

Aplicação de extrato enzimático contendo lacase no processo de remoção de cor

Loreny Ribeiro do Nascimento^a, Nayara Kelly Ribeiro Silva^b, Mariângela Fontes Santiago^c,
Edemilson Cardoso da Conceição^c, Telma Alves Garcia^d

Faculdade de Farmácia, UFG, CEP 74605-220, Brasil

E-mail: loreny_ribeiro@hotmail.com; telma@farmacia.ufg.br

PALAVRAS-CHAVE: Lacase, descoloração, *P.sanguineus*

1 INTRODUÇÃO

O aumento da atividade industrial é acompanhado do crescimento dos problemas ambientais, destacando-se as questões relativas à contaminação da água. Diretamente relacionado a essa realidade há uma problemática gerada pelo emprego de grande quantidade de diferentes corantes químicos em várias aplicações industriais, sendo que uma significativa proporção destes aparece na forma de resíduos. O lançamento de efluentes industriais, incluindo os do setor farmacêutico, em cursos d'água, nos quais estão presentes tais corantes, causa enorme impacto ambiental, visto que tais resíduos interferem na absorção de luz pelos seres vivos aquáticos, são transportados para os mananciais e promovem a contaminação da água que abastece a população. Como corantes são projetados para ser quimicamente e fotoliticamente estáveis, eles são altamente persistentes no ambiente natural, e não são retirados por tratamentos de água convencionais (Sharma et al, 2009). Dentre os corantes artificiais utilizados pela indústria têxtil, alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (Lopes, 2008) pode-se citar o Remazol Brilliant Blue R (RBBR) que é um corante antraquinônico, o Azul de Indigotina (AzInd), pertencente à classe indigo e o corante azóico Vermelho Ponceau (VermPonc).

^a Orientanda

^b Aluna de IC da Faculdade de Farmácia

^c Professores da Faculdade de Farmácia, Laboratório de Enzimologia

^d Orientadora, professora da Faculdade de Farmácia

Devido a sua toxicidade e carcinogenicidade, os corantes empregados nas diversas atividades industriais são frequentemente alvos de estudos de degradação por diferentes mecanismos, entre os quais aqueles envolvendo o uso de enzimas que se apresentam como processos da denominada “química verde”. As enzimas mais estudadas para esse fim são as que compõem o complexo enzimático degradador de lignina formado por lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase (Souza e Rosado, 2009).

A enzima lacase (EC 1.10.3.2) é uma oxidase multicobre que catalisa a oxidação de um amplo grupo de compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos por redução de oxigênio em água através da transferência de elétrons e por isso também é denominada por Riva (2006) como uma enzima *eco-friendly*. Esta enzima apresenta distribuição bastante ampla sendo detectada em plantas, fungos e bactérias. O espectro do substrato de lacase é muito amplo e pode ser aumentado consideravelmente na presença de mediadores redox adequados (Baiocco et al, 2003;. Camarero et al, 2005). A inclusão de substâncias oxidáveis apropriadas de baixa massa molecular, os mediadores, expande a atividade catalítica da lacase frente a grupos mais difíceis de oxidar (Batista, 2009). Existem muitos mediadores disponíveis e dentre eles o Ácido Violúrico (AV) se mostra bastante eficaz (Fabbrini et al, 2002).

As lacases possuem um grande potencial de aplicação em diversos processos industriais e biotecnológicos, podendo-se citar sua utilização para análise de drogas, clarificação e estabilização de vinhos, biorremediação de efluentes de indústria de alimentos (Osma et al, 2010) e de medicamentos (Mayer & Staples 2002), branqueamento de polpa de papel e de tecidos, descoloração de corantes sintéticos (Teixeira et al, 2010), biosensores (Vianello et al, 2006) e obtenção de biocombustíveis (Kunamneni et al, 2008).

