

Descoloração do corante Índigo Carmim e produção de Lacase por fungos filamentosos

D. G. Almeida¹; M. G. C. Silva¹; R. C. M. Miranda²; C. C. S. Maciel²;
N. B. Gusmão²

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife-Pe, Brasil

²Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife-Pe, Brasil

darnebio@yahoo.com.br

(Recebido em 02 de setembro de 2011; aceito em 03 de maio de 2012)

As indústrias têxteis têm contribuído largamente para a contaminação ambiental, devido à grande produção de resíduos, incluindo os corantes, que são geralmente mutagênicos e carcinogênicos. A alta estabilidade e o caráter comumente recalcitrante dos corantes não favorecem as técnicas convencionais de degradação, sendo os microrganismos alternativa bastante recorrida. As lacases fúngicas estão recebendo grande atenção porque dentre várias aplicações, uma delas é o clareamento de corantes. Este estudo objetivou selecionar fungos com potencial para descoloração do corante índigo carmim bem como para produção de lacase, visando a otimização desses processos. Trinta e sete fungos isolados do solo do Rio Beberibe-Recife-PE, após seleção prévia de descoloração e produção da enzima, foram submetidos a um planejamento fatorial fracionado (2^{6-3}) com dois níveis e três pontos centrais gerando 11 corridas. Os resultados obtidos neste trabalho selecionaram 56,75% fungos como sendo produtores de Polifenoloxidasas, dos quais 14 se mostraram bons produtores de lacase. O fungo FDG 36, posteriormente identificado como *Penicillium* sp., se destacou no ensaio de descoloração, tendo descolorido o corante após 120h. Não houve influência significativa das variáveis estudadas nos processos de otimização, sugerindo o estudo de novas variáveis para *Penicillium* sp.

Palavras-chave: descoloração; fungos filamentosos; lacases fúngicas; corante índigo carmim

Textile industries have largely contributed to environmental contamination due to the large production of wastes, including dyes, which are usually mutagenic and carcinogenic. The high stability and character of the dyes commonly recalcitrant does not favor the conventional techniques of degradation, the microorganisms are enough alternative defendant. Fungal laccases are receiving much attention because of several applications, one is the bleaching of dyes. This study aimed to select fungi with potential for decolourisation of indigo carmine as well as for laccase production, to optimize these processes. Thirty-seven fungi isolated from soil of Rio Beberibe-Recife-PE, after previous selection of discoloration and enzyme production were subjected to a fractional factorial design (2^{6-3}) with two levels and three central points generating 11 races. The results of this study selected 56.75% fungi as producers of polyphenoloxidase, 14 of which showed good producer of laccase. The fungus FDG 36, later identified as *Penicillium* sp, stood the test of discoloration, and the colorless dye after 120h. There was no significant influence of the variables in the optimization process, suggesting the study of new variables to *Penicillium* sp.

Keywords: discoloration; fungi; fungal laccase; indigo carmine dye

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 100 anos, milhões de compostos coloridos têm sido sintetizados, sendo que 10.000 são produzidos em escala industrial. Entre estes, estima-se que 20 % estão disponíveis para a indústria têxtil. Isto porque cada tipo de fibra a ser colorida requer corantes com características próprias [1].

A molécula de corante utilizada para tingimento da fibra têxtil pode ser dividida em duas partes, sendo a primeira o grupo cromóforo e a segunda a estrutura responsável por sua fixação à fibra [2]. Os corantes indigóides são os de maior uso na indústria têxtil, com aplicações também na indústria de papel e celulose e indústria alimentícia. Os indigóides possuem uma estrutura molecular complexa, o que o torna mais estável quimicamente e mais

resistente aos processos de biodegradação e de remoção mais comumente utilizados para tratamento de efluentes [3].

O corante índigo carmim é um corante muito utilizado na indústria alimentícia, fabricação de cápsulas como um pigmento solúvel, empregado como corante de contraste para a mucosa colorretal para melhor visualização de lesões detectadas pela colonoscopia, e é também usado como agente complexante para a análise de cobre por espectrofotometria. Entretanto, seu principal emprego acontece nas indústrias têxteis [4].

