

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LÍVIA TEIXEIRA DUARTE

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE  
TIROSINASE NO EXTRATO BRUTO DE *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518**

GOIÂNIA, 2009.

LÍVIA TEIXEIRA DUARTE

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE  
TIROSINASE NO EXTRATO BRUTO DE *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518**

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> Dra. MARIA TERESA FREITAS BARA  
CO-ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> Dra. MARIÂNGELA FONTES SANTIAGO

GOIÂNIA, 2009

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**(GPT/BC/UFG)**

Duarte, Livia Teixeira.

D812p Produção e caracterização da atividade de tirosinase no extrato bruto de *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 [manuscrito] / Livia Teixeira Duarte. – 2009.

67f. : il., color., figs., qds., tabs.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Teresa Freitas Bara; Co-Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Mariângela Fontes Santiago.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 2009.

Bibliografia: f. 59-64.

Inclui lista de figuras, tabelas e de abreviaturas.

1. *Pycnoporus sanguineus* 2. Fungos 3. Tirosinase 3. Biotecnologia I. Bara, Maria Teresa Freitas. II Santiago, Mariângela Fontes. III. Universidade Federal de Goiás. **Faculdade de Farmácia**  
IV. Título.

CDU:582.282

LÍVIA TEIXEIRA DUARTE

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE  
TIROSINASE NO EXTRATO BRUTO DE *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Teresa Freitas Bara  
Orientadora

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Fabricia Paula de Faria  
(titular)

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Warde Antonieta da Fonseca-Zang  
(titular)

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Telma Alves Garcia  
(suplente)

*Aos meus pais Luiz Augusto e Márcia e aos meus irmãos Débora e Rafael pelo amor e carinho, dedicação, compreensão e contribuição nos momentos mais difíceis. À Deus pelas inspirações, paz e saúde.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, da sabedoria e da graça de poder concluir mais uma etapa de minha vida. Agradeço por sempre iluminar meus passos, dando-me força nos momentos mais difíceis desta caminhada, não me abandonando e permitindo que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais Luiz Augusto e Márcia pelo incentivo e contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores. Obrigada pela paciência infinita e crença absoluta na capacidade de realização a mim atribuída.

Aos meus irmãos Débora e Rafael pela paciência, pelo apoio e companhia, dividindo brigas, desafios e alegrias. À Débora pelas sugestões e correções e ao Rafael pela ajuda nos assuntos relacionados à informática.

Ao Rodrigo pelo companheirismo, pela presença constante em minha vida, incluindo idas noturnas ao laboratório, e por compreender a fase pela qual eu estava passando e minha falta de tempo quando o dever e o estudo me chamavam.

À Luciana, Patrícia e Leandro Mourão pela preciosa amizade e pelos momentos de descontração maravilhosos que surgem sempre que nos encontramos.

À Andreia Silva e Nara Augusta Lima pela confiança e longos anos de amizade. À Andreia por dividir comigo este sentimento de tensão frente ao mestrado.

À prima Luciana Silva pela fundamental e indispensável ajuda na formatação do trabalho.

À minha família (tios, primos, avós) e demais amigos pela alegria que trazem à minha vida.

À orientadora Prof<sup>ª</sup> Dra. Maria Teresa Freitas Bara pela competente orientação, ensinamentos, agradável convivência e empenho em me socorrer sempre que necessário.

Além de transmitir seus conhecimentos, transmitiu-me sua experiência e apoiou-me em minhas dificuldades.

À co-orientadora Prof<sup>ª</sup> Dra. Mariângela Fontes Santiago por permitir o uso do Laboratório de Enzimologia da Faculdade de Farmácia da UFG para o desenvolvimento da minha dissertação e pelas preciosas contribuições ao presente trabalho.

À Prof<sup>ª</sup> Dra. Telma Alves pela contribuição fundamental em diversas etapas do trabalho, em especial os ensinamentos sobre a lacase e seus inibidores, sem os quais teria sido impossível prosseguir.

À Joyce Batista Tiba pela amizade que surgiu a partir da tirosinase e por compartilhar momentos únicos de descobertas, decepções e alegrias durante a realização dos ensaios enzimáticos e dos testes com inibidores.

Aos demais colegas do Laboratório de Enzimologia pela convivência, pelo agradável ambiente de trabalho, propício à novas descobertas.

À equipe do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (LCQM/FF/UFG), em especial à Claudia, Ezequiane, Suzana e Luciana pela amizade, carinho e pela boa vontade em me receber e ajudar sempre que necessário.

À Lidiane Santana pela amizade e ensinamentos sobre gel de eletroforese e gel de atividade, que foram fundamentais para a realização dos meus experimentos.

À Dra. Marta Cristina Filippi por permitir o uso do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Arroz Feijão para a realização dos géis de eletroforese e atividade.

Ao Márcio Vinícius Cortes pela ajuda durante a realização dos géis e respostas às minhas frequentes dúvidas no campo da enzimologia.

*“De tudo ficaram três coisas:  
a certeza de que estamos começando,  
a certeza de que é preciso continuar,  
a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar.  
Façamos da interrupção um caminho novo,  
da queda, um passo de dança,  
do medo, uma escada,  
do sonho, uma ponte,  
da procura, um encontro!”*

*(Fernando Sabino)*

*“Paciência e perseverança tem o efeito mágico  
de fazer as dificuldades desaparecerem  
e os obstáculos sumirem.”*

*(John Quincy Adams)*

## RESUMO

### **Produção e caracterização da atividade de tirosinase no extrato bruto de *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518**

A tirosinase (E.C.1.14.18.1), também conhecida como polifenoloxidase ou catecolase, é uma enzima de interesse industrial que catalisa a o-hidroxilação de monofenóis (atividade monofenolase) e a subsequente oxidação do o-difenol resultante em o-quinonas reativas (atividade difenolase), usando oxigênio molecular. O *Pycnoporus sanguineus* (L. ex Fries) Murril, um fungo de decomposição branca (*white rot*) capaz de produzir a tirosinase, é amplamente distribuído na natureza, sendo encontrado em regiões de clima mais ameno e em florestas tropicais. A produção e caracterização da tirosinase produzida por *P. sanguineus* foi investigada. Foi realizada seleção de indutores, determinação da influência da luminosidade, biomassa e meios de cultura na produção de tirosinase, bem como o efeito de inibidores sobre a atividade enzimática. O extrato bruto enzimático foi caracterizado quanto ao pH ótimo, temperatura ótima e termoestabilidade. Os resultados obtidos demonstraram que o fungo produziu tirosinase intracelular e a mais alta atividade ocorreu com a utilização de 0,15% de L-tirosina como indutor, na presença de luz, com inóculo de 10 discos de micélio fúngico, meio caldo extrato de malte 2%, incubação à 30°C e agitação de 150 rpm, durante 2 dias. Ácido salicilhidroxâmico (SHAM) 6 mmol.L<sup>-1</sup> e feniltiouréia (PTU) 6 mmol.L<sup>-1</sup> inibiram 100% da atividade de tirosinase. Azida sódica 0,1 mmol.L<sup>-1</sup> inibiu 4,15% da atividade de tirosinase, enquanto nenhuma inibição foi observada após adição de fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) 0,1 mmol.L<sup>-1</sup>. Utilizando a L-dopa como substrato, o extrato bruto intracelular apresentou pH ótimo de 6,6, temperatura ótima de 45°C, baixa estabilidade à temperatura de 50°C, mantendo apenas cerca de 50% de atividade após 15 minutos de incubação. A produção da tirosinase foi comprovada através de eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante, tendo como controle positivo tirosinase fúngica comercial.

**Palavras-chave:** *Pycnoporus sanguineus*, fungos de decomposição branca, tirosinase, MBTH, biotecnologia.

## ABSTRACT

### **Production and characterization of tyrosinase activity in *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 crude extract**

Tyrosinase (E.C.1.14.18.1) is an enzyme of industrial interest that catalyses the o-hydroxylation of monophenols (monophenolase activity) and the oxidation of o-diphenols to reactive o-quinones (diphenolase activity), both reactions using molecular oxygen. *Pycnoporus sanguineus* (L. ex Fries) Murril, is a white rot fungi capable of producing tyrosinase and widely distributed in nature. It is found in regions of mild climate and in tropical forest. The production and characterization of tyrosinase from *P. sanguineus* were investigated. The selection of inductors, determination of the luminosity influence, biomass and culture media in the production of tyrosinase and the effect of inhibitors on enzyme activity were determined. The fungus produced intracellular tyrosinase and the higher activity was observed using 0.15% L-tyrosine as inducer, in the presence of light, with inoculum of 10 mycelium discs, medium malt extract broth 2%, incubation at 30°C, and constant agitation of 150 rpm, during 2 days. 6 mmol.L<sup>-1</sup> salicylhydroxamic acid (SHAM) and 6 mmol.L<sup>-1</sup> phenylthiourea (PTU) inhibited 100% of the tyrosinase activity. 0.1 mmol.L<sup>-1</sup> sodium azide inhibited 4.15% of tyrosinase activity, while no inhibition was observed after addition of 0.1 mmol.L<sup>-1</sup> of phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF). Using L-dopa as substrate, the intracellular crude extract presented optimum pH of 6,6, optimum temperature of 45°C, low stability at 50°C, maintaining about 50% of the activity after 15 min of incubation. The tyrosinase production was confirmed by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, using commercial fungal tyrosinase as positive control.

**Keywords:** *Pycnoporus sanguineus*, white-rot fungi, tyrosinase, MBTH, biotechnology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de ação da enzima tirosinase (HAGHBEEN & TAN, 2003).....	10
Figura 2 – Sítio ativo da enzima tirosinase (DURÁN <i>et al.</i> ,2002).....	11
Figura 3 - O fungo <i>P. sanguineus</i> em madeira e em meio de cultura BDA.....	21
Figura 4 – Placas de Petri contendo meio BDA e o fungo <i>P. sanguineus</i> na ausência e na presença de p-cresol.....	35
Figura 5 - Atividade de lacase no lisado e no sobrenadante de amostras de <i>P. sanguineus</i> .....	36
Figura 6 - Atividade de tirosinase no lisado e no sobrenadante de amostras de <i>P. sanguineus</i> .....	37
Figura 7 - Seleção de indutores para produção de tirosinase por <i>P. sanguineus</i> .....	38
Figura 8 - Seleção de substratos para atividade dopa oxidase da tirosinase.....	43
Figura 10 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%), sob condições desnaturantes, corado com solução de Coomassie a 0,1%.....	49
Figura 11 - Gel de eletroforese não desnaturante corado para atividade de tirosinase.....	51
Figura 12 - Determinação do pH ótimo do extrato bruto de tirosinase de <i>P. sanguineus</i> .....	53
Figura 13- Determinação da temperatura ótima do extrato bruto de tirosinase de <i>P. sanguineus</i> .....	54
Figura 14 - Determinação da termoestabilidade do extrato bruto de tirosinase de <i>P. sanguineus</i> .....	54
Figura 15 - Determinação da estabilidade no meio reacional do extrato bruto de tirosinase de <i>P. sanguineus</i> .....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Influência da concentração do indutor L-tirosina na produção de tirosinase por <i>P. sanguineus</i> .....	39
Tabela 2 - Influência da luminosidade na produção de tirosinase por <i>P. sanguineus</i> .....	39
Tabela 3 - Influência da biomassa na produção de tirosinase por <i>P. sanguineus</i> .....	40
Tabela 4 - Influência dos meios de cultura na produção de tirosinase por <i>P. sanguineus</i> .....	40
Tabela 5 – Atividades enzimáticas do extrato enzimático bruto de <i>P. sanguineus</i> medidas pelos métodos contínuo e descontínuo.....	41
Tabela 6 - Estabilidade da mistura reacional após o término da reação enzimática para atividade de tirosinase.....	42
Tabela 7 – Efeito de diferentes compostos sob atividade de lacase e tirosinase.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS – 2, 2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) sal diamônio

BDA – agar batata dextrose

DHPPA – ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico

DMF – N,N-dimetilformamida

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

L-dopa – L-3,4-diidroxifenilalanina

LiP – lignina peroxidase

MBTH – 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona

MnP – manganês peroxidase

PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil

PO – fenoloxidase

PPO – polifenoloxidase

PTU – feniltiouréia; feniltiocarbamida

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

Seringaldazina – 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeido azina

SHAM – ácido salicilhidroxâmico

# SUMÁRIO

1	Introdução.....	10
1.1	Função das tirosinases.....	10
1.2	Estrutura das tirosinases.....	11
1.3	Ocorrência das tirosinases .....	11
1.4	Tirosinases X lacases.....	13
1.5	Métodos de quantificação da tirosinase.....	14
1.6	Aplicações das tirosinases.....	17
1.7	O fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....	21
2	Objetivo.....	23
2.1	Objetivo Geral.....	23
2.2	Objetivos Específicos.....	23
3	Metodologia.....	24
3.1	Reagentes.....	24
3.2	Equipamentos.....	24
3.3	Origem e manutenção dos fungos.....	24
3.3.1	Meio de cultura para manutenção dos fungos.....	25
3.4	Condições de cultivo.....	25
3.4.1	Preparo do inóculo.....	25
3.4.2	Incubação.....	25
3.5	Pesquisa qualitativa de tirosinase (Agar “spot tests”).....	25
3.6	Produção enzimática.....	26
3.6.1	Seleção de compostos para produção de tirosinase.....	26
3.6.2	Influência da luminosidade na produção de tirosinase.....	27
3.6.3	Influência da biomassa na produção de tirosinase.....	27
3.6.4	Seleção de meios de cultura.....	27
3.7	Ensaio enzimático para atividade de lacase.....	28
3.8	Ensaio enzimático para atividade de tirosinase.....	28
3.9	Seleção de substratos para atividade de tirosinase.....	30

3.10	Teste de especificidade dos ensaios enzimáticos.....	30
3.10.1	Teste de especificidade do ensaio para lacase.....	30
3.10.2	Teste de especificidade do ensaio para tirosinase.....	30
3.11	Efeito de inibidores sob atividade de lacase e de tirosinase .....	30
3.12	Dosagem de proteínas totais.....	31
3.13	Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE).....	31
3.14	Coloração com Coomassie Blue.....	32
3.15	Determinação da atividade de tirosinase em gel de eletroforese.....	32
3.16	Caracterização bioquímica do extrato bruto de tirosinase de <i>P. sanguineus</i> .....	32
3.16.1	Determinação do pH ótimo.....	33
3.16.2	Determinação da temperatura ótima.....	33
3.16.3	Determinação da termoestabilidade.....	33
3.16.4	Determinação da estabilidade no meio reacional.....	33
3.17	Descoloração de corantes em meio líquido.....	34
4	Resultados e Discussão.....	35
4.1	Pesquisa qualitativa de tirosinase (Agar “spot tests”).....	35
4.2	Produção enzimática.....	36
4.2.1	Produção de lacase.....	36
4.2.2	Produção de tirosinase.....	36
4.2.3	Seleção de compostos para produção de tirosinase.....	37
4.2.4	Influência da luminosidade na produção de tirosinase.....	39
4.2.5	Influência da biomassa na produção de tirosinase.....	40
4.2.6	Influência dos meios de cultura na produção de tirosinase.....	40
4.3	Ensaio enzimático para atividade de tirosinase.....	41
4.4	Seleção de substratos para determinação da atividade de tirosinase.....	42
4.5	Teste de especificidade dos ensaios enzimáticos.....	44
4.5.1	Teste de especificidade do ensaio para lacase.....	44
4.5.2	Teste de especificidade do ensaio para tirosinase.....	44
4.6	Efeito de inibidores sob atividade de lacase e de tirosinase .....	45
4.7	Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE).....	49
4.8	Determinação da atividade de tirosinase em gel de eletroforese.....	50
4.9	Caracterização bioquímica do extrato bruto de tirosinase de <i>P. sanguineus</i> .....	52
4.9.1	Determinação do pH ótimo.....	52

4.9.2 Determinação da temperatura ótima.....	53
4.9.3 Determinação da termoestabilidade.....	54
4.9.4 Determinação da estabilidade no meio reacional .....	55
4.10 Descoloração de corantes em meio líquido.....	56
5 Conclusões.....	57
6 Perspectivas.....	58
Referências Bibliográficas.....	59
APÊNDICE - Tabelas apresentando os valores de desvio padrão relativo relacionados aos dados apresentados nas figuras do trabalho.....	65

## 1 INTRODUÇÃO

Fenoloxidasas são oxidoreduzantes que catalisam a oxidação de um amplo grupo de compostos aromáticos fenólicos e não-fenólicos. As fenoloxidasas estão subdivididas em duas subclasses: tirosinases e lacases, sendo que ambos os grupos reagem com oxigênio sem a necessidade de cofatores (DURÁN & ESPOSITO, 2000). Embora frequentemente confundidas com as lacases, as tirosinases pertencem a um grupo distinto (MAYER & STAPLES, 2002). Não raro os nomes genéricos fenoloxidasas (PO) e polifenoloxidasas (PPO) tem sido utilizados em diversas publicações para indicar ambas lacase e tirosinase (DURÁN *et al.*, 2002).

### 1.1 Função das tirosinases

A tirosinase (E.C.1.14.18.1), também conhecida como polifenoloxidase ou catecolase, é uma enzima que catalisa a *o*-hidroxilação de monofenóis (atividade cresolase ou “monofenolase”) e a subsequente oxidação do *o*-difenol resultante em *o*-quinonas reativas (atividade catecolase ou “difenolase”), ambas as reações utilizando oxigênio molecular (Figura 1) (MAYER, 1987). O produto liberado do sítio ativo das tirosinases, a *o*-quinona, sofrerá reações não-enzimáticas com vários nucleófilos, produzindo intermediários, que se associam espontaneamente em pigmentos castanho escuro, vermelhos ou pretos, denominados melanina (ESPÍN *et al.*, 1995a). A *o*-quinona formada é muito reativa e pode escurecer proteínas através de ligações covalentes ou auto-oxidação (DURÁN & ESPOSITO, 2000).

É a atividade monofenolase que distingue a tirosinase de outras enzimas polifenoloxidasas, tais como lacase e peroxidase (SANCHEZ-FERRER *et al.*, 1995).

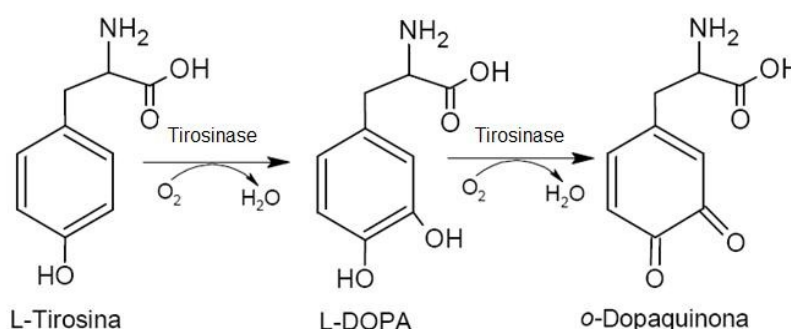


Figura 1 – Mecanismo de ação da enzima tirosinase (HAGHBEEN & TAN, 2003)

## 1.2 Estrutura das tirosinases

A tirosinase contém em seu sítio ativo um sistema binuclear apresentando um par de átomos de cobre. Esta enzima exibe um centro de cobre tipo 3 (DURÁN *et al.*, 2002), em que ligados aos átomos de cobre estão 6 moléculas de histidina (MIN *et al.*, 2001), conforme apresentado na Figura 2.

