



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCENCIAS

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

SAMANTHA SEEHAGEN WANDERLEY

**ANÁLISE DO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR
AGARICOMYCETES SOB A INFLUÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS**

Recife

2023

SAMANTHA SEEHAGEN WANDERLEY

**Análise do crescimento e produção enzimática por
Agaricomycetes sob a influência de nanopartículas**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Coordenação do curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial à obtenção do título
em Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Tatiana Baptista Gibertoni

Coorientador (a): Renato Lucio Mendes Alvarenga

Recife

2023

SAMANTHA SEEHAGEN WANDERLEY

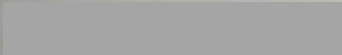
**ANÁLISE DO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR
AGARICOMYCETES SOB A INFLUÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Coordenação do
curso de Bacharelado em Ciências
Biológicas da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito
parcial à obtenção do título em
Bacharel em Ciências Biológicas.

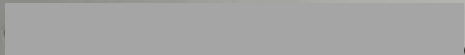
Aprovada em: 18 / 04 / 23

Nota: 9,75

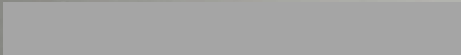
COMISSÃO EXAMINADORA



Profª. Dra. Tatiana Baptista Gibertoni / UFPE



Dra. Valéria Ferreira da Silva / Secretaria Estadual de Educação



Dr. Erik Jonne Vieira de Melo / UFPE

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Seehagen Wanderley, Samantha.

ANÁLISE DO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR
AGARICOMYCETES SOB A INFLUÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS /
Samantha Seehagen Wanderley. - Recife, 2023.

49 : il.

Orientador(a): Tatiana Baptista Gibertoni

Coorientador(a): Renato Lucio Mendes Alvarenga

(Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências,
, 2023.

Inclui referências, anexos.

1. Agaricomycetes. 2. Biodegradação. 3. Polifenoloxidasas. 4. Nanopartículas.
I. Baptista Gibertoni, Tatiana. (Orientação). II. Lucio Mendes Alvarenga, Renato
. (Coorientação). III. Título.

570 CDD (22.ed.)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, aos meus tios e minhas tias de coração, pois sem eles não teria recebido todo o suporte e privilégio de cursar a graduação que desejava. Especialmente meu falecido pai, que se foi repentinamente neste trajeto e que continua presente sempre que alcanço um novo objetivo.

Agradeço à minha orientadora, que acolheu uma Samantha perdida desde o início da graduação e me levou a dar os primeiros passos dentro da vida acadêmica.

Agradeço ao meu coorientador, que com toda a paciência do mundo suportou as minhas doidices e me acompanhou nos últimos momentos dessa jornada, o melhor apoio e companhia em laboratório que eu poderia ter tido.

Agradeço aos meus amigos, Débora, Vitória, Rafael, Yasmim e Nicholas, com quem tanto aprendi dentro da graduação e que me ajudaram a crescer imensamente como pessoa.

Agradeço à Pedro Ximenes, meu melhor amigo, quem mais me aturou, acompanhou e ajudou durante este trajeto. Espero tê-lo em minha vida até o fim dos meus dias.

Agradeço à minha psicóloga e grande mestra Regina, que também me traz ensinamentos e perseverança nesta longa caminhada que está por vir.

Agradeço também à Fernanda, Joicy e Dilliane por todo o apoio e todos os momentos compartilhados em tantas vidas.

Agradeço a todos os meus amigos e aqueles que de algum modo, em algum momento, pensaram em mim e me deram apoio nos momentos mais difíceis e necessários.

Por fim, mas não menos importante, agradeço imensamente a universidade, os professores com quem mais aprendi, e a banca, por aceitar estar presente nesta etapa final.

RESUMO

Agaricomycetes é uma classe de fungos degradadores da madeira conhecidos por sua produção enzimática que vem sendo estudada para diversos fins biotecnológicos, como por exemplo a biorremediação de ambientes contaminados por compostos recalcitrantes e xenobióticos por lacases e fenoloxidasas. Portanto, o presente estudo teve em foco analisar e comparar a capacidade de produção enzimática de isolados de Agaricomycetes sob a influência de nanopartículas baseadas em carbono e nitrogênio, vinculadas a metais que muitas vezes fazem parte dos sítios catalíticos de cofatores, responsáveis por atuar de forma conjunta a grupos enzimáticos. Os isolados de Agaricomycetes foram avaliados segundo o seu crescimento e produção de tanases, amilases e celulasas, mediante os testes de assimilação e bioestimulação realizados em meio sólido, e de lacases em meio líquido, ambos os meios adicionados com nanopartículas. Foi possível detectar a produção de tanases, celulasas e amilases para *Schizophyllum sp.*, *Trametes sp.*, *Pycnoporus sp.* e *Psilocybe sp.* Foi observada atividade reduzida de lacases por *Trametes sp.*, único isolado a apresentar tal atividade. Não foram observados resultados especialmente promissores utilizando os isolados testados sob influência de nanopartículas.

Palavras-chave: Agaricomycetes, biodegradação, polifenoloxidasas, nanopartículas.

ABSTRACT

Agaricomycetes is a class of wood-decay fungi known for their enzymatic production that have been studied for various biotechnological purposes, such as the bioremediation of environments contaminated by recalcitrant and xenobiotic compounds by laccases and phenoloxidases. Therefore, the present study focused on the analysis and comparison of the enzyme production capacity of Agaricomycetes isolates under the influence of carbon and nitrogen based nanoparticles, bound to metals that are often part of the catalytic sites of cofactors, responsible for working with enzymatic groups. The Agaricomycetes isolates were evaluated according to their growth and production of tannases, amylases and cellulases, through assimilation and biostimulation tests carried out in solid medium, and laccases in liquid medium, both mediums added with nanoparticles. It was possible to detect the production of tannases, cellulases and amylases for *Schizophyllum sp.*, *Trametes sp.*, *Pycnoporus sp.* and *Psilocybe sp.* Reduced activity of laccase was observed by *Trametes sp.*, the only isolate to show such activity. No particularly promising results were observed using the tested isolates under the influence of nanoparticles.

Keywords: Agaricomycetes, biodegradation, polyphenoloxidases, nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS

Figura 1 – Estrutura básica da lignina	14
Figura 2 – Estrutura da lacase produzida por <i>Trametes versicolor</i>	15
Figura 3 – Estrutura tridimensional da lignina peroxidase produzida por <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	16
Figura 4 – Estrutura tridimensional da manganês peroxidase produzida por <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	17
Figura 5 – Estrutura tridimensional da peroxidase versátil produzida por <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	18
Figura 6 – Fórmula do cálculo de atividade enzimática da lacase	25
Figura 7 – Teste de bioassimilação	27
Figura 8 – Halos de crescimento em teste de bioassimilação meio NPP	30
Figura 9 – Halos de degradação do substrato em meio amido e CMC	31
Figura 10 – Teste de bioassimilação em meio amido acrescido de NP + Cu	32
Figura 11 – Teste de produção de tanases em triplica	34
Figura 12 – Teste de despigmentação dos tratamentos utilizando caldo glicosado	35

QUADROS

Quadro 1 – Espécies de Agaricomycetes selecionadas	21
Quadro 2 – Tratamentos contendo as diferentes combinações de nanopartículas	24

GRÁFICOS

Gráfico 1 – Halos de crescimento médio dos isolados em meios distintos	26
Gráfico 2 – Comparação entre halos médios de crescimento e halos médios de despigmentação em meio de amido	28
Gráfico 3 – Comparação entre halos médios de crescimento e halos médios de despigmentação em meio CMC	29
Gráfico 4 – Análise de produção de tanases	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1 OBJETIVOS	14
1.1 OBJETIVO GERAL	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS Específicos.....	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 AGARICOMYCETES E CAPACIDADE ENZIMÁTICA	15
3.2 GRUPOS ENZIMÁTICOS	16
3.2.1 Polifenoloxidasas	17
3.2.2 Peroxidasas	18
3.2.3 Hidrolases	20
3.3 NANOPARTÍCULAS	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 ISOLAMENTOS E PURIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE AGARICOMYCETES	23
4.2 ENSAIOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS	24
4.2.1 Bioassimilação	24
4.2.2 Bioestimulação.....	24
4.3 BIOESTIMULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE.....	25
4.3.1 Quantificação da atividade de lacase	26
5 RESULTADOS	28
5.1 BIOASSIMILAÇÃO.....	28
5.2 BIOESTIMULAÇÃO	30
5.2.1 Bioestimulação em BDA + Ácido-Tânico	35
5.2.2 Bioestimulação da lacase	37
6 DISCUSSÃO	38
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIAS.....	43

“Só depois da última árvore derrubada, do último rio poluído, do último peixe morto, o homem irá perceber que dinheiro não se come. ”(Alanis Obomsawin).

1 INTRODUÇÃO

O reino Fungi é constituído de organismos uni e pluricelulares, heterotróficos e eucariotos que apresentam alta capacidade degradativa. Atuam em uma ampla gama de substratos e desempenhando importante papel na ciclagem de nutrientes (Esposito; Azevedo, 2004). Os Agaricomycetes (filo Basidiomycota) são constituídos por fungos macroscópicos conhecidos popularmente como cogumelos e orelhas de pau e pela sua ampla capacidade de produção enzimática, responsável pela degradação de todos os polímeros que constituem a madeira, sendo eles a celulose, hemicelulose e a lignina, um dos polímeros mais abundantes na natureza e de difícil degradação (Hao; Mohnen, 2014).

A produção enzimática dos Agaricomycetes, como as oxidases, peroxidases e lacases, apresenta grande importância em aplicações industriais pela sua eficiência em degradar compostos orgânicos e fenólicos, bem como corantes antraquinônicos (Aguiar; Ferraz, 2011). Essa produção enzimática ligninolítica dos fungos de podridão branca, ou seja, capaz de degradar a lignina e celulose, é a responsável por um diferencial na capacidade de interagir com certos compostos específicos de substâncias recalcitrantes, atuando contra uma grande diversidade de estruturas fenólicas e complexas consideradas poluentes quando encontradas em excesso na natureza (Santana *et al.* 2017).

O descarte de corantes sintéticos na natureza é um exemplo de substâncias que, quando despejadas, modificam a atividade fotossintetizante dos organismos presentes em ambientes aquáticos, bem como o regime de solubilidade dos gases (Pereira *et al.* 2010). Nesse sentido, surge uma vasta quantidade de estudos em biotecnologia para testar a utilização de fungos e outros micro-organismos quanto à remoção de corantes poluentes e substâncias provenientes, por exemplo, de indústrias têxteis (Pointing 2001; Novotný *et al.* 2004; Rani *et al.* 2014).

No entanto, há poucos estudos que fazem o uso de espécies brasileiras para testes de degradação de corantes e outras substâncias xenobióticas (Machado *et al.* 2005; Cannon *et al.* 2018). Além disso, existem muitas espécies

que ainda não foram testadas quanto à sua capacidade ligninocelulolítica, tendo em vista a grande diversidade de biomas brasileiros e o potencial de uma riqueza ainda inexplorada (He *et al.* 2022).

