aromáticos incluindo ácido benzoico, ácido gálico, ácido tânico, fenol, siringaldazina, vanilina e xilidina, em diferentes concentrações, sobre a produção de lacase. Utilizando-se etanol e CuSO_4 , as maiores atividades obtidas foram de 17,35 U mL^{-1} , em 11 dias de cultivo, e 35,19 U mL^{-1} , em 13 dias de cultivo, respectivamente. Atividades de 62,33, 50,84, 48,39 e 45,22 U mL^{-1} , foram observadas para os ensaios contendo 100 mg L^{-1} dos seguintes compostos aromáticos, siringaldazina, ácido benzoico, ácido gálico e vanilina, respectivamente, em 9 dias de cultivo, com exceção do cultivo com vanilina, que apresentou maior atividade de Lac em 11 dias de cultivo. Quando combinados CuSO_4 e compostos aromáticos, os autores observaram aumento da atividade de Lac. A combinação de CuSO_4 com ácido benzoico propiciou atividade de Lac de 72,11 U mL^{-1} , em 13 dias de cultivo; CuSO_4 com ácido gálico, 80,66 U mL^{-1} , em 13 dias de cultivo e CuSO_4 com vanilina, 66,73 U mL^{-1} , em 13 dias de cultivo. Os autores concluíram, com estes resultados, que *Pleurotus sajor-caju* é um bom produtor de Lac, principalmente, quando adicionado no meio de cultivo sacarose ou glicose como fonte de carbono e CuSO_4 combinado com vanilina, ácido gálico ou ácido benzoico como indutores.

2.5 Aplicações de LiPs, MnPs e Lacs

De acordo com Ferreira *et al.* (2009), as enzimas oxidativas, devido à capacidade de catalisar a oxidação de diferentes compostos recalcitrantes, encontram aplicação em diversas áreas, como no processo de deslignificação (polpação e branqueamento) na indústria de papel e celulose, na produção de etanol, na modificação de fibras da madeira, no clareamento de corantes em processos têxteis, na síntese de produtos químicos/medicinais e na remediação de solos e águas contaminadas.

Munari *et al.* (2003) estudaram a capacidade de redução de fenóis totais e cor

por *P. sajor-caju* em efluentes da indústria de papel e celulose. O meio de cultivo foi composto por 90% (v/v) de efluente, 10% (v/v) de solução mineral (KH_2PO_4 20 g L⁻¹, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 14 g L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g L⁻¹, ureia 3 g L⁻¹, CaCl_2 4 g L⁻¹, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 15,6 mg L⁻¹, FeSO_4 50 mg L⁻¹, ZnSO_4 14 mg L⁻¹, CoCl_2 20 mg L⁻¹) e concentrações de glicose de 5, 10 e 15 g L⁻¹. A determinação da atividade enzimática foi realizada utilizando-se dois substratos, ABTS e siringaldazina. Os autores observaram maior atividade de Lac, no 7º dia de cultivo, independentemente do substrato utilizado para a análise (~200 a 270 U mL⁻¹ e 40 a 65 U mL⁻¹, respectivamente). A redução de fenóis foi observada a partir do 3º dia de cultivo, sendo a maior redução de compostos fenólicos observada 13º dia de cultivo (58,9% em relação ao meio de controle, sem inóculo). Os autores observaram redução da cor de aproximadamente 40% contra redução de aproximadamente 4% nos cultivos controle, principalmente, nos cultivos com adição da maior concentração de glicose, 15 g L⁻¹.

Ferreira (2009) estudou a biodegradação de vinhaça, resíduo proveniente do processamento industrial da cana-de-açúcar, por fungos lignocelulolíticos por meio da análise de atividade enzimática e da descoloração do efluente. Descoloração de 98%, por *P. sajor-caju*, foi observada em 12 dias de cultivo, seguido de *P. chrysosporium*, *Pleurotus* sp. 068 e *Ganoderma* sp., na ordem de aproximadamente 65 a 90%. Os cultivos de *P. sajor-caju* sobre vinhaça 100%, vinhaça + glicose e vinhaça + meio sintético apresentaram atividade de Lac entre 400 e 450 U L⁻¹ em 9 dias de cultivo. A maior atividade de MnP foi encontrada no 12º dia de cultivo, entre 60 e 80 U L⁻¹ para os três meios testados. Para LiP não foi encontrada atividade enzimática. Elevados percentuais de redução da cor e turbidez (90 a 98%) foram observadas no 12º e 15º dias de cultivo, respectivamente, coincidindo com as atividades enzimáticas máximas. Num segundo momento foi analisado a produção de Lac e MnP em meio contendo 100 % de vinhaça, onde foi observado atividade máxima de Lac de 424,9 U L⁻¹ em 10 dias de cultivo e MnP de 100,9 U L⁻¹ em 12 dias de cultivo, coincidindo com os níveis máximos de descoloração atingidos (98,56%). Além da descoloração do meio, os autores observaram diminuição da toxicidade do meio de cultivo “vinhaça 100%” por *P. sajor-caju*.

Além das aplicações anteriormente citadas, o uso da enzima Lac na oxidação de compostos lignocelulósicos pode aumentar a biodisponibilidade de carbono para a alimentação animal e em processos de sucessão microbiana para a produção de biocompostos como enzimas e/ou biocombustíveis (DALJIT e RAKESH, 2010;

D'AGOSTINI *et al.*, 2011).

2.5.1 Degradação Biológica de Compostos Interferentes Endócrinos

A demanda crescente da sociedade por produtos e bens de consumo industrializados motivou consideravelmente o desenvolvimento tecnológico, sendo que muitos compostos inovadores, tais como produtos farmacêuticos e alimentícios, foram produzidos e distribuídos para consumo. No entanto, este crescimento tecnológico foi promovido sem o devido cuidado com relação aos possíveis contaminantes lançados ao meio ambiente (SODRÉ *et al.*, 2007).

Mais recentemente, porém, tem se observado uma crescente preocupação de órgãos ambientais em relação a estes possíveis contaminantes, sendo os compostos interferentes endócrinos destaque devido a resultados alarmantes de pesquisas científicas que demonstraram sua toxicidade aos seres humanos e ao meio ambiente (FERREIRA, 2008; BARNABÉ *et al.*, 2009; HOMSTRUP *et al.*, 2009). Uma substância exógena capaz de causar efeitos adversos na saúde de um organismo ou de seus descendentes, provocando distúrbios na função hormonal, é denominada interferente endócrino (ALVES *et al.*, 2007).

A tradução do termo “endocrine disrupting chemicals” (EDCs) não é simples, visto que há cinco possíveis traduções para o termo: perturbadores endócrinos, desreguladores endócrinos, interferentes endócrinos, disruptores endócrinos e interferentes hormonais (BILA & DEZOTTI, 2007).

Estes compostos são classificados segundo a USEPA (United States Environmental Protection Agency) como “*um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação dos hormônios naturais que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento*” (SODRÉ *et al.*, 2007). Segundo o Programa de Segurança Química (IPCS) “*é uma substância ou mistura exógena que altera a função do sistema endócrino e conseqüentemente causa efeitos adversos em um organismo saudável, ou em seus descendentes ou subpopulações*” (DAMSTRA *et al.*, 2002; GHISELLI & JARDIM, 2007; SODRÉ *et al.*, 2007).

Numerosos compostos químicos de uso doméstico, industrial e agrícola possuem comprovada atividade hormonal. Porém, o grau de exposição e efeitos dos

outros milhares de produtos com os quais entramos em contato diariamente ainda são desconhecidos (ALVES *et al.*, 2007).

Atualmente, as maiores preocupações em relação à exposição de humanos e outros animais aos interferentes endócrinos são: se essas substâncias podem produzir efeitos tóxicos em baixas concentrações; quais substâncias estão relacionadas aos efeitos tóxicos a baixas concentrações; se essas substâncias estão presentes em concentrações ambientalmente relevantes que possam ser uma ameaça à saúde de humanos e animais; se existe uma concentração limiar abaixo da qual essas substâncias químicas podem ser consideradas como seguras; se os novos tipos de ensaios, usados para prever os efeitos causados em organismos expostos, podem realmente fornecer ferramentas para o entendimento do mecanismo de ação dessas substâncias e, se esses ensaios podem ser usados facilmente em larga escala a fim de monitorar seus efeitos no meio ambiente (BILA & DEZOTTI, 2007).

Alguns dos EDCs mais encontrados são: diclorofeniltricloroetano (DDT), dieldrin, aldrin e txafeno encontrados em agrotóxicos organoclorados; ftalatos, subprodutos industriais provenientes de sua adição ao policloreto de vinila (PVC) usado para dar flexibilidade e durabilidade ao plástico; dioxinas que são produzidas como subproduto de processos industriais devido à combustão incompleta de compostos orgânicos; bifenilas policloradas (BPC) usadas na produção de isolantes termoelétricos por apresentarem alta estabilidade térmica e elevada constante dielétrica e o bisfenol-A (BPA) que é utilizado na produção de plásticos policarbonatos e da resina epóxi. Este último pode ser absorvido pelo organismo através de múltiplas fontes, até mesmo da água utilizada para beber e banhar, causando grande preocupação sobre seus efeitos no organismo (ALVES *et al.*, 2007).

Algumas tecnologias que possam ser eficientes na remoção destes poluentes em águas e estações de tratamento (ETEs) têm sido bastante investigadas, entre elas encontram-se os processos oxidativos, que têm ganhado bastante atenção. Alguns destes processos são: ozonização, filtração em carvão ativado, processos com membranas de nanofiltração, osmose reversa, cloração, entre outros. Porém, estudos mostram que estes micropoluentes podem não ser totalmente removidos por alguns destes processos, ou acabar gerando subprodutos durante os tratamentos (BILLA & DEZOTTI, 2007).

Uma outra forma de degradação destes compostos é por meio da utilização de enzimas oxidativas. A enzima lacase tem sido aceita como uma alternativa para o

processo de degradação destes interferentes já que o seu estudo de produção, isolamento e aplicação vem crescendo significativamente (MODARESSI *et al.*, 2005).

Libardi Jr *et al.* (2012) estudaram a produção de lacase por *P. ostreatus* e *Phoma* sp. e a capacidade destas enzimas em degradar compostos interferentes endócrinos, tais como bisfenol-A, 17 α -etilestradiol e t-nonifenol. Primeiramente foi realizado um estudo cinético de produção de Lacase; o caldo enzimático foi então concentrado e aplicado na degradação dos componentes. Atividade máxima de Lacase inferior a 80 U L⁻¹ foi obtida no 9º dia de cultivo utilizando cascas de banana e CuSO₄ como fonte de carbono para *Phoma* sp. e 1699,39 U L⁻¹ para *P. ostreatus* em 19 dias de cultivo. A degradação dos compostos foi realizada utilizando 0,5 g L⁻¹ da solução concentrada de Lac dos dois fungos em estudo. A concentração de nonilfenol submetida a tratamento de Lacase por *P. ostreatus* foi reduzida em 88,66% após 72 horas de reação. A concentração de BPA foi totalmente reduzida em 48 horas de reação com a utilização do caldo concentrado de Lacase por *Phoma* sp. e em 24 horas para Lacase de *P. ostreatus*. A degradação de 17 α -etilestradiol foi completa em 24 horas utilizando Lacase de *P. ostreatus* e em 48 horas para Lacase de *Phoma* sp. Através dos estudos foi possível observar que a utilização de Lacase de *P. ostreatus* foi mais eficaz que a Lacase de *Phoma* sp.

2.5.1.1 Bisfenol-A (BPA)

Bisfenol-A ou 2,2-bis-(4-hidroxifenil)propano ou 4,4-isopropilideno difenol (Figura 2) foi sintetizado pela primeira vez em 1905 pela reação de condensação do fenol com acetona na presença de uma resina trocadora de íons fortemente ácida, na forma de gel. É um composto orgânico apresentando baixa pressão de vapor, baixa volatilidade, solubilidade em água moderada e sólido em temperatura ambiente (MAGRO, 2013). Sua estrutura molecular é apresentada na Figura 2.

Na década de 1930 o BPA encontrou sua primeira possível utilização como estrogênio para tratamento de distúrbios de gravidez, sendo substituído na década de 1940 pelo 1,2-dietilestilbestrol (DES). Sua utilização na indústria de plástico iniciou na década de 1950 sendo amplamente utilizado nas décadas seguintes. Em 1970 os Estados Unidos iniciaram estudos quanto ao potencial carcinogênico do BPA, sendo que ao final da década de 1980 a USAPA publicou a primeira recomendação de dose segura de BPA, de 50 $\mu\text{g Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (SCHLEICHER, 2013).

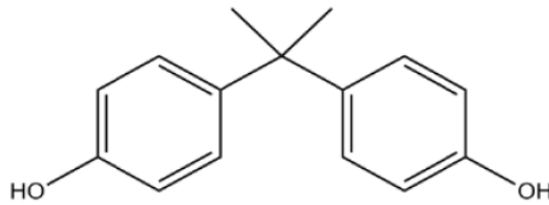


Figura 2. Estrutura molecular do Bisfenol-A (HARO, 2013).

O BPA é um monômero que apresenta excelentes características físicas e químicas (Tabela 3), cuja principal aplicação é na produção de resinas epóxi e de plásticos de policarbonato. As resinas epóxi são utilizadas como vernizes para revestimento de produtos metálicos como em latas de alimentos, tampas de garrafas e tubulações de abastecimento de água, já os plásticos policarbonatos são empregados em embalagens de alimentos e de bebidas (HARO *et al.*, 2014), podendo ser encontrados ainda em produtos finais como adesivos, CDs, aditivos de papéis térmicos, revestimentos em veículos, mamadeiras, tampas de latas, protetores de vidraças, lentes automotivas, revestimento de componentes eletrônicos, cosméticos, materiais de construção (COSTA, 2008; RIVAS *et al.* 2008; XAVIER, 2011; HIRO, 2013). As propriedades físico-químicas estão representadas na Tabela 3.

Tabela 3. Propriedades físico-químicas do BPA

Propriedade	Valor
Fórmula Química	$C_{15}H_{16}O_2$ ou $(CH_3)_2C(C_6H_4OH)_2$
Massa Molar	228,89 g mol ⁻¹
Solubilidade em água (20 a 25 °C)	120 a 200 mg L ⁻¹
p _{ka}	9,6 a 10,2
Ponto de Fusão	153 °C
Ponto de Ebulição	220 °C

(Fonte: MAGRO, 2013 - adaptado).

O efeito do BPA na saúde humana tem sido muito discutido nas últimas décadas pela possível migração do composto para o produto acondicionado. Encontram-se atualmente muitas especulações a cerca do tema sendo que muitos estudos passaram a ser publicados demonstrando os diferentes pontos de vista defendidos em prol e contra a utilização do BPA (BESERRA *et al.*, 2012)

O BPA pode ser encontrado no meio ambiente por meio de ações humanas, atingindo água, solo, ar e até produtos alimentícios. A presença de BPA no ambiente aquático e nas plantas é proveniente de agente emulsificante de pesticidas e/ou herbicidas, do lodo proveniente de esgoto, usado como fertilizante na agricultura, da descarga de esgotos domésticos e industriais ou ainda dos lixões e aterros sanitários (BERKNER *et al.*, 2004; JIN *et al.*, 2004; COSTA, 2008).

Estima-se que os aterros sejam os principais contribuintes de níveis elevados de BPA, uma vez que o descarte de materiais plásticos normalmente é realizado sem um tratamento adequado, tornando-se uma fonte de contaminação de ambientes aquáticos. As estações de tratamento de resíduos são consideradas as principais fontes secundárias de BPA devido a incompleta degradação ou remoção deste composto durante os tratamentos físico-químicos ou biológicos (HARO, 2013).

O BPA pode causar diversos impactos ambientais, principalmente na fauna levando a reprodução desordenada, alterações genéticas e malformações congênitas. Descargas em águas destinadas ao consumo humano ou a ingestão destes animais afeta diretamente a espécie humana (GOMES *et al.*, 2007). De acordo com Beserra *et al.* (2012) baixas doses de BPA possuem efeitos adversos sobre a fertilidade e o sistema nervoso, podendo ainda causar diabetes, câncer, obesidade, puberdade precoce, doenças cardíacas etc. Acredita-se ainda que por apresentar uma composição química semelhante ao estrógeno (hormônio feminino), o BPA pode agir como um desregulador endócrino.

Entrou em vigor em 2012 a proibição em todo território nacional, pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), da venda e fabricação de mamadeiras de plástico que contenham BPA, tendo como principal argumento estudos realizados com animais que mostraram que a substância pode causar problemas neurológicos, sobretudo, em crianças expostas à substância química nos primeiros anos de vida.

O tratamento de BPA tem sido alvo de muitos estudos, sendo investigado uma série de técnicas, entre as quais encontram-se: a biodegradação utilizando bactérias (YAMANAKA *et al.*, 2008), a coagulação combinada com adsorção (JOSEPH *et al.*, 2013), a osmose inversa (BOLONG *et al.*, 2010), a oxidação eletroquímica (KURAMITZ *et al.*, 2001; HE *et al.*, 2013), a fotólise (CHEN *et al.*, 2006), a ozonização (LEE *et al.*, 2003, XAVIER, 2011), a filtração por membranas de micro e ultrafiltração (VAN DER BRUGGEN *et al.*, 2001; SHAFER e WAITE, 2002; JIN *et al.*, 2007; BING-

ZHI *et al.*, 2008), a sorção (DONG *et al.*, 2010; HARO, 2013; JOSEPH *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013).

Outra técnica de remoção é a utilização de enzimas oxidativas provenientes de linhagens fúngicas. A utilização de lacases produzidas por *Trametes versicolor* e *Pycnoporus coccineus* foi avaliada por Tanaka *et al.* (2001) para a degradação de bisfenol-A presente em solos contaminados, chegando-se à remoção de 75% do bisfenol-A após 5 horas de reação. Os autores também avaliaram a capacidade de remoção de BPA por lacases de *Pycnoporus coccineus*, porém estas não apresentaram capacidade de remoção do composto.

