



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE RIO CLARO**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**CARACTERIZAÇÃO DE LACASES PRODUZIDAS POR FUNGOS
BASIDIOMICETOS DE ORIGEM MARINHA E TERRESTRE E APLICAÇÃO
BIOTECNOLÓGICA NA DESCOLORAÇÃO DE CORANTE TÊXTIL**

BRUNO DE JESUS FONTES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dra. Lara Durães Sette

Co-orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

**RIO CLARO
MAIO - 2019**

BRUNO DE JESUS FONTES

**CARACTERIZAÇÃO DE LACASES PRODUZIDAS POR FUNGOS
BASIDIOMICETOS DE ORIGEM MARINHA E TERRESTRE E APLICAÇÃO
BIOTECNOLÓGICA NA DESCOLORAÇÃO DE CORANTE TÊXTIL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia
Aplicada).

Orientador: Prof. Dra. Lara Durães Sette

Co-orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

RIO CLARO

MAIO - 2019

F683c Fontes, Bruno de Jesus
Caracterização de lacases produzidas por fungos basidiomicetos de origem marinha e terrestre e aplicação biotecnológica na descoloração de corante têxtil / Bruno de Jesus Fontes. -- Rio Claro, 2019
81 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Lara Durães Sette
Coorientador: Henrique Ferreira

1. Lacase. 2. Basidiomicetos. 3. Purificação enzimática. 4. Biotecnologia ambiental. 5. Corante têxtil. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

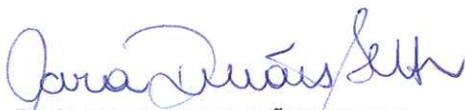
Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO DE LACASES PRODUZIDAS POR FUNGOS BASIDIOMICETOS DE ORIGEM MARINHA E TERRESTRE E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA NA DESCOLORAÇÃO DE CORANTE TÊXTIL

AUTOR: BRUNO DE JESUS FONTES
ORIENTADORA: LARA DURÃES SETTE
COORIENTADOR: HENRIQUE FERREIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. ELEONORA CANO CARMONA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. LARISSA PEREIRA BRUMANO
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica / Universidade de São Paulo

Rio Claro, 28 de fevereiro de 2019

DEDICATÓRIA

A Deus, pois tudo vem dEle!

À minha mãe Terezinha, meu irmão Gabriel e ao meu pai João. Vocês me dão força para ir
avante!

Às minhas avós Benita, Vardinha e vô Osvaldo. Pois vocês são minhas relíquias.

À minha namorada Maryana Nogueira e em memória de sua Avó Elza Nogueira. Por que te
amo.

Aos amigos e irmãos da Igreja Adventista do Sétimo dia de Rio Claro - SP e Maracás – Ba.

Aos desbravadores da minha unidade “Tubarões”.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela conclusão desta etapa, que por mim foi tão sonhada. A minha Orientadora, Professora Dr. Lara Durães Sette, pela orientação, ensino e apoio durante esta etapa, também ao meu co-orientador Dr. Henrique Ferreira, pela pronta disposição e aprendizado a mim concedido e por todo apoio técnico, e também ao professor Dr. Adalberto Pessoa Júnior por ter me recebido e dado todo apoio técnico e teórico durante a estadia em seu laboratório (Biotecnologia Farmacêutica na USP – SP).

De forma especial eu gostaria de agradecer a minha mãe, por todo amor, carinho e apoio, por me sustentar em suas orações e por todo esforço disposto a mim, não só neste momento, mas em toda a minha vida.

Aos meus tios Valdir e Del, minha prima Bia por todo apoio e suporte em minha estadia em São Paulo, vocês foram fundamentais para eu finalizar esta etapa.

Agradeço também a minha namorada Maryana Nogueira, por todo amor, carinho, consolo nos momentos difíceis, pelo auxílio nas horas de desespero e por compartilhar comigo esta fase.

De forma especial agradeço aos meus amigos do grupo de pesquisa do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial - LAMAI (UNESP – RC) e do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica - LABIOTEC (USP-SP), os momentos vividos dentro do laboratório com vocês foram de muita alegria, boas conversas e aprendizado. Cresci muito com vocês, e sem a orientação de vocês muitas coisas não teriam acontecido e eu ainda seria o mesmo.

Em especial agradeço aos colegas que de forma mais próxima me ajudaram: Igor Otero (LAMAI); Eduardo Krebs (USP) e Kenny Sato (Laboratório de Genética Bacterina - LGB).

Obrigado também a professora Dr. Eleonora Carmona e a Carmem pelo suporte técnico.

Obrigado a todos do departamento de bioquímica e microbiologia. Obrigado por fazer este mestrado inesquecível!

À FAPESP pelo financiamento do projeto, processo nº 2016/07957-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

À CAPES, pois, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

As lacases têm sido alvo de investigação devido à capacidade de oxidar compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos com a concomitante redução do oxigênio à água. Embora possam ser sintetizadas por diversos organismos, sua produção se destaca em fungos de podridão branca. As lacases tem sido amplamente aplicada no campo industrial e ambiental. A fim de comparar o potencial catalítico das lacases dos fungos de ambiente marinho e terrestre, no presente estudo as lacases produzidas pelos basidiomicetos de origem marinha (*Peniophora* sp. CBMAI 1063 e *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062) e terrestre (*Peniophora cinerea* CCIBt 2541 e *Marasmiellus colocasiae* CCIBt 3388) foram parcialmente purificadas (ultrafiltração e cromatografia de troca iônica) e caracterizadas bioquimicamente. Para a quantificação das lacases foram utilizados os substratos enzimáticos 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e siringaldazina (SYG). Os fungos analisados apresentaram produção de lacases no meio utilizado, o qual foi previamente otimizado para a produção de lacases para o *Peniophora* sp. CBMAI 1063. Nestas condições de cultivo, as enzimas ligninolíticas Manganês Peroxidase (MnP) e Lignina Peroxidase (LiP) não foram produzidas. Com relação ao processo de purificação, a cada passo houve perda no rendimento, em proporções diferentes para o conjunto enzimático de cada fungo, com melhor recuperação para as lacases produzidas pelos fungos do gênero *Marasmiellus*. O zimograma revelou que *Peniophora* sp. CBMAI 1063 produz duas isoenzimas de lacases, *P. cinerea* CCIBt 2541 cinco, *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 duas e *M. colocasiae* CCIBt 3388 uma. O conjunto enzimático foi caracterizado de modo aparente. O pH ótimo (4,0 para ABTS e 5,5 para SYG) e temperatura ótima (55 °C) foram iguais para os dois fungos do gênero *Peniophora*. Para os fungos do gênero *Marasmiellus* o pH ótimo foi o mesmo (5,0 para ABTS e 6,5 para SYG) porém a temperatura ótima foi diferente (55 °C para *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 e 50 °C para *M. colocasiae* CCIBt 3388). As lacases de todas as espécies estudadas não apresentaram atividade na presença de EDTA e L-cisteína, evidenciando a importância do Cu^{2+} e do aminoácido cisteína no sítio ativo. Diferentes íons metálicos ativam as atividades das lacases. De modo geral, a caracterização do conjunto enzimático do *P. cinerea* CCIBt 2541 apresentou melhores resultados que o do *Peniophora* sp. CBMAI 1063. No conjunto enzimático *M. colocasiae* CCIBt 3388 íons Mn^{2+} aumentou a atividade (117%), entretanto *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 apresentou estabilidade maior frente a todos os íons testados, apresentando aumento da atividade na presença de Al^{3+} (126%). Quanto à salinidade, o I_{50} para NaCl foi mais eficiente para as lacases do *P. cinerea* CCIBt 2541, enquanto que *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 apresentou maior resistência a 1000 mM de NaCl. De acordo com os valores de K_M e V_{\max} há uma maior afinidade das lacases dos fungos de origem terrestres pelos substratos ABTS e SYG. As lacases parcialmente purificadas apresentaram as seguintes porcentagens de descoloração do corante têxtil marinho reativo (MR) (40 mg/L) após sete dias de incubação: *P. cinerea* CCIBt 2541 67%, *Peniophora* sp. CBMAI 1063 61% e *M. colocasiae* CCIBt 3388 27%. A descoloração do MR pelas lacases dos fungos do gênero *Peniophora* foi similar à obtida para a lacase industrial de *Trametes versicolor* (66%). Devido à quantidade insuficiente de lacases do *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 o teste de descoloração não foi realizado. Testes de toxicidade mostraram que as lacases de *P. cinerea* CCIBt 2541 deixa praticamente inalterada a toxicidade no tratamento. Entretanto o conjunto de lacases do *Peniophora* sp. CBMAI 1063 e *M. colocasiae* CCIBt 3388 apresentam um leve aumento de toxicidade após o período de reação. A lacase pura de *T. versicolor* não alterou a toxicidade inicial. Os resultados do presente estudo ampliam o conhecimento sobre as lacases produzidas por fungos de origem marinha e abrem novas perspectivas de estudos na área da biotecnologia ambiental.

Palavras-chave: Lacase; Basidiomicetos; Purificação enzimática; Biotecnologia ambiental

ABSTRACT

Laccases have been under investigation due to their capacity to oxidize phenolic and non-phenolic aromatic compounds with concomitant reducing of oxygen to water. Although laccases can be synthesized by several organisms; their production is notable in white rot fungi. Laccases have been widely applied in industrial and environmental fields. Aiming to compare the catalytic potential of laccases in fungi from marine and terrestrial environments, in the present work laccases produced by marine basidiomycetes (*Peniophora* sp. CBMAI 1063 and *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062) and the terrestrial (*Peniophora cinerea* CCIBt 2541 and *Marasmiellus colocasiae* CCIBt 3388) were partially purified (ultrafiltration and ionic chromatography) and biochemically characterized. For the laccases quantification were used 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazol-6-sulphonic) (ABTS) and syringaldazine (SYG) as substrates. All studied fungi showed satisfactory laccases productions in the utilized medium, which was previously optimized to laccases production by *Peniophora* sp. CBMAI 1063. In these culture conditions ligninolytic enzymes Manganese Peroxidase (MnP) and Lignin Peroxidase (LiP) were not produced. Regarding the purification process, there was yield loss in each step, in different proportions to the enzymatic pool for each fungi, with better yielded the laccases produced by the fungi from *Marasmiellus* genus. Zymogram revealed that *Peniophora* sp. CBMAI 1063 has two laccase isoforms, *P. cinerea* CCIBt 2541 has five, *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 has two and *M. colocasiae* CCIBt 3388 has one. The enzymatic pools were apparently characterized. The optimum pH (4.0 to ABTS and 5.5 to SYG) and optimum temperature (55 °C) were the same to both *Peniophora* fungi. The fungi from the genus *Marasmiellus* had the same optimum pH (5.0 to ABTS and 6.5 to SYG), however, the optimum temperature was distinct, 55 °C to the *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 and 50 °C to the *M. colocasiae* CCIBt 3388). EDTA and L-cysteine completely inhibit all enzymatic pools, showing the importance of Cu^{2+} and the cysteine aminoacid in the active site of laccases. Different metallic ions acted empowering the laccase activities. The enzymatic pool obtained with the fungus *P. cinerea* CCIBt 2541 showed better results in comparison with *Peniophora* sp. CBMAI 1063. In the enzymatic pool of *M. colocasiae* CCIBt 3388 Mn^{2+} ions enhanced laccase activity (117%), but the pool of *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 showed better stability with all tested ions, enhancing its activity in the presence of Zn^{2+} (102%) and Al^{3+} (126%). Regarding salinity, the I_{50} of NaCl was most efficient to the laccases of *P. cinerea* CCIBt 2541, while laccases from *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 were more resistant to 1000 mM of NaCl. According to the K_M e V_{max} values, there is a better affinity with laccases from terrestrial fungi to the substrates ABTS and SYG. The partially purified laccases exhibited the following percentage of the Marine Reactive (MR) (40 mg/L) textile dye decolorization after seven days of incubation: *P. cinerea* CCIBt 2541 67%, *Peniophora* sp. CBMAI 1063 61% and *M. colocasiae* CCIBt 3388 27%. Decolorization of MR by *Peniophora* fungal laccases was similar to the pure industrial laccase from *Trametes versicolor* (66%). Due to the little amount of laccases of *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 discoloration test was not carried out. Toxicity tests revealed that laccases from *P. cinerea* CCIBt 2541 did not change the dye toxicity during the treatment. However, the pool of *Peniophora* sp. CBMAI 1063 and *M. colocasiae* CCIBt 3388 slightly increased the toxicity after the treatment. *T. versicolor* pure laccase did not change the initial toxicity. Results from the present work increase the knowledge about the laccases produced by fungi from marine origin and open new perspectives of studies in the area of environmental biotechnology.

Keywords: Laccase; Basidiomycetes; Enzymatic purification; Environmental biotechnology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo representativo da estrutura da lignina (Fonte: GIAZERA; NIKAIDO, 2007)

Figura 2. Diagrama esquemático da degradação da lignina (Fonte: SETTE; BONUGLI-SANTOS, 2015, adaptado de DASHTBAN et al. 2010).

Figura 3. Representação esquemática do sítio ativo de lacases. X - aminoácido variável; Cu1 - cobre T1; Cu4 - cobre T2; Cu 2 e 3 - par de cobres T3. (Fonte: OTERO, 2016 adaptado de CLAUS, 2004).

Figura 4. Estrutura da lacase do fungo *Trametes versicolor* evidenciando os dos 3 domínios *cupredoxin* D1 - domínio 1; D2 - domínio 2; D3 - domínio 3 (Fonte: OTERO, 2016 adaptada de DWIVEDI et al., 2011).

Figura 5. Alinhamento de lacases fúngicas e genes de lacase de *Peniophora* sp. CBMAI 1063 transcritos. Os retângulos vermelhos representam as regiões conservadas L1, L2, L3 e L4 (Fonte: OTERO, 2016).

Figura 6. Estrutura química de diferentes grupos de corante têxteis: (A) corante azo; (B) corante sulfuroso; (C) corante ácido; (D) corante disperso; (E) corante básico; (F) corante direto; (G) corante antraquinona; (H) corante indigóides; (I) corante reativo.

Figura 7. Esquema de uma via geral de degradação de corante azo em reação com lacase (LC) na presença de oxigênio molecular (fonte: ZUCCA et al., 2015).

Figura 8. *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (Fonte: autor).

Figura 9. *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 (Fonte: autor).

Figura 10. *Peniophora cinerea* CCIBt 2541 (Fonte: autor).

Figura 11. *Marasmiellus colocasiae* CCIBt 3388 (Fonte: autor).

Figura 12. Cromatograma da troca aniônica (DEAE-Sepharose FF) de 1,5 mL do caldo bruto ultrafiltrado concentrado *Peniophora cinerea* CCIBt 2541 (A); *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (B); *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 (C); *Marasmiellus colocasiae* CCIBt 3388 (D).

Figura 13. Gel SDS-PAGE do perfil proteico dos fungos: (A) *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, *Peniophora* sp. CBMAI 1063, *Marasmiellus colocasiae* CCIBt3388 e *Peniophora cinerea* CCIBt 2541, das amostras: ultrafiltrada concentrada (U.C.) e troca iônica 3X concentrada (T.I.).

(B) Gel SDS-PAGE: amostras de *Peniophora cinerea* CCIBt 2541, 1 – ultrafiltrado, 2-troca iônica 6X concentrada.

Figura 14 – Zimograma de lacases por atividades em SYG para as amostras do conjunto enzimático do *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (CBMAI 1063) e *Peniophora cinerea* CCIBt 2541 (CCIBt 2541); atividade em ABTS para as amostras do conjunto enzimático do *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 (CBMAI 1062) e *Marasmiellus colocasiae* CCIBt 3388 (CCIBt 3388).

Figura 15. Caracterização do pH ótimo aparente das lacases dos fungos marinhos e terrestres do gênero: (A) *Peniophora* para ABTS, (B) *Peniophora* para SYG, (C) *Marasmiellus* para ABTS, (D) *Marasmiellus* para SYG; e temperatura ótima aparente das lacases dos fungos marinhos e terrestre do gênero: (E) *Peniophora*, (F) *Marasmiellus*.

Figura 16 – Estabilidade dos conjuntos enzimáticos de lacases para os fungos (A) *Peniophora* e (B) *Marasmiellus* em temperatura ótima.

Figura 17 – Efeito de íons metálicos, agente quelante (EDTA) e aminoácido (L-cisteína) na atividade enzimática dos conjuntos de lacases dos fungos do gênero em estudo: (A) *Peniophora* e (B) *Marasmiellus*.

Figura 18. Efeito das concentrações de NaCl na atividade dos conjuntos enzimático de lacases: (A) fungos marinho e terrestre *Peniophora* sp. CBMAI 1063 e *Peniophora cinerea* CCIBt 2541, (B) Fungos marinho e terrestre *Marasmiellus* sp. CBMAI 1063 e *Marasmiellus colocasiae* CCIBt 3388 e (C) lacase comercial pura do fungo terrestre *Trametes versicolor*.

Figura 19 – Corante têxtil marinho reativo, estrutura química associada (Fonte: SIGMA-ALDRICH).

Figura 20 – Descoloração do corante têxtil marinho reativo pelo conjunto enzimático de lacases dos fungos marinho e terrestre do gênero *Peniophora*, do fungo terrestre *Marasmiellus colocasiae* CCIBt 3388 e da lacase pura comercial de *Trametes versicolor*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das faixas de toxicidade aguda segundo Bulich (1992).

Tabela 2. Etapas do processo de purificação da lacase referente aos fungos marinhos e terrestres dos gêneros *Peniophora* e *Marasmiellus*.

Tabela 3. Cinética enzimática aparente em reação com diferentes substratos.

Tabela 4. Constante de Michaelis-Menten de lacases em diferentes basidiomicetos utilizando ABTS como substrato.

Tabela 5. Concentração efetiva (EC_{50}) de *A. fischeri*, após 15 min de exposição do conjunto enzimático das lacases com o corante marinho reativo (40 mg L^{-1}).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS - 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).

ASW – Água do mar artificial (*Artificial Sea Water*)

BSA – Albumina de soro bovino

CBMAI - Coleção Brasileira de Microrganismos do Ambiente e Indústria

CCIBT - Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica

CRM - UNESP – Centro de Recursos Microbianos da Universidade Estadual Paulista

DEAE – Dietilaminoetil

DTT – Ditioneitol

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

FPLC - (*Fast Protein Liquid Chromatography*)

LAMAI - Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial

H - hora

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

K_M - constante de Michaelis-Menten

LAC - Lacase

LiP - Lignina Peroxidase

MnP - Mangaês Peroxidase

MR - Marinho Reativo

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

RB - Preto Reativo

RBBR - Azul Brilhante Remazol R

RC – Rio Claro

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SYG – siringaldazina

SP – São Paulo

UNESP – Universidade Estadual Paulista

USP – Universidade de São Paulo

V_{máx} - Velocidade máxima

W/V – Peso / volume (Weight / volume)

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA | 13 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO | 15 |
| 2.1 Enzimas ligninolíticas..... | 15 |
| 2.2 Lacases..... | 16 |
| 2.2.1 Dinâmica gênica das lacases..... | 18 |
| 2.2.2 Organismos produtores de lacases | 20 |
| 2.2.3 Produção de lacases por fungos de origem marinha | 21 |
| 2.2.4 Aplicações das lacases | 22 |
| 2.2.4.1 Química sintética e orgânica..... | 22 |
| 2.2.4.2 Indústria de papel..... | 22 |
| 2.2.4.3 Indústria de alimentos | 23 |
| 2.2.4.4 Indústrias farmacêuticas e de cosméticos..... | 23 |
| 2.2.4.5 Biorremediação..... | 23 |
| 2.2.4.6 Outras aplicações | 24 |
| 2.2.4.7 Aplicação de lacases na indústria têxtil..... | 24 |
| 3. OBJETIVOS | 29 |
| 3.1 Geral | 29 |
| 3.2 Objetivos específicos | 29 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 29 |
| 4.1 Microrganismos | 29 |
| 4.1.1 <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063..... | 29 |
| 4.1.3 <i>Peniophora cinerea</i> CCIBt 2541 | 31 |
| 4.1.4 <i>Marasmiellus colocasiae</i> CCIBt 3388 | 32 |
| 4.2 Reativação e cultivo em meio sólido | 33 |
| 4.3 Cultivo em meio líquido | 33 |
| 4.4 Atividade enzimática | 33 |
| 4.4.1 Lacase (Lac) | 33 |
| 4.4.2 Atividade enzimática de Manganês Peroxidase (MnP)..... | 34 |
| 4.4.3 Atividade enzimática de Lignina Peroxidase (LiP) | 34 |
| 4.4.4 Determinação da atividade enzimática..... | 34 |
| 4.5 Purificação e caracterização bioquímica | 35 |
| 4.5.1 Tratamento do caldo bruto..... | 35 |
| 4.5.2 Visualização qualitativa do perfil proteico: SDS- PAGE e revelação de gel nativo..... | 35 |
| 4.5.3 Teor de proteína..... | 36 |
| 4.5.4 Técnicas cromatográficas | 36 |
| 4.5.5 Determinação dos parâmetros cinéticos aparente | 36 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.5.6 | Temperatura ótima e estabilidade térmica..... | 36 |
| 4.5.7 | pH ótimo..... | 37 |
| 4.5.8 | Estabilidade em NaCl e efeito de íons e outros agentes na atividade de lacases | 37 |
| 4.6 | Tratamento de corantes têxteis | 37 |
| 4.6.1 | Descoloração de corantes têxteis | 37 |
| 4.6.2 | Teste de toxicidade: Microtox | 38 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 39 |
| 5.1 | Atividade de lacases | 39 |
| 5.2 | Purificação de lacases | 39 |
| 5.3 | Caracterização aparente das lacases parcialmente purificadas | 45 |
| 5.3.1 | Cinética enzimática aparente | 46 |
| 5.3.2 | Temperatura e pH ótimos | 47 |
| 5.3.3 | Estabilidade Térmica..... | 50 |
| 5.3.4 | Efeito de íons, de um aminoácido e um agente quelante sobre a atividades de lacases | 51 |
| 5.3.5 | Efeito do NaCl nas lacases | 53 |
| 5.4 | Descoloração e destoxificação do corante têxtil marinho reativo | 55 |
| 6. | CONCLUSÕES..... | 59 |
| 7. | REFERÊNCIAS..... | 60 |
| | APÊNDICE | 77 |

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As lacases (benzenediol: oxigênio oxi-redutase) [EC 1.10.3.2] são glicoproteínas pertencente ao grupo de enzimas multicobre oxidases, contendo em sua estrutura quatro íons de cobre. Estas enzimas oxidam um grande número de reações de compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos, reduzindo oxigênio à água, sem necessidade de coenzima (LEONOWICZ, et al., 2001; DURÁN et al., 2002).

Lacase foi inicialmente isolada da planta *Rhus vernicifera* (*Toxicodendron vericifluum*) (YOSHIDA, 1883). A produção de lacases por fungos foi observada por volta de 1896, e posteriormente, essas enzimas foram detectadas também em bactérias, corais, pepinos do mar, insetos e algas (THURSTON, 1994; THEERACHAT; GUIEYSSE, 2018; OTTO; SCHLOSSER, 2014). Os fungos basidiomicetos são os principais produtores de lacases, com destaque para os fungos de podridão branca (GIARDINA et al., 2010).

Geneticamente estas enzimas possuem uma grande variabilidade, inclusive entre espécies e em um mesmo indivíduo, sendo este fenômeno principalmente observado em fungos, os principais produtores. Diferentes isoformas são expressas dependendo do tipo de indutor, das características físico-químicas e cinética dos nutrientes e do grau de polimorfismo entre as espécies (BLAICH; ESSER, 1975). Os genes das lacases possuem 4 regiões altamente conservadas sem presença de *gaps*, onde são expressos aminoácidos fundamentais para ligações com os íons cobre, dando funcionalidade à enzima, formando assim, o sítio ativo. Estas regiões são denominadas L1, L2, L3 e L4 (KUMAR et al., 2003). Mais de 100 isoformas da enzima já foram relatadas (BALDRIAN, 2006).

Aplicações bem-sucedidas de lacases as evidenciam como uma ótima alternativa para processos biotecnológicos. A enzima pode ser utilizada na forma nativa ou imobilizada, em ambientes aquosos, na presença de solventes orgânicos, oferecendo aplicabilidade em diferentes campos industriais, e na área ambiental são aplicadas de forma sustentável e ecologicamente amigável em processos de biorremediação (LEONOWICZ, et al., 2001; POLIZELI; RAI, 2014; MINUSSI; PASTORE; DURÁN, 2002).

Embora existam inúmeras perspectivas em distintos campos de atuação e promissoras aplicações industriais, ainda há poucas aplicações de lacases no mercado. Isso é devido, principalmente, ao alto custo da produção somada à baixa produtividade enzimática pelos organismos naturais ou recombinantes (POLIZELI; RAI, 2014). A fim de reverter essa situação, estratégias e ensaios para o melhoramento da obtenção de lacases vêm sendo empregados, incluindo a procura por novos produtores, mutagênese e recombinação gênica (GIESE et al., 2004; SHANKAR; SHIKHA, 2012).