1 OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o crescimento e produção enzimática ligninolítica de espécies selecionadas de Agaricomycetes coletados no Norte e Nordeste do Brasil sob influência de nanopartículas

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Avaliar o crescimento e capacidade de produção de tanases, amilases, celulasas e lacases pelos espécimes selecionados;

✓ Acompanhar a capacidade degradativa dos espécimes em meios distintos contendo nanopartículas associadas a diferentes metais;

✓ Verificar a estimulação da produção das enzimas na presença de nanopartículas associadas a diferentes metais;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

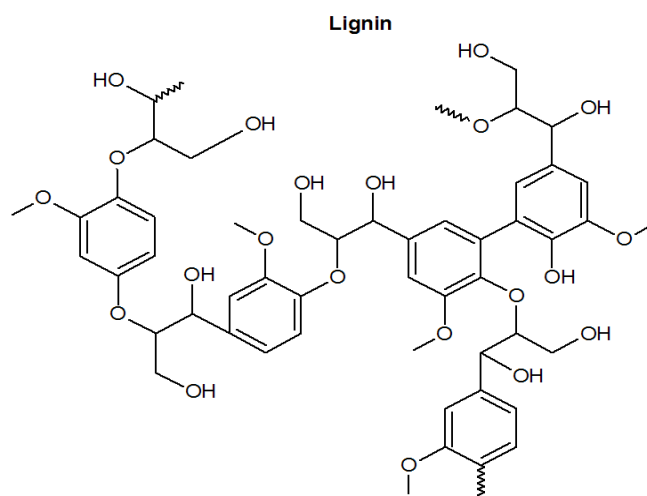
3.1 AGARICOMYCETES E CAPACIDADE ENZIMÁTICA

Os Agaricomycetes são uma classe pertencente ao filo Basidiomycota (reino Fungi). Apresentam cerca de 30.143 espécies distribuídas em 1.434 gêneros, 22 ordens, 128 famílias e 22 ordens (He *et al.* 2019). De modo geral, são espécies macroscópicas, popularmente conhecidas como cogumelos ou orelhas de pau (Shortle; Dudzik, 2012) e, em sua maioria, degradadores da madeira (Hibbett *et al.* 2007).

Neste grupo, se encontram os fungos conhecidos pelo seu papel em ecossistemas florestais, com importância no equilíbrio do carbono, formação do solo e reflorestamento devido a sua capacidade de degradar todos os componentes da parede celular das plantas (Shakhova; Volobuev, 2020). A depender do tipo de componente da parede celular degradado, esses fungos recebem os nomes de causadores de podridão branca, quando degradam celulose, hemicelulose e lignina, ou parda/marrom, quando degradam apenas celulose e hemicelulose. As espécies mais estudadas para fins biotecnológicos são as causadoras da podridão branca, respectivamente (Dashtban *et al.* 2010; Abdel-Hamid, 2013).

Consequentemente, contribuem imensamente para os ecossistemas ao participarem da importante ciclagem de nutrientes e decomposição de compostos de difícil degradação como a lignina (Figura 1), considerada uma das mais abundantes fontes de polímeros aromáticos encontrados na natureza (Yang, 2011; Stangerlin *et al.* 2013).

Figura 1 – Estrutura básica da lignina.



Fonte: Polymerdatabase (2022)

A lignina é um polímero responsável por conferir rigidez e resistência a ataques microbiológicos e físicos à madeira e, portanto, resistência à decomposição biológica. Ela atua como ligante entre as cadeias de celulose e hemicelulose, conferindo resistência mecânica e à perda de água às plantas (Coelho, 2007; Hao; Mohnen, 2014). A capacidade dos Agaricomycetes em degradar tal polímero complexo se deve à produção de enzimas ligninolíticas extracelulares, dentre elas as oxidases e peroxidases (Wong, 2009).

Este potencial enzimático, responsável pelas reações oxidativas sobre a lignina e produzido pelos Agaricomycetes, tem se mostrado de grande potencial não só na biorremediação ambiental para degradar compostos recalcitrantes e xenobióticos (Aguiar; Ferraz, 2011), mas também para variadas aplicações e fins biotecnológicos nas indústrias alimentícias e do papel, bem como aplicações orgânicas, médicas, farmacêuticas, cosméticas e de nanotecnologia (Maciel *et al.* 2010).

3.2 GRUPOS ENZIMÁTICOS

Como produtores de uma grande variedade de enzimas extracelulares, os fungos ligninolíticos produzem enzimas divididas em 4 grupos principais para a degradação da lignina. São elas as LiP (ligninases ou lignina peroxidases), MnP

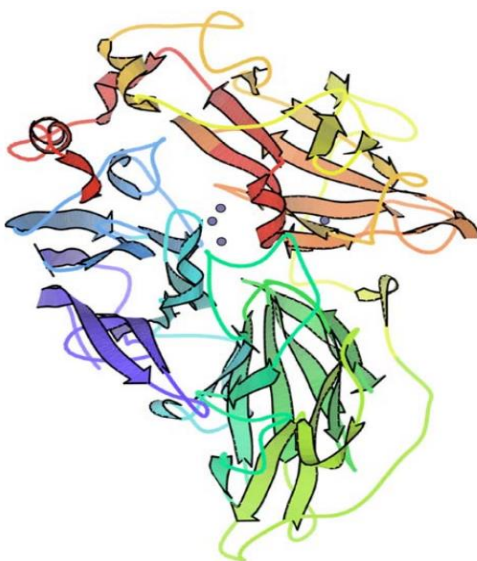
(manganês peroxidases), VP (peroxidases versáteis) e as lacases, também conhecidas como fenoloxidasas. Esses grupos atuam muitas vezes com a ação cooperativa de várias enzimas acessórias (Wong, 2009).

A degradação, como no caso da madeira, ocorre a partir da ligação dos grupos das enzimas funcionais com o devido substrato, causando a oxidação dos compostos aromáticos relacionados com a lignina (Labat, 2008; Oliveira, 2015). A alta capacidade das enzimas ligninolíticas também se deve a sua baixa especificidade, que permite a atuação sobre uma ampla gama de substâncias, compostos aromáticos, bem como, possivelmente, diversos tipos de xenobióticos e estruturas químicas recalcitrantes (Aguiar *et al.* 2010; Nengah *et al.* 2019).

3.2.1 Polifenoloxidasas

As polifenoloxidasas, pertencentes ao grupo das oxirredutases, são um grupo de enzimas responsáveis pela oxidação de compostos fenólicos que apresentam íons Cu^{2+} em seu sítio ativo, dentre elas, as lacases (Martinez; Whitaker, 1995., Figura 2). É sabido que as lacases produzidas por fungos apresentam capacidade oxidativa superior a de outros organismos, alta estabilidade molecular e consequentemente maior potencial redox, o que os tornam foco de estudo biotecnológico (Rodgers *et al.* 2009).

Figura 2 – Estrutura da lacase produzida por *Trametes versicolor*.



Fonte: Wong 2009.

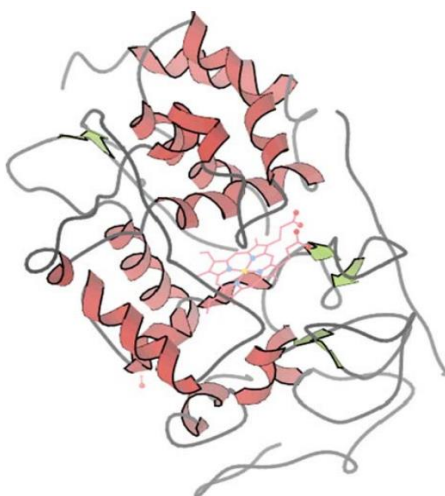
Essas enzimas realizam a oxidação de compostos fenólicos utilizando o oxigênio molecular como aceptor de elétrons e, portanto, diferente das peroxidases, não necessitam de cofatores para exercerem a sua atividade (Agrawal; Chaturvedi; Verma. 2018). Por conta da baixa especificidade das lacases, atuam em uma ampla gama de substratos e tem atuação em processos biotecnológicos de diferentes setores industriais, como de impressão, tingimento e como oxidantes nas indústrias papéis (Polizeli; Rai, 2014; Zheng *et al.* 2016).

3.2.2 Peroxidases

As peroxidases extracelulares fúngicas fazem parte da família das hemoproteínas, também conhecidas como a classe II das heme-peroxidases microbianas e o primeiro grupo de proteínas produzidas e expressas durante a degradação da lignina (Hofrichter *et al.* 2010). As LiP, MnP e VP requerem a presença de peróxidos, principalmente o peróxido de hidrogênio, utilizado como co-substrato para catalisar a oxidação dos substratos correspondentes (Heinzkill *et al.* 1998).

A LiP (Figura 3) tem papel fundamental na degradação da parede celular da lignina, com capacidade para catalisar substratos aromáticos fenólicos e não fenólicos, apresentam um alto potencial redox e, portanto, não necessitando de mediadores (Wong 2009; Dashtban *et al.* 2010).

Figura 3 – Estrutura tridimensional da LiP produzida por *Phanerochaete chrysosporium*.



Fonte: Wong 2009.

A MnP (Figura 4) é descrita como a peroxidase modificadora de lignina mais comumente secretada pelos fungos de podridão branca. O resultado de oxidação das moléculas de Mn é bastante reativo e, portanto, capaz de oxidar uma variedade de substratos fenólicos como a lignina. Esta capacidade é limitada quanto à oxidação de substratos não fenólicos, que ocorre apenas sob a presença de mediadores (Hofrichter, 2002). Dessa forma, são relatados a aplicação e os estudos das MnP na degradação de compostos recalcitrantes, bem como na despolimerização de formas de lignina naturais e sintéticas que embasam o seu fundamental papel no branqueamento da celulose (Falade *et al.* 2016).

Figura 4 – Estrutura tridimensional da MnP produzida por *Phanerochaete chrysosporium*.



Fonte: Wong 2009.

Diferente das LiP, que tem em foco a degradação de substratos não fenólicos, e das MnP, que degradam apenas os substratos fenólicos sem a ajuda de mediadores, as peroxidases versáteis (Figura 5) são capazes de atuar sobre ambos os tipos de substrato com eficiência. Tal combinação da capacidade degradativa da LiP e da MnP presente nas VP é caracterizada pela presença de diferentes sítios ativos de oxidação que interagem com o cofator heme e dão a este grupo uma conformação única (Ruiz-Dueñas *et al.* 2009; Wong 2009).

Figura 5 – Estrutura tridimensional de peroxidase versátil produzida por *Phanerochaete chrysosporium*



Fonte: Wong 2009.

3.2.3 Hidrolases

As hidrolases são enzimas que realizam a catálise das reações químicas e quebram das moléculas na presença de água. Dentre elas, as amilases, celulasas, lipases, pectinases e catalases estão entre as mais conhecidas. De acordo com Pietro e Said (2004), cerca de 75% das enzimas que são aplicadas industrialmente são hidrolases, sendo 40% delas proteases comercializadas. O processo da hidrólise é facilitado pelos fungos, que conseguem penetrar com mais facilidade substratos compactados e realizar a fermentação a base de sólidos (Erdal; Taskin, 2010).