A remoção do BPA de águas residuais por lacases foi estudada também por Modaressi *et al.* (2005). Os autores estudaram a otimização do pH e das concentrações de lacase e polietilenoglicol (PEG) que levassem ao maior percentual de remoção. A concentração ótima de lacase e PEG necessárias para a remoção de 95% de BPA, em pHs variando de 5,6 a 6, foram $0,001 \text{ U mL}^{-1}$ e 75 mg L^{-1} , respectivamente.

Arboleda *et al.* (2006) estudaram a produção de lacase por *Ganoderma sp.* e sua potencial aplicação na biorremediação de águas residuais da indústria de polímeros, contendo o interferente de ação estrogênica, Bisfenol-A. Primeiramente os autores estudaram a indução da produção de lacase utilizando substratos sólidos ricos em lignina e metais como Cu e Mn, e também etanol. A degradação do BPA foi avaliada variando-se o pH e a temperatura de incubação. A adição de resíduos sólidos favoreceu a atividade de lacase (1.643 U L^{-1}) e a combinação dos três indutores resultou numa atividade de 4.000 U L^{-1} . Os resultados de remoção do BPA utilizando lacase produzida por *Ganoderma sp.*, após de 6 horas de incubação, foram: remoção de 93,7% do interferente, em pH 5 e temperatura de 60°C .

3. METODOLOGIA

3.1 Microrganismo e Manutenção

Utilizou-se a linhagem *P. sajor-caju* da Coleção de Culturas de Basidiomicetos da Universidade de São Paulo, sob o código CCB 019. A linhagem foi mantida em meio trigo-dextrose-ágar (TDA) (FURLAN *et al.*, 1997), sob refrigeração, com repiques a cada três meses.

3.2 Meio de Cultivo

Foram avaliados três meios de cultivo: Solução de Manachini (MANACHINI *et al.*, 1987), Solução de Manachini modificada (POFFO, 2013) e Meio OXI (CESA *et al.*, 2012). A solução de Manachini é composta por: 2 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 1 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄; 0,1 g L⁻¹ de MgSO₄; 0,9 g L⁻¹ Na₂HPO₄.2H₂O; 1 g L⁻¹ de extrato de levedura, dissolvidos em água destilada. Adicionou-se a este meio de cultivo 10 g L⁻¹ de glicose. A solução de Manachini Modificada teve os mesmos sais, assim como glicose, nas mesmas concentrações, dissolvidos em água de imersão de palha de bananeira ao invés de água destilada. A água de imersão de palha de bananeira foi obtida por meio da imersão de 150 g de palha de bananeira seca em 3 L de água, por aproximadamente 12 horas. O meio OXI foi composto por água de imersão de palha de bananeira suplementada com pó de cascas de banana 60 g L⁻¹, tartarato de amônio 5,4 mM e glicose 10 g L⁻¹.

Para a produção das enzimas oxidativas foi testado cada meio de cultivo com suplementação de indutores conforme a enzima em estudo (Figura 3). Para produção de lacase (Lac) os meios foram suplementados com CuSO₄ anidro 150 µM, para manganês peroxidase (MnP) foi adicionado Mn²⁺ 0,05 mM e para produção de lignina peroxidase álcool veratrílico 4 mM. Cada ensaio foi realizado em triplicata e o pH inicial dos meios de cultivo ajustado em 6,0 utilizando, quando necessário, soluções de H₃PO₄ 12 M e NaOH 6 M.

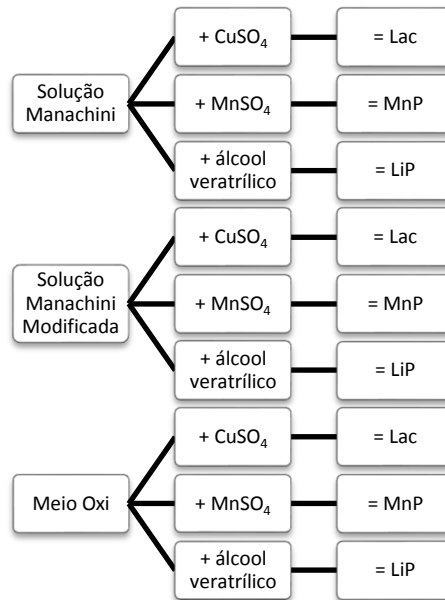


Figura 3. Composição dos meios de cultivo para produção das enzimas oxidativas.

3.3 Estudo da Influência do Meio de Cultivo sobre a Produção de Enzimas - Experimentos em Frascos Agitados

Utilizaram-se frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio de cultivo, esterilizados a 121°C por 20 minutos. Após esterilização cada frasco foi inoculado com dois discos de ágar de 12 mm de diâmetro contendo micélio fúngico e incubado com agitação recíproca de 105 min⁻¹, temperatura de 30°C, por aproximadamente 15 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata. As amostras foram congeladas e analisadas quanto as atividades de Lac, MnP e LiP.

3.4 Estudo da Influência do pH Controlado em 5,5 e sua Evolução Espontânea sobre a Produção de Enzimas - Experimentos em Biorreator

Utilizou-se biorreator de mistura completa B. BRAUN (modelo BIOSTAT B), com cuba de vidro de parede dupla com volume total de 5 L e tampa de aço inoxidável. Para todos os cultivos, foi utilizado um volume operacional de 4 L. O meio de cultivo OXI para produção de lacase, composto por água de imersão de palha de bananeira suplementada com pó de cascas de banana 30 g L⁻¹, tartarato de amônio 5,4 mM, glicose 10 g L⁻¹ e CuSO₄ anidro 150 µM como indutor da produção de lacase, foi esterilizado juntamente com a cuba, em autoclave, por 30 minutos. Antiespumante,

propilenoglicol, foi adicionado à cuba para que não houvesse formação de espuma durante o cultivo. As condições operacionais básicas foram temperatura controlada em 30 °C, frequência de agitação fixada em 350 min⁻¹ e vazão de ar de 0,37 L min⁻¹.

Primeiramente foram realizados ensaios em pH livre e, após estudos cinéticos destes ensaios, determinou-se o valor de pH a ser utilizado e fixado nos cultivos subsequentes. Nos ensaios realizados com controle de pH, os ajustes foram realizados automaticamente pela adição de NaOH 6N e H₃PO₄ 12N. Em todos os ensaios, as amostras foram centrifugadas a 3000 min⁻¹ durante 10 minutos para a separação da biomassa, sendo o sobrenadante utilizado nos procedimentos analíticos. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.5 Determinação das Atividades Enzimáticas

A atividade de lacase foi avaliada por meio da variação da absorbância em 420 nm, produzida pela oxidação do composto ABTS (ácido 2,2"-Azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)), em solução tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,8). A análise foi realizada em um volume de 0,9 mL de ABTS em solução tampão acetato de sódio 50 mM ao qual acrescentou-se 0,1 mL do caldo enzimático (BUSWELL *et al.*, 1995). Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol do substrato ABTS por minuto.

A atividade de manganês peroxidase foi avaliada por meio da oxidação do composto vermelho de fenol ($\epsilon_{610} = 4460 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) na presença de manganês e peróxido de hidrogênio (GLENN & GOLD, 1985). A mistura de reação foi constituída de 0,5 mL do caldo enzimático, 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 M, 0,05 mL de MnSO₄ 2 mM, 0,2 mL de albumina bovina 0,5%, 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%, 0,05 mL de H₂O₂ em tampão succinato de sódio 0,2 M (pH = 4,5). A mistura foi incubada a 30 °C durante 5 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 0,04 mL de NaOH 2,0 N. As leituras foram feitas em absorbância de 610 nm, no tempo zero e após os 5 minutos de reação (KUWAHARA *et al.*, 1984). Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de vermelho de fenol por minuto.

A atividade de lignina peroxidase foi avaliada por meio da oxidação do composto álcool veratrílico ($\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a 30°C (TIEN & KIRK, 1984). A mistura de reação foi constituída de 0,8 mL de solução tampão tartarato dissódico

0,05M (pH 3,0), 0,1 mL de álcool veratrílico 40 mM e 0,1 mL do caldo enzimático. A reação foi iniciada pela adição de H₂O₂ 0,2 mM e o aumento da absorbância foi medida em 310 nm. Uma unidade de atividade de enzima é definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de veratraldeído por minuto.

As atividades das enzimas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase foram determinadas, e expressas em U mL⁻¹ (μmoles produto min⁻¹ L⁻¹) utilizando-se o espectrofotômetro UV-1601PC UV-visible spectrophotometer – Shimadzu. Os cálculos foram realizados a partir da Equação 1.

$$U L^{-1} = \frac{\Delta abs \times Vt \times 10^6}{\epsilon \times Va \times t \times d} \quad [U L^{-1}] \quad \text{Eq. 1}$$

Onde: Δ abs, absorbância final - absorbância inicial;
 Vt, volume reacional total (mL);
 ε, coeficiente de extinção molar (M⁻¹ cm⁻¹);
 Va, volume de caldo enzimático (mL)
 d, caminho óptico (cm) e
 t, tempo de reação (minutos).

3.6 Metodologias Utilizadas nos Cálculos

3.6.1 Variação da atividade enzimática

$$dP = P_{m\acute{a}x} - P_o \quad [U L^{-1}] \quad \text{Eq. 2}$$

Onde: dP, variação da atividade enzimática (U L⁻¹);
 P_{máx}, atividade enzimática máxima obtida no cultivo (U L⁻¹) e
 P_o, atividade enzimática no início do processo (U L⁻¹).

$$dPm = PP_{m\acute{a}x} - P_o \quad [U L^{-1}] \quad \text{Eq. 3}$$

Onde: dP_m, variação da atividade enzimática no tempo em que a produtividade de lacase é máxima (U L⁻¹);

$PP_{\text{máx}}$, atividade enzimática no tempo em que a produtividade é máxima, obtida a partir da tangente à curva ($U L^{-1}$) e

P_0 , atividade enzimática no início do processo ($U L^{-1}$).

3.6.2 Fator de conversão de glicose em atividade enzimática

$$Y_{P/S} = \frac{dP}{S_0 - S} \quad [U g^{-1}] \quad \text{Eq. 4}$$

Onde: $Y_{P/S}$, fator de conversão de glicose em atividade enzimática ($U g^{-1}$);

dP , variação da atividade enzimática ($U L^{-1}$);

S_0 , concentração de glicose no início do processo ($g L^{-1}$).

S , concentração de glicose no tempo que a atividade de lacase é máxima ($P_{\text{máx}}$) ($g L^{-1}$).

3.6.3 Produtividade enzimática global

$$Q_p = \frac{dP}{t} \quad [U L^{-1} h^{-1}] \quad \text{Eq. 5}$$

Onde: Q_p , produtividade enzimática global ($U L^{-1} h^{-1}$);

dP , variação da atividade enzimática ($U L^{-1}$) e

t , tempo corresponde ao ponto em que a atividade de lacase é máxima ($P_{\text{máx}}$) (h).

3.6.4 Produtividade enzimática máxima

$$Q_{pm} = \frac{dP_m}{t_p} \quad [U L^{-1} h^{-1}] \quad \text{Eq. 6}$$

Onde: Q_{pm} , produtividade enzimática máxima ($U L^{-1} h^{-1}$);

dP_m , variação da atividade enzimática no tempo em que a produtividade de lacase é máxima ($U L^{-1}$);

t_p , tempo do processo correspondente ao tempo em que a produtividade de lacase é máxima, obtida a partir da tangente à curva ($PP_{\text{máx}}$) (h).

3.7 Construção das curvas cinéticas e análises estatísticas

Os resultados obtidos com os ensaios realizados em frascos agitados foram avaliados através do Teste Q de Dixon, com nível de confiança de 95%, a fim de avaliar a rejeição de valores desviantes (RORABACHER, 1991). Os resultados obtidos com os ensaios realizados em biorreator foram avaliados através do Teste de Tukey, com nível de confiança de 95%, a fim de avaliar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros de processo das repetições. As curvas cinéticas obtidas dos ensaios em biorreator foram traçadas utilizando-se os pontos experimentais de cada repetição (experimentos realizados em duplicata) e o “software” para tratamento de dados experimentais de cultivo microbiano (EMERSON), desenvolvido no Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT) por Wagner Bruna e Manuel F. Barral foi utilizado para a obtenção das curvas cinéticas “fantasmas”. O programa Origin 8.0 PRO[®] foi utilizado para desenhar os gráficos contendo as curvas “fantasmas” juntamente com os pontos experimentais de cada experimento.

3.8 Determinação do pH ótimo e Temperatura ótima

Para determinação do pH ótimo, a reação enzimática foi conduzida em solução tampão McIlvain com 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, mantendo-se as demais condições previstas no teste de atividade (item 3.5) de cada uma das enzimas. As análises foram realizadas em duplicatas.

Para determinação da temperatura ótima, a reação enzimática foi conduzida em temperaturas de incubação entre 20 e 50°C, mantendo-se as demais condições previstas no teste de atividade (item 3.5) de cada uma das enzimas. As análises foram realizadas em duplicatas.

3.9 Estabilidade das Enzimas com o pH, a Temperatura e o Tempo de Estocagem

Para realização dos testes de estabilidade com o pH, os extratos enzimáticos brutos foram incubados em diferentes intervalos de tempo (2, 4, 6, 8, 24, 48 e 72 horas), utilizando-se valores de pH de 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0, em temperatura

ambiente, sendo, na sequência realizado o teste da atividade enzimática, em triplicata, nas condições padrões do teste (item 3.5).

Para realização dos testes de estabilidade com a temperatura, extratos enzimáticos brutos foram incubados por diferentes intervalos de tempo (2 a 72 horas), em temperaturas variando entre 20 e 50°C, sendo na sequência realizado o teste da atividade enzimática, em triplicata, nas condições padrões do teste (item 3.5).

Para determinação da estabilidade das enzimas em função do tempo de estocagem, 0,5 mL do extrato enzimático bruto foi diluído em água para volume final de 25 mL. As soluções diluídas foram estocadas em refrigerador, a 4°C, e à temperatura ambiente, em duplicatas, tendo sua atividade enzimática monitorada quinzenalmente. Para análise da estabilidade em freezer (-20 °C), o caldo bruto foi congelado em eppendorfs e quinzenalmente realizado teste de atividade enzimática. As condições de análise enzimática foram mantidas conforme metodologia descrita no item 3.5.

3.10 Determinação da Constante de Michaelis-Menten (K_m) e da Velocidade Máxima de Reação ($V_{m\acute{a}x}$)

Soluções estoque de cada do substrato padrão ABTS foram preparadas nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 e 5,0 mM, mantendo os demais parâmetros de análise. As medidas foram realizadas no instante inicial da reação, quando a taxa de oxidação é linear. A análise foi realizada em duplicata e o programa utilizado para cálculo dos valores aparentes de K_m e de $V_{m\acute{a}x}$ foi o OriginPro 8.0 PRO®, através da linearização de Lineweaver-Burk, utilizando-se o modelo de Michaelis-Menten.

3.11 Degradação do composto interferente endócrino Bisfenol-A

A degradação do composto interferente endócrino foi realizada nas proporções caldo enzimático – Bisfenol-A (95% de pureza; Sigma-Aldrich) de 1,5:05, 1:1 e 0,5:1,5 totalizando 2 mL de reação e concentração de 500 mg L⁻¹ de Bisfenol-A. As misturas foram incubadas a temperatura ambiente e as extrações realizadas nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas.

Antes do processo de extração, adicionou-se as amostras uma gota de ácido acético concentrado e agitou-se. Procedeu-se, então, a extração do Bisfenol-A utilizando-se éter etílico. Analisou-se o sobrenadante quanto a concentração de Bisfenol-A utilizando Cromatógrafo Gasoso marca Agilent 6890 com detector FID. A coluna HP-5 (5% phenylmethylsiloxane), mantida a 290 °C durante a injeção e depois programada para aquecimento de 140 °C min⁻¹ à 310 °C, por 10 minutos, foi utilizada para análise quantitativa. O Bisfenol-A foi identificado durante o tempo de retenção. As concentrações do composto foram calculados com base na curva de calibração estabelecida com o padrão externo de bisfenol-A. Todas as experiências foram realizadas em triplicata e os resultados são apresentados em termos de valores médios das replicatas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo da Influência do Meio de Cultivo sobre a Produção de Enzimas - Experimentos em Frascos Agitados

A Figura 4 apresenta os valores médios de atividade de lacase utilizando os meios de cultivo solução Manachini, solução Manachini Modificada e OXI.

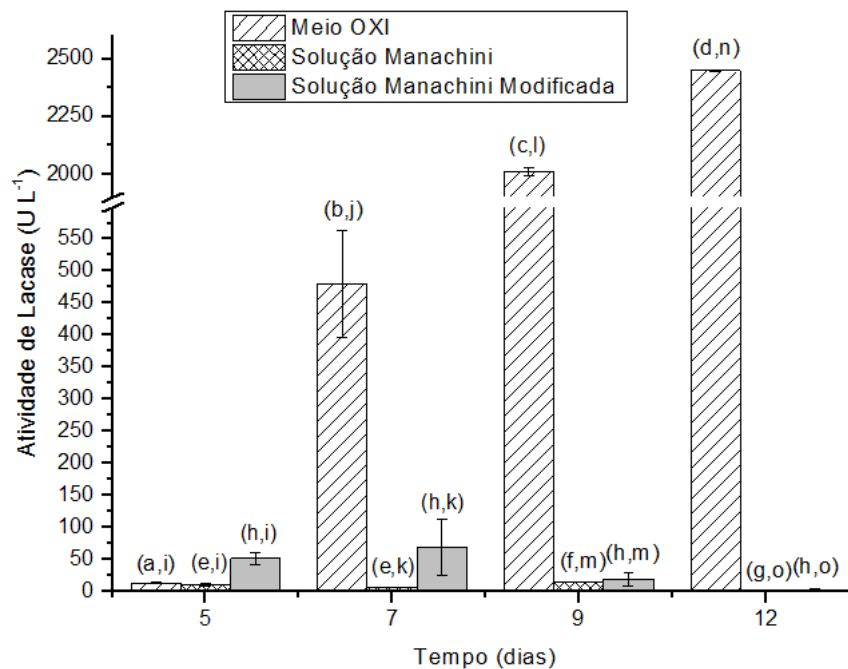


Figura 4. Valores médios de atividade de lacase (Lac) obtidos no cultivo de *P. sajor-caju* nos meios de cultivo OXI, Solução Manachini e Solução Manachini Modificada.

a, b, c, d indicam a existência ou não de diferença significativa entre os tempos de cultivo, para o meio de cultivo OXI, de acordo com teste de Tukey.

e, f, g indicam a existência ou não de diferença significativa entre os tempos de cultivo, para o meio de cultivo Solução Manachini, de acordo com o teste de Tukey.

h indica a existência ou não de diferença significativa entre os tempos de cultivo, para o meio de cultivo Solução Manachini Modificada, de acordo com o teste de Tukey.

i indica a existência ou não de diferença significativa entre os meios de cultivo, para o tempo de 5 dias, de acordo com o teste de Tukey

j, k indicam a existência ou não de diferença significativa entre os meios de cultivo, para o tempo de 7 dias, de acordo com o teste de Tukey.

l, m indicam a existência ou não de diferença significativa entre os meios de cultivo, para o tempo de 9 dias, de acordo com o teste de Tukey

n, o indicam a existência ou não de diferença significativa entre os meios de cultivo, para o tempo de 12 dias, de acordo com o teste de Tukey

De acordo com a Figura 4, observa-se maior atividade de lacase quando utiliza-se o meio de cultivo OXI. Para este meio, a atividade de lacase aumenta com o tempo de cultivo, atingindo valor máximo ($2.416,5 \pm 35,5 \text{ U L}^{-1}$) no 12º dia. Os meios de cultivo Solução Manachini e Manachini Modificada apresentaram atividade de lacase iguais entre si e bastante inferiores àquelas obtidas utilizando-se o meio de cultivo OXI, com exceção dos valores de atividade obtidos no 5º dia de cultivo, no qual não se observou diferença estatisticamente significativa entre as atividades de lacase obtidas nos três diferentes meios de cultivo.