Uma das áreas de aplicação mais promissora das lacases é a descoloração de corantes têxteis em efluentes industriais (GONÇALVES; SILVA; CAVACO-PAULO, 2015). Estes resíduos causam grandes problemas ambientais, pois bloqueiam a passagem da luz para os ecossistemas aquáticos mais profundos, diminuem o processo de fotossíntese, e ocasionam condições anaeróbicas (RAGHUKUMAR; D'SOUZA-TICLO; VERMA, 2008). Tais compostos, em sua maioria, são aromáticos, incluindo fenóis e aminas. Por agirem sobre estes substratos, as lacases têm apresentado resultados satisfatórios no processo de descoloração deste tipo de poluente (SHRADDHA et al., 2011).

Efluentes da indústria têxtil, apresentam alta concentração de sais (MOREIRA; MILAGRES; MUSSATTO, 2014). Partindo deste pressuposto, a fim de tratá-los, biocatalizadores estáveis e/ou organismos tolerantes aos sais são requeridos. Neste contexto, os fungos marinhos e os catalizadores por eles sintetizados, apresentam-se como recursos genéticos promissores devido às suas adaptações fisiológicas, as quais incluem a tolerância à salinidade, pressão, baixa temperatura, condições oligotróficas, pH extremos, disparidades nas concentrações de minerais disponíveis, entre outras (BONUGLI-SANTOS et al., 2015).

Neste sentido, o grupo de pesquisa coordenado pela professora Dra. Lara Durães Sette, há mais de uma década vem concentrando esforços em pesquisas relacionadas com o isolamento de fungos de ambiente marinho, visando produção, caracterização e aplicação de lacases em processos biotecnológicos. Assim, os fungos basidiomicetos de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063, *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, têm sido estudados quanto à produção de enzimas e aplicação na área ambiental no tocante a degradação de corantes têxteis e hidrocarbonetos (BONUGLI-SANTOS et al., 2010a, 2010b; MAGRINI, 2012; BONUGLI-SANTOS et al., 2012; MAINARDI et al., 2018; OTERO et al., 2017; PAIVA, 2016; BONUGLI-SANTOS et al., 2016).

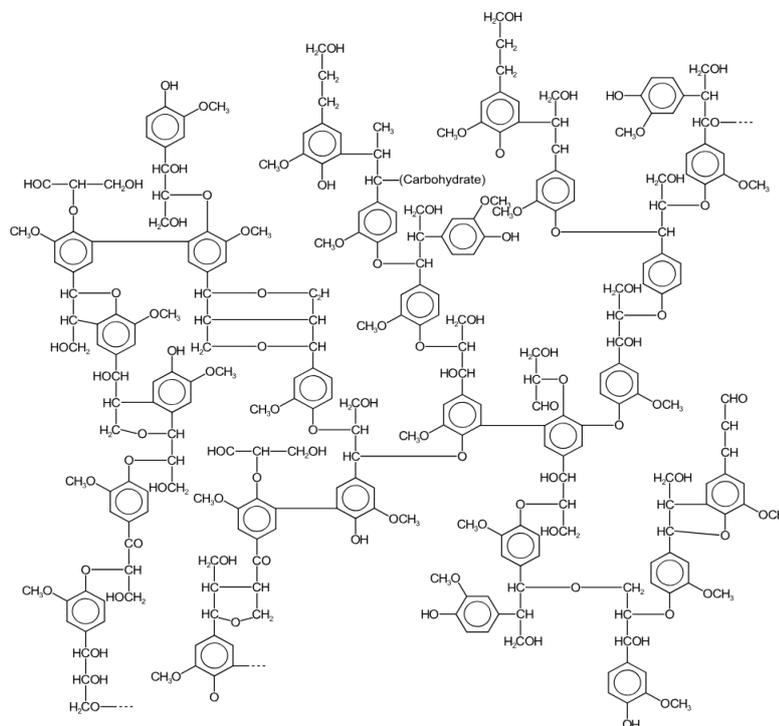
Levando-se em consideração a capacidade de produção de lacases pelos fungos marinhos acima mencionados e o potencial que elas podem apresentar na degradação de poluentes ambientais em condições salinas, faz-se necessária a sua caracterização, tendo em vista a identificação de isoformas com melhor potencial de ação no ambiente alvo. Em adição, considerando que os diferentes fungos de origem marinha, destacados neste trabalho, possuem homólogos terrestres, a comparação da eficiência físico-químicas das lacases produzidas por eles podem fornecer conhecimentos significativos para melhor aplicabilidade na área da biotecnologia ambiental.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Enzimas ligninolíticas

A lignina é um polímero complexo composto por hidroxifenil-propano (Figura 1), atua como uma cola natural nas lamelas intermédias nos tecidos vegetais, bem como matriz nas paredes secundárias das células da madeira e como ligante entre celulose e cadeias de hemicelulose, dando força às plantas e auxiliando na proteção contra a perda de água e organismos invasores (RIVA, 2006; HAO; MOHNEN, 2014).

Figura 1. Modelo representativo da estrutura da lignina (Fonte: GLAZERA; NIKAIDO, 2007)

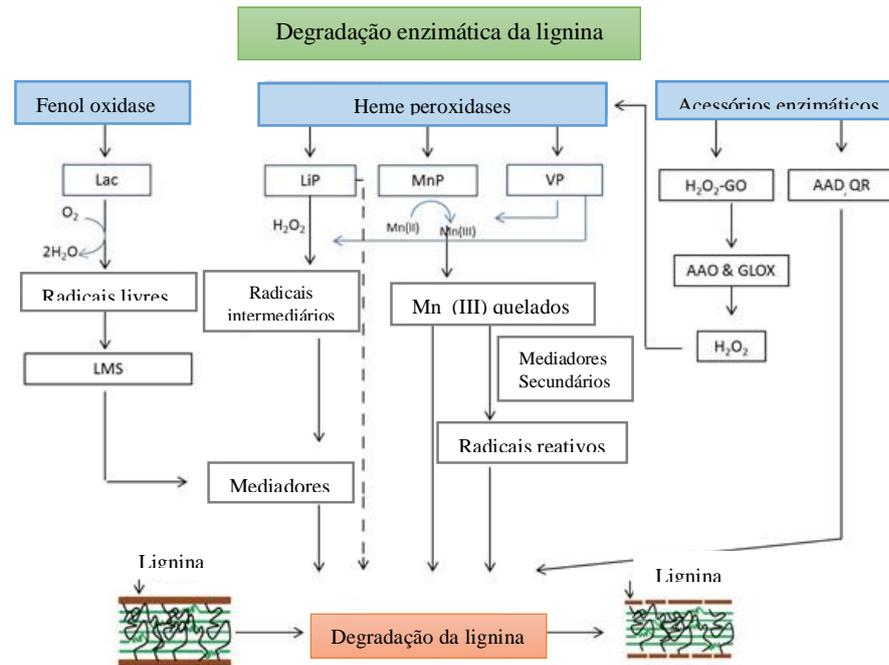


As fontes de carbono disponíveis nos tecidos vegetais podem ser utilizadas por microrganismos, os quais secretam enzimas oxidativas a fim de degradar a lignina e obtê-las. As principais enzimas do sistema ligninolítico estão apresentadas na Figura 2, sendo as lacases (Lac), manganês peroxidase (MnP), e lignina peroxidase (LiP) as enzimas mais utilizadas neste processo. A degradação da lignina é um processo multi enzimático, por reação não específica, com transferência de átomos de hidrogênio a um receptor final (LEONOWICZ et al., 2001).

As peroxidases ligninolíticas são hemoproteínas de ação catalítica apenas na presença de peróxido de hidrogênio, para onde são transferindo os íons hidrogênio do substrato, a fim de produzir água. A lignina peroxidase age clivando ligações carbono alfa e beta, abrindo anéis aromáticos e gerando radicais hábeis para reagir sobre o substrato. A manganês peroxidase oxida íons manganês, tornando-os capazes de reagir com ácidos orgânicos, os quais podem

oxidar substratos secundários (GAJERA et al., 2015; CHRISTIAN et al., 2005; SINGH; SINGH; SINGH, 2015). As enzimas ligninolíticas de modo geral agem sobre uma diversidade de compostos formados por anéis aromáticos, fenólicos e não fenólicos, tornando-as promissoras em processos biotecnológicos (GHOSH; DASTIDAR; SREEKRISHNAN, 2016).

Figura 2. Diagrama esquemático da degradação da lignina (Fonte: SETTE; BONUGLI-SANTOS, 2013, adaptado de DASHTBAN et al. 2010).



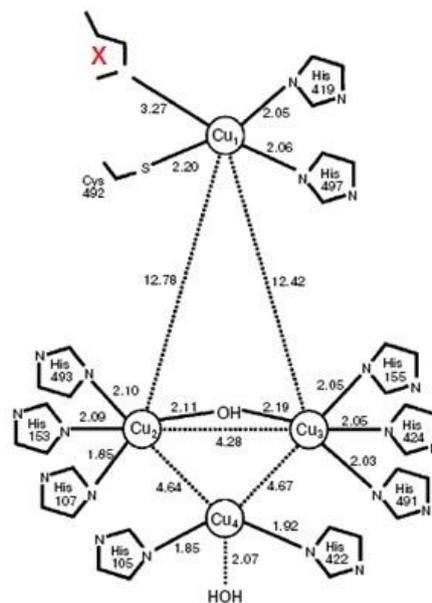
Lac = Lacase; LiP = Lignina peroxidase, MnP = Manganês peroxidase; VP = Versátil oxidase; AAO = Aril-álcool oxidase; GLOX = Glioxal oxidase; LMS = Sistema lacase-mediador; H₂O₂-GO = H₂O₂-generating oxidases; AAD = Aril-álcool desidrogenases; QR = Quinona redutase .

2.2 Lacases

As lacases pertencem ao grupo das enzimas multicobre oxidase (benzenediol: oxigênio oxi-redutase) [EC 1.10.3.2]: compostas por um sítio ativo com quatro íons de cobre dispostas em uma estrutura geométrica e eletrônica (Figura 3), o qual é constituído por um centro tipo 1, onde se encontra o Cu1 (centro azul); o agrupamento trinuclear composto pelo tipo 2, onde se encontra os Cu2 e Cu3 e o centro tipo 3 integrado pelo Cu4 (DURÁN et al., 2002). A reação típica de lacases inicia-se no Cu1, sendo este o primeiro aceptor de elétrons. É neste local que a oxidação de quatro elétrons de quatro moléculas de substrato (fenóis ou aromáticos doadores de hidrogênio) ocorre. Este centro também é que determina o ritmo da reação, bem como o potencial redox das lacases, por conta de suas características estruturais, coordenação

geométrica, ligações de hidrogênio e presença ou ausência de grupos hidrofóbicos. Os elétrons deste centro são transportados por um tripeptídeo altamente conservado nas lacases (His, Cys, His) até o centro trinuclear onde o O_2 é reduzido à moléculas de água. O processo de redução do O_2 a água e oxidação do substrato ocorre de forma concomitante. A oxidação dos substratos gera radicais fenóis e intermediários quinona, os quais podem formar dímeros ou polímeros insolúveis em água (GIARDINA et. al, 2010; DURÁN et. al, 2002; LEONOWICZ et. al, 2001; RIVA, 2006; SOLOMON et. al, 1996).

Figura 3. Representação esquemática do sítio ativo de lacases. X - aminoácido variável; Cu1 - cobre T1; Cu4 - cobre T2; Cu 2 e 3 - par de cobres T3. (Fonte: OTERO, 2016 adaptado de CLAUS, 2004).



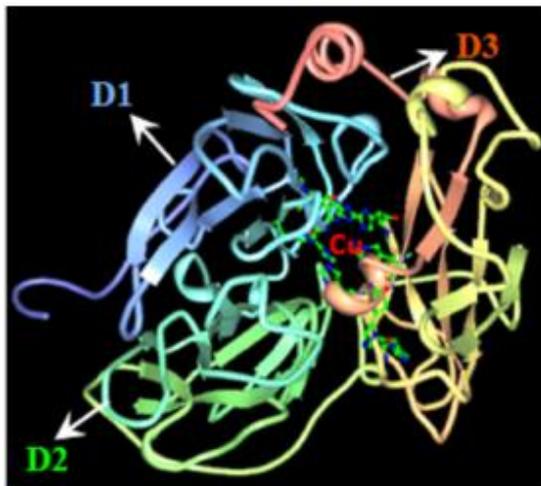
As lacases são glicoproteínas com proporções glicosídicas variadas em diferentes organismos. Em plantas cerca de 45% da enzima é composta por glicídios e em fungos estes geralmente correspondem a 15-30% (SHRADDHA et al., 2011). Estudos têm evidenciado que a porção glicosídica desempenha papel na proteção da enzima contra a proteólise e radicais livre e para a estabilidade da proteína (GOMES et al., 2007; MOROZOVA et al., 2007).

A massa molecular das lacases está em torno de 50-130 kDa, com uma temperatura de ação ótima entre 45-70 °C, havendo preferência por temperaturas mais elevadas. Em relação ao pH, estudos em diferentes fungos apontam melhor ação em meio ácido com pH em torno de 3-5. Contudo, alguns estudos apontam estabilidade maior em meio mais neutro a alcalino, sendo diretamente influenciado pelo substrato, o que provoca expressões de diferentes variações da enzima. Os valores cinéticos de K_m e k_{cat} variam para o mesmo substrato (GOMES et al., 2007; MOROZOVA et al., 2007; SHRADDHA et al., 2011).

2.2.1 Dinâmica gênica das lacases

Uma grande variabilidade de lacases podem ser produzidas pelas diferentes espécies produtoras. Esta multiplicidade é causada pela diversificação de isoformas de lacases em fungo por conta da pluralidade de genes, diferenças nas concentrações de nutrientes, agentes indutores, graus de polimorfismos, características físico-químicas e propriedades cinéticas. Em fungos basidiomicetos, há várias espécies produtoras de mais de uma isoforma da enzima (DURÁN et al., 2002; BLAICH; ESSER, 1975). Baldrian (2006) relata mais de 100 lacases purificadas, sendo a maioria de basidiomicetos de podridão branca, e embora haja outros grupos de fungos que as produzem em quantidade inferiores, a estrutura tridimensional da enzima exibe a mesma arquitetura molecular (POLIZELI; RAI, 2014), incluindo os domínios conservados relacionados aos sítios de ligação ao cobre (Figura 4).

Figura 4. Estrutura da lacase do fungo *Trametes versicolor* evidenciando os dos 3 domínios *cupredoxin* D1 - domínio 1; D2 - domínio 2; D3 - domínio 3 (Fonte: OTERO, 2016 adaptada de DWIVEDI et al., 2011).

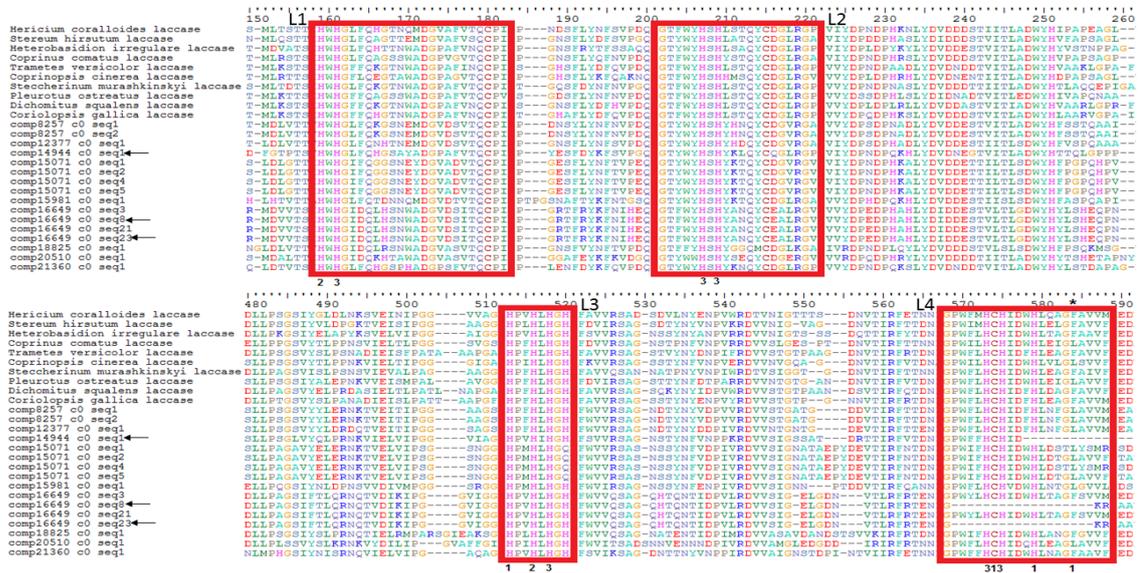


Diversos fungos possuem mais de um gene em um mesmo cromossomo e essas sequências gênicas têm mostrado alta conservação em quatro regiões denominadas L1, L2, L3 e L4 (Figura 5). Os transcritos dessas regiões, na estrutura proteica, interagem de forma específica com as quatro íons de cobre, formando o sítio ativo, e a simetria natural da arquitetura, evidencia o fenômeno da duplicação gênica no processo evolutivo para manutenção desta molécula (KUMAR et al., 2003).

Em trabalho prévio realizado com o fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063, foram encontrados no transcriptoma do mesmo (após cultivo nas condições otimizadas), dez diferentes lacases com peptídeos variando entre 482 a 588 aa de comprimento e massas

moleculares de 53,5 a 64,4 kDa (OTERO et al., 2016). Em adição, Kilaru, Hoegger e Kues, (2006) encontraram 17 genes para lacases em *Coprinopsis cinerea*, destas pelo menos nove produzem isoformas funcionais. A identificação de distintos genes para lacase está diretamente relacionada ao crescente número de sequenciamento genômico de fungos. Tal diversificação ainda não é bem compreendida, mas possivelmente a variedade de funções fisiológicas durante o ciclo de vida celular fúngica pode ser uma explicação (GIARDINA et al., 2010; POLIZELI; RAI, 2014).

Figura 5. Alinhamento de lacases fúngicas e genes de lacase de *Peniophora* sp. CBMAI 1063 transcritos. Os retângulos vermelhos representam as regiões conservadas L1, L2, L3 e L4 (Fonte: OTERO, 2016).



Com relação à abundância de genes que codificam para lacases, diversos componentes têm se apresentado como indutores. Ensaios têm evidenciado que a presença e proporção de carbono e nitrogênio influenciam na regulação da expressão gênica (D'AGOSTINI et al., 2011). Agentes químicos como tween, álcool veratrílico, ácido nicotínico e ácido L-aspartico, podem induzir a produção destes biocatalizadores em fungos (GIESE et al., 2004; SHANKAR; SHIKHA, 2012). Outros componentes reguladores são os íons metais Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ag^{+} , Mn^{2+} . Os compostos aromáticos de igual forma também têm sido reportados como indutores, incluindo a presença de pequenas quantidades de corantes, possivelmente sendo esse fato relacionado à defesa contra o estresse causado pelas substâncias fenólicas (GIARDINA et al., 2010; THURSTON, 1994; YAVER et al., 1996; POLIZELI; RAI, 2014; COLLINS; DOBSON, 1997; VAITHANOMSAT et al., 2010).

2.2.2 Organismos produtores de lacases

A enzima lacase foi isolada pela primeira vez em 1883 da árvore japonesa da família do caju, *Rhus vernicifera* (*Toxicodendron vericifluum*) (Yoshida, 1883). Entretanto, atualmente, sabe-se que lacases são amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em representantes dos três domínios: archaea (*Haloferax volcanii*), procariotos (bactérias e cianobactérias) e eucariotos (fungos, algas, insetos, corais, pepino do mar e plantas) (UTHANDI et al., 2010; THEERACHAT; GUIEYSSE, 2018; POLIZELI; RAI, 2014; MOROZOVA et al., 2007; HUTTERMANN; MAI; KHADAZIPOUR, 2001).

Distintas funções biológicas têm sido associadas às lacases. Em plantas, acredita-se que a enzima desempenha um papel na síntese de lignina e catálise da polimerização radicular de unidades estruturais de álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (BAO et al., 1993; POLIZELI; RAI, 2014, MOROZOVA et al., 2007). Em bactérias, atua na morfogênese, biossíntese do pigmento marrom de esporos, na proteção contra raios UV e peróxido de hidrogênio, e na homeostasia do cobre (SHARMA; GOEL; CAPALASH, 2007). Em insetos, auxilia na esclerotização da cutícula epidérmica (DITTMER et al., 2004). Em invertebrados como pepino do mar e corais, ainda não está bem solucionada a função desta enzima, porém, acredita-se que esteja relacionada à proteção contra agentes biológicos, por estar presente na via de melanização, ou assim como nos insetos, estar relacionada à esclerotização e regeneração causada por injúrias (MYDLARZ; PALMER, 2011; JIANG et al., 2014). Em algas, as lacases parecem agir na detoxificação de componentes fenólicos, desempenhando papel na síntese de componentes da parede celular e absorção de produtos resultantes da quebra de materiais ligninolíticos de componentes fenólicos (OTTO; SCHLOSSER, 2014). Em fungos há maior produção e desempenho, incluindo o auxílio no desenvolvimento do corpo de frutificação, pigmentação dos esporos, diferenciação sexual, formação do rizomorfo, morfogênese, defesa contra estresse, ação contra patógenos, detoxificação e, principalmente, ligninólise (quebra das ligações carbono-carbono ou carbono-oxigênio em polímeros de lignina ou componentes ligninolíticos) (LEONOWICZ, et al., 2001; GOMES et al., 2007; GIARDINA et al., 2010; BALDRIAN, 2006; POLIZELI; RAI, 2014).

Devido ao fato dos fungos possuírem habilidades em produzir lacases de forma mais expressiva, podendo apresentar capacidade oxidativa superior à de outros organismos, esses organismos são os de maior interesse do ponto de vista biotecnológico (SHRADDHA et al., 2011). Em adição, as lacases fúngicas exibem alta estabilidade molecular e maior potencial de redução em comparação com as lacases de outros organismos (RODGERS et al., 2009). Vários estudos reportam a habilidade de fungos basidiomicetos de origem terrestre para a produção de

lacases (PATEL et al., 2014; TINOCO et al., 2011; SIVAKUMAR et al., 2010; MANAVALAN et al., 2013; REVANKAR; LELE, 2006; SENTHIVELAN; KANAGARAJ; PANDA, 2016), porém, os estudos com fungos de origem marinha ainda são escassos.

2.2.3 Produção de lacases por fungos de origem marinha

Os fungos encontrados no ambiente marinho podem ser classificados quanto aos hábitos: são marinhos obrigatórios aqueles que crescem e esporulam exclusivamente em ambiente marinho (substratos, estuários, água do mar), ao passo que os facultativos são aqueles capazes de crescer no ambiente marinho, porém são provenientes da água doce ou de ambiente terrestre (KOHLMEYER; VOLKMANN-KOHLMEYER 2003). Devido à dificuldade de classificação dos fungos marinhos, o termo fungos derivados marinhos (*marine-derived fungi*) tem sido utilizado para englobar os fungos que foram isolados do ambiente marinho, sem a necessidade categorizá-los como marinhos obrigatórios ou facultativos (OSTERHAGE, 2001).

De acordo com Jones et al. (2009), há dez anos atrás, a estimativa da biodiversidade dos fungos marinhos era de 530 espécies, sendo 424 representantes dos ascomicetos, 12 dos basidiomicetos (sem a inclusão de leveduras) e 94 de fungos anamórficos, excluídos os fungos verdadeiros zoospóricos. É evidente que estes números não refletem a verdadeira diversidade dos fungos marinhos, mas demonstram que o mar, sendo um amplo ecossistema, é pouco explorado na área da micologia.

Estes microrganismos são encontrados em associação com vários organismos (e.g. algas, corais, tunicados, moluscos, plantas, peixes e esponjas) (SHIN; LEE, 2000) e apresentam excelente perspectiva para o campo biotecnológico, devido às suas adaptações fisiológicas relacionadas com a tolerância a elevadas concentrações de sais, alta pressão, baixa temperatura, condições oligotróficas, pH extremos, disparidades nas concentrações de minerais, além das condições de pouca incidência de raios de luz (BONUGLI-SANTOS et al., 2015). De acordo com Passarini e colaboradores (2011) uma vasta fração de fungos marinhos ainda não foram catalogados os quais podem apresentar capacidade de produzir enzimas ligninolíticas e degradar poluentes, tais como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Em adição, Bounugli-Santos e colaboradores (2015) reportaram haver um amplo mercado para enzimas produzidas por fungos marinhos, incluindo as lacases.

Alguns fungos derivados de ambiente marinho foram reportados em literatura como produtores de enzimas ligninolíticas. D'Souza et al., (2006) reportaram a produção de uma quantidade elevada de lacases por um fungo basidiomiceto marinho não identificado. No estudo de Raghukumar e colaboradores (1994) foram alcançados resultados positivos para a produção

de enzimas ligninolíticas (LiP, MnP e lacase) pelo fungo de degradação branca *Flavodon flavus* isolado dos detritos da alga *Thalassia hemprichii*. Li, Kondo e Sakai (2003a, 2003b) publicaram dois artigos envolvendo a produção de enzimas ligninolíticas pelo basidiomiceto de decomposição branca *Phlebia* sp. IMG-60 em diferentes concentrações de sal. Estudos do nosso grupo de pesquisa envolvendo a produção de ligninases por fungos derivados-marinhos, bem como a otimização e expressão de lacases foram também publicados (DA SILVA et al., 2008; BONUGLI-SANTOS, 2010a, 2010b; PASSARINI et al., 2015; OTERO et al., 2017; MAINARDI et al., 2018; DUARTE et al., 2018).