A celulase é um complexo enzimático dividido em três grupos, definidos de acordo com o seu local de atuação no substrato celulósico. Apesar da individualidade nas alterações causadas por estes grupos na celulose, as enzimas atuam de forma altamente sinérgica por apresentarem propriedades complementares (Lynd; Zhang, 2002; Ramos, 2000). Estudos anteriores referem que este complexo enzimático é normalmente obtido a partir de espécies do filo Ascomycota, *Trichoderma* e *Aspergillus*, para uma grande diversidade de

aplicações em setores industriais, como na clarificação, produção de ágar e glicose, indústria alimentícia e indústria têxtil (Pietro; Said, 2002; Ruegger; Tauk-Tornisiello, 2004). Estudos mais recentes indicam que ainda são necessárias mais pesquisas que utilizem espécies de Agaricomycetes para a produção industrial de celulasas para fomentar a conservação ambiental (Okal *et al.* 2020).

A amilase é outro complexo enzimático produzido principalmente por micro-organismos que têm apresentado aplicação diversa em processos industriais, principalmente em indústrias têxteis, de panificação, bem como na fabricação de detergentes. Representam o segundo maior grupo utilizado para essas atividades, depois das proteases (Cherry; Fidantsef, 2003; Abu *et al.* 2005). Sua produção tem também relação com a ação antimicrobiana de plantas contra fungos endofíticos, que usam a amilase para superar a defesa do hospedeiro (Ayob; Simarani, 2016).

A tanase é uma enzima capaz de hidrolisar os taninos e que liberam, como produto da reação, a glicose, o ácido gálico e o ácido elágico, além de também degradar posteriormente a glicose, conhecida como fonte base de energia, e o ácido gálico por completo (Mahendran *et al.*, 2006). Assim como as amilases, a tanase, através da quebra dos compostos fenólicos presentes nos tecidos de plantas hospedeiras, também favorece a invasão de microrganismos como as espécies de fungos que a produzem (Scalbert, 1991). A produção de ácido gálico a partir da hidrólise realizada pelas tanases tem diversos usos industriais, com principal aplicação na indústria alimentícia e potencial na aplicação biotecnológica do tratamento de efluentes de curtumes, que apresentam altas concentrações de polifenóis e taninos reconhecidos como poluentes. A utilização da tanase nesse tipo de tratamento representa uma solução menos custosa e efetiva (Aguilar *et al.*, 2007)

3.3 NANOPARTÍCULAS

O uso de nanopartículas baseadas em carbono-nitrogênio acrescidas de metais para a análise de crescimento fúngico e sua influência em

outros organismos ainda é recente e escasso. Anteriormente, foram realizados estudos utilizando este tipo de nanopartículas em fungos micorrízicos arbusculares (FMA, filo Glomeromycota) para observar sua influência, inibição e redução do estresse em plantas através da assimilação realizada pelos fungos (Feng *et al.* 2013; Aleksandrowicz-Trzcinska *et al.* 2018). Em ambos os estudos, foi observado o aumento da massa e funções ecológicas dos FMA.

Outra função da aplicação das nanopartículas associadas a metais foi realizada por Nsengumuremyi *et al.* (2020), que observaram a capacidade das nanopartículas em atuar como supressores da síntese de micotoxinas em fungos filamentosos, obtendo resultados positivos que são vistos como avanço para reduzir a questão da prevalência de aflatoxina em todo o mundo.

Estudos mais similares ao estudo presente também foram realizados por Aleksandrowicz-Trzcinska *et al.* (2018), que observaram a influência das nanopartículas vinculadas a metais sob o crescimento de fungos degradadores da madeira e espécies patogênicas. Apesar da variação sobre a atividade antifúngica dos isolados, os resultados apresentaram as nanopartículas como úteis o suficiente para sugerir tal uso como método alternativo às medidas químicas contra algumas espécies patogênicas e degradadoras de madeira. No entanto, ainda não há estudos que façam o uso de nanopartículas sintetizadas e vinculadas a metais para a análise de crescimento fúngico e produção enzimática em isolados de Agaricomycetes no Brasil.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTOS E PURIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE AGARICOMYCETES

Foram selecionados quatro espécimes depositados no Banco de Fragmentos de Basidioma (BDNA) coletados em diferentes áreas de Mata Atlântica no Nordeste do Brasil. (Quadro 1).

Quadro 1: Espécimes de Agaricomycetes selecionados.

Número de identificação	Micoteca URM	Espécies
BDNA AS172	a ser depositado	<i>Schizophyllum sp.</i>
BDNA 1001	a ser depositado	<i>Trametes sp.</i>
BDNA ABP401	a ser depositado	<i>Pycnoporus sp.</i>
BDNA V11	a ser depositado	<i>Psilocybe sp.</i>

Fonte: A autora (2023)

Os fragmentos selecionados foram tratados assepticamente com hipoclorito de sódio (NaClO) a 3%, e enxaguados em água destilada autoclavada. O material foi incubado em tubos contendo meio BDA (Ágar batata dextrose) a temperatura ambiente de $\pm 28^{\circ}\text{C}$ no período de 1 a duas semanas ou até o desenvolvimento micelial (Cavalcante 1972). Foram realizados repiques até a obtenção das culturas puras. Os isolados purificados foram determinados utilizando biologia molecular e dados morfológicos dos seus respectivos basidiomas, em trabalhos anteriores. Todos os ensaios a seguir foram realizados em triplicata, a fim de permitir observar a variação dos halos de crescimento e halos de produção enzimática entre os isolados.

4.2 ENSAIOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

4.2.1 Bioassimilação

Os isolados dos quatro espécimes foram inoculados em placas de Petri em quatro meios distintos, além do controle negativo (ágar puro), contendo as diferentes nanopartículas como única fonte de carbono e nitrogênio. As nanopartículas foram sintetizadas pelo Prof. Dr. Severino Alves Júnior do Departamento de Química Fundamental da UFPE e pelo Pós-Doutorando Idio Alves de Souza Filho (BFP-FACEPE) a partir de resíduos de folhas, com o intuito de desenvolver bio-híbridos voltados para a biodegradação de polímeros sintéticos. No estudo presente, os testes foram realizados com a adição de diferentes íons metálicos às nanopartículas separadamente, sendo eles Cu, Mn e Fe. Os íons metálicos foram selecionados a fim de estimular a interação entre as fenoloxidasas e o substrato, devido à afinidade de certos grupos enzimáticos com os metais escolhidos ou a presença desses metais como cofatores enzimáticos, como as lacases, por exemplo, que apresentam quatro íons de Cu em seu centro catalítico mediando os processos de redox (Messerschmidt; Huber, 1990).

Para formulação de 250 mL de ágar+NP, foram utilizados 4,5 g de ágar e a concentração de cada nanopartícula acrescida de metais padronizada a 2 mg/mL. Posteriormente, os inóculos das culturas foram padronizados em diâmetros de 6 mm para a análise comparativa do crescimento dos isolados. Os halos de crescimento foram aferidos com o paquímetro, e os isolados foram categorizados segundo a capacidade de despigmentação do meio em 7 dias e em 28 dias. Essa categorização foi utilizada para indicar a assimilação da nanopartícula para o crescimento dos isolados.

4.2.2 Bioestimulação

Seguindo a mesma concentração das nanopartículas do teste anterior, 250 mL de meio CMC (carboximetilcelulose) a 1% e Ágar Amido a 1% foram preparados para a detecção da bioestimulação de celulose e amilase, respectivamente. Discos de 6 mm dos isolados foram inoculados nos meios

específicos e o tamanho do crescimento das culturas foi aferido com o paquímetro após 120 h. Após a medição do micélio aéreo, foi adicionada solução de iodo às placas de Petri, atuando como revelador dos halos de produção de enzimática e mensurados com o auxílio de um paquímetro.

Adicionalmente, para verificar a bioestimulação de polifenoloxidação, foi preparado meio contendo 0,25 g de ácido tânico adicionados ao meio BDA. Não foram adicionadas nanopartículas ao meio BDA+ácido tânico, devido à pigmentação da nanopartícula que inviabiliza a observação do positivo para a reação de tanase.

4.3 BIOESTIMULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE

Foram preparados dois meios líquidos, caldo glicosado e malte, ambos a 1%, com adição de diferentes combinações das nanopartículas, na concentração de 1 mg/mL, que resultaram em sete tratamentos distintos, além do controle (Tabela 1). Para a elaboração do experimento, as nanopartículas puras ou acrescidas de Fe e Cu foram selecionadas devido aos resultados positivos quando comparados aos testes realizados com Mn.

Quadro 2 – Tratamentos contendo as diferentes combinações de nanopartículas. 0 = ausência de determinada NP; + = Presença de determinada NP.

	NPP	NP + Fe	NP + Cu
Controle	0	0	0
Trat 1	+	0	0
Trat 2	0	+	0
Trat 3	0	0	+
Trat 4	+	+	0
Trat 5	+	0	+
Trat 6	0	+	+
Trat 7	+	+	+

Fonte: A autora (2023).

4.3.1 Quantificação da atividade de lacase

Para o teste enzimático da atividade da lacase foi preparado tampão de acetato de sódio na concentração de 100 mM (pH 5) e uma solução de ABTS realizada na concentração de 0,5 mM. O extrato enzimático foi obtido utilizando 1 ml do caldo nutritivo centrifugado a 14000 rpm por 5 min, sendo utilizado apenas o sobrenadante na reação.

A reação foi preparada adicionando 100 µl de tampão, 100 µl do extrato e 800 µl de ABTS, e lida em espectrofotômetro a 420 nm durante o período de

1,5 min. Para calcular a atividade enzimática foi utilizada a fórmula de atividade da lacase segundo BUSWELL et al. (1996, figura 6):

Figura 6 – Fórmula do cálculo de atividade enzimática da lacase

$$\frac{U}{L} = \frac{\Delta abs . V}{\epsilon . d . v . t}$$

Fonte:Buswell (1998)

em que: Δabs representa a diferença entre absorbância final e absorbância inicial; V é o volume total da reação (mL); ϵ é o coeficiente de extinção molar ($M^{-1} cm^{-1}$); v é o volume de amostra (mL); d é o comprimento do passo através da cubeta (cm); e t é o tempo de reação (min), expressa em $U L^{-1} (\mu moles \text{ produto } min^{-1} L^{-1})$.