Comparando-se os resultados obtidos com Solução Manachini e Manachini Modificada, observa-se que não houve influência da água de imersão de palha de folhas de bananeira sobre a produção de lacase por *P. sajor-caju*. Contudo, o meio de cultivo OXI (CuSO_4 150 μM , pó de cascas de banana 60 g L^{-1} , glicose 10 g L^{-1} e tartarato de amônio 5,4 mM, dissolvidos em água de imersão de palha de folhas de bananeira) propiciou atividade de lacase aproximadamente 22 vezes superior às obtidas utilizando-se os meios Solução Manachini e Solução Manachini Modificada.

Os valores de atividade de lacase obtidos neste trabalho, dos cultivos de *P. sajor-caju* em meio de cultivo OXI, em 12 dias de cultivo, são superiores aos reportados por muitos autores. Mikiashvili *et al.* (2006), que estudaram a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção de lacase por *P. ostreatus* e *P. sajor-caju*. Os maiores valores de atividade de lacase foram encontrados para as linhagens *P. ostreatus* 98 e *P. ostreatus* 108, com valores variando de 5 a 62 U L^{-1} e de 55 a 390 U L^{-1} , respectivamente, dependendo das fontes de carbono e nitrogênio. As melhores fontes de carbono e nitrogênio para produção de lacase foram glicose e peptona de soja. Bonfanti (2006), utilizando meio de cultivo composto por solução salina, serragem de *Pinus* e farelo de trigo moído, atingiu produção máxima de lacase igual a 0,54 U L^{-1} em 144 horas de cultivo. Menezes *et al.* (2009), utilizando *P. sajor-caju* e meio de cultivo a base de bagaço de cana-de-açúcar, obtiveram atividade máxima de lacase igual a 3,52 U L^{-1} em 10 dias de cultivo e utilizando *P. sp* BCCB068 atividade máxima igual a 6,23 U L^{-1} em 15 dias de cultivo. Ferreira (2009), utilizando diferentes espécies *Pleurotus* e meios de cultivo compostos por vinhaça de cana-de-açúcar e glicose ou apenas vinhaça, obteve atividade máxima de lacase em torno de 400 a 450 U L^{-1} , em 9 dias de cultivo. Libardi-Júnior *et al.* (2011) obtiveram atividade de lacase por *P. ostreatus* igual 372,5 U L^{-1} utilizando meio de cultivo composto por água, 40 g L^{-1} de pó de cascas de banana e CuSO_4 150 μM . Aragão (2012), em

estudos de bancada, avaliou o efeito da vinhaça de melaço de cana-de-açúcar na síntese de lacase por *P. sajor-caju* CCB020, sob condições de 30 °C e pH 5, e obteve como resultado atividade de 30 e 65 U L⁻¹, no 6^o e 14^o dia, para lacase.

Rabonato (2013), por sua vez, encontrou valores bastante superiores aos obtidos neste trabalho. Este autor estudou a produção de lacase por diversas espécies de cogumelos (*Lentinula edodes*, *P. ostreatus*, *P. eryngii* e *Pycnoporus sanguineus*) utilizando meio de cultivo líquido composto por uma mistura de 158g de bagaço de cana, 40g de farelo arroz, 2g de CaCO₃ e água destilada suficiente para obtenção de umidade igual a 60%. As maiores atividades de lacase observadas para *L. edodes*, *P. ostreatus*, *P. sanguineus* e *P. eryngii* foram 39,23 U mL⁻¹ ao 25^o dia de incubação, 2,5 U mL⁻¹ e 80 U mL⁻¹ ao 27^o dia de incubação, e 16,45 U mL⁻¹ ao 15^o dia, respectivamente.

A Figura 5 apresenta os valores médios de atividade de manganês peroxidase utilizando os meios de cultivo solução Manachini, solução Manachini Modificada e OXI.

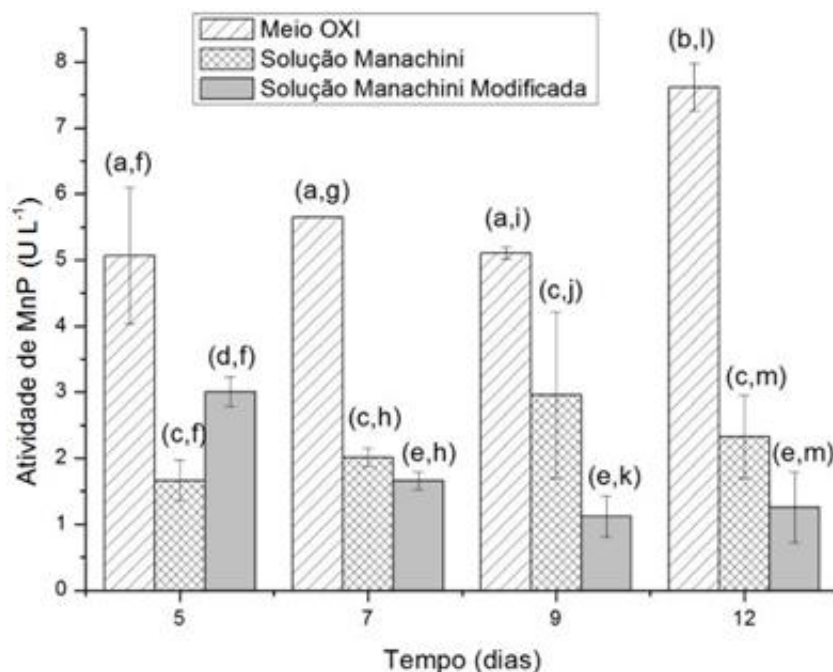


Figura 5. Valores médios de atividade de manganês peroxidase (MnP) obtidos no cultivo de *P. sajor-caju* nos meios de cultivo OXI, Solução Manachini e Solução Manachini Modificada.

a, b indicam a existência ou não de diferença significativa entre os tempos de cultivo, para o meio de cultivo OXI, de acordo com teste de Tukey.

c indica a existência ou não de diferença significativa entre os tempos de cultivo, para o meio de cultivo Solução Manachini, de acordo com o teste de Tukey.

d, e indicam a existência ou não de diferença significativa entre os tempos de cultivo, para o meio de cultivo Solução Manachini Modificada, de acordo com o teste de Tukey.

f indicam a existência ou não de diferença significativa entre os meios de cultivo, para o tempo de 5 dias, de acordo com o teste de Tukey

g, h indicam a existência ou não de diferença significativa entre os meios de cultivo, para o tempo de 7 dias, de acordo com o teste de Tukey.

i, j, k indicam a existência ou não de diferença significativa entre os meios de cultivo, para o tempo de 9 dias, de acordo com o teste de Tukey

l, m indicam a existência ou não de diferença significativa entre os meios de cultivo, para o tempo de 12 dias, de acordo com o teste de Tukey

Observa-se maior atividade de manganês peroxidase também quando se utiliza o meio de cultivo OXI, sendo a maior atividade observada no 12º dia de cultivo ($7,62 \pm 0,36 \text{ U L}^{-1}$). Entre o 5º e o 9º dia de cultivo não se observou diferenças estatisticamente significativas entre os valores de atividade de manganês peroxidase. Quanto ao cultivo em Solução Manachini, de acordo com análise estatística, não se observou diferença nos valores de atividade de manganês peroxidase ao longo do cultivo, sendo estas, nos tempos 7 e 12 dias, iguais àquelas obtidas utilizando-se o meio Solução Manachini Modificada. Utilizando-se este último meio de cultivo, obteve-se maior atividade de lacase no tempo de cultivo de 5 dias, sendo esta estatisticamente igual a obtida utilizando-se os meios de cultivo OXI e Solução Manachini.

Assim como nos cultivos para a produção de lacase, também não se observou influência da utilização de água de imersão de palha de folhas de bananeira ao invés de água destilada sobre a produção enzimática. Entretanto, o uso desta adicionada de MnSO_4 e pó de cascas de banana e, suplementada com glicose e tartarato de amônio (Meio OXI), proporcionou atividades de manganês peroxidase superiores.

Menezes *et al.* (2009), utilizando *P. sajor-caju* e meio de cultivo a base de bagaço de cana-de-açúcar, obtiveram atividade máxima de manganês peroxidase igual a $22,86 \text{ U L}^{-1}$, em 10 dias de cultivo e, utilizando a linhagem *P. sp* BCCB068 obtiveram atividade máxima igual a $31,56 \text{ U L}^{-1}$ no 5º dia de cultivo. Sartori (2011) cultivou diferentes espécies do gênero *Pleurotus sp.* em meio líquido contendo vinhaça e observou atividade de manganês peroxidase igual a $318,94 \text{ U L}^{-1}$ após 15 dias de cultivo de *P. sajor-caju*. Souza (2012), utilizando vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar na composição do meio de cultivo, obteve atividade de manganês

peroxidase igual a 16,15 U L⁻¹ no 12º dia de cultivo. Aragão (2012), em estudos de bancada, também avaliou o efeito da vinhaça de melaço de cana-de-açúcar na síntese de manganês peroxidase, utilizando a espécie *P. sajor-caju* CCB020 sob condições de 30 °C e pH 5, e obteve como resultado atividade igual a 65 U L⁻¹, no 14º dia de cultivo. Estes valores são superiores aos valores máximos obtidos neste trabalho.

Rabonato (2013), por sua vez, não encontrou atividade para as enzimas manganês peroxidase e lignina peroxidase em seus estudos utilizando diversas espécies de cogumelos (*Lentinula edodes*, *P. ostreatus*, *P. eryngii* e *Pycnoporus sanguineus*). No presente estudo, também não se observou atividade para a enzima lignina peroxidase, independentemente do meio de cultivo utilizado. Assim como também não observaram atividade para a enzima lignina peroxidase os autores Hou *et al.* (2004) e Maia (2011). Lipreri (2012) utilizando meio de cultivo composto por caldo obtido de 250 g L⁻¹ de batata cozida, adicionado de 1% (m v⁻¹) de dextrose e 0,15% (m v⁻¹) de extrato de levedura obteve produção máxima de lignina peroxidase por *P. sajor-caju* de 0,02 U mL⁻¹ em 21 dias de cultivo. Bonfanti (2006) em cultivo de *P. sajor-caju* obteve atividade máxima de lignina peroxidase de 19,27 U mL⁻¹ utilizando meio de cultivo composto por solução salina acrescida de efluente da IPC com presença de compostos fenólicos.

4.2 Estudo da Influência do pH controlado em 5,5 e sua evolução espontânea sobre a Produção de Enzimas - Experimentos em Biorreator

4.2.1. pH livre

Considerando a não detecção da enzima lignina peroxidase e a baixa produção de manganês peroxidase, comparada à produção de lacase, nos ensaios em frascos agitados, decidiu-se dar continuidade aos estudos em biorreator apenas visando à síntese de lacase. Da mesma forma, com base nos resultados obtidos em frascos agitados, os meios de cultivo solução Manachini e solução Manachini modificada não foram utilizados na continuidade do trabalho. O meio selecionado para estudo foi o OXI e enzima a lacase.

Os resultados de atividades médias de lacase, consumo de glicose e variação do pH nos ensaios em biorreator para a produção de lacase por *P. sajor-caju* utilizando meio de cultivo OXI em pH livre estão apresentados na Figura 6.

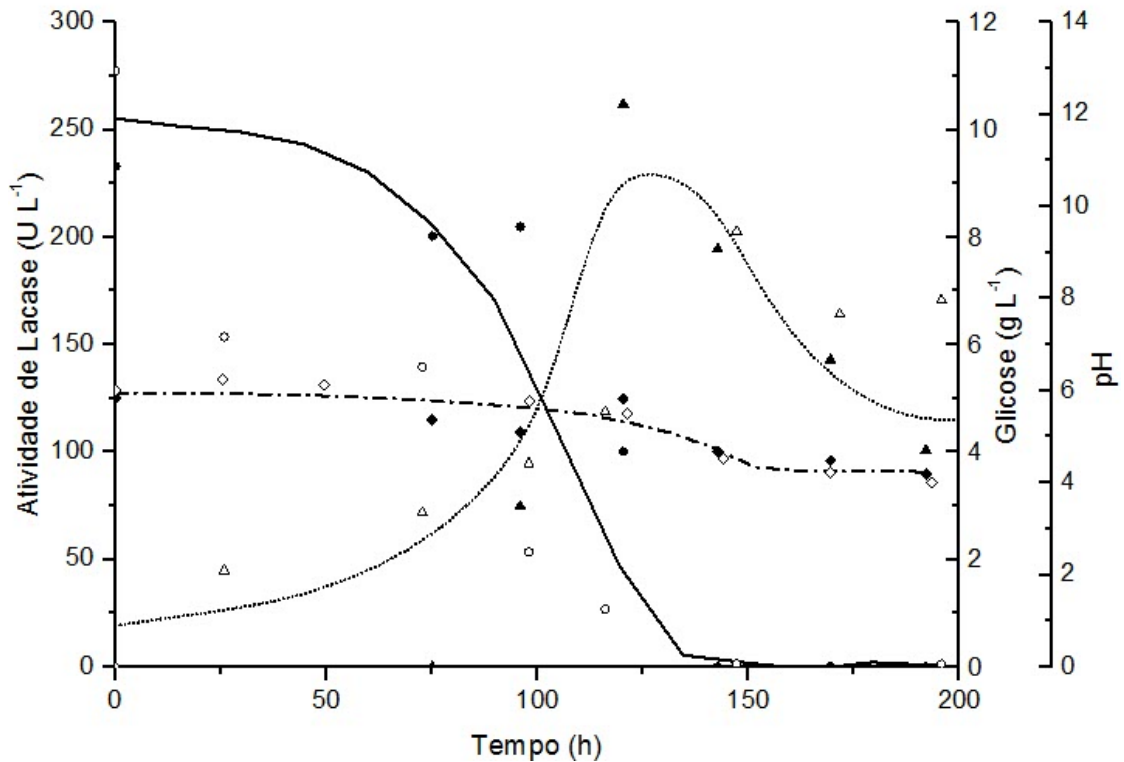


Figura 6. Variações da concentração de glicose (—, ● e ○), atividade de lacase (⋯, ▲ e Δ) e pH (—·—, ◆ e ◇) em função do tempo (horas) de cultivo de *P. sajor-caju*, em meio de cultivo OXI, sem controle do pH. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas.

O maior valor de atividade de lacase ao longo do cultivo ($210,3 \text{ U L}^{-1}$) foi observado em torno de 125 horas de processo. Neste tempo, a concentração de glicose era muito próxima de zero (aproximadamente $0,2 \text{ g L}^{-1}$). O pH inicial que era de 6,0, neste tempo encontrava-se próximo a 5,5, sendo portanto este o valor escolhido para os cultivos subsequentes, em pH controlado. A partir de 161 horas o pH tornou-se estável, em torno de 4,2. A atividade de lacase no tempo em que a produtividade em lacase é máxima (120,6 h) foi de $206,5 \text{ U L}^{-1}$. As produtividades máxima e global foram de $1,71$ e $1,67 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

4.2.2 pH controlado em 5,5

Os resultados de atividades médias de lacase e consumo de glicose dos ensaios em biorreator para a produção de lacase por *P. sajor-caju* utilizando meio de cultivo OXI e pH controlado em 5,5 estão apresentados na Figura 7.