O emprego industrial dos mais diversos tipos de enzimas e para os mais variados fins é crescente e paralelamente há um grande número de estudos que objetivam melhorar a produção enzimática. Assim como é importante uma excelente produção enzimática, é também importante que o extrato enzimático assim obtido mantenha sua atividade por longos períodos, permita condições favoráveis para armazenamento, transporte e uso. Nesse aspecto pode-se destacar a obtenção de extratos enzimáticos secos uma vez que o baixo conteúdo de umidade faz com que os produtos sejam menos suscetíveis ao ataque microbiano e a reações de degradações, propiciando o armazenamento por um longo período de tempo e redução nos custos de transporte. Outro aspecto a ser considerado quanto aos processos de secagem é que

se consegue dessa forma a concentração dos extratos e com isso a possibilidade de se trabalhar com extratos de maior atividade enzimática.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é avaliar o potencial de descoloração do extrato bruto enzimático contendo lacase, no estado líquido e após ser seco por liofilização e por atomização.

2 METODOLOGIA

2.1 Organismo e Cultivo: O fungo *P. sanguineus*, obtido junto à Fundação André Tosello, Campinas/SP, foi cultivado em meio Batata Dextrose (BDA) e mantido a 4 °C. A produção do extrato enzimático foi através do cultivo em meio líquido contendo extrato de malte, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 2,5-xilidina (Valeriano et al. 2009).

2.2 Obtenção do extrato seco a partir do extrato bruto de *P. sanguineus*: O extrato bruto foi liofilizado utilizando-se o liofilizador da Thermo Eletron Corporation – modelo *Micromodulyo – 115*. Imediatamente após a secagem o extrato foi recolhido e mantido em congelador até sua utilização assim como o extrato atomizado.

2.3 Determinação da atividade de lacase (Leonowicz & Grzywnowicz 1981): A atividade de lacase foi determinada no extrato bruto antes e após a secagem pela oxidação do 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotriazolina-6-sulfônico) (ABTS) 5mM em solução aquosa. A mistura de reação totalizou 1 mL, sendo composta por tampão acetato de sódio 50 mM, Ph 5,0; extrato enzimático e ABTS 5mM. A oxidação do substrato foi determinada espectrofotometricamente após 5 minutos de reação, à temperatura ambiente em 420 nm ($\epsilon_{420} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O extrato seco foi ressuspenso em tampão acetato de sódio 50 mM, Ph 4,2 e então determinada a sua atividade enzimática. Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de substrato por minuto, nas condições do ensaio.

2.4 Testes de descoloração: A capacidade de descoloração do extrato enzimático produzido por *P. sanguineus* foi avaliada para os corantes RBBR, AzInd e VerPonc. A mistura de reação teve composição diferenciada, dependendo do parâmetro analisado. Para o estudo do efeito da concentração do corante a mistura continha 0,5 U. mL⁻¹ de lacase (extrato enzimático), tampão acetato de sódio 50 mM (Ph 4,2) e corante na concentração de 0,1 a 0,3 mg.mL⁻¹ para RBBR; 0,05 a 0,1 mg.mL⁻¹ para AzInd e 0,0125 a 0,05 mg.mL⁻¹ para VerPonc. Para se avaliar o efeito de mediador na descoloração enzimática acrescentou-se à mistura de reação 1,0 mM de AV às preparações contendo 0,5 U.mL⁻¹ de lacase e 0,1 mg.mL⁻¹ de RBBR 0,05 mg.mL⁻¹ de AzInd e 0,05 mg.mL⁻¹ de VerPonc. Para o estudo do efeito da concentração de enzima na descoloração desses corantes, utilizou-se o extrato seco por liofilização e a mistura continha 1 – 2 U. mL⁻¹ de lacase e 0,4 mg.mL⁻¹ de RBBR; 0,1 mg.mL⁻¹ de AzInd e 0,05 mg.mL⁻¹ de VerPonc. Para comparar a influência do método de secagem no processo de descoloração fez-se ensaio utilizando 1 U. mL⁻¹ de lacase e 0,05 mg.mL⁻¹ de VerPonc. Em todos os ensaios a mistura de reação totalizou 1 mL e foi incubada a 20 °C, no escuro. As descolorações foram medidas por espectrofotometria, monitorando o decréscimo na absorbância máxima de cada corante utilizado (RBBR: λ máx=590nm, AzInd: λ máx= 600nm, VermPonc: λ máx= 500nm) (Lu et al, 2007; Osma et al, 2007) e expressa em termos de porcentagem.