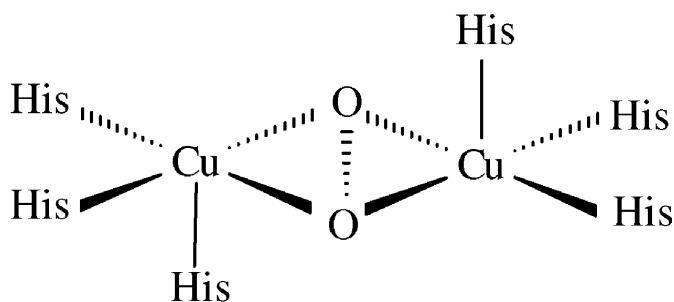


Figura 2 – Sítio ativo da enzima tirosinase (DURÁN *et al.*, 2002)

## 1.3 Ocorrência das tirosinases

As tirosinases estão presentes em mamíferos, invertebrados, plantas e microrganismos, nos quais estão envolvidas em diversas funções biológicas e apresentam considerável heterogeneidade (HALAOULI *et al.*, 2006).

Dentre as funções biológicas das tirosinases, destaca-se a produção da melanina. A melanina é um dos pigmentos mais amplamente distribuídos, sendo encontrada em bactérias, fungos, plantas e animais. A melanina é um polímero formado a partir da oxidação enzimática da tirosina, pela tirosinase. Existem dois tipos principais de melanina, que diferem entre si pela composição química, propriedades físicas e estruturais: eumelanina (de cor acastanhada) e feomelanina, de cor avermelhada ou amarela (SLOMINSKI *et al.*, 2004). A coloração da pele e cabelos dos mamíferos é determinada por uma série de fatores e o mais importante deles é o grau e distribuição da melanina. Este pigmento é formado em células especializadas denominadas melanócitos (SÁNCHEZ-FERRER *et al.*, 1995).

Os melanócitos absorvem radiação UV e sobrevivem sob considerável stress genotóxico. A pele é a principal barreira para o meio externo e é função dos melanócitos prover, dentre outras coisas, fotoproteção e termorregulação, através da produção de melanina. O grau de produção de pigmento manifesta-se nos diferentes fototipos da pele (coloração da pele e facilidade de bronzeamento) e é o mais útil indicador de risco de câncer de pele humano na população em geral (LYN & FISCHER, 2007).

As tirosinases foram primeiramente caracterizadas nos mamíferos devido ao seu papel no desenvolvimento de melanomas e por sua relação com os distúrbios de pigmentação, como o albinismo e o vitiligo, por exemplo. Nos seres humanos, a tirosinase confere pigmentação ao tecido epidérmico e absorve luz visível e luz ultravioleta (UV), protegendo as células vivas da pele (SLOMINSKI *et al.*, 2004).

As tirosinases fúngicas nativas são geralmente intracelulares e produzidas em quantidades limitadas, em resposta à baixas concentrações de fontes de carbono (HALAOULI *et al.*, 2006). Nos fungos, as tirosinases estão principalmente associadas ao escurecimento enzimático e à pigmentação. As melaninas da parede celular fúngica são derivadas da L-tirosina,  $\gamma$ -glutaminil-3,4-dihidroxibenzeno (GDHB) ou catecol, no caso de fungos basidiomicetos. As melaninas constituem um mecanismo de defesa e resistência ao stress causado por radiações UV, radicais livres, raios gama, desidratação e altas temperaturas, além de contribuir para a resistência da parede celular dos fungos frente às enzimas hidrolíticas, evitando assim a lise celular (BEEL & WHEELER, 1986). Nos fungos, o papel da melanina está correlacionado ainda com a diferenciação de órgãos reprodutivos e formação de esporos, virulência de fungos patogênicos e proteção tecidual após injúria. De modo geral, todas as tirosinases obtidas de diversas espécies de fungos têm propriedades similares (SEO *et al.*, 2003).

As tirosinases foram inicialmente estudadas devido ao escurecimento enzimático indesejável ocorrido nos alimentos (fungos comestíveis, frutas e vegetais) que acontece durante o amadurecimento ou deterioração no período de manipulação pós-colheita, responsável por qualidades sensoriais desagradáveis e perdas na qualidade nutricional do alimento (SEO *et al.*, 2003). Este escurecimento ocorre devido à oxidação enzimática de fenóis, resultando numa redução do prazo de validade do alimento, além da perda de seu valor nutritivo e do desenvolvimento de qualidades sensoriais desagradáveis. Em vista disso, observa-se que o estudo de inibidores é de fundamental importância para o desenvolvimento de novas abordagens que possam ajudar na regulação do processo de escurecimento enzimático. Diversos inibidores de tirosinase vem sendo identificados, sendo que diferentes tipos de compostos, tanto de origem vegetal quanto de origem sintética tem sido investigados. Os inibidores de origem natural tem um grande potencial na indústria de alimentos, uma vez que são considerados mais seguros e de certo modo livres de efeitos secundários adversos (SEO *et al.*, 2003). A prevenção do escurecimento enzimático tem sido um desafio para os cientistas de alimentos (ESPÍN *et al.*, 1995b; KIM *et al.*, 2005).

## 1.4 Tirosinases X lacases

As lacases (EC 1.10.3.2), também conhecidas como p-difenol: dioxigênio oxidoreductase, são enzimas multicobre pertencentes ao grupo das oxidases azuis. Podem ser divididas em dois grandes grupos que apresentam notáveis diferenças, sendo as lacases de plantas superiores e as lacases fúngicas (HARVEY & WALKER, 1999).

As lacases catalisam a oxidação de uma ampla variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, incluindo difenóis, polifenóis, diaminas, fenóis substituídos e aminas aromáticas, através de mecanismo de transferência de um elétron, sendo que oxigênio molecular é usado como aceptor de elétrons. O substrato perde um único elétron formando um radical livre, que por ser instável pode sofrer oxidação catalisada pela lacase ou reações não enzimáticas (BOURBONNAIS & PAICE, 1990; THURSTON, 1994).

Numerosos substratos têm sido utilizados para o estudo da atividade de lacases. O uso de seringaldazina e de 2, 2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) sal diamônio (ABTS) como substratos pode ser falho visto que estes substratos são também oxidados por peroxidases. Precauções especiais são necessárias para o seu uso, incluindo a remoção de peróxido de hidrogênio. Estas precauções são frequentemente omitidas nos trabalhos em que a presença de lacase está sendo supostamente investigada (MAYER & STAPLES, 2002).

A variedade de substratos que podem ser oxidados pelas lacases é bastante grande (MAYER & STAPLES, 2002). Essa ampla especificidade das lacases pelos substratos as vezes torna difícil a sua distinção de tirosinases (EC 1.14.18.1) e peroxidases (EC 1.11.1.7). Estas enzimas oxidam os substratos comuns para lacase, como 2,6-dimetoxifenol (DMOP), catecol, pirogalol e guaiacol (EDENS et al., 1999). Basicamente, qualquer substrato com características similares a um p-difenol será oxidado por lacases. Além disso, ao menos algumas das lacases fúngicas podem oxidar monofenóis como o cresol e outras são capazes de oxidar ácido ascórbico (MAYER & STAPLES, 2002).

A lacase pode ser distinguida da tirosinase, embora as duas enzimas utilizem oxigênio molecular para oxidar substratos um tanto quanto semelhantes. Uma propriedade típica da tirosinase é a incapacidade de catalisar a oxidação de p-difenóis (MAYER & HAREL, 1979). Por outro lado, a incapacidade de oxidar a tirosina, mas habilidade em oxidar a L-dopa são provas da atividade da lacase (MAYER, 1987).

A inibição irreversível da lacase por substâncias quelantes de metais, tais como azida sódica e EDTA, sugerem que há pelo menos um centro contendo metal na enzima, que é

indispensável para sua atividade. As lacases contêm comumente 4 átomos de cobre em três diferentes tipos de sítios ligantes de cobre (tipo 1, tipo 2 e sítio binuclear tipo 3) (EDENS *et al.*, 1999).

A atividade da lacase tem sido demonstrada em plantas superiores, alguns insetos e bactérias (GIANFREDA *et al.*, 1999). As lacases ocorrem amplamente nos fungos e relatos da sua presença em diversas espécies tem sido publicados (THURSTON, 1994).

A função das lacases nos fungos é ligeiramente variada e inclui regulação da morfologia, controle de virulência e nutrição, bem como a capacidade de delignificar tecidos de madeira. Esta enzima tem sido encontrada em diversos gêneros de ascomicetos, alguns deuteromicetos e principalmente basidiomicetos, em especial aqueles associados com madeira deteriorada ou em estágio terminal de decomposição (WOOD, 1980, apud por SOUZA *et al.*, 2004). Os basidiomicetos pertencentes ao grupo dos fungos de decomposição branca são os melhores produtores de lacase, sendo também eficientes degradadores de madeira (THURSTON, 1994, MAYER & STAPLES, 2002). Nas plantas superiores a função das lacases está sendo estudada somente agora, e mais investigações a respeito de sua ocorrência, desenvolvimento e função são necessárias. É conhecido o envolvimento das lacases na patogênese das plantas (THURSTON, 1994).

Em adição às funções estritamente biológicas, as lacases estão sendo crescentemente investigadas em uma variedade de aplicações práticas uma vez que têm apresentado potencial em várias aplicações industriais e ambientais, incluindo branqueamento de polpa, branqueamento de corantes têxteis, detergentes, conversão enzimática de intermediários químicos (KIISKINEN *et al.*, 2004), biorremediação (MAYER & STAPLES, 2002), dentre outros.

### **1.5 Métodos de quantificação da tirosinase**

Devido à pequena especificidade das PPO sobre os substratos fenólicos, diversos métodos de ensaio têm sido desenvolvidos a fim de medir as atividades tirosina hidroxilase (monofenolase) e dopa oxidase (difenoilase) da tirosinase, incluindo métodos oximétricos (MAYER & HARREL, 1979), espectrofotométricos, radiométricos, cromatográficos (HPLC) e eletroanalíticos (ESPÍN *et al.*, 1997a; WINDER & HARRIS, 1991). Em geral, métodos descontínuos são mais comumente utilizados para quantificar a atividade monofenolase de PPO, enquanto ensaios espectrofotométricos contínuos são mais amplamente utilizados para determinar a atividade difenolase de PPO (ESPÍN *et al.*, 1995a). A maioria dos métodos descritos

na literatura consultada estão focados na atividade difenolase da tirosinase. Por outro lado há apenas poucos trabalhos acerca da atividade monofenolase uma vez que o mecanismo de ação cinético da enzima sobre os monofenóis ainda não foi completamente elucidado (ESPÍN *et al.*, 1997a; RODRÍGUEZ-LOPEZ *et al.*, 1994; ROS *et al.*, 1994). Para determinar as atividades tirosina hidroxilase e dopa oxidase da tirosinase, são necessários ensaios específicos. A determinação da atividade tirosina hidroxilase (monofenolase) requer L-tirosina como substrato e L-dopa como cofator. A L-dopa é também o produto da hidroxilação da L-tirosina pela tirosinase e na ausência deste cofator nenhuma atividade ou atividade muito baixa tem sido relatada. A necessidade de L-dopa como cofator faz com que o ensaio para determinação da atividade tirosina hidroxilase seja de mais difícil realização (WINDER & HARRIS, 1991). Por outro lado, ensaios para a atividade dopa oxidase (difenolase) são geralmente mais diretos e mais amplamente utilizados (WINDER, 1994).

Para a determinação da atividade dopa oxidase, pode-se utilizar diferentes substratos o-difenólicos, tais como L-dopa e ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico (DHPPA) (ESPÍN *et al.*, 1997a).

Ambas as atividades da tirosinase podem ser determinadas espectrofotometricamente usando 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH). Este composto é um nucleófilo potente devido ao seu grupo amino, que aprisiona as o-quinonas geradas pela enzima para formar o complexo MBTH-quinona. Este complexo é solúvel e apresenta um alto coeficiente de absorvidade molar (HALAOULI *et al.*, 2005). O caráter ácido do MBTH requer o uso de tampão no meio reacional (ESPÍN *et al.*, 1995a; ESPÍN *et al.*, 1997a). O pH afeta a solubilidade e estabilidade dos adutos; utilizando DMF os adutos formados são solúveis em ampla faixa de pH, variando de 3,5 a 7,0 (ESPÍN *et al.*, 1995a).

Além disso, o efeito de diversos inibidores na atividade difenolase tem sido amplamente estudado, sendo que diversos compostos como hidroquinona, ácido kójico, benzaldeído-o-alkil-oximas, ácido salicilhidroxâmico (SHAM) e feniltiouréia (PTU) tem sido relatados como inibidores de tirosinase (ALADAILEH *et al.*, 2007; MIRANDA *et al.*, 1992; RESCIGNO *et al.*, 2007). PTU e SHAM são tidos como inibidores específicos de tirosinase (DAWLEY & FLURKEY, 1993; MIRANDA *et al.*, 1992).

O método dopacromo foi o método contínuo anteriormente mais amplamente utilizado na determinação da atividade dopa oxidase da tirosinase. Neste método, a oxidação da L-dopa pela tirosinase produz dopaquinona, que sofre rápida auto-oxidação originando um pigmento de cor laranja, o dopacromo, cuja formação é medida espectrofotometricamente a

475 nm. O maior problema deste método é que o dopacromo é instável e ainda reage mesmo enquanto seu acúmulo está sendo monitorado. Além disso, este método mede apenas metade da atividade enzimática, devido à baixa absorvidade molar para o dopacromo ( $\epsilon=3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (ESPÍN *et al.*, 1995a), o que resulta em um ensaio de limitada sensibilidade (WINDER, 1994).

Um segundo ensaio espectrofotométrico para determinação da atividade dopa oxidase da tirosinase mede a formação de melanocromo (VACHTENHEIM *et al.*, 1985), mas o produto é instável e o ensaio apenas um pouco mais sensível do que o método dopacromo (WINDER, 1994). Há ainda outros ensaios para dopa oxidase, mas alguns requerem equipamentos especializados, tais como HPLC (TOWNSEND *et al.*, 1986), o que desestimula uma aplicação mais generalizada (WINDER, 1994).

Foi descrito um método espectrofotométrico contínuo com MBTH para a determinação da atividade dopa oxidase da tirosinase, utilizando L-dopa como substrato da reação (WINDER & HARRIS, 1991). Este método está baseado na reação da dopaquinona, o produto da oxidação da L-dopa, com o MBTH, formando deste modo um pigmento rosa escuro, com máximo de absorvância na faixa de 494 a 510 nm. Dimetilformamida (DMF) é adicionado à mistura reacional para solubilizar o MBTH, e a formação do pigmento rosa é monitorada continuamente à 505 nm. Comparando-se esse método contínuo com o método dopacromo, o pigmento rosa formado é relativamente estável e apresenta um maior coeficiente de absorção, o que resulta em um ensaio contínuo mais sensível do que o método dopacromo (ESPÍN *et al.*, 1995a; ESPÍN *et al.*, 1997a; WINDER & HARRIS, 1991).

Utilizando o ensaio contínuo com MBTH, poucos ensaios podem ser realizados por hora, o que é um problema quando um grande número de amostras têm que ser analisadas. Este método foi então adaptado, de modo que diversas amostras pudessem ser analisadas em um curto período de tempo, originando o método descontínuo para determinação da atividade dopa oxidase da tirosinase (WINDER, 1994).

Os ensaios espectrofotométricos descontínuos também quantificam a atividade dopa oxidase da tirosinase. Do mesmo modo que o método contínuo, o ensaio descontínuo mede o pigmento rosa que é formado pela reação do MBTH com a dopaquinona, que é o produto da oxidação da L-dopa pela tirosinase. A oxidação enzimática da L-dopa é interrompida pela adição de ácido perclórico, o que acarreta simultânea precipitação de proteínas da amostra permitindo que amostras túrbidas e não túrbidas sejam analisadas após centrifugação. A estabilidade do produto rosa formado é aumentada em solução ácida e o pigmento apresenta

um pico de absorvância a 505 nm, o que permite sua fácil quantificação em espectrofotômetro. A especificidade do ensaio pode ser confirmada utilizando-se inibidores de tirosinase. Este ensaio descontínuo utilizando MBTH é aproximadamente 15 vezes mais sensível do que o ensaio dopacromo amplamente utilizado, permitindo que baixos níveis de atividade de tirosinase sejam quantificados, quantidades essas que não seriam detectadas usando o método dopacromo (WINDER, 1994).

A adição de ácido perclórico ao meio reacional não afeta o máximo de absorvância em 505 nm do pigmento ou o valor de  $\epsilon_{505}$ ; também não há alteração significativa no espectro do pigmento por período de até 1 hora à temperatura ambiente (ESPÍN *et al.*, 1997a; WINDER, 1994). Após 2 horas, um pequeno aumento na absorvância é detectado devido à espontânea oxidação da L-dopa remanescente na mistura reacional. Este efeito se torna mais pronunciado com o tempo, mas pode ser corrigido com um branco apropriado, no qual a enzima é omitida. Como consequência da estabilidade do pigmento formado, utiliza-se tempos de incubação de 30 minutos ou menos para a oxidação enzimática da L-dopa no ensaio descontínuo (WINDER, 1994).

Assim como no método contínuo, a presença de 2% de DMF na mistura reacional do método descontínuo solubiliza o MBTH e não interfere na atividade enzimática (ESPÍN *et al.*, 1995a; ESPÍN *et al.*, 1997a; WINDER, 1994).

A linearidade do método descontínuo com relação à concentração de enzima indica que este ensaio é capaz de proporcionar uma medida quantitativa de tirosinase na amostra. Em vista disso, o método descontínuo utilizando MBTH mostra-se especialmente útil para análise rápida de grande número de amostras (WINDER, 1994).

## 1.6 Aplicações das tirosinases

As tirosinases fúngicas constituem um vasto campo para pesquisa devido à importância dessas enzimas nas indústrias farmacêuticas e de alimentos, bem como suas aplicações biotecnológicas e ambientais (HALAOULI *et al.*, 2006), já que são promissoras tanto para descoloração quanto para remoção de fenóis presentes em efluentes (CHIACCHIERINI *et al.*, 2004).

As enzimas polifenoloxidasas como lacases, peroxidases e tirosinases são importantes também na degradação ou detoxificação de certos compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos encontrados no solo, o que resulta em degradação de materiais vegetais ou in-

troduzidos pelo homem (GUNTHER *et al.*, 1998). Há vários anos já é conhecido o uso de enzimas oxidativas de fungos filamentosos como uma solução biológica para o tratamento de efluentes contendo compostos fenólicos tóxicos (BURTON, 2003; CHIACCHIERINI *et al.*, 2004; GIRELLI *et al.*, 2006; HALAOULI *et al.*, 2006).