2.2.4 Aplicações das lacases

Devido à capacidade de oxidar grande número de compostos aromáticos as lacases são promissoras em aplicações biotecnológicas. Estas enzimas podem ser utilizadas na forma nativa ou imobilizada, em ambientes aquosos, na presença de solventes orgânicos, oferecendo aplicabilidade em diferentes campos industriais e na biorremediação. As vantagens em usar lacases em processos industriais são extensas, e inclui entre outras, a sua ação como mediadoras de baixo peso molecular (LEONOWICZ et al., 2001; POLIZELI; RAI, 2014; MINUSSI; PASTORE; DURÁN, 2002).

2.2.4.1 Química sintética e orgânica

Usada na sínteses de corantes; em procedimentos de polimerização de monômeros de catecol para a produção de policatecol sintético; na fabricação de polímeros inertes de fenóis, os quais possuem diversas aplicações, tal como ligações de fibra, laminados, revestimento e adesivos. Na fabricação de aldeídos aromáticos a partir do teuteno como substrato, síntese de polímeros de reutina objetivando inibição de adipogênicos e de aminonaftoquinonas com atividade anticâncer (GONÇALVES; SILVA; CAVACO-PAULO, 2015; POLIZELI; RAI, 2014; GIARDINA et al., 2010).

2.2.4.2 Indústria de papel

Lacases agem no branqueamento da polpa e deslignificação, no tratamento de efluente deste tipo de indústria, no pré-tratamento da madeira, melhoramento a solubilidade da lignina. A enzima, de modo geral, age sobre substratos presente na matéria prima do papel, proporcionando modificações na lignina, evitando assim, o uso de cloro ou oxidantes quimicamente baseado em oxigênio, reduzindo a quantidade requerida de água e energia no

processamento da polpa (GONÇALVES; SILVA; CAVACO-PAULO, 2015; POLIZELI; RAI, 2014; GIARDINA et al., 2010; LEONOWICZ et al., 2001).

2.2.4.3 Indústria de alimentos

Lacases são utilizadas em massas tornando-as mais fortes, estáveis, reduzindo a viscosidade, aumentando o volume e tornando-as mais macias (geralmente não exigindo a presença de glúten); garante a estabilização do mosto; utilizada para melhoria da cor e a qualidade de vinhos e sucos; remoção de polifenóis em cerveja, aumentando assim, o prazo de validade; eliminação de oxigênio dissolvido em óleos vegetais, evitando a oxidação indesejada, além disso, é usada no pré-tratamento do cacau para enriquecer o sabor e o gosto do chocolate (BONUGLI-SANTOS et al., 2015; GONÇALVES; SILVA; CAVACO-PAULO, 2015; POLIZELI; RAI, 2014; GIARDINA et al., 2010; MINUSSI; PASTORE; DURÁN, 2002; LEONOWICZ et al., 2001).

2.2.4.4 Indústrias farmacêuticas e de cosméticos

Na indústria farmacêutica lacases podem ser aplicadas tanto para reduzir o número de passos na síntese de drogas, diminuir toxicidades de alguns reagentes, tornando o processo de fabricação mais barato, facilitando a fabricação por acoplamentos oxidativos. Além disso, estas enzimas podem ser aplicadas para modificar ou degradar componentes farmacêuticos, como agentes não-esteróis e antibióticos a fim de evitar lança-los no ambiente. São aplicadas com ação antimicrobiana, como desintoxicante; como droga (e.g. actinomicina anticâncer, antibióticos, sedativos, anti-inflamatórios); aplicadas em produtos para clareamento de pele e na produção de iodine, um reagente largamente usado como desinfetante (BONUGLI-SANTOS et al., 2015; GONÇALVES; SILVA; CAVACO-PAULO, 2015; POLIZELI; RAI, 2014).

2.2.4.5 Biorremediação

Componentes tóxicos muitas vezes fazem parte de efluentes industriais, tornando-se um problema ambiental de difícil tratamento. Neste sentido, microrganismos produtores de lacases podem ser aplicados na descontaminação, por possuírem capacidade de quebrar moléculas xenobioticas em estruturas que podem ser menos toxicas, por ligar em nanoparticulas magnéticas amino-funcionalizadas, corantes têxteis, fármacos aromáticos e outros (GONÇALVES; SILVA; CAVACO-PAULO, 2015; BONUGLI-SANTOS et al., 2015; POLIZELI; RAI, 2014; LEONOWICZ et al., 2001).

2.2.4.6 Outras aplicações

Lacases têm mostrado ser útil em aplicações nanobiotecnológicas, devido a capacidade para catalisar a eletrotransferência sem a necessidade de um cofator. Têm sido aplicadas para sínteses de vários itens funcionais com propriedades mecânicas, elétrica, ótica ou pesticida; têm apresentado função importante como biosensores na detecção de fenóis em dejetos aquático ou na indústria de alimentos, bem como, por meio de reações oxidativas por radicais-mediadores livres atuar no campo de biocombustíveis (BONUGLI-SANTOS et al., 2015; POLIZELI; RAI, 2014; GIARDINA et al., 2010; MOROZOVA et al., 2007; MINUSSI; PASTORE; DURÁN, 2002).

2.2.4.7 Aplicação de lacases na indústria têxtil

Os corantes são feitos de fontes distintas, podem ser naturais, inorgânicos ou sintéticos, com maior preocupação para estes últimos, devido ao alto custo e dificuldade em tratá-los (KARTIKA, 2015; ROSSI et al., 2017). Os corantes naturais de organismos vivos e inorgânicos provenientes de minerais, embora se apresentem como “amigos do ambiente”, eles têm um lado negativo por conta dos mordentes utilizados para a fixação no tecido que são majoritariamente sais metálicos (e.g. alumínio, sulfato de cobre, sulfato ferroso, dicromato de potássio e cloreto estânico, entre outros) e podem causar bioacumulação (KUMAR; DAYAL; ONIAL, 2014; BENKHAYA; HARFI; HARFI, 2017).

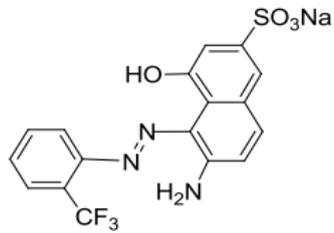
Em relação aos corantes sintéticos, eles são classificados com base em sua composição química ou aplicação. (i) azos: são os mais utilizados, apresentam cromóforo com ligação azo ($-N = N-$), são bem aceitos devido à resistência às ações físico-químicas, simplicidade na reação de acoplamento, variações estruturais e alta extinção molar (Figura 6 A) (ONG et al., 2010; ARACAGÖK; CİHANGİR, 2013). (ii) sulfurosos: os quais possuem uma estrutura altamente complexa, feita principalmente pela tionização de vários intermediários aromáticos (Figura 6 B); (iii) corantes ácidos (pH 3-7): aplicados sob condições acídicas, eles têm uma variedade de estruturas e complexos metálicos, o arranjo sufonado dá solubilidade em água (Figura 6 C); (iv) corantes dispersos: são insolúveis em água, aplicados em substratos hidrofóbicos, exigindo muita água no processo de tingimento (Figura 6 D); (v) corantes básicos: têm difusão em água quente, produzem cátions para atrair carga negativa ao corante, que vêm do grupo amônio, entre outros (Figura 6 E); (vi) corantes diretos: são formados por vários cromóforos, estilbeno, ftalocianina, dioxazina e outras classes químicas menores, como formazan, antraquinona, quinolona e tiazol (Figura 6 F); (vii) corantes de antraquinona: podem

ser neutros, catiônicos ou aniônicos, contendo funções de hidroxila ou amina, sistema de anel policondensado e outros (Figura 6 G); (viii) corantes indigóides: a princípio foram extraídos de plantas, posteriormente sintetizados em laboratório, apresentam baixa solubilidade devido a sua ligação de hidrogênio intra- e intermolecular (Figura 6 H); (ix) corantes metálicos complexos: apresentam um átomo de metal, geralmente metais pesados (Cr, Co e Cu), os quais oferecem cores profundas e ajudam na fixação; (x) corantes reativos: são os terceiros mais presentes no mercado correspondendo a 16% do total, uma classe de corantes com grupos funcionais específicos que atuam por ligação covalente com o substrato, de ampla gama de tons estáveis a luz e resistentes a lavagem em algodão, contudo, apresenta pobre fixação no tecido alvo, sendo aplicado em tecidos a base de celulose, lã e nylon (Figura 6 I) (BENKHAYA; HARFI; HARFI, 2017; CERRÓN et al, 2015; OLIVEIRA et al., 2016; HUNGER, 2004; GHOSH; DASTIDAR; SREEKRISHNAN, 2016).

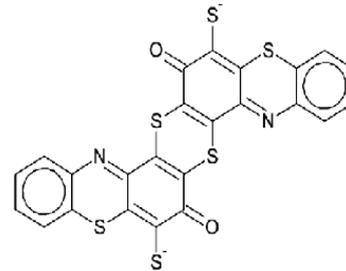
A indústria têxtil libera grande quantidade de efluentes contendo diversos tipos de corantes, os quais possuem alta salinidade e mordentes (KUMAR; DAYAL; ONIAL, 2014; BENKHAYA; HARFI; HARFI, 2017). Em razão disso, as suas águas residuais se apresentam como um grande desafio, devido à dificuldade em tratá-las e aos efeitos adversos nos leitos de rios. Os metais pesados e a estrutura química dos corantes têxteis podem contribuir para a mutação, alergias ou desenvolvimento de câncer nos organismos vivos. Também resistem à agentes biológicos e/ou químicos, podem causar efeitos adversos de toxicidade, bloqueiam a passagem da luz para os ecossistemas aquáticos mais profundos, diminuindo o processo de fotossíntese, levando à condições anaeróbicas, o que por consequência leva à morte formas de vida aquáticas, causando danos ambientais e odor desagradável. Além do mais, os corantes hidrofóbicos, por não dissolverem em água, exigem grande quantidade de líquido para serem tratados, e uma porcentagem significativa de corantes permanece na água após o banho (RAGHUKUMAR; D'SOUZA-TICLO; VERMA, 2008; ROSSI, et al., 2017; CERRON et al. 2015; MALINAUSKIENE et al., 2012; HUNGER, 2004; SCHNEIDER; HAFNER; JAGER, 2004; CORREIA; STEPHENSON; JUDD, 1994; CHUNG; CERNIGLIA, 1992).

Por conta disto, microrganismos com adaptações fisiológicas e capazes de sintetizar biomoléculas estáveis em situações adversas são almejados na área da biotecnologia ambiental. Nesse contexto, os fungos marinhos podem, por consequência de suas adaptações, ser efetivos em tratamentos de efluentes têxteis (RAGHUKUMAR; D'SOUZA-TICLO; VERMA, 2008; TRINCONE, 2010).

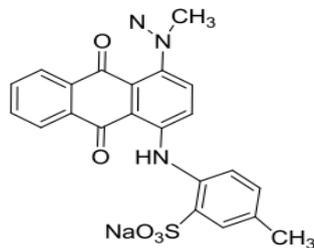
Figura 6. Estrutura química de diferentes grupos de corante têxtil: (A) corante azo; (B) corante sulfuroso; (C) corante ácido; (D) corante disperso; (E) corante básico; (F) corante direto; (G) corante antraquinona; (H) corante indigóides; (I) corante reativo.



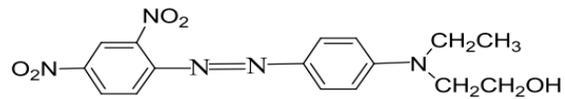
A - Corante Azo



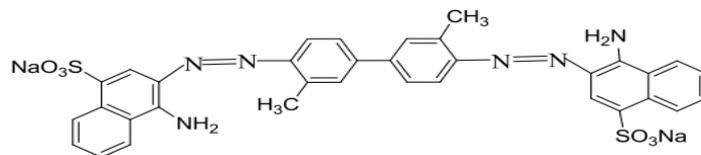
**B - Corante Sulfuroso
(Preto sulfuroso I)**



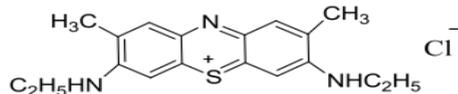
C- Corante Ácido (Azul ácido 25)



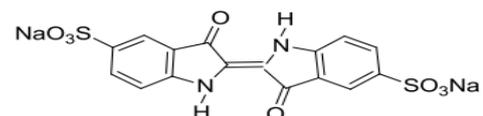
D- Corante Disperso (Vermelho disperso 8)



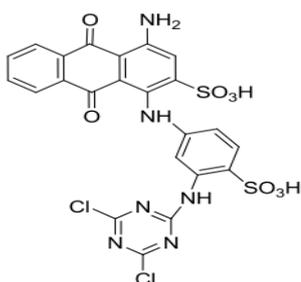
F - Corante Direto (Vermelho direto 2)



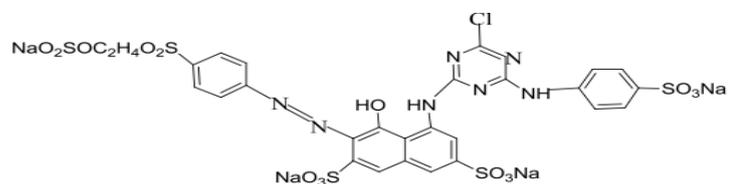
E- Corante Básico (Azul básico)



**H - Corante indigóides (Azul ácido
74)**



**G - Corante Antraquinona
(Azul reativo 4)**



I - Corante reativo (Vermelho reativo)

48 horas, utilizando 1 U/mL de lacases de *Trametes orientalis*. O estudo conduzido por Kumari, Kishor e Guptasarma (2018) com a lacase recombinante de *Thermus thermophilus* deixa evidente o papel positivo de mediadores na eficiência da descoloração de corantes têxteis, o trabalho aponta três corantes descoloridos sem necessidade de mediadores, e outros três, nos quais somente ocorreu a descoloração na presença dos mediadores.

Estudos também têm revelado o potencial de lacases na descoloração de corantes têxteis em caldo bruto, onde foram reportadas alta porcentagem de descoloração em curto tempo na presença e ausência de mediadores (COUTO, 2007; STOILOVA; KRASTANOV; STANCHEV, 2010). A descoloração de corantes têxteis por lacases é um fato. Entretanto, o ritmo da descoloração e capacidade para descolorir é dependente de vários fatores, tais como o potencial redox, concentração da enzima, condições físico-químicas para ação no meio de cultivo (temperatura, pH e mediadores), e a estrutura do corante (KUMARI; KISHOR; GUPTASARMA, 2018; BIBI; BHATTI, 2012; MIRZADEH et al., 2014).

Além da ação na descoloração e degradação de corantes, as lacases possuem outras aplicações na indústria têxtil, as quais fornecem economia de água, de químicos e de energia (MOJSOV, 2014). Estas enzimas têm sido aplicadas no branqueamento de tecidos têxteis ou no enriquecimento da tonalidade branca de tecidos a base de algodão ou lã. Podem também auxiliar no acoplamento de corante, permitindo o desenvolvimento de novas cores, auxiliam na fixação de corantes em tecidos de lã e algodão, são utilizadas para prevenir o encolhimento de lãs, podem ser empregadas em conjunto com produtos de limpeza a fim de eliminar odores e detergentes formados durante o processo de lavagem do tecido. Além disso, lacases podem ser usadas como enxertos biocatalíticos em tecidos de lã, a fim de auxiliar na ação do componente fenólico insolúvel lauril galato (MATE; ALCADE, 2017; MOJSOV, 2014; COUTO et al., 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar bioquimicamente as lacases de dois fungos basidiomicetos de origem marinha e gêneros homólogos de origem terrestre a fim de determinar e comparar as características enzimáticas dos mesmos e avaliar a eficiência das lacases parcialmente purificadas na descoloração de corantes da indústria têxtil.

3.2 Objetivos específicos

- Produção, purificação, caracterização físico-química e determinação da cinética enzimática das lacases produzidas pelos fungos basidiomicetos marinhos e terrestres dos gêneros *Peniophora* e *Marasmiellus*;
- Comparação das propriedades bioquímicas de lacases produzidas pelas espécies de origem marinha e terrestre;
- Avaliação da descoloração e destoxificação de corante têxtil pelas lacases purificadas produzidas pelos fungos em estudo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Os fungos de origem marinha utilizados neste trabalho *Peniophora* sp. CBMAI 1063 e *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 foram isolados de esponjas marinhas coletadas no litoral norte do Estado de São Paulo (MENEZES et al., 2010) e foram identificados por Bonugli-Santos e colaboradores (2010a). Os fungos de origem terrestre *Peniophora cinerea* CCIBt 2541 e *Marasmiellus colocasiae* CCIBt 3388 foram adquiridos da Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica, São Paulo (CCIBT). Todos os fungos estudados estão preservados por dois métodos distintos (criopreservação e Castellani) na coleção de pesquisa do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI) do Instituto de Biociências da UNESP campus Rio Claro, a qual é parte da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP).

4.1.1 *Peniophora* sp. CBMAI 1063

Representantes do gênero *Peniophora* são encontrados tanto em ambiente terrestre quanto marinho e são considerados basidiomicetos de podridão branca (ordem Russulales), com hifas apresentando septo do tipo doliporo (TANI; FUJII; NAKAJIMA, 2001). *Peniophora* spp.

podem ser isoladas de ambientes sob decomposição tanto em solo quanto em efluentes (SHANKAR e SHIKHA, 2012).

O fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (Figura 6) isolado da esponja *Amphimedon viridis* (MENEZES et al., 2010) é classificado como marinho facultativo, apresenta capacidade de produção de lacases em escala de Erlenmeyer e biorreator e tem demonstrando ser uma linhagem adaptada ao ambiente marinho, devido à produção significativa desta enzima apenas na presença de salinidade e sulfato de cobre, sendo a mesma estável ao estresse térmico e de pH (MAINARDI et al., 2018).

Figura 8. *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (Fonte: autor)



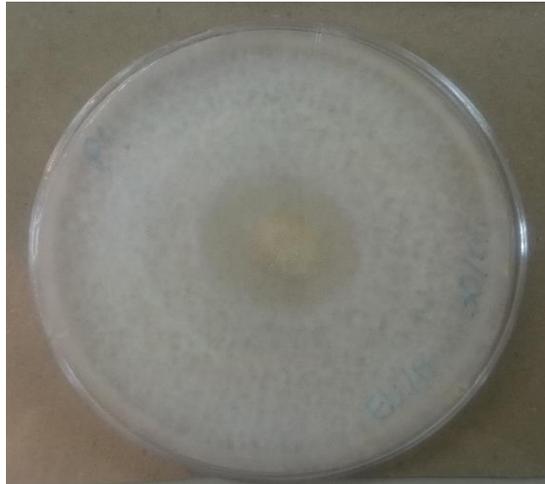
Este fungo também tem demonstrado capacidade em descolorir corantes têxteis: Preto Reativo (RB) e Azul Brilhante Remazol R (RBBR) (BONUGLI-SANTOS et al., 2012, 2016). A condição otimizada para a produção de lacases por esse fungo, bem como o uso das mesmas foi patenteada (número do registro no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI): BR102014008502 – SETTE et al., 2014). Em adição, a avaliação do transcriptoma do *Peniophora* sp. CBMAI 1063 após cultivo nas condições otimizadas de produção de lacase, revelou a presença de ao menos oito genes putativos, os quais podem expressar 10 diferentes lacases (OTERO et al., 2017).

4.1.2 *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062

Da ordem dos Agaricales o gênero *Marasmiellus* também possui representantes no ambiente terrestre e marinho (MENEZES et al., 2010). O fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 (Figura 7) foi isolado da esponja *Amphimedon viridis* e classificado como marinho facultativo. Este fungo demonstrou excelente capacidade para degradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (pireno e benzo[a]pireno) (VIEIRA et al., 2018) além de ser um bom produtor de

enzimas ligninolíticas, incluindo a lacase, e efetiva descoloração do corante têxtil *Remazol Brilliant Blue R* (BONUGLI-SANTOS et al, 2012). Poucos são os estudos que reportam esse gênero, sendo ainda mais raros os trabalhos com representantes oriundos do ambiente marinho.

Figura 9. *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 (Fonte: autor).



4.1.3 *Peniophora cinerea* CCIBt 2541

P. cinerea é um basidiomiceto de podridão branca corticioide (fungo em crosta), presente em madeiras mortas e também em limbo de plantas lenhosas. São cosmopolitas, no Brasil alguns representantes dessa espécie foram isolados da mata costeira sob influência marinha (CHAMURIS, 1991; SILVÉRIO et al., 2012).

P. cinerea quando mobilizado, apresenta melhor produção de lacases em comparação como a mesma cepa livre, estudos tem demonstrado que este fungo expressa pelo menos oito lacases, com massa molecular variando entre 30-70 kDa, com tolerância e estabilidade em meio salino, capazes de descolorir corantes têxteis como: Azul Reativo 19, efluentes sintéticos com Vermelho reativo 271 e também efluente natural (MOREIRA-NETO, 2012; SILVÉRIO et al., 2012).

O fungo *P. cinerea* CCIBt 2541 (Figura 8) foi isolado de mata de restinga em São Vicente – SP (informações cedidas pela coleção de culturas de algas, cianobactérias e fungos do Instituto de Botânica de São Paulo).

Figura 10. *Peniophora cinerea* CCIBt 2541(Fonte: autor).

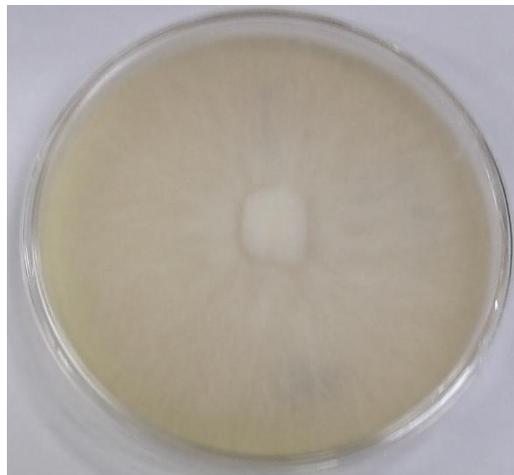


4.1.4 *Marasmiellus colocasiae* CCIBt 3388

Marasmiellus colocasiae é um típico patógeno da planta *Colocasia esculenta* (Taro ou planta do tubérculo inhame), apresenta basidiocarpo de coloração branca. Esta espécie foi isolada e identificada a partir de plantações de inhame no estado do Espírito Santo. Por conta da *Colocasia esculenta* ser exótica, oriunda da Ásia, acredita-se que este fungo também tenha sido introduzido. Contudo, de maneira geral, existem poucos estudos com fungos do gênero *Marasmiellus*, o que impossibilita maiores inferências quanto à sua biologia e distribuição (CAPELARI et al., 2010) .

O fungo *M. colocasiae* CCIBt 3388 (Figura 9) foi isolado no estado de São Paulo, porém dados mais acurados sobre o isolamento não foram disponibilizados.

Figura 11. *Marasmiellus colocasiae* CCIBt 3388 (Fonte: autor).



4.2 Reativação e cultivo em meio sólido

Os fungos foram reativados e cultivados em meio sólido ágar-malte contendo extrato de malte 2,0% (w/v) e ágar-ágar 2% (w/v), por 7 dias a 28°C. Após verificação de viabilidade celular e pureza os mesmos foram utilizados nos experimentos abaixo apresentados.

4.3 Cultivo em meio líquido

Para a produção de lacases pelos fungos estudados foi utilizado o meio de cultura otimizado por Sette e colaboradores (2014) para a síntese de lacase do fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (patente depositada junto ao INPI sob o número do registro BR102014008502). O meio é composto de extrato de levedura 0,20% (w/v), peptona bacteriológica de caseína 0,27% (w/v), extrato de malte 0,14% (w/v) e glicose 0,27% (w/v). O meio foi preparado com água do mar artificial (ASW) adaptado de Kester et al. (1967): MgCl₂ 0,704% (w/v), CaCl₂ 0,098% (w/v), SrCl₂ 0,001 (w/v), NaCl 1,555% (w/v), Na₂SO₄ 0,261% (w/v), KCl 0,044% (w/v), NaHCO₃ 0,013% (w/v), KBr 0,006% (w/v) e H₃BO₃ 0,002% (w/v), para os fungos marinhos e com água destilada para os representantes terrestres. Todos os meios de cultivo foram suplementados com 2 mM de CuSO₄.

Os quatro fungos filamentosos foram cultivados por 7 dias em replicatas de 50 ml (n=10) em erlenmeyer de 125 mL em incubadora shaker com agitação de 140 rpm a 28 °C. Para Tanto, foram utilizados 7 cilindros de ágar + micélio (0,9 cm de diâmetro) provenientes do meio ágar malte como inóculo.

4.4 Atividade enzimática

As atividades enzimáticas foram avaliadas por espectrofotometria UV/VIS usando os substratos específicos para cada enzima avaliada.

4.4.1 Lacase (Lac)

Os testes de atividade enzimática para lacases foram realizados utilizando o substrato 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e Siringaldazina (SYG) a 37 °C de acordo com a metodologia descrita por Buswell, Cai e Chang (1995). A mistura continha 0,3 mL de 0,1 M de tampão acetato de sódio (pH 5.0), 0,1 mL de 0,5 mM de solução ABTS ou SYG e 0,6 mL da solução enzimática (caldo bruto). A oxidação dos substratos foi monitorada pelo aumento da absorbância a 420 nm (ABTS, $\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e 525 nm (SYG, $\epsilon = 65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), após 10 min de reação.