Todos os experimentos foram realizados no mínimo em duplicata e resultados expressos como a média das repetições e o respectivo desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A habilidade de descoloração dos corantes industriais RBBR, AzInd e VermPonc por extrato bruto contendo lacase de *P. sanguineus* foi avaliada na presença de diferentes concentrações dos corantes, diferentes concentrações de lacase, assim como na presença ou não de mediador. Avaliou-se ainda o efeito do processo de secagem do extrato enzimático na descoloração do corante VermPonc.

3.1 Efeito da concentração do corante

O efeito da concentração do corante na descoloração foi avaliado para diferentes concentrações de corante (0,012 a 0,3 mg . mL⁻¹) com quantidade constante de enzima (0,5

U.mL⁻¹). Os corantes RBBR e AzInd foram fortemente descolorados pela ação do extrato enzimático, ambos alcançando uma descoloração maior que 85 % e 95% após 2 e 24 horas de reação respectivamente (Fig 1). Observou-se para estes dois corantes que a taxa de descoloração foi praticamente a mesma para todas as concentrações testadas.

No trabalho apresentado por Murugesan e colaboradores (2007) a descoloração do corante RBBR (50 mg.L⁻¹) pelo extrato enzimático contendo lacase de *Ganoderma lucidum* (25 U.mL⁻¹) foi de 40% após 2 horas de incubação e de 95% após 12 horas. A descoloração foi diminuída com o aumento da concentração de corante, atingindo uma descoloração de 94,0 ; 90,2 e 87,8 % respectivamente na presença de 100, 200 e 300 mg.L⁻¹ do corante, após 12 horas de incubação (Murugesan et al, 2007). Em estudo utilizando a enzima lacase purificada de *Fomes fomentarius* (0,2 U.mL⁻¹) a descoloração do corante RBBR (150 mg.L⁻¹) foi de 80 % após 1 hora de incubação (Neifar et al, 2010).

Lacase de *Trametes modesta* promoveu 58% de descoloração do corante AzInd (250 mg.L⁻¹) em meio contendo 0.2 nkat mL⁻¹ de enzima, após 6 horas de incubação (Nyanhongo et al, 2002).

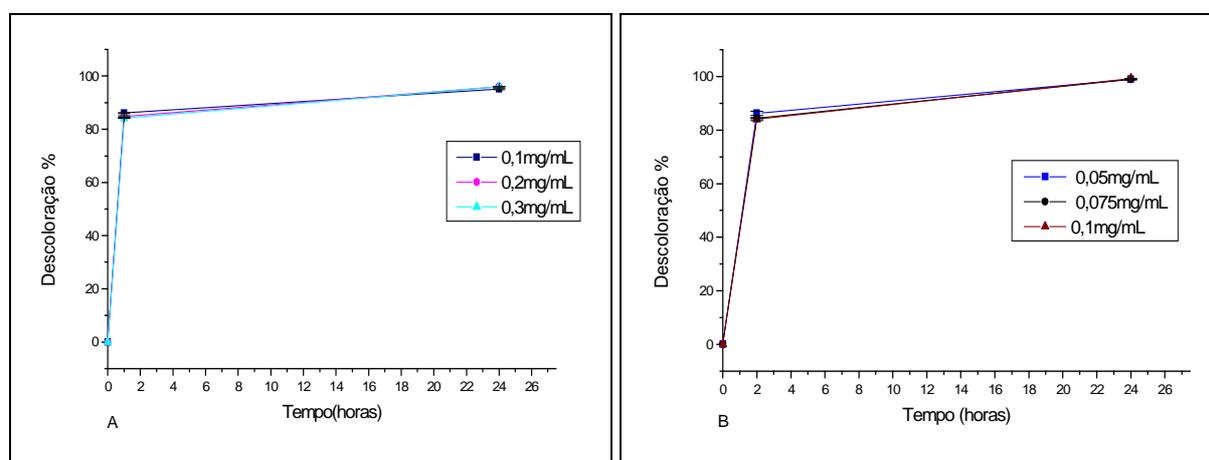


Figura 1- Efeito da concentração de corante na descoloração pelo extrato bruto de *P. sanguineus* para os corantes RBBR (A), AzIn (B).

