



Efeito do cobre na atividade de lacase e na descoloração de Remazol Brilliant Blue R por extrato de *Panus strigellus* cultivado em meios com frutos amazônicos

Ítala Freire de Araújo¹, Ruby Vargas-Isla², Nomia Kazue Ishikawa³, José Renato Pereira Cavallazzi⁴

Resumo

Os fungos degradadores de madeira são os únicos organismos capazes de mineralizar a lignina por conta de enzimas oxidativas inespecíficas como a lacase. Por oxidarem uma ampla gama de substratos, tais enzimas são utilizadas em sistemas de biorremediação objetivando a degradação de substâncias tóxicas, como corantes industriais. Numa tentativa de aumentar a síntese de enzimas por um mesmo isolado, diferentes substratos são empregados bem como certos íons metálicos, como o cobre, são adicionados. O basidiomiceto *Panus strigellus* (Berk.) Overh. é encontrado na Amazônia e produz lacase como sua principal enzima ligninolítica. O objetivo deste estudo foi cultivar *P. strigellus* em meio líquido preparado à base de pupunha, tucumã e batata por 10 e 20 dias e utilizar seu extrato para determinar a atividade de lacase e sua capacidade de descolorir o corante têxtil Remazol Brilliant Blue R (RBBR) com ou sem a adição de sulfato de cobre. *P. strigellus* foi capaz de crescer em todos os meios, principalmente naqueles à base de batata e pupunha. A atividade de lacase foi maior aos 20 dias no extrato dos meios com batata e pupunha independentemente da adição de sulfato de cobre, atingindo valor máximo de 36,3 UI/L no meio com pupunha. A maior descoloração de RBBR ocorreu utilizando extrato dos meios com pupunha (6,46%) e tucumã (6,07%) aos 10 dias de cultivo sem adição de cobre. A descoloração de RBBR por extrato de *P. strigellus* provavelmente conta com a participação de outras enzimas além da lacase.

Palavras-Chave: *Panus strigellus*, lacase, corantes industriais, biorremediação, Amazônia.

Effect of copper on laccase activity and Remazol Brilliant Blue R discoloration by *Panus strigellus* extract cultivated in media made from Amazon fruits. Degrading wood fungi are the only organisms capable of mineralizing lignin thanks to unspecific enzymes like laccase. For being capable of oxidizing a broad range of substrates, such enzymes are used in bioremediation systems aiming to degrade toxic substances like industrial dyes. In an attempt to increase enzyme synthesis by a specific isolate several substrates may be used as well as certain metallic ions like copper are added to the culture media. The

¹ Discente de Ciências Biológicas / UFAM italafreire09@gmail.com

² – Bolsista DTI / INPA rubyvar9@gmail.com

³ Pesquisadora INPA noemia@inpa.gov.br

⁴ Professor do Instituto de Ciências Biológicas / UFAM cavallazzi@ufam.edu.br



basidiomycete *P. strigellus* (Berk.) Overh. is found in Amazon region and produces laccase as its main ligninolytic enzyme. The aim of this study was to cultivate *P. strigellus* in liquid media which contained pupunha, tucumã and potato by 10 and 20 days and then use the extract to determine laccase activity and its capacity to decolorize the textile dye Remazol Brilliant Blue R (RBBR) with and without copper sulfate addition. *P. strigellus* was able to grow in all media, especially those with potato and pupunha. Laccase activity was higher at 20 days cultivation with potato and pupunha extracts irrespectively of copper sulfate addition, reaching 36,3 UI/L with pupunha medium extract. The highest RBBR discoloration was achieved using pupunha (6,46%) and tucumã (6,07%) media extracts at 10 days cultivation. The *P. strigellus* isolate used in this study showed potential to be used in bioremediation systems. RBBR discoloration by *P. strigellus* extract is likely to be performed by other enzymes besides laccase.

Keywords: *Panus strigellus*, laccase, industrial dyes, biorremediation, Amazon.