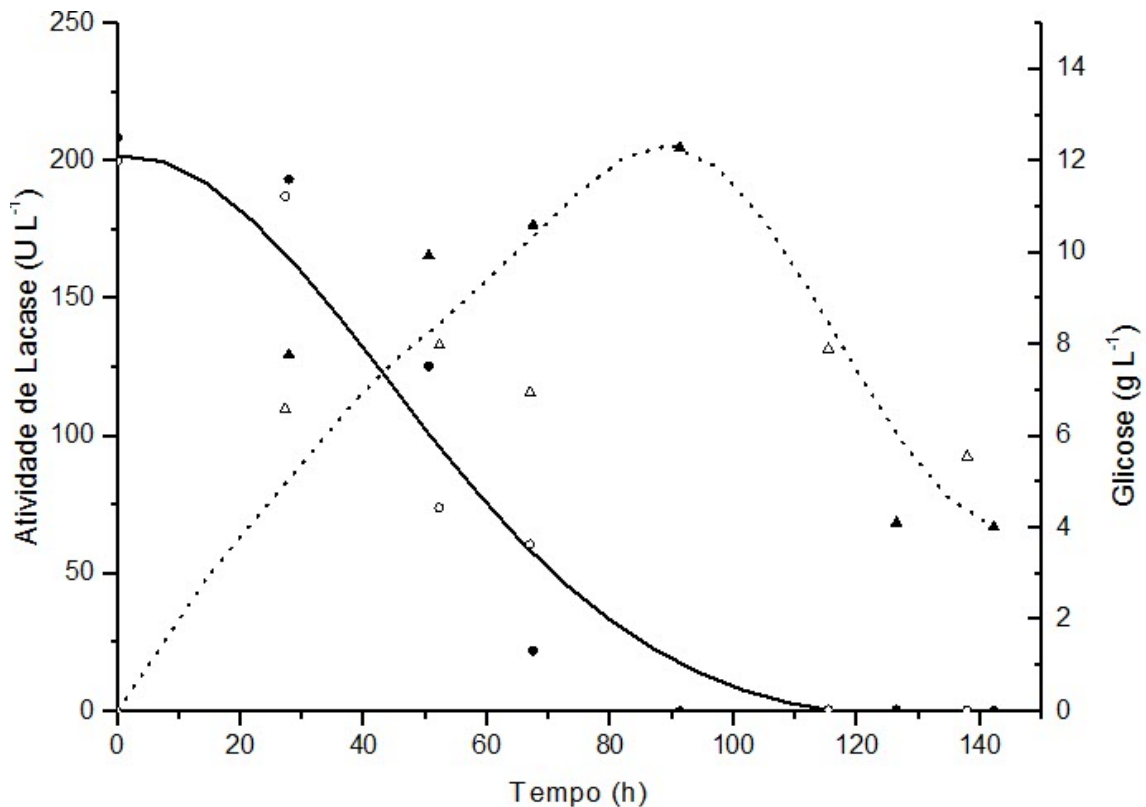


Figura 7. Variações da concentração de glicose (—, ● e ○) e atividade de lacase (···, ▲ e △) em função do tempo (horas) de cultivo de *P. sajor-caju*, em meio de cultivo OXI, com controle do pH em 5,5. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas.

O maior valor de atividade de lacase ao longo do cultivo ($205,8 \text{ U L}^{-1}$) foi observado em torno de 90 horas de processo. Neste tempo a concentração de glicose era de aproximadamente $1,3 \text{ g L}^{-1}$. O pH durante todo processo foi controlado em 5,5. A atividade de lacase no tempo em que a produtividade em lacase é máxima (14,9 h) foi de $50,0 \text{ U L}^{-1}$. As produtividades máxima e global foram de 3,3 e $2,3 \text{ U L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente.

A Tabela 4 resume os valores dos parâmetros cinéticos obtidos para os cultivos de *P. sajor-caju* utilizando meio OXI em pH livre e em pH controlado em 5,5. De acordo com análise estatística, teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%, não foi observada diferença significativa para as condições de pH avaliadas, com exceção da concentração máxima (dPm). Portanto, sugere-se o cultivo de *P. sajor-caju* em meio

de cultivo OXI para produção de lacase, em pH livre, evitando-se desta forma gastos desnecessários com reagentes ácidos e bases.

Tabela 4. Parâmetros obtidos do cultivo de *P. sajor-caju* em meio de cultivo OXI, em biorreator, em pH livre e em pH controlado em 5,5.

Parâmetros	pH livre	Erro padrão	pH 5,5	Erro padrão
dP (U L ⁻¹)	210,27	23,62	205,83	35,78
dPm (U L ⁻¹)	206,46	23,63	50,00	2,54
Yp/s (U g ⁻¹)	25,20	13,59	19,12	0,39
Qp (U L ⁻¹ h ⁻¹)	1,67	0,37	2,29	0,21
Qpm (U L ⁻¹ h ⁻¹)	1,71	0,34	3,34	0,43

Comparando-se as atividades de lacase obtidas por *P. sajor-caju* em frascos agitados (item 3.1) e em biorreator (item 3.2), observa-se que em biorreator a atividade não foi mantida, passando da faixa de 2.000 para 200 U L⁻¹, fato este que pode ser justificado pela diferença nas condições de cultivo encontradas em frascos Erlenmeyer e em biorreator (transferência de oxigênio etc.) bem como a diminuição da concentração do pó de casca de banana, diminuição esta ocasionada pelas condições de operação do cultivo, já que a utilização de 60 g L⁻¹ de cascas de banana tornara o meio muito denso e pouco homogêneo, dificultando a esterilização do material bem como a retirada de amostras.

Estudos reportados de literatura, a seguir, mostram valores de atividade de lacase, obtidos de experimentos em biorreator, da mesma ordem, ou superiores, àqueles encontrados neste trabalho, provenientes dos cultivos conduzidos em frascos agitados. Mazumder *et al.* (2008) estudaram a produção de lacase por *P. ostreatus* em biorreator e sua posterior aplicação na determinação da concentração total de antioxidante no plasma humano. A produção máxima de lacase foi obtida com adição de 10% de inóculo (384,3 U mL⁻¹) sendo aumentada para 874,0 U mL⁻¹ pela adição de 200 μmol L⁻¹ de sulfato de cobre e mantendo-se as demais condições de cultivo.

Bettin *et al.* (2011) avaliaram a produção da lacase por *P. sajor-caju* PS-2001 em biorreator utilizando meio de cultivo composto por 5 g L⁻¹ de sacarose, 1,5 g L⁻¹ de caseína, solução mineral (KH₂PO₄ 20 g L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 14 g L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 3 g L⁻¹, CaCl₂ 3 g L⁻¹, MnSO₄.H₂O 15,6 mg L⁻¹, FeSO₄ 50 mg L⁻¹, ZnSO₄ 14 mg L⁻¹, CoCl₂ 20 mg L⁻¹, ureia 3 g L⁻¹) e dois indutores, CuSO₄ 100 mg L⁻¹ e ácido gálico 100 mg L⁻¹. A

produção máxima de lacase, 40 U mL^{-1} , foi alcançada em 6 dias de cultivo. Em 7 dias de cultivo a atividade diminuiu para 20 U mL^{-1} , mantendo-se neste valor até o fim do experimento. A concentração máxima de biomassa ($5,2 \text{ g L}^{-1}$) e o consumo da fonte de carbono, quase total, coincidiram com a produção de lacase, em 6 dias de cultivo. Neste trabalho, também observou-se tal coincidência, ou seja, maior atividade de lacase quando a concentração de glicose aproximou-se de zero. Entretanto, neste trabalho, não foi possível acompanhar, ao longo do cultivo, o crescimento celular devido à presença no meio de pó de cascas de banana. Mesmo o meio de cultivo sendo homogêneo, a massa de pó de cascas de banana retirada em cada amostragem variava devido a diferença no tamanho de suas partículas. A produtividade em lacase encontrada por Bettin *et al.* (2011) foi $0,280 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$, superior a obtida neste trabalho, que foi de $0,00167$ e $0,00229 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$, para os experimentos conduzidos em pH livre e pH controlado, respectivamente.

Abo-State *et al.* (2011) estudaram os efeitos de diferentes concentrações de CuSO_4 ($0 - 900 \text{ } \mu\text{M}$) sobre a produção de lacase por *P. sajor-caju* e *P. ostreatus*. A adição de CuSO_4 aumentou a atividade de lacase pelos fungos testados, exceto na concentração de $900 \text{ } \mu\text{M}$. As maiores atividades de lacase obtidas nos cultivos de *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* iguais a $1,3$ e $1,8 \text{ U mL}^{-1}$, respectivamente, utilizando-se $300 \text{ } \mu\text{M}$ de CuSO_4 . Libardi Jr. *et al.* (2012), estudaram a produção de lacase por *P. ostreatus* em meio de cultivo Kirk Modificado (composto por $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de KH_2PO_4 , $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de CaCl_2 , $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de tartarato de amônio dibásico, $0,2 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de malte, $150 \text{ } \mu\text{M}$ de CuSO_4 e 40 g L^{-1} de cascas de banana) e registraram produção máxima de lacase de aproximadamente 1.500 U L^{-1} no 7º dia de cultivo, valor este cerca de 14% superior ao obtido neste trabalho.

Lipreri (2012) estudou o crescimento e secreção de enzimas por *P. sajor-caju* e *Lentina edodes* em cultivo submerso. Entre os meios testados, o que apresentou maior atividade enzimática foi o meio CBDY (composto por 250 g L^{-1} de batata inglesa cozida, 1% (m/v) de dextrose e 0,15% (m/v) de extrato de levedura). Quando comparado aos outros meios de estudo, a autora destacou a presença de cobre na composição da batata, o que propiciou maior atividade da enzima neste meio. A produção média de lacase para *P. sajor-caju* neste meio de cultivo foi igual a $207,4 \text{ U mL}^{-1}$ no 21º dia de cultivo.

Bettin *et al.* (2014) avaliaram a produção da lacase por *P. sajor-caju* PS-2001. O meio de cultivo foi composto de 5 g L^{-1} de sacarose, $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de caseína, solução

mineral (KH_2PO_4 20 g L^{-1} , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 14 g L^{-1} , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g L^{-1} , CaCl_2 3 g L^{-1} , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 15,6 mg L^{-1} , FeSO_4 50 mg L^{-1} , ZnSO_4 14 mg L^{-1} , CoCl_2 20 mg L^{-1} , ureia 3 g L^{-1}), os indutores testados foram CuSO_4 , álcool absoluto e compostos aromáticos (fenol, ácido benzoico, ácido gálico, ácido tânico, siringaldzina, vanilina e xilidina) todos na concentração de 100 mg L^{-1} . Maiores atividades de lacase foram obtidas com adição de siringaldzina (62,3 U mL^{-1}), ácido benzoico (58,8 U mL^{-1}) e ácido gálico (48,4 U mL^{-1}) no 9º dia de cultivo. Quando combinados estes compostos com 100 mg L^{-1} de sulfato de cobre observou-se um aumento na atividade da lacase, atingindo 72,1 U mL^{-1} para ácido benzoico e 80,6 U mL^{-1} para ácido gálico.

Muruguesan *et al.* (2006) estudaram a purificação e caracterização de lacase de *P. sajor-caju* em fermentação submersa em biorreator. O meio de cultivo foi composto de 10 g L^{-1} de glicose, 0,25 g L^{-1} de tartarato de amônio, 2,0 g L^{-1} de KH_2PO_4 , 0,5 g L^{-1} de MgSO_4 , 0,5 g L^{-1} de KCl , 0,001 g L^{-1} de cloridrato de tiamina e 1 mL da solução traço (100 mg L^{-1} de $\text{B}_4\text{O}_7\text{Na}_2$, 10 mg L^{-1} de MnSO_4 , 10 mg L^{-1} de $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}$, 10 mg L^{-1} de ZnSO_4 e 50 mg L^{-1} de CuSO_4) e xilidina como indutor enzimático. O pH inicial foi ajustado em 5,5 e a temperatura de cultivo foi mantida em 30°C. A produção de lacase alcançou o pico máximo em 8 dias com produção de 5 U mL^{-1} para o experimento sem indutor e 14 U mL^{-1} com indutor.

Zaccaria (2013) estudou o crescimento e a produção de lacase por *P. sajor-caju* PS-2001 em biorreator, em diferentes valores de pH. O meio em estudo era composto por glicose, caseína pura, sais, ácido benzoico e sulfato de cobre, sendo este último adicionado após 24 horas de cultivo. A maior atividade de lacase foi obtida em 6 dias de cultivo apresentando atividade máxima de 80 U mL^{-1} em pH 6,5, resultando em uma produtividade de aproximadamente 0,5 U $\text{mL}^{-1} \text{h}^{-1}$. Díaz *et al.* (2013) estudaram o efeito do pH na produção de biomassa e de lacase por *P. ostreatus*. O meio de cultivo utilizado foi composto por solução mineral proposta por Téllez-Téllez *et al.* (2008) contendo 10 g L^{-1} de glicose, 5 g L^{-1} de extrato de malte, 0,6 g L^{-1} de KH_2PO_4 , 0,5 g L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4 g L^{-1} de K_2HPO_4 , 0,25 g L^{-1} de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g L^{-1} de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, com pH inicial e reacional controlados entre 3,5 e 8,5. O ensaio que apresentou maior atividade de lacase foi o de pH inicial ajustado e mantido durante a fermentação em 4,5, obtendo atividade enzimática de 77.500 U L^{-1} em 408 horas de processo e resultando em produtividade cerca de 0,2 U $\text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$.

4.3 Determinação do pH ótimo e Temperatura ótima

4.3.1 Determinação do pH ótimo

A Figura 8 mostra o perfil de atividade de lacase proveniente de *P. sajor-caju* em relação ao pH.

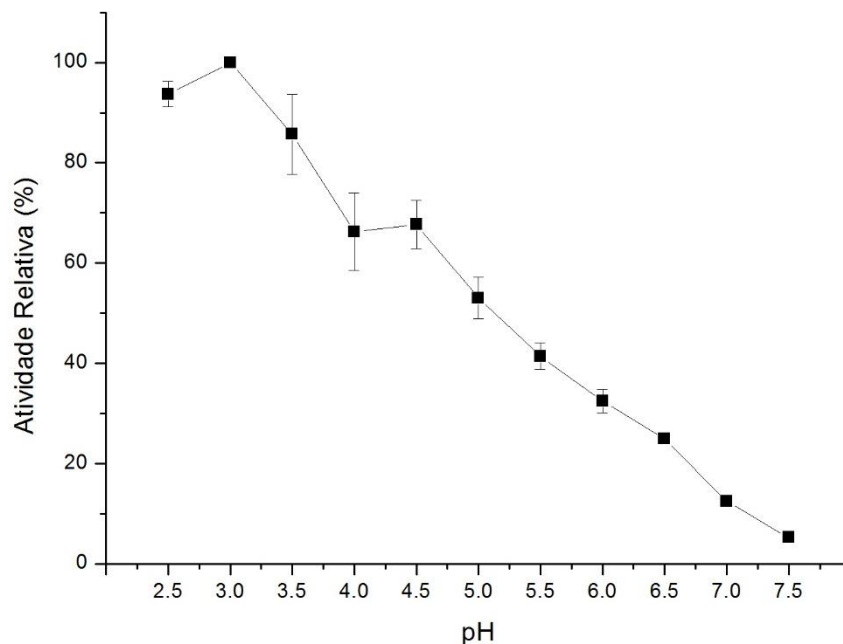


Figura 8. Atividade relativa de lacase proveniente de *P. sajor-caju* em relação ao pH. As barras representam o erro padrão das médias das replicatas.

Pode-se visualizar através da Figura 8 que o valor ótimo de pH para a reação enzimática foi 3,0. Estes valores podem ser comparados com valores de pH ótimo encontrados por vários autores (Tabela 5) utilizando o mesmo substrato (ABTS), para diferentes soluções de lacase, provenientes de diferentes espécies de *Pleurotus*. Pode-se perceber que a faixa de pH ideal para se trabalhar com esta enzima é muito restrita (entre 2,5 e 3,5), já que valores de pH acima de 4,0 levam a perda de atividade de lacase superior a 30% em relação ao pH ótimo. Em pH acima de 5,0 a perda já passa a ser superior a 50%.

Tabela 5. Valores de pH e temperatura ótimos das soluções de lacase provenientes de diferentes espécies de *Pleurotus*.

Fungo	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Autor(es)
	4,5	-	Libardi <i>et al.</i> (2012)
<i>P. ostreatus</i>	3,0	50-55	Pakhadnia <i>et al.</i> (2009)
	4,0	-	Pozdnyakova <i>et al.</i> (2006)
	3,5	30	Rashad <i>et al.</i> (2010)
	3,0-3,5	40-45	Ramírez (2003)
	4,0	40	Soto (2011)
	3,2	50	Bettin <i>et al.</i> (2011)
	3,5	50	Linke <i>et al.</i> (2009)
<i>P. sajor-caju</i>	5,0	40	Muruguesan <i>et al.</i> (2006)
	4,0-5,0	-	Rasera (2006)
	4,0	37	Sahay <i>et al.</i> (2008)
	3,0-5,0	-	Sarnthima e Khammuang (2008)
<i>P. sajor-caju</i>	3,0	50	Resultados obtidos no presente trabalho
<i>Pleurotus sp.</i>	4,5	65	More <i>et al.</i> (2011)

Pozdnyakova *et al.* (2006), em estudos utilizando lacase proveniente de *P. ostreatus*, identificaram a faixa de pH entre 3,0 e 4,5 como ideal para manutenção da atividade, sendo o pH 4,0 considerado como pH ótimo. Assim como observado neste trabalho, os autores também verificaram que para valores de pH acima de 5,0 a atividade enzimática cai drasticamente, chegando a zero em pH 8. Sahay *et al.* (2008) avaliaram o pH ótimo para lacase proveniente de *P. sajor-caju* MTCC 141, em meio de cultivo composto por bagaço. Estes autores observaram pH ótimo igual a 4,0, sendo que acima de 5 a atividade de lacase cai para abaixo de 50%.

More *et al.* (2011), em estudo sobre a caracterização da lacase proveniente de *Pleurotus sp.*, encontraram pH 4,5 como sendo o pH ótimo. E, assim como neste trabalho, constataram que valores de pH acima de 5,0 levam a diminuição de atividade em mais de 50%. Bettin *et al.* (2011), em estudo sobre a caracterização da lacase produzida por *P. sajor-caju* PS-2001, observaram três picos de pH ótimo (2,4, 3,2 e 4,4). Os autores justificam a presença de três picos de atividade devido a diferentes isoformas de lacase produzidas pelo fungo.

4.3.2 Determinação da temperatura ótima

A Figura 9 mostra o perfil de atividade de lacase proveniente de *P. sajor-caju* em relação à temperatura.