As indústrias têxteis têm contribuído largamente para a contaminação ambiental, devido à grande produção de resíduos com baixos níveis de degradação, incluindo corantes provenientes das etapas de tingimento, sendo descartados efluentes com intensa coloração. Não obstante, este tipo de efluente possui uma composição extremamente variável, devido à diversidade dos corantes utilizados diariamente [5]. A presença de apenas um miligrama de corante por litro de água é suficiente para colorir pelo menos parcialmente um manancial. Como resultado, a luz solar deixa de atingir as plantas aquáticas, impedindo a fotossíntese e adequada reprodução. Como consequência, os peixes têm a oferta de alimentos e oxigênio reduzida [6].

A preocupação com a estética e qualidade do ambiente atingido por efluentes coloridos leva à busca de alternativas de descoloração, especialmente de corantes têxteis [7]. Há diversas formas de tratamento para os efluentes têxteis: físicos, químicos e biológicos. Os microrganismos vêm sendo intensamente estudados com a finalidade de remover compostos tóxicos do ambiente. As pesquisas sobre degradação de compostos químicos têm mostrado que bactérias e fungos são extremamente versáteis em degradar substâncias recalcitrantes [8].

A lacase é uma polifenoloxidase produzida por diversos fungos, plantas e bactérias [9,10,11]. A enzima catalisa a oxidação de substratos fenólicos, tendo o O₂ molecular como agente para regeneração da forma ativa da enzima. Em geral as lacases contêm 4 átomos de cobre por molécula de enzima, embora existam enzimas com 2, 3 ou 6 átomos de cobre [9]. As lacases são produzidas pela maioria dos fungos de decomposição branca, tais como *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus sp.*, etc., além de diversos ascomicetos que apresentam como vantagem aos fungos basidiomicetos o fato de crescer mais rapidamente em laboratório [12]. As lacases fúngicas estão recebendo grande atenção em várias aplicações industriais, devido à capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, como a deslignificação, produção de etanol, modificação de fibras da madeira, clareamento de corantes e remediação de solos e águas contaminados [13].

A relevância deste trabalho se dá pela urgência de processos de remediação eficientes, que atenuem os impactos causados pelo descarte irregular dos efluentes da indústria têxtil. Sendo assim, objetivou-se avaliar, bem como otimizar a descoloração do corante Índigo Carmim e a produção de Lacases por fungos de modo a potencializar suas aplicações em processos industriais ou na biorremediação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Fungos Filamentosos

Foram utilizados trinta e sete fungos filamentosos isolados do solo da margem do Rio Beberibe-Recife-PE, os quais se encontram estocados no Laboratório de Fármacos e Ensaio Antimicrobianos do Departamento de Antibióticos – UFPE, mantidos sob refrigeração em Meio Extrato de Malte Agar (MEA).

2.2 Corante

O corante índigo Carmin foi obtido comercialmente da empresa Sigma (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA Aldrich).

2.3 Seleção Qualitativa dos Fungos produtores de Polifenoloxidasas

A fim de selecionar os microrganismos potencialmente produtores das enzimas polifenoloxidasas, blocos de gelose de aproximadamente seis milímetros com fungos previamente crescidos em Extrato de Malte Agar (MEA) foram inoculados em meio sólido Bushnell Hass (BH) [14], acrescido de 0,5% de ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) e incubados a $30^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante cinco dias. Ao longo deste período foi observada a formação quinonas visualizadas através de um halo em torno do micélio com coloração âmbar característico da "Reação de Bavendamm" [15].

2.4. Produção da Lacase

Para verificar a produção de lacase, três discos de gelose de aproximadamente seis milímetros dos fungos previamente crescidos em Extrato de Malte Agar (MEA) foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL de volume contendo 50 mL de *Solução de Manachini* [16] acrescidos de 0,5% de ácido tânico e incubados durante 72 horas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1$ em condição estática. Após esse período, as amostras de cada frasco foram filtradas e o extrato enzimático submetido à análise da atividade da lacase.

2.4.1 Atividade da Enzima Lacase

A atividade da lacase foi determinada usando 2,2-azino-bis-etilbentiazolina (ABTS) de acordo com a metodologia determinada por Buswell et al. (1995) [17]. A mistura reativa foi constituída de 0,1mL de tampão acetato de sódio a 0,1M (pH 5,0), 0,8mL de uma solução de ABTS a 0,03% (m/v) e 0,1mL do extrato enzimático. A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento no aumento da absorbância a 420nm.