Introdução

A lignina é uma substância encontrada nas fibras vegetais e considerada de difícil degradação devido à sua estrutura química única. Estudos pioneiros de Freudenberg (1956) e Adler (1977) esclareceram que sua formação se dá pela copolimerização oxidativa ao acaso de três principais compostos precursores, os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico que se combinam em diferentes proporções a depender da parte morfológica da planta. O resultado deste processo é a formação de uma substância complexa composta por anéis aromáticos ligados fortemente entre si por ligações covalentes. Tal estrutura torna a lignina um composto recalcitrante que se acumula no solo e contribui de forma importante não apenas para sua estabilidade e estrutura, mas também para sua fertilidade, como, por exemplo, na formação do húmus (Ponge, 2013; Frouz, 2018).

Os fungos de podridão branca são um grupo de micro-organismos considerados os únicos capazes de

degradar a lignina até CO₂ e H₂O (Martinez, 2002) utilizando seu sistema enzimático composto principalmente por lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase (Schmidt-Dannert, 2016). Estas enzimas são caracterizadas pela sua inespecificidade, ou seja, oxidam uma ampla gama de diferentes ligações presentes na lignina (Field et al., 1993; Thilakaratne et al. 2016), o que permite a mineralização deste composto. Paralelamente, outras enzimas também sintetizadas por estes fungos fornecem radicais livres e intermediários que facilitam a degradação desta substância (Manavalan et al., 2015).

Tais características evidenciam o potencial de utilização do complexo enzimático ligninolítico dos fungos de podridão branca em sistemas de biorremediação. Compostos tóxicos tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), DDT, TNT, tricloroetileno, pentaclorofenol, entre outros, são comprovadamente degradados por enzimas sintetizadas por espécies deste grupo de micro-organismos (Gao et al.,



2010; Mir-Tutusaus et al., 2018). Corantes artificiais, especialmente aqueles empregados em processos de indústrias têxteis, como *Remazol Brilliant Blue R* (RBBR), são corriqueiramente utilizados em ensaios visando a estimar o potencial do fungo para utilização em sistemas de biorremediação, uma vez que sua capacidade de degradar tais substâncias está diretamente relacionada ao seu complexo enzimático ligninolítico (Tavares et al., 2020; Wesenberg et al., 2003). Sendo assim, há uma busca permanente por isolados capazes de sintetizar estas enzimas em quantidades cada vez maiores.

Paralelamente à procura por novos isolados fúngicos, é possível maximizar a produção dessas enzimas em um mesmo isolado, uma vez que a síntese enzimática e a consequente capacidade de degradação de compostos tóxicos dependem do material ligninocelulósico utilizado no cultivo do fungo (Elisashvili et al. 2008), bem como de outros fatores ambientais (Almeida et al., 2018). A utilização de substratos alternativos, como resíduos agrícolas, para o cultivo de fungos de podridão branca é interessante pelo baixo custo ao mesmo tempo em que diminui o impacto ambiental que seria causado pelo seu eventual descarte. No entanto, diferentes resíduos influenciam a síntese enzimática de diferentes maneiras devido às peculiaridades nas suas composições, especialmente em relação à concentração de nitrogênio, carboidratos e outros nutrientes e compostos (Almeida et al., 2018; Tavares et al., 2020). Íons metálicos adicionados ao meio de cultura também podem afetar a síntese dessas enzimas. A lacase, por exemplo, possui quatro átomos de cobre no seu sítio

catalítico, o que torna este metal imprescindível para o perfeito funcionamento desta enzima (Martani et al., 2017, Cardoso et al., 2018) além de estar envolvido na regulação da sua expressão genética (Piscitelli et al., 2011).

Panus strigellus (Berk.) Overh. (= *Lentinus strigellus* Berk.) é um basidiomiceto degradador de madeira encontrado na Amazônia brasileira e em outros países do continente americano (Vargas-Isla et al., 2015). Estudos demonstram que este fungo é capaz de produzir substâncias de interesse medicinal (Julca-Canto et al., 2016) bem como apresenta atividade antimicrobiana (Vásquez et al., 2018). Esta espécie sintetiza lacase como sua principal enzima ligninolítica e sua capacidade de degradar corantes e crescer em resíduos agrícolas têm sido observada (Gomes et al, 2009; Cardoso et al, 2018). Nesse sentido, a utilização de substratos regionais bem como de cobre para o seu cultivo poderia aumentar a produção de lacase por esta espécie, bem como forneceria importantes informações sobre sua fisiologia. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi adicionar cobre ao extrato enzimático bruto de *P. strigellus* cultivado em meio de cultura líquido com pupunha e tucumã e utilizá-lo para determinar tanto a sua atividade de lacase bem como a sua capacidade de descolorir RBBR.