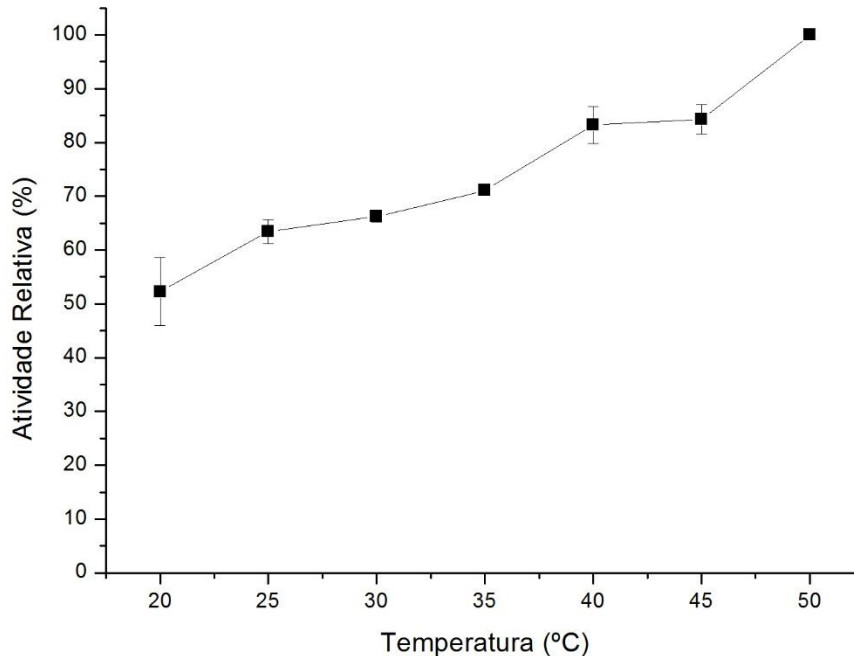


Figura 9. Atividade relativa de lacase proveniente de *P. sajor-caju* em relação à temperatura. As barras representam o erro padrão das médias.

Observa-se por meio da Figura 9, que a medida que se aumenta a temperatura de reação, aumenta-se a atividade de lacase, para a faixa de temperatura testada, sendo o maior valor de atividade observado em 50°C. É sabido que a temperatura tem grande influência sobre a velocidade das reações, e que a medida que aumenta-se a temperatura, propicia-se maior encontro/choque entre as moléculas reagentes, ou como ganho de energia cinética e aumento do número de moléculas no estado de transição, suficiente para se completar a reação. Contudo, valores extremamente altos de temperatura devem provocar o rompimento de ligações químicas e, conseqüentemente, a desnaturação da enzima (SKOOG *et al.*, 2007). No teste realizado neste trabalho, esta temperatura não foi atingida, significando que a temperatura de desnaturação da enzima encontra-se acima de 50 °C.

A Tabela 5 apresenta valores de temperatura e pH ótimos para isoformas de lacase provenientes de diferentes espécies de *Pleurotus*.

Muruguesan *et al.* (2006), em estudo sobre a caracterização de lacase por *P. sajor-caju*, encontraram temperatura ótima de reação igual a 40°C. Em temperaturas superiores a atividade caiu drasticamente. Sahay *et al.* (2008) observaram temperatura ótima para a reação de lacase proveniente de *P. sajor-caju* em 37 °C. Em 45°C os autores observaram perda de cerca de 50% da atividade.

Bettin *et al.* (2011), em estudo sobre a caracterização da lacase produzida por *P. sajor-caju* PS-2001, observaram temperatura ótima de reação igual a 50°C. More *et al.* (2011) também obtiveram valores elevados para temperatura ótima, sendo a maior atividade observada em 65°C. Acima de 75°C os autores observaram decréscimo de aproximadamente 100% na atividade de lacase.

4.4 Estabilidade das Enzimas com pH, Temperatura e Tempo de Estocagem

4.4.1 Estabilidade com o pH

A Figura 10 mostra o perfil de estabilidade da lacase proveniente do cultivo de *P. sajor-caju*, em meio de cultivo OXI, com o tempo, em diferentes valores de pH, em temperatura ambiente. Este experimento teve como objetivo constatar por quanto tempo a enzima permanece ativa em diferentes valores de pH.

De acordo com a Figura 10, pode-se observar maior estabilidade da enzima nos valores de pH entre 5 e 8. Observa-se atividade relativa superior a 80% ao longo do tempo nesta faixa de pH, sendo em pH 7,0, após 72 horas de incubação, observada atividade relativa de 95,7 %. Em pH 8,0, após 72 horas, a atividade é de 91,2%. Em pH 3,0 e 4,0 constata-se queda acentuada de atividade, principalmente em pH 3, o qual foi determinado como sendo o pH ótimo neste trabalho (item 3.3). Neste valor de pH (3,0) a atividade cai em torno 50% em apenas 4 horas de incubação e, após 24 horas, a enzima não apresenta mais atividade. Em pH 4 a atividade enzimática cai menos bruscamente, porém em 48 horas a enzima perde 50% da sua atividade.

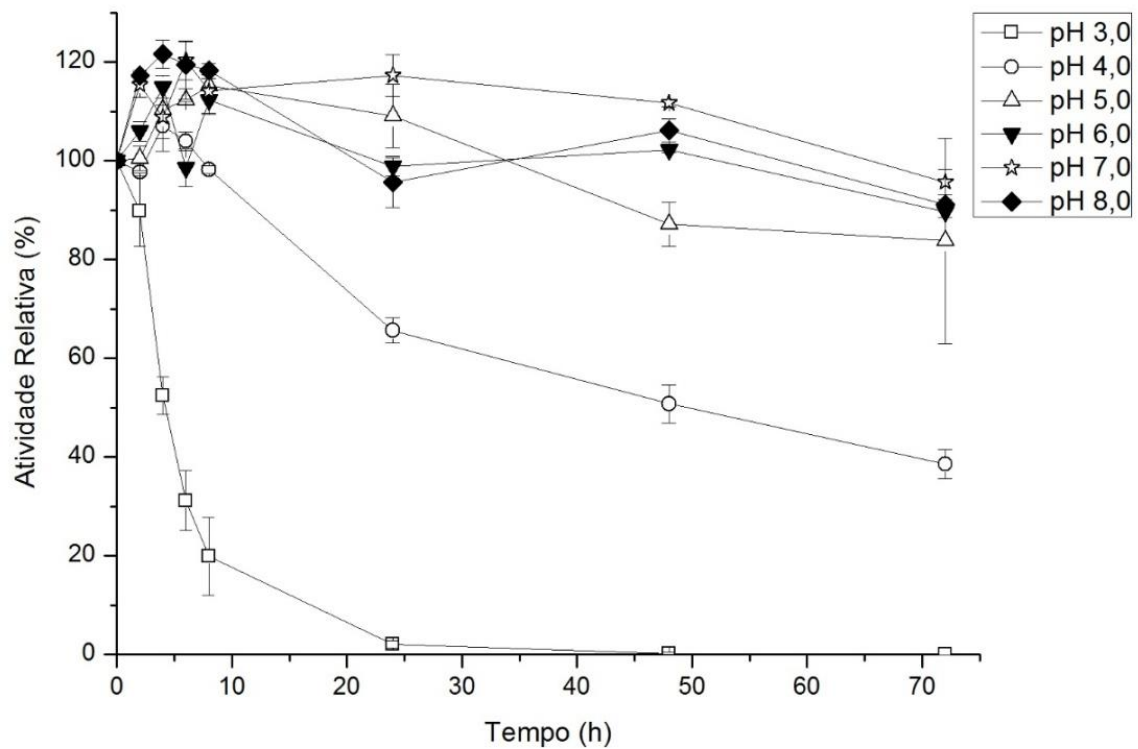


Figura 10. Cinética da estabilidade da enzima lacase, proveniente do cultivo de *P. sajor-caju*, em meio de cultivo OXI, em diferentes valores de pH. As barras representam o erro padrão das médias.

Liu *et al.* (2009) avaliaram a estabilidade de lacases em relação ao pH obtidas do cultivo de *P. ostreatus* linhagem 10969. Os autores avaliaram a estabilidade enzimática na faixa de pH de 1,0 a 7,0, em temperatura de 25°C, por 60 minutos. O valor de pH que se mostrou mais favorável, com atividade em torno de 90% ao final do tempo de incubação, foi o 4,0. Valores superiores diminuíram a atividade para em torno de 70% (pH 5,0) e 40% (pH 6,0). Valores de pH inferiores a 4,0 diminuíram ainda mais a atividade, para a faixa de 0 a 20%. Comparando estes resultados com os obtidos neste trabalho para 60 minutos (analisando a tendência da curva), observa-se que em pH 4,0 a enzima mantinha quase 100% de atividade e, mesmo em pH 3,0, a atividade era da ordem de 95%.

Libardi Jr. *et al.* (2012) avaliaram a estabilidade de lacases obtidas do cultivo de *P. ostreatus* na faixa de pH de 3,0 a 8,0, à temperatura ambiente, num intervalo de tempo de 72 horas. Os autores encontraram maior estabilidade em pH 6,0, sendo que após 24 horas a enzima mantinha-se com cerca de 50% da atividade inicial. Valores extremos de pH influenciaram negativamente a estabilidade da enzima, sendo que em pH 3,0 e 8,0, em 4 horas de incubação, restavam menos de 5% de atividade,

chegando a zero em 8 horas. Comparativamente, a enzima de *P. sajor-caju* avaliada neste trabalho mostrou-se mais estável com o pH. Em pH 8,0 manteve 91,2% de atividade após 72 horas de incubação e após 4 horas de incubação em pH 3,0 ainda mantinha 50% de atividade.

4.4.2 Estabilidade com a temperatura

A Figura 11 mostra o perfil de estabilidade da lacase proveniente do cultivo de *P. sajor-caju*, em meio de cultivo OXI, com o tempo, em diferentes temperaturas (20, 30, 40 e 50°C).

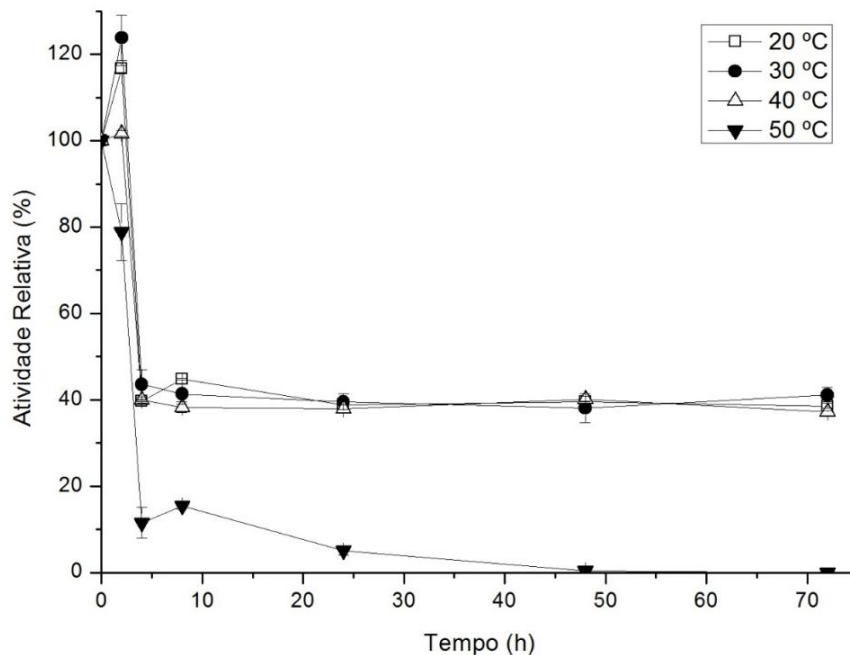


Figura 11. Perfil de estabilidade térmica da lacase, proveniente do cultivo de *P. sajor-caju* em meio de cultivo OXI, com o tempo. As barras representam o erro padrão das médias.

De acordo com a Figura 11, observa-se perfil semelhante e queda brusca da estabilidade entre 2 e 4 horas de incubação, independentemente da temperatura. Neste período, observa-se perda de aproximadamente 60% da atividade, nas temperaturas de 20, 30 e 40°C e de aproximadamente 90% a 50°C. Em 48 horas, a 50°C, a enzima é totalmente inativada, enquanto nas temperaturas mais baixas, mantém cerca de 40% de atividade até 72 horas, tempo de duração do teste. Desta forma, o comportamento da enzima frente à estabilidade térmica limita sua aplicação

em operações que necessitem de período superior a 4 horas de processo. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos a 20, 30 e 40 °C no intervalo de tempo investigado.

Lo *et al.* (2001) estudaram a estabilidade térmica de lacases de *P. sajor-caju* em temperaturas entre 35 e 65°C. Os autores observaram maior estabilidade a 35°C, temperatura na qual a atividade manteve-se estável, com 85% de atividade, por 2 horas. Em temperaturas mais elevadas os autores verificaram gradual inativação da enzima, sendo observado em 5 minutos de incubação perda de atividade de 40% e 75% para 55 e 65°C, respectivamente.

Rasera (2006) avaliou a estabilidade térmica de lacases provenientes do cultivo de *P. sajor-caju* a 20, 30, 40 e 50°C, em tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ pH 5, e observou grande sensibilidade da enzima à temperatura. Assim como observado neste trabalho, após 2 horas de incubação ocorreu uma queda acentuada na atividade enzimática das soluções mantidas: 30% a 30 °C, 90% a 40 °C e perda total da atividade a 50°C. A temperatura que propiciou maior estabilidade enzimática foi a de 20°C, que em 24 horas de incubação apresentou perda de atividade em torno de 20% da atividade inicial.

Muruguesan *et al.* (2006) estudaram a termoestabilidade de lacases de *P. sajor-caju* variando a temperatura de incubação entre 30 e 70 °C durante uma hora. Assim como observado neste trabalho, os autores obtiveram, ao final do tempo de incubação, atividade relativa estável de 100% para a temperatura de 30°C. A 40°C a enzima manteve 90% da atividade inicial e a 50°C, 50% da atividade inicial. Em temperaturas superiores (60 e 70°C), em 5 minutos de incubação, observou-se atividade enzimática inferior a 20%, sendo a desnaturação observada em 40 e 20 minutos, para 60 e 70°C, respectivamente.

Bettin *et al.* (2011), avaliaram a estabilidade com a temperatura de lacase de *P. sajor-caju* numa faixa de temperatura de 20 a 60 °C, por 168 horas. Os autores observaram maior estabilidade da enzima nas temperaturas de 20 e 30 °C. A 40 °C observou-se queda de 50% da atividade em 48 horas de incubação e, em 50 e 60°C, a enzima foi inativada em menos de 5 horas de incubação.

Libardi Jr. *et al.* (2012) estudaram a estabilidade térmica de lacase por *P. ostreatus* nas condições de 4 a 50 °C por 72 horas e observaram, também para esta espécie, uma rápida perda na atividade nas primeiras duas horas de incubação. Em

72 horas de incubação, apenas nas temperaturas de 4°C e 14°C 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.

Por outro lado, Pakhadinia *et al.* (2009), avaliando também a estabilidade térmica de lacase de *P. ostreatus* nas temperaturas de 40 e 60°C, observaram atividade inalterada por 180 horas de incubação a 40 °C. Entretanto a 60° C, a atividade caiu mais de 50% em 20 minutos.

4.4.3 Tempo de estocagem

A Figura 12 mostra o perfil de estabilidade da lacase proveniente do cultivo de *P. sajor-caju*, em meio de cultivo OXI, com o tempo, em diferentes condições de estocagem: temperatura ambiente, geladeira e freezer.

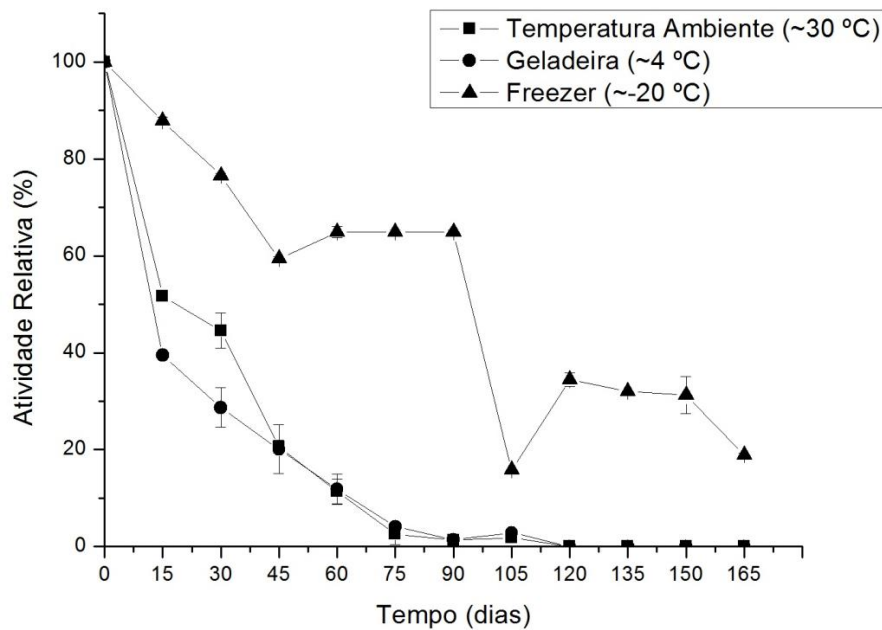


Figura 12. Cinética da estabilidade da enzima lacase, proveniente do cultivo de *P. sajor-caju*, em meio de cultivo OXI, em diferentes condições de estocagem: temperatura ambiente, geladeira e freezer. As barras representam o erro padrão das médias.

Gil *et al.* (2009) avaliaram a estabilidade com o tempo de estocagem da lacase de *Pycnoporus sanguineus* a 4 °C. A enzima mostrou-se estável por mais 6 meses, diferentemente da enzima de *P. sajor-caju* investigada neste trabalho, que na metade

desse tempo já estava totalmente inativada. Côrtes *et al.* (2010) estudaram diferentes métodos de estocagem da lacase de *Lentinus edodes*, durante 8 semanas. O armazenamento do extrato puro concentrado em suspensão de sulfato de amônio 80%, juntamente com temperatura de -5°C , foi aquele que propiciou a maior estabilidade enzimática, aproximadamente 100% durante todas as 8 semanas de experimento.

More *et al.* (2011) avaliaram a estabilidade com o tempo de estocagem para lacase de *Pleurotus sp* em temperatura ambiente e a -4°C . A enzima apresentou-se estável por 20 dias quando estocada em temperatura ambiente e por 60 dias quando estocada a -4°C .