4.4.2 Atividade enzimática de Manganês Peroxidase (MnP)

Para identificar a atividade de MnP, utilizou-se o método de Wariishi, Valli e Gold (1992) com a adição de 50 µL de H₂O₂ (2 mM) em 0,8 mL de tampão malonato de sódio (60 mM; pH 4,5), 50 µL de MnSO₄ (10 mM), e 0,1 mL de caldo enzimático. A formação do complexo Mn⁺³-malonato foi acompanhada a 270 nm ($\epsilon = 11590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), após 5 min de reação.

4.4.3 Atividade enzimática de Lignina Peroxidase (LiP)

A atividade da lignina peroxidase foi avaliada usando o álcool veratrílico como substrato, a fim de oxidá-lo produzindo do aldeído veratrílico produzido ($\epsilon_{310\text{nm}} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Para tanto, 0,8 mL de tampão tartarato de sódio 125 mM pH 3,0; 0,5 mL de álcool veratrílico 10 mM; 0,5 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 0,5 mL do caldo enzimático foram misturados. A reação foi iniciada adicionando o peróxido de hidrogênio e o aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado lendo-se a absorbância a 310 nm, após 10 min de reação (ARORA; GILL, 2001).

4.4.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática para Lac, MnP e LiP foi calculada conforme a equação 1, sendo a unidade (U) definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de substrato por minuto, expressa em U/L.

$$U/L = \Delta A \times V \times 10^6 / \epsilon \times R \times t \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde:

ΔA = Diferença entre a absorbância final e a inicial

V = Volume da reação (0,001 L)

10^6 = Fator de conversão (de ϵ moles para µmoles)

ϵ = Coeficiente de extinção ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

R = Quantidade de caldo enzimático (L)

T = Tempo de reação (min)

Os valores obtidos em U/L foram convertidos para a grandeza de U/mL para expressar a atividade de lacases, devido ao fato da literatura consultada geralmente reportar a atividade nesta unidade de medida, o que favorece a comparação dos estudos, bem como na facilidade dos cálculos durante os passos da purificação.

4.5 Purificação e caracterização bioquímica

As etapas de purificação e caracterização foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica – Faculdade de Ciências Farmacêutica – USP, São Paulo, sob supervisão do professor Dr. Adalberto Pessoa Junior.

4.5.1 Tratamento do caldo bruto

Os caldos enzimáticos provenientes do cultivo dos quatro fungos em estudo foram centrifugados (Centrifuga Hettich – Rotina 380R) por 15 min a 4 °C à 10.000 RPM e filtrados em papel filtro 0,45 µm. Para obtenção de um volume final de 500 mL, tampão acetado de sódio 20 mM (pH 4,5) foi acrescentado ao sobrenadante, os quais foram ultrafiltrados em pelicon com uma membrana de corte de 10 kDa. Para os fungos marinhos, o processo de ultrafiltração ocorreu duas vezes, sendo adicionado tampão acetato, trazendo até a marca de 500 mL, a fim de remover os sais presentes no caldo bruto.

4.5.2 Visualização qualitativa do perfil proteico: SDS- PAGE e revelação de gel nativo

A eletroforese em condição desnaturante foi realizada em poliacrilamida (15%) na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio), a fim de exibir o padrão proteico, tanto do caldo bruto ultrafiltrado quanto da amostra após cromatografia de troca iônica, sendo conduzido à temperatura ambiente a 100 V. O gel foi montado em placas de vidro, com espessura de 1 mm. O tampão Tris/Glicina pH 8,3 com presença de SDS foi utilizado para a corrida do gel. A amostra foi aplicada à eletroforese com 15 µL do caldo enzimático, 4 µL do tampão de amostra e 0,5 µL de DTT, usando padrão de 10 proteínas recombinantes 10-250 kDa (*Precision plus protein standards unstained*, Bio-Rad). Os géis foram revelados com solução de coloração azul *Coomassie Brilliant*.

O gel nativo foi confeccionado com poliacrilamida (10%) na ausência de qualquer agente desnaturante e submetido a 100 V à 4 °C na presença do tampão Tris/glicina pH 8,3. O gel foi montado em placas de vidro com espessura de 1,5 mm. A amostra foi aplicada ao gel com 0,18 mg/mL de proteína, em 15 µL, com tampão de amostra (azul de bromofenol, glicerol, água). Após a corrida, o gel foi banhado por uma hora em tampão acetato (100 mM) pH 5, seguido de um banho com tampão acetato (50 mM) pH 5,0 contendo 0,5 mM do substrato (ABTS e SYG) até revelação das bandas por atividade de lacases.

4.5.3 Teor de proteína

Para a quantificação de proteínas totais o reagente de Bradford (Sigma) foi utilizado. Para construção da curva foram empregados 20 μ L de proteína albumina do soro bovino (BSA) em concentrações variando de 0 a 0,2 mg/mL (0; 0,01; 0,03; 0,05, 0,1; 0,15 e 0,2) diluídas em 20 mM de tampão acetado de sódio (pH 4,5), reagido com 80 μ L do reagente de Bradford. A leitura foi realizada após o período de 10 min de reação a 595 nm (Apêndice 1).

A fim de determinar o teor de proteínas durante as etapas de purificação dos extratos fúngicos estudados, 20 μ L das amostras e 80 μ L do reagente foram utilizados conforme tempo e comprimento de onda descritos no parágrafo anterior (Apêndices 2-5).

4.5.4 Técnicas cromatográficas

Do total ultrafiltrado concentrado (cerca de 50 mL), 1,5 mL foi submetido à cromatografia de troca iônica (DEAE - *Sepharose Fast Flow* GE Healthcare 1 mL). A amostra ultrafiltrada foi aplicada à coluna cromatográfica externamente ao aparelho, por meio de bomba peristáltica (*Pharmacia LKB P-1*) com fluxo de 1 mL/min. A eluição ocorreu pelo acoplamento da coluna carregada ao equipamento automatizado FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) ÄKTA START (GE Life Sciences) equipado com detector UV (280 nm) a um fluxo de 1 mL/min, utilizando 20 mM de tampão acetato de sódio (pH 4,5) em gradiente do mesmo tampão com 1000 mM de NaCl (0 a 100%), à temperatura ambiente. As frações correspondentes a um único pico foram reunidas e concentradas em 0,5 mL utilizando Amicon de 10 kDa, este processo foi repetido cerca de 5 vezes.

4.5.5 Determinação dos parâmetros cinéticos aparente

A constante de Michaelis (K_M) e a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) da reação catalisada pelas lacases foram determinadas com auxílio de gráfico duplo recíproco (Lineweaver–Burk) da atividade enzimática em função da concentração do substrato ABTS 0,001 – 2 mM e SYG 0,001 – 0,1 mM em tampão acetato de sódio nas condições de pH ótimo à 37 °C.

4.5.6 Temperatura ótima e estabilidade térmica

A temperatura ótima foi determinada incubando a enzima em tampão acetato 100 mM (pH 5) e o substrato (ABTS) a parte, por 10 min em temperaturas variando de 25 a 75 °C, com intervalos de 5 °C.

Para analisar a estabilidade térmica, a enzima foi incubada por 24hs nos valores determinados de temperatura ótima em reação com o ABTS. A atividade residual foi mensurada nos tempos 0 (zero), 1 (uma) e 24 (vinte e quatro) horas, utilizando ABTS como substrato.

4.5.7 pH ótimo

O pH ótimo foi determinado utilizando tampão acetato de sódio 100 mM (pH 3,5 - 5,5), tampão fosfato 100 mM (pH 6,0-8,0) nas condições de temperatura ótima, incubando-se a enzima em tampão e o substrato (ABTS) a parte, por 10 min.

4.5.8 Estabilidade em NaCl e efeito de íons e outros agentes na atividade de lacases

De acordo com a temperatura e pH ótimos de cada conjunto enzimático, tendo com substrato o ABTS, foram realizados ensaios em diferentes concentrações de NaCl (variando de 10 – 1000 mM) em tampão acetato de sódio 100 mM. Também nestas mesmas condições, o efeito dos íons Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , e dos agentes L-cisteína e EDTA, a 10 mM, foram testados sobre a atividade enzimática das lacases.

4.6 Tratamento de corantes têxteis

Para o teste de descoloração foi utilizado o corante têxtil Marinho Reativo (MR) cedido pela empresa Texpal Química (Valinhos, SP). Este corante é recalcitrante e pode causar problemas de contaminação ambiental.

4.6.1 Descoloração de corantes têxteis

Os testes de descoloração foram realizados com o conjunto enzimático parcialmente purificado dos fungos do gênero *Peniophora* e *Marasmiellus* em estudo, e com a enzima comercial de *Trametes versicolor* (sigma) pura. Um alíquota de 0,2 U/mL do conjunto enzimático de lacases foi adicionado ao corante têxtil marinho reativo (pH 4,8) em concentração final de 40 mg/L. A solução resultante da mistura (1,5 mL de solução final) foi incubada na temperatura 37 °C a 100 rpm por 7 dias. O controle negativo foi preparado por adição da enzima inativada por aquecimento à solução com o corante. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A porcentagem de descoloração de cada amostra foi mensurada por absorbância no início e final do tempo de incubação, usando o espectrofotômetro UV-vis a 595 nm. A porcentagem da descoloração foi calculada com base na equação 2.

$$\text{Descoloração (\%)} = \frac{\text{Abs inicial} - \text{Abs final}}{\text{Abs inicial}} \times 100$$

(Equação 2)

4.6.2 Teste de toxicidade: Microtox

A avaliação da destoxificação do corante marinho reativo após sete dias de incubação foi realizada por meio da análise de toxicidade aguda em Microtox 500. A técnica consiste na exposição da bactéria *Aliivibrio fischeri* a uma amostra, a qual acusa por meio do equipamento Microtox 500 a toxicidade, com base na luminescência das bactérias vivas. Para tanto, uma suspensão inicial da bactéria liofilizada em tampão de reativação (10^8 células/mL) foi preparada. Posteriormente, foi feita uma primeira diluição da bactéria, sendo 150 µL transferidos para 1500 µL de NaCl 2%. A partir dessa diluição, 50 µL foram transferidos para cubetas e verificada a luminescência da bactéria (T0). Um volume de 1250 µL da amostra foi misturada com 125 µL de NaCl 22%, e a mistura foi utilizada para a confecção de diluições seriadas (1:1). Para o controle foi utilizado NaCl 2%. As diluições (450 µL) foram transferidas para as cubetas contendo 50 µL da suspensão celular do bioindicador. A leitura em luminômetro foi realizada em tempos de 5 e 15 min. Os valores referente às leituras da luminescência da bactéria *A. fischeri* foram avaliados em programa específico do equipamento Microtox 500, permitindo inferir o EC₅₀ (concentração que inibe em 50 % a luminescência da bactéria).

A classificação de toxicidade foi realizada de acordo com Bulich (1992), com base nos dados da Tabela 1.

Tabela 1. Classificação das faixas de toxicidade aguda segundo Bulich (1992).

| Grau de Toxicidade | |
|----------------------|----------------------|
| EC ₅₀ (%) | Classificação |
| <25 | Muito tóxica |
| 25 – 50 | Tóxica |
| 51 – 75 | Moderadamente tóxica |
| >75 | Levemente tóxica |

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade de lacases

Atividades de lacases foram detectadas nos caldos enzimáticos dos fungos dos gêneros *Peniophora* e *Marasmiellus* cultivados nas mesmas condições, porém com ausência de salinidade (ASW) para as espécies terrestres. As diluições para cada caldo bruto foram estabelecidas de acordo com a atividade enzimática, com limite máximo de leitura de 0,500 de absorbância. Estas diluições foram mantidas em todas as etapas das análises.

O meio de cultivo otimizado por Sette e colaboradores (2014) para o fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 mostrou-se eficiente para os fungos *Peniophora cinerea* CCIBt 2541 e *Marasmiellus colocasiae* CCIBt 3388, sendo as quantidades obtidas equivalentes para os fungos do gênero *Peniophora* (Tabela 2, Apêndices 6-8). O extrato de malte, um dos componentes do meio de cultura, tem se mostrado eficiente na produção exclusiva de lacases (DEDEYAN et al, 2000; TAGGER et al, 1998, ZOUARI-MECHICHI et al, 2006). Para o fungo marinho *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 a quantidade de lacase produzida foi detectada (Apêndice 9), porém, a forte coloração marrom que surgiu em torno do quarto dia de cultivo, impediu a quantificação acurada da enzima, sendo necessário diluições a níveis detectáveis. Esta coloração também está presente no *M. colocasiae* CCIBt 2541, porém em menor quantidade, causando menor impacto na detecção e quantificação enzimática. Bonugli-Santos e colaboradores (2010a) reportaram uma atividade maior de lacase (0,97 U/mL) para o fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 utilizando o meio malte 2% em água do mar artificial após 21 dias de cultivo, sem CuSO₄. O tempo de cultivo aparentemente afeta a produção da enzima, entretanto os valores obtidos foram suficientes para que as análises ocorressem.

Não foram detectadas atividade para as enzimas ligninolíticas manganês peroxidase e lignina peroxidase nos caldos brutos dos quatro fungos estudados.

5.2 Purificação de lacases

Os caldos brutos provenientes dos cultivos dos fungos em estudo foram submetidos à ultrafiltração, para concentrar, dessalinizar, remover pigmentos e compostos com tamanhos menores que 10 kDa. Como esperado, após este procedimento houve aumento na concentração de proteínas totais em todos os caldos brutos ultrafiltrados (Tabela 2).

Este procedimento mostrou-se importante no tratamento dos caldos brutos dos fungos do gênero *Marasmiellus*, pois removeu a pigmentação que interferia na determinação da atividade enzimática de lacases. Por conta disso, os valores da atividade enzimática no caldo

bruto, para os fungos de ambos gêneros em estudo, não foram apresentados na Tabela 2, considerando, assim, este como o passo inicial.

A ultrafiltração e precipitação por sulfato de amônia têm sido técnicas recorrentes no processo iniciais de purificação de lacases, ambas permitem alto grau de recuperação, geralmente recuperando entre 70-100% da atividade inicial, entretanto valores até 50% são considerados dentro do limite para utilização dessas técnicas (DAÂSSI et al., 2013; PARK; PARK, 2014; DEDEYAN et al., 2000; MORE et al., 2011; SI; PENG; CUI, 2013; CHEN et al., 2013).

Tabela 2. Etapas do processo de purificação da lacase referente aos fungos marinhos e terrestres dos gêneros *Peniophora* e *Marasmiellus*. Atividade enzimática com base na reação com ABTS.

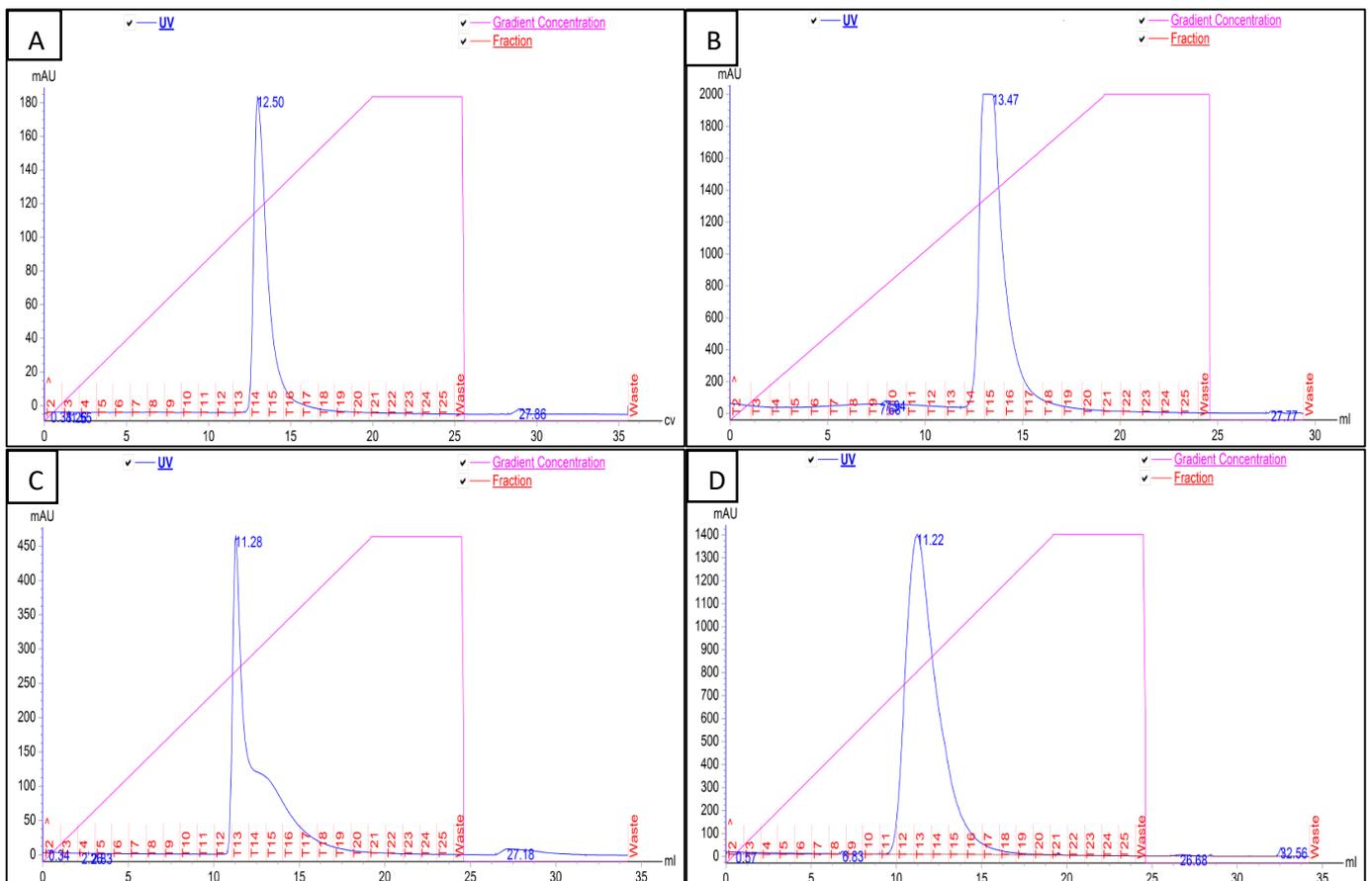
| Táxon | Amostra | Volume (mL) | Atividade (U/mL) | Atividade total (U) | Proteínas totais (mg/mL) | Recuperação (%) | Atividade específica (U/mg) | Fator de purificação |
|---|---------------|-------------|------------------|---------------------|--------------------------|-----------------|-----------------------------|----------------------|
| <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063 | Ultrafiltrado | 52,00 | 10,60 | 551,20 | 0,18 | 100,00 | 58,80 | 3,80 |
| | DEAE | 17,30 | 4,70 | 81,31 | 0,13 | 14,75 | 36,15 | 2,30 |
| <i>Peniophora cinerea</i> CCIBt 2541 | Ultrafiltrado | 55,00 | 6,40 | 352,00 | 0,22 | 100,00 | 29,00 | 2,60 |
| | DEAE | 18,30 | 0,64 | 11,52 | 0,07 | 3,30 | 3,20 | 0,30 |
| <i>Marasmiellus colocasiae</i> CCIBt 3388 | Ultrafiltrado | 46,00 | 8,10 | 373,00 | 0,47 | 100,00 | 17,00 | 2,00 |
| | DEAE | 15,34 | 15,00 | 230,00 | 0,42 | 62,00 | 36,00 | 4,00 |
| <i>Marasmiellus</i> sp CBMAI 1062 | Ultrafiltrado | 38,00 | 0,03 | 1,30 | 0,24 | 100,00 | 0,13 | 14,00 |
| | DEAE | 12,70 | 0,08 | 1,01 | 0,12 | 78,40 | 0,70 | 70,00 |

O permeado obtido com a ultrafiltração do caldo bruto de cada fungo, em volume de 1,5 mL, a cada eluição, foi submetido à cromatografia de troca iônica (coluna aniônica DEAE-sepharose FF, 1 mL), com a finalidade de eliminar proteínas que não apresentassem atividades para lacase. Após realizadas as etapas de adsorção e eluição, apenas um pico foi identificado nos cromatogramas A, B e D e dois picos no cromatograma C, conforme apresentado na Figura 12. As frações referentes a esses picos foram submetidas ao teste de atividade enzimática, e todas foram positivas para atividade de lacase. Posteriormente, as mesmas foram reunidas em uma única amostra, dessalinizadas e concentradas para 0,5 mL.

Após o processo de purificação por troca aniônica, a atividade específica para os fungos do gênero *Marasmiellus* apresentaram recuperação de 62,00% e 78,40% para as lacases dos fungos de origem terrestre e marinha, respectivamente (Tabela 2). No caso dos fungos do

gênero *Peniophora* verificou-se baixo rendimento na etapa de troca aniônica (Tabela 2). Uma das possíveis explicações seria a proximidade do pH do tampão de adsorção com o ponto isoelétrico das lacases produzidas por estes fungos. Pelo fato de não termos conhecimento do valor exato do ponto isoelétrico das amostras que estavam sendo injetadas na coluna, o tampão e o valor do pH (acetato de sódio, pH 4,5) foram definidos com base em dados da literatura encontrados para lacases fúngicas, ou seja, com valores de ponto isoelétrico entre 3,5 e 4,0 (GIARDINA et. al, 2010; BALDRIAN, 2006; EGGERT et. al, 1998; TIEN; KIRK, 1884). Outros trabalhos científicos que abordam a purificação de lacases, os quais utilizaram este tampão na faixa de pH próximo ao relatado também foram tomados como base (GARCIA, 2006; MOREIRA-NETO, 2012; EGGERT et. al, 1995).

Figura 12. Cromatograma da troca aniônica (DEAE-Sepharose FF) de 1,5 mL do caldo bruto ultrafiltrado concentrado *Peniophora cinerea* CCIBt 2541 (A); *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (B); *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 (C); *Marasmiellus colocasiae* CCIBt 3388 (D).



Os resultados da cromatografia de troca iônica revelaram baixa recuperação da atividade enzimática, principalmente para o *P. cinerea* CCIBt 2541 (3,30%). O perfil proteico dessas amostras podem ser qualitativamente observados nas Figuras 13 A e 13 B. Onde, para tornar-

se nítida a visualização do perfil proteico deste fungo, seis repetições de cromatografia, com atividade para lacases foram coletadas e concentradas em 0,5 mL, totalizando 0,42 mg/mL aplicadas ao gel SDS-Page.

As frações coletadas apresentaram fator de purificação final satisfatório apenas para os fungos do gênero *Marasmiellus*, sendo o do *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 na grandeza de 70,00 (Tabela 2). Entre os fungos do gênero *Peniophora*, o *P. cinera* CCIBt 2541 apresentou o menor fator de purificação, da ordem de 0,30. Porém, todas as amostras parcialmente purificadas na cromatografia de troca iônica foram satisfatórias para as análises seguintes.

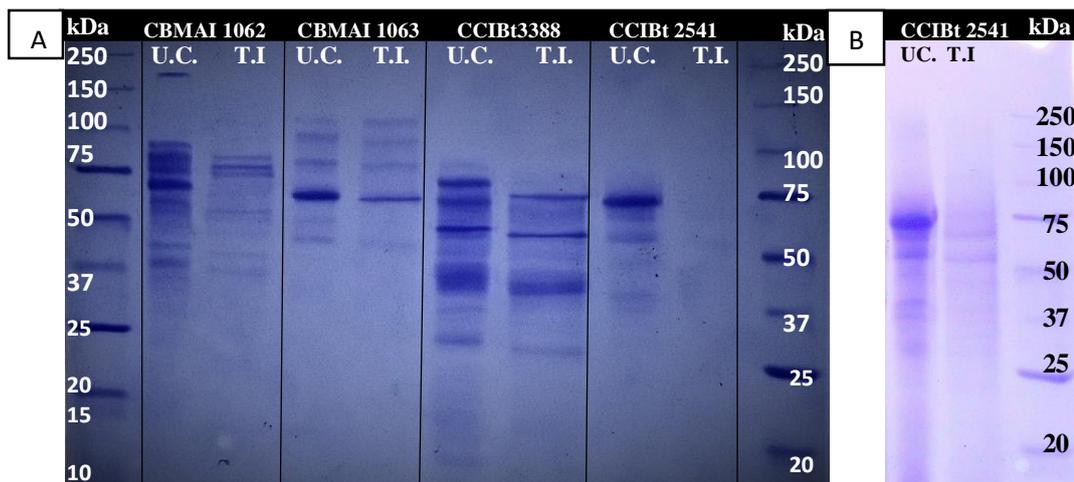
O processo de purificação enzimática requer em cada passo o monitoramento de proteínas e atividade da enzima de interesse, gerando custo e trabalho (GARCIA, 2006). Lacases geralmente são enzimas que requerem várias etapas na purificação, para tanto, técnicas iniciais de filtrações e concentrações (Ultrafiltração e precipitação por sulfato de amônia) são fundamentais. Devido ao fato das lacases serem enzimas de carga positiva, frequentemente se inicia a etapa cromatográfica com o método da troca aniônica, sendo as colunas mais utilizadas DEAE (Celulose ou sepharose), Hitrap QFF, Q-sepharose (ZHENG et al., 2017; MORE et al., 2011; DAÂSSI et al., 2013; MOREIRA; MILAGRES; MUSSATTO, 2014; SI; PENG; CUI, 2013; OBARA et al., 2005; BAGEWADI; MULLA; NINNEKAR, 2017). Porém, a maioria dos processos requerem mais de um passo cromatográfico, há trabalhos que utilizam até três a fim de purificar a enzima (DEDEYAN et al., 2000; ZOUARI-MECHICHI et al., 2006; PARK; PARK, 2014). O presente trabalho utilizou apenas um passo cromatográfico, sendo assim, o mesmo se apresenta como uma alternativa à redução tempo e custos em aplicações industriais.