Material e métodos

Isolado fúngico

O isolado INPACM1464 de *P. strigellus* utilizado neste trabalho foi obtido em 31/07/2006 a partir de madeira em decomposição no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - Campus III (INPA; 3°5'31.34"S 59°59'36.535"W), localizado na



região de Manaus (AM). Este material foi identificado pelas características morfológicas e moleculares (Vargas-Isla et al., 2015). Basidiocarpos foram coletados, acondicionados em recipientes e levados para isolamento da colônia micelial em laboratório. No laboratório, fragmentos do contexto dos basidiocarpos foram depositados em placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA), mantidos a 35 °C durante 5 dias e após esse período foram repicados até a obtenção de cultura pura. A cultura estoque foi mantida através de sucessivas repicagens sempre que necessário em meio BDA e armazenado em refrigerador (5 °C).

Espécies vegetais

Foram utilizados neste projeto os frutos das espécies *Bactris gasipaes* Kunth (pupunheira) e *Astrocaryum aculeatum* G. Mey. (tucumanzeiro). Os frutos foram adquiridos em mercados e feiras da cidade de Manaus e armazenados em laboratório a 5 °C até sua utilização. Tubérculos de *Solanum tuberosum* L. (batata) foram utilizados para o tratamento controle.

Indicadores, corante e fonte de cobre

Foram utilizados dois indicadores de atividade ligninolítica, o ácido tânico (Vetec) e o guaiacol (Sigma; Tabela 1), e um corante da classe das antraquinonas: Remazol Brilliant Blue R (RBBR; Sigma). O íon Cu^{2+} foi adicionado na forma de sulfato de cobre na concentração de 1mM.

Tabela 1. Nome, peso molecular e fórmula molecular de compostos utilizados nos ensaios.

Composto	Peso molecular	Fórmula molecular
Ácido tânico	1.701,2	$\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_4$
Guaiacol	124,1	$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$
RBBR	626,5	$\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_{11}\text{S}_3$
Sulfato de cobre	159,6	CuSO_4

Avaliação quantitativa da produção de lacase

O isolado foi cultivado em triplicata em placas de Petri com meio ágar extrato de malte (AEM) 2% pH 5,0 contendo CuSO_4 (250 μM) e $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,5g/L) e suplementado separadamente com ácido tânico (5g/L) e guaiacol (500ppm) e incubados a 25 °C. O aparecimento de um halo de coloração marrom ou vermelha nos meios contendo ácido tânico e guaiacol, respectivamente, é considerado indicativo de atividade de lacase.

Preparo dos meios de cultura líquidos

Os meios de cultura foram preparados com 250g/L de cada um dos ingredientes de cada uma das espécies utilizadas. Os ingredientes foram cozidos durante 15 minutos e apenas o caldo (sem filtração) foi utilizado para fazer o meio de cultura. Ao caldo foram adicionados CuSO_4 (250 μM) e $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,5g/L) e então o volume foi distribuído em frascos Erlenmeyer de 200mL (100mL por frasco) e esterilizado em autoclave.



Cultivo em meio líquido visando à obtenção do extrato enzimático

O isolado foi repicado para placas de Petri contendo meio BDA pH 5,0 e incubados a 25 °C. Após cinco dias de incubação foram retirados discos de 8mm de diâmetro de meio de cultura contendo micélio das bordas das colônias e transferidos para 18 frascos Erlenmeyer (200mL, um disco por frasco) contendo 100mL de cada meio descrito acima, com seis repetições para cada meio. Após 10 e 20 dias de cultivo o extrato de três frascos de cada meio foi coletado e o micélio retirado para a determinação da massa seca. Os extratos enzimáticos foram mantidos congelados até sua utilização, e o micélio foi seco em estufa para determinação da massa micelial seca.