4.5 Determinação da Constante de Michaelis-Menten (K_m) e da Velocidade Máxima de Reação ($V_{m\acute{a}x}$)

A determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ são de grande importância na área biotecnológica, pois é por meio destes que se avalia a velocidade de transformação do complexo enzima-substrato ($V_{m\acute{a}x}$) e a afinidade da enzima pelo substrato (K_m). No presente trabalho, obteve-se valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ iguais a 3,78 mM e $1.111,11 \mu\text{M L}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectivamente.

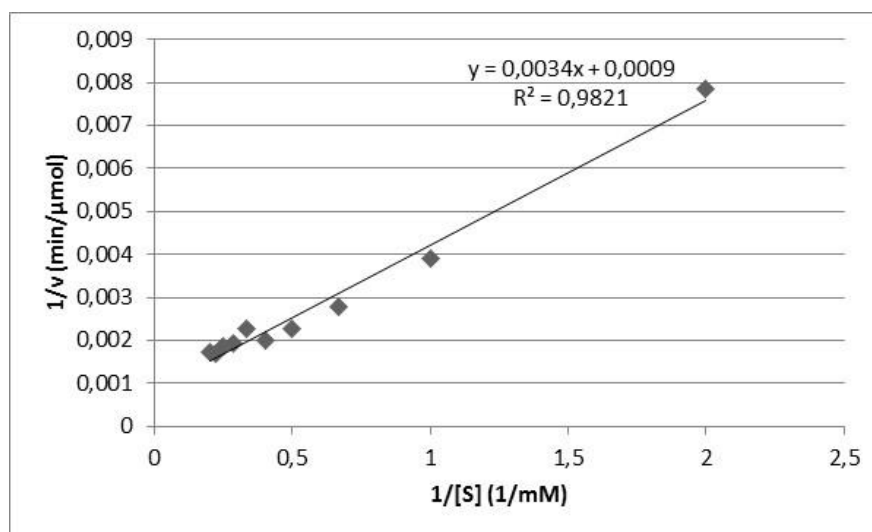


Figura 13. Reta da equação de linearização de Lineweaver-Burk para obtenção de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da lacase obtida do cultivo de *P. sajor-caju*, em meio de cultivo OXI.

Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de lacase de diferentes espécies de *Pleurotus* são apresentados na Tabela 6. A diferença entre estes parâmetros, obtidos por cada autor, pode ser explicada pelas diferenças nas composições dos meios de

cultivo ou do substrato utilizado, assim como das condições de cultivo. Desta forma, diferentes isoenzimas são produzidas por cada fungo, assim como compostos inibidores da atividade de lacase.

Tabela 6. Parâmetros cinéticos da enzima lacase proveniente de diferentes espécies de *Pleurotus*.

Espécie	Substrato	K_m	$V_{máx}$	Autores
<i>P. ostreatus</i>	ABTS	0,11 mM	11 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	Pozdnyakova <i>et al.</i> (2006)
	ABTS	14 μM	-	Pakhadinia <i>et al.</i> (2009)
	ABTS	216 μM	-	Libardi <i>et al.</i> (2012)
	ABTS	0,092 mM	-	Lo <i>et al.</i> (2001)
<i>P. sajor-caju</i>	ABTS	0,3 mM	265 $\mu\text{M min}^{-1}$	Rasera (2006)
	ABTS	56 μM	-	Muruguesan <i>et al.</i> (2006)
	2,6-dimetoxifenol	35 μM	-	Sahay <i>et al.</i> (2008)
<i>P. sajor-caju</i>	ABTS	3,78 mM	1.111,11 $\mu\text{M min}^{-1}$	Este trabalho
<i>P. sp.</i>	ABTS	250 mM	0,33 $\mu\text{M min}^{-1}$	More <i>et al.</i> (2011)

Os valores de K_m e $V_{máx}$ obtidos neste trabalho mostram grande afinidade da enzima pelo substrato quando se comparam estes valores com os apresentados na Tabela 6. O coeficiente de correlação encontrado para a Lineweaver-Burk foi de 0,9821 (Figura 13).

4.6 Degradação do composto interferente endócrino Bisfenol-A

A Figura 14 apresenta os percentuais de degradação de Bisfenol-A por *P. sajor-caju* em 24, 48 e 72 h de incubação, em diferentes composições de volume do extrato enzimático (282,96 U L⁻¹) e da solução de Bisfenol-A (500 mg L⁻¹ equivalente a 2,19 mM).

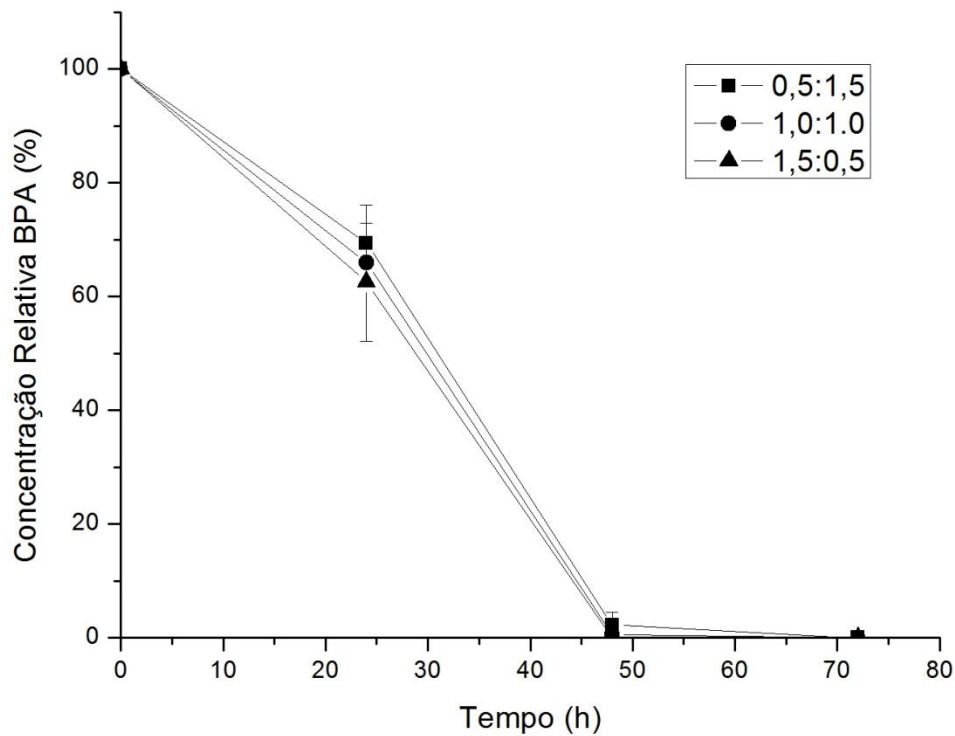


Figura 14. Percentual de degradação de bisfenol-A pelo caldo bruto contendo lacase proveniente de *P. sajor-caju*.

Observa-se, por meio da Figura 14, percentual de degradação semelhante para todas as composições extrato enzimático bruto:solução de Bisfenol-A, ou seja, após 24 h observa-se degradação de aproximadamente 40% para todas as três composições testadas, e de 100% em 48 h de incubação.

Tanaka *et al.* (2001) estudaram a degradação de BPA presente em solos contaminados utilizando a enzima lacase proveniente dos fungos *Trametes versicolor* e *Pycnoporus coccineus*. O estudo mostrou redução de 75% do bisfenol-A após 5 horas de reação quando utilizada lacase de *Trametes versicolor*. No entanto, a lacase proveniente de *Pycnoporus coccineus* não apresentou eficiência na degradação do composto.

Nakamura *et al.* (2003) estudaram a degradação de compostos interferentes endócrinos presentes em águas residuais de uma estação de tratamento utilizando a enzima lacase de *Trametes* sp. Os estudos mostraram eficiente degradação e conversão de BPA (100 ppm) em H₂O e CO₂ em 4 horas de incubação na presença de lacase (0,8 U mL⁻¹), ou seja, após tratamento enzimático (0,8 U mL⁻¹ de lacase), os autores verificaram redução de 75 a 85% de degradação dos compostos interferentes endócrinos presentes nas amostras. A decomposição de BPA por lacase de

Corioloopsis polyzona foi estudada por Cabana *et al.* (2007) e resultou na eliminação total do BPA, com concentração inicial de 22 μM e atividade enzimática de 10 U L^{-1} após 4 horas de reação.

Arboleda *et al.* (2006) avaliaram a biorremediação de águas residuais da indústria de polímeros, contendo o interferente endócrino bisfenol-A, pela ação da enzima lacase de *Ganoderma sp.* A degradação do BPA foi avaliada variando pH e temperatura de ensaio. Os melhores resultados foram obtidos após 6 horas de tratamento com caldo enzimático bruto apresentando remoção de 93,7% do interferente, em pH 5, temperatura de 60 °C e atividade enzimática de 4.000 U L^{-1} .

Cajthaml *et al.* (2009) estudaram a capacidade de degradação de interferentes endócrinos por oito linhagens fúngicas ligninolíticas (*Irpex lacteus* 617/93, *Bjerkandera adusta* 606/93, *Phanerochaete chrysosporium* ME 446, *Phanerochaete magnoliae* CCBAS 134/I, *Pleurotus ostreatus* 3004 CCBAS 278, *Trametes versicolor* 167/93, *Pycnoporus cinnabarinus* CCBAS 595, *Dichomitus squalens* CCBAS 750). A solução testada pelos autores foi composta por 10 mg L^{-1} de BPA, 10 mg L^{-1} de 17 α -ethinilestradiol, 3 mg L^{-1} de nonilfenol e 2,5 mg L^{-1} de triclosan. Os fungos que apresentaram maior eficiência na degradação dos compostos foram *I. lacteus* e *P. ostreatus*, com redução de 90% e 80%, respectivamente, em 7 dias de incubação.

Libardi-Júnior *et al.* (2012) avaliaram a degradação de BPA (0,25 μM – 0,057 mg L^{-1}) pelo extrato enzimático bruto de *P. ostreatus* (atividade de lacase igual a 0,5 U mL^{-1}). Os autores observaram, após 24 h de incubação, redução de 100% na concentração de BPA.

Chang e Chang (2014) avaliaram a capacidade de degradação do BPA (20 mg L^{-1}) pelo extrato enzimático bruto de *P. eryngii* e obtiveram cerca de 97% de degradação após 24 horas de incubação. Observa-se que a comparação entre os resultados obtidos pelos diferentes autores se torna complexa, uma vez que a fonte da enzima, seu grau de pureza e sua concentração, assim como a concentração do interferente endócrino variaram entre um trabalho e outro. Cabe destacar, porém, que a concentração de BPA utilizada neste trabalho foi elevada, quando comparada com aquelas utilizadas pelos autores, sendo todo o poluente degradado em 48 horas de reação.

CONCLUSÕES

Os experimentos em frascos agitados, para definição do melhor meio de cultivo para produção das enzimas lacase (Lac), manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP), revelaram maior atividade tanto de Lac quanto de MnP no meio de cultivo OXI. Os meios de cultivo solução Manachini e solução Manachini modificada apresentaram atividade de Lac e MnP iguais entre si e bastante inferiores às aquelas obtidas utilizando-se o meio de cultivo OXI. As maiores atividades de Lac e MnP em meio de cultivo OXI foram observadas no 12º dia de cultivo, iguais a $2.416,5 \pm 35,5$ e $7,62 \pm 0,36 \text{ U L}^{-1}$, respectivamente. Independentemente do meio de cultivo estudado, não se observou atividade da enzima LiP. Com base nesses resultados, o meio de cultivo OXI foi selecionado para a continuidade dos experimentos a fim de investigar a influência do pH sobre a síntese da enzima lacase em biorreator.

Não se observou influência estatisticamente significativa do controle do pH ao longo do cultivo (evolução espontânea do pH e controlado em 5,5) sobre a atividade da Lac produzida por *P. sajor-caju*. A maior atividade de Lac obtida nos experimentos com evolução espontânea do pH foi de $210,3 \text{ U L}^{-1}$ em 125 h de cultivo e, nos experimentos com pH controlado em 5,5, a atividade máxima encontrada foi de $205,8 \text{ U L}^{-1}$ em 90 h de cultivo. Estes valores são inferiores aos obtidos em experimentos em frascos agitados, o que pode ser explicado pela diferença entre as condições de cultivo encontradas em frascos Erlenmeyer e em biorreator, especialmente no que diz respeito à transferência de oxigênio. Considerando que o tempo de processo foi cerca de 30% menor no experimento conduzido em pH controlado, esperava-se maiores produtividades máxima e global nessa condição. No entanto, estatisticamente, não foram observadas diferenças significativas entre estes parâmetros.

Os testes relativos à caracterização da enzima produzida revelaram que o pH ótimo para atuação da lacase de *P. sajor-caju* é igual a 3,0 e a temperatura ótima, para a faixa de temperatura testada, igual a 50°C. Com relação à estabilidade com o pH, observou-se maior estabilidade da enzima na faixa de pH entre 5 e 8, sendo a atividade relativa superior a 80% ao longo do tempo nesta faixa de pH. Com relação à estabilidade com a temperatura, observou-se perfil semelhante, independentemente da temperatura, com queda brusca da estabilidade entre 2 e 4 horas de incubação. Neste período, observou-se perda de aproximadamente 60% da atividade, nas temperaturas de 20, 30 e 40°C e de aproximadamente 90% a 50°C. Com relação ao

tempo de estocagem, a enzima apresentou maior estabilidade quando estocada em freezer, se comparado à estocagem em geladeira e à temperatura ambiente. Nessas duas últimas condições, a atividade caiu bruscamente, para aproximadamente 50% em relação à atividade inicial, em 15 dias de estocagem. Em freezer, após 90 dias, observou-se atividade enzimática em torno de 60%. Os valores de K_m e $V_{máx}$ encontrados neste trabalho para a enzima produzida foram iguais a 3,78 mM e $1.111,11 \mu\text{M L}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectivamente, utilizando ABTS como substrato.

Os ensaios de degradação do composto interferente endócrino bisfenol-A mostrou percentual de redução semelhante para todas as composições de volume de extrato enzimático bruto versus volume de solução de Bisfenol-A, sendo que a degradação total de BPA foi observada após 48 h incubação.

PERSPECTIVAS

Com o intuito de dar continuidade ao presente trabalho a partir do aprofundamento dos estudos até então realizados, do esclarecimento das dúvidas levantadas até aqui e, na tentativa de viabilizar a aplicação do extrato enzimático bruto na degradação de resíduos contendo Bisfenol-A, algumas sugestões são apresentadas:

- aprofundar os estudos em biorreator de bancada em termos de (a) otimizar as condições de cultivo, como k_{La} e pH, a fim de aproximar as atividades obtidas em biorreator daquelas obtidas em frascos agitados e (b) aumentar a concentração de pó de cascas de banana na composição do meio de cultivo a fim de buscar a elevação da atividade enzimática, porém sem comprometer etapas do processo como esterilização do meio de cultivo, retirada de amostras etc;

- aprofundar estudos referentes à caracterização da enzima, mais especificamente, testar temperaturas superiores a 50°C a fim de identificar a temperatura ótima de reação da enzima;

- estudar a adição de estabilizantes ao extrato enzimático bruto visando à estabilização da enzima lacase, posterior comercialização do extrato e aplicação em diferentes processos industriais;

- realizar o estudo de degradação do Bisfenol-A utilizando como comparação um branco, para ter certeza que a total degradação do interferente provém da oxidação enzimática;

- investigar a capacidade do extrato enzimático bruto na degradação de concentrações de Bisfenol-A superiores a 500 mg L⁻¹; proporções solução Bisfenol-A:extrato enzimático bruto com menor concentração da enzima; influência de condições de incubação das soluções de Bisfenol-A com o extrato enzimático bruto como temperatura, pH e luminosidade sobre o percentual de degradação;

- estudar a capacidade do extrato enzimático bruto na degradação do Bisfenol-A presente em resíduos sólidos por meio da inserção destes resíduos cominuídos de diferentes formas, e em diferentes proporções, na composição dos meios de cultivo líquido e sólido, assim como, por meio da incubação destes resíduos com o extrato enzimático bruto, em diferentes condições de incubação.

Além disso, sugere-se aprofundar os estudos com relação à enzima manganês peroxidase, a qual apresentou atividade inferior àquela da enzima lacase, porém similar e/ou superior às reportadas pela literatura. Sugere-se, portanto:

- estudar, em frascos agitados, novas composições de meio de cultivo, assim como diferentes indutores, a fim de maximizar a atividade da enzima manganês peroxidase;

- estudar, em biorreator de bancada, a otimização das condições de cultivo para síntese desta enzima;

- realizar a caracterização da enzima em termos de pH e temperatura ótimos, estabilidade com o pH, temperatura e condições de estocagem; determinar os valores de K_m e $V_{máx}$;

- avaliar a capacidade da enzima MnP na degradação de compostos interferentes endócrinos por extratos enzimáticos brutos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIB - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA INDÚSTRIAS BIOMASSA BRASIL BIOMASSA E ENERGIA RENOVÁVEL. **Inventário Residual Brasil - WoodPellets - Briquete – Energia**, 2011. E – book. Disponível em: <http://pt.calameo.com/read/000200968cc3a949579a0>. Acesso em 05/07/2014.

ABO-STATE, M. A. M., KHATAB, O., ABO-EL, A. & MAHMOUD. Factores affecting laccase production by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. **World Applied Sciences Journal**. vol. 14, nº. 11, p.1607-1619, 2011.

AGUIAR, M. M.; FERREIRA, L. F. R.; MONTEIRO, R. T. R. Use of Vinasse and Sugarcane Bagasse for the Production of Enzymes by Lignocellulolytic Fungi. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.53, nº. 5, p. 1245-1254, 2010.

AKINDAHUNSI, A. A., & OYETAYO, F. L. Nutrient and antinutrient distribution of edible mushroom, *Pleurotus tuber-regium* (fries) singer. **LWT**, v. 39, p. 548–553, 2006.

ALEXANDRINO, A.M.; FARIA, H.G.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciênc. Technol. Aliment.**, Jun 2007, vol.27, nº.2, p.364-368. ISSN 0101-2061, 2007.

ALVES, C.; FLORES, L. C.; CERQUEIRA, T. S.; TORALLES, M. B. P. Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, nº. 5, p. 1005-1014, 2007.