Dentre as aplicações biotecnológicas das tirosinases destacam-se ainda a síntese de fármacos o-difenólicos (DURÁN *et al.*, 2002; HALAOULI *et al.*, 2006; HAQ *et al.*, 2002). A bioconversão na biossíntese de fármacos importantes, tais como L-dopa, que está envolvida no tratamento do Mal de Parkinson e de doenças do miocárdio, tem sido investigada por RAJU *et al.*, 1993 apud HALAOULI *et al.*, 2006. A produção de L-dopa tem sido descrita usando a L-tirosina como substrato e tirosinases de *Aspergillus oryzae* (HAQ *et al.*, 2002) e *Aspergillus flavus* (SINGH, 1999) como biocatalisadores (HALAOULI *et al.*, 2006). Um importante aspecto que tem ganhado popularidade é a imobilização da tirosinase para a construção de bio-reatores para a produção de L-dopa. No entanto, mais estudos acerca deste assunto precisam ser feitos (SEO *et al.*, 2003).

A habilidade das tirosinases em converter monofenóis em difenóis motivou estudos acerca da produção de anti-oxidantes o-difenólicos que apresentam potencial para utilização como aditivos alimentares ou fármacos. A produção de ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxifenil-2-propenóico) usando ácido p-cumárico (ácido 4-hidroxifenil-2-propenóico) como substrato, e tirosinase de *Agaricus bisporus* como biocatalisador, e ácido ascórbico como inibidor da formação de quinonas, foi inicialmente relatada por Sâto (1969) apud HALAOULI *et al.*, 2006.

O hidroxitirosol (2-(3,4-dihidroxifenil)etanol) é um potente antioxidante que ocorre naturalmente em óleo de oliva e frutas, mas que não é comercialmente disponível (ESPÍN *et al.*, 2000). Recentemente as tirosinases purificadas de *A. bisporus* (ESPÍN *et al.*, 2001) e *Pycnoporus sanguineus* (HALAOULI *et al.*, 2005) demonstraram eficácia na biossíntese do hidroxitirosol a partir do p-tirosol (2-(4-hidroxifenil)etanol), um monofenol encontrado em sub-produtos agroindustriais (LESAGE-MEESEN *et al.*, 2001). Este tipo de bioconversão enzimática pode constituir uma alternativa à síntese química, quando compostos “naturais” são requeridos (HALAOULI *et al.*, 2006).

Além de ser usados no tratamento de algumas patologias dermatológicas associadas à hiperpigmentação causadas pela melanina, inibidores de tirosinase tem sido empregados na indústria cosmética para o clareamento da pele e despigmentação após queimaduras solares. Outra importante aplicação clínica das tirosinases fúngicas inclui o papel no tratamen-

to do vitiligo, já que as tirosinases agem como marcadores desta doença (SEO *et al.*, 2003).

Os corantes têm sido amplamente utilizados nas indústrias de alimentos, farmacêutica, de cosméticos, têxteis e de couro (McMULLAN *et al.*, 2001), embora não sejam prontamente biodegradáveis. Os fungos de decomposição branca, tais como o *P. sanguineus*, são os únicos capazes de descorar significativamente os corantes, na maioria dos casos devido às atividades de lignina peroxidase (LiP) (OLLIKA *et al.*, 1993), manganês peroxidase (MnP) (HEINFLING *et al.*, 1998) e lacase (POINTING & VRIJMOED, 2000).

A habilidade desses fungos de decomposição branca em degradar uma diversidade de compostos orgânicos resulta da natureza relativamente não específica das enzimas lignolíticas (LiP, MnP e lacase). A LiP e a MnP catalisam a oxidação de compostos aromáticos não fenólicos. A lacase também catalisa a oxidação de substratos fenólicos (McMULLAN *et al.*, 2001).

Efluentes de indústrias têxteis contendo corantes são altamente coloridos e por isso são visualmente identificáveis (KILIC *et al.*, 2007). A complexa estrutura aromática dos corantes é resistente à luz, à atividade biológica, ao ozônio e a outras condições degradativas ambientais. Assim, os tratamentos de efluentes permanecem ineficazes. Além disso, corantes azo aniônicos e não iônicos liberam aminas tóxicas devido à clivagem reativa dos grupos azo (JOSHI *et al.*, 2004). A presença de metais pesados como, por exemplo, cromo, cobalto, níquel e cobre (corantes metalizados) em efluentes é também motivo de preocupação ambiental. Até agora os cientistas tem tentado desenvolver um único e econômico método para o tratamento de efluentes contendo corantes têxteis, mas isto ainda permanece como um grande desafio (SANTOS *et al.*, 2007). Há vários métodos para o tratamento de efluentes têxteis, podendo esses métodos serem divididos em 3 categorias: métodos físicos, químicos e biológicos. As maiores desvantagens dos métodos físico-químicos tem sido seu alto custo, baixa eficiência, limitada versatilidade, interferência de outros constituintes do efluente e o tratamento do resíduo gerado no processo. A descoloração por microrganismos, por ser mais eficaz em termos de custos, vem recebendo mais atenção para o tratamento de efluentes contendo corantes têxteis (BANAT *et al.*, 1996; STOLZ, 2001; ZEE & VILLAVARDE, 2005). Os métodos biológicos podem envolver tanto degradação aeróbica quanto anaeróbica dos corantes por microrganismos. Os componentes biodegradáveis dos efluentes industriais podem ser removidos por tratamento aeróbico, mas no entanto, o mesmo tratamento mostra-se ineficaz para a degradação de compostos xenobióticos, tais como os corantes (JOSHI *et al.*, 2004; KAUSHIK & MALIK, 2009).

Os fungos têm demonstrado ser organismos adequados para o tratamento de efluentes têxteis e remoção de corantes. O micélio fúngico tem uma vantagem adicional se comparado com organismos unicelulares, sendo que são capazes de solubilizar substratos insolúveis através da produção de enzimas extracelulares. Devido à crescente taxa de crescimento de micélio fúngico, que aumenta a superfície de contato, os fungos têm também um crescente contato físico e enzimático com o meio ambiente. A natureza extracelular das enzimas fúngicas é também vantajosa por tolerar altas concentrações de compostos tóxicos (KAUSHIK & MALIK, 2009).

Diversos gêneros de fungos têm sido empregados na descoloração de corantes, tanto em sua forma viva quanto em sua forma morta. Baseado no mecanismo envolvido, as formas com que os fungos descolorem os corantes podem ser divididas em 3 grupos, adsorção, biodegradação e bioacumulação. A adsorção é definida como uma ligação dos solutos à biomassa através de processos que não envolvem energia metabólica ou transporte, embora tais processos possam ocorrer simultaneamente onde biomassa viva esteja sendo utilizada. Deste modo, pode ocorrer em biomassa viva ou morta (TOBIN *et al.*, 1994). A biodegradação é um processo dependente de energia e envolve a quebra do corante em vários compostos através da ação de diversas enzimas. Já a bioacumulação refere-se à acumulação de poluentes pelo crescimento ativo das células, resultante do metabolismo (AKSU & DONMEZ, 2005). Observa-se que a maioria dos trabalhos relacionados à biodegradação de corantes têxteis por fungos, concentra-se no uso de fungos de decomposição branca, que são os responsáveis pela produção de enzimas lignolíticas, tais como lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase, enquanto que estudos relacionados à adsorção tem sido na maioria dos casos conduzidos com a utilização de outros fungos, que não os de decomposição branca (KAUSHIK & MALIK, 2009).

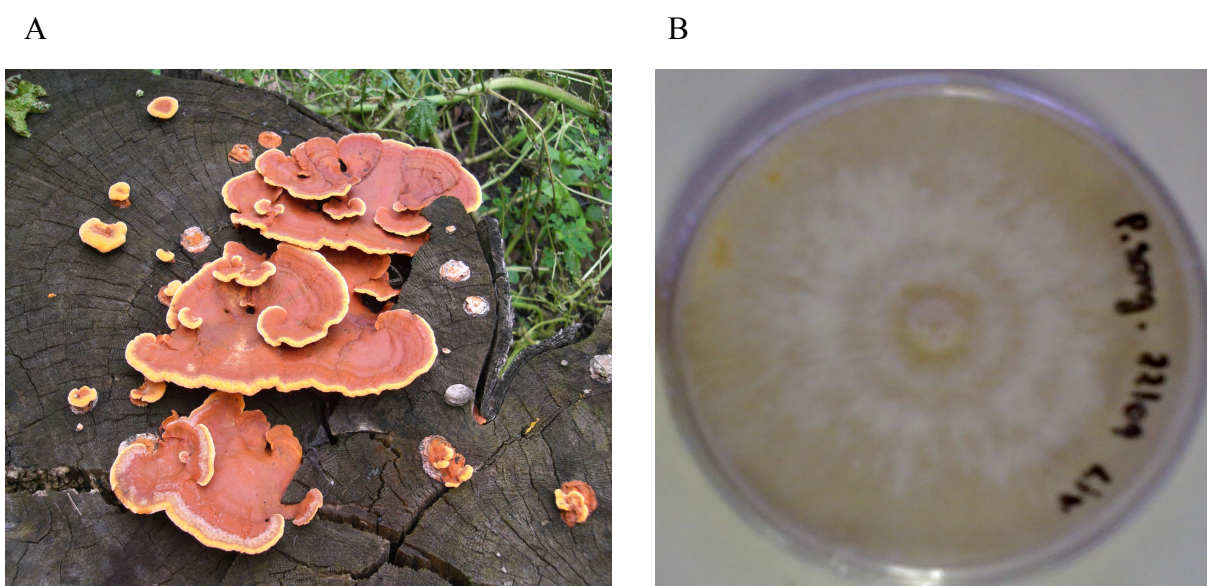
A aplicação prática de tirosinases em biotecnologia requer grande quantidade de enzimas; logo, o isolamento de novas cepas de *Pycnoporus* como potenciais produtoras de tirosinase é de grande importância biotecnológica (HALAOULI *et al.*, 2005).

### 1.7 O fungo *Pycnoporus sanguineus*

Dentre os produtos naturais, os de origem fúngica têm sido reconhecidos como candidatos em potencial para estudos clínicos, uma vez que são prontamente obtidos em relativamente grandes quantidades e em geral não são caros (SEO *et al.*, 2003).

Fungos basidiomicetos do gênero *Pycnoporus* são capazes de produzir várias enzimas com aplicação industrial, sendo que a característica mais relevante do gênero é a habilidade em produzir lacase (GARCIA *et al.*, 2007) e outras fenoloxidasas contendo cobre, como a tirosinase (HALAOULI *et al.*, 2005).

*Pycnoporus sanguineus* (L. ex Fries) Murril, pertencente à família Polyporaceae, é amplamente distribuído na natureza, sendo encontrado em regiões de clima mais ameno e em florestas tropicais como a floresta amazônica (ESPOSITO *et al.*, 1993). É conhecido popularmente como orelha-de-pau, sendo encontrado em madeira, onde se fixa e se alimenta (Figura 3A). É capaz de hidrolisar os polissacarídeos da parede celular e também a lignina de materiais celulósicos (TEIXEIRA *et al.*, 1997), sendo chamado de fungo de decomposição branca (*white rot*).



(Fonte: Universidade Federal de Santa Catarina/  
Centro de Ciências Biológicas)

Figura 3 - O fungo *P. sanguineus* em madeira (A) e em meio de cultura BDA (B)

Durante o crescimento do *P. sanguineus* em placa de Petri (Figura 3B), o micélio fúngico é inicialmente branco e a coloração vermelho-alaranjado começa a aparecer após 1 ou 2 semanas na maioria das culturas. Essa coloração aumenta progressivamente de intensidade com o passar do tempo (NOBLES & FREW, 1962).

Apesar do número ainda limitado de publicações envolvendo este fungo, há uma tendência crescente de seu emprego em processos biotecnológicos. *P. sanguineus* já foi utilizado com sucesso na descoloração de efluente Kraft (DURÁN *et al.*, 1991; ESPOSITO *et al.*, 1993) e na descoloração de diferentes corantes (POINTING & VRIJMOED, 2000).

Não foram encontrados na literatura pesquisada publicações acerca da produção de tirosinase pelo *P. sanguineus* CCT-4518, que é uma cepa proveniente da floresta amazônica. Portanto, deseja-se verificar a produção de tirosinase por *P. sanguineus* CCT-4518, já que outras cepas desse fungo demonstraram ser produtoras desta enzima (HALAOULI *et al.*, 2005).

Devido ao número ainda limitado de trabalhos publicados na literatura referentes à tirosinase e a suas aplicações biotecnológicas, faz-se necessário este estudo a fim de otimizar as condições de produção para posterior caracterização, visando aumentar a disponibilidade de tirosinase.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar e otimizar a produção de tirosinase(s) pelo fungo *Pycnoporus sanguineus*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar a reação para quantificação da atividade de tirosinase;
- Determinar as condições de cultivo de *P. sanguineus* para a produção de tirosinase;
- Otimizar as condições de cultivo visando aumentar o rendimento da produção de tirosinase (meio de cultura/indutores);
- Caracterizar o extrato bruto de tirosinase produzido por *P. sanguineus*, determinando pH ótimo, temperatura ótima, termoestabilidade e estabilidade no meio reacional para a tirosinase;
- Avaliar a ação da tirosinase comercial sobre o corante vermelho Ponceaux;

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes: Agar batata dextrose (Acumedia); caldo batata dextrose (Acumedia); caldo extrato de malte (Bacto); acetato de sódio P.A. (Biotec); fosfato de sódio monobásico (Synth); fosfato de sódio dibásico (Synth); ácido acético glacial (Synth); ácido fosfórico (Quimex); ácido perclórico (Vetec); DMF (Nuclear); sorbitol (Sigma); PMSF (Acros Organics); coquetel inibidor de protease para leveduras (Sigma); L-dopa (Acros Organics); L-tirosina (Acros Organics); ácido cafeico (Acros Organics); guaiacol (Sigma); ácido 4-hidroxifenil-2-propionico (Acros Organics); ácido 3,4-dihidroxifenil-2-propionico (Sigma Aldrich); 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (Sigma); azida sódica (Berse); 2, 2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) sal diamônio (Sigma Aldrich); feniltiouréia (Sigma); ácido salicilhidroxâmico (Sigma Aldrich); catalase (Sigma); tirosinase comercial (Sigma) e lacase purificada de *P. sanguineus* (gentilmente cedida pela Profa. Dra. Telma Alves Garcia).

As soluções estoque dos substratos fenólicos foram preparadas em ácido fosfórico 0,15 mmol.L<sup>-1</sup> para prevenir a auto-oxidação (ESPÍN *et al.*, 1997a).

Os demais reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

### 3.2 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: Balança semi-analítica (Marte); banho-maria (Quimis); bomba de vácuo (Millipore); centrífuga (Marconi Centribio); espectrofotômetro (Micronal B582); lavadora ultra-sônica (Unique); shaker (New Brunswick Scientific); sistema de eletroforese (Bio-Rad Mini Protean).

### 3.3 Origem e manutenção dos fungos

A linhagem de *P. sanguineus* CCT-4518 (Linnaeus ex Fries) Murril utilizada neste trabalho foi obtida junto à Fundação André Tosello em Campinas – SP.

Os fungos foram mantidos em meio BDA, no escuro, à temperatura ambiente (25-30°C) durante 7 dias para crescimento das colônias (HERPOËL *et al.*, 2000). Após o

crescimento foram armazenados a 4°C e repicados periodicamente para a manutenção das culturas.

### 3.3.1 Meio de cultura para manutenção dos fungos

- Meio agar batata dextrose (BDA):
  - Glicose 2,0% (p/V)
  - Agar 1,5% (p/V)
  - Caldo de batata cozida 20,0% (V/V)

O meio de cultura foi autoclavado a 120°C, durante 15 min.

## 3.4 Condições de cultivo

### 3.4.1 Preparo do inóculo

Os inóculos foram preparados de acordo com HERPOËL *et al.*, 2000. Dez discos de micélio de 5 mm de diâmetro provenientes de culturas do fungo em placas de Petri contendo meio BDA, recém repicadas (1 semana), foram inoculados em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura caldo extrato de malte (ou caldo batata dextrose) acrescido do substrato em questão.

### 3.4.2 Incubação

A incubação das culturas foi realizada a 30°C (HALAOULI *et al.*, 2005), com agitação contínua a 150 rpm, no claro ou no escuro, sendo que os tempos de incubação foram avaliados em intervalos de 24 h a fim de otimizar a produção de tirosinase.

## 3.5 Pesquisa qualitativa de tirosinase (Agar “spot tests”)

Placas de Petri contendo ágar batata dextrose (meio BDA) acrescido de 100 mg/L de p-cresol foram inoculadas com 1 disco de micélio cada uma retirados de cultura recente de *P. sanguineus* e incubadas à temperatura ambiente (25-30°C). À medida que o micélio fúngico cresce, foi gotejado com solução etanólica de p-cresol 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. A mudança de coloração do meio para marrom-avermelhado indica a produção de tirosinase pelo fungo. Os testes foram realizados em triplicata e as observações feitas durante 7 dias. As observações foram visuais comparando-se a placa teste com uma placa controle em que o p-cresol não foi

adicionado (GRAMSS *et al.*, 1998).

### 3.6 Produção enzimática

Para preparar o lisado das células de *P. sanguineus*, o micélio contido em três frascos tipo Erlenmeyer, anteriormente incubados em shaker, foi coletado por filtração à vácuo em papel de filtro (GRINYER *et al.*, 2004; HALAOULI *et al.*, 2005) e a seguir foi utilizado para extração enzimática. O sobrenadante foi mantido em banho de gelo e utilizado imediatamente para ensaio enzimático.

Durante a extração enzimática, os micélios dos três frascos foram ressuspensos em 5 mL de tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 6,8) contendo 850  $\mu\text{L}$  de sorbitol  $650 \text{ mmol.L}^{-1}$ , 500  $\mu\text{L}$  de PMSF  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  (HALAOULI *et al.*, 2005) e 6,5  $\mu\text{L}$  de coquetel inibidor de proteases Sigma (GRINYER *et al.* 2004), sendo que essas quantidades foram também duplicadas a fim de avaliar a sua interferência na extração enzimática. As células foram transferidas para Erlenmeyer de 125 mL e lisadas em Ultrassom (HALAOULI *et al.*, 2005). Foram avaliados tempos de 5 e 10 minutos de sonicação, a fim de verificar qual seria o tempo ótimo para a extração enzimática.

O precipitado foi removido por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante resultante constituiu o extrato enzimático bruto (lisado); o mesmo foi mantido em banho de gelo e utilizado imediatamente para ensaios de atividade enzimática (HALAOULI *et al.*, 2005). O restante das amostras foi armazenado em freezer.

As atividades enzimáticas de tirosinase e lacase foram medidas diariamente no lisado e no sobrenadante das amostras.

#### 3.6.1 Seleção de compostos para produção de tirosinase

Os seguintes compostos foram acrescentados ao meio extrato de malte 2%: L-tirosina, L-dopa, ácido caféico, ácido 4-hidroxifenil-2-propiónico e guaiacol, na concentração de 0,3% (150 mg ou 50  $\mu\text{L}$ ), a fim de verificar a condição que resulta em maior produção de tirosinase. Os experimentos foram realizados sob as mesmas condições (incubação em shaker a  $30^\circ\text{C}$ , 150 rpm, no claro, meio extrato de malte 2%) exceto pelo tipo de indutor. A produção de tirosinase também foi avaliada na ausência de indutores. Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata conforme descrito no item 3.8.