Determinação da massa micelial seca

Após 10 e 20 dias de cultivo os micélios de três frascos de cada meio foram retirados para a determinação da massa micelial seca. Os micélios foram depositados em círculos e papel filtro previamente secados e pesados. Posteriormente, os discos de papel contendo micélios foram depositados em uma estufa de secagem, onde permaneceram por 24h a 105 °C. Após esse período, os discos, juntamente com o micélio seco foram pesados e da massa total foi subtraída a massa dos discos para então obter a massa micelial.

Descoloração de RBBR

A porcentagem de descoloração do RBBR foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Cavallazzi et al. (2019). A descoloração do RBBR foi monitorada em espectrofotômetro (592nm) durante 30 minutos em uma mistura de

reação contendo 600µL de extrato enzimático de cada um dos meios de cultura, 250µL de tampão acetato de sódio (pH 5,0; 0,1M), 100µL de solução do corante (200mg/L), e com 50µL de solução 1mM de sulfato de cobre. Nas amostras controle não foi adicionado sulfato de cobre e tampão foi utilizado para completar o volume. A porcentagem de descoloração foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Descoloração (\%)} = 100 - \left(\frac{100 * ABSf}{ABSi} \right)$$

Em que:

ABSf = absorvância final

ABSi = absorvância inicial

Atividade de lacase

A atividade de fenoloxidasas do tipo lacase (FLAC) foi determinado pela oxidação de 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato, ABTS) de acordo com Buswell et al. (1995). A mistura de reação (1mL) continha 600µL de extrato enzimático, 250µL de tampão acetato de sódio (pH 5,0; 100mM), 100µL de solução de ABTS (1mM) e 50µL de solução de sulfato de cobre (1mM). Nas amostras controle não houve adição de sulfato de cobre. A oxidação foi determinada pelo aumento na absorvância a 420nm ($\epsilon_{420} = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1µmol de ABTS por minuto.

Resultados e discussão

Após cinco dias de cultivo em meios de cultura contendo guaiacol e ácido tânico como indicadores, o isolado de *P. strigellus* utilizado neste estudo produziu halos vermelhos e



marrons, respectivamente, em torno de suas colônias, indicando atividade de lacase. A utilização de indicadores é uma forma rápida e prática para a determinação qualitativa de lacases, especialmente em *screenings* nos quais uma grande quantidade de isolados é analisada. O ácido tânico é um composto tradicionalmente utilizado para este fim (Harkin e Obst, 1973), e a presença de um halo marrom ao redor da colônia quando este é adicionado ao meio de cultura evidencia a produção de lacases. Com o passar do tempo o ácido tânico e outros compostos naturais vêm sendo substituídos por compostos fenólicos sintéticos, como o guaiacol (Nishida et al, 1988). Neste caso, um halo vermelho indica uma reação positiva na medida em que o composto é oxidado por lacases sintetizadas pelo organismo cultivado em meio de cultura.

Apesar de ser um dos mais tradicionais indicadores para a detecção rápida de micro-organismos produtores de lacases, o ácido tânico por vezes se mostra menos sensível do que o guaiacol, com o risco de não produzir um halo mesmo que esta enzima seja sintetizada, gerando falsos negativos. Em um estudo utilizando ácido tânico e guaiacol, Kiiskinen et al. (2004) concluíram que a utilização deste permitiu a detecção de um número maior de produtores de lacase.

O isolado utilizado neste estudo cresceu em todos os meios de culturas testados (Figura 1). Aos 10 dias após a inoculação já se mostrava evidente a maior facilidade do fungo em crescer no meio com

batata e pupunha em comparação ao meio com tucumã. Neste período, a massa micelial seca do fungo cultivado em batata era maior que o triplo daquela em meio com tucumã, e em relação à massa micelial seca do meio com pupunha esse valor era quase quatro vezes maior (Figura 1). Ao final de 20 dias de cultivo a massa micelial seca do fungo cultivado em batata e pupunha era maior que o quádruplo daquela produzida pelo fungo em meio com tucumã.