ARAGÃO, M. S. S. Tratamento da vinhaça com *P. sajor-caju* CCB020 em testes de bancada e reator air-lift. **Dissertação de Mestrado** – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade de Tiradentes, Sergipe, 2012.

ARBOLEDA, C.; MEJÍA, A. I.; JIMÉNEZ, G. A.; PENNINCK, M. J. Producción de la fenoloxidasa lacasa del *Ganoderma sp.* y su aplicación en la bioremediación de aguas

residuales. In: **XI Congreso Internacional y nacional de ciências ambientais**, 2006.

ARORA, D. S., GILL, P. K. Laccase production by some white rot fungi under different nutritional condition. **Bioresource Technology** vol.73, p.283-285, 2000.

ASTHER, M.; LESAG, L.; DRAPRON, R.; CORRIEU, G.; ODIER, E. Phospholipid and fatty acid enrichment of *Phanerochaete chrysosporium* INA-12 relation to ligninase production. Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 27, p. 393-398, 1988. In.: PATRICK, F.; MTUI, G.; MSHANDETE, A. M.; KIVAISI, A. Optimization of laccase and manganese peroxidase production in submerged culture of *Pleurotus sajor-caju*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, nº. 50, p. 10166-10177, 2011.

BALDRIAN, P. Fungal Laccases occurrence and properties. **FEMS Microbiol. Rev.** nº. 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.

BERKNER S.; STRECK, G.; HERRMANN, R. Development and validation of a method for determination of traces levels of alkylphenols and bisphenol A in atmospheric samples. **Chemosphere**, v. 54, p. 575-584, 2004.

BESERRA, M. R.; SCHIAVINI, J. A.; RODRIGUES, W. C.; PEREIRA, C. S. S. O Bisfenol A: Sua Utilização e a Atual Polêmica em Relação aos Possíveis Danos à Saúde Humana. **Revista Eletrônica TECEN**, Vassouras, v. 5, n. 1 p. 37-46, 2012.

BETTIN, F.; ROSA, L. R.; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T. A.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M.; DILLON, A. J. P. Growth kinetics, production, and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 758–764, 2011.

BETTIN, F.; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T. A.; SILVEIRA, M. M.; DILLON, A. J. P. Additive effects of CuSO₄ and aromatic compounds on laccase production by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 using sucrose as a carbon source. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, N^o. 02, p. 335-346, 2014.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, vol. 30, n^o. 3, p. 651-666, 2007.

BINOD P., SINGHANIA R. R., SOCCOL C. R., PANDEY A. Industrial enzymes, in *Advances in Fermentation Technology*. **Asiatech Publishers**, New Delhi, India, 2008

BOLONG, N.; ISMAIL, A. F.; SALIM, M. R.; RANA, D., MATSUURA, T., TABE-MOHAMMADI, A. Negatively charged polyethersulfone hollow fiber nanofiltration membrane for the removal of bisphenol A from wastewater. **Separation and Purification Technology**, v. 73, p. 92-99, 2010.

BONFANTI, P. Utilização de *Pleurotus sajor-caju* na redução da concentração de compostos fenólicos presentes no efluente da indústria de papel e celulose. **Dissertação de mestrado** do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2006.

BONONI, V. L.; CAPELARI, M.; MAZIEIRO, R.; TRUFEM, S. F. B. Cultivo de cogumelos comestíveis. São Paulo: **Ícone**, 1995.

BUSWEL, J. A.; CA, Y.; CHANG, S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, n^o. 1, p. 81-87, 1995.

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

CAMERON, M. D., TIMOFEEVSKI, S., AUST, S. D. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol.54, p.751-758, 2000.

CESA, M. ; RAMPINELLI, J. ; BONATTI CHAVES, M. ; SILVEIRA, M. L. L. ; GERN, R. M. M. ; WISBECK, E. ; FURIGO JÚNIOR, A. ; FURLAN, S. A. Influência das concentrações de fonte de carbono e fonte de nitrogênio sobre a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia - ALAM, 2012, Santos - SP. **Caderno de Resumos do XXI ALAM**, 2012.

CESA, M.; RAMPINELLI, J. R.; CHAVES, M. B.; SILVEIRA, M. L. L.; WISBECK, E.; FURLAN, S. A.; GERN, R. M. M. Influência da adição de glicose, tartarato de amônio e ajuste do pH do meio de cultivo formulado com resíduos agroindustriais da região de Joinville sob a atividade de lacase por *Pleurotus ostreatus*. **Caderno de Iniciação à Pesquisa (UNIVILLE)**, v. 15, p. 119-123, 2013.

CHANG, B.; CHANG, Y. Biodegradation of toxic chemicals by *Pleurotus eryngii* in submerged fermentation and solid-state fermentation. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. XX, p. 1-7, 2014.

CHEN, P. J.; LINDEN, K. G.; HINTON, D. E.; KASHIWADA, S.; ROSENFELDT, E. J.; KULLMAN, S. W. Biological assessment of bisphenol A degradation in water following direct photolysis and UV advanced oxidation. **Chemosphere**, v. 65, p. 1094-1102, 2006.

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. vol.58, p.582-594, 2002.

COLEN, G. Isolamento de fungos filamentosos produtores de lipases. Minas Gerais: UFMG. **Tese de Doutorado** – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia da UFMG, Minas Gerais, 2006.

CÔRTEZ, M. V. C. B.; MENEZES, R. R.; PAIVA, L. M. C.; ANTUNES, O. A. C. Purificação e caracterização parcial de uma enzima lacase (ec 1.10.3.2) extracelular obtida através de fermentação em fase sólida. **Revista Anhanguera**, v. 11, n. 1, p. 9-22, 2010.

COSTA, L. A. Desenvolvimento e Validação de Metodologia de Análise de Bisfenol A em Amostras de Águas Naturais por CG/EM. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2008.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Effect of two wastes from groundnut processing on laccase production and dye decolourisation ability. **Journal of food engineering**, vol.73, p.388-393, 2006.

D'AGOSTINI, E. C.; MANTOVANI, T. R. D.; DO VALLE, J. S.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, vol.68, nº.3, p. 295-300, 2011.

DALJIT, S.A.; RAKESH, K.S. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol.160, p:1760-1788, 2010.

DALONSO, N.; SOUZA, R.; SILVEIRA, M. L. L.; RUZZA, A. A.; WAGNER, T. M.; WISBECK, E.; FURLAN, S. A. Characterization and antineoplastic effect of extracts obtained from "*Pleurotus sajor-caju*" fruiting bodies. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol.160, nº.8, p.2265-2274, 2010.

DAMSTRA, T.; BARLOW, S.; BERGMAN, A.; KAVLOCK, R.; VAN DER KRAAK, G. Global Assessment of the State-of-the-science of endocrine disruptors. **International Programme on Chemical Safety**, WHO, Geneva, 2002.

DE BARBA, F. F. M.; SILVEIRA, M. L. L.; PILONI, B. U.; FURLAN, S. A.; PINHO, M. S. L. Influence of *Pleurotus djamor* bioactive substances on the survival time of mice

inoculated with sarcoma 180. **International Journal of Pharmacology**, vol.7, p.478-484, 2011.

DHOUIB, A.; HAMZA, M.; ZOUARI, H.; MECHICHI, T.; H'MIDI, R.; LABAT, M.; MARTÍNEZ, M. J.; SAYADI, S. Autochthonous fungal strains with high ligninolytic activities from Tunisian biotopes. *Afr. J. Biotechnol.* v. 4, p. 431-436, 2005. In.: PATRICK, F.; MTUI, G.; MSHANDETE, A. M.; KIVAISI, A. Optimization of laccase and manganese peroxidase production in submerged culture of *Pleurotus sajor-caju*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, nº. 50, p. 10166-10177, 2011.

DÍAZ, R.; TÉLLEZ-TÉLLEZ, M.; SÁNCHEZ, C.; BIBBINS-MARTÍNEZ, M. D.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; SORIANO-SANTOS, J. Influence of initial pH of the growing medium on the activity, production and genes expression profiles of laccase of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentations. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 16, 2013.

DO VALE, J. S. Produção e caracterização molecular de lacases de *Agaricus blazei* obtidas por fermentação de resíduos agroindustriais. **Tese de doutorado** em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, 2012.

DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J.S. Desenvolvimento in vitro de *Pleurotus* spp. sob a influência de diferentes substratos e dextrose. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, vol.72, nº.3, p.331-338, 2005.

DORALICE, S. L.; BALAN, T.; REGINA, T. R. Decolorization of textile índigo dye by lignolytic fungi. **Journal of Biotechnology**, vol. 89, p. 141-145, 2001.

DURÁN, N. Enzimas ligninolíticas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. de. **FUNGOS: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul, RS: EDUCS, p. 245-259, 2004.

DURAN, N. *et al.* Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidasas) immobilized on different supports: a review. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v. 31, p. 907-931, 2002

EICHLEROVÁ, I.; HOMOLKA, L.; LISÁ, L.; NERUD, F. Orange G and Remazol Brilliant Blue R decolorization by white-rot fungi *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinosum* and *Pleurotus calyptratus*. **Chemosphere**, vol.60, p.398-404, 2005.

EIRA, A. F. Fungos Comestíveis. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. de. **FUNGOS: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul, RS: EDUCS, p. 379-447, 2004.

EIRA, A.F.; MINHONI, M.T.A. Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis. 2.ed. Botucatu: **Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais**, 1997.

ELISASHVILI, V.; PENNINGCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLARI, N.; METREVELI, E.; ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul, RS: EDUCS, 2004.

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.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. A cultura da banana / Mandioca e Fruticultura Tropical. **Embrapa Informação Tecnológica** 3ª. Ed., p. 110. Brasília, DF, 2006.

EPAGRI. Avaliação de cultivares para o estado de Santa Catarina – 2013-2014. **Boletim Técnico**, 162. Florianópolis, 2013.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. de. **FUNGOS: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul, RS: EDUCS, 2004.

FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations. Banana Market Review and Banana Statistics 2012-2013. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/019/i3627e/i3627e.pdf>. Acesso em 07/07/2014.

FERNANDES, L. P.; ULHOA, C. J.; ASQUIERI, E. R.; MONTEIRO, V. N. Produção de Amilases pelo Fungo *Macrophomina Phaseolina*. Revista Eletrônica de Farmácia, v. IV, n. 1, p. 43-51, 2007.

FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **FUNGOS – Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS. p. 215-242, 2004.

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

FERREIRA, L. F. R. Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungos. **Tese de Doutorado** – Agronomia – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FLORÊNCIO, I. M.; PRATA, A. S.; CAVALCANTI, M. T.; FLORENTINO, E. R.; PIRES, V. C. F.; ABÍLIO, G. M. F. Caracterização da casca da banana (*musa sapientum*) madura e de sua respectiva farinha. **V Congresso Latino Americano e XI Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos**, Salvador – BA, 2011.

FURLAN, S. A.; VIRMOND, L. J.; MIERS, D.; BONATTI, M.; GERN, R. M. M., JONAS, R. Mushroom strains able to grow at high temperatures and low pH values. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol.13, p. 689-692, 1997.

FURLAN, S. A.; GERN, R. M. M.; WISBECK, E.; BONATTI, M.; SILVEIRA, M. L. L.; SILVA, H. H. Possibilities of "*Pleurotus*" applications in food, health and environmental

technologies. In: KOUTINAS, A.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. **Current topics on Bioprocesses in Food Industry**. Nova Delhi: Asiatech, p. 482-495, 2008.

GARCIA, B. C.; RAMPINELLI, J. R.; GERN, R. M. M.; FURLAN, S. A.; WISBECK, E. Influência da fração de inóculo e da fração de farelo de arroz na degradação da palha de bananeira por *Pleurotus djamor*. **Caderno de Iniciação à Pesquisa (UNIVILLE)**, v. 11, p. 168-171, 2009.

GARG, S. K., MODI, D.R. Decolorization of pulp-paper mill effluents by white-rot fungi. **Critical Reviews in Biotechnology** vol.19 nº.2, p.85-112, 1999.

GERN, R. M. M.; WISBECK, E. ; RAMPINELLI, J.; 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**, vol. 30, p. 695-706, 2007.

GIL, E.S.; MULLER, L.; SANTIAGO, M. F.; GARCIA, T. A. Biosensor Based on Brut Extract from Laccase (*Pycnoporus sanguineus*) for Environmental Analysis of Phenolic Compounds. **Port. Electrochim. Acta**, v. 27, p. 215-225, 2009.

GLENN, J. K.; GOLD, M. H. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 242, nº. 2, p. 329–341, 1985.

GÓMEZ, M.; GARRALON, G.; PLAZA, F.; VÍLCHEZ, R. HONTORIA, E.; GÓMEZ, M. A. Rejection of endocrine disrupting compounds (bisphenol A, bisphenol F and triethyleneglycol dimethacrylate) by membrane technologies. **Deslination**, v. 212, p. 79-9, 2007.

GREGORI, A.; VAGELJ, M. S.; PAHOR, B.; BEROVIC, M.; POHLEVEN, F. The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production,

New Biotechnology, v. 25, p. 157-161, 2008.

HARO, N. K. Remoção de bisfenol-A por adsorção. **Dissertação de Mestrado** em Engenharia Química- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

Haro, N. K.; Zanella, O.; Dembogurski, L.; Féris, L. A. Remoção de bisfenol-a por adsorção – estudo das isothermas de equilíbrio. **X Encontro Brasileiro sobre Adsorção – EBA 10**, SP, 2014.

HAVTANI, N.; MÉES, I. Effects of the nutrient composition on dye coloration, and extracelular enzyme production by *Lentinula edodes* on solid médium. **Enzyme and Mycrobial Technology**, v. 30, p. 381-386, 2002.

HE, J.; YU, H.; FUGETSU, B.; TANAKA, S.; SUN, L. Eletrochemical removal of bisphenol A using a CNT-covered polyester yarn electrode. **Separation and Purification Technology**, v. 110, p. 81-85, 2013.

HENN, C. Seleção de linhagens de basidiomicetos resistentes a altas concentrações dos herbicidas atrazina e diurom – produção de enzimas lignolíticas e degradação dos compostos. **Dissertação de Mestrado** em Microbiologia – Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, SP, 2009.

HERNÁNDEZ, D. M. M.; MATA, G.; ANDREU, L I. Cambios en la producción de lacasa por el hongo *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué. cultivado en pulpa de café en confrontación con *Trichoderma viride* Pers., un hongo contaminante. **Foresta Veracruzana**, vol.4, nº.1, p.47-52, 2002.

HOLTEZ, M.; BORGES, G. M.; FURLAN, S. A.; WISBECK, E. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* utilizando resíduos de algodão da indústria têxtil. RCA. **Revista de Ciências Ambientais (Unilasalle)**, v. 3, p. 37-51, 2009.

HOMSTRUP, M.; BINDESBOL, 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.; BAYLEY, M.; SVENDSEN, C.;

SPURGEON, D. J. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. **Science of the Total Environment**, 2009.

HOU, H.; ZHOU, J.; WANG, J.; DU, C.; YAN, B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochem.** v. 39, p. 1415-1419, 2004.

IPPUJ – Fundação Instituto de Pesquisa e Planejamento para o Desenvolvimento Sustentável de Joinville. Joinville Cidade em dados 2010/2011. Joinville: Prefeitura Municipal, 2011.

JAROSZ, W. A.; KOCHMANSKA, R. J.; MALAERCZYK, E.; WARDAS, W.; LEONOWISZCZ, A. Fungi and their ability to decolorize azo and antraquinonic dyes. **Enzyme and Mycrobial Technology**, vol. 30, p. 556-572, 2002.

JIN, X.; HU, J.; ONG, S.L. Influence of dissolved organic matter on estrone removal by NF membranes and the role of their structures. **Water Research**, v. 41, p. 3077-3088, 2007.

JIN, X.; JIANG, G.; HUANG, G.; LIU, J.; ZHOU, Q. Determination of 4-tert-ctylphenol, 4-nonylphenol and bisphenol A in surface waters from the Haihe River in Tianjin by gas chromatography-mass spectrometry with selected ion selected monitoring. **Chemosphere**, v. 56, p.1113-1119, 2004.

JOSEPH, L.; BOATENG, L. K.; FLORA, J. R.V.; PARK, Y.; SON, A.; BADAWY, M.; YOON, Y. Removal of bisphenol A and 17a-ethinyl estradiol by combined coagulation and adsorption using carbon nanomaterials and powdered activated carbon. **Sep. Purif. Technol.**, v. 107, p. 37–47, 2013.

KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R.; MONTEIRO, R. T. R.; ARMAS, E. D. Biodegradação de efluente têxtil por "*Pleurotus sajor-caju*". **Química Nova**, vol. 28, nº. 4, p. 629-632, 2005.

KARP, S. G.; FARACO, V.; AMORE, A.; BIROLO, L.; GIANGRANDE, C.; SOCCOL, V. T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 735–739, 2012.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C.; Industrial enzymes applications. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 13, p. 345-351, 2002.

KURAMITZ, H.; NAKATA, Y.; KAWASAKI, M.; TANAKA, S. Electrochemical oxidation of bisphenol A. Application to the removal of bisphenol A using a carbon fiber electrode. **Chemosphere**, v. 45, p. 37-43, 2001.

KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, vol. 169, p. 247-250, 1984.

LEE, J.; PARK, H.; YOON, J. Ozonation characteristics of bisphenol a in water. **Environmental Technology**, v. 24, p. 241-248, 2003.

LI, J.; JIANG, L.; XIANG, X.; XU, S.; WEN, R.; LIU, X. Competitive sorption between 17 α -ethinyl estradiol and bisphenol A/4-n-nonylphenol by soils. **Journal of Environmental Sciences**, v. 25, p. 1154-1163, 2013.

LIBARDI JUNIOR, L.; CORREA, M.; BONATTI-CHAVES, M.; GERN, R. M. M.; WISBECK, E.; SCHLOSSER, D.; FURLAN, S. A. Production and Applications of *Pleurotus* laccase. **Advances in Bioprocess in Food Industry**. Vol. IV. Nova Delhi: Asiatech, p. 36-61, 2011.