2.5 Ensaio prévio de Descoloração

Os fungos selecionados na etapa anterior foram avaliados quanto ao seu potencial em descolorir o corante índigo carmim em placas multipoços. Em cada poço foram adicionados 1,5 mL do meio de Kirk [18], 50 μL do corante Índigo Carmim (0,2%) e 200 μL do inoculo, incubadas a 30°C por 120 horas sendo observada a descoloração do corante a cada 24 horas, através de uma leitura visual. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

2.6 Ensaio de Descoloração em frascos de Erlenmeyer

O fungo selecionado foi submetido a um ensaio de descoloração em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL do meio Kirk, três blocos de gelose do fungo e o corante Índigo Carmim (0,3%), incubadas a 30°C por 120 horas. A fim de determinar a taxa de descoloração foram realizadas leituras a cada 24h em dois comprimentos de onda 410nm e 420nm.

2.7 Planejamento Experimental

Com o melhor fungo selecionado na etapa anterior foi realizado um planejamento experimental a fim de obter as melhores condições operacionais. Para isto foi aplicado um Planejamento Experimental Fatorial Fracionado (2^{6-3}) com dois níveis (-1 e +1), e três pontos centrais gerando onze experimentos. As variáveis estudadas foram: concentração de sulfato de cobre (CuSO_4), concentração de Extrato de Levedura, concentração de Glicose, concentração do corante, pH e temperatura como variáveis independentes e produção enzimática como variável dependente (Tabela 1). Os onze experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer contendo 50mL de meio Kirk nas concentrações e condições estabelecidas no planejamento experimental.

2.8 Identificação do Fungo Selecionado

Para identificação em nível de gênero do fungo com maior potencial para descolorir o corante nas condições testadas, foram realizadas análises macroscópicas com observação do crescimento micelial, cor e textura além de visualizações microscópicas de conídio, conidióforo e conidiósporos.

Tabela 1: Planejamento experimental utilizado para estabelecer as melhores condições do processo.

Corridas	Concetração de Glicose g/L	Concetração de Ext.Lev. g/L	Concetração de CuSO4 g/L	pH	Temperatura	Concetração do Corante g/L
1	0	0,05	0,028	8	35	0,08
2	0	0,15	0,028	6	25	0,08
3	10	0,05	0,028	6	35	0,02
4	10	0,15	0,028	8	25	0,02
5	0	0,05	0,07	8	25	0,02
6	0	0,15	0,07	6	35	0,02
7	10	0,05	0,07	6	25	0,08
8	10	0,15	0,07	8	35	0,08
9 C	5	0,1	0,049	7	30	0,05
10 C	5	0,1	0,049	7	30	0,05
11 C	5	0,1	0,049	7	30	0,05

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção Qualitativa dos Fungos produtores de Polifenoloxidas.

A confirmação positiva para a reação de Banvendamm foi observada através de uma zona de cor âmbar ao redor dos micélios (Figura 1). Como resultado, 56,75% dos trinta e sete fungos testados apresentaram-se positivos para produção das enzimas Polifenoloxidas.

Souza et al., (2008) [19], estudaram linhagens de Basidiomycetes oriundas de áreas de floresta da Amazônia, das quais 50% apresentaram halo, sendo positivas para produção deste grupo de enzimas. Gomes (2007) [20] testou 50 fungos filamentosos isolados do sedimento de manguezal, dos quais 21 apresentaram reação positiva através do aparecimento de uma zona de difusão acastanhada (âmbar) ao redor da colônia, indicando a oxidação do ácido gálico. Conceição et al., (2005) [15] analisaram 257 fungos filamentosos dos quais 43% apresentaram formação de halo, indicando a presença de polifenoloxidas. Todos esses resultados corroboram o presente trabalho, onde foi empregada a mesma técnica de Bavendamm para caracterizar qualitativamente a atividade das Polifenoloxidas.



Figura 1: A - Halo em torno do micélio indicando atividade de Polifenoloxidas.
B - Placa de controle negativo, sem halo.

3.2 Atividade da Enzima Lacase

Dos 21 fungos previamente selecionados, 14 mostraram atividade enzimática para a lacase bastante significativa, acima de 4000 U/L, após o 3º dia de incubação, tendo o ácido tânico

como substrato indutor (Figura 2). Dentre estes, destacaram-se os fungos FDG 06 (5180 U/L), FDG 13 (5240 U/L) e FDG 29 (5750 U/L).