Ensaio prévios (dados não publicados) conduzidos no Laboratório de Microbiologia Ambiental da UFAM já indicavam a dificuldade de fungos degradadores de madeira em crescer em meios de cultura contendo tucumã. A razão para tal comportamento ainda está por ser elucidada, mas pode estar relacionada à grande quantidade de lipídeos presente nesta fruta, visto que o substrato natural destes organismos (madeira em decomposição) não apresenta esse composto em quantidades significativas.

A atividade de lacase foi maior no extrato bruto de 20 dias do que no de 10 dias em todos os tratamentos (Figura 2), mesmo, como no caso do tucumã, sem diferença estatisticamente significativa. No entanto, enquanto nos meios com batata e pupunha foi observado um crescimento significativo da atividade de lacase no extrato de 20 dias quando comparado ao extrato de 10 dias, nos tratamentos com extrato do fungo cultivado com tucumã o crescimento foi discreto, beirando à estabilidade (Figura 2).

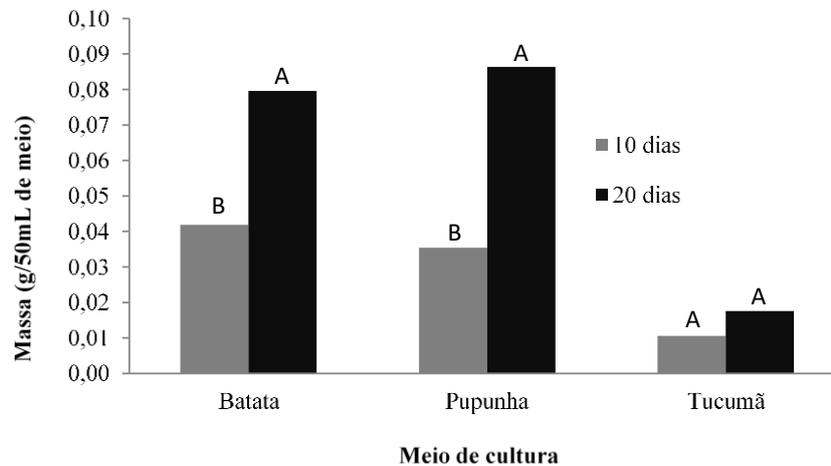
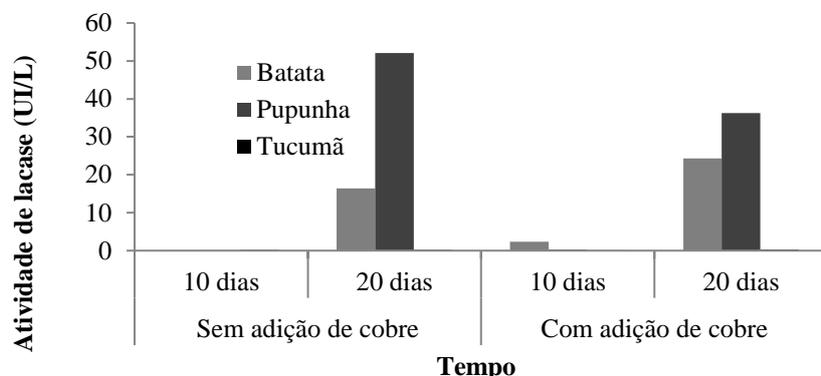


Figura 1. Massa micelial seca de *Panus strigellus* cultivado por 10 e 20 dias em meios de cultura com diferentes substratos. Médias indicadas pela mesma letra maiúscula em um mesmo tratamento (Batata, Pupunha ou Tucumã) não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Diferentemente do tempo de cultivo, a adição de cobre não exerceu um efeito significativo na atividade de lacase (Figura 2). O cobre é importante para o funcionamento das lacases, pois esta enzima apresenta quatro átomos deste metal associados a diferentes sítios responsáveis pela coloração e pela atividade catalítica (Senthivelan et al., 2016). Para além do seu papel na estrutura e na catálise da enzima, o cobre também se mostra um eficiente indutor, ou seja, sua presença no meio de cultivo afeta a expressão de lacases em fungos (Saparrat et al., 2002). No entanto, seu efeito varia com sua concentração no meio de cultivo e também é marcadamente influenciado pela concentração e fonte de nitrogênio (Piscitelli et al., 2011). Em um estudo com *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler cultivado em meio mineral (Cavallazzi, et al., 2005), a maior atividade de lacase foi obtida em meio com baixa concentração de nitrogênio e 250 μ M de