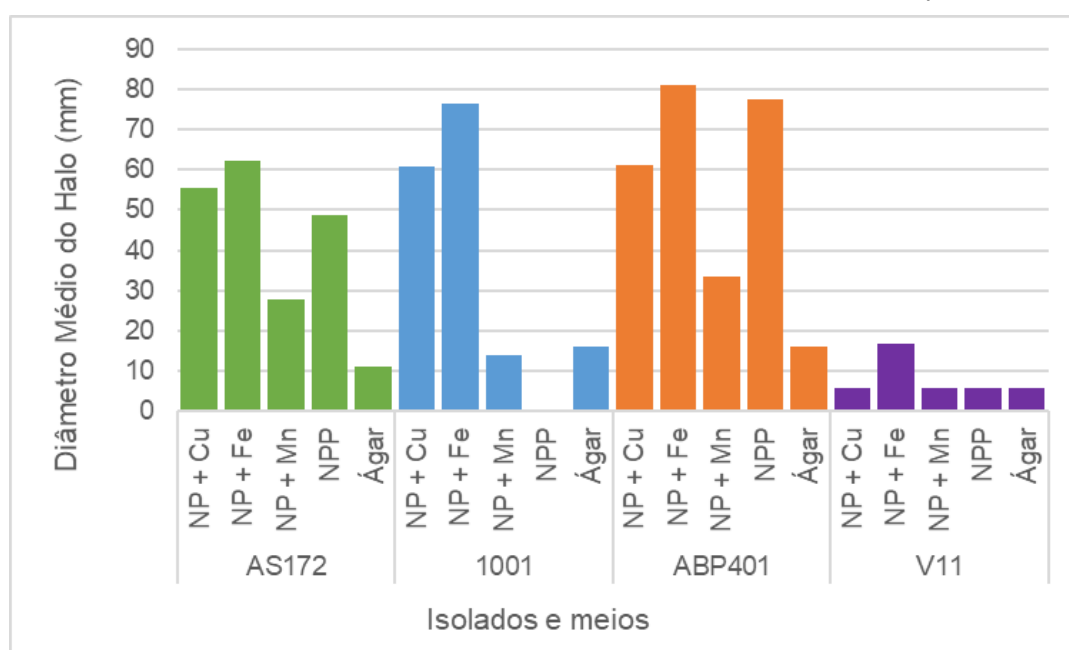
A unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol do substrato por minuto (BUSWELL et al., 1996).

5 RESULTADOS

5.1 BIOASSIMILAÇÃO

Após 7 dias de crescimento, com exceção do isolado V11, os demais isolados não apresentaram crescimento maior do que o controle positivo realizado em meio BDA. Em meio com nanopartícula, a NPP estimulou consideravelmente o crescimento dos isolados, exceto em 1001 e V11 (Gráfico 1).

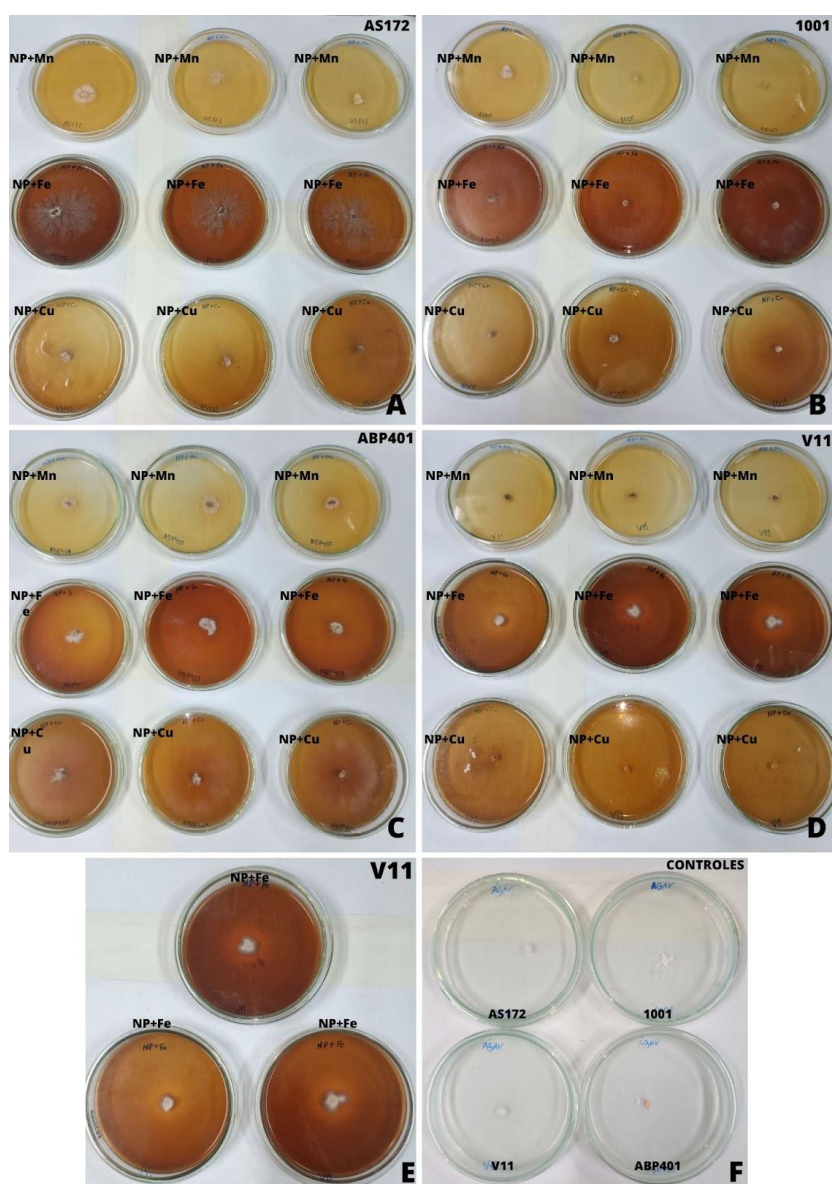
Gráfico 1 – Halos de crescimento médio dos isolados em meios distintos após 7 dias



Fonte: A autora (2023).

ABP401 apresentou maior crescimento, com halos médios de 61 mm em NP + Cu, 81 mm em NP + Fe, 33,3 mm em NP + Mn e 77,3 mm em NPP. O isolado 1001 apresentou o segundo maior crescimento (60,6 mm em NP + Cu, 76,3 mm em NP + Fe e 33,3 mm em NP + Mn), seguido por AS172 (55,5 mm em NP + Cu, 62,3 mm em NP + Fe, 27,8 mm em NP + Mn, 48,6 mm em NPP). O isolado 1001 também apresentou crescimento maior na presença de Fe, mas teve o seu crescimento inibido na presença das nanopartículas vinculadas a Mn e na presença de NPP (Figura 7B). O isolado V11 apresentou crescimento apenas para o meio contendo NP + Fe, sinalizando que este pode ser o único metal a estimular consideravelmente o crescimento do isolado (Gráfico 1).

Figura 7 – Teste de bioassimilação. A) Crescimento do isolado AS172. B) Crescimento do isolado 1001. C) Crescimento do isolado ABP401. D) Crescimento do isolado V11 E) Despigmentação do meio observada em V11. F) Controles dos isolados utilizados.



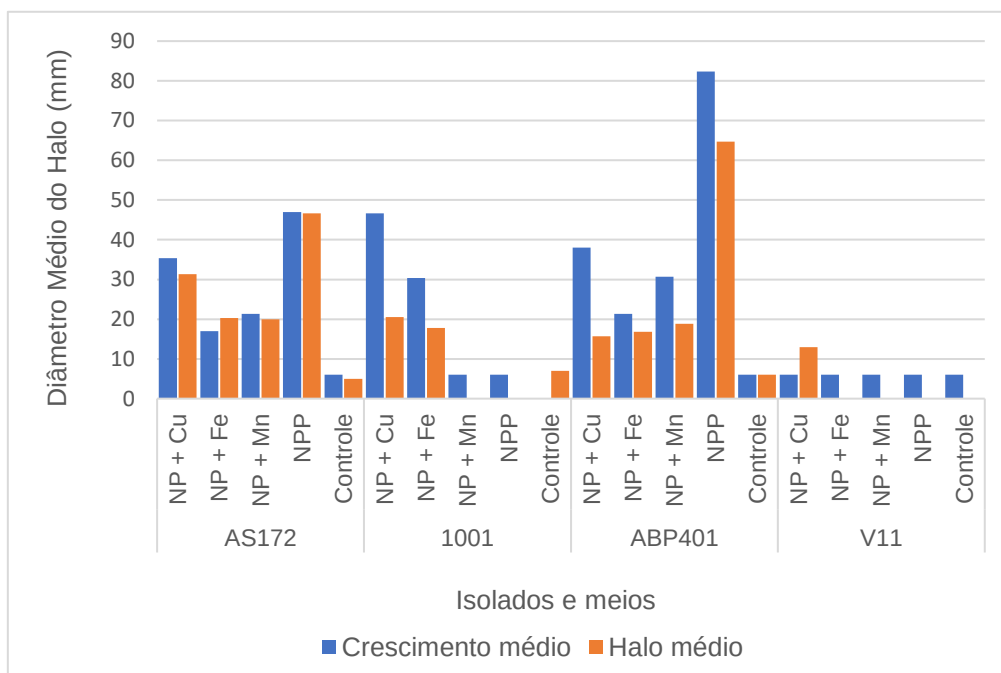
Fonte: A autora (2023).

Dentre as variedades de nanopartículas analisadas, a NP + Fe foi a que mais estimulou o crescimento dos isolados, apesar do crescimento aparente menos robusto quando comparado aos meios contendo Mn (Figura 7). A despigmentação visual foi observada apenas no isolado V11 em 7 dias de crescimento (Figura 7E) e, após 28 dias foi observada a despigmentação visual no isolado ABP401.

5.2 BIOESTIMULAÇÃO

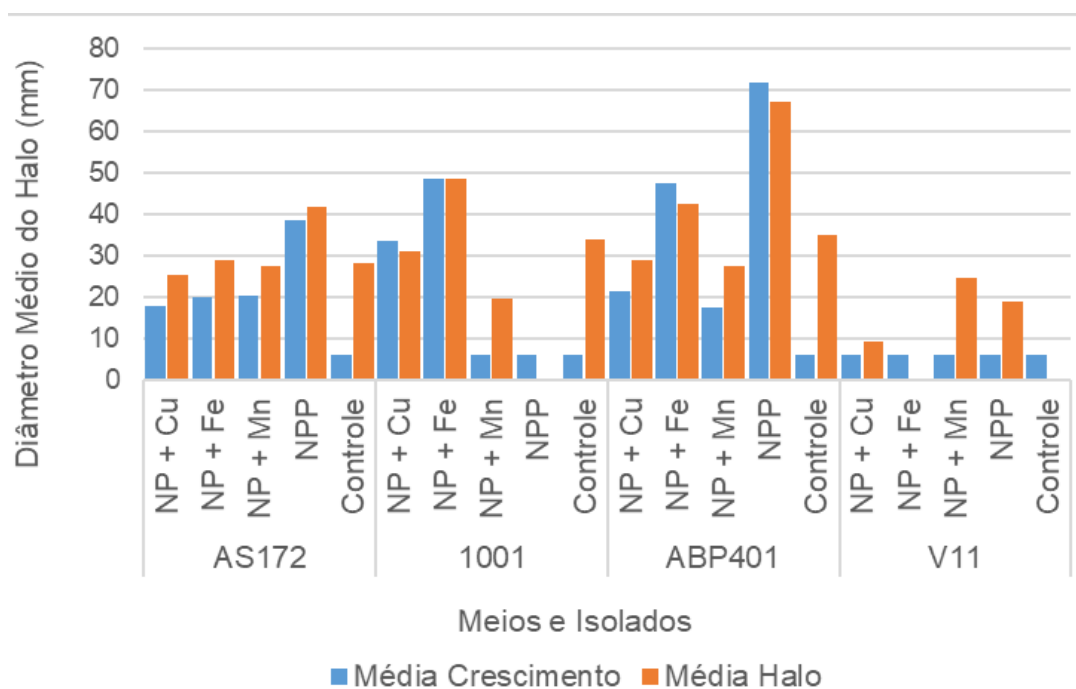
Após 7 dias de crescimento, foi possível observar os isolados que mais cresceram e mais apresentaram reações positivas para produção enzimática em meios distintos (amido e CMC), com a adição das diferentes nanopartículas (Gráficos 2, 3).