O processo de recuperação, bem como demais valores referentes ao monitoramento da purificação (atividade específica, fator de purificação, proteínas totais, atividade total) não são uniformes. Isso pode ser percebido pela análise dos quatro fungos estudados (Tabela 2), bem como em outros estudos (ZHENG et al., 2017; MORE et al., 2011; MOREIRA; MILAGRES; MUSSATO, 2014; SI; PENG; CUI, 2013; OBARA et al., 2005; BAGEWADI; MULLA; NINNEKAR, 2017; DEDEYAN et al., 2000; ZOUARI-MECHICHI et al., 2006). Tal variação é diretamente influenciada por fatores como: características das demais enzimas presente no extrato bruto, proximidade do ponto isoeletrico entre as proteínas, o qual deve ser levando em conta também na escolha da coluna, as condições do ambiente de corrida, pH, composição do tampão, entre outros. Park e Park (2014) recuperou cerca de 53% da atividade de lacases de *Fomitopsis pinicola* após ultrafiltração, e após a troca aniônica (DEAE-Sepharose) a recuperação caiu para cerca de 43%, nestes processos o fator de purificação aumentou de 1,9 para 7,1, sendo que no passo final havia apenas 9% de rendimento com fator de purificação na

ordem de 60. No entanto, Daâssi e col. (2014) recuperaram 97,5% da atividade de lacase de *Trametes* sp. após ultrafiltração e 78,5% após a troca aniônica (Hitrap Q FF), aumentando o fator de purificação de 1 para 5.

É importante destacar que apesar dos cromatogramas apresentados na Figura 12 (A, B e D) mostrarem apenas um pico após eluição, a eletroforese das amostras revelou a presença de várias proteínas (Figura 13 A). A visualização de proteínas que não foram detectadas nos picos pode ter ocorrido devido ao fato de que foram juntadas amostras dos conjuntos enzimáticos contendo lacases de três eluições diferentes (1,5 mL cada), as quais foram concentradas em 0,5 mL para os fungos do gênero *Marasmiellus* e para o *Peniophora* sp. CBMAI 1063. Para o fungo *Peniophora cinerea* CCIBt 2541 seis eluições de 1,5 mL das amostras contendo as lacases foram concentradas para 0,5 mL (Figura 13 B). Além disso, o pouco volume aplicado à coluna pode ter resultado em um pico estreito e bem resolvido. Lacases submetidas a troca iônica utilizando coluna DEAE (Sepharose ou celulose) podem apresentar apenas um pico com atividade, requerendo um outro passo para a separação das isoformas (PARK; PARK, 2014; OBARA et al., 2005; MOREIRA; MILAGRES; MUSSATTO, 2014; BAGEWADI; MULLA; NINNEKAR, 2017; AFREEN et al., 2017; PATEL et al., 2014).

Figura 13. Gel SDS-PAGE do perfil proteico dos fungos: (A) *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, *Peniophora* sp. CBMAI 1063, *Marasmiellus colocasiae* CCIBt3388 e *Peniophora cinerea* CCIBt 2541, das amostras: ultrafiltrada concentrada (U.C.) e troca iônica 3X concentrada (T.I.). (B) Gel SDS-PAGE: amostras de *Peniophora cinerea* CCIBt 2541, 1 – ultrafiltrado, 2-troca iônica 6X concentrada.

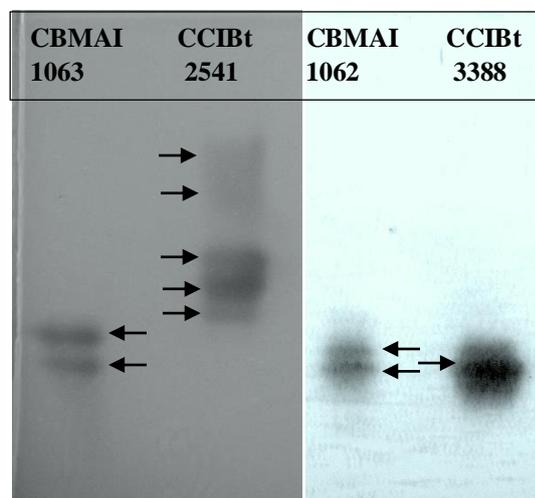


Sabe-se que lacases se apresentam em diversas isoformas e tamanhos, e o fato de um microrganismo produzir mais de uma isoforma foi reportado por diversos autores (BLAICH; ESSER, 1975; BALDRIAN, 2006; GIARDINA et al., 2010). O maior objetivo ao submeter um caldo enzimático à purificação é a obtenção apenas das proteínas de interesse. Durante o

processo de purificação o rendimento tende a diminuir, como apresentado na Tabela 2. Considerando que o caldo bruto é composto por várias isoformas de lacases e que, em função disto, apresenta maior atividade enzimática total (soma de todas as isoformas de lacases), pode-se afirmar que este conjunto de diferentes lacases é mais atrativo para o uso industrial quando comparado com apenas uma das enzimas puras (ZOUARI-MECHICHI et al, 2006; GARCIA, 2006; BRAZKOVA et al, 2016; RAMÍREZ-CAVAZOS, 2014; GOLVEIA, 2016).

Neste contexto, os caldos brutos ultrafiltrados dos fungos compostos por mais de uma isoforma de lacase foram submetidos a apenas uma etapa cromatográfica, a fim de se obter o maior número possível de isoformas secretadas. Com o objetivo de avaliar esta proposição, o conjunto enzimático parcialmente purificado pela troca iônica foi testado em gel de poliacrilamida, mediante a técnica de zimograma para lacases, utilizando dois substratos (ABTS e SYG), os resultados estão apresentados da Figura 14 e revelaram atividade de duas isoformas de lacases para o conjunto enzimático do *Peniophora* sp. CBMAI 1063, utilizando a SYG e ABTS. O fungo terrestre *P. cinerea* CCIBt 2541 aparentemente apresentou cinco bandas de atividades utilizando SYG, pois em ABTS as bandas reveladas não apresentavam condições de distinção. De modo semelhante, a espécie marinha *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, em gel de atividade, mostrou reação de duas isoformas na presença do ABTS e apenas uma na presença de SYG, por outro lado, a espécie terrestre *M. colocasiae* CCIBt 3388 apresentou apenas uma isoforma, em ambos os substratos, conforme atividade identificada no gel nativo de poliacrilamida (Figura 14).

Figura 14 – Zimograma de lacases por atividades em SYG para as amostras do conjunto enzimático do *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (CBMAI 1063) e *Peniophora cinerea* CCIBt 2541 (CCIBt 2541); atividade em ABTS para as amostras do conjunto enzimático do *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 (CBMAI 1062) e *Marasmiellus colocasiae* CCIBt 3388 (CCIBt 3388).



As lacases produzidas pelo basidiomiceto *Peniophora* sp. CBMAI 1063 nas mesmas condições de cultivo do presente trabalho (otimizadas) foram investigadas por Otero et al., (2017) e os resultados revelaram a presença de oito genes putativos de lacases no transcriptoma do fungo. Moreira, Milagres e Mussato (2014) purificaram oito isoformas de lacases do isolado de *P. cinerea* (CCIBt 2541), todas com características distintas uma das outras, incluindo o tamanho.

Portanto, a purificação enzimática foi de modo parcial uma vez que haviam outras proteínas, sem atividade para lacases, que não se separaram das isoformas de interesse. Considerando que as lacases não estão puras, a caracterização das enzimas ocorreu de modo aparente (app.), utilizando amostras eluídas da cromatografia de troca iônica.

5.3 Caracterização aparente das lacases parcialmente purificadas

A caracterização do caldo bruto ou *pool* enzimático parcialmente purificado para lacases tem sido reportada (KUMAR et al, 2016; KUMAR et al, 2012; STOILOVA; KRASTANOV; STANCHEV, 2010; TAGGER et al, 1998), entretanto, a grande maioria caracteriza uma isoforma, e quando há presença de mais de uma, comparam entre elas. Avaliações de lacases geralmente mostram diferenças significativas quanto ao pH e temperatura ótima para um mesmo substrato, ponto isoelétrico, estabilidade térmica, cinética enzimática, variam no grau de glicolização, peso molecular, disposição dos íons de cobre no sítio ativo, canal que leva ao agrupamento de cobre T2/T3, potencial de redução no sítio T1, aminoácidos, cristalografia e sequência gênica (OTERO et al, 2017; MOREIRA-NETO, 2012; SHRADDHA et al., 2011; MOROZOVA et al., 2007; SHLEEV et al, 2005; XU et al, 1996). Considerando todos estes fatores, podemos inferir que as lacases são distintas, não apresentam isoenzimas iguais em microrganismos diferentes, isto torna impreciso comparações de lacases entre espécies, permitindo apenas analisar a eficiência em detrimento das características que apresentam.

Por conta disso, este trabalho se deteve em analisar as respostas dos conjuntos enzimáticos das lacases quando submetidas à diferentes temperaturas e valores de pH, análises da cinética enzimática, influência NaCl, íons e outros compostos. Para isso, os conjuntos enzimáticos, obtidos após cultivo sob as mesmas condições, foram parcialmente purificados e utilizados para caracterização a fim de investigar as vantagens, desvantagens e/ou similaridades, dentro dos parâmetros anteriormente citados.

5.3.1 Cinética enzimática aparente

A cinética enzimática permite entender o mecanismo das enzimas, oferecendo condições para determinar a velocidade da reação e como ela se modifica em respostas às mudanças impostas (NELSON; COX, 2014, p. 200-213). A caracterização aparente do conjunto enzimático dos quatro fungos estudados revelou um K_M semelhante a outras lacases, para o mesmo substrato (Tabelas 3 e 4). Mesmo estando em conjunto com outras enzimas, de acordo com estas análises comparativas, percebe-se que as demais enzimas presentes podem não interferir na cinética das lacases, isto pode ser evidenciado quando analisamos a cinética das lacases do *P. cinerea* CCIBt 2541 (K_M 15,4 μ M) com a isoforma pura caracterizada, por Moreira, Milagres e Mussatto (2014), onde para o mesmo substrato, a isoforma mais abundante apresentou K_M de 15,6 μ M, e demais isoformas também com valores próximo a este.

Tabela 3. Cinética enzimática aparente em reação com diferentes substratos

| Fungo | Substrato | | | |
|------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| | ABTS | | Siringaldazina | |
| | K_M app. (μ M) | V_{max} app. (μ mol/min) | K_M app. (μ M) | V_{max} app. (μ mol/min) |
| <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063 | 47,1 | 0,00017 | 5,6 | 0,000061 |
| <i>P. cinerea</i> CCIBt 2541 | 15,4 | 0,00011 | 1,5 | 0,000038 |
| <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062 | 70,9 | 0,00025 | 1,5 | 0,000017 |
| <i>M. colocasiae</i> CCIBt 3388 | 42,7 | 0,00017 | 0,9 | 0,000016 |
| <i>Trametes versicolor</i> * | 64,5* | 0,00018* | 13,9* | 0,000016* |

* Os valores cinéticos para *T. versicolor* não são aparentes, representam valores para a enzima pura.

Esta constante diz respeito da concentração do substrato na qual a reação acontece na metade da velocidade máxima e pode significar uma maior afinidade da enzima pelo substrato, o que viabiliza o cálculo da concentração do substrato necessário, em determinado tempo, para saturar todos os sítios ativos da enzima (WILSON; WALKER, 2010, p. 585). Os basidiomicetos terrestres (*P. cinerea* CCIBt 2541 e *M. colocasiae* CCIBt 3388) apresentaram menor K_M em comparação com as espécies de origem marinha (*Peniophora* sp. CBMAI 1063 e *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062), conforme demonstrado na Tabela 3.

Em cinética enzimática a velocidade máxima (V_{max}) diz respeito à velocidade inicial quando todos os sítios ativos da enzima estão ocupados, ou seja, quase todas as enzimas estão no complexo enzima-substrato (ES) (WILSON; WALKER, 2010, p. 584-585). Os resultados de V_{max} demonstraram que as lacases da espécie terrestre do gênero *Peniophora* mais rapidamente se satura na presença do ABTS e SYG. O mesmo ocorre para as lacases dos fungos

do gênero *Marasmiellus*, a espécie terrestre apresenta menor valor de V_{max} , embora o valor da V_{max} em reação com o ABTS sejam praticamente iguais para ambos fungos deste gênero. Poucos trabalhos relatam a V_{max} para as enzimas. Dentre os trabalhos listados na Tabela 4, apenas o reportado por Stoilova, Krastanov e Stranchev (2010) e Garcia (2006) apresentam esse dado, sendo que o primeiro assinala um valor, porém não há como se identificar a unidade utilizada para mensurar, e o segundo aponta 238,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ para a Lac 2, uma das isoformas purificadas.

Tabela 4. Constante de Michaelis-Menten de lacases em diferentes basidiomicetos utilizando ABTS como substrato.

| Fonte de Lacases | K_M (μM) | | Referência |
|------------------------------|-------------------------|------|---|
| | ABTS | SYG | |
| <i>Trametes versicolor</i> | 46,0 | 14,8 | STOILOVA; KRASTANOV; STANCHEV., 2010 |
| | 104,7 | 17,4 | |
| <i>Trametes orientales</i> | 333,0 | - | ZHENG et al, 2017 |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> | 13,0 | 5,1 | KUMAR et al, 2012 |
| <i>Pleurotos ostreatus</i> | 46.510,0 | - | PATEL et al, 2014 |
| <i>Pycnoporus sanguineus</i> | 6,0 | - | RAMÍREZ-CAVAZOS et al, 2014 |
| | 12,0 | - | |
| <i>Pycnoporus sanguineus</i> | 58,0 | 8,3 | GARCIA, 2006 |
| <i>Peniophora cinerea</i> | 12,7 | - | MOREIRA; MILAGRES; MUSSATO, 2014 |
| | 20,0 | - | |
| | 15,6 | - | |

Os valores cinéticos da lacase comercial de *T. versicolor* são similares aos dos conjuntos enzimáticos estudados, sendo que os valores cinéticos de K_M em SYG são maiores que os dos demais fungos e o K_M superior às lacases dos fungos do gênero *Peniophora* e *M. colocasiae* CCIBt 3388 em reação com o ABTS, conforme Tabela 3. Com exceção de Stoilova, Krastanov e Stranchev (2010) tabela 4, o V_{max} diz respeito apenas a uma isoforma purificada, corroborando com a hipótese de que a presença de outras enzimas no conjunto enzimático das lacases podem não interferir na cinética da enzima sobre determinado substrato.

5.3.2 Temperatura e pH ótimos

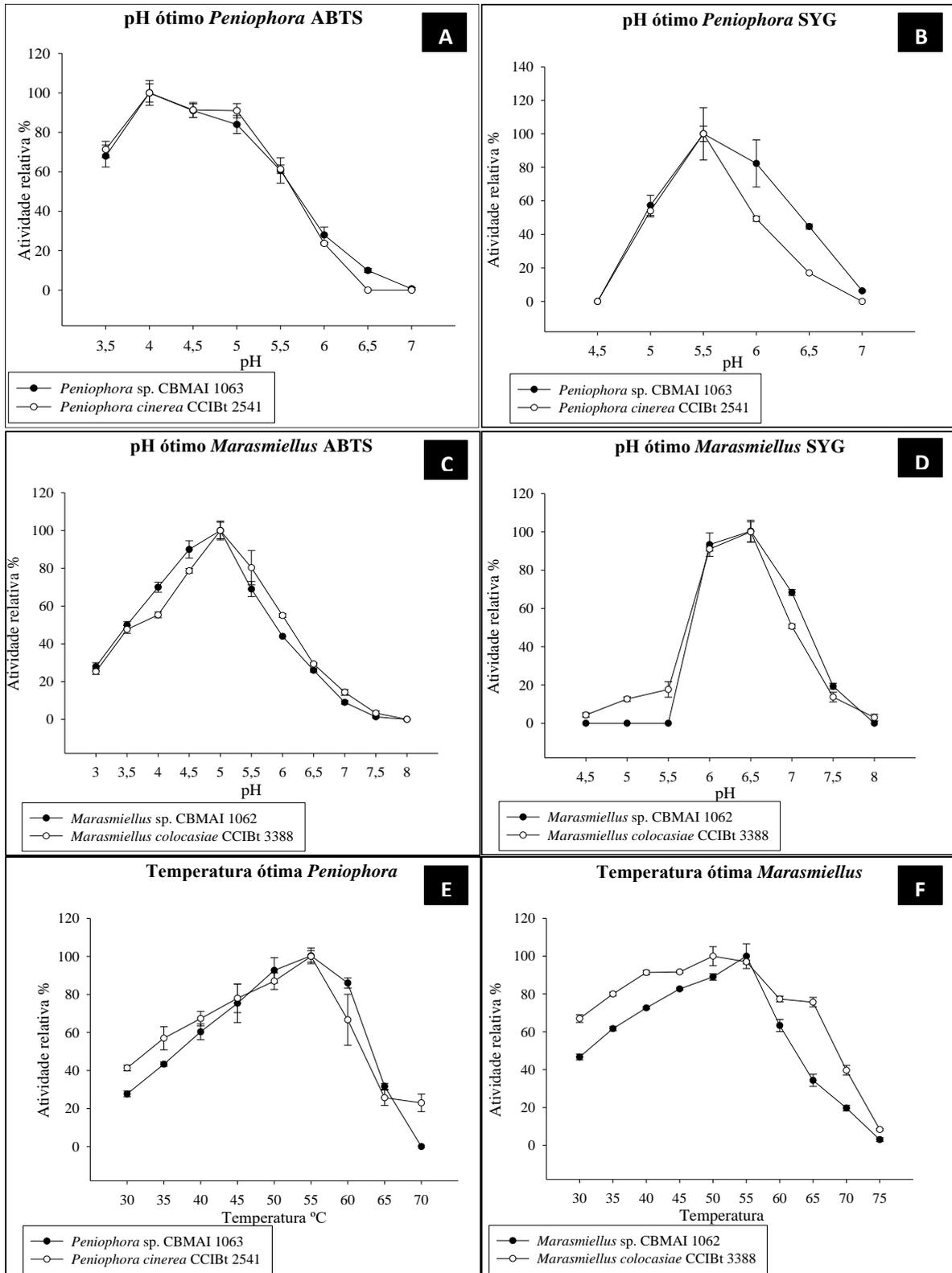
A temperatura e pH ótimos de atividades para as lacases das espécies marinha e terrestre do gênero *Peniophora* foram iguais: 55°C e pH 4 para ABTS e 5,5 para SYG. Isoenzimas de lacases destas espécie já foram caracterizadas, e assim como demonstrado por Mainardi e colaboradores (2017) para a principal lacase do *Peniophora* sp. CBMAI 1063, acima de 60 °C

a proteínas começa a perder a estabilidade, apresentando baixa atividade e perdendo-a totalmente a 70 °C (Figura 15 A, B e E). Estes pesquisadores determinaram o pH 5 como ótimo para esta isoenzima, tendo SYG como substrato, entretanto, o testes por eles realizados utilizaram a variação de 1,0 no valor da grandeza do pH, enquanto que o presente trabalho realizou a cada 0,5.

É de comum entendimento que os valores de pH ótimos variam conforme o substrato, disponibilidade de oxigênio e tampão (DESAI; NITYANAND, 2011; TAGGER et al, 1998). Moreira-Neto (2012) caracterizou oito isoformas de lacases do fungo *P. cinerea* usando ABTS como substrato. Apenas duas isoformas apresentaram pH igual a 2,6 e a principal enzima apresentou pH 4. Para os fungos do gênero *Marasmiellus* de origem marinha e terrestre, o pH ótimo foi 5 (ABTS) e 6,5 (SYG), respectivamente. Contudo, a temperatura ótima para a espécie terrestre foi de 50 °C, enquanto que para a espécie marinha foi de 55 °C (Figura 15 C, D e F). Os valores de pH e temperatura estão dentro dos valores reportados para lacases fúngicas, atividades enzimáticas em pH ácidos e temperatura entre 50-70 °C (ZHENG et al., 2017).

Embora haja determinação da temperatura e pH ótimo para lacases e enzimas de modo geral, nem sempre os valores encontrados são aplicados no ambiente alvo. Isto pode ocorrer por causa de fatores, tais como: o pH ser variável conforme o substrato, temperatura na qual permita estabilidade para a enzima, dentre outras variáveis como condições não manipuláveis do ambiente alvo. A maioria dos trabalhos procura aplicar lacases em condições de pH variando entre 3,5-5,5 e temperatura aproximadamente de 30-40 °C (YANG et al., 2014; KUMAR et al., 2012; RAMIREZ-CAVAZOS et al., 2014; MANAVALAN et al., 2013; ZHENG et al., 2017). Há estudos que aplicam a enzima nas condições ótimas encontradas, contudo, isso vai depender da estabilidade da mesma (AFREEN et al., 2017; KUMARI; KISHOR; GUPTASARMA, 2018).

Figura 15. Caracterização do pH ótimo aparente das lacases dos fungos marinhos e terrestres do gênero: (A) *Peniophora* para ABTS, (B) *Peniophora* para SYG, (C) *Marasmiellus* para ABTS, (D) *Marasmiellus* para SYG; e temperatura ótima aparente das lacases dos fungos marinhos e terrestre do gênero: (E) *Peniophora*, (F) *Marasmiellus*.

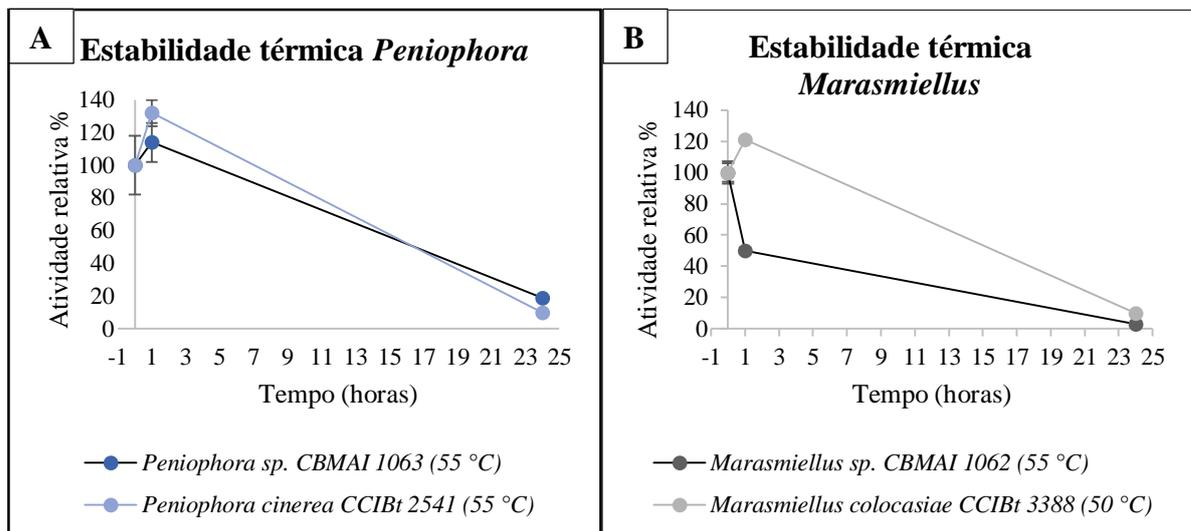


5.3.3 Estabilidade Térmica

As lacases dos basidiomicetos do gênero *Marasmiellus* apresentaram tolerância maior à temperatura, em relação às lacases dos fungos do gênero *Peniophora*. Aos 75 °C ambos conjuntos enzimáticos apresentaram atividade, sendo a do fungo terrestre 8,5% em relação à própria temperatura ótima (Figura 15 F).

A estabilidade térmica dos conjuntos enzimático em análises nas temperaturas ótimas mostraram aumento da atividade enzimática após uma hora para os fungos *Peniophora*, sendo que *P. cinerea* CCIBt 2541 alcançou 132%, enquanto que o *Peniophora* sp. CBMAI 1063 chegou a 114%. Entretanto, após o período de 24 hs a espécie marinha apresentou aproximadamente 20% da atividade residual, enquanto que para o exemplar terrestre este valor foi de 10% (Figura 16 A). O mesmo ocorreu para os fungos do gênero *Marasmiellus*. O exemplar terrestre *M. colocasiae* CCIBt 3388 mostrou aumento da atividade, chegando a 121% após uma hora, e atividade residual de 10% após 24 hs. Para as lacases do *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 de origem marinha, o período de um hora é o período da meia vida da atividade de suas lacases, 50% da atividade foi observada neste tempo e após 24 horas, apresentou apenas 3% da atividade residual (Figura 16 B).