Em cultivos de fungos, a atividade da lacase pode ser aumentada com a adição de diferentes compostos no meio. Ferreira (2009) [21] obteve, no nono dia, atividade máxima para lacase entre 400 e 450 U/L, após cultivar *Pleurotus sajor-caju* em diferentes meios contendo vinhaça ou somente em vinhaça. Valeriano *et al.*, (2009) [22] obtiveram atividade máxima de 2019 U/L e 1035 U/L para lacase quando o fungo *Pynoporus sanguineus* foi cultivado em meio contendo 2,5 - xilidina e etanol como substrato indutor, respectivamente.

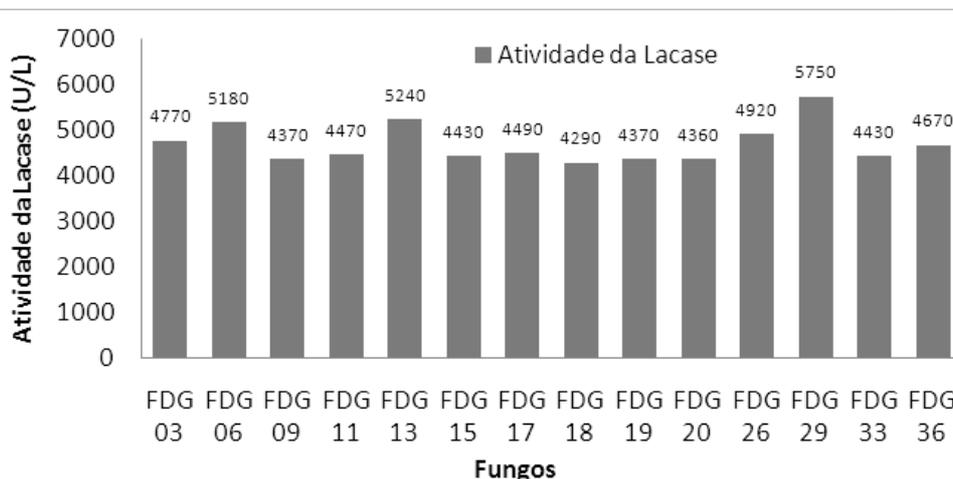


Figura 2: Atividade da Lacase em U/L pelos fungos filamentosos isolados do solo da margem do Rio Beberibe.

3.3 Ensaio prévio de Descoloração

Dos fungos selecionados previamente e submetidos ao ensaio de descoloração, o FDG 36 foi o que apresentou o melhor perfil de descoloração em placas multipoços (Figura 3), tendo sido capaz de promover a descoloração do corante índigo carmim no período de 120h, enquanto os outros fungos só descoloriram o corante índigo carmim parcialmente no mesmo período. A utilização de placas multipoços como metodologia para identificação de fungos metabolizadores de corante mostrou-se bastante promissora, pois foi possível realizar uma triagem primária diante de um número maior de fungos, bem como, mostra-se útil devido ao baixo custo e ser uma técnica de fácil execução.



Figura 3: Descoloração do corante índigo carmim após 120h. As setas brancas indicam o melhor resultado, correspondendo ao fungo FDG 36. As setas escuras indicam o controle negativo.

Segundo Silva *et al.*, (2009) [23], quanto menor o tempo de biodegradação de um resíduo por um microrganismo, mais este se torna promissor em processos de descoloração e descontaminação de ambientes ou de resíduos contaminados.

3.4 Ensaio de Descoloração em frascos de Erlenmeyer

Os resultados para produção da enzima lacase e para a taxa de descoloração pelo fungo FDG 36 estão apresentados nas figuras 4 e 5, respectivamente. Os dados mostram que o máximo de produção da enzima ocorreu logo após o 2º dia (em torno de 800 U/L), permanecendo constante a partir do 4º dia (em torno de 700 U/L). Também se observa que a maior taxa de descoloração (em torno de 30% para ambos os comprimentos de onda) ocorreu entre os 2º e 3º dias, coincidindo com o máximo de produção da enzima.