Gráfico 2 – Comparação entre halos médios de crescimento e halos médios de despigmentação em meio de amido.



Fonte: A autora (2023).

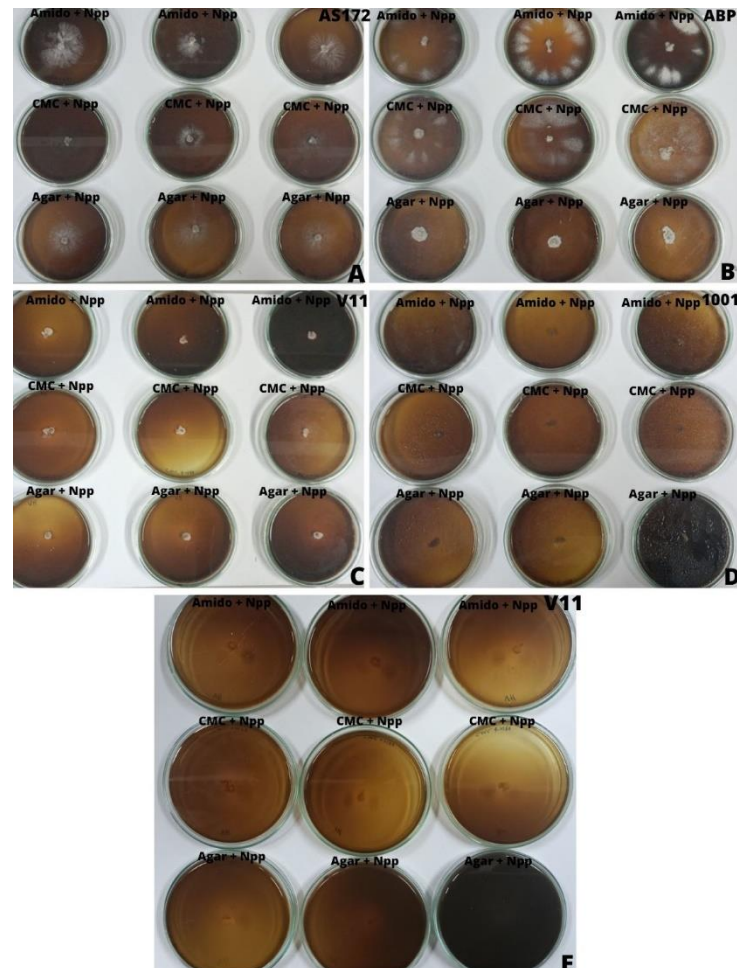
Gráfico 3 – Comparação entre os halos médios de crescimento e halos médios de despigmentação em meio CMC



Fonte: A autora (2023).

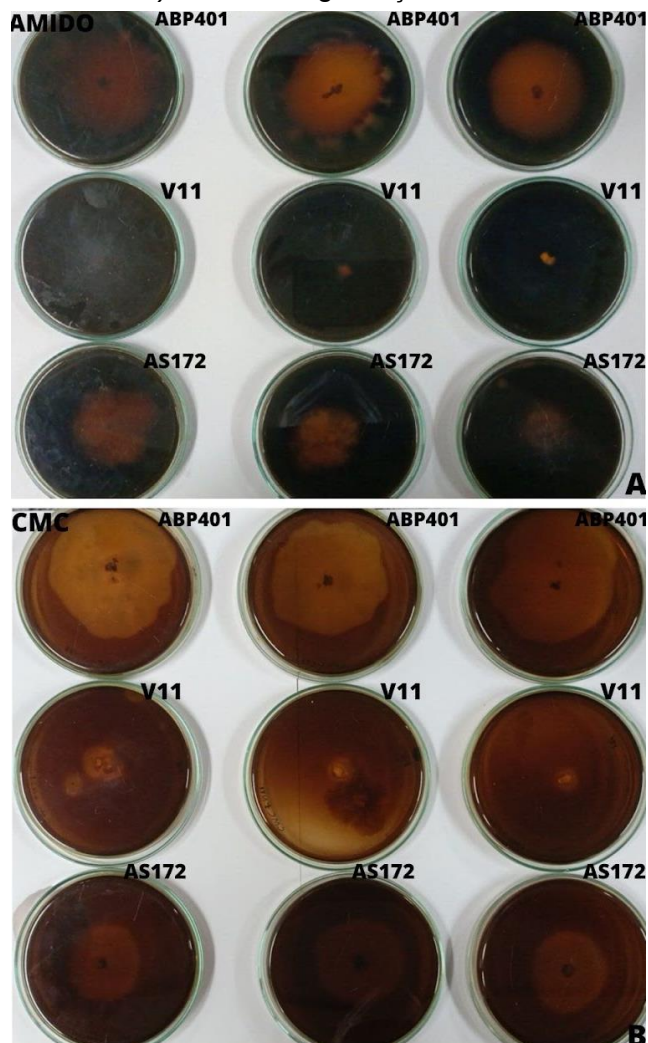
Para ambos os meios, o isolado 1001 apresentou o maior crescimento quando observados apenas os meios contendo a adição de nanopartículas vinculadas aos metais Fe e Cu (Gráficos 2, 3) com tamanhos médios de halo de 30,3 mm em NP + Fe e 46,6 mm em NP + Cu para meio amido, respectivamente, e 48,6 mm em NP + Fe e 33,6 mm em NP + Cu em CMC. Entretanto, este isolado não se desenvolveu nos meios NP + Mn e NPP, o que pode indicar a possível inibição do crescimento em ambos os casos. Seguido de 1001, em meio amido, APB401 apresentou melhor crescimento micelial em todos os meios (38 mm em NP + Cu, 21 mm em NP + Fe e 30 mm NP + Mn), incluindo NPP, que apresentou maior crescimento micelial e maior halo de despigmentação (82,3 mm e 64,3 mm respectivamente, Figuras 8, 9).

Figura 8 – Halos de crescimento em teste de bioassimilação meio NPP
 A) Halos de crescimento em AS172 B) Halos de crescimento em ABP401 C)
 Halos de crescimento em V11 D) Halos de crescimento em 1001 E) Halo de
 degradação do meio observada em V11



Fonte: A autora (2023).

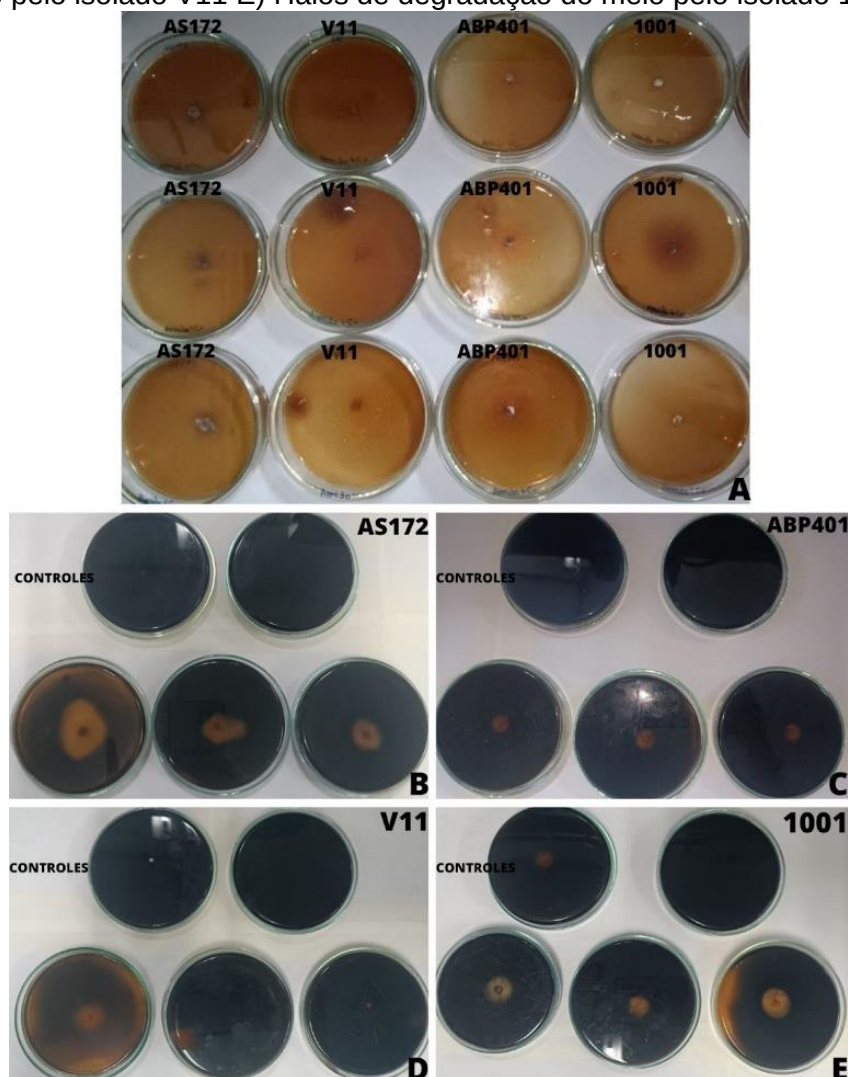
Figura 9 – Halos de degradação do substrato A) Halo de degradação em meio amido B) Halo de degradação em meio CMC



Fonte: A autora (2023).

Ainda em relação ao meio amido, o isolado AS172 teve menor crescimento em comparação aos testes anteriores (35,3 mm em NP + Cu, 17 mm em NP + Fe, 21,3 mm em NP + Mn), seu maior crescimento micelial e halo de despigmentação ocorreram em meio NPP (47 mm e 46,6 mm respectivamente). O isolado V11 apresentou o menor desenvolvimento micelial para ambos os meios, não atingindo os 6 mm padronizados durante a inoculação. Em relação aos halos de degradação do substrato, os isolados ABP401 e AS172 apresentaram os maiores halos de degradação do substrato na presença de NPP (64,6 e 46,4, respectivamente), em meio amido, seguidos dos isolados AS172 (31,3 mm) e 1001 (31,3 mm) em meio NP + Cu. NP + Cu também foi o único meio a estimular a produção de amilases em V11 (13 mm; Figura 10, D).

Figura 10 – Teste de bioassimilação em meio amido acrescido de NP + Cu. A) Crescimento micelial dos isolados B) Halos de degradação do meio pelo isolado AS172 C) Halos de degradação do meio pelo isolado ABP401 D) Halos de degradação do meio pelo isolado V11 E) Halos de degradação do meio pelo isolado 1001.



Fonte: A autora (2023).

Em meio CMC, foi possível observar menor desenvolvimento do crescimento micelial em relação ao meio amido na maioria dos isolados, com exceção dos meios acrescidos de Fe para os isolados 1001 e ABP401. O isolado ABP401 apresentou maior crescimento e halo de degradação do substrato em meio NPP (72 mm e 67,3 mm, respectivamente. Figuras 7, 8). Também é possível observar a inversão no tamanho dos halos de crescimento e produção enzimática em meios contendo NP + Mn, quando comparado ao meio amido.