cobre. Cardoso et al. (2018) cultivaram *P. strigellus* em meio de cultura contendo bagaço de cana-de-açúcar e obtiveram os maiores valores no tratamento sem adição de nitrogênio e com 200 μ M de cobre. No presente estudo não houve controle da concentração de nitrogênio nos meios de cultura, ou seja, o nitrogênio presente foi aquele fornecido pelos substratos utilizados (batata, pupunha ou tucumã). É sabido que a expressão da enzima é diretamente dependente do tipo de material lignocelulósico (Elisashvili et al., 2008, Tavares et al., 2020), dessa forma os resultados podem variar significativamente quando diferentes substratos são utilizados, pois diferentes substratos apresentam diferentes concentrações não apenas de nitrogênio, mas também de outros nutrientes e açúcares, o que pode interferir na produção de lacase por fungos (Almeida et al., 2018).



Substrato	Atividade de lacase (UI/L)			
	Sem adição de cobre		Com adição de cobre	
	10 dias	20 dias	10 dias	20 dias
Batata	0,057 bB	16,38 bA	2,31 aB	24,3 aA
Pupunha	0,021 bB	52,11 aA	0,28 bB	36,3 aA
Tucumã	0,13 aA	0,18 cA	0,07 bA	0,23 bA

Figura 2. Atividade de lacase de extrato de *Panus strigellus* cultivado por 10 e 20 dias em meios de cultura com diferentes substratos adicionados ou não de cobre. Médias indicadas pela mesma letra minúscula em uma coluna e médias indicadas pela mesma letra maiúscula em uma linha não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

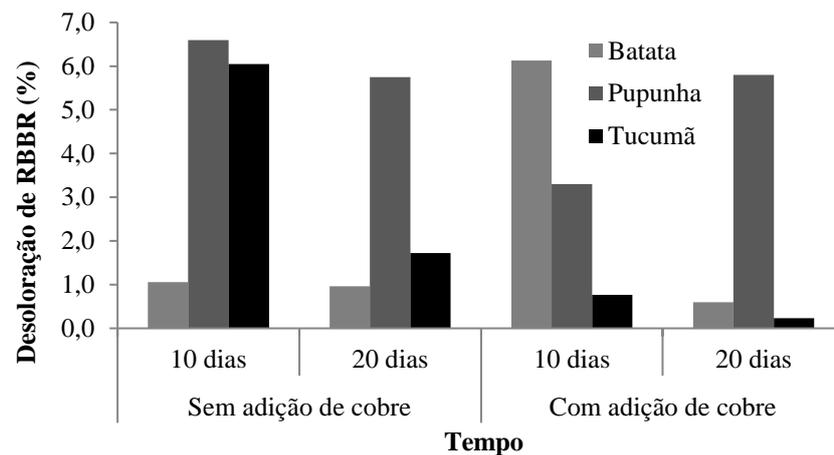
Todos os extratos enzimáticos de *P. strigellus* utilizados neste estudo e adicionados ou não de cobre foram capazes de descolorir, em alguma extensão, a solução de RBBR (Figura 3). O extrato do meio de cultura com pupunha foi o que propiciou a maior porcentagem de descoloração em todos os tratamentos, com exceção do tratamento de 10 dias adicionado de cobre. Neste tratamento, o extrato com batata atingiu uma descoloração de quase 6%, um valor bem mais alto do que todos os outros tratamentos com esse mesmo substrato. O extrato com tucumã, por sua vez, demonstrou pouca capacidade de descolorir a solução de RBBR, com exceção do tratamento de 10 dias sem cobre, o qual, juntamente com o extrato

contendo pupunha, obteve o maior valor de descoloração.