Após seleção do indutor, o mesmo foi testado nas concentrações de 0,3%, 0,15% e 0,075%. Os experimentos foram realizados sob as mesmas condições (incubação em shaker a 30°C, 150 rpm, no claro, meio extrato de malte 2%) exceto pela concentração de indutor. Os ensaios enzimáticos para atividade de tirosinase foram realizados em triplicata conforme descrito no item 3.8.

### **3.6.2 Influência da luminosidade na produção de tirosinase**

As condições de claro e escuro foram testadas durante o período de incubação com a finalidade de avaliar a influência destas variáveis na produção de tirosinase. O indutor utilizado foi a L-tirosina a 0,15% (75 mg), sendo que os experimentos foram realizados sob as mesmas condições (incubação em shaker a 30°C, 150 rpm, meio extrato de malte 2%) exceto pela luminosidade (3 frascos foram mantidos no claro e 3 frascos mantidos ao abrigo da luz).

### **3.6.3 Influência da biomassa na produção de tirosinase**

Durante o preparo do inóculo testou-se diferentes quantidades de discos de micélio (dez e vinte discos) com a finalidade de verificar qual das quantidades resultaria numa maior produção de tirosinase. Os experimentos foram realizados sob as mesmas condições (incubação em shaker a 30°C, 150 rpm, no claro, meio extrato de malte 2% e L-tirosina 0,15% como indutor) exceto pela quantidade de discos de micélio utilizados.

### **3.6.4 Seleção de meios de cultura**

Os 2 meios de cultura abaixo foram testados e ao final dos ensaios um deles foi selecionado para produção da enzima:

- Meio caldo batata dextrose (BD)
  - Glicose 0,2% (p/V)
  - Caldo de batata cozida 20% (V/V)
- Meio extrato de Malte (HERPOËL *et al.*, 2000)
  - Extrato de Malte 2,0% (p/V)

Todos os meios de cultura foram autoclavados a 120°C, durante 15 min.

50 mL de cada um dos 2 meios de cultura descritos acima foram colocados em frasco Erlenmeyer de 250 mL. 10 discos de micélio de *P. sanguineus* e 75 mg do indutor tirosina foram adicionados. Os experimentos foram realizados sob as mesmas condições (incuba-

ção em shaker a 30°C, 150 rpm, no claro, 10 discos de micélio e L-tirosina 75 mg como indutor) exceto pelo tipo de meio de cultura utilizado.

### 3.7 Ensaio enzimático para atividade de lacase

A atividade da lacase foi determinada a partir da oxidação do ABTS, sendo que o meio reacional consistiu na adição de 100 µL da amostra, 800 µL de tampão acetato de sódio 170 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 5,0 e 100 µL de ABTS 5 mmol.L<sup>-1</sup> (solução aquosa). A reação se inicia pela adição do ABTS.

A oxidação do substrato foi determinada espectrofotometricamente a 420 nm após 5 minutos de reação, à temperatura ambiente (25 - 30°C) (BOURBONNAIS & PAICE, 1990). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µmol de substrato por minuto. A atividade de lacase foi calculada de acordo com a fórmula descrita por Leonowicz & Grzynowicz (1981) e expressa em U/L, considerando que  $\epsilon_{420}=36000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ :

$$A = \frac{10^6 \Delta E}{\epsilon \Delta t}$$

Em que:

A = atividade de lacase (U/L);

$\Delta E$  = aumento da absorbância no comprimento de onda específico;

$\epsilon$  = absortividade molar;

$\Delta t$  = tempo de reação (minutos).

Todas as determinações foram feitas em triplicata.

Em alguns experimentos o extrato bruto foi pré incubado com a enzima catalase por 30 minutos, antes do ensaio para atividade enzimática de lacase, a fim de eliminar qualquer peróxido de hidrogênio endógeno que pudesse estar presente.

### 3.8 Ensaio enzimático para atividade de tirosinase

A atividade da tirosinase foi determinada espectrofotometricamente, através dos métodos contínuo e descontínuo, utilizando o reagente MBTH.

O meio reacional para determinação da atividade difenolase da tirosinase conti-

nha tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup> pH 5,0, L-dopa 3,2 mmol.L<sup>-1</sup>, MBTH 5 mmol.L<sup>-1</sup>, DMF 2% (adaptação WINDER, 1994), azida sódica 0,1 mmol.L<sup>-1</sup> e extrato enzimático bruto (lisado).

A composição do tubo branco foi a mesma dos tubos teste, exceto pela ausência do substrato, que foi substituído por tampão acetato de sódio 170 mmol.L<sup>-1</sup> pH 5,0 (ESPÍN *et al.*, 1995a).

Para a determinação da atividade de tirosinase pelo método contínuo, a sequência para adição dos componentes da mistura reacional é de fundamental importância, sendo que primeiramente foram adicionados o tampão, o substrato e o lisado e deixou-se reagir por 1 minuto. Após esse tempo de incubação adicionou-se o MBTH, esperou-se mais 1 minuto e o DMF foi adicionado. A reação inicia-se com a adição do extrato enzimático bruto. O tempo de reação, após a adição do DMF, foi de 5 minutos, sendo que foram feitas determinações, em triplicata, das absorbâncias em espectrofotômetro.

Para a determinação da atividade de tirosinase pelo método descontínuo, todos os componentes do meio reacional, exceto a amostra (lisado ou sobrenadante) foram incubados em banho-maria a 37°C durante 5 minutos. A seguir, a amostra foi adicionada e a mistura foi incubada a 37°C durante 10 minutos. Decorridos os 10 minutos, a reação foi parada pela adição de 500 µL de solução de ácido perclórico 1 mol.L<sup>-1</sup>. A absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-vis imediatamente após o término da reação enzimática, sendo que este tempo decorrido desde o término da reação até a leitura, foi também avaliado. Foi realizada varredura do meio reacional após o término da reação enzimática para determinação do comprimento de onda para leitura (adaptação WINDER, 1994).

Considerando que a absorvidade para o produto da reação seja  $\epsilon=29000\pm 1000$  (WINDER & HARRIS, 1991) (em que  $A=\epsilon bc$ ,  $A$  é a absorbância,  $\epsilon$  é o coeficiente de absorvidade molar,  $b$  é o caminho óptico da cubeta em cm e  $c$  é a concentração do produto formado em mol.L<sup>-1</sup>), a taxa de formação do pigmento (por mL de amostra) foi calculada do seguinte modo:

$$\text{Atividade (U/L)} = (\Delta A_{505} / t) \times (10^3/29) \times (10^3/100)$$

Onde:  $\Delta A_{505}$  é a mudança na absorbância a 505 nm no tempo  $t$  (em minutos) (adaptação WINDER, 1994).

Uma unidade de enzima (U) é definida como sendo a quantidade de enzima que produz 1 µmol do complexo MBTH-quinona por minuto. A atividade da tirosinase foi ex-

pressa em U/L (HALAOULI *et al.* 2005).

As determinações enzimáticas foram realizadas em triplicata.

### **3.9 Seleção de substratos para atividade de tirosinase**

Foram utilizados dois substratos (L-dopa 3 mmol.L<sup>-1</sup> ou DHPPA 2 mmol.L<sup>-1</sup>) com a finalidade de verificar qual deles apresenta maior especificidade frente à tirosinase. As soluções-estoque dos substratos fenólicos foram preparadas em ácido fosfórico 0,15 mmol.L<sup>-1</sup> e acondicionadas ao abrigo da luz para prevenir auto-oxidação dos mesmos. Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 3.8, sendo que a amostra utilizada foi a tirosinase comercial. As determinações foram feitas em triplicata. Para o substrato que apresentou maior atividade enzimática de tirosinase foi estabelecido a porcentagem de 100% de atividade enzimática, enquanto a atividade do outro substrato foi calculada proporcionalmente.

### **3.10 Teste de especificidade dos ensaios enzimáticos**

#### **3.10.1 Teste de especificidade do ensaio para lacase**

Com a finalidade de verificar se o ensaio que quantifica a lacase é capaz de dosar a tirosinase, a atividade de lacase de uma amostra de tirosinase comercial foi medida utilizando a metodologia descrita no item 3.7. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **3.10.2 Teste de especificidade do ensaio para tirosinase**

Com a finalidade de verificar se o ensaio que quantifica a tirosinase é específico para esta enzima, uma amostra de lacase purificada foi utilizada no ensaio que dosa tirosinase conforme descrito no item 3.8. A quantidade de amostra utilizada foi de 100 µL e os ensaios foram realizados em triplicata.

### **3.11 Efeito de inibidores sob atividade de lacase e de tirosinase**

Para a avaliação do efeito de inibidores sob atividade de lacase, uma amostra de lacase purificada foi utilizada em ensaios enzimáticos conforme descrito no item 3.7 na ausência de inibidores e na presença de azida sódica 0,1 mM (GARCIA *et al.*, 2007), SHAM 6 mmol.L<sup>-1</sup> e PTU 6 mmol.L<sup>-1</sup> (soluções etanólicas) (ALADAILEH *et al.*, 2007; WINDER, 1994). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Ao ensaio sem o uso de inibidores atribuiu-se 100% de atividade de lacase e

0% de inibição, enquanto nos demais ensaios a porcentagem de atividade de lacase e de porcentagem de inibição foi calculada proporcionalmente.

Para avaliação do efeito de inibidores sob atividade de tirosinase, uma amostra de tirosinase comercial foi utilizada no ensaio de tirosinase, conforme descrito no item 3.8. A quantidade de amostra utilizada foi de 100  $\mu\text{L}$  e os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata. Paralelamente foi realizado um ensaio sem a adição de azida sódica e sua atividade foi definida como tendo um valor de 100%.

10  $\mu\text{L}$  da solução-estoque de PMSF 10  $\text{mmol.L}^{-1}$  preparada em etanol 96%, foram acrescentados ao meio reacional contendo os componentes anteriormente descritos (item 3.8). A concentração final obtida foi de 0,1  $\text{mmol.L}^{-1}$ , a mesma a que o micélio fúngico está submetido durante a etapa de extração enzimática. A amostra utilizada foi de 100  $\mu\text{L}$  de tirosinase comercial e os ensaios foram realizados em triplicata.

Os compostos feniltiouréia (PTU) e ácido salicilhidroxicinâmico (SHAM), preparados em etanol 96%, foram acrescentados individualmente ao meio reacional contendo os componentes anteriormente descritos (item 3.8), com a finalidade de verificar a especificidade dos ensaios para a atividade dopa oxidase da tirosinase (WINDER, 1994). Os compostos foram adicionados juntamente com o substrato da reação (MIRANDA *et al.*, 1992) em ensaios contendo amostras de lisado contendo tirosinase, bem como a própria tirosinase comercial.

A concentração final de PTU e SHAM no meio reacional foi de 6  $\text{mmol.L}^{-1}$ .

### **3.12 Dosagem de proteínas totais**

As concentrações de proteínas nas amostras foram determinadas pelo método colorimétrico descrito por BRADFORD *et al.*, 1976, utilizando-se albumina sérica bovina (BSA-SIGMA) como padrão. Amostras de 50  $\mu\text{L}$  foram misturadas a 2,5 mL da solução de Bradford. Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente foi feita a leitura da absorbância das amostras a 595 nm. Esta análise foi feita em triplicata.

### **3.13 Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE)**

Para a análise do perfil de proteínas do extrato bruto produzido por *P. sanguineus* foi utilizado um sistema de eletroforese (Bio-Rad Mini Protean) em gel de poliacrilamida a 4 e 10% (OLIANAS *et al.*, 2005), em condições desnaturantes (SDS-PAGE), segundo LAEMMLI, 1970. As amostras para eletroforese desnaturante foram liofilizadas ou dialisadas

e ressuspendidas em tampão de amostra desnaturante 1X (5 mL de glicerol; 2,5 mL de Tris-HCl, pH 6,8; 0,05 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol; 5 mL de SDS 10% e 2,5 mg de azul de bromofenol), fervidas por 10 minutos e aplicadas no gel. A eletroforese foi conduzida a temperatura ambiente com uma voltagem inicial de 80 V e posteriormente cerca de 100 V.

Os marcadores de peso molecular pré-corados (Fermentas) utilizados para a determinação do perfil protéico da amostra em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram:  $\beta$ -galactosidase de *E. coli* (116 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), lactato desidrogenase (35 kDa), rease bfp 98i (25 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,4 kDa).

### **3.14 Coloração com Coomassie Blue**

Após o término da corrida de eletroforese, o gel foi corado para proteínas, utilizando-se solução de Coomassie a 0,1% e a seguir foi descorado utilizando-se solução descorante (40% metanol, 10% ácido acético glacial e 50% água destilada) até o aparecimento das bandas.

### **3.15 Determinação da atividade de tirosinase em gel de eletroforese**

Para determinação da atividade de tirosinase em gel de poliacrilamida a 4 e 10% (OLIANAS *et al.*, 2005), em condições não desnaturantes (sem  $\beta$ -mercaptoetanol e sem SDS), foram aplicadas 10  $\mu$ L de amostras de tirosinase comercial e extrato bruto (lisado) nos géis. Após a corrida eletroforética (duração de 5 horas, à 4°C, sob voltagem constante de 70 V), o gel foi incubado em tampão citrato/fosfato (170 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 6,6) por 20 minutos, sob leve agitação. Descartou-se o tampão e em seguida o gel foi incubado em mistura reacional contendo L-dopa 5 mmol.L<sup>-1</sup>, MBTH 2 mmol.L<sup>-1</sup> e etanol 3% em tampão citrato/fosfato 170 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 6,6 (adaptação ALADAILEH *et al.*, 2007; adaptação FAN & FLURKEY, 2003; adaptação RESCIGNO *et al.*, 2007).

### **3.16 Caracterização bioquímica do extrato bruto de tirosinase de *P. sanguineus***

O extrato bruto de tirosinase de *P. sanguineus* foi caracterizado conforme descrito a seguir:

### **3.16.1 Determinação do pH ótimo**

Na determinação do pH ótimo para a atividade da tirosinase, incubou-se o extrato bruto em tampão citrato/fosfato de sódio 170 mmol.L<sup>-1</sup> e fosfato de sódio 170 mmol.L<sup>-1</sup>, com valores de pH que variaram, respectivamente, de 3,6 a 7,0 e 7,6 a 8,0. As misturas de reação e as condições de ensaio foram idênticas às descritas no item 3.8, exceto pelo tampão utilizado no meio reacional, que foi substituído pelos tampões nos pHs descritos anteriormente. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **3.16.2 Determinação da temperatura ótima**

Para se determinar a temperatura ótima para a atividade do extrato bruto de tirosinase empregou-se tampão citrato/fosfato de sódio, pH 6,6. As temperaturas analisadas variaram de 25 a 70°C, com intervalos de 5°C. A dosagem de tirosinase foi feita nas mesmas condições descritas no item 3.8. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **3.16.3 Determinação da termoestabilidade**

O efeito da temperatura na estabilidade do extrato bruto de tirosinase foi determinado, após pré-incubação do extrato bruto, a 45, 50 ou 55°C, por 0, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos. A atividade enzimática residual foi determinada conforme descrito no item 3.8, exceto pela utilização de tampão citrato/fosfato de sódio, pH 6,6 e temperatura de incubação da reação de 45°C. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **3.16.4 Determinação da estabilidade no meio reacional**

A estabilidade da mistura no meio reacional foi determinada a partir de variações nos tempos de incubação da reação. A atividade enzimática residual foi determinada conforme descrito no item 3.8, exceto pela utilização de tampão citrato/fosfato de sódio, pH 6,6, temperatura de incubação da reação de 45°C e variações nos tempos de incubação, sendo que foram testados os tempos de 5, 10, 20, 30 e 60 minutos. Ao tempo que apresentou maior atividade enzimática foi atribuído o valor de 100% de atividade relativa e para os demais tempos estas atividades foram calculadas proporcionalmente. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.17 Descoloração de corantes em meio líquido

O ensaio de descoloração de corantes em meio líquido foi realizado com o corante Vermelho n° 6 Ponceaux 4R, em solução a 0,002%, preparada em tampão citrato/fosfato de sódio  $170 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 6,6.

Foram colocados 50 mL da solução de corante em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL e então adicionou-se quantidades variadas de tirosinase comercial (correspondendo a 31,40 U, 62,80 U e 94,20 U). Foi feito um frasco controle sem a adição de solução de tirosinase. Os frascos foram incubados em shaker, a  $30^{\circ}\text{C}$ , luz ambiente e sob agitação a 120 rpm, durante 12 dias. A descoloração foi acompanhada diariamente por meio de leitura da solução de corante em espectrofotômetro. Os ensaios foram realizados em triplicata. Realizou-se anteriormente varredura com a solução de corante a fim de determinar o comprimento de onda para as leituras. Paralelamente, foi realizado experimento com solução de tirosinase em maior concentração. Em tubo de ensaio, adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de solução de corante 0,002% e 500  $\mu\text{L}$  de solução de tirosinase comercial (157 U). Um tubo branco foi feito adicionando-se 500  $\mu\text{L}$  de tampão citrato/fosfato de sódio  $170 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 6,6 no lugar da solução de tirosinase comercial. Os tubos foram mantidos no escuro, à temperatura ambiente, em condição estática, também durante 12 dias. A descoloração foi acompanhada diariamente por meio de leitura da solução de corante em espectrofotômetro a 505 nm.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Pesquisa qualitativa de tirosinase (Agar “spot tests”)

Este teste qualitativo foi realizado com a finalidade de verificar a produção de tirosinase pelo *P. sanguineus*. No 6º dia de observação, notou-se o aparecimento de coloração avermelhada clara no micélio fúngico. Adicionou-se então algumas gotas de solução etanólica de p-cresol 0,1M ao micélio fúngico, e no dia seguinte (7º dia) observou-se desenvolvimento de coloração marrom-avermelhada mais intensa no micélio, que é indicativa da presença de tirosinase (Figura 4).

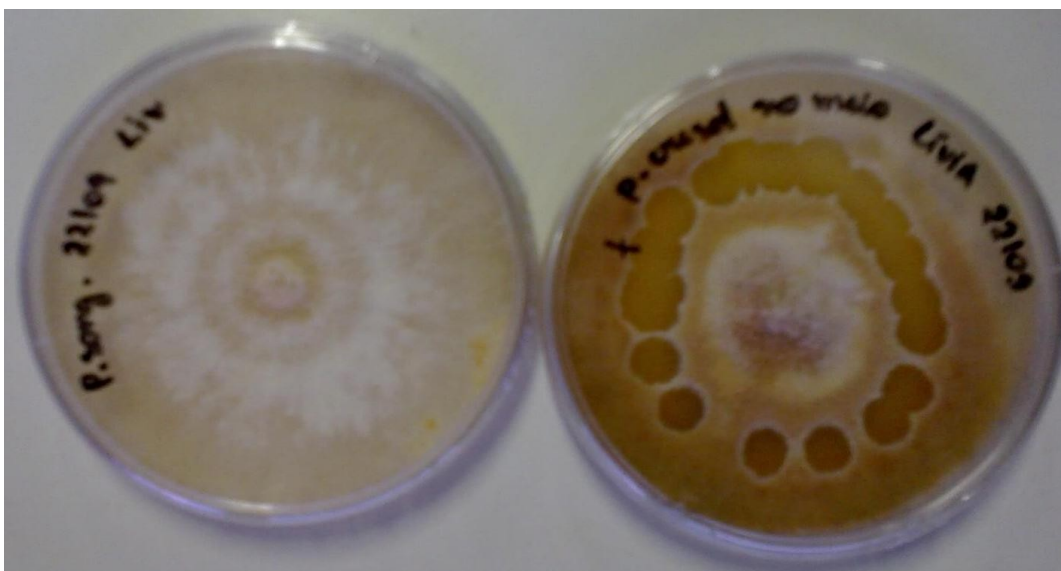


Figura 4 – Placas de Petri contendo meio BDA e o fungo *P. sanguineus* na ausência (esquerda) e na presença (direita) de p-cresol.