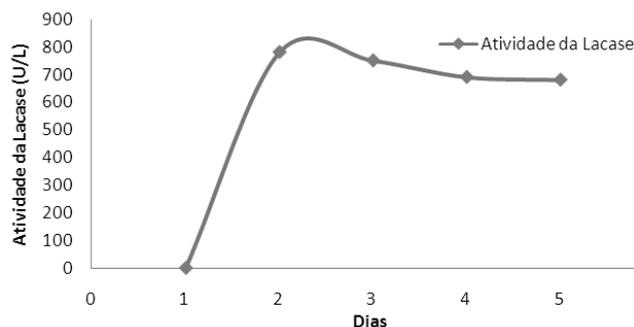


Figura 4. Produção de Lacase pelo fungo FDG

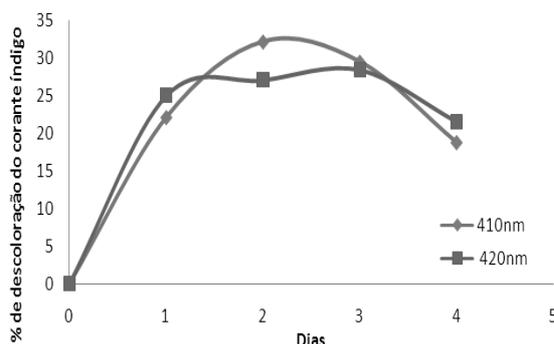


Figura 5 Taxa de descoloração do corante Índigo Carmim pelo fungo FDG 36.

Máximo e Costa-Ferreira (2004) [24] obtiveram esse mesmo comportamento, onde a maior produção de atividade de lacases por *Irpex lacteus* coincidiu com a descoloração do Azul Reativo 19 e do Preto Reativo.

Os resultados para o fungo FDG 36 foram submetidos a uma análise estatística, onde se observou que entre os valores de produção da enzima houve diferença estatística significativa (com valor de $p=0,016$), sendo necessário escolher o dia em que houve melhor produção. Já entre os dois comprimentos utilizados nas leituras (Figura 6), não se observou diferença estatística significativa ($p>0,05$). Quando realizada a análise estatística para os dias do processo de descoloração notou-se que ocorreu diferença estatística significativa (com $p=0,00047$), sendo necessário escolher qual o melhor dia do processo.

3.5 Planejamento Experimental

Ao final do planejamento fatorial, todas as corridas analisadas apresentaram atividade de Lacase acima de 1000 U/L, com destaque para as corridas 4, 7, 9, 10 e 11 (com atividade acima de 3000 U/L), sugerindo que a presença do corante Índigo Carmim exerce influência sobre a

produção de lacase (Figura 6). Yamanaka *et al.*, (2007) [25], constataram a influência do corante RBBR sobre a atividade de lacases produzidas por *Psilocybe castanella*, onde este, na ausência do corante, foi capaz de produzir 25 U/L em 15 dias de cultivo, e na presença, produziu cerca de 100 U/L desta atividade enzimática aos 12 dias de cultivo. Yamanaka et al (2008) [18] observaram a produção de enzima lacase pelo fungo *Trametes villosa* durante todo o seu crescimento e sob diferentes condições de cultivo. Um maior rendimento foi observado quando o meio foi suplementado com o cobre. Bonugli-Santos *et al.*, (2010) [26], estudaram a produção de lacase, manganês-peroxidase e lignina peroxidase pelos fungos *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, 857 *Cladosporium cladosporioides* CBMAI e *Mucor racemosus* CBMAI 847 isolados de ambiente salino e cultivados em extrato de malte. Quando estes fungos foram cultivado neste mesmo meio contendo glicose e farelo de trigo, houve inibição na produção de lignina peroxidase, enquanto as enzimas lacase e manganês-peroxidase tiveram sua produção aumentada.

Em relação à descoloração (Figura 6), a corrida 3 obteve o melhor resultado, onde se observou taxa de descoloração acima de 60% após os cinco dias do experimento. Já as corridas 2, 4, 7 e 10 não apresentaram taxa de descoloração expressiva. Ambrósio e Campos-Takaki (2004) [27] relataram que *Cunninghamella elegans* foi capaz de clarear 83% da cor do Orange II em meio contendo sacarose e peptona após 96 h de tratamento e na ausência de sacarose, a descoloração do corante reduziu para 48% em relação ao mesmo período de tempo. Radha et al. (2005) [28] obtiveram descoloração de 99% para "Violeta de metila", "Laranja" e "IVA Majenta" por *Phanerochaete chrysosporum* em concentrações iniciais de 0,05 g / L na temperatura de 35°C e pH 4,5.