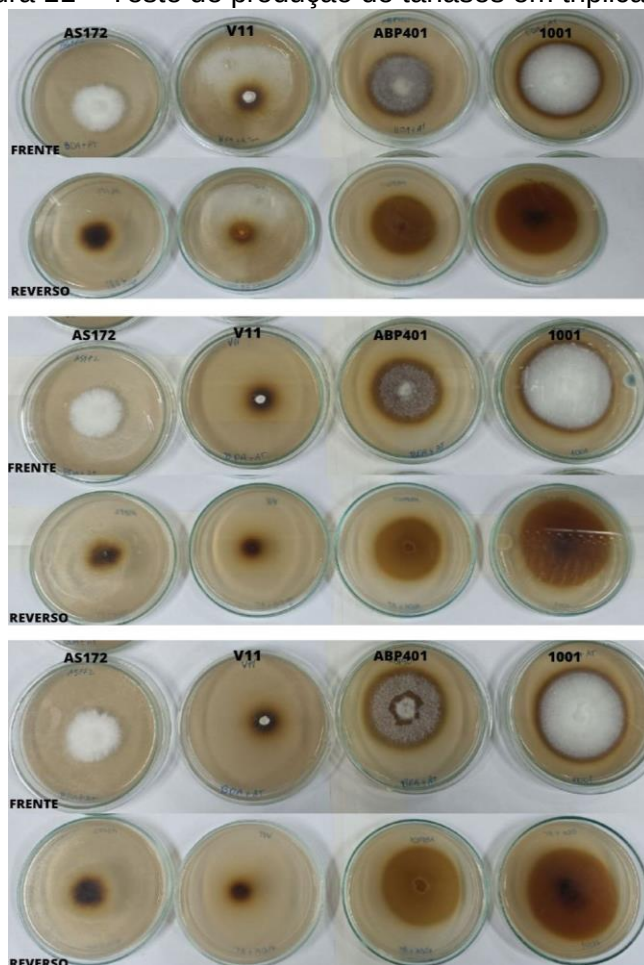
O isolado V11 não apresentou crescimento micelial aparente, no entanto produziu halo de degradação do substrato para os meios NP + Cu (9 mm), NP + Mn (24 mm) e NPP (18,6 mm). Todos os isolados com crescimento visível apresentaram maior crescimento na presença de Cu para o meio amido, enquanto para o meio CMC os halos de crescimento foram maiores na presença de Fe.

5.2.1 Bioestimulação em BDA + Ácido-Tânico

Todos os isolados apresentaram halo escurecido e amarronzado no reverso da placa em reação ao ácido-tânico, indicativo da produção de fenoloxidasas (Figura 11). Os isolados 1001 e AS172 apresentaram crescimento mais robusto, sendo o halo de reação enzimática proporcional ao halo de crescimento em 1001. O isolado ABP401 apresentou maior produção aparente de fenoloxidasas e crescimento mais delgado do micélio aéreo. O isolado V11 mais uma vez não apresentou crescimento aparente na superfície do meio, apesar de apresentar forte produção de tanases, observado na coloração mais escura dos halos em relação aos outros isolados (Figura 11), o que pode ser um indicador do crescimento vegetativo do micélio dentro do meio sólido.

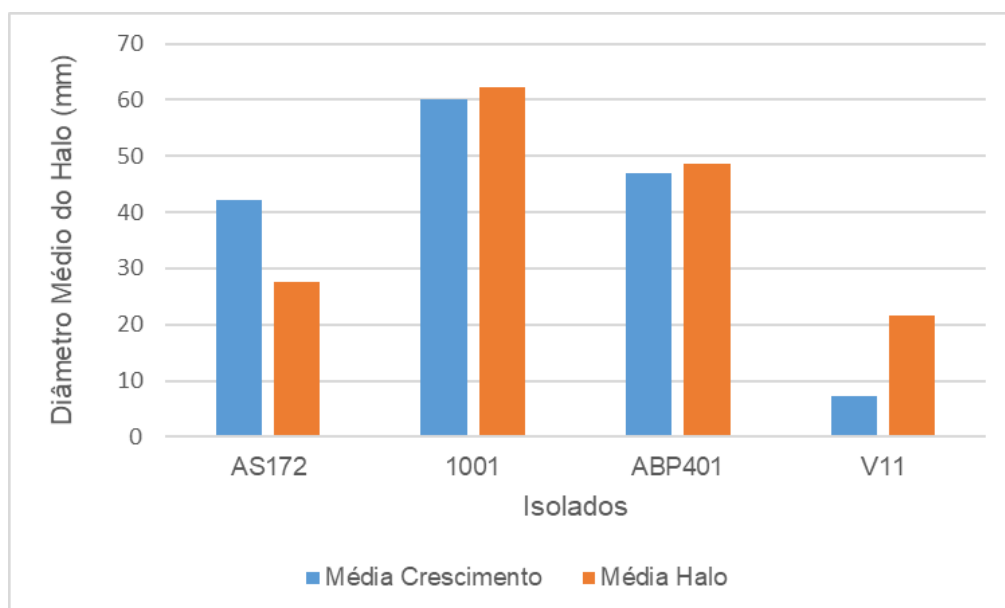
O isolado 1001 apresentou o maior halo médio de crescimento (60,1 mm) e maior halo médio de produção de fenoloxidasas (62,3 mm), seguido por 1001, que também apresentou halo de reação enzimática quase que sobreposta ao halo de crescimento, 48,6 mm e 47 mm, respectivamente (Gráfico 4; Figura 10). O isolado AS172, além de apresentar aspecto mais robusto de crescimento, foi o único isolado a apresentar halo de crescimento (42,1 mm) relativamente maior que o halo de reação enzimática (27,5 mm), evidenciando que o isolado não produziu em específico inicialmente a tanase (Figura 11).

Figura 11 – Teste de produção de tanases em triplicata.



Fonte: A autora (2023).

Gráfico 4 – Análise de produção de tanases



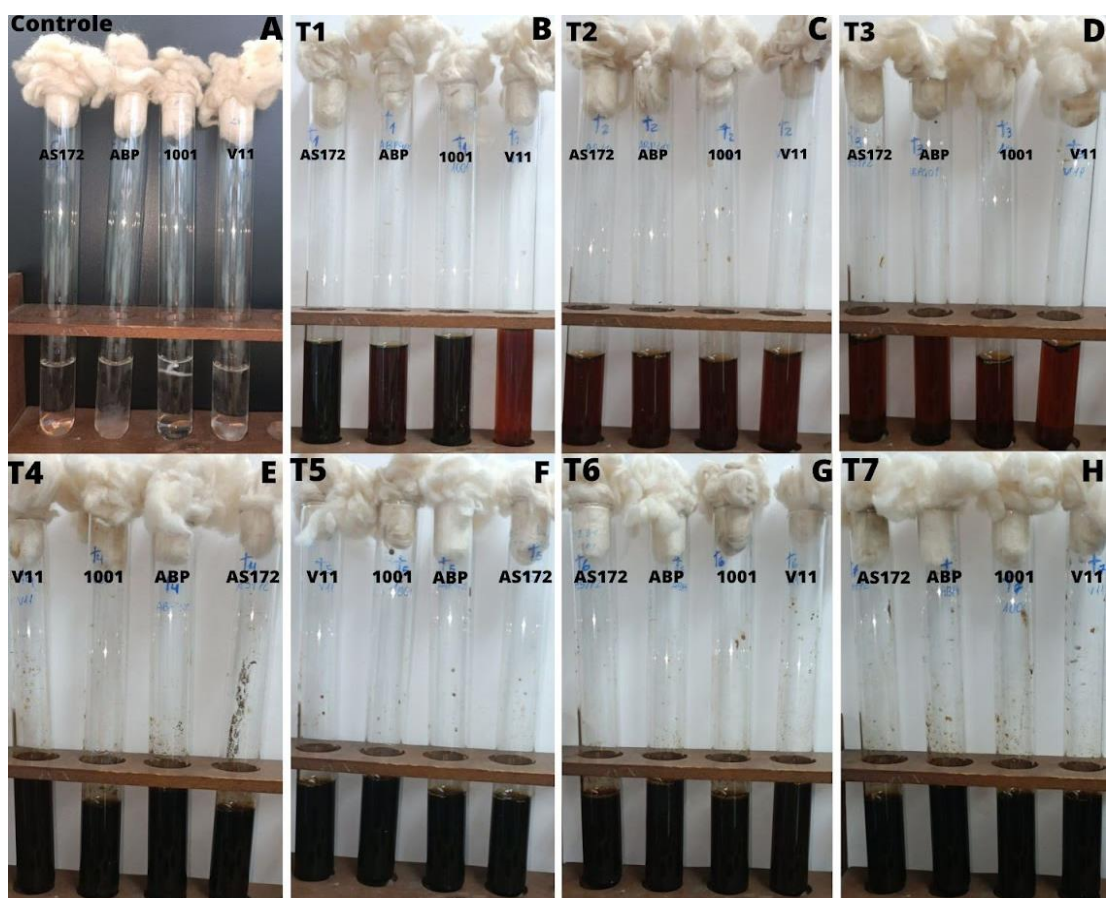
Fonte: A autora (2023).

5.2.2 Bioestimulação da lacase

Após 7 dias de crescimento, o isolado V11 apresentou capacidade visível de degradação no primeiro tratamento, em caldo glicosado, constituído apenas de NPP (Figura 12, B). Todos os tratamentos seguintes não apresentaram despigmentação para nenhum dos isolados (Figura 12). Adicionalmente, a atividade de lacase não foi detectada utilizando caldo glicosado nos diferentes tratamentos.

Quando inoculados em caldo malte, não foi possível detectar a atividade nos tratamentos contendo as diferentes nanopartículas. A atividade foi mensurada apenas no caldo malte sem a adição de nanopartículas, onde a atividade enzimática foi detectada e calculada para o isolado 1001, que teve como resultado de atividade média 1534,18 UI/L e $\pm 93,06$ de desvio padrão.

Figura 12 – Teste de despigmentação dos tratamentos utilizando caldo glicosado e contendo as diferentes combinações de nanopartículas A) Controles dos isolados B) Tratamento 1 C) Tratamento 2 D) Tratamento 3 E) Tratamento 4 F) Tratamento 5 G) Tratamento 6 H) Tratamento 7



Fonte: A autora (2023).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi possível observar que os isolados selecionados apresentam grande potencial enzimático ainda pouco explorado e que a utilização de nanopartículas, em determinados casos, pode ser promissora, tendo em vista a escassez de estudos no mundo e a ausência no Brasil.

Orlandelli *et al.* (2013) realizaram análises comparativas do crescimento de isolados selecionados em meio BDA em relação a meios acrescidos de diferentes tipos de corantes de importância em biorremediação. Foram analisados três isolados: *Marasmius cladophyllus*, *Phlebia sp.*, e *Schizophyllum commune*, espécie usada em nossos estudos, apresentou crescimento de 75 mm em meio BDA no período de 7 dias de crescimento, comparado ao desenvolvimento dos isolados em meios acrescidos dos corantes têxteis preto direto e turquesa G reativo na concentração de 0,1% (v/v). Os resultados de crescimento dos isolados no estudo foram similares ao seu controle positivo, 75 mm para o corante preto direto e 74,3 mm para o turquesa G reativo.