Em alguns tratamentos houve significativa descoloração de RBBR mesmo com pouca atividade de lacase (Figuras 2 e 3), o que pode ser explicado pelo fato de que outras enzimas ligninolíticas possam ter sido sintetizadas e, juntamente com a lacase, atuado na degradação de RBBR. Isso ocorre porque diferentes substratos naturais apresentam diferentes concentrações de compostos fenólicos que, por sua vez, podem induzir ou inibir a atividade de lacases ou outras enzimas relacionadas à degradação da lignina (Elisashvili et al., 2017). Como a atividade e a consequente atuação na degradação de substâncias de diferentes enzimas ligninolíticas está

diretamente relacionada a vários fatores, como presença de indutores, razão C/N, tipo de fermentação, entre outros, investigações específicas

deveriam ser realizadas para a detecção de cada enzima, bem como de fatores que afetam suas atividades.



Substrato	Sem adição de cobre		Com adição de cobre	
	10 dias	20 dias	10 dias	20 dias
Batata	1,09 bA	0,99 bA	5,94 aA	0,59 bB
Pupunha	6,46 aA	5,77 aA	3,30 bA	5,70 aA
Tucumã	6,07 aA	1,63 bB	0,77 cA	0,49 bA

Figura 3. Descoloração de RBBR por extrato de *Panus strigellus* cultivado por 10 e 20 dias em meios de cultura com diferentes substratos adicionados ou não de cobre. Médias indicadas pela mesma letra minúscula em uma coluna e médias indicadas pela mesma letra maiúscula em uma linha não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Conclusões

O presente estudo se propôs a investigar a influência de diferentes substratos naturais e do íon cobre no crescimento de *Panus strigellus* cultivado em meio líquido, bem como na atividade de lacase e na descoloração de RBBR pelo extrato bruto deste fungo após 10 e 20 dias de cultivo. *Panus strigellus* cresceu em todos os meios de cultura utilizados neste estudo e o fator tempo exerceu significativo efeito na atividade de lacase, especialmente nos meios

contendo batata e pupunha, ao contrário do íon cobre. Todos os extratos se mostraram capazes de ocasionar algum grau de descoloração do RBBR, mas existe a possibilidade de outras enzimas terem atuado neste processo, haja vista a substância ter sido degradada por extratos com baixíssima atividade de lacase. O extrato do fungo cultivado em meio com pupunha foi o que apresentou maior atividade de lacase, e na maioria dos casos o extrato do fungo cultivado em tucumã



Ciências Biológicas

proporcionou a maior porcentagem de descoloração. O isolado IN-PACM1464 de *P. strigellus* utilizado neste estudo demonstrou potencial para utilização em processos de biorremediação. Estudos complementares se fazem necessários para a elucidação da fisiologia deste fungo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à UFAM, ao INPA, à FAPEAM e ao CNPq pelo apoio.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

ADLER, E. Lignin chemistry - past, present and future. **Wood Science and Technology**, v. 11, p. 169-218, 1977.

ALMEIDA, P. H.; OLIVEIRA, A. C. C. D.; SOUZA, G. D. P.; FRIEDRICH, J. C. LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; VALLE, J. S. D. Decolorization of remazol brilliant blue R with laccase from *Lentinus citrinus* grown in agro-industrial by-products. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 4, p. 3463-3473, 2018.

BUSWELL, J. A., CAI, Y. J., CHANG, S. T. Effect of nutrient and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 81-88, 1995.

CARDOSO, B. K.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N.; VALLE, J. S. *Panus strigellus* laccase decolorizes anthraquinone, azo and triphenylmethane dyes. **Biocatalysis and**

Agricultural Biotechnology, v. 16, p. 558-563, 2018.

CAVALLAZZI, J. R. P.; KASUYA, M. C.; SOARES, M. A. Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 36, p. 383-387, 2005.

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

FIELD, J. A.; DE JONG, E.; FEIJOO-COSTA, G.; DE BONT, J. A. M. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. **Trends in Biotechnology**, v. 11, p. 44-49, 1993.

FREUDENBERG, K. 1956. Lignin and natural polymers. **Angewandte Chemie**, v. 68, p. 84-92, 1956.