Figura 16 – Estabilidade dos conjuntos enzimáticos de lacases para os fungos (A) *Peniophora* e (B) *Marasmiellus* em temperatura ótima, utilizando ABTS como substrato.



A estabilidade térmica das lacases está atrelada a vários fatores, tais como: ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas na estrutura química da molécula, quanto maiores esses fatores, mais estável será a enzima; resíduos carregados positivamente também confere maior resistência, bem como o empacotamento da enzima, quanto maior a densidade, maior a

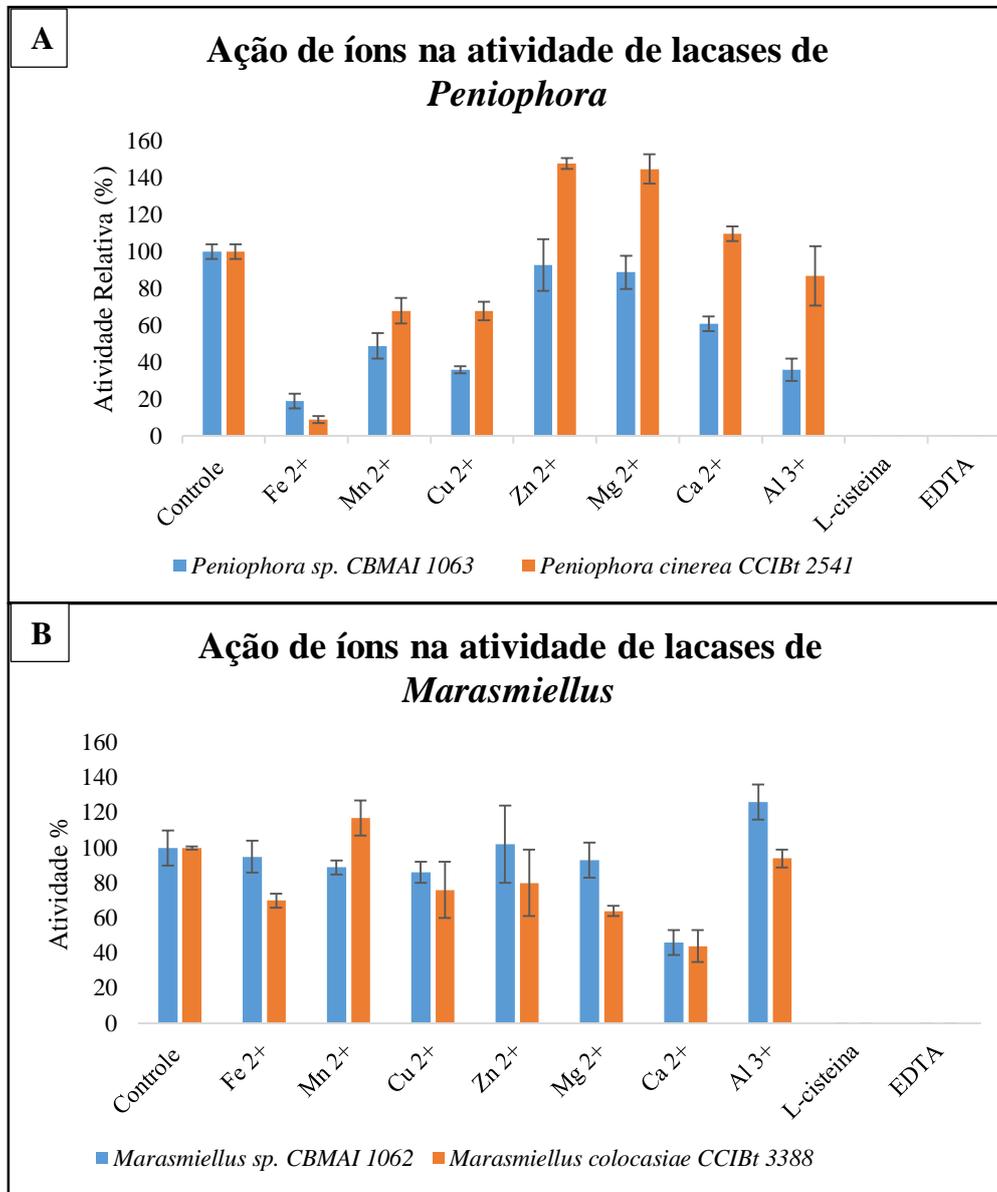
resistência, a presença da prolina também parece dar resistência térmica e um dos fatores mais influenciável é a porção glicosídica das lacases, quanto maior a porcentagem de carboidratos, mais estável é a enzima (CLAUS, 2004; ENGUITA et al., 2003).

5.3.4 Efeito de íons, de um aminoácido e um agente quelante sobre a atividades de lacases

Em todos os conjuntos enzimáticos, não foi observada a atividade em presença de EDTA e L-cisteína (Figura 17). Este efeito era esperado, uma vez que o EDTA é um agente quelante, age quelando íons metálicos. Nas amostras de lacases, ele sequestra os íons cobres, o qual é essencial para a reação enzimática, impedindo a ocorrência da reação, evidenciando assim, que elas são metaloenzimas e que o Cu^{2+} é necessário para a reação (GAUR; NARASIMHULU; PYDISSETTY, 2018; FANG et al., 2012). A L-cisteína é um inibidor típico de moléculas de fenóis oxidases ou semelhantes, é um agente redutor, ocasiona a redução do substrato oxidado pelas lacases, esta inibição é previsível e evidencia a presença do aminoácido cisteína, mostrando ser ele essencial no sitio ativo das lacases, isto é inerente a qualquer tipo de lacase (SHIN e LEE, 2000; GOLVEIA et al., 2016).

Metais pesados são contaminantes comuns dispersos no ambiente. Eles podem afetar a produção, ação e/ou estabilidade de enzimas, por conta disso, a necessidade de estudá-los a fim de inferir sobre a habilidade das lacases em suportar a presença deles na forma de íons (ZHENG et al., 2017). O conjunto enzimático do *P. cinerea* CCIBt 2541 apresentou melhores resultados quanto à exposição aos íons estudados, em comparação com o conjunto do *Peniophora* sp. CBMAI 1063, houve ativação da atividade para os íons Zn^{2+} (148%), Mg^{2+} (145%) e Ca^{2+} (110%), estes íons também não causaram inibição expressiva ao conjunto enzimático do *Peniophora* sp. CBMAI 1063, sendo atividade verificada em presença dos íons Zn^{2+} de 93%, Mg^{2+} de 89% e Ca^{2+} de 61%, conforme demonstrado na Figura 17 A. Estes valores são distintos para os reportados por Christopher, Yao e Ji, (2014) que afirmam que os íons Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , inibem a atividade de lacase. Porém, Kumar et al., 2018 também observou o efeito de enriquecimento da atividade de lacases de *Pandoraea* sp. ISTKB pelo íon Mg^{2+} e os mesmos relacionam outros trabalhos com resultados similares. Chatha, Asgher e Iqbal, (2017) também reporta inibição do Zn^{2+} sobre a atividade de lacases e ativação da atividade por Mn^{2+} e Cu^{2+} , diferentemente do observado para o conjunto enzimático dos fungos *Peniophora*.

Figura 17 – Efeito de íons metálicos, agente quelante (EDTA) e do aminoácido (L-cisteína) sobre a atividade enzimática dos conjuntos de lacases dos fungos do gênero em estudo: (A) *Peniophora* e (B) *Marasmiellus*.



Análises do conjunto enzimático dos fungos do gênero *Marasmiellus* revelaram que para a espécie terrestre *M. colocasiae* CCIBt 3388 parece seguir as observações apontadas anteriormente pelos autores, no que diz respeito à inibição das lacases pelos íons Zn^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} . Por outro lado, para as lacases desse isolado o Mn^{2+} aumentou a atividade, alcançando 117% de atividade relativa. As lacases da espécie marinha apresentou estabilidade maior frente a todos os íons testados. Na concentração de 10 mM a atividade relativa ficou em torno dos 90%, havendo aumento da atividade na presença do Al^{3+} (126%). Ambos conjuntos enzimático das espécies do gênero *Marasmiellus* são significativamente diminuídas pelos íons Ca^{2+} *Marasmiellus sp. CBMAI 1062* (46%) e *M. colocasiae* CCIBt 3388 (44%) (Figura 17 B).

Conforme demonstrado na Figura 17, houve forte inibição pelo íons Fe^{2+} para ambos conjuntos enzimáticos dos fungos *Peniophora* e pouco efeito negativo sobre o conjunto enzimático dos *Marasmiellus*. A ação de íons metálicos sobre a atividade de lacases varia para isoformas de lacases, não podendo ser postulada uma regra de ação (DURAN et al., 2002; NILADEVI; JACOB; PREMA, 2008; YOUNES; SAYADI, 2011; YANG et al., 2014; JAFARI et al., 2017)

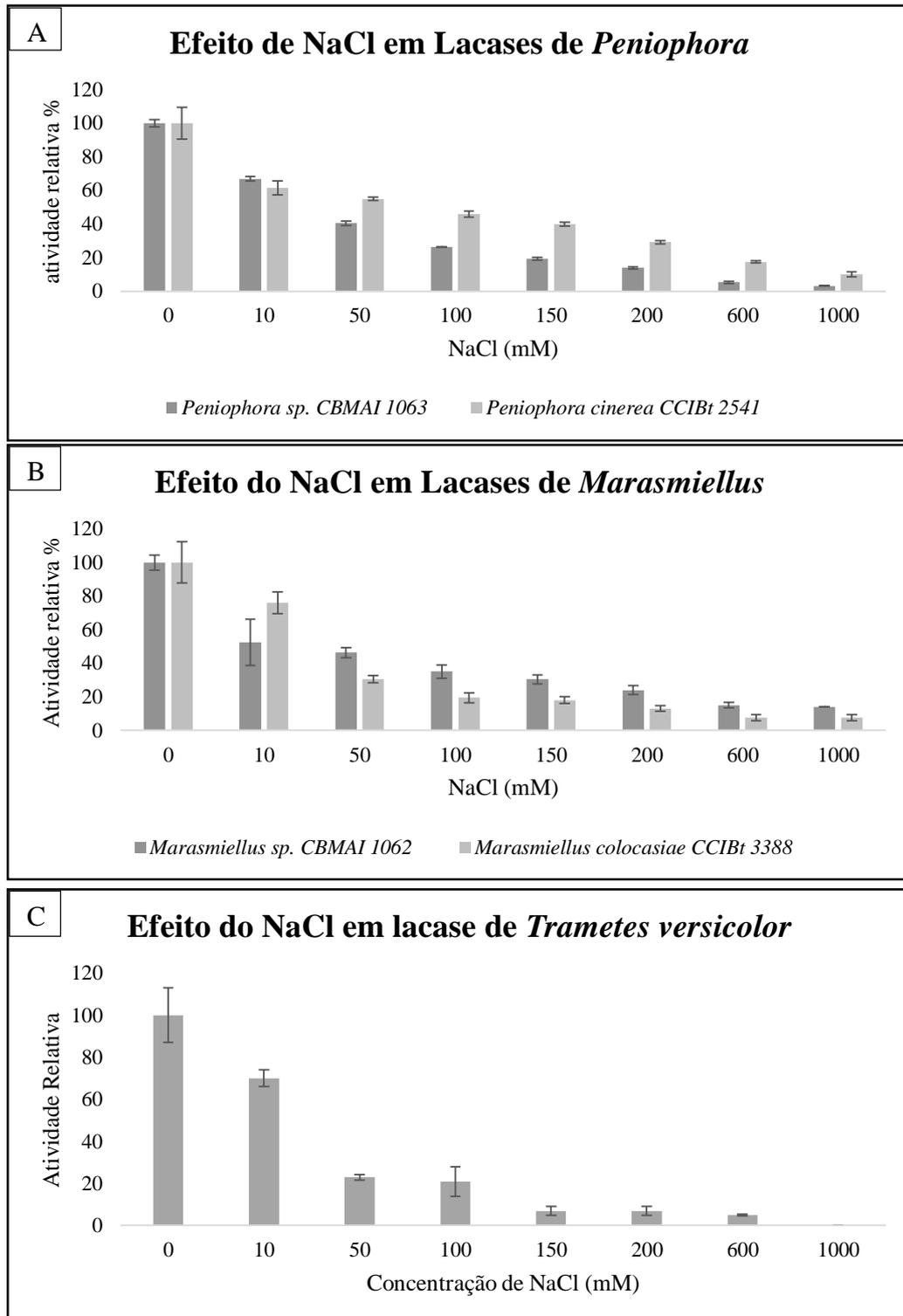
5.3.5 Efeito do NaCl nas lacases

A água do mar tem cerca de 510 mM de NaCl, sal que representa 85% dos sais presente no mar (CASTRO; HUBER, 2008, p.44). Devido ao fato dos fungos *Peniophora* sp. CBMAI 1063 e *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 serem de origem marinha, partimos da hipótese de que as lacases produzidas pelos mesmos seriam mais resistentes à salinidade. Dessa forma, os fungos de origem marinha foram cultivados em água do mar artificial, a fim de mimetizar o ambiente natural destes microrganismos.

Todos os conjuntos enzimáticos analisados mostraram semelhança no perfil de tolerância à salinidade (Figura 18). Além disso, em comparação com a atividade inicial, utilizando 0,0015 U/mL de lacases dos fungos do presente estudo, a atividade enzimática ficou abaixo de 20% na molaridade da água marinha (510 mM). A concentração enzimática pode ser um fator influente, pois de acordo com Moreira-Neto (2012) a análise da resistência de 0,5 U/mL de lacases do *P. cinerea* ao NaCl comparada com duas lacases comerciais, revelou que 47% de atividade se mantinha a 1000 mM, frente a 16 e 25% das lacases comerciais.

Percebe-se que a enzima tem maior preferência para agir em meio sem sal, pois na concentração de 10 mM já há queda da atividade enzimática de todos os conjuntos enzimáticos analisados (Figura 18). Dentre os conjuntos enzimáticos dos fungos *Peniophora* estudados, a concentração de NaCl na qual 50% da atividade inicial é observada (I_{50}), foi melhor para o *P. cinerea* CCIBt 2541 (I_{50} entre 50 a 100 mM). As lacases desse fungo também apresentaram melhores resultados de resistência com o aumento da concentração do sal (Figura 18 A). As lacases do *Peniophora* sp. CBMAI 1063 apresentaram I_{50} entre as concentrações de 10-50 mM, conforme demonstrado na Figura 18 A. De igual forma, nesta faixa de concentração estão os I_{50} dos conjuntos enzimáticos dos fungos do gênero *Marasmiellus*. A 1000 mM as lacases do fungo marinho *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, apresentou 14% de atividade em relação à inicial, apresentando maior atividade em comparação ao homólogo terrestre e aos fungos do gênero *Peniophora*. As lacases deste fungo também apresentaram menor variação de atividade entre as concentrações de 600 – 1000 mM (apenas 1%), conforme demonstrado na Figura 18 B.

Figura 18. Efeito das concentrações de NaCl na atividade dos conjuntos enzimático de lacases: (A) fungos marinho e terrestre *Peniophora* sp. CBMAI 1063 e *Peniophora cinerea* CCIBt 2541, (B) Fungos marinho e terrestre *Marasmiellus* sp. CBMAI 1063 e *Marasmiellus colocasiae* CCIBt 3388 e (C) lacase comercial pura do fungo terrestre *Trametes versicolor*.



A fim de comparar o efeito do NaCl sobre as lacases estudadas, a enzima comercial pura de *Trametes versicolor*, um fungo de origem terrestre, foi testada e mostrou pouca tolerância à salinidade (Figura 18 C). Em 50 mM apenas 23% da atividade foi observada, isso mostra considerável sensibilidade dessa enzima ao sal, apresentando um comportamento semelhante às lacases do fungo *M. colocasiae* CCIBt 3388. Este resultado revela que os conjuntos enzimáticos dos fungos analisados apresentam maior tolerância ao sal do que a lacase de *T. versicolor* comercialmente utilizada.

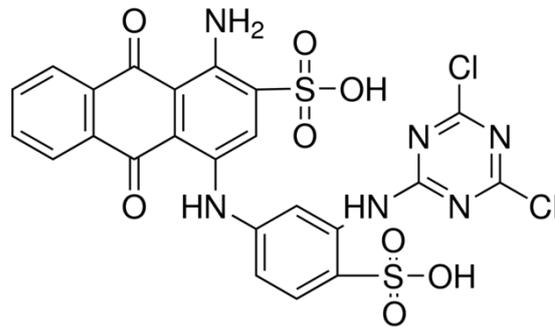
A diminuição da atividade de lacases pelo NaCl, bem como, o fato da atividade entre 100 e 1000 mM não decrescer de forma proporcional ao aumento da concentração salina (Figura 8), pode ser explicado pelo fato dos Cl⁻ causarem perturbação no fluxo da transferência de elétrons obtidos do substrato. Pois, por serem altamente eletronegativos os íons Cl⁻ se ligam aos aminoácidos positivamente carregados, responsáveis pela transferência dos elétrons provenientes do sítio T1 para o T2/T3. Além disso, aparentemente lacases possuem um diâmetro definido neste percurso, e isto varia entre as isoenzimas, fazendo com que o aumento da concentração de sal gere saturação neste canal, tornando desproporcional a relação entre concentração de sal e a diminuição da atividade (XU, 1996; MOREIRA; MILAGRES; MUSSATTO, 2014; SHLEEV et al, 2005; CHRISTOPHER et al., 2014).

Cabe destacar que em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa foi constatado que o fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 produz quantidades significativas de lacases apenas na presença de salinidade (ASW) e CuSO₄, revelando a sua adaptação ao ambiente marinho (MAINRADI et al., 2017). Em adição, experimentos realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que, embora o fungo de origem terrestre *P. cinerea* CCIBt 2541 cresça em salinidade, ele não tolera a adição do CuSO₄. Além disso, o fungo *M. colocasiae* não apresentou crescimento em condições salinas. Estes resultados evidenciam a importância dos fungos de origem marinha em processos salinos.

5.4 Descoloração e destoxificação do corante têxtil marinho reativo

O corante têxtil marinho reativo BF-V 130% (MR) (Figura 19) foi fornecido pela empresa Texpal Química Ltda (produto 03.53.129) e sua degradação foi testada para os conjunto enzimático de lacases dos fungos *P. cinerea* CCIBt 2541, *Peniophora* sp. CBMAI 1063, *M. colocasiae* CCIBt 3388 e da lacase comercial pura de *Trametes versicolor*. Por não haver volume enzimático suficiente de lacases produzidas pelo fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, estas não foram testadas quanto ao potencial de descoloração do corante MR.

Figura 19 – Estrutura química associada do corante têxtil marinho reativo (Fonte: SIGMA-ALDRICH).

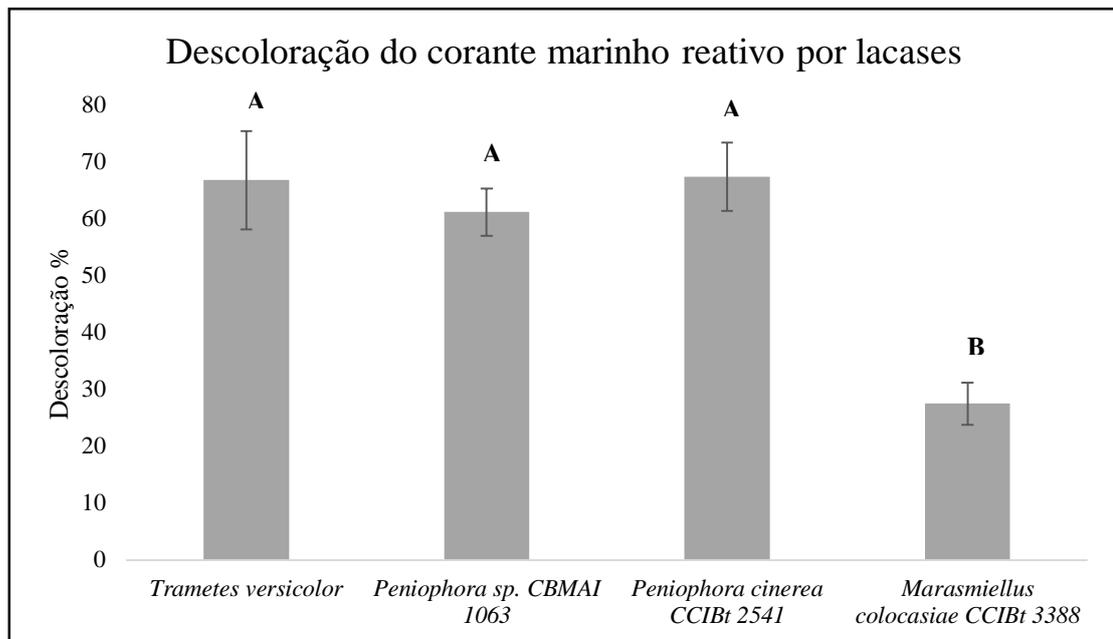


A descoloração do corante têxtil MR após tratamento com o conjunto enzimático dos fungos em estudo mostraram, após 7 dias de cultivo, descoloração acima de 60% pela ação das lacases dos fungos do gênero *Peniophora*, com melhor ação para descoloração pelas enzimas do *P. cinerea* CCIBt 2541 (67%), enquanto que as do *Peniophora* sp. CBMAI 1063 descoloriu 61% (Figura 20). As lacases do representante terrestre *M. colocasiae* CCIBt 3388 apresentaram apenas 27% de descoloração após 7 dias de incubação. A lacase comercial pura do *T. versicolor* apresentou resultado de descoloração de 66%, similar aos resultados observados para os fungos do gênero *Peniophora* (Figura 20). Análises estatística, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), mostram não haver diferença significativa entre o processo de descoloração do corante MR pelo conjunto enzimático dos fungos do gênero *Peniophora* e da amostra comercial *T. versicolor*, utilizada como parâmetro de comparação, (referências A do gráfico). Entretanto, as amostras do *M. colocasiae* CCIBt 3388 apresenta diferença para este parâmetro estatístico (referências B do gráfico), evidenciando que as lacases deste fungo, agem de maneira distinta das demais no processo de descoloração do corante MR.

Não há relatos na literatura do tratamento deste corante por outras lacases, mas o fato das lacases em conjunto com outras enzimas mostrarem eficiência na descoloração de corantes têxtil, tal qual a enzima pura, evidencia o potencial das lacases para agir sobre determinado substrato, mesmo estando em conjunto com outras proteínas. No processo de descoloração, o corante em estudo de cor azul e muda para uma coloração próxima ao rosa e então vai se tornando, conforme o decorrer do tempo, cada vez mais transparente. Bonugli-Santos et al., (2016) em estudo de descoloração do corante Preto Reativo 5 (PR5) pelo fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 identificaram um processo semelhante ao visualizado no presente trabalho para o corante MR. Nas primeiras 24 hs de cultivo do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em solução contendo o corante PR5 o meio extracelular apresentou coloração roxa, a qual com o

tempo foi decrescendo até o momento da descoloração. Os autores atribuíram a alteração da cor nas primeiras 24 hs à alta ação oxidativa, ocasionando a redução das ligações azo, porém, permanecendo ainda intermediários da reação. Logo após este período houve a descoloração por conta da redução destes intermediários. Entretanto, os autores sugerem que este processo ocorreu devido à ação de MnP. Porém, no presente estudo não foi identificada nenhuma outra enzima ligninolítica além de lacases e o teste com resultado semelhante (Figura 20), usando lacase comercial pura de *Trametes versicolor*, fortalece a proposição da ação somente das lacases no processo de descoloração do MR.

Figura 20 – Descoloração do corante têxtil marinho reativo pelo conjunto enzimático de lacases dos fungos marinho e terrestre do gênero *Peniophora*, do fungo terrestre *Marasmiellus colocasiae* CCIBt 3388 e da lacase pura comercial de *Trametes versicolor*.



Dos fungos analisados, apenas o *M. colocasiae* CCIBt 3388 não apresenta registro de descoloração de corantes têxteis em literatura, quer seja por ação de suas enzimas, ou do fungo diretamente aplicado. Fungos do gênero *Peniophora* apresentaram resultados relevantes quanto a descoloração de corantes têxteis. O *Peniophora sp. CBMAI 1063*, em estudos conduzidos por Bonugli-Santos et al., (2016) mostraram eficiência na degradação do corante preto reativo 5 (reactive black 5), com taxa de descoloração de 94% em sete dias. Estudos realizados por Moreira, Milagres e Mussato (2014), mostraram que lacases do *P. cinerea* foram capazes de descolorir até 77% o corante têxtil azul reativo 19 (reactive blue 19) em 3 dias, utilizando 1 U/mL de lacases, em reação contendo tampão e mediadores redox.