No estudo realizado por Machado *et al.* (2006), *Trametes villosa* e *Pycnoporus sanguineus* apresentaram crescimento que atingiu as extremidades das placas no 7º dia de crescimento, assim como no presente estudo que utilizou espécies do mesmo gênero (Quadro 1). Dessa forma, é possível observar que nenhum dos isolados apresentou crescimento na presença das nanopartículas maior do que os controles positivos em meio BDA, com exceção do isolado V11, diferente dos estudos que fizeram uso de corantes como substrato, nos quais foi observado que quase todos os halos de crescimento apresentavam o mesmo tamanho que os isolados que cresceram em meio BDA.

Baldrian; Gabriel (2002) realizaram testes de otimização de produção de lacase em *Pleurotus ostreatus* a partir da adição de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, além da adição de íons metálicos e compostos aromáticos. Foi confirmada a indução da produção de lacases na presença de Cu em meio limitado de hidrogênio, registrada anteriormente por Palmieri *et al.* (2000). Baldrian; Gabriel (2002) observaram, pela primeira vez, a indução da produção

de lacases na presença de Cd, que ocorreu apenas quando a adição de Cd foi realizada durante os estágios finais de crescimento. Os mesmos autores constataram também que metais pesados têm influência não só na atividade de lacases como também em MnP, que demonstrou alta sensibilidade a meios acrescidos de metais pesados como Cu e o Cd em testes realizados em *Stereum hirsutum* e *Phanerochaete chrysosporium* (Baldrian *et al.* 1996).

A sensibilidade dos isolados à presença de certos metais como o Mn também foi observada no estudo atual, em que as espécies apresentaram melhor desenvolvimento na presença de NPP. Portanto, mais estudos se tornam necessários para entender a interação dos metais em relação à produção enzimática das espécies selecionadas.

No presente estudo, o isolado 1001 foi evidenciado como o maior produtor de tanases. De acordo com Almási *et al.* (2019), genes relacionados com a produção de tanases foram encontrados em 10 das 31 espécies testadas da família *Schizophyllaceae*, usualmente mais frequentes em cascas de árvores, sendo elas pertencentes aos gêneros *Auriculariopsis*, *Schizophyllum*, como o isolado testado, *Peniophora*, *Dendrothele*, *Plicaturopsis*, *Gymnopus*, *Pterula*, *Fibulorhizoctonia*, *Omphalotus* e *Fistulina*. Ferreira-Silva *et al.* (2022) observaram a produção de tanases por espécies do gênero *Trametes*, que apresentaram o halo âmbar escuro em três dias do experimento, evidenciado pela degradação de ácido tânico e a produção de fenoloxidasas, de diâmetro 80 mm para *T. villosa* e 85 mm de halo médio para *T. lactinea*.

Pesquisas anteriores estudaram diferentes espécies dos gêneros selecionados no estudo atual para realizar testes de produção enzimática, com o intuito de avaliar a capacidade degradativa de diferentes compostos poluentes despejados pelas indústrias, que chegam às redes de esgoto e nos rios das mais diversas formas. O estudo realizado por Sales *et al.* (2012), que teve em foco a degradação de medicamentos recalcitrantes, testou a produção enzimática utilizando *Pycnoporus sanguineus* e *Schizophyllum commune*, obtendo resultados positivos quanto à degradação da matéria orgânica e descoloração visível do substrato observado. Entretanto, enfatizam que não foi observada a produção de lacases por *S. commune* para o substrato em estudo neste experimento e que

o oxigênio dissolvido nas amostras pode ter sido um fator inibitório para a produção de lignina peroxidases. Portanto, a produção de lacase, neste experimento, foi apenas observada em *Pycnoporus sanguineus* (14.000 U/L).

Quanto ao uso de fenoloxidasas na degradação de corantes recalitrantes, a pesquisa realizada por Dayaram *et al.* (2008) foi capaz de observar, pela primeira vez, a atividade de lacases por *Polyporus rubidus*, outra espécie de Agaricomycetes testada quanto à suas propriedades para a descoloração de quatro tipos de corantes, incluindo o Vermelho Congo e o Remazol Brilliant Blue R (RBBR). Foi observada a atividade de lacase obtida, que atingiu valor máximo de 17.100 U/L.

Pesquisas mais recentes também ressaltam que obtiveram bons resultados para a descoloração de corantes utilizando espécies do gênero *Trametes*, Ferreira-Silva *et al.* (2022) que as espécies *T. lactinea* e *T. villosa* são capazes de degradar o corante índigo carmim de forma eficiente, com mais de 80% de descoloração, ainda ressaltando que a lacase se mostrou integrada no mecanismo de degradação, apresentando atividades de 27.833 U/L e ± 0.031 U/L de desvio padrão para *T. villosa* e em média 0.500 U/L com ± 0.002 U/L para *T. lactinea*. Portanto, *T. villosa* apresentou atividade de lacase bastante superior ao isolado 1001 no presente estudo, enquanto *T. lactinea* não obteve resultados tão positivos.

Moreira *et al.* (2009) também realizaram o estudo para a degradação do corante RBBR a partir de *Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella*. Além de testar sua ação positiva para a produção das enzimas e descoloração do corante, foi feito uma análise sobre o pH favorável para as espécies e a sua influência no processo de produção das fenoloxidasas. In vitro, a descoloração do RBBR foi total para ambas as espécies em um período de 14 dias. Foi também possível observar que as espécies selecionadas foram capazes de modificar o pH inicial do meio para o seu pH ótimo de desenvolvimento. Os estudos sugerem que as lacases produzidas por tais isolados podem descolorir corantes sintéticos em uma grande variedade de concentrações e sem a ação de mediadores redox, no caso de *Polyporus rubidus* (Dayaram *et al.* 2008). Os resultados chamam a atenção para um método efetivo, fácil e de baixo custo para a degradação de

corantes antraquinônicos e possivelmente outros grupos de compostos fenólicos de importância.

Dessa forma, a inclusão de nanopartículas como agente estimulante do crescimento e de produção enzimática possibilita novas abordagens que requerem maior número de testes para melhor compreensão da interação entre as nanopartículas e os grupos enzimáticos. É esperado que surjam novos estudos que tenham como intuito complementar e enriquecer o conhecimento acerca da produção de enzimática de espécies de Agaricomycetes brasileiras ainda não estudadas e testadas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista os resultados observados, é destacado que as nanopartículas vinculadas a metais não foram capazes de estimular o crescimento e produção enzimática dos isolados tanto quanto em meios contendo apenas nanopartículas (NPP), exceto para o isolado V11. A NPP também não influenciou o crescimento dos isolados tanto quanto os controles positivos realizados em meio BDA. Portanto, apesar de servir como um meio de cultura menos custoso para o desenvolvimento desses isolados, ainda não foram observados resultados especialmente promissores utilizando os isolados testados sob influência de nanopartículas. É necessário que testes utilizando o isolado 1001 em meio NPP sejam refeitos para avaliar a sua influência e comprovar o possível efeito inibidor da NPP neste isolado, bem como, posteriormente, realizar análises estatísticas dos dados observados. A produção enzimática proveniente dos fungos Agaricomycetes é compreendida como uma alternativa menos custosa e efetiva para diversos processos biotecnológicos, incluindo a micorremediação, mas requer que mais estudos continuem sendo realizados para sua futura aplicação nas mais diversas áreas. Além disso, é aconselhável que mais espécies de riqueza tropical sejam testadas, a fim de enriquecer o conhecimento sobre o potencial de aplicação dessas espécies.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMID, AHMED, M. *et al.* Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. **Advances In Applied Microbiology**, [S.L.], p. 1-28, 2013. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-407679-2.00001-6>.
- ABU, E. A.; ADO, S. A.; JAMES, D. B. Raw starch degrading amylase production by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* grown on sorghum pomace. **African journal of Biotechnology**, v. 4, n. 8, p. 785-790, 2005. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/15182>
Acesso em: 7.dez.2022.
- AGRAWAL, K. CHATURVEDI, V. VERMA, P. Fungal laccase discovered but yet undiscovered. **Bioresources And Bioprocessing**, [S.L.], v. 5, n. 1, 31 jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40643-018-0190-z>.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. 2011. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova** v. 10, p. 1729-1738 doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011001000006>
- AGUIAR, M. M. *et al.* Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, [S.L.], v. 53, n. 5, p. 1245-1254, out. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-89132010000500030>.
- AGUILAR, C. N.; RODRIGUEZ, R.; GUTIERREZ-SANCHEZ, G.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES, E.; PRADO-BARRAGAN, L. A.; RAMÍREZ-CORNEL, A.; CONTRERAS-ESQUÍVEL, J. C. Microbial tannases: advances and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 47-49, 2007. doi: [10.1007/s00253-007-1000-2](http://dx.doi.org/10.1007/s00253-007-1000-2)
- ALEKSANDROWICZ-TRZCINSKA, M. *et al.* The effect of silver and copper nanoparticles on the growth and mycorrhizal colonisation of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in a container nursery experiment. **Iforest - Biogeosciences And Forestry**, [S.L.], v. 11, n. 5, p. 690-697, 31 out. 2018. Italian Society of Sivilculture and Forest Ecology (SISEF). <http://dx.doi.org/10.3832/ifor2855-011>.

ALEKSANDROWICZ-TRZCIŃSKA, M. *et al.* Effects of copper and silver nanoparticles on growth of selected species of pathogenic and wood-decay fungi in vitro. **The Forestry Chronicle**, v. 94, n. 2, p. 109-116, 2018. doi: <https://doi.org/10.5558/tfc2018-017>

ALMÁSI, É. *et al.* Comparative genomics reveals unique wood-decay strategies and fruiting body development in the *Schizophyllaceae*. **New Phytologist**, [S.L.], v. 224, n. 2, p. 902-915, ago. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.16032>.

AYOB, F. W.; SIMARANI, K. Endophytic filamentous fungi from a *Catharanthus roseus*: Identification and its hydrolytic enzymes. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 3, p. 273–278, 2016. doi: [10.1016/j.jsps.2016.04.019](https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.04.019) Acesso em: 21. Jan. 2023.

AZEVEDO, J. L.; ESPOSITO, E. Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. **Caxias do Sul. EDUCS**, p. 125-169, 2004.

BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 206, n. 1, p. 69-74, jan. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb10988.x>.

BALDRIAN.; GABRIEL, J.; NERUD, F.. Effect of cadmium on the ligninolytic activity of *Stereum hirsutum* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Folia Microbiologica**, [S.L.], v. 41, n. 4, p. 363-367, ago. 1996. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02814716>.

BUSWELL, J. A. *et al.* Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. **World Journal Of Microbiology & Biotechnology**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 537-542, set. 1996. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00419469>.

CANNON, P. *et al.* Definition and diversity In: WILLIS K.J ed. State of the World's Fungi Report. **Royal Botanic Gardens**, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/328489651_'Definition_and_diversity'

[In Willis KJ ed State of the World's Fungi Report Royal Botanic Gardens Kew 4-11](#) Acesso em: 5 Dez. 2023.