De acordo com GRAMSS *et al.*, 1998, após a aplicação de p-cresol solubilizado em etanol 96% a coloração da reação do p-cresol com a tirosinase aparece em alguns dos micélios, como indicativo de tirosinase intracelular. Isto está de acordo também com MAYER & HAREL, 1979, que afirmou que a tirosinase é uma enzima intracelular na maioria dos fungos investigados.

O teste para atividade cresolase da tirosinase não é influenciado pela presença de lacase ou peroxidase. O indicador p-cresol muda de coloração amarelada para marrom-avermelhado somente pela tirosinase, permanecendo incolor na presença de lacase e peroxidase (GRAMSS *et al.*, 1998).

Uma vez que a substância indicadora para tirosinase (p-cresol) foi aplicada em etanol 96%, a solução pode penetrar na célula. Vários dos discos de ágar inoculados coloriram o ágar de marrom-avermelhado, indicando a presença de tirosinase nas hifas rompidas (GRAMSS *et al.*, 1998).

## 4.2 Produção enzimática

### 4.2.1 Produção de lacase

Após a dosagem enzimática de lacase no lisado e no sobrenadante das amostras de *P. sanguineus* produzidas em meio caldo extrato de malte 2%, observou-se que há produção desta enzima tanto no lisado quanto no sobrenadante, como apresentado na Figura 5. Observou-se um pico de produção enzimática no 2º dia, com atividade de lacase de 72,98 U/L no lisado e de 111,35 U/L no sobrenadante. No 3º dia houve um decréscimo da produção e no 4º dia a produção de lacase voltou a aumentar, continuando alta até o 7º dia de incubação, tanto no lisado quanto no sobrenadante.

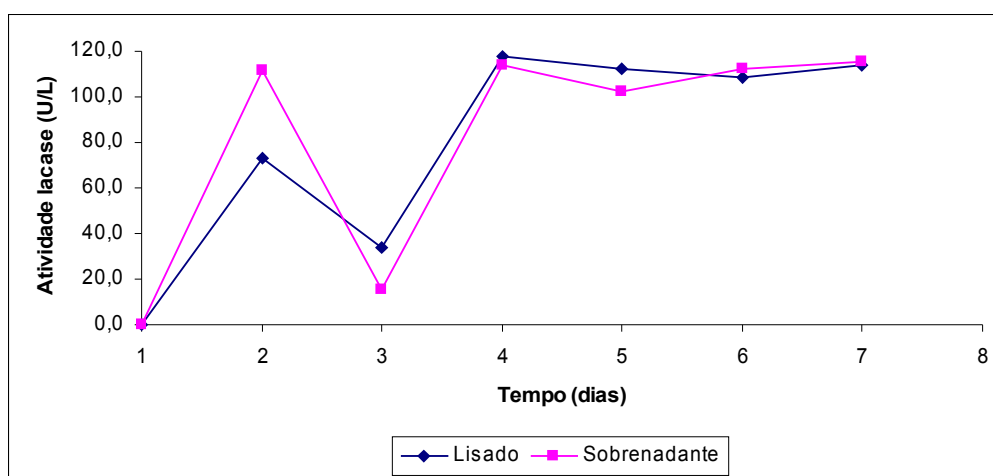


Figura 5 - Atividade de lacase no lisado e no sobrenadante de amostras de *P. sanguineus*.

Os resultados obtidos estão de acordo com os descritos por GARCIA *et al.*, 2006, em que a produção de lacase extracelular por *P. sanguineus* foi observada.

### 4.2.2 Produção de tirosinase

A dosagem enzimática de tirosinase no lisado e no sobrenadante das amostras de *P. sanguineus* revelou que a tirosinase é uma enzima intracelular neste fungo. A atividade de tirosinase no sobrenadante foi nula durante todos os dias de incubação (do 1º ao 7º dia). Já no lisado, a atividade de tirosinase apresentou pico de produção no 2º dia, com atividade de

18,96 U/L, conforme demonstrado na Figura 6, na presença de L-tirosina como indutor.

A tirosinase é descrita tipicamente como uma enzima intracelular (MAYER & HAREL, 1979), sendo que alguns estudos têm mostrado que certos fungos ectomicorrízicos produzem tirosinase extracelular (GRUHN & MILLER, 1991). No caso do *P. sanguineus*, observa-se somente a produção de tirosinase intracelular, o que está de acordo com a maioria das tirosinases estudadas (GRAMSS *et al.*, 1998). Visto que não houve produção de tirosinase extracelular, a atividade enzimática foi determinada apenas na fração intracelular para os estudos posteriores.

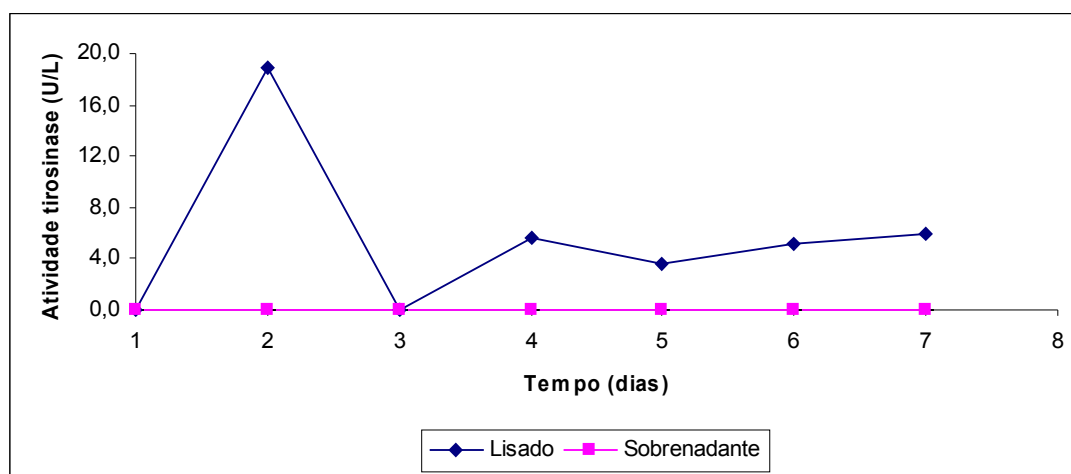


Figura 6 - Atividade de tirosinase no lisado e no sobrenadante de amostras de *P. sanguineus*.

#### 4.2.3 Seleção de compostos para produção de tirosinase

Observou-se que 0,3% (150 mg) de L-tirosina induziram a produção de tirosinase no lisado de forma bastante superior que os demais indutores testados (L-dopa, ácido caféico, ácido 4-hidroxifenil-2-propiónico e guaiacol), bem como na ausência de indutores. Utilizando-se 150 mg de L-tirosina como indutor, foram obtidos diversos picos de produção enzimática, dentre eles destacam-se os picos no 2º dia (9,77 U/L), no 4º dia (10,70 U/L), no 6º dia (8,91 U/L) e no 7º dia (14,62 U/L), como apresentado na Figura 7.

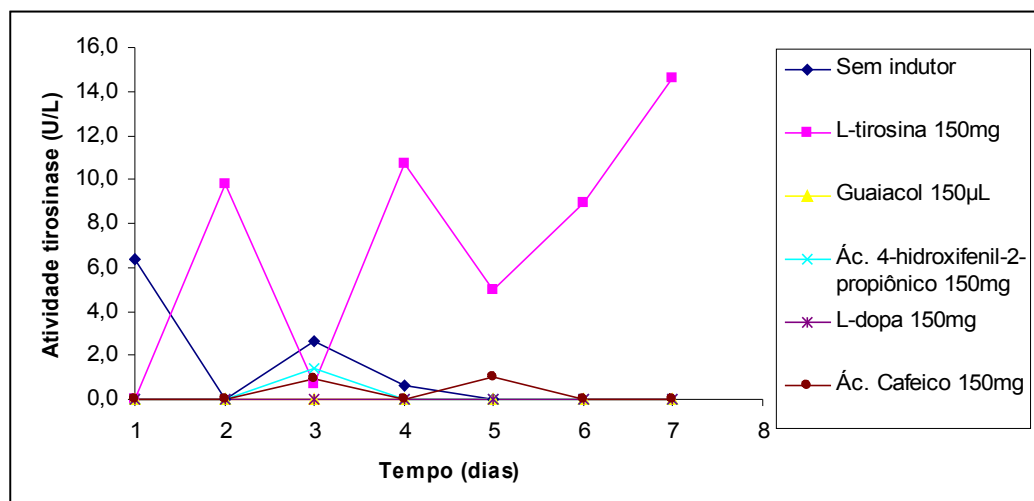


Figura 7 - Seleção de indutores para produção de tirosinase por *P. sanguineus*.

A produção de tirosinase na ausência de indutores ou quando outros indutores foram utilizados foi bastante pequena, sendo que a produção não chegou a 5 U/L em nenhum dos casos. Na ausência de indutores os picos ocorreram no 1º dia e no 3º dia, com atividade de tirosinase de 3,38 U/L e 2,60 U/L, demonstrando a importância do uso de indutores para produção de tirosinase.

Os dados sugerem que a tirosinase produzida pelo fungo *P. sanguineus* seja regulada geneticamente e que existe atividade de tirosinase constitutiva, uma vez que foi observada atividade de tirosinase na ausência de indutores (Figura 7). Esta enzima pode ainda ser induzida, conforme também mostrado na Figura 7.

Logo, devido a essa maior produção de tirosinase frente aos demais indutores, a L-tirosina foi o indutor escolhido para dar continuidade aos estudos, sendo que o mesmo foi testado nas concentrações de 0,3%, 0,15% e 0,075%. Ao final dos experimentos escolheu-se a concentração de L-tirosina 0,15% como melhor para a produção de tirosinase, conforme apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1 - Influência da concentração do indutor L-tirosina na produção de tirosinase por *P. sanguineus***

Tempo (dias)	Atividade		Atividade		Atividade	
	tirosinase	DPR	tirosinase	DPR	tirosinase	DPR
	0,3% (U/L)	(%)	0,15% (U/L)	(%)	0,075% (U/L)	(%)
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	9,77	2,40	18,97	5,02	5,41	2,78
3	0,00	0,00	0,00	0,00	6,37	6,89
4	10,70	3,19	5,55	3,51	6,95	2,45
5	4,98	8,27	3,53	0,69	0,00	0,00
6	8,91	8,91	5,16	3,31	5,33	5,65
7	14,61	10,00	5,86	8,71	4,55	7,23

Esta concentração foi escolhida devido ao fato de, dentre as concentrações testadas, ter sido a que apresentou uma maior produção de tirosinase em menor tempo de incubação. Enquanto a produção de tirosinase no 2º dia de incubação foi de 5,41 U/L para L-tirosina 0,075% e 9,77 U/L para L-tirosina 0,3%, a produção foi de 18,97 U/L para L-tirosina 0,15%. Até o 7º dia de incubação não foi observada nenhuma atividade tão alta quanto esta encontrada para L-tirosina 0,15%.

#### 4.2.4 Influência da luminosidade na produção de tirosinase

Observou-se que quando a incubação foi realizada no escuro o pico de produção enzimática ocorreu no 2º dia, apresentando atividade de tirosinase de 18,72 U/L. Já quando a incubação foi realizada no claro, observou-se 3 picos de produção no 2º, 4º e 7º dia de incubação, em que as atividades de tirosinase foram de 9,77 U/L, 10,70 U/L e 14,62 U/L, respectivamente, como apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2 - Influência da luminosidade na produção de tirosinase por *P. sanguineus* (indutor L-tirosina 0,15%).**

Tempo (dias)	Atividade tirosinase		Atividade tirosinase	
	claro (U/L)	DPR (%)	escuro (U/L)	DPR (%)
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	9,77	2,40	18,72	4,00
3	0,70	10,00	6,54	10,00
4	10,70	3,19	4,47	10,00
5	4,98	8,27	7,31	10,00
6	8,91	8,91	7,98	10,00
7	14,62	10,00	2,05	5,94

Apesar da maior atividade enzimática ter sido observada durante a incubação no escuro, a condição escolhida para a produção de tirosinase foi o claro, na tentativa de inibir

a produção de lacase, uma vez que a mesma tem sua produção aumentada no escuro (GARCIA *et al.*, 2006).

#### 4.2.5 Influência da biomassa na produção de tirosinase

Observou-se que a maior produção de tirosinase utilizando-se 10 discos de micélio ocorreu no 2º dia de incubação. A atividade encontrada foi de 18,96 U/L. Utilizando-se 20 discos de micélio, o pico de produção de tirosinase ocorreu no 6º dia de incubação, sendo que a atividade encontrada foi de 23,22 U/L. Apesar da maior atividade ter sido encontrada com 20 discos de micélio, esta atividade ocorreu no 6º dia, bem mais tardiamente do que o pico de atividade utilizando-se 10 discos de micélio (Tabela 3).

**Tabela 3 - Influência da biomassa na produção de tirosinase por *P. sanguineus*.**

Tempo (dias)	Atividade tirosinase 10 discos de micélio		Atividade tirosinase 20 discos de micélio	
	(U/L)	DPR (%)	(U/L)	DPR (%)
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	18,97	5,02	9,24	2,33
3	0,00	0,00	10,83	6,31
4	5,90	10,00	14,39	4,74
5	3,77	10,00	10,79	6,37
6	4,80	10,00	23,22	7,54
7	5,86	8,71	8,45	4,32

#### 4.2.6 Influência dos meios de cultura na produção de tirosinase

Os picos de atividade de tirosinase quando o caldo batata foi utilizado ocorreram no 2º dia, 3º dia e 6º dia, com atividades enzimáticas de 12,53 U/L, 14,71 U/L e 14,22 U/L, respectivamente. Quando o meio extrato de malte 2% foi utilizado, observou-se um pico de produção de tirosinase no 2º dia de incubação, com atividade de 18,97 U/L, conforme mostrado na Tabela 4.

**Tabela 4 - Influência dos meios de cultura na produção de tirosinase por *P. sanguineus*.**

Tempo (dias)	Atividade tirosinase meio Extrato de Malte 2% (U/L)		Atividade tirosinase meio Caldo batata (U/L)	
	(U/L)	DPR (%)	(U/L)	DPR (%)
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	18,97	5,02	12,53	5,53
3	0,00	0,00	14,71	5,14
4	5,90	10,00	3,93	10,00
5	3,77	10,00	5,44	7,35
6	4,80	10,00	14,22	7,04
7	5,86	8,71	6,15	3,73

Deste modo, escolheu-se o meio extrato de malte 2% para a produção de tirosinase, visto que o pico obtido ocorreu num curto período de incubação (2 dias) e o valor da atividade enzimática foi maior do que os demais.

### 4.3 Ensaio enzimático para atividade de tirosinase

Com a finalidade de comparação entre os métodos contínuo e descontínuo para determinação da atividade da tirosinase, um mesmo extrato enzimático bruto de *P. sanguineus* foi utilizado para os ensaios enzimáticos pelos 2 métodos de quantificação. Observou-se que ambos os métodos tiveram resultados semelhantes com diferença de atividade de aproximadamente 3 U (Tabela 5). O método espectrofotométrico contínuo é descrito como sendo um ensaio que permite o monitoramento espectrofotométrico da formação do complexo MBTH-quinona a 505 nm. Porém, este método possui uma desvantagem, pois permite que apenas poucas amostras sejam quantificadas em uma hora (WINDER, 1994). Dessa maneira, para melhorar o desempenho do ensaio, WINDER adaptou esse método de modo que várias amostras pudessem ser lidas com a adição de ácido perclórico para parar a reação da tirosinase. Devido à pequena diferença entre os valores encontrados nas quantificações realizadas pelos 2 métodos, a utilização de qualquer um deles pode ser satisfatória para a determinação da tirosinase.

**Tabela 5 – Atividades enzimáticas do extrato enzimático bruto de *P. sanguineus* medidas pelos métodos contínuo e descontínuo.**

	Atividade enzimática tirosinase (U/L)	
	Método contínuo	Método descontínuo
Extrato enzimático bruto de <i>P. sanguineus</i>	8,065 ± 0,05	11,085 ± 0,36

A Tabela 6 apresenta os dados relativos à estabilidade da mistura reacional, ou seja, o tempo desde a finalização da reação com solução de ácido perclórico 1M até a leitura em espectrofotômetro, relacionados com a queda na atividade enzimática.

**Tabela 6 - Estabilidade da mistura reacional após o término da reação enzimática para atividade de tirosinase.**

<b>Tempo decorrido do término da reação enzimática até a leitura (min)</b>	<b>Atividade relativa (%)</b>
0	100,00
25	97,97
45	89,18
65	84,82
90	80,24
110	75,73
120	74,30
155	72,13

De acordo com WINDER (1994), a absorbância deve ser medida em espectrofotômetro UV-vis, em período não superior à 1 hora, contado a partir do término da reação enzimática. Observou-se neste experimento que a atividade enzimática encontrada 65 minutos após o término da reação foi de 84,82%, se comparada com a atividade medida imediatamente após o término da reação, sendo que a queda na atividade foi de 15,18%.

Decorridos 25 minutos desde o término da reação até a leitura em espectrofotômetro, observou-se atividade relativa de 97,97%, sendo uma queda de apenas 2,03% na atividade. Em vista disso, realizou-se as leituras de atividade enzimática em no máximo 25 minutos após o término da reação enzimática, com o intuito de minimizar os efeitos de queda de atividade relacionados à demora para leitura das amostras.

Após o término da reação enzimática para atividade de tirosinase, a varredura de 200 a 800 nm de comprimento de onda de uma amostra de extrato bruto de tirosinase de *P. sanguineus* apresentou picos de absorção de 0,327 em 506,1 nm e 501,1 nm. Esses picos de absorção em torno de 500 nm estão de acordo com o relatado por WINDER (1994). Logo, as absorbâncias das misturas reacionais dos ensaios para determinação da atividade enzimática de tirosinase foram todas medidas a 505 nm, como descrito por WINDER (1994).

#### **4.4 Seleção de substratos para determinação da atividade de tirosinase**

A atividade de tirosinase encontrada quando a L-dopa 3 mmol.L<sup>-1</sup> foi utilizada como substrato foi de 22,34 U/L, enquanto a atividade quando DHPPA 2 mmol.L<sup>-1</sup> foi utilizado foi de 7,31 U/L, o que representa cerca de 30% da atividade com L-dopa (Figura 8). Logo, podemos concluir que a L-dopa é um substrato mais facilmente oxidado pela tirosinase do que

o DHPPA, e por isso somente ela foi utilizada para a determinação enzimática da tirosinase de agora em diante.