FROUZ, J. Effects of soil macro-and mesofauna on litter decomposition and soil organic matter stabilization. **Geoderma**, v. 332, p. 161 – 172, 2018.

GAO, D.; DU, L.; YANG, J.; WU, W. M.; LI-ANG, H. 2010. A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, p. 70-77, 2010.

GOMES, E.; AGUIAR, A. P.; CARVALHO, C. C.; BONFÁ, M. R. B.; SILVA, R.; BOSCOLO, M. Ligninases production by basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 31-39, 2009.

HARKIN, J. M.; OBST, J. R. Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. **Experientia**, v. 29, p. 381-387, 1973.



Ciências Biológicas

JULCA-CANTO, M.; AGUILAR-PEREZ, M. M.; RIOS, N.; SOUSA, J. P. B.; CUBILLA-RIOS, L. 2016. Additional new natural products produced by *Lentinus strigellus*: a biotechnological approach. **Tetrahedron Letters**, v. 57, p. 650–653, 2016.

KIISKINEN, L.-L.; RÄTTÖ, M.; KRUUS, K. Screening for novel laccase-producing microbes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 640-646, 2004.

MANAVALAN, T.; MANAVALAN, A; HEESE, K. Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. **Current Microbiology**, v. 70, p. 485-498, 2015.

MARTANI, F.; BELTRAMETTI, F.; PORRO, D.; BRANDUARDI, P.; LOTTI, M. The importance of fermentative conditions for the biotechnological production of lignin modifying enzymes from white-rot fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 13, 2017.

MARTINEZ, A. T. Molecular biology and structure function of lignin degrading heme peroxidases. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 30, p. 425-444, 2002.

MIR-TUTUSAUS, J. A.; BACCAR, R.; CAMINAL, G.; SARRÀ, M. Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review. **Water Research**, v. 138, p. 137 – 151, 2018.

NISHIDA, T.; YOSHINORI, K.; MIMURA, A.; TAKAHARA, Y. Lignin biodegradation by wood-rotting fungi I. Screening of lignin-degrading fungi. **Mkuzai Gakkaishi**, v. 34, p. 530-536, 1988.

PISCITELLI, A.; GIARDINA, P.; LETTERA, V.; PEZZELLA, C.; SANNIA, G.; FARACO, V. 2011. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. **Current Genomics**, v. 12, p. 104-112, 2011.

PONGE, J.-F. Plant–soil feedbacks mediated by humus forms: A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 57, p. 1048-1060, 2013.

SAPARRAT, M. C. N.; GUILLÉN, F.; ARAMBARRI, A. M.; MARTÍNEZ, A. T.; MARTÍNEZ, M. J. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1534-1540, 2002.

SCHMIDT-DANNERT, C. Biocatalytic portfolio of Basidiomycota. **Current Opinion in Current Biology**, v. 31, p. 40-49, 2016.

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, p. 19-38, 2016.

TAVARES, M. F.; AVELINO, K. V.; ARAÚJO, N. L.; MARIM, R. A.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; VALLE, J. S. Decolorization of azo and anthraquinone dyes by crude laccase produced by *Lentinus crinitus* in solid state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 99-106, 2020.

THILAKARATNE, R.; TESSONNIER, J.-P.; BROWN, R. C. Conversion of methoxy and hydroxyl functionalities of phenolic monomers over zeolites. **Green Chemistry**, v. 18(7), p. 2231 – 2239, 2016.

VARGAS-ISLA, R.; CAPELARI, M; MENOLLI, N. JR.; NAGASAWA, E.; TOKIMOTO, K.; ISHIKAWA, N. K. 2015. Relationship between *Panus lecomtei* and *P. strigellus* inferred from their morphological, molecular and biological characteristics. **Mycoscience**, v. 56, p. 561-571, 2015.

VÁSQUEZ, R.; RIOS, N.; SOLANO, G.; CUBILLA-RIOS, L., 2018. Lentinoids A–D, new natural products isolated from *Lentinus strigellus*. **Molecules**, v. 23, p. 773, 2018.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 161-187, 2003.