CAVALCANTE, M. A. Q. Caracteres culturais de alguns Basidiomycetes isolados em Recife. Publicações do IMUR 694, 1972.

CHERRY, J. R. et FIDANTSEF, Ana L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current opinion in biotechnology**, 2003, v. 14, n 4, p. 438-443 doi: [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00099-5)

COELHO, G. D. **Purificação parcial do sistema enzimático produzido por *Psilocybe castanella* CCB444 durante crescimento em solo**. 101 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica, Usp, São Paulo, 2007. Disponível em: http://arquivos.ambiente.sp.gov.br/pgibt/2013/09/Glauciane_Danusa_Coelho_D_R.pdf Acesso em: 10 Fev. 2023

DASHTBAN, M; *et al.* Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, p. 36-50, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3180040/> Acesso em: 21 Fev. 2023

DAYARAM, DASGUPTA D. Decolorisation of synthetic dyes and textile wastewater using *Polyporus rubidus*. **Journal of Environmental Biology**. v. 29 n.6, p. 831-6, 2008 PMID: 19297974. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19297974/> Acesso em: 25 Fev. 2023

ERDAL, S; TASKIN, M. Production of alpha-amylase by *Penicillium expansum* MT-1 in solid-state fermentation using waste Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindley) kernels as substrate. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, n. 3, p. 5342-5350, 2010 Disponível em: <https://www.rombio.eu/rbl3vol15/20%20Mesut%20Taskin.pdf> Acesso em: 10 Fev. 2023

FALADE, A. O. et al. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. **Microbiologyopen**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 394, 7 set. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.394>.

FENG, Y. et al. The Role of Metal Nanoparticles in Influencing Arbuscular Mycorrhizal Fungi Effects on Plant Growth. **Environmental Science & Technology**, [S.L.], v. 47, n. 16, p. 9496-9504, 2 ago. 2013. American Chemical Society (ACS). doi: <http://dx.doi.org/10.1021/es402109n>.

FERREIRA-SILVA, V. et al. *Trametes lactinea* and *T. villosa* collected in Brazil are able to discolor indigo carmine. **Acta Botanica Brasilica**, v. 36, 2022. doi: <https://doi.org/10.1590/0102-33062021abb0356>

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. DOI: [10.3109/10409238.2014.889651](https://doi.org/10.3109/10409238.2014.889651)

HE, M. et al. Notes, outline and divergence times of Basidiomycota. Fungal Diversity, [S.L.], v. 99, n. 1, p. 105-367, nov. 2019. **Springer Science and Business Media LLC**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-019-00435-4>.

HE, M. et al. Species diversity of Basidiomycota. **Fungal Diversity**, [S.L.], v. 114, n. 1, p. 281-325, 14 jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-021-00497-3>.

HEINZKILL, M. et al. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1601-1606, 1998. doi: [10.1128/aem.64.5.1601-1606.1998](https://doi.org/10.1128/aem.64.5.1601-1606.1998)

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, [S.L.], v. 111, n. 5, p. 509-547, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>.

HOFRICHTER, M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and microbial technology**, v. 30, n° 4, 454-466, 2002. doi: [10.1016/S0141-0229\(01\)00528-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00528-2)

HOFRICHTER, M. *et al.* New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, p. 871-897, 2010. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2633-0>

LABAT, G. A. A. **Estudo cinético da oxidação de ligninas obtidas da palha e do bagaço de cana e aplicações de lignina de bagaço em resina a base de materiais naturais**. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97131/tde-27092012-122112/publico/BID08001.pdf> Acesso em: 18 Fev. 2023.

LYND L. R.; ZHANG Y. H. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. **Biotechnology and Bioengineering** v. 77, p. 467-475, 2002. doi: <https://doi.org/10.1002/bit.10142>

MACHADO, K. M. G. *et al.* Ligninolytic enzymes production and Remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 246-252, set. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822005000300008>.

MACHADO, K. M. G. *et al.* Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from brazilian ecosystems. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 37, n. 4, p. 481-487, dez. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822006000400015>.

MACHADO, S.; SILVA LILGE, D.; LAZAROTTO, M. Crescimento In Vitro de *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes versicolor* em Meio de Cultura Suplementados com Serragem de Pinus sp. Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, v. 5, n. 2, 14 fev. 2020. Disponível em: <https://periodicos.unipampa.edu.br/index.php/SIEPE/article/view/65587> Acesso em: 15. mar. 2023.

MACIEL, M. J. M., & Ribeiro, H. C. T. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.13, n. 6, p 14-15, 2010 Disponível em: [https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-](https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-34582010000600014&script=sci_arttext)

[34582010000600014&script=sci_arttext](https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-34582010000600014&script=sci_arttext) Acesso em: 21 Mar. 2023

MAHENDRAN, B.; RAMAN, N.; KIM, D. Purification and characterization of tannase from *Paecilomyces variotii*: hydrolysis of tannic acid using immobilized tannase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 445-451, 2006. doi: [10.1007/s00253-005-0082-y](https://doi.org/10.1007/s00253-005-0082-y)

MARTINEZ, M.V.; WHITAKER, J.R., The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trends in Food Science and Technology**, v.6, p.195- 200, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89054-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89054-8)

MESSERSCHMIDT, A.; HUBER, R. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin Modelling and structural relationships. **European Journal Of Biochemistry**, [S.L.], v. 187, n. 2, p. 341-352, jan. 1990. Wiley. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15311.x>.

MOREIRA NETO, S. L., MATHEUS, D. R., MACHADO, K. M. G. 2009. Influence of pH on the growth, laccase activity and RBBR decolorization by tropical basidiomycetes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 52: 1075-1082. doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000500003>

NOVOTNÝ, Č. *et al.* Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology And Biochemistry**, [S.L.], v. 36, n. 10, p. 1545-1551, out. 2004. Elsevier BV. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.019>.

NSENGUMUREMYI, D. *et al.* The Potential Application of Nanoparticles on Grains during Storage: part 2 :: an overview of inhibition against fungi and mycotoxin biosynthesis. **Mycotoxins And Food Safety**, [S.L.], 7 out. 2020. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.93213>.

OKAL, E. J. *et al.* Mini review: Advances in understanding regulation of cellulase enzyme in white-rot basidiomycetes. **Microbial Pathogenesis**, v. 147, p. 104410, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104410>

ORLANDELLI, R. C, *et al.* Encontro Internacional de Produção Científica VIII EPCC, 8., Maringá. **AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE BASIDIOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Piper hispidum* NA PRESENÇA DOS CORANTES PRETO DIRETO E TURQUESA G REATIVO**. Maringá: Universidade Cesumar, 2013. 4 p. Disponível em: <https://www.unicesumar.edu.br/epcc-2013/trabalhos/> Acesso em: 15 Mar. 2023.

PALMIERI, G. *et al.* Copper Induction of Laccase Isoenzymes in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 66, n. 3, p. 920-924, mar. 2000. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.66.3.920-924.2000>.

PEREIRA, A. R. B, *et al.* BIODEGRADAÇÃO DE CORANTES E EFLUENTES TÊXTEIS POR FUNGOS. *Holos Environment*, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 165, 8 jul. 2010. Lepidus Tecnologia. <http://dx.doi.org/10.14295/holos.v10i2.2156>.

POINTING. S, *et al.* Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 57, n. 1-2, p. 20-33, 1 out. 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s002530100745>.

POLIZELI, M. L. T. M.; RAI, M. *Fungal Enzymes*. **1 ed. Boca Raton: CRC press**, 2014 doi: <https://doi.org/10.1201/b15247>

RAMOS, L. P. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agro-industriais. In: Seminário Nacional sobre Reuso/Reciclagem de Resíduos Sólidos Industriais. São Paulo, 2000. Disponível em http://www.lamam.ufscar.br/files/2010/07/artigo_pretratamento.pdf Acesso em: 27 Fev. 2023.

RANI, Babita *et al.* Bioremediation of dyes by fungi isolated from contaminated dye effluent sites for bio-usability. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 45,

n. 3, p. 1055-1063, set. 2014. FapUNIFESP (SciELO). doi: <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822014000300039>.

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 doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.11.001>

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, 2004 doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-84042004000200001>

RUIZ-DUENAS, F. J. et al. Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. **Journal Of Experimental Botany**, [S.L.], v. 60, n. 2, p. 441-452, 6 jan. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ern261>.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. Enzymes as biotechnological agents. **Editora Legis Summa, São Paulo, Brazil**, p. 1-8, 2004. ISBN: 85-904377-1-X

SAID, S; PIETRO, R. C. L. R. Enzimas de interesse industrial e biotecnológico. Editora Eventos, Rio de Janeiro, 2002. doi: <https://doi.org/10.19142/rpq.v3i5.83>

SALES, P. D. T. F., CAMPOS, L. C., SCHIMIDT, F., VALADARES, M. C., & SANTIAGO, M. F. (2012). Estudo da tratabilidade de efluente da indústria farmacêutica por meio dos fungos *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune* e fotocatalise. **REEC-Revista Eletrônica de Engenharia Civil**, v. 5, n. 1, 2012. Doi: <https://doi.org/10.5216/reec.v5i1.20257>

SANTANA, M, D, F., et al. Fenoloxidase e biodegradação do corante têxtil Azul Brilhante de Remazol R (RBBR) para três espécies de macrofungos coletadas na Amazônia. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia** v. 11, n. 2, p. 53-60, 2017. Disponível em: <https://revista2.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios/article/view/2196>
Acesso em: 10 Jan. 2023.

SHAKHOVA, N. et al. Revealing new active and biotechnologically perspective producers of oxidative and cellulolytic enzymes among pure cultures of xylotrophic Agaricomycetes from the Southern Non-Chernozem zone of the European part of Russia. **Current Research In Environmental & Applied Mycology**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 113-119, 2020. Mushroom Research Foundation. <http://dx.doi.org/10.5943/cream/10/1/12>.

SHORTLE, W. C.; DUDZIK, K. R. Wood decay in living and dead trees: A pictorial overview. Gen. Tech. Rep. NRS-97. **Newtown Square, PA: US Department of Agriculture, Forest Service, Northern Research Station**. 26, p. 1-26, 2012.

STANGERLIN, D. M., COSTA, A. F., GARLET, A., PASTORE, T. C. M. Resistência natural da madeira de três espécies amazônicas submetidas ao ataque de fungos apodrecedores. **Revista Ciência da Madeira (Brazilian Journal of Wood Science)**, v. 4, n. 1, p. 10-12953, 2013 Disponível em: <https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/cienciadamadeira/article/view/4056> Acesso em: 20 Mar. 2023.

WONG, Dominic W. S. et al. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [S.L.], v. 157, n. 2, p. 174-209, 26 jun. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-008-8279-z>.

YANG, Zhu L. et al. Molecular techniques revolutionize knowledge of basidiomycete evolution. **Fungal Diversity**, [S.L.], v. 50, n. 1, p. 47-58, 26 jul. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-011-0121-1>.

ZHENG, Fei et al. Immobilization of laccase onto chitosan beads to enhance its capability to degrade synthetic dyes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [S.L.], v. 110, p. 69-78, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.03.004>.