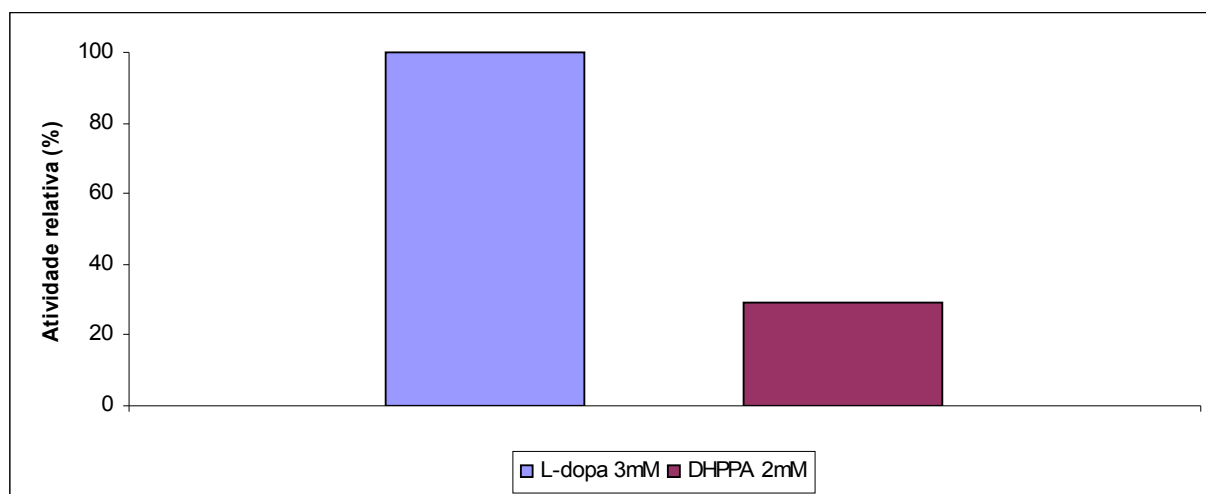


Figura 8 - Seleção de substratos para atividade dopa oxidase da tirosinase.

Estes resultados são distintos dos encontrados na literatura pesquisada. ESPÍN *et al.*, 1995a por exemplo, relatou em seu trabalho que para a atividade difenolase, o substrato DHPPA mostra-se melhor do que a L-dopa.

Apesar da maior especificidade da L-dopa, quando comparada com o DHPPA, é conhecido que a mesma não é substrato somente para tirosinase, sendo que também pode ser oxidada pela lacase (RESCIGNO *et al.*, 2007). Em vista disso, faz-se necessário o acréscimo de azida sódica, um conhecido inibidor de lacase de *Pycnoporus sanguineus* (GARCIA *et al.*, 2007), no meio reacional para quantificação da tirosinase, com a finalidade de eliminar as possíveis interferências da presença de lacase nas amostras a serem analisadas. No caso deste ensaio não foi necessário a adição de azida sódica, já que era conhecido que a amostra não apresentava lacase, o mesmo não aconteceu com as amostras de origem fúngica produzidas pelo *P. sanguineus* que necessitaram da adição de azida por conterem altas concentrações de lacase.

A L-tirosina seria o substrato ideal para determinação de tirosinase nas amostras, uma vez que é o único verdadeiramente específico para tirosinase, não sendo substrato para lacase (RESCIGNO *et al.*, 2007). No entanto, a solubilização da mesma não foi possível apesar do uso de solventes descritos na literatura, tais como o ácido fosfórico 0,15 mmol.L<sup>-1</sup>, o que impossibilitou seu uso nos ensaios enzimáticos realizados.

## 4.5 Teste de especificidade dos ensaios enzimáticos

### 4.5.1 Teste de especificidade do ensaio para lacase

Este teste foi realizado com a finalidade de verificar se o ensaio que quantifica a lacase, a partir da oxidação do ABTS, é específico para lacase, ou se quantifica também a tirosinase. Ao final do ensaio observou-se que não houve desenvolvimento de coloração esverdeada no meio reacional, típica para oxidação do ABTS, e que a absorbância a 420 nm foi nula, o que indica que a amostra de tirosinase comercial não apresenta atividade de lacase e que o ensaio para lacase é específico, não quantificando a tirosinase.

Dados da literatura pesquisada indicam que amostras de tirosinase comercial podem conter, além da tirosinase, quantidades muitas vezes grandes de outras enzimas, tais como lacase,  $\beta$ -glucosidase e  $\beta$ -xilosidase (RESCIGNO *et al.*, 2007).

Pesquisadores que frequentemente fazem uso de preparações de tirosinase comercial sugerem que a presença de enzimas contaminantes pode levar a interpretações equivocadas dos resultados. PHILLIPS *et al.*, 1990 em seu estudo com tirosinas fluoradas, estimaram que na preparação comercial de tirosinase que eles utilizaram a enzima estava somente cerca de 3% pura (RESCIGNO *et al.* 2007). Foi confirmada a presença de atividade de lacase e outros contaminantes enzimaticamente ativos foram identificados em preparações comerciais de tirosinase. Esses contaminantes podem afetar a correta interpretação da atividade de tirosinase (RESCIGNO *et al.*, 2007).

Nos casos em que um procedimento de purificação não pode ser realizado, para minimizar o efeito indesejável da possibilidade de contaminação por lacase, é sugerido tomar algumas precauções. A presença de lacase deve ser sempre investigada através da quantificação por um ensaio sensível (RESCIGNO *et al.*, 2007).

No presente trabalho, a amostra de tirosinase comercial foi investigada quanto à presença de lacase, sendo que a lacase não foi encontrada como contaminante nesta amostra. Ao mesmo tempo, o ensaio para lacase mostrou-se específico para esta enzima, uma vez que não foi capaz de quantificar a tirosinase.

### 4.5.2 Teste de especificidade do ensaio para tirosinase

Verificou-se que o método para dosagem de tirosinase (na ausência de azida sódica) não é específico para esta enzima, visto que foi observado ao final dos ensaios uma leitura (absorbância) de 0,107 a 505 nm, mesmo com a utilização de lacase purificada no en-

saio. Isto ocorre devido ao fato da L-dopa (substrato difenólico) não ser um substrato específico para a tirosinase, sendo também substrato para a enzima lacase (RESCIGNO *et al.*, 2007).

Com a finalidade de contornar este problema da especificidade de substratos, realizou-se 2 ensaios utilizando como amostra a lacase purificada, sendo que no segundo ensaio adicionou-se 9  $\mu\text{L}$  de solução de azida sódica 0,01M na tentativa de inibir a lacase e aproximar a leitura à 505 nm de zero.

No primeiro ensaio, na ausência de azida sódica, como já era esperado, observou-se uma absorbância de 0,181, utilizando-se como amostra lacase purificada, o que representa uma atividade de tirosinase de 10,05 U/L. Este dado se mostra incoerente, uma vez que a amostra não continha tirosinase.

Já no segundo ensaio, na presença de azida sódica, observou-se uma absorbância média de 0,0515, o que representa uma atividade de 2,86 U/L. Este valor, bastante inferior ao primeiro, demonstra uma inibição de 71,53% da amostra de lacase purificada pela azida sódica. Esta considerável inibição permite que amostras contendo lacase em adição à tirosinase, sejam quantificadas quanto à presença de tirosinase pelo método descrito anteriormente. Apesar do substrato utilizado (L-dopa) ser comum às 2 enzimas em questão, a adição de azida sódica ao meio reacional permite a inibição da lacase e quantificação somente da tirosinase.

#### 4.6 Efeito de inibidores sob atividade de lacase e de tirosinase

Os resultados relativos ao efeito de inibidores sob atividade de lacase e de tirosinase estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7 – Efeito de diferentes compostos sob atividade de lacase e tirosinase.**

Compostos	Concentração (mmol.L <sup>-1</sup> )	Atividade relativa lacase (%)	Atividade relativa tirosinase (%)
Sem inibidor	-	100	100
Azida sódica	0,1	2,68	95,85
PMSF	0,1	-	100
PTU	6	4,62	0
SHAM	6	3,62	0

Nos ensaios realizados com a amostra de lacase purificada, foi encontrada uma atividade de 103,83 U/L na ausência de azida sódica e uma atividade de 2,78 U/L na presença de azida sódica. Logo, houve uma inibição de 97,32% da lacase da amostra pela azida sódica.

A inibição por azida sódica é bastante comum em enzimas contendo cobre, uma vez que ela pode se ligar aos átomos de cobre tipo 2 e 3, resultando numa interrupção da transferência interna de elétrons e conseqüente inibição da atividade (GARCIA *et al.*, 2007; GIANFREDA *et al.*, 1999). De modo geral, a inibição da lacase por quelantes de metal como a azida sódica e o EDTA sugerem que há pelo menos um metal requerido para a atividade enzimática (EDENS *et al.*, 1999).

O efeito da azida sódica sobre a atividade de lacases produzidas por *P. sanguineus* foi avaliado por GARCIA *et al.*, 2006. Em seu trabalho foi observado que 0,01 mmol.L<sup>-1</sup> de azida sódica inibiram em 85% a enzima Lac 1, restando apenas 15% da atividade desta enzima. A mesma concentração de azida sódica inibiu a Lac 2 em 77%, restando 23% de atividade residual. No trabalho de KIISKINEN *et al.*, 2004, foi observada uma inibição de 99% da atividade de lacase na presença de 1 mmol.L<sup>-1</sup> de azida sódica. No presente trabalho, apesar de utilizar o extrato enzimático bruto, ao contrário da lacase purificada utilizada por GARCIA *et al.*, 2006, também foi observada uma alta porcentagem de inibição da lacase na presença de 0,01 mmol.L<sup>-1</sup> de azida sódica.

A atividade de lacase encontrada no ensaio realizado sem a adição dos inibidores SHAM e PTU foi de 109,82 U/L (100% de atividade). A atividade de lacase encontrada no ensaio que continha SHAM 6 mmol.L<sup>-1</sup> no meio reacional, foi de 3,98 U/L, o que corresponde a 3,62% de atividade de lacase. Já no ensaio contendo PTU 6 mmol.L<sup>-1</sup> no meio reacional, a atividade de lacase encontrada foi de 5,074 U/L, o que corresponde a 4,62% de atividade de lacase.

Logo, observou-se que a porcentagem de inibição da lacase na amostra foi de 96,38% por SHAM 6 mmol.L<sup>-1</sup> e de 95,38% por PTU 6 mmol.L<sup>-1</sup>, sugerindo que a lacase também seja inibida por SHAM e PTU, apesar desses inibidores serem tidos como inibidores específicos de tirosinase (GUNTHER *et al.*, 1998; MIRANDA *et al.*, 1992; RESCIGNO *et al.*, 2007; WINDER, 1994).

No ensaio realizado com amostra de tirosinase comercial, sem a adição de azida sódica, foi encontrada uma atividade de tirosinase de 28,24 U/L (100% de atividade). Já no ensaio com a adição de azida sódica a atividade encontrada foi de 27,07 U/L, o que corresponde a 95,85% da atividade na ausência de azida. Logo, percebe-se uma queda na atividade de tirosinase de 4,15% na presença de azida sódica. Apesar desta queda na atividade de tirosinase, optou-se pela continuação do uso da azida sódica nos ensaios, uma vez que a mesma é imprescindível para a quantificação precisa da tirosinase em amostras que também contenham

lacase, como é o caso das amostras de *P. sanguineus* que foram analisadas, conforme descrito anteriormente no item 4.5.2.

O ensaio com PMSF  $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$  no meio reacional foi realizado com o objetivo de verificar se o PMSF, inibidor de proteases utilizado durante a etapa de extração enzimática, atua também como inibidor da atividade da tirosinase. A atividade de tirosinase encontrada na ausência de PMSF (21,72 U/L) foi praticamente a mesma atividade encontrada na presença do inibidor (23,82 U/L), sugerindo deste modo que o PMSF, na concentração em que é utilizado na etapa de extração enzimática, não inibe a tirosinase.

O uso de PMSF (inibidor de serina proteases), bem como o uso de coquetel inibidor de proteases (que inibe serina-, cisteína-, aspártico- e metaloproteases), durante a etapa de extração enzimática da tirosinase é indispensável. Isso porque a ruptura das células para isolamento de proteínas pode resultar na liberação de proteases de compartimentos subcelulares. Essas proteases frequentemente têm que ser removidas rapidamente para assegurar que a proteína de interesse permaneça intacta. Até que a proteína de interesse seja purificada, inibidores de protease devem ser usados para impedir a proteólise (BOLLAG *et al.*, 1996).

A atividade de tirosinase em ambas as amostras, tanto a amostra de lisado contendo tirosinase, quanto a amostra de tirosinase comercial, foi completamente inibida por PTU  $6 \text{ mmol.L}^{-1}$  e SHAM  $6 \text{ mmol.L}^{-1}$ .

No caso da amostra de lisado contendo tirosinase, foi encontrada uma atividade de tirosinase de 23,22 U/L sem o uso de inibidores. Esta atividade, após o acréscimo de PTU e SHAM, foi nula.

Neste caso, foi necessário o uso de azida sódica no meio reacional, uma vez que além da tirosinase, esta amostra produzida por *P. sanguineus* também apresentou grande quantidade de lacase (dados não apresentados), que precisou ser inibida pela adição de azida sódica.

No caso da amostra de tirosinase comercial, foi encontrada uma atividade de tirosinase de 47,25 U/L sem o uso de inibidores. Esta atividade, após o acréscimo de PTU e SHAM, também foi nula. Neste caso, não foi necessário o uso de azida sódica, já que a amostra em questão não apresentava atividade de lacase.

Inibidores foram anteriormente utilizados para verificar que o método descontínuo utilizando MBTH realmente quantifica a atividade dopa oxidase da tirosinase. Os inibidores de tirosinase dietilditiocarbamato ( $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) e PTU ( $0,7 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) inibiram completa-

mente a atividade dopa oxidase da tirosinase, confirmando a especificidade do ensaio descontínuo para a tirosinase, de acordo com WINDER, 1994. No presente experimento, no entanto, verificou-se que apesar do PTU realmente inibir a tirosinase, não pode ser considerado específico, já que também inibe a lacase juntamente com o SHAM.

#### 4.7 Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE)

A Figura 10 apresenta o perfil de proteínas encontrado no extrato bruto de *P. sanguineus*, bem como o perfil de proteínas da amostra de tirosinase comercial, após aplicação de cerca de 10 µg de proteína em gel de poliacrilamida (10%) e coloração com solução de Coomassie a 0,1%.

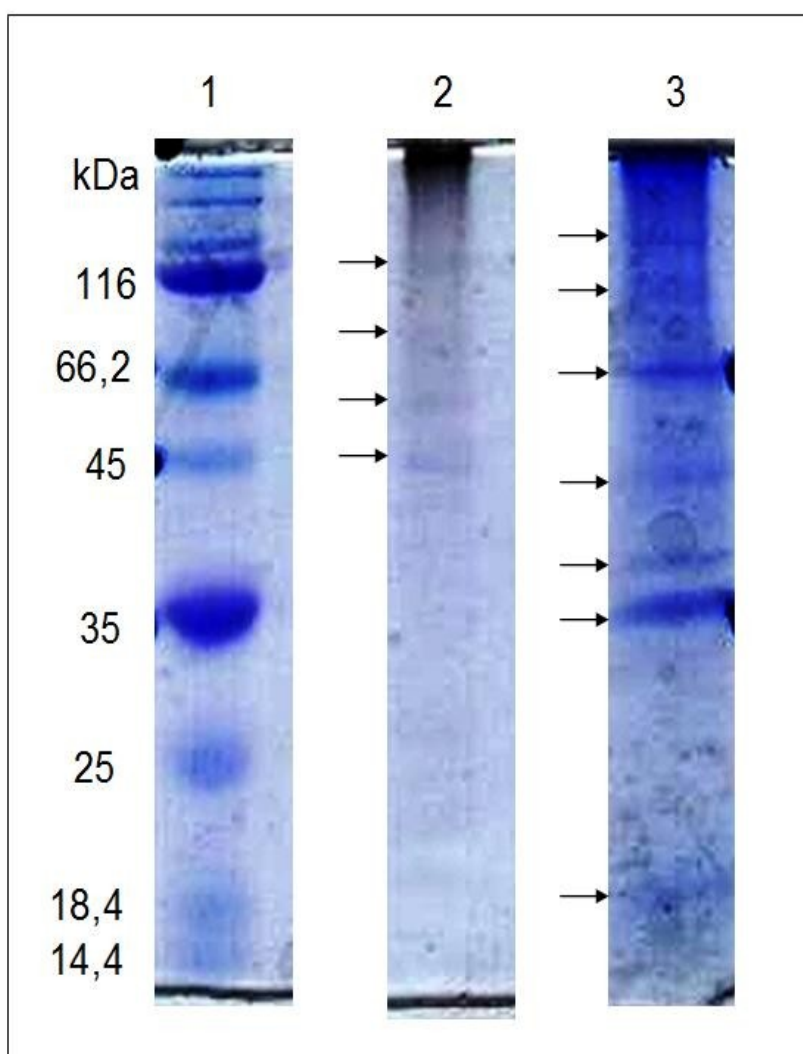


Figura 10 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%), sob condições desnaturantes, corado com solução de Coomassie a 0,1%: 1. Marcadores de massa molecular; 2. Extrato bruto (lisado) de *P. sanguineus*; 3. Tirosinase comercial.

Na amostra de tirosinase comercial, observou-se o aparecimento de 7 bandas, 3 delas de maior intensidade, sendo que 2 apresentaram massas moleculares de cerca de 66,2 kDa e 35 kDa. No trabalho de RESCIGNO *et al.*, 2007, a eletroforese não desnaturante

(SDS-PAGE) de tirosinase fúngica comercial (Fluka) apresentou um complexo perfil de proteínas não identificadas, com pelo menos 3 bandas principais e diversas outras bandas menores e pouco coradas. Os resultados obtidos por RESCIGNO *et al.*, 2007 estão de acordo com os obtidos no presente trabalho.

Na amostra de extrato bruto de *P. sanguineus*, observou-se o aparecimento de 4 bandas de baixa intensidade, com massas moleculares estimadas de 54,9 kDa, 64,8 kDa, 78,6 kDa e 95,3 kDa.

No trabalho de FAN & FLURKEY, 2004, observou-se a presença de 2 bandas de proteínas mais fortemente coradas e uma terceira banda com menor intensidade de coloração, para amostra contendo tirosinase purificada de cogumelo *Portabella*. Os tamanhos estimados das maiores bandas foram de 48 e 43 kDa. Para a menor banda de proteína estimou-se o massa molecular de 60 kDa. Diversas outras proteínas com massa molecular inferior a 45 kDa foram observadas, no entanto não foram visíveis nos géis escaneados. Supõe-se que as bandas de 43-48 kDa são de formas ativas de tirosinase quebradas por proteólise, citadas por muitos autores (GERRITSEN *et al.*, 1994; WICHERS *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 1999). No trabalho de HALAOULI *et al.*, 2005, o gel de eletroforese sob condições desnaturantes foi realizado com a finalidade de controlar a eficiência das etapas de purificação do extrato bruto de tirosinase de *P. sanguineus*. A tirosinase foi purificada e a massa molecular dela foi confirmada como sendo de 45 kDa, sugerindo que a enzima seja monomérica. Em vista disso, supõe-se que a banda de 54,9 kDa encontrada no presente trabalho seja de tirosinase, no entanto, etapas de purificação são necessárias para confirmação deste resultado.