O Gráfico de Pareto para produção enzimática (Figura 8) revela que nenhuma das variáveis estudadas influenciou significativamente no processo ($p > 0,05$). Outro dado importante que se observa no gráfico é que a temperatura influencia de forma negativa no processo.

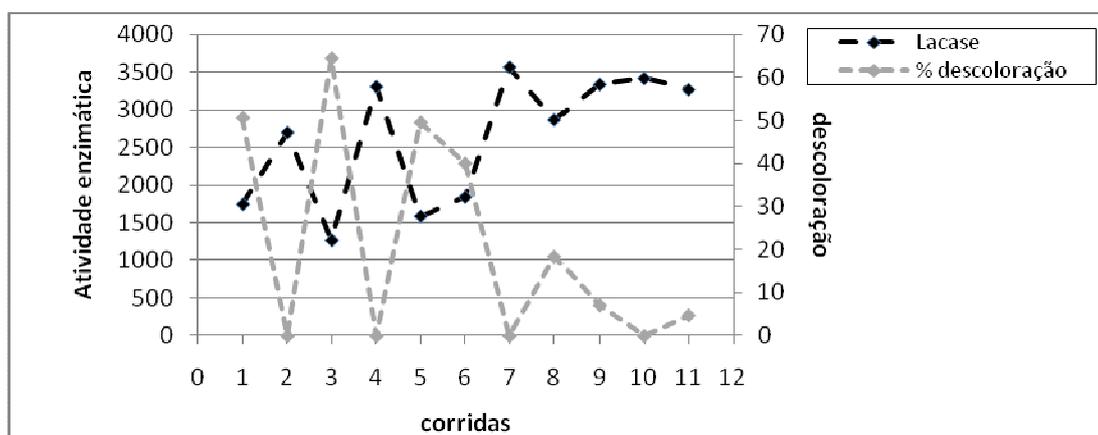


Figura 6: Percentual de descoloração e produção de lacase pelo fungo FDG 36 após cinco dias de cultivo utilizando corante Índigo Carmin como substrato.

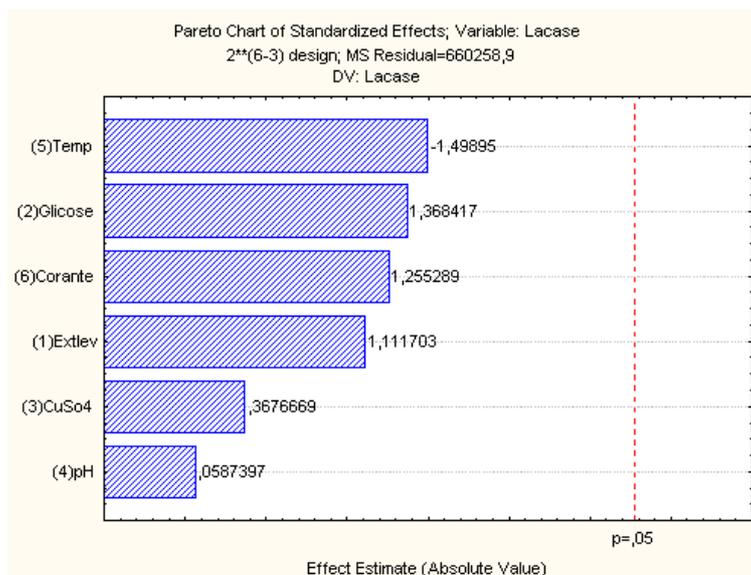


Figura 7: Gráfico de Pareto, demonstrando a influência das variáveis na produção da Lacase.

A análise estatística das corridas para produção enzimática mostrou que há diferença estatística significativa entre elas (com $p=0,00036$). Neste sentido, a corrida 7 foi a que demonstrou ter as melhores condições, e com exceção da corrida 10, todas apresentaram diferença estatística significativa ($p= 0,000054$), reforçando que a corrida sete foi a que apresentou as condições mais promissoras para o processo.

O Gráfico de Pareto para descoloração (Figura 9) também não apresentou influência estatística significativa das variáveis no processo ($p>0,05$). No entanto, somente duas das variáveis estudadas (pH e temperatura) poderiam influenciar positivamente no processo.