Embora o tempo de sete dias seja longo para o tratamento do corante, a dosagem da enzima parcialmente purificada usada na reação de descoloração, foi baixa (0,2 U/mL), quando comparada à outros trabalhos (LIU., et al., 2015; YAMAK et al., 2008; WANG et al., 2010; ZHENG et al., 2017; FANG et al., 2012). Além disso, as reações ocorreram na ausência de tampão e de forma livre, enquanto que muitos trabalhos aplicam a enzima de forma imobilizada, e também não se usou mediador redox, que geralmente proporciona maior eficiência na descoloração (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMAN; MOLDES, 2012; ZOUARI-MECHICH et al., 2006; BIBI; BHATTI, 2012; MOREIRA; MILAGRES; MUSSATTO, 2014). Lacases de *T. versicolor* apresentaram 66% de descoloração do corante laranja ácido 52 (Acid Orange 52) em 6 h, porém foi utilizado 11,4 U/mL da enzima de forma imobilizada na presença de tampão (YAMAK et al., 2008). A lacase comercial de *T. versicolor* na ausência de mediadores não foi capaz de descolorir o corante preto reativo 5 (reactive black 5), concentração da enzima não especificada (BIBI; BHATTI, 2012). No que diz respeito à pureza das lacases em aplicação de descoloração de corantes têxteis, isoformas puras não têm demonstrado bons desempenhos quando comparadas com o caldo bruto, contendo outras enzimas (ZOUARI-MECHICH et al., 2006).

Testes de toxicidade aguda realizados pelo Microtox 500, revelaram aumento da toxicidade, com base no EC₅₀ (concentração que inibe em 50% a luminescência da bactéria *Aliivibrio fischeri*), na descoloração do corante marinho reativo pelo conjunto enzimático do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063, apresentando nível muito tóxico (EC₅₀ = 3,39%), conforme demonstrado na Tabela 5

Tabela 5. Concentração efetiva (EC₅₀) de *A. fischeri*, após 15 min de exposição do conjunto enzimático das lacases com o corante marinho reativo (40 mg L⁻¹).

| | <i>Peniophora</i> sp CBMAI 1063 | <i>P. cinerea</i> CCIBt 2541 | <i>M. colocasiae</i> CCIBt 3388 | <i>T. versicolor</i> |
|------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------|
| Controle negativo (%) | 10,37 | 19,54 | 26,66 | 9,04 |
| EC₅₀ (%) | 3,39 | 20,01 | 12,38 | 9,34 |
| Desvio padrão | ± 0,78 | ± 2,7 | ±2,96 | ±0,34 |

Por outro lado, os ensaios do conjunto enzimático do *P. cinerea* CCIBt 2541 (o que apresentou maior descoloração) levando em consideração o desvio, não apresentou maior toxicidade após o tratamento, exibindo a mesma taxa de antes do tratamento, porém, sendo ainda considerado muito tóxico (EC₅₀ = 20,01%) (Tabela 5). O *M. colocasiae* CCIBt 3388

também mostrou-se mais tóxico após o tratamento, tomando o controle negativo como parâmetro de comparação, com EC₅₀ de 12,38%. A lacase pura do *T. versicolor* também não apresentou destoxificação, sendo o EC₅₀ da amostra (9,34) praticamente igual ao controle (9,04), isto reafirma que o conjunto enzimático em comparação com uma enzima pura pode não apresentar diferença neste tipo de aplicação biotecnológica.

Estudos têm revelado que nem sempre é possível destoxificar uma amostra de corante ou até mesmo efluente apesar de haver a descoloração, devido a fatores como a composição do corante ou a sensibilidade do microrganismo teste a solução proteica (PEREIRA et al., 2009; FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004). Champagne e Ramsay (2010) mostraram que lacases de *T. versicolor* imobilizadas e livres descoloriram os corantes índigo e antraquinona, tendo significância na descoloração do primeiro, porém, não havendo destoxificação no segundo. Resultados negativos para destoxificação são poucos relatados, por haver poucos estudos testando essa variável. Khlifi e colaboradores (2010) relataram que o caldo bruto de *Trametes trogii* aplicados em efluentes de corantes têxteis, apresentou descoloração apenas na presença de mediadores, não sendo capaz de destoxificar o efluente em diferentes concentrações. Além disso, a ação das enzimas sobre o composto alvo, pode quebrá-lo, gerando produtos ainda mais tóxicos do que a própria molécula do poluente inicial (CATHERINE; FRÉDÉRIC; PENNINGCKX, 2016; CHHABRA; MISHRA; RAMASWAMY, 2015).

6. CONCLUSÕES

O meio de cultivo otimizado por Sette e colaboradores (2014) para produção de lacases mostrou-se adequado para os quatro fungos analisados, com ausência de salinidade para os fungos de origem terrestre. A purificação de modo parcial com caracterização de modo aparente (app.), foi realizada apenas levando em conta a cromatografia de troca iônica.

O estudo comparativo das lacases parcialmente purificadas, mostrou que o conjunto enzimático de lacases da espécie terrestre *P. cinerea* CCIBt 2541, apresentou melhor resultado que o do marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063. *P. cinerea* CCIBt 2541 apresentou mais isoformas de lacases, um menor K_m, as lacases foram mais resistentes à influência do NaCl, apresentaram ativação pelos íons Zn²⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺ e melhor descoloração e destoxificação do corante têxtil marinho reativo. Quanto aos conjuntos parcialmente purificados das lacases dos fungos do gênero *Marasmiellus*, as lacases do fungo de origem marinha *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 apresentaram melhor eficiência ante o efeito do NaCl e aos íons metálicos, sendo a atividade enzimática ativadas pelos íons Zn²⁺ e Al³⁺. *M. colocasiae* CCIBt 3388 apresentou

maior K_m para ambos os substratos. Entretanto, os fungos de origem terrestre *P. cinerea* CCIBt 2541 e *M. colocasiae* CCIBt 3388 não se desenvolveram no meio salino, nas condições estudadas, o que indica a inviabilização da aplicação dos mesmos em processos ou ambientes salinos.

De modo geral, as características cinéticas dos fungos analisados são muito semelhantes entre si para o mesmo gênero, principalmente para os fungos *Peniophora*, pois apresentaram pH ótimo e temperatura ótima iguais, produção de lacases e mesmo padrão de atividade em respostas ante influências dos íons e agentes testados, bem como descoloração do corante têxtil. Os fungos *Marasmiellus*, de similaridade apresentaram apenas o mesmo pH ótimo para ambos os substratos testados.

Por conta do conjunto enzimático parcialmente purificados de todos os fungos analisados não apresentarem atividades para as enzimas ligninolítica MnP e LiP, acredita-se que apenas as enzimas lacases agiram no processo de descoloração do corante marinho reativo.

Os resultados do presente trabalho contribuíram para o conhecimento de lacases de basidiomicetos de origem marinha e abrem novas perspectivas para o estudo das lacases de origem marinha e terrestre, incluindo a caracterização molecular das mesmas, a avaliação do potencial de oxidação e aplicações biotecnológicas.

7. REFERÊNCIAS

AFREEN, S.; SHAMSI, T. N.; BAIG, M. A.; AHMAD, N.; FATIMA, S.; QURESHI, M. I.; HASSAN, I.; FATMA, T. A novel multicopper oxidase (laccase) from cyanobacteria: Purification, characterization with potential in the decolorization of anthraquinonic dye. **PLoS one**, v. 12, n. 4, p. e0175144, 2017.

ARACAGÖK, Y. D.; CİHANGİR, N. Decolorization of Reactive Black 5 by *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658. **American Journal of Microbiological Research**, v.1, n.2, p. 16-20, 2013.

ARORA, D. S.; GILL, P. K. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 7–8, p. 602–605, 7 maio 2001.

BAGEWADI, Z. K.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, H. Z. Purification and immobilization of laccase from *Trichoderma harzianum* strain HZN10 and its application in dye decolorization. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 139-150, 2017.

- BALDRIAN, P. Fungal laccases-occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.30, n. 2, p. 215-242, 2006.
- BAO, W.; O'MALLEY, D. M.; WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. R. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. **Science**, v. 260, n. 5108, p. 672-674, 1993.
- BENKHAYA, S.; HARFI, S.; HARFI, A. Classifications, properties and applications of textile dyes: a review. **Applied Journal of Environmental Engineering Science**, v. 3, n. 3, p. 311-320, 2017.
- BIBI, I.; BHATTI, H. N. Biodecolorization of Reactive Black 5 by laccase mediator system. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 29, 2012.
- BLAICH, R.; ESSER, K. Function of enzymes in wood destroying fungi - II. Multiple forms of laccase in white rot fungi. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 103, s.n, p. 271-277, 1975.
- BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; DA SILVA, M.; SETTE, L. D. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. **Fungal Biology**, Amsterdam, v. 114, n. 10, p. 863-872, 2010a.
- BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; DA SILVA, M.; SETTE, L. D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 1, p. 32-37, 2010b.
- BONUGLI-SANTOS, R. C.; VIEIRA, G. A. L.; COLLINS, C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A.; MURRAY, P.; SETTE, L. D. Enhanced textile dye decolorization by marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 using integrated statistical design. **Environmental Science and Pollution Research**, Landsberg, v. 23, n. 9, p. 8659-8668, 2016.
- BONUGLI-SANTOS, R.C.; DURRANT, L. R.; SETTE, L. D. The production of ligninolytic enzymes by marine-derived basidiomycetes and their biotechnological potential in the biodegradation of recalcitrant pollutants and the treatment of textile effluents. **Water Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 223, n. 5, p. 2333-2345, 2012.
- BONUGLI-SANTOS, R.C.; VASCONCELOS, M. R. D.; PASSARINI, M. R. Z.; VIEIRA, G.; LOPES, V. C. P.; MAINARDI, P. H.; DOS SANTOS, J. A.; DUARTE, L. D.; OTERO, I. V. R.; YOSHIDA, A. M. D.; FEITOSA, V.A.; PESSOA, A.; SETTE, L. D. Marine-derived fungi: Diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, n. 269, p. 1-15, 2015.

- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, New Delhi, v.72, n. 1, p.248-254, 1976.
- BRAZKOVA, M.; MERCATI, A.; HRISTOVA, I; LANTE, A.; KRASTANOV, A. Isolation, Purification and Characterization of Laccase from the White-rot Fungus *Trametes Versicolor*. **Scientific Works of University of Food Technologies**, Washington, v. 63, n. 1, 2016.
- BULICH, A. A. A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples. **Process Biochemistry**, v. 17, n. 2, p. 45–47, 1992.
- BUSWELL, J. K.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T.; Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula* (*Lentinus*) *edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, Nova Iorque, v. 128, n. 1, p. 81-88, 1995.
- CAPELARI, M; ANTONÍN, V; ASAI, T; COSTA, H; VENTURA, J. A. A new pathogenic species of *Marasmiellus* from Brazil. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 31, n. 2, p. 137-142, 2010.
- CASTRO, P.; HUBER, M. E. **Marine Biology**. 7. ed. Nova Iorque: MicGraw-Hill , 2008.
- CATHERINE, H., FRÉDÉRIC, D., PENNINCKX, M. Product formation from phenolic compounds removal by laccases: A review. **Environmental Technology and Innovation**, 2016.
- CERRÓN, L. M.; ROMERO-SUÁREZ, D.; VERA, N.; LUDEÑA, Y.; VILLENA, G. K.; GUTIÉRREZ-CORREA, M. Decolorization of textile reactive dyes and effluents by biofilms of *Trametes polyzona* LMB-TM5 and *Ceriporia* sp. LMB-TM1 Isolated from the Peruvian Rainforest. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 226, n.8 , p. 226-235, 2015.
- CHAMPAGNE, P.-P.; RAMSAY, J. A. Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on porous glass beads. **Bioresource technology**, v. 101, n. 7, p. 2230-2235, 2010.
- CHAMURIS, G. P. Speciation in the *Peniophora cinerea* complex. **Mycologia**, p. 736-742, 1991.
- CHATHA, S. A. S.; ASGHER, M.; IQBAL, H.M.N. Enzyme-based solutions for textile processing and dye contaminant biodegradation—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 16, p. 14005-14018, 2017.
- CHEN, C. Y.; HUANG, Y. C.; WEI, C. M.; MENG, M.; LIU, W. H.; YANG, C. H. Properties of the newly isolated extracellular thermo-alkali-stable laccase from thermophilic

actinomycetes, *thermobifida fusca* and its application in dye intermediates oxidation. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2013.

CHHABRA, M.; MISHRA, S.; RAMASWAMY, T. Combination of chemical and enzymatic treatment for efficient decolorization / degradation of textile effluent : High operational stability of the continuous process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, s. n, p. 17-24, 2015.

CHRISTHOPHER, L. P.; YAO, B.; JI, Y. Lignin Biodegradation with Laccase-Mediator Systems. **Frontiers in Energy Research**, v. 2, n. 12, p. 1-13, 2014.

CHRISTIAN, V.; SHRIVASTAVA, R.; SHUKLA, D.; MODI, H.; VYAS, B. R. M. Mediator role of veratryl alcohol in the lignin peroxidase-catalyzed oxidative decolorization of Remazol Brilliant Blue R. **Enzyme and microbial technology**, v. 36, n. 4, p. 426-431, 2005.

CHUNG, K.-T.; CERNIGLIA, C.E. Mutagenicity of azo dyes: Structure–activity relationships. **Mutation Research**, v. 227, n.3, p. 201-220, 1992.

CLAUS, H. Laccases: Structure, reactions, distribution. **Micron**, London, v.35, 1-2, p. 93-96, 2004.

COLLINS, P. J.; DOBSON, A. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3444-3450, 1997.

CORREIA, V.M., STEPHENSON, T., JUDD, S.J.: Characterization of textile waste waters— a review. **Environmental Technology**, v. 15, . 10, p. 917–929, 1994.

COUTO, S. Decolouration of industrial azo dyes by crude laccase from *Trametes hirsuta*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 148, n. 3, p. 768-770, 2007.

DA SILVA, M.; PASSARINI, M. R. Z.; BONUGLI, R. C.; SETTE, L. D. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterization and RBBR decolorization screening. **Environmental Technology**, v. 29, s. n, p. 1331-1339, 2008.

DAÂSSI, D.; ZOUARI-MECHICHI , H.; PRIETO, A.; MARTÍNEZ, M. J.; NASRI, M.; MECHICHI, T. Purification and biochemical characterization of a new alkali-stable laccase from *Trametes* sp . isolated in Tunisia: role of the enzyme in olive mill waste water treatment. **World Journal of Microbiology and Biotechnollogy**, v. 29, s. n, p. 2145-2155, 2013.

D'AGOSTINI, É. C., MANTOVANI, T. R. D. A., VALLE, J. S. D., 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**, v. 68, n. 3, p. 295-300, 2011.

DEDEYAN, B.; KLONOWSKA, A.; TAGGER, S.; TRON, T.; IACAZIO, G.; GIL, G.; PETIT, J. L. Biochemical and Molecular Characterization of a Laccase from *Marasmius quercophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 3, p. 925-929, 2000.

DESAI, S. S.; NITYANAND, C. Microbial laccases and their applications: a review. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 3, s.n, p. 98-124, 2011.

DITTMER, N. T.; SUDERMAN, R. J.; JIANG, H.; ZHU, Y.C.; GORMAN, M. J.; KRAMER, K. J.; KANOST, M. R. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 1, p. 29-41, 2004.

D'SOUZA, D. T.; TIWARI, R.; SAH, A. K.; RAGHUKUMAR, C. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 3-4, p. 504-511, 2006.

DUARTE, A. W. F.; SANTOS, J. A.; VIANNA, M. V.; VIEIRA, J. M. F.; MALLAGUTTI, V. H.; INFORSATO, F. J.; WENTZEL, L. C. P.; LARIO, L. D.; Rodrigues, A.; Pagnocca, F. C.; Pessoa, A.; SETTE, L. D. Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. **Critical reviews in biotechnology**, v. 1, p. 600-619, 2018.

DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, Nova Iorque, v. 31, s.n, p. 907-931, 2002.

EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K. E. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1151-1158, 1996.

EGGERT, C.; LAFAYETTE, P. R.; TEMP, U.; ERIKSSON, K. E. L.; DEAN, J. F. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1766-1772, 1998.

ENGUITA, F. J.; MARTINS, L. O.; HENRIQUES, A. O.; CARRONDO, M. A. Crystal structure of a bacterial endospore coat component: A laccase with enhanced thermostability properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 19416-19425, 2003.

FANG, Z. M.; LI, T. L.; CHANG, F.; ZHOU, P.; FANG, W.; HONG, Y. Z.; ZHANG, X. C.; PENG, H.; XIAO, Y. Z. A new marine bacterial laccase with chloride-enhancing, alkaline-dependent activity and dye decolorization ability. **Bioresource Technology**, v. 111, s. n, p. 36-41, 2012.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. A.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808-1825, 2013.

FORGACS, E.; CSERHÁTI, T.; OROS, G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review. **Environment International**, v. 30, n. 7, p. 953-971, 2004.

GAJERA, H. P.; GAJERA, H. P.; BAMBHAROLIA, R. P.; HIRPARA, D. G.; PATEL, S. V.; GOLAKIYA, B. A. Molecular identification and characterization of novel *Hypocrea koningii* associated with azo dyes decolorization and biodegradation of textile dye effluents. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 98, p. 406-416, 2015.

GARCIA, T. A. **Purificação e caracterização de lacases de *Pycnoporus sanguineus***. 2006. p.126. Tese de doutorado – Universidade de Brasília, Brasília - DF, 2006.

GAUR, N.; NARASIMHULU, K.; PYDISETTY, Y. Biochemical and kinetic characterization of laccase and manganese peroxidase from novel *Klebsiella pneumoniae* strains and their application in. **RSC Advances**, v. 8, s.n, p. 15044–15055, 2018.

GHOSH, A.; DASTIDAR, M. G.; SREEKRISHNAN, T. R. Recent advances in bioremediation of heavy metals and metal complex dyes: review. **Journal of Environmental Engineering**, v.192, n.9, p. 2-14, 2016.

GIARDINA, P.; FARACO, V.; PEZZELLA, C.; PISCITELLI, A.; VANHULLE, S.; SANNIA, G. Laccases: A never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 67, n. 3, p. 369-385, 2010.

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

GLAZERA, A. N.; NIKAIDO, H. **Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology**. 2nd edition: New York, Cambridge University Press, 2007, p. 577.

- GOLVEIA, J. C. S. **Indução de lacase de *Pycnoporus sanguineus* CCT 4518 induzida por resíduos agroindustriais e ensaio de biorremediação de estrogênio sintético (EE2)**. 2016. p.82. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO, 2016.
- GOMES, E.; AGUIAR, A. P.; CARVALHO, C. C.; BONFÁ, M. R. B. B.; DA SILVA, R.; BOSCOLO, M. Ligninases production by basidiomicetes strains on lignocellulosic agricultural residues and decolorization of synthetic dyes. **Brazilian Journal of Biotechnology**, v. 131, n. 2, p. 31-39, 2007.
- GONÇALVES, I.; SILVA, C.; CAVACO-PAULO, A. Ultrasound enhanced laccase applications. **Green Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 1362-1374, 2015.
- HAO, Z.; MOHNEN, D. A review of xylan and lignin biosynthesis: Foundation for studying Arabidopsis irregular xylem mutants with pleiotropic phenotypes. **Critical Reviews Biochemistry Molecular Biology**, p. 1–30, 2014.
- HUNGER, K. **Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Application**. Editora Wiley-VCH, 1ª ed, Weinheim, Alemanha, 2003.
- HÜTTERMANN, A.; MAI, C.; KHARAZIPOUR, A. Modification of lignin for the production of new compounded materials. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 55, n. 4, p. 387-394, 2001.
- JAFARI, N.; REZAEI, S.; REZAEI, R.; DILMAGHANI, H.; KHOSHAYAND, M. R.; FARAMARZI, M. A. Improved production and characterization of a highly stable laccase from the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* for the efficient delignification of almond shell bio-waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, s. n, p. 489-498, 2017.
- JIANG, J. ZHOU, Z.; DONG, Y.; GUAN, X.; WANG, B.; JIANG, B.; YANG, A.; CHEN, Z.; GAO, S.; SUN, H. Characterization of phenoloxidase from the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **Immunobiology**, v. 219, n. 6, p. 450-456, 2014.
- JONES, E. B. G.; SAKAYAROJ, J.; SUETRONG, S.; SOMRITHIPOL, S.; PANG, K.L. Classification of marine Ascomycota , anamorphic taxa and Basidiomycota. **Fungal Diversity**, v. 35, p. 1-187, 2009.
- KESTER, Dana R. et al. Preparation of artificial seawater 1. **Limnology and oceanography**, v. 12, n. 1, p. 176-179, 1967.

KHLIFI, R.; BELBAHRI, L.; WOODWARD, S.; ELLOUZ, M.; DHOUIB, A.; SAYADI, S.; MECHICHI, T. Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, s. n., p. 802-808, 2010.

KILARU, S.; HOEGGER, P. J.; KÜES, U. The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. **Current genetics**, v. 50, n. 1, p. 45-60, 2006.

KOHLMEYER, J.; VOLKMANN-KOHLMEYER, B. Fungi from Coral Reefs: A Commentary. **Mycological Research**, v. 107, p. 386-387, 2003.

KUMAR, M.; MISHRA, A.; SINGH, S. S.; SRIVASTAVA, S.; THAKUR, I. S. Expression and characterization of novel laccase gene from *Pandoraea* sp. ISTKB and its application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, s. n, p. 308-316, 2018.

KUMAR, R.; DAYAL, R.; ONIAL, P. Utilization of *Tagetes minuta* Aerial Parts as a Source of Natural Dyes for Textile Coloration. **Waste and Biomass Valorization**, v. 5, n. 4, p. 699-707, 2014.

KUMAR, R.; KAUR, J.; JAIN, S.; KUMAR, A. Optimization of laccase production from *Aspergillus flavus* by design of experiment technique: Partial purification and characterization. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, Amsterdam, v.14, n.1, p 125-131, 2016.

KUMAR, S. V. S.; PHALE, P. S.; DURANI, S.; WANGIKAR, P. P. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase Family. **Biotechnology and Bioengineering**, Nova Iorque, v. 83, n. 4, p. 386-394, 2003.

KUMAR, V. V.; SATHYASELVABALA, V.; PREMKUMAR, M. P.; VIDYADEVI, T.; SIVANESAN, S. Biochemical characterization of three phase partitioned laccase and its application in decolorization and degradation of synthetic dyes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 74, n. 1-2, p. 63-72, 2012.

KUMARI, A.; KISHOR, N.; GUPTASARMA, P. Characterization of a mildly alkalophilic and thermostable recombinant *Thermus thermophilus* laccase with applications in decolourization of dyes. **Biotechnology Letters**, v. 40, n. 2, p. 285-295, 2018.

LEONOWICZ, A.; CHO, N. S.; JOLANTA LUTEREK, J.; WILKOLAZKA, A.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; MATUSZEWSKA, A.; HOFRICHTER, M.; WESENBERG, D.; ROGALSKI, J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. **Journal of Basic Microbiology**, Nova Iorque, v. 41, [s.n], p.185-227, 2001.

LI, X.; KONDO, R.; SAKAI, K. Studies on hypersaline-tolerant white-rot fungi III: biobleaching of unbleached kraft pulp by hypersaline-tolerant manganese peroxidase from a marine white rot isolate, *Phlebia* sp. MG-60. *Journal of wood science*, v. 49, n. 1, p. 0042-0046, 2003a.

LI, X.; KONDO, R.; SAKAI, K.. Studies on hypersaline-tolerant white-rot fungi IV: effects of Mn²⁺ and NH⁴⁺ on manganese peroxidase production and Poly R-478 decolorization by the marine isolate *Phlebia* sp. MG-60 under saline conditions. **Journal of wood science**, v. 49, n. 4, p. 355-360, 2003b.

LIU, H. CHENG, Y.; DU, B.; TONG, C.; LIANG, S.; HAN, S.; ZHENG, S.; LIN, Y. Overexpression of a novel thermostable and chloride-tolerant laccase from *Thermus thermophilus* SG0.5JP17-16 in *Pichia pastoris* and its application in synthetic dye decolorization. **PLoS ONE**, v.10, n.3, p. 1-14, 2015.

MAGRINI, M. J. **Degradação de HPAs e produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos derivados de esponjas marinhas**. 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2012.

MAINARDI, P. H. **Produção de lacases pelo fungo filamentoso de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em biorreator de bancada**. 2015. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro – SP. 2015.

MAINARDI, P. H.; FEITOSA, V. A.; PAIVA, L. B. B.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; SQUINA, F. M.; PESSOA, A.; SETTE, L. D. Laccase production in bioreactor scale under saline condition by the marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063. **Fungal biology**, v. 122, n. 5, p. 302-309, 2018.

MALINAUSKIENE, L., BRUZE, M., RYBERG, K., ZIMERSON, E., ISAKSSON, M. Contact allergy from disperse dyes in textiles: a review. **Contact Dermatitis**, v. 68, s.n, p.65–75, 2012.

MANAVALAN, T.; MANAVALAN, A.; THANGAVELU, K. P.; HEESE, K. Characterization of optimized production, purification and application of laccase from *Ganoderma lucidum*. **Biochemical engineering journal**, v. 70, p. 106-114, 2013.

MATE, D. M.; ALCALDE, M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. **Microbial Biotechnology**, v.10, n.16, p. 1457-1467, 2017.

MENEZES, C. B. A.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; MIQUELETTA, P. B.; PASSARINI, M. R. Z.; DA SILVA, C. H. D.; JUSTO, M. R.; FANTINATTI-GARBOGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; BERLINCK, R. G. S.; SETTE, L. D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of Sao Paulo state. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 165, s.n, p. 466–482, 2010.