O corante VermPonc mostrou-se bem mais resistente à descoloração nas condições avaliadas que os demais corantes. Para uma concentração de 0,05 mg.mL⁻¹ de VermPonc observou-se 8% e 49,7% de descoloração pela ação do extrato enzimático, após 2 e 24 horas de reação respectivamente. No estudo apresentado por Moya e colaboradores (2010) o corante VermPonc (302 mg.L⁻¹) sofreu 18% de descoloração após 3 horas de incubação com 0,4

U.mL⁻¹ de lacase de *Streptomyces cyaneus*, confirmando também a dificuldade de descoloração deste corante.

3.2 Efeito de mediador na descoloração

O efeito de mediador na descoloração foi avaliado usando-se 1mM de AV em soluções contendo cada um dos corantes na concentração de 0,1 mg.L⁻¹ para RBBR e 0,05 mg.L⁻¹ para AzInd ou VermPonc). Os resultados revelaram que para o RBBR a maior diferença na descoloração foi observada no início da incubação sendo alcançado, após 1 hora, 80 e 92% de descoloração respectivamente na ausência e presença do mediador (Fig. 2A). Após 24 horas observou-se uma inversão do perfil de descoloração sendo o resultado muito próximo com o uso ou não de mediador.

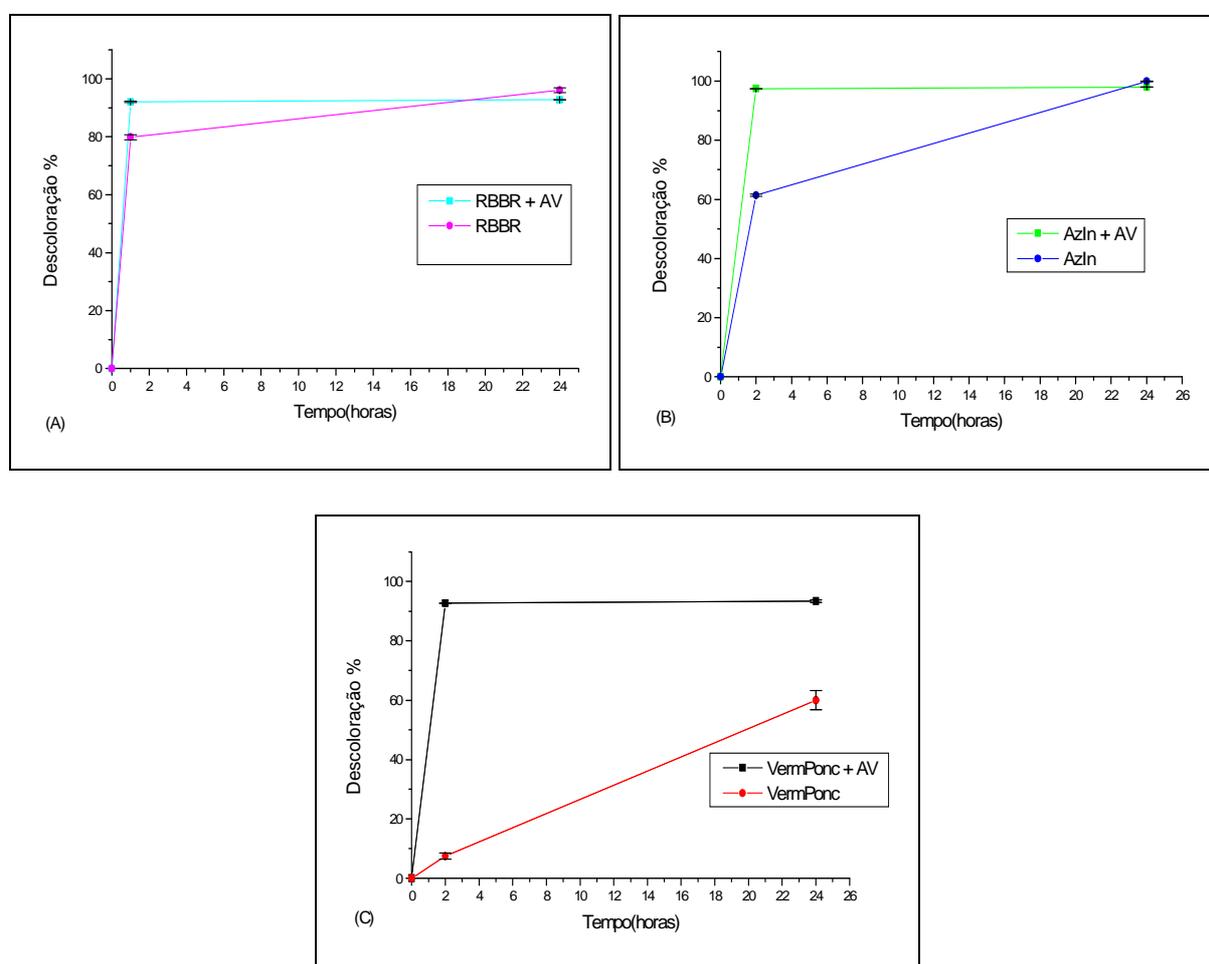


Figura 2. Efeito do AV na descoloração dos corantes RBBR (A), AzInd (B) e VermPonc (C) pelo extrato bruto de *P. sanguineus*

O comportamento de descoloração do corante AzInd assemelhou-se ao do RBBR, mas com um destaque ainda maior para o mediador nas primeiras horas de incubação em que se

atingiu uma descoloração de 97% e 61% na presença e ausência do AV respectivamente (Fig. 2B) . Ao longo do período de 24 horas a descoloração foi crescente na ausência de mediador enquanto que na presença a taxa de descoloração manteve-se praticamente a mesma alcançada na primeira hora de incubação. Após 24 horas a descoloração do corante nos dois experimentos foi praticamente a mesma.