3.5 Identificação do Fungo Selecionado

As análises morfológicas dos aspectos macroscópicos da colônia e microscópicos das estruturas reprodutivas do fungo FDG 36 permitiu sua identificação em nível de gênero, se tratando este do gênero *Penicillium*. O gênero *Penicillium* pertence ao filo Ascomycota, fazendo parte do grupo dos chamados fungos mitospóricos. Diversas pesquisas aplicadas têm mostrado o enorme potencial para os fungos desse gênero, podendo ser utilizados no biocontrole, microparasitismo, secreção de metabólitos secundários, fonte de novos fármacos, fonte de enzimas de interesse industrial, entre outros [29].

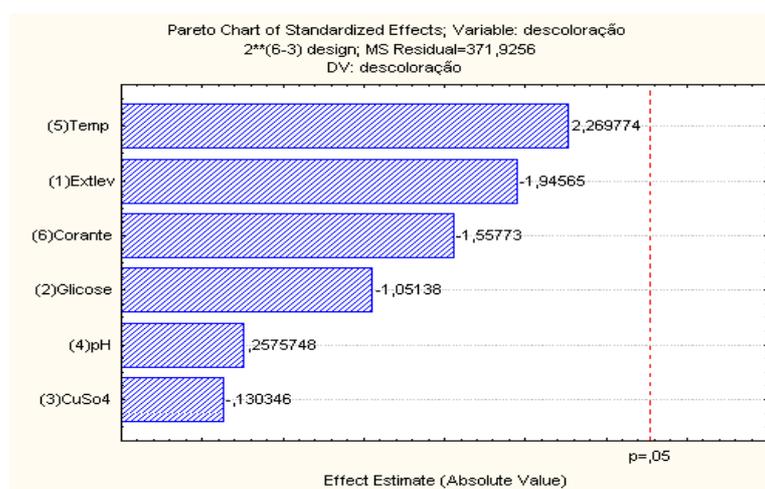


Figura 8: Gráfico de Pareto, demonstrando a influência das variáveis na descoloração do corante Índigo Carmim.

Marciel et al (2010) [30], por exemplo, demonstraram a capacidade de *Penicillium spp* em produzir biomassa utilizando querosene de aviação.

Os fungos mitospóricos também têm o potencial de descolorir efluentes têxteis por enzimas lignolíticas e substâncias de baixo peso molecular, tais como espécies reativas de oxigênio, radical hidroxila e íons Fe [31]. Shedbalkar et al (2008) [32], por exemplo, relataram que *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 descoloriu 93% do corante trifenilmetano em condição estática em pH 6,5 a 25 ° C em apenas duas horas e meia de cultivo.

4. CONCLUSÃO

O fungo

-
1. GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. N.; Corantes têxteis. *Quím. Nova.* v.23, 71-78, 2000.
 2. KUNZ, A. et al.; Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis. *Quím. Nova.* v. 25, n. 1, p. 78-82, jan./fev. 2002.
 3. CHAVES, K. O. et al., Adsorção de índigo carmim em biomassas mortas de *Aspergillus niger*. *Eng. sanit. ambient.* Vol.13 - Nº 4 - 351-355 - out/dez 2008.
 4. LOPES, R. P.; *Estudo de processos alternativos para a degradação de compostos de relevância ambiental com monitoramento dos produtos formados por Espectrometria de Massas com Fonte de Ionização Electrospray (ESI-MS)*. Dissertação (Mestrado em Química – Química Analítica) – Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química, Belo Horizonte, 2008.
 5. DELLAMATRICE, P. M. *Biodegradação e Toxicidade de Efluentes Têxteis e Efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Americana- SP, 2003, 137f*. Tese (Doutorado em Ecologia de Agrossistemas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.
 6. DURRANT, L. R.; Fungos e Bactérias Degradam Corantes Poluidores. *Jornal da Unicamp.* v. 3, 2003.
 7. YOUNG, L. & YU, J.; Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes. *Wat. Res.* Vol. 31, No. 5, pp. 1187-1193. 1997.
 8. BARR, D. P. & AUST, S. D.; Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science and Technology*, v.28, n.2, p. 78-87, 1994.
 9. MCGUIRL, M. A. & DOOLEY, D. M. Copper-containing oxidases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* V.3, 138-144, 1999.
 10. LUIS, P.; WALTHER, G.; KELLNER, H.; MARTIN, F.; BUSCOT, F.; Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. *Soil Biology & Biochemistry.* v.36, 1025-1036, 2004.
 11. CLAUS, H.; Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron.* V.35, 93-96, 2004.
 12. GIL, E.S.; MULLER, L.; SANTIAGO, M.F.; GARCIA, T.A.; Biosensor Based on Brut Extract from Laccase (*Pycnoporus sanguineus*) for Environmental Analysis of Phenolic Compounds. *Portugaliae Electrochimica Acta.* 27(3), 215-225, 2009.
 13. NETO, M.; SÉRGIO, L. *Enzimas Lignofílicas produzidas por Psilocybe castanella CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno.* 2006, 110f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.
 14. ATLAS, R.M.; Bioremediation of petroleum pollutants. *International Bioremediation & Biodegradation.* P. 317 – 327, 1995.
 15. CONCEIÇÃO, D.M.; ANGELIS, D. A.; BIDOIA, E.D.; ANGELIS, D. F.; Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.72, n.1, p.99-106, jan./mar., 2005.
 16. MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G.; PARINI, C. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters*, v. 9, n. 3, p. 219-224, 1987.
 17. BUSWELL, J.K., CAI, Y.J., CHANG, S.T. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letter* 128:81-8. 1995.
 18. YAMANAKA, R.; SOARES, C. F.; MATHEUS, D. R.; MACHADO, K. M. G.; Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* ccb176 under different culture conditions. *Brazilian Journal of Microbiology.* 39:78-84 ISSN 1517-8382, 2008.