#### **4.8 Determinação da atividade de tirosinase em gel de eletroforese**

A Figura 11 apresenta os resultados do gel de eletroforese não desnaturante corado para atividade de tirosinase com L-dopa 5 mmol.L<sup>-1</sup> e MBTH 2 mmol.L<sup>-1</sup>. As amostras são de tirosinase comercial (1), extrato bruto (lisado) de *P. sanguineus* (2) e sobrenadante de *P. sanguineus* (3).

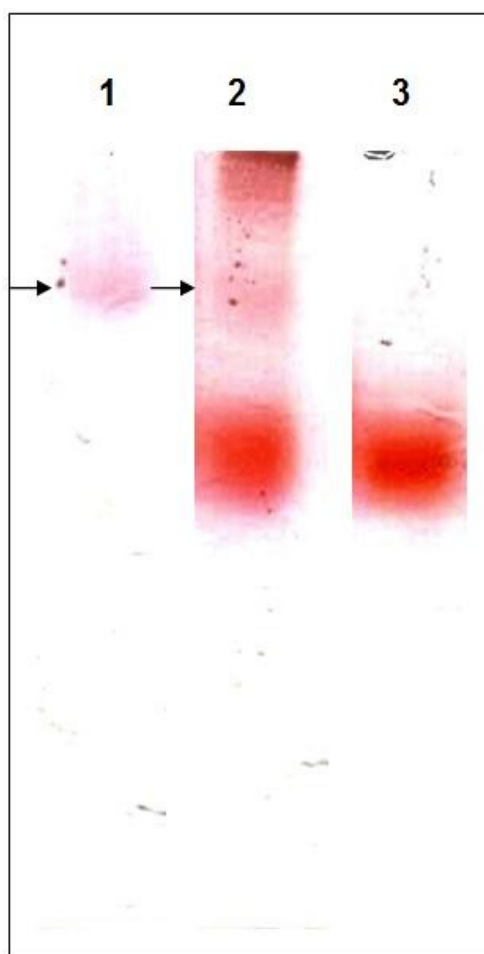


Figura 11 - Gel de eletroforese não desnaturante corado para atividade de tirosinase com *L-dopa* 5 mmol.L<sup>-1</sup> e MBTH 2 mmol.L<sup>-1</sup>: 1. Tirosinase comercial; 2. Extrato bruto (lisado) de *P. sanguineus*; 3. Sobrenadante de *P. sanguineus* (as setas indicam as bandas relativas à tirosinase e as demais bandas são relativas à lacase).

O substrato *L-dopa* utilizado na coloração do gel, como apresentado anteriormente no item 4.4, não é específico para tirosinase, sendo também substrato para a enzima lacase. Como não utilizou-se inibidor de lacase (azida sódica) no presente ensaio, as bandas relativas à lacase também foram coradas. A amostra de tirosinase comercial foi anteriormente quantificada quanto à presença de tirosinase e lacase, do mesmo modo que as amostras de extrato bruto e de sobrenadante de *P. sanguineus*. A atividade de lacase foi nula na amostra de tirosinase comercial, a atividade de tirosinase foi nula na amostra de sobrenadante de *P. sanguineus*, enquanto a amostra de lisado de *P. sanguineus* apresentou atividade de lacase e de tirosinase, comprovando a identidade das bandas apresentadas na Figura 11.

Quando a preparação comercial de tirosinase foi corada para investigação das atividades de lacase e tirosinase por RESCIGNO *et al.*, 2007, a banda referente à lacase foi observada inferiormente à banda relativa à tirosinase, do mesmo modo que as bandas observadas no presente trabalho.

Em gel de eletroforese (SDS-PAGE) parcialmente desnaturante, realizado com amostras não fervidas ou tratadas com agentes redutores, diversas isoformas de tirosinase foram detectadas em extrato bruto de cogumelo *Portabella* (FAN & FLURKEY, 2003), ao contrário do observado no presente trabalho, em que apenas uma banda larga de tirosinase foi obtida no gel de atividade.

#### **4.9 Caracterização bioquímica do extrato bruto de tirosinase de *P. sanguineus***

##### **4.9.1 Determinação do pH ótimo**

A faixa de pH ótimo para atividade de tirosinase do extrato bruto de *P. sanguineus* foi de 6,0 a 6,6, como mostrado na Figura 12. A atividade encontrada em pH 6,0 foi de 25,78 U/L, o que corresponde à 96,81% de atividade relativa, enquanto a atividade encontrada em pH 6,6 foi de 26,63 U/L, o que corresponde a 100% de atividade relativa de tirosinase. Este valor de pH ótimo encontrado para o extrato bruto de tirosinase de *P. sanguineus* (CCT-4518) coincide com o valor de pH ótimo encontrado para a tirosinase purificada de *P. sanguineus* (CBS 614.73), cuja atividade ótima foi observada em pH 6,5-7,0 (HALAOULI *et al.*, 2005). A tirosinase purificada por HALAOULI *et al.*, 2005 mostrou-se quase totalmente ativa na faixa de pH de 5 a 8, o que não foi observado com o extrato bruto de tirosinase do presente trabalho, em que atividades relativas superiores a 70% foram encontradas somente nos pHs 5,6, 6,0, 6,6 e 7,0. Em pH 5,0 a atividade relativa foi de apenas 58,57%, em pH 7,6 foi de 61,89% e em pH 8,0 foi de 60,60%. Em vista disso, o pH ótimo para atividade de tirosinase do extrato bruto de *P. sanguineus* (CCT-4518) foi de 6,6 (atividade máxima) e somente este pH foi utilizado nos ensaios enzimáticos subsequentes.

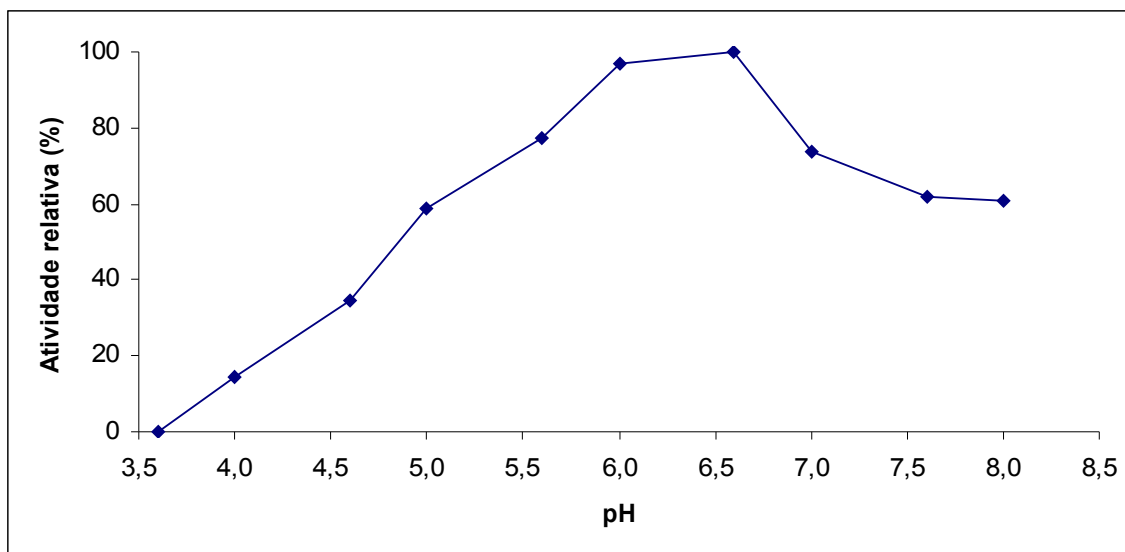


Figura 12 - Determinação do pH ótimo do extrato bruto de tirosinase de *P. sanguineus*.

#### 4.9.2 Determinação da temperatura ótima

O extrato bruto de tirosinase de *P. sanguineus* (CCT-4518) mostrou-se quase totalmente ativo na faixa de temperatura de 40-60°C, com atividades relativas superiores a 90% em todas as temperaturas testadas neste intervalo. A temperatura ótima encontrada foi de 45°C (100% de atividade relativa), apresentando atividade de 23,57 U/L, seguida pela temperatura de 50°C (99,49% de atividade relativa) e atividade de tirosinase de 23,45 U/L (Figura 13).

A tirosinase purificada de *P. sanguineus* (CBS 614.73) estudada por HALOULI *et al.*, 2005, apresentou-se ativa em ampla faixa de temperatura (25-70°C), sendo a temperatura ótima 60-65°C. A 60°C o extrato bruto de tirosinase de *P. sanguineus* apresentou boa atividade (94,44% de atividade relativa), entretanto a 65°C observou-se queda na atividade e conseqüente redução da atividade relativa para 70,74%. Em vista disso, a temperatura utilizada nos ensaios posteriores foi a ótima de 45°C.

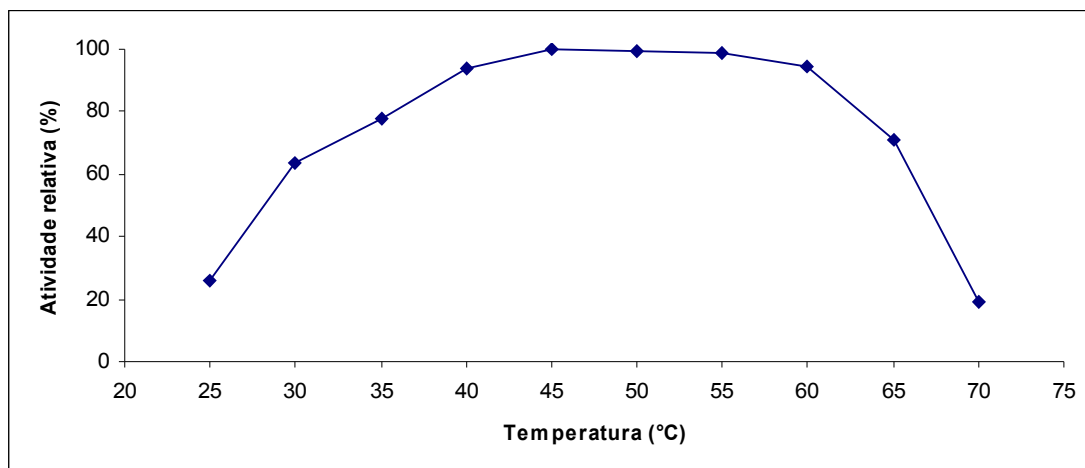


Figura 13- Determinação da temperatura ótima do extrato bruto de tirosinase de *P. sanguineus*.

#### 4.9.3 Determinação da termoestabilidade

A influência da temperatura na estabilidade do extrato bruto de tirosinase de *P. sanguineus* foi verificada após pré-incubação do extrato bruto por um período variável de 0 a 90 minutos em temperaturas de 45, 50 e 55°C, conforme demonstrado na Figura 14.

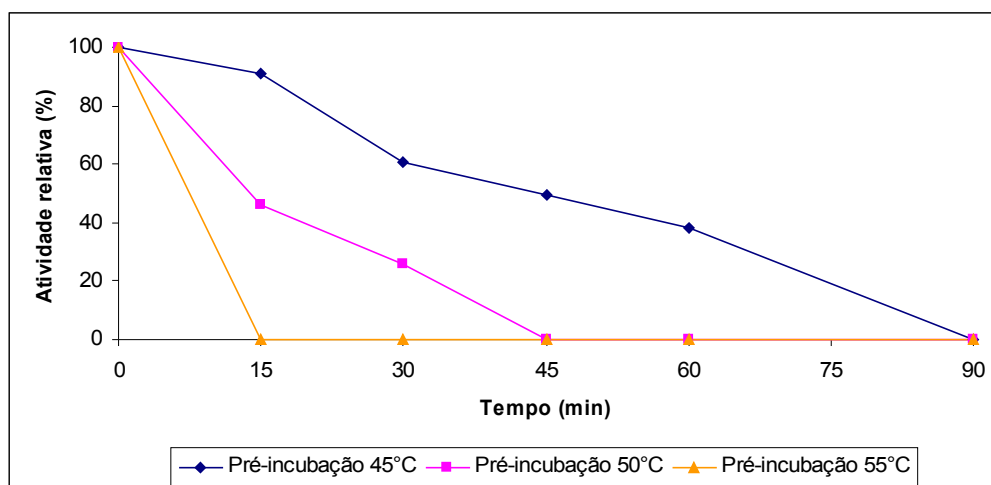


Figura 14 - Determinação da termoestabilidade do extrato bruto de tirosinase de *P. sanguineus*.

Os resultados apresentados mostram que a estabilidade do extrato bruto de tirosinase diminui com o aumento da temperatura de pré-incubação e também com o aumento do tempo de pré-incubação. Observou-se que o extrato bruto estudado apresentou uma perda rápida de atividade quando pré-incubado por períodos relativamente curtos de tempo nas temperaturas de 50 e 55°C. Em apenas 15 minutos de pré-incubação a 50°C, observou-se queda de 53,87% na atividade relativa de tirosinase. Em 45 minutos de pré-incubação a queda na atividade relativa foi de 100%. Já com relação à pré-incubação à 55°C, em apenas 15

minutos a queda na atividade relativa foi de 100%. No caso da pré-incubação à 45°C, foi observada maior estabilidade do extrato bruto, sendo que após 45 minutos de incubação ainda restou-se cerca de 50% de atividade relativa. A tirosinase purificada de *P. sanguineus* (CBS 614.73) estudada por HALAOULI *et al.*, 2005, mostrou-se mais termoestável, apresentando considerável estabilidade abaixo de 60°C. A 50°C, a meia-vida da enzima foi maior do que 120 minutos, enquanto a 60°C foi quase completamente inativada após 20 minutos de incubação.

#### 4.9.4 Determinação da estabilidade no meio reacional

A Figura 15 apresenta os dados relativos à determinação da estabilidade no meio reacional.

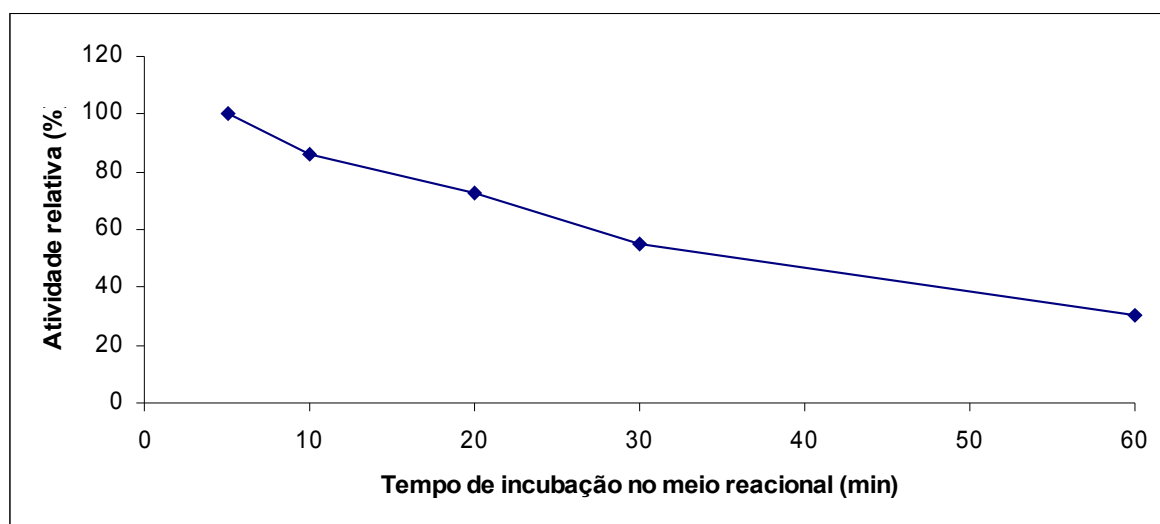


Figura 15 - Determinação da estabilidade no meio reacional do extrato bruto de tirosinase de *P. sanguineus*.

Observa-se que o tempo de 5 minutos apresentou o maior valor de atividade enzimática, 26,69 U/L, o que corresponde à 100% de atividade relativa. A atividade relativa foi decrescente com o passar do tempo, sendo que chegou a 8,05 U/L em 60 minutos de incubação, correspondendo a 30,18% de atividade relativa. No tempo em que os ensaios enzimáticos estavam sendo realizados, 10 minutos, a atividade enzimática encontrada foi de 23 U/L (86,18% de atividade relativa). De acordo com WINDER (1994), a incubação deve ocorrer em um período fixo entre 10 e 30 minutos, no entanto em nossos estudos foi constatado que a atividade no tempo de 5 minutos apresenta-se aumentada, logo este tempo de incubação foi utilizado, enquanto no tempo de 30 minutos, a atividade enzimática encontrada foi de somente 14,73 U/L (55,19% de atividade relativa). Em vista disso, o tempo de incubação de 5 minutos apresentou-se mais vantajoso, ao contrário dos tempos de 10 a 30 minutos encontrados no tra-

balho do autor.

#### 4.10 Descoloração de corantes em meio líquido

A varredura de 200 a 800 nm de comprimento de onda da solução do corante Vermelho Ponceaux a 0,002% apresentou pico de absorção de 0,666 em 505 nm. Logo, as leituras do ensaio de descoloração de corantes em meio líquido foram realizadas neste comprimento de onda.

A absorbância a 505 nm da solução de Vermelho Ponceaux a 0,002%, sem a adição da solução de tirosinase foi de cerca de 0,6. Esta absorbância manteve-se constante em todos os frascos, até mesmo naqueles em que a solução de tirosinase foi adicionada nas diferentes concentrações, durante os 12 dias de monitoramento da descoloração. Já em relação ao experimento com a solução de tirosinase mais concentrada, a absorbância encontrada para os tubos branco e teste foi de 0,390, leitura que se repetiu durante os 12 dias de monitoramento da descoloração. Em vista disso, observa-se que pelo fato da absorbância não ter diminuído durante o período estudado, a tirosinase não apresenta capacidade de descoloração do corante Vermelho Ponceaux.

Não foram encontrados na literatura pesquisada, relatos acerca da tirosinase na descoloração de corantes, somente dos fungos como um todo. De acordo com POINTING & VRIJMOED, 2000, a descoloração baseada nos tratamentos com lacase são potencialmente vantajosas para biorremediação, uma vez que a enzima é produzida em maiores quantidades e é frequentemente produzida constitutivamente ou requer menores condições de indução do que as requeridas para a produção de LiP ou MnP.

Ainda no trabalho de POINTING & VRIJMOED, 2000, foi observada descoloração completa ou parcial de todos os corantes azo avaliados (orange G, CI 16230, CI 16185) por *P. sanguineus*, sendo que esta descoloração foi correlacionada apenas com a produção de lacase, apesar de também terem sido avaliadas as produções de LiP e MnP. Deste modo, a descoloração observada quando o fungo é utilizado, pode ser devida à produção de lacase ou outras enzimas, sendo que a produção de tirosinase não foi investigada.