MINUSSI, R. C.; PASTORE, G. M.; DURAN, N.; Potential applications of laccase in the food industry. **Trends in Food Science and Technology**, Chichester, v. 13, n. 6-7, p. 205-216, 2002

MIRZADEH, S. S.; KHEZRI, S. M.; REZAEI, S.; FOROOTANFAR, H.; MAHVI, A. H.; FARAMARZI, M. A. Decolorization of two synthetic dyes using the purified box of *Paraconiothyrium variabile* immobilized on porous silica beads. **Journal of Environmental Health Sciences and Engineering**, London, v. 12, s.n, p. 9, 2014.

MOHD-NASIR, H.; ABD-TALIB, N.; MOHD-SETAPAR, S. H.; WONG, L. P.; IDHAM, Z.; CASILLAS, A. C.; AHMAD, A. Natural colorants from plants for wellness industry. **Empowerment**, v. 9, n. 3, p. 836-843, 2018.

MOJSOV, K. Biotechnological applications of laccases in the textile industry. **Savremene tehnologije**, v.3, n.1, p. 76-79, 2014.

MOJSOV, K. D; ANDRONIKOV, D.; JANEVSKI, A.; KUZELOV, A.; GABER, S. The application of enzymes for the removal of dyes from textile effluents. **Advanced technologies**, v.5, n.10, p. 81-86, 2016.

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**, v. 2011, s. n, p. 1-7, 2011.

MOREIRA, S.; MILAGRES, A. M. F.; MUSSATTO, S. I. Reactive dyes and textile effluent decolorization by a mediator system of salt-tolerant laccase from *Peniophora cinerea*. **Separation and Purification Technology**, v. 135, n. 1, p. 183-189, 2014.

MOREIRA-NETO, S. L. M. **Caracterização de lacase de *Peniophora cinerea* e estudo do potencial de aplicação biotecnológica**. 2012. 169 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

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

- MYDLARZ, L. D.; PALMER, C. V. The presence of multiple phenoloxidases in Caribbean reef-building corals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 159, n. 4, p. 372-378, 2011.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Tradução de A. A. Simões. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014, p.1220
- NILADEVI, K. N.; JACOB, N.; PREMA, P. Evidence for a halotolerant-alkaline laccase in *Streptomyces psammoticus*: Purification and characterization. **Process Biochemistry**, Barking, v. 43, s.n, p. 654-660, 2008.
- OBARA, F. W. H.; VARÉA-PEREIRA, G.; MIYAGUI, D. T.; SILVA, M.L. C. PPO-Purificação de lacases PPO - I de *Botryosphaeria rhodina*. **Acta Science Biology Science**, v. 17, n. 13, P. 303-310, 2005.
- OLIVEIRA, G. A. R.; LAPUENTE, J.; TEIXIDÓ, E.; PORREDÓN, C.; BORRÀS, M.; OLIVEIRA, D. P. Textile dyes induce toxicity on zebrafish early life stages. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.35, n.2, p. 429-434, 2016.
- ONG, S. A.; UCHIYAMA, K.; INADAMA, D.; ISHIDA, Y.; YAMAGIWA, K. Treatment of azo dye Acid Orange 7 containing wastewater using up-flow constructed wetland with and without supplementary aeration. **Bioresource Technology**, v.101, n.23, p. 9049-9057, 2010.
- OSTERHAGE, C. **Isolation, Structure Determination and Biological Activity Assessment of Secondary Metabolites from Marine-derived Fungi**. 2001, 195f. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade de Tecnologia de Carolo-Braunschweig, Brunswick – Alemanha, 2001.
- OTERO, I. V. R. **Transcriptoma do fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063: análise dos genes de lacase, clonagem e expressão heteróloga**. 2016. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2016.
- OTERO, I. V. R.; FERRO, M.; BACCI, M.; FERREIRA, H.; SETTE, L. D. De novo transcriptome assembly: a new laccase multigene family from the marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063. **AMB Express**, Heidelberg, v. 1, n. 7, 2017.
- OTTO, B.; SCHLOSSER, D. First laccase in green algae: purification and characterization of an extracellular phenol oxidase from *Tetracystis aerea*. **Planta**, v. 240, n. 6, p. 1225-1236, 2014.

- PAIVA, C. K. C. **Produção de laccase por fungo isolado de sedimento marinho**. 2016. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de graduação em engenharia ambiental) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2016.
- PARK, N.; PARK, S. International Journal of Biological Macromolecules Purification and characterization of a novel laccase from *Fomitopsis pinicola* mycelia. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, s. n, p. 583-589, 2014.
- PASSARINI, M. R. Z.; OTTONI, C.; SANTOS, C.; LIMA, N.; SETTE, L. D. Induction, expression and characterisation of laccase genes from the marine-derived fungal strains *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 and *Arthopyrenia* sp. CBMAI 1330. **AMB Express**, v. 5, p. 1-9, 2015.
- PASSARINI, M. R.Z.; RODRIGUES, M. V. N.; SILVA, M.; SETTE, L. D. Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 364–370, 2011.
- PATEL, H.; GUPTE, S.; GAHLOUT, M.; GUPTE, A. Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1. **3 Biotech**, v.4, n.1, p. 77-84, 2014.
- PEREIRA, L.; COELHO, A. V.; VIEGAS, C. A.; SANTOS, M. M. C.; ROBALO, M. P.; MARTINS, L. O. Enzymatic biotransformation of the azo dye Sudan Orange G with bacterial CotA-laccase. **Journal of Biotechnology**, v. 139, n. 1, p. 68-77, 2009.
- PESSOA-JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. 1ª ed. Barueri-SP: Manole, 2005. p. 444.
- POLIZELI, M. L. T. M.; RAI, M. **Fungal Enzymes**. 1 ed. Boca Raton: CRC press, 2014.
- RAGHUKUMAR, C.; D’SOUZA-TICLO, D.; VERMA, A. K. Treatment of Colored Effluents with Lignin-Degrading Enzymes: An Emerging Role of Marine-Derived Fungi. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 34, n. 3-4, p. 189–206, 2008.
- RAGHUKUMAR, C.; RAGHUKUMAR, S.; CHINNARAJ, A.; CHANDRAMOHAN, D.; D’SOUZA, T. M.; REDDY, C. A. Laccase and other lignocellulose modifying enzymes of marine fungi isolated from the coast of India. **Botanica Marina**, v. 37, n. 6, p. 515-524, 1994.
- RAMÍREZ-CAVAZOS, L. I.; JUNGHANNS, C.; ORNELAS-SOTO, N.; CÁRDENAS-CHÁVEZ, D. L.; HERNÁNDEZ-LUNA, C.; DEMARCHE, P.; ENAUD, E.; GARCÍA-MORALES, R.; AGATHOS, S. N.; PARRA, R. Purification and characterization of two

thermostable laccases from *Pycnoporus sanguineus* and potential role in degradation of endocrine disrupting chemicals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 108, s.n, p 32-42, 2014.

REVANKAR, M. S.; LELE, S. S. Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 581-588, 2006.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **TRENDS in Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 219-226, 2006.

RODGERS, C. J.; BLANFORD, C. F.; GIDDENS, S. R.; SKAMNIOTI, P.; ARMSTRONG, F. A.; GURR, S. J. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? **Trends in Biotechnology**, v.28, n.2, p. 63-72, 2009.

ROSSI, T.; SILVA, P. M.S.; DE MOURA, L. F.; ARAÚJO, M. C.; BRITO, J. O.; FREEMAN, H. S. Waste from eucalyptus wood steaming as a natural dye source for textile fibers. **Journal of Cleaner Production**, v.143, s.n, p. 303-310, 2017.

SCHNEIDER, K., HAFNER, C.; JÄGER, I. Mutagenicity of textile dye products. **Journal of Applied Toxicology**, v. 24, n.2, p. 83– 91, 2004.

SENTHIVELAN, T.; KANAGARAJ, J.; PANDA, R. C. Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: an eco-friendly approach-a review. **Biotechnology and bioprocess engineering**, v. 21, n. 1, p. 19-38, 2016.

SETTE, L. D.; BONUGLI-SANTOS, R. C. Ligninolytic enzymes from marine-derived fungi: production and applications. In: Antonio Trincone. (Org.). *Marine enzymes for biocatalysis: Sources, biocatalytic characteristics and bioprocesses of marine enzymes*. 1ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2013, v., p. 403-427.

SETTE, L.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; TERRONE, C. C.; CARMONA, E. C. Processo de obtenção da enzima lacase por fungo marinho, enzima lacase e uso da mesma. 2014, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR102014008502, título: "processo de obtenção da enzima lacase por fungo marinho, enzima lacase e uso da mesma", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 09/04/2014; Em Domínio Público: 01/12/2015.

SHANKAR, S.; SHIKHA. Laccase production and enzymatic modification of lignin by a novel *Peniophora* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 166, n. 4, p. 1082-1094, 2012.

SHARMA, P.; GOEL, R.; CAPALASH, N. Bacterial laccases. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 823-832, 2007.

SHIN, K. S.; LEE, Y. J. Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 384, n. 1, p. 109-115, 2000.

SHLEEV, S.; JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; KHALUNINA, A.; MOROZOVA, O.; YAROLOV, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L. Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes. **Bioelectrochemistry**, Nova Iorque, v. 67, n.1, p. 115-124, 2005.

SHRADDHA; SHEKHER, R.; SEHGAL, S.; KAMTHANIA, M.; KUMAR, A. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. **Enzyme research**, Nova Iorque, v. 2011, s.n, p. 1-11, 2011.

SI, J.; PENG, F.; CUI, B. Bioresource Technology Purification, biochemical characterization and dye decolorization capacity of an alkali-resistant and metal-tolerant laccase from *Trametes pubescens*. **Bioresource Technology**, v. 128, s.n, 2013.

Sigma-Aldrich, disponível em:
<<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b1064?lang=pt®ion=BR>>
acessado 10 de janeiro de 2019.

SILVÉRIO, S. C.; MOREIRA, S.; MILAGRES, A. M.; MACEDO, E. A.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Laccase production by free and immobilized mycelia of *Peniophora cinerea* and *Trametes versicolor*: a comparative study. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 36, n. 3, p. 365-373, 2013.

SINGH, R. L.; SINGH, P. K.; SINGH, R. P.. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes—A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 104, p. 21-31, 2015.

SIVAKUMAR, R.; RAJENDRAN, R.; BALAKUMAR, C.; TAMILVENDAN, M. Isolation, screening and optimization of production medium for thermostable laccase production from *Ganoderma* sp. **Int J Eng Sci Technol**, v. 2, n. 12, p. 7133-7141, 2010.

STOILOVA, I.; KRASTANOV, A.; STANCHEV, V. Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, Oxford, v. 1, n. 3, p. 208-215, 2010.

TAGGER, S.; PÉRISSOL, C.; GIL, G.; VOGT, G. LE PETIT, J. Phenoloxidases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus* isolated from an evergreen oak litter (*Quercus ilex* L.). **Enzyme and Microbial Technology**. V.23 N.6 p. 372-379, 1998.

TANI, H.; FUJII, Y.; NAKAJIMA, H. Chlamydocin analogues from the soil fungus *Peniophora* sp.: Structures and plant growth-retardant activity. **Phytochemistry**, v. 58, n. 2, p. 305-310, 2001.

THEERACHAT, M.; GUIEYSSE, D.; MOREL, S.; REMAUD-SIMÉON, M.; CHULALAKSANANUKUL, W. Laccases from Marine Organisms and Their Applications in the Biodegradation of Toxic and Environmental Pollutants: a Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. p.1-29, 2018.

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

TIEN, M; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 8, p. 2280-2284, 1984.

TINOCO, R.; ACEVEDO, A.; GALINDO, E.; SERRANO-CARREÓN, L. Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 531-540, 2011.

TRINCONI, A. Potential biocatalysts originating from sea environments. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 241-256, 2010.

UTHANDI, S.; SAAD, B.; HUMBARD, M. A.; MAUPIN-FURLOW; J. A. LccA, an archaeal laccase secreted as a highly stable glycoprotein into the extracellular medium by *Haloferax volcanii*. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 3, p. 733-743, 2010.

VAITHANOMSAT, P.; APIWATANAPIWAT, W.; PETCHOY, O.; CHEDCHANT, J. Production of ligninolytic enzymes by white-rot fungus *Datronia* sp. KAPI0039 and their application for reactive dye removal. **International Journal of chemical engineering**, v. 2010, 2010.

VIEIRA, G.; PURIC, J.; MORAO, L.G; SANTOS, J. A.; INFORSATO, F. J.; SETTE, L. D.; FERREIRA, H.; SASS, D. C. Terrestrial and marine Antarctic fungi extracts active against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Letters in applied microbiology**, v. 67, p. 64-71, 2018.

WANG, Z.; CAI, Y.; LIAO, X.; ZHANG, F.; ZHANG, D.; LI, Z. Production and characterization of a novel laccase with cold adaptation and high thermal stability from an isolated fungus. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 1, p. 280-294, 2010.

WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 33, p. 23688–23695, 25 nov. 1992.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 7. ed. Nova Iorque: Cambridge University Press, 2010, p. 484.

XU, F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. **Biochemistry**, Washington, v. 35, n. 23, p. 7608-7614, 1996.

YAMAK, O.; KALKAN, N. A.; AKSOY, S.; ALTINOK, H.; HASIRCI, N. Semi-interpenetrating polymer networks (semi-IPNs) for entrapment of laccase and their use in Acid Orange 52 decolorization. **Process Biochemistry**, v. 44, s. n, p. 440-445, 2009.

YANG, J.; LIN, Q.; NG, T. B.; YE, X.; LIN, J. Purification and characterization of a novel laccase from *Cerrena* sp. HYB07 with dye decolorizing ability. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1-13, 2014.

YANG, J.; XU, X.; NG, T. B.; LIN, J.; YE, X. Laccase gene family in *Cerrena* sp. HYB07: Sequences, heterologous expression and transcriptional analysis. **Molecules**, v.21, n. 8, p.1-16, 2016.

YAVER, D. S.; XU, F.; GOLIGHTLY, E. J.; BROWN, K. M.; BROWN, S. H.; REY, M. W.; SCHNEIDER, P.; HALKIER, T. DALBOGE, H. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 834-841, 1996.

YOSHIDA, H. LXIII.- Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. communication from the chemical society of Tokio. **Journal of the Chemical Society**, Washington, v. 43, s.n, p. 472-486, 1883.

YOUNES, S. B.; SAYADI, S. Purification and characterization of a novel trimeric and thermotolerant laccase produced from the ascomycete *Scytalidium thermophilum* strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 73, n. 1-4, p. 35-42, 2011.

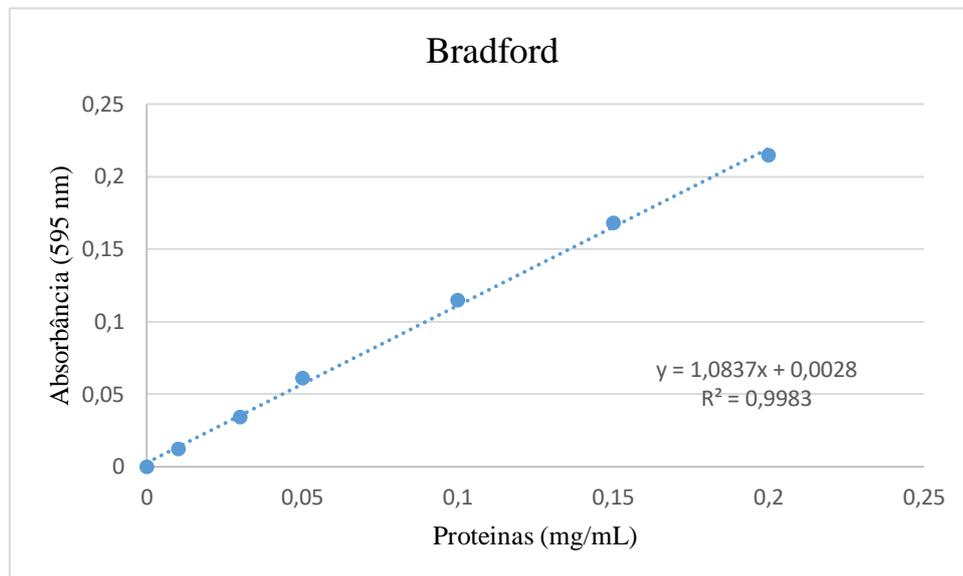
ZHENG, F.; AN, Q.; MENG, G.; WU, X. J.; DAI, Y. C.; SI, J. A novel laccase from white rot fungus *Trametes orientalis*: Purification, characterization, and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, s. n, p. 758-770, 2017.

ZOUARI-MECHICHI, H.; MECHICHI, T.; DHOUIB, A.; SAYADI, S.; MARTÍNEZ, A. T.; MARTÍNEZ, M. J. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 141-148, 2006.

ZUCCA, P.; COCCO, G.; SOLLAI, F.; SANJUST, E. Fungal laccases as tools for biodegradation of industrial dyes. **Biocatalysis**, v. 1, n. 1, p. 82-108, 2015.

APÊNDICE

Apêndice 1. Curva de Bradford, plotado com concentrações de BSA variando de 0 a 0,2 mg/mL em tampão acetato, com relação do volume de 20µL amostra para 80µL reagente.



Apêndice 2. Absorbância da reação do caldo bruto, ultrafiltrado concentrado (*diluída 1,6 X), ultrafiltrado permeado 1 e 2 e troca iônica (*diluída 1,6 X) do *Peniophora* sp. CBMAI 1063 com o reagente de Bradford (Sigma).

| Proteínas totais Absorbância (595) | | | | |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Amostra | I | II | III | Média |
| Caldo Bruto | 0,069 | 0,069 | 0,096 | 0,078 |
| *Ultrafiltrado concentrado | 0,127 | 0,125 | 0,127 | 0,126 |
| Ultrafiltrado Permeado 1 | 0,001 | 0,003 | 0,005 | 0,003 |
| Ultrafiltrado Permeado 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Troca Iônica | 0,184 | 0,179 | 0,183 | 0,182 |

Apêndice 3. Absorbância da reação do caldo bruto, ultrafiltrado concentrado (*diluída 1,6 X), ultrafiltrado permeado e troca iônica do *Peniophora cinerea* CCIBt 2541 com o reagente de Bradford (Sigma).

| Proteínas totais Absorbância (595) | | | | |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Amostra | I | II | III | Média |
| Caldo Bruto | 0,151 | 0,176 | 0,159 | 0,162 |
| *Ultrafiltrado concentrado | 0,155 | 0,157 | 0,153 | 0,155 |
| Ultrafiltrado Permeado 1 | 0,002 | 0,003 | 0 | 0 |
| Troca Iônica | 0,142 | 0,169 | 0,134 | 0,15 |

Apêndice 4. Absorbância da reação do caldo bruto, ultrafiltrado concentrado (*diluída 5 X), ultrafiltrado permeado e troca iônica (*diluída 5 X) do *Marasmiellus colocasiae* CCIBt 3388 com o reagente de Bradford (Sigma).

| Proteínas totais Absorbância (595) | | | | |
|---|----------|-----------|------------|--------------|
| Amostra | I | II | III | Média |
| Caldo Bruto | 0,111 | 0,107 | 0,126 | 0,115 |
| *Ultrafiltrado concentrado | 0,104 | 0,110 | 0,100 | 0,105 |
| *Troca Iônica | 0,181 | 0,194 | 0,188 | 0,188 |

Apêndice 5. Absorbância da reação do caldo bruto, ultrafiltrado concentrado (*diluída 1,6 X), ultrafiltrado permeado e troca iônica (*diluída 1,6 X) do *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 com o reagente de Bradford (Sigma).

| Proteínas totais Absorbância (595) | | | | |
|---|----------|-----------|------------|--------------|
| Amostra | I | II | III | Média |
| Caldo Bruto | 0,07 | 0,077 | 0,072 | 0,073 |
| *Ultrafiltrado concentrado | 0,133 | 0,119 | 0,0129 | 0,127 |
| *Troca Iônica | 0,122 | 0,128 | 0,131 | 0,127 |

Apêndice 6. Absorbâncias (420 nm) do caldo bruto e após o processo purificação de lacases, em diferentes diluições do caldo do fungo *Marasmiellus colocasiae* CCIBt 3388 aplicado à equação 1 para determinação da atividade enzimática de lacase.

| Caldo bruto | | | Ultrafiltrado | | | Troca Iônica | | |
|---------------------------------|----------------|-----------------|--------------------------------|----------------|-----------------|---------------------------------|----------------|-----------------|
| t1 (0') | t2 (5') | t3 (10') | t1 (0') | t2 (5') | t3 (10') | t1 (0') | t2 (5') | t3 (10') |
| 0,09 | | 0,28 | 0,03 | 0,12 | 0,20 | 0,03 | 0,20 | 0,36 |
| 0,08 | | 0,27 | 0,02 | 0,12 | 0,20 | 0,03 | 0,19 | 0,350 |
| 0,07 | | 0,26 | 0,03 | 0,12 | 0,20 | 0,03 | 0,19 | 0,35 |
| Total (U/L⁻¹) | 887,30 | | Total(U/L⁻¹) | 8117 | | Total (U/L⁻¹) | 15031 | |
| Desvio Padrão | 21 | | Desvio Padrão | 71 | | Desvio Padrão | 377 | |

Apêndice 7. Absorbâncias (420 nm) do caldo bruto e após o processo purificação de lacases, em diferentes diluições do caldo do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063, aplicado à equação 1 para determinação da atividade enzimática de lacase.

| Caldo bruto | | | Ultrafiltrado | | | Permeado ultrafiltrado | | | Troca iônica | | |
|---------------------------------|---------|----------|--------------------------------|---------|----------|---------------------------------|---------|----------|---------------------------------|---------|----------|
| t1 (0') | t2 (5') | t3 (10') | t1 (0') | t2 (5') | t3 (10') | t1 (0') | t2 (5') | t3 (10') | t1 (0') | t2 (5') | t3 (10') |
| 0,12 | 0,22 | 0,30 | 0,09 | 0,19 | 0,30 | 0,04 | 0,09 | 0,18 | 0,05 | 0,28 | 0,55 |
| 0,13 | 0,25 | 0,31 | 0,08 | 0,20 | 0,33 | 0,04 | 0,10 | 0,19 | 0,05 | 0,28 | 0,56 |
| 0,13 | 0,21 | 0,31 | 0,08 | 0,19 | 0,30 | 0,03 | 0,08 | 0,17 | 0,05 | 0,29 | 0,57 |
| Total (U/L⁻¹) | | 1.722,00 | Total(U/L⁻¹) | | 10632,70 | Total (U/L⁻¹) | | 0,65 | Total (U/L⁻¹) | | 4691,40 |
| Desvio Padrão | | 9,30 | Desvio Padrão | | 1053,01 | Desvio Padrão | | 0,01 | Desvio Padrão | | 107,30 |

Apêndice 8. Absorbâncias (420 nm) do caldo bruto e após o processo purificação de lacases, em diferentes diluições do caldo do fungo *Peniophora cinerea* CCIBt 2451, aplicado à equação 1 para determinação da atividade enzimática de lacase.

| Caldo bruto | | | Ultrafiltrado | | | Permeado ultrafiltrado | | | Troca iônica | | |
|---------------------------------|---------|----------|--------------------------------|---------|----------|---------------------------------|---------|----------|---------------------------------|---------|----------|
| t1 (0') | t2 (5') | t3 (10') | t1 (0') | t2 (5') | t3 (10') | t1 (0') | t2 (5') | t3 (10') | t1 (0') | t2 (5') | t3 (10') |
| 0,12 | 0,21 | 0,30 | 0,03 | 0,09 | 0,17 | 0,02 | 0,07 | 0,13 | 0,01 | 0,04 | 0,08 |
| 0,06 | 0,15 | 0,25 | 0,04 | 0,11 | 0,18 | 0,02 | 0,06 | 0,10 | 0,01 | 0,04 | 0,08 |
| 0,06 | 0,16 | 0,27 | 0,03 | 0,09 | 0,16 | 0,02 | 0,06 | 0,11 | 0,01 | 0,04 | 0,08 |
| Total (U/L⁻¹) | | 1753 | Total(U/L⁻¹) | | 6419,70 | Total (U/L⁻¹) | | 422,80 | Total (U/L⁻¹) | | 642 |
| Desvio Padrão | | 123,30 | Desvio Padrão | | 208,80 | Desvio Padrão | | 55,80 | Desvio Padrão | | 26,7 |

Apêndice 9. Absorbâncias (420 nm) durante os processos de purificação de lacases, em diferentes diluições do caldo do fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, aplicado à equação 1 para determinação da atividade enzimática de lacase.

| Caldo bruto | | | Ultrafiltrado | | | Troca Iônica | | |
|---------------------------------|---------|----------|--------------------------------|---------|----------|---------------------------------|---------|----------|
| t1 (0') | t2 (5') | t3 (10') | t1 (0') | t2 (5') | t3 (10') | t1 (0') | t2 (5') | t3 (10') |
| 0,044 | 0,061 | 0,077 | 0,022 | 0,061 | 0,094 | 0,049 | 0,146 | 0,235 |
| 0,047 | 0,066 | 0,085 | 0,023 | 0,059 | 0,096 | 0,053 | 0,142 | 0,235 |
| | | | 0,021 | 0,056 | 0,094 | 0,045 | 0,130 | 0,227 |
| Total (U/L⁻¹) | | 1,1 | Total(U/L⁻¹) | | 33,6 | Total (U/L⁻¹) | | 85 |
| Desvio Padrão | | 0,16 | Desvio Padrão | | 0,26 | Desvio Padrão | | 1 |