LIBARDI JUNIOR, N.; GERN, R. M. M.; FURLAN, S. A.; SCHLOSSER, D. Laccase production by the aquatic ascomycete "*Phoma*" sp. UHH 5-1-03 and the white rot basidiomycete "*Pleurotus ostreatus*" DSM 1833 during submerged cultivation on banana peels and enzyme applicability for the removal of endocrine-disrupting chemicals. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, in press, 2012.

LIBARDI, N. Jr.; GERN, R. M. M.; FURLAN, S. A.; SCHLOSSER, D. Laccase Production by the Aquatic Ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03 and the White Rot Basidiomycete *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 During Submerged Cultivation on Banana Peels and Enzyme Applicability for the Removal of Endocrine-Disrupting Chemicals. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 167, p. 1144–1156, 2012.

LIPRELI, A. Melhoramento genético de *Lentinula edodes* e *Pleurotus sajor-caju* para aumento da atividade extracelular de fenol-oxidases e produtividade de basidiomas. **Dissertação de Mestrado** – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, 2012.

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.

LO, S. C., HO, Y. S.; BUSWELL, J. A. Effect of Phenolic Monomers on the Production of Laccases by the Edible Mushroom *Pleurotus sajor-caju*, and Partial Characterization of a Major Laccase Component *Mycologia* - **Mycological Society of America**, v. 93, nº. 3, p. 413-421, 2001.

LOGUERCIO-LEITE, C. & ESPOSITO, E.; Fungos: estrutura e ultra-estrutura. In: ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos – Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS. p. 15-46, 2004.

LOGUERCIO-LEITE, C. Taxonomia dos fungos. In: ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos – Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS. p. 47-90, 2004.

MACCHERONI, J.; ARAUJO, W. L.; LIMA, A. O. S. Ecologia: Habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. In: ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul. EDUCS, 2004.

MAGRO, R. D. Remoção de bisfenol A de águas contaminadas através de processos de separação por membranas e de sorção. **Dissertação de Mestrado** em Engenharia Química – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2013.

MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G.; PARINI, C. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced By *Rhizopus stolonifer*. **Biotechnology Letters**, v. 9, nº 3, p. 219-224, 1987.

MATTILA, P.; SALO-VÄÄNÄNEN, P.; KONKO, K.; ARO, H.; JALAVA, T. Basic Composition and Amino Acid Contents of Mushrooms Cultivated in Finland. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, p. 6419-6422, 2002.

MAZUMDER, S.; BOSE, S.; BANDOPADHYAY, A.; ALAM, S.; MUKHERJEE, M. Study of laccase production by *Pleurotus ostreatus* in a 5 l bioreactor and application of the enzyme to determine the antioxidant concentration of human plasma. **Applied Microbiology**, v. 47, p. 355–360, 2008.

MENDES, A. A. ; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Revista Química Nova**, v. 34, nº. 5, p. 831-840, 2011.

MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulíticas. **Estudos Tecnológicos**, v. 5, n. 1, p. 68-78, 2009.

MIKIASHVILI, N.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; ELISASHVILI, V. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 999–1002, 2006.

MODA, E.M. Produção de *Pleurotus sajor-caju* em bagaço de cana-de-açúcar lavado e o uso de aditivos visando sua conservação in natura. **Dissertação de mestrado** – Escola Superior de Agricultura. Piracicaba, SP, 2003.

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

MOERS, E. M.; VIEIRA, A. C.; FERNANDES, D. M.; SOUZA, S. N. M.; BARICATTI, R. A. Caracterização da biomassa residual proveniente de resíduos agrícolas para geração de energia. **I COLASSA – Congresso Latino Americano de Suinocultura e Sustentabilidade Ambiental**. Foz do Iguaçu, PR. 2011.

MORE, S. S.; RENUKA, P. S.; PRUTHVI, K.; SWETHA, M.; MALINI, S.; VEENA, S. M. Isolation, Purification, and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus sp.* **Enzyme Research**, 2011.

MOREIRA NETO S. L. Enzimas ligninolíticas produzidas por "*Psilocybe castanella*" CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno **Dissertação de Mestrado** – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.

MUNARI F. M.; GAIO T. A.; CALLONI R.; DILLON A. J. P. Decolorization of textile dyes by enzymatic extract and submerged cultures of "*Pleurotus sajor-caju*". **World Journal Microbiological Biotechnology**, vol. 24, p. 1383-1392, 2008.

MURUGESAN, K.; ARULMANI, M.; NAM, I.; KIM, Y.; CHANG, Y.; KALAICHELVAN, P. T. 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. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 72, p. 939–946, 2006.

NAKAMURA, Y.; MTUI, G. Biodegradation of Endocrine-disrupting Phenolic Compounds Using Laccase Followed by Activated Sludge Treatment. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, p. 294-298, 2003.

NOVOZYMES – Enzymes at work, 2008. In: DO VALE, J. S. Produção e caracterização molecular de lacases de *Agaricus blazei* obtidas por fermentação de resíduos agroindustriais. **Tese de doutorado** em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, 2012.

PAKHADNIA, Y. G.; MALINOUSKI, N. I.; LAPKO, A.G. Purification and Characteristics of an Enzyme with Both Bilirubin Oxidase and Laccase Activities from Mycelium of the Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **Biochemistry** (Moscow), v. 74, n. 9, p. 1027-1034, 2009.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, vol. 74, p. 69-80, 2000.

PARK, C.; KAWAGUCHI, T.; SUMITANI, J.. Cloning and sequencing of a exoglucanase gene from *Streptomyces* sp. M23, and its expression in *Streptomyces lividans* TK-24. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, vol. 99, nº. 4, p. 434-436, 2005.

PATRICK, F.; MTUI, G.; MSHANDETE, A. M.; KIVAISI, A. Optimization of laccase and manganese peroxidase production in submerged culture of *Pleurotus sajor-caju*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, nº. 50, p. 10166-10177, 2011.

PERALTA, R. M.; SOUZA, C. G. M.; BÔER, C. G. As principais oxirredutases de uso industrial. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p.412, cap. 10, 2004.

PEREIRA, P. M. Avaliação do potencial de fungos na degradação do herbicida Atrazina. **Dissertação de mestrado** como requisito parcial para obtenção do requisito de mestre em Vigilância Sanitária da Fundação Osvaldo Cruz, RJ, 2011.

PESSOA, T. R. B. Avaliação do processo de obtenção de farinha de casca de banana (*Musa sapientum*) das variedades Prata, Pacovan e Maçã. **Dissertação de Mestrado** em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Paraíba – PB, 2009.

PINTO, G. A. S; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R; FRAGA, S. L. P; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização

de resíduos agroindustriais tropicais. **Embrapa Agroindústria Tropical** 1ª edição online, 2005.

PLAZA, S. Y. Caracterización fisiológica y molecular del proceso de decoloración de un efluente industrial con el basidiomiceto *Corioloopsis gallica*. **Tese de Doutorado**. Universidade de Alcalá – Departamento de Microbiología e Parasitología. Alcalá de Henares, 2004.

POFFO, C. Cultivo de *Pleurotus sajor-caju* utilizando resíduo de água de imersão da palha de bananeira: análise da cinética de produção de lacase e extração de polissacarídeos. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Graduação em Engenharia química) - Universidade da Região de Joinville, 2013.

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

POZDNYAKOVA, N. N.; NIKIFOROVA, S. V.; TURKOVSKAYA, O. V. Influence of HPAs on ligninolytic enzymes of the fungus *Pleurotus ostreatus* D1. **Cent. Eur. J. Biol.** vol.5, nº.1, p. 83-94, 2010.

POZDNYAKOVA, N. N.; TURKOVSKAYA, O. V.; YUDINA, E. N.; RODAKIEWICZ-NOWAK, Y. A. Yellow Laccase from the Fungus *Pleurotus ostreatus* D1: Purification and Characterization. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 42, n. 1, p. 56–61, 2006.

PURNOMO AS; MORI T; KAMEI I; NISHII T; KONDO R. Application of mushroom waste medium from "*Pleurotus ostreatus*" for bioremediation of DDT-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, vol. 64, nº. 5, p. 397-402, 2010.

RABONATO, A. C. Linhagens fúngicas na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. **Dissertação de Mestrado** em Agronomia. Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP, Botucatu, SP, 2013.

RAMÍREZ, N. E.; VARGAS, M. C.; ARIZA, J. C.; MARTÍNEZ, C. Caracterización de La lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. V, n. 2, 2003.

RAMPINELLI, J.; CHAVES, M. B.; WISBECK, E.; FURLAN, S. A.; GERN, R. M. M. Análise da composição química de diferentes substratos utilizados para o cultivo de *Agaricus blazei*. **Caderno de Iniciação à Pesquisa (UNIVILLE)**, v. 9, p. 263-266, 2007.

RAMPINELLI, J. R.; SILVEIRA, M. L. L.; GERN, R. M. M.; FURLAN, S. A.; NINOW, J. L.; WISBECK, E. Valor nutricional de *Pleurotus djamor* cultivado em palha de bananeira. **Alimentos e Nutrição** (UNESP – Marília), v. 21, p. 195-200, 2010.

RASERA, K. Desenvolvimento de membranas com lacases por imobilização do extrato enzimático de *Pleurotus sajor-caju*. **Dissertação de Mestrado** – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2006.

RASHAD, M. M.; ABDU, H. M.; SHOUSA, W. G. H.; ALI, M. M.; EL-SAYED, N. N. Purification and characterization of extracellular polygalacturonase from *Pleurotus ostreatus* using Citrus limonium waste. **J. Appl. Sci. Res.** v. 6, p. 81-88, 2010.

REDDY, G. V., RAVINDRA BABU, P., KOMARAIHAH, P., ROY, K. R. R. M., & KOTHARI, I. L. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus species* (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Process Biochemistry**, vol. 38, nº.10, p. 1457-1462, 2003.

REFAIE F. M.; ESMAT A. Y.; DABA A. S.; TAHA S. M. Characterization of polysaccharopeptides from "*Pleurotus ostreatus*" mycelium: assessment of toxicity and immunomodulation in vivo. **Micologia Aplicada International**, v 21, n 2, p 67-75, 2009.

REGINA, M.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; BARBOSA, A. M.; AMADOR, I. R.; ANDRADE-NOBREGA, G. M.; MASCHIARE, D. C. Sabugo de milho e carvão ativado na produção de Lacase e Basidiomas de *Pleurotus* sp. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, nº. 1, p. 39-48, 2012.

REYS, L. F. Estudo da degradação de Polietileno Tereftalato (PET) por Fungos Basidiomicetes Lignofílicos. Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos - **Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, 2003.

RITTMANN, B. E., McCARTY, P. L. **Environmental biotechnology: principles and applications**. New York: Mc Graw-Hill, 2001.

RIVAS, F. J.; ENCINAS, A.; ACEDO, B.; BELTRÁN, F. J. Mineralization of bisphenol-A by advanced oxidation processes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 84, n. 4, p. 589-594, 2008.

RORABACHER, D. B. Statistical treatment for rejection of deviant values: critical values of Dixon's "Q" parameter and related subrange ratios at the 95% confidence level. **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 139-146., 1991.

ROSA, M. F.; SOUZA, F. M. S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S. T.; LEITÃO, R. C. Valorização de resíduos da agroindústria. II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – **Anais II SIGERA**: Volume 1: Palestras. Foz do Iguaçu, PR, 2011.

SAHAY, R.; YADAV, R. S. S.; YADAV, K. D. S. Purification and Characterization of Extracellular Laccase Secreted by *Pleurotus sajor-caju* MTCC 141. **Chinese Journal of Biotechnology**. v. 24, n. 12, p. 2068-2073, 2008.

SÁNCHEZ, C. Modern aspects of mushroom culture technology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 64, p. 756-762, 2004.

SARNTHIMA, R.; KHAMMUANG, S. Laccase isozymes of *Pleurotus sajor-caju* culture on husk and bran of black sticky rice and their potential on indigo carmine decolourisation. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 20, p. 3731-3736, 2008.

SARNTHINA R.; KHAMMUANG S. Evaluation of dyes decolourisation by the crude enzyme from "*Pleurotus sajor-caju*" grown on sorghum seed media. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, vol. 11, nº.1, p. 62-67, 2008.

SARTORI, Sérgio Birello. Atividade e valores nutricionais de *Pleurotus* spp. cultivados em vinhaça. **Dissertação de Mestrado**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2011.

SCHLEICHER, A. T. Remoção de estrona, estradiol, etinilestradiol e bisfenol-A por meio de nanofiltração aplicada ao tratamento avançado de águas para consumo humano. **Dissertação de mestrado** em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2013.

SCHULZ, J. G.; COGORNI, P. F. B. O.; SILVA, D. A. K.; GERN, R. M. M.; FURLAN, S. A. ; WISBECK, E. Folhas de pupunheira na produção de *Pleurotus sajor-caju* CCB 019. BBR - **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, p. 380-383, 2013.

SCHWARZE, F.; ENGELS, J.; MATTHECK, C. **Fungal strategies of wood decay in trees**. Springer, 2000.

SHASHIREKHA M. N.; RAJARATHNAM S.; BANO Z. Enhancement of bioconversion efficiency and chemistry of the mushroom, "*Pleurotus sajor-caju*" (Berk and Br.) Saccroded on spent rice straw substrate, supplemented with oil seed cakes. **Food Chemistry**, vol. 76, nº. 1, p. 27-31, 2002.

SILVA, A. J. Banana. **Revista Hortifruti Brasil**. p. 40-41, 2014.

SILVA, H. H. B.; SCHNEIDER, A. L. S.; WISBECK, E.; FURLAN, S. A. Biodegradation of 2,4 dichlorophenol by "*Pleurotus ostreatus*" DSM 1833. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 52, p. 1563-1570, 2009.

SILVA, J. J. da; SANTANA, T. T.; OLIVEIRA, A. C. C.; ALMEIDA, P. H. de; SOUZA, S. G. H. de; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; VALLE, J. S. do. Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com casca de café. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 15, nº. 2, supl. 1, p. 191-196, 2012.

SIQUEIRA, F. G. Resíduos agroindustriais com potencial para produção de holocelulases de origem fúngica e aplicações biotecnológicas de hidrolases. **Tese de Doutorado** Ciências Biológicas – Universidade de Brasília, 2010.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; STANLEY, R. C. **Fundamentos da Química Analítica**. Tradução da 8ª edição norte americana. São Paulo, Ed. Thomson, 2007.

SOARES, C. H. I. Estudos Mecanísticos de degradação de efluentes de indústria de papel e celulose por fungos basidiomicetos degradadores de madeira. **Tese de Doutorado** em Engenharia Têxtil – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1998.

SODRÉ, F. F.; MONTAGNER, C. C.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil). **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 2, nº. 2, p. 187-196, 2007.

SOTO, M. L. C. Producción de lacasa de *Pleurotus ostreatus* utilizando los residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato. **Dissertação de Mestrado** – Escola Nacional de Ciências Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, 2011.

SOUZA, G. Produção, extração e estabilidade de enzimas lignocelulolíticas para uso em degradação em compostos poluentes. **Dissertação de Mestrado** - Universidade de São Paulo (USP). Centro de Energia Nuclear na Agricultura Piracicaba, 2012.

STAJIC, M.; PERSKY, L.; FRIESEM, D.; HADAR, Y.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; VUKOJEVIC, J. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. **Enzyme Microbiological and Technnology** vol. 38, p. 65-73, 2006.

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

TAM, S. C.; YIP, K. P.; CHANG, F.; CHANG, S. T. Hypotensive and renal effects of in extract of the edible mushroom "*Pleurotus sajor-caju*". **Life Sciences**, vol. 38, p. 1155-1161, 1986.

TANAKA, N.; TONOSAKI, T.; NOSE, M.; TOMIDOKORA, N.; KADOMURA, N.; FUJII, T.; TNIGUCHI, M. Treatment of model soils contaminated with phenolic endocrine disrupting chemicals with laccase from *Trametes* sp. in a rotating reactor. **Journal Biosci. Bioeng.**, v. 92, nº. 4, p. 312–316, 2001.

TÉLLEZ-TÉLLEZ, M.; FERNÁNDEZ, F.J.; MONTIEL-GONZÁLEZ, A.M.; SÁNCHEZ, C.; DÍAZ-GODÍNEZ, G. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 675-679, 2008.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** vol.81, p. 2280-2284, 1984.

VAN DER BRUGGEN, B.; EVERAERT, K.; WILMS, D.; VANDECASTEELE, C. The use of nanofiltration for the removal of pesticides from groundwater: An evaluation. **Water Sci. Technol.**, v. 1, n. 2, p. 99–106, 2001.

WESENBERG D., KYRIAKIDES I., AGATHOS S.N. White-rot-fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, vol. 22, nº. 1-2, p. 161-187, 2003.

WISBECK E.; FURLAN S. A.; NINOW J. L. Efeito da concentração inicial de glicose e do pH na produção de exopolissacarídeos de potencial antitumoral por "*Pleurotus ostreatus*" DSM 1833. **Revista Saúde e Ambiente (UNIVILLE)**, vol. 6, p. 19-22, 2005.

WOLFF E. R. S.; WISBECK E.; SILVEIRA M. L. L.; GERN R. M. M.; PINHO M. S. L.; FURLAN S. A. Antimicrobial and antineoplastic activity of "*Pleurotus ostreatus*". **Appl. Biochem. Biotechnol.**, nº. 151, p. 402-412, 2008.

XAVIER, T. M. R. Mineralização de Timol e Bisfenol-A via ozônio, radiação ultravioleta e mineralização. **Dissertação de Mestrado** em Ciências – Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, 2011.

YAMANAKA, H.; MORIYOSHI, K.; OHMOTO, T.; OHE, T.; SAKAI, K. Efficient microbial degradation of bisphenol A in the presence of activated carbon. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 105, n. 2, p. 157-160, 2008.

ZACCARIA, S. ; BETTIN, F. ; SILVEIRA, M. M. . Crescimento e produção de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 sob diferentes condições de pH em biorreator com agitação mecânica. In: XXV Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SIC - UFRGS), 2013, Porto Alegre. **Anais do XXV Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2013.

ZHANG M.; ZHANG L.; CHEUNG P. C. K.; OOI V. E. C. Molecular weight and anti-tumor activity of the water-soluble polysaccharides isolated by hot water and ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of "*Pleurotus tuber-regium*". **Carbohydrate Polymers**, vol. 56, p. 123-128, 2004.