19. SOUZA, H.Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 28(Supl.): 116-124, dez. 2008.
20. GOMES, D. N. F. *Diversidade e Potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal barra das jangadas, jaboatão dos guararapes, Pernambuco*. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Universidade de Pernambuco, 2007.
21. FERREIRA, L. F. R. *Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungos*. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2009.
22. VALERIANO, V.S.; SILVA, A. M. F.; SANTIAGO, M.F.; BARA, M.T. F.; GARCIA, T. A. Production of laccase by *Pycnoporus sanguineus* using 2,5 - xylidine and ethanol. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40: 790-794, 2009.
23. SILVA, M. F.; AZEVEDO, L. M. L.; GOMES, E. B.; SENNA, K.X.F.R; MIRANDA, R. C. M. ; GUSMAO, N. B. . Descoloração de Efluentes Têxteis por Bactérias Isoladas de Ambientes Contaminados por Petroderivados. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal. Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos.
24. MÁXIMO, C; COSTA-FERREIRA, M. Decolourisation of reactive textile dyes by *Irpex lacteus* and lignin modifying enzymes. *Process Biochemistry* 39, 1475–1479, 2004.
25. YAMANAKA, R.; MACHADO, K. M. G. Influência do corante Azul Brillhante de Remazol R sobre o sistema enzimático ligninolítico de *Psilocybe castanella* CCB444 em meio de cultivo sintético. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1119-1121, jul. 2007.
26. BONUGLI-SANTOS, R.C.; DURRANT, L.R.; SILVA, M.; SETTE, L.D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by brazilian marine-derived fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 46: 32-37. 2010.
27. AMBROSIO, S.T.; TAKAKI, G.M.C.. Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. *Bioresour. Technol.* 91: 69-75. 2004.
28. RADHA, K.V.; REGUPATHI, I.; ARUNAGIRI, A.; MURUGESAN, T. Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. *Proc. Biochem.* 40: 3337-3345. 2005.
29. PALLU, A.P.S. *Potencial biotecnológico de fungos do gênero Penicillium e interação com cana-de-açúcar*. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESAL/USP. 2010.
30. MACIEL, C.C.S.; SOUZA, M.A.; GUSMÃO, N.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Produção de enzimas do complexo lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. *Exacta*. 8 (3): 299-305, 2010.
31. VITALI, V.M.V.; MACHADO, K.M.G.; ANDREA, M.M.; BONONI, V.L.R.. Screening Mitosporic Fungi for Organochlorides Degradation. *Braz. J. Microb.* 37: 256-261. 2006.
32. SHEDBALKAR, U.; DHANVE, R.; JADHAV, J. Biodegradation of Triphenylmethane dye cotton blue by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517. *J. Hazard. Mater.* 157: 472-479. 2008.