## 5 CONCLUSÕES

A reação para quantificação da atividade difenolase da tirosinase foi padronizada, sendo que o meio reacional deve conter tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup> pH 5,0, L-dopa 3,2 mmol.L<sup>-1</sup>, MBTH 5 mmol.L<sup>-1</sup>, DMF 2%, azida sódica 0,1 mmol.L<sup>-1</sup> e extrato enzimático bruto. Todos os componentes do meio reacional devem ser incubados a 37°C durante 10 minutos, quando então a reação deve ser parada pela adição de 500 µL de solução de ácido perclórico 1M, seguida por leitura em espectrofotômetro a 505 nm.

A cepa *P. sanguineus* (CCT-4518), conhecida pela produção de lacase, mostrou-se produtora de outra fenoloxidase, a tirosinase.

As condições de cultivo de *P. sanguineus* para a produção de tirosinase foram determinadas, sendo que a melhor produção ocorreu com a utilização de 0,15% de L-tirosina como indutor, na presença de luz, com inóculo de 10 discos de micélio fúngico de 5 mm de diâmetro, meio caldo extrato de malte 2%, com incubação à 30°C e agitação de 150 rpm, durante 2 dias.

O extrato bruto de *P. sanguineus* apresentou pH ótimo de 6,6, temperatura ótima de 45°C, baixa estabilidade à temperatura de 50°C, mantendo apenas cerca de 50% de atividade após 15 minutos de incubação, e atividade enzimática de cerca de 25 U/L nas condições ótimas.

A ação da tirosinase foi ainda testada sobre o corante vermelho Ponceaux, sendo que esta enzima não se mostrou promissora para a descoloração de corantes, provavelmente devido ao seu próprio mecanismo de ação.

## 6 PERSPECTIVAS

Estão descritas na literatura pesquisada diversas importantes aplicações biotecnológicas para a enzima tirosinase, que incluem o tratamento de efluentes contendo compostos fenólicos e corantes, a síntese de fármacos difenólicos, bem como a bioconversão de diversos compostos.

Uma vez que no presente trabalho a reação para quantificação da atividade difenolase da tirosinase foi padronizada, as condições de cultivo de *P. sanguineus* para a produção de tirosinase foram determinadas, o extrato bruto obtido foi caracterizado e apenas testes iniciais foram feitos sobre o corante vermelho Ponceaux, estudos adicionais serão realizados com a finalidade de investigar a aplicação da tirosinase obtida no extrato enzimático bruto de *P. sanguineus* na descoloração de outros corantes, biotransformação de compostos, biorremediação de efluentes e biossensores enzimáticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSU, Z. & DONMEZ, G. Combined effects of molasses sucrose and reactive dye on the growth and dye bioaccumulation properties of *Candida tropicalis*. *Process Biochemistry*, 40: 2443-2454, 2005.
- ALADAILEH, S., RODNEY, P., NAIR, S. V. & RAFTOS, D. A. Characterization of phenoloxidase activity in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 148: 470-480, 2007.
- BANAT, I.M., NIGAM, P., SINGH, D. Microbial decolourization of textile- dye containing effluents: a review. *Bioresource Technology*, 58: 217-227, 1996.
- BEEL, A. A. & WHEELER, M. H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology*, 24: 411-451, 1986.
- BOLLAG, D. M., ROZYCKI, M. D. & EDELSTEIN, S. J. Protein Methods. 2<sup>nd</sup> Edition, Wiley-Liss, 1996.
- BOURBONNAIS, R. & PAICE, M. G. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*, 267: 99-102, 1990.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254, 1976.
- BURTON, S. G. Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends in Biotechnology*, 21: 543-549, 2003.
- CHIACCHIERINI, E., RESTUCCIA, D. & VINCI, G. Bioremediation of food industry effluents: recent applications of free and immobilised polyphenoloxidases. *Food and Science Technology International*, 10 (6): 373-382, 2004.
- DAWLEY, R. M. & FLURKEY, W. H. Differentiation of tyrosinase and laccase using 4-hexyl-resorcinol, a tyrosinase inhibitor. *Phytochemistry*, 33: 281-284, 1993.
- DURÁN, N., DEZOTTI, M. & RODRIGUEZ, J. Biomass photochemistry XV: photobleaching and biobleaching of Kraft effluent. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A, Chemistry*, 62: 269-279, 1991.
- DURÁN, N. & ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 28: 83-99, 2000.
- DURÁN, N., ROSA, M. A., D'ANNIBALE, A. & GIANFREDA, L. Applications of laccases

and tyrosinases (phenoloxidas) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 907-931, 2002.

EDENS, W. A., GOINS, T.Q., DOOLEY, D. & HENSON, J. M. Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (7): 3071-3074, 1999.

ESPIN, J. C., MORALES, M., VARÓN, R., TUDELA, J. & GARCÍA-CANOVAS, F. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 231: 237-246, 1995a.

ESPIN, J. C., MORALES, M., VARÓN, R., TUDELA, J. & GARCÍA-CANOVAS, F. Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Verdedoncella Apple. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2807-2812, 1995b.

ESPIN, J. C., MORALES, M., GARCÍA-RUIZ, P. A., TUDELA, J. & GARCÍA-CANOVAS, F. Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 1084 -1090, 1997a.

ESPÍN, J. C., SOLER-RIVAS, C. & WICHERS, H. J. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetables oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picryldrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 648-656, 2000.

ESPÍN, J. C., SOLER-RIVAS, C., CANTOS, E., TOMAS-BARBERAN, F. A. & WICHERS, H. J. Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1187-1193, 2001.

ESPOSITO, E., INNOCENTINI-MEI, L. H., FERRAZ, A., CANHOS, V. P. & DURÁN, N. Phenoloxidas and hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* (EUC-2050 strain): applications. *Journal of Biotechnology*, 29: 219-228, 1993.

FAN, Y. & FLURKEY, W. H. Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry*, 65: 671-678, 2004.

GARCIA, T. A., SANTIAGO, M. F. & ULHOA, C. J. Properties of laccases produced by *Pycnoporus sanguineus* induced by 2,5-xylydine. *Biotechnology Letters*, 28: 633-636, 2006.

GARCIA, T. A., SANTIAGO, M. F. & ULHOA, C. J. Studies on the *Pycnoporus sanguineus* laccase purified by hydrophobic interaction chromatography. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75: 311-318, 2007.

GERRITSEN, Y. A. M., CHAPELON, C. G. J. & WICHERS, H. J. The low isoelectric point tyrosinase of *Agaricus bisporus* may be a glycoprotein. *Phytochemistry*, 35: 573-577, 1994.

GIANFREDA, S., XU, F. & BOLLAG, J. M. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*, 3 (1): 1-25, 1999.

- GIRELLI, A. M., MATTEI, E. & MESSINA, A. Phenols removal by immobilized tyrosinase reactor in on-line high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 580: 271-277, 2006.
- GRAMSS, G., GUNTHER, TH. & FRITSCH, W. Spot tests for oxidative enzymes in ectomycorrhizal, wood-, and litter decaying fungi. *Mycology Research*, 102 (1): 67-72, 1998.
- GRUHN, C. M. & MILLER, O. K. Effect of copper on tyrosinase activity and polyamine content of some ectomycorrhizal fungi. *Mycology Research*, 95: 268-272, 1991.
- GRINYER, J., MCKAY, M., HERBERT, B. & NEVALAINEN, H. Fungal proteomics: mapping the mitochondrial proteins of a *Trichoderma harzianum* strain applied for biological control. *Current Genetics*, 45: 170-175, 2004.
- GUNTHER, TH., PERNER, B. & GRAMSS, G. Activities of phenol oxidizing enzymes of ectomycorrhizal fungi in axenic culture and in symbiosis with Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Journal of Basic Microbiology*, 38: 197-206, 1998.
- HAGHBEEN, K. & TAN, E.W. Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase activities of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates. *Analytical Biochemistry*, 312(1): 23-32, 2003.
- HALAOULI, S., ASTHER, M., KRUS, K., GUO, L., HAMDI, M., SIGOILLOT, J. C., ASTHER, M. & LOMASCOLO, A. Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 332-343, 2005.
- HALAOULI, S., ASTHER, M., SIGOILLOT, J. C., HAMDI, M. & LOMASCOLO, A. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 219-232, 2006.
- HAQ, I., ALI, S. & QADEER, M.A. Biosynthesis of L-dopa by *Aspergillus oryzae*. *Bioresource Technology*, 85: 25-29, 2002.
- HARVEY, B. M. & WALKER, J. R. K. Studies with plant laccases: I comparison of plant and fungal laccases. *Journal of Biochemistry Molecular Biology & Biophysics*, 3: 45-51, 1999.
- HEINFLING, A., MARTINEZ, M. J., MARTINEZ, A. T., BERGBAUER, M. & SZEWZYL, U., Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2788-2793, 1998.
- HERPOËL, I., MOUKHA, S., LESAGE-MEESSEN, L., SIGOILLOT, J. C. & ASTHER, M. Selection of *Pycnoporus cinnabarinus* strains for laccase production. *FEMS Microbiology Letters*, 183: 301-306, 2000.
- JOSHI, M., BANSAL, R. & PURWAR, R. Colour removal from textile effluents. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, 29: 239-259, 2004.

KAUSHIK, P. & MALIK, A. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. *Environment International*, 35: 127-141, 2009.

KIISKINEN, L. L., KRUUS, K., BAILEY, M., YLOSMÄKI, E., SIIKA-AHO, M. & SALOHEIMO, M. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Thichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiology*, 150: 3065-3074, 2004.

KILIC, N. K., NIELSON, J. P., YUCE, M. & DONMEZ, G. Characterization of a simple bacterial consortium for effective treatment of wastewaters with reactive dyes and Cr(VI). *Chemosphere*, 67: 826-831, 2007.

KIM, Y. J., NO, J. K., LEE, J. H. & CHUNG, H. Y. 4, 4'-dihydroxybiphenyl as a new potent tyrosinase inhibitor. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(2): 323-327, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685, 1970.

LEONOWICZ, A. & GRZYWNOWICZ, K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, 3: 55-58, 1981.

LESAGE-MEESSEN, L., NAVARRO, D., MAUNIER, S., SIGOILLOT, J.-C., LORQUIN, J., DELATTRE, M., SIMON, J.-L., ASTHER, M. *et al.* Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*, 75: 501-507, 2001.

LYN, J. Y. & FISCHER, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, 445: 843-850, 2007.

MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants – recent progress. *Phytochemistry*, 26: 11-20, 1987.

MAYER, A. M. & HAREL, E. Review: Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 18: 193-215, 1979.

MAYER, A. M. & STAPLES, R. C. Review – laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60: 551-565, 2002.

McMULLAN, G., MEEHAN, C., CONNEELY, A., KIRBY, N., ROBINSON, T., NIGAM, P., BANAT, I. M., MARCHANT, R. & SMYTH, W. F. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 81-87, 2001.

MIN, K.-L., KIM, Y.-H., KIM, Y. W., JUNG, H. S. & HAH, Y.C. Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 392 (2): 279-286, 2001.

MIRANDA, M., BONFIGLI, A., ZARIVI, O., RAGNELLI, A. M., PACIONI, G. & BOTTI, D. Truffle tyrosinase: Properties and activity. *Plant Science*, 81: 175-182, 1992.

NOBLES, M.K. & FREW B.P. *Canadian Journal of Botany* 40(7): 1011, 1962.

- OLIANAS, A., SANJUST, E., PELLEGRINI, M. & RESCIGNO, A. A tyrosinase activity and hemocyanin in the hemolymph of the slipper lobster *Scyllarides latus*. *Journal of Comparative Physiology B*, 175(6): 405-411, 2005.
- OLLIKKA, P., ALHONMAKI, K., LEPPANEN, V-L., GLUMOFF, T. R. & SUOMINEN, I. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 4010-4016, 1993.
- PHILLIPS, R. S., FLETCHER, J. G., VON TERSCH, R. L. & KIRK, K. L. Oxygenation of fluorinated tyrosines by mushroom tyrosinase releases fluoride ion. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 276 (1): 65-69, 1990.
- POINTING, S. B. & VRIJMOED, L. L. P. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenol oxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16: 317-318, 2000.
- RESCIGNO, A., ZUCCA, P., FLURKEY, A., INLOW, J. & FLURKEY, W. H. Identification and discrimination between some contaminant enzyme activities in commercial preparations of mushroom tyrosinase. *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 620-627, 2007.
- RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N., ESCRIBANO, J. & GARCÍA-CÁNOVAS, F. A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone. *Analytical Biochemistry*, 216: 205-212, 1994.
- ROS, J. R., RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N. & GARCÍA-CANOVAS, F. Tyrosinase: kinetic analyses of the transient phase and the steady state. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1204: 33-42, 1994.
- SANCHEZ-FERRER, A., RODRIGUEZ-LOPEZ, J. N., GARCIA-CANOVAS, F. & GARCIA-CARMONA, F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1247: 1-11, 1995.
- SANTOS, A. B., CERVANTES, F. J. & LIER, J. B. Review paper on current technologies for decolorization of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technology*, 98: 2369-2385, 2007.
- SEO, S-Y, SHARMA, V. K. & SHARMA, N. Mushroom Tyrosinase: Recent Prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2837-2853, 2003.
- SINGH, H. Mechanism of oxidation of L-tyrosine by fungal tyrosinases. *Journal of Chemistry*, 172: 83, 1999.
- SLOMINSKI, A., TOBIN, D. J., SHIBAHARA, S. & WORTSMAN, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological Reviews*, 84: 1155-1228, 2004.
- SOUZA, C. G. M., TYCHANOWICZ, G. K., SOUZA, D. F & PERALTA, R. M. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and

aromatic compounds. *Journal of Basic Microbiology*, 44 (2): 129-136, 2004.

STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 69-80, 2001.

TEIXEIRA, D. E., COSTA, A. F. & SANTANA, M. A. E. Aglomerados de bagaço de cana-de-açúcar: resistência natural ao ataque de fungos apodrecedores. *Scientia Forestalis*, 52: 29-34, 1997.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140: 19-26, 1994.

TOBIN, J. M., WHITE, C. & GADD, G. M. Metal accumulation by fungi: applications in environment biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology*, 13: 126-130, 1994.

TOWNSEND, D., OLDS, D. P. & KING, R. A. Dopa oxidase activity in human hairbulbs measured by high-performance liquid chromatography. *Journal of Investigative Dermatology*, 86: 570-572, 1986.

Universidade Federal de Santa Catarina/ Centro de Ciências Biológicas/ Departamento de Botânica/ Laboratório de Micologia. *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murrill. Altura: 2112 pixels. Largura: 2816 pixels. 72 dpi. Formato JPEG. Compactado. Disponível em: <<http://www.ccb.ufsc.br/bot/micologia>>. Acesso em: 05 jul. 2009, 13:05:00.

VACHTENHEIM, J. DUCHON, J. & MATOUS, B. A spectrophotometric assay for mammalian tyrosinase utilizing the formation of melanochrome from L-dopa. *Analytical Biochemistry*, 146: 405-410, 1985.

VIKINESWARY, S., NOORLIDAH, A., RENUVATHANI, M., SEKARAN, M., PANDEY, A. & JONES, E. B.G. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresource Technology*, 97: 171-177, 2006.

WICHERS, H. J., GERRITSEN, Y. A. M. & CHAPELON, C. G. J. Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry*, 43 (2): 333-337, 1996.

WINDER, A. J. A stopped spectrophotometric assay for the dopa oxidase activity of tyrosinase. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 28: 173-183, 1994.

WINDER, A. J. & HARRIS, H. New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase. *European Journal of Biochemistry*, 198: 317-326, 1991.

ZEE, F. P. & VILLAVERDE, S. Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes – a short review of bioreactor studies. *Water Research*, 39: 1425-1440, 2005.

ZHANG, X., van LEEUWEN, J., WICHERS, H. J. & FLURKEY, W. H. Characterization of tyrosinase from the cap flesh of *Portabella* mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 374-378, 1999.

**APÊNDICE - TABELAS APRESENTANDO OS VALORES DE DESVIO  
PADRÃO RELATIVO RELACIONADOS AOS DADOS APRESENTADOS NAS  
FIGURAS DO TRABALHO**

Tabela A – Valores de desvio padrão relativo relacionados aos dados apresentados na Figura 5 (Atividade de lacase no lisado e no sobrenadante de amostras de *P. sanguineus*).

Tempo (dias)	Atividade lacase lisado (U/L)	DPR (%)	Atividade lacase sobrenadante (U/L)	DPR (%)
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	72,98	2,41	111,35	3,60
3	33,63	0,48	15,06	4,61
4	117,57	1,58	113,67	6,92
5	112,52	5,88	102,69	4,09
6	108,50	4,92	112,46	5,59
7	113,76	7,62	115,02	4,86

Tabela B – Valores de desvio padrão relativo relacionados aos dados apresentados na Figura 6 (Atividade de tirosinase no lisado e no sobrenadante de amostras de *P. sanguineus*).

Tempo (dias)	Atividade tirosinase lisado (U/L)	DPR (%)	Atividade tirosinase sobrenadante(U/L)	DPR (%)
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	18,97	5,02	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4	5,55	3,51	0,00	0,00
5	3,53	0,69	0,00	0,00
6	5,16	3,31	0,00	0,00
7	5,86	8,71	0,00	0,00

Tabela C - Valores de desvio padrão relativo relacionados aos dados apresentados na Figura 7 (Seleção de indutores para produção de tirosinase por *P. sanguineus*)

Tempo (dias)	Sem indutor*	DPR (%)	L-tirosina 150 mg*	DPR (%)	Guaiacol 150 µL*	DPR (%)	Ác. 4-hidroxi-fenil-2-propiónico 150 mg*		DPR (%)	L-dopa 150 mg*	DPR (%)	Ác. Cafeico 150 mg*	DPR (%)
							DPR (%)	DPR (%)					
1	6,3448	10,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2	0,0000	0,0000	9,7701	2,4024	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
3	2,6034	8,4291	0,7011	10,0000	0,0000	0,0000	1,3793	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,9655	0,0000
4	0,6552	0,0000	10,7011	3,1900	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5	0,0000	0,0000	4,9770	8,2658	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0172	2,3940
6	-	-	8,9080	8,9144	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
7	-	-	14,6092	10,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

\* Valores de atividade de tirosinase em (U/L)

Tabela D - Valores de desvio padrão relativo relacionados aos dados apresentados na Figura 8 (Seleção de substratos para atividade dopa oxidase da tirosinase).

Substrato	Atividade tirosinase (U/L)	Média	DPR (%)
L-dopa 3 mmol.L <sup>-1</sup>	22,48	22,34	0,65
	22,24		
DHPPA 2 mmol.L <sup>-1</sup>	6,97	7,31	6,67
	7,66		

Tabela E - Valores de desvio padrão relativo relacionados aos dados apresentados na Figura 9 (Inibição de amostra de extrato bruto de *P. sanguineus* por PTU 6 mmol.L<sup>-1</sup> e SHAM 6 mmol.L<sup>-1</sup>).

	Atividade tirosinase (U/L)	Média	DPR (%)
Sem inibidor	25,07	23,22	7,54
	21,59		
	23,00		
Inibidor SHAM 6 mmol.L <sup>-1</sup>	0,00	0	0,00
	0,00		
	0,00		
Inibidor PTU 6 mmol.L <sup>-1</sup>	0,00	0	0,00
	0,00		
	0,00		