Os resultados apresentados na figura 2C mostram que para o corante VermPonc o uso do mediador alterou significativamente a capacidade de descoloração pelo extrato bruto de *P. sanguineus* passando a descoloração após 2 horas de incubação de 8 % para 93 % com a adição do AV e ao final das 24 horas , diferente dos corantes citados anteriormente, também se observou uma considerável diferença de descoloração sendo alcançada uma taxa de descoloração de praticamente 60 % de descoloração na ausência do mediador enquanto que na presença não houve alteração em relação ao valor observado em 2 horas.

Para Murugesan e colaboradores (2007), a adição de mediador levou a um aumento de 2,3 vezes na descoloração do RBBR por lacase de *G. lucidum* durante uma incubação de 2 horas, alcançando uma taxa de 92,4 %, resultado muito próximo ao observado após 1 hora de incubação no presente estudo (92%). No trabalho de Peralta-Zamora e colaboradores (2003) não houve descoloração do corante RBBR pela lacase de *Trametes versicolor* na ausência de mediador, mas o emprego de 1- hidroxibenzotriazol (HBT) favoreceu esta atividade sendo observados 40% de descoloração após 30 minutos de incubação com a enzima livre e 70% de descoloração depois de 2 horas na presença de lacase imobilizada. A descoloração do corante VermPonc por lacase de *S. cyaneus* aumentou aproximadamente 5 vezes pela adição do mediador acetoseringona (Moya et al, 2010).

Soares e colaboradores (2002) relataram que o AV é um mediador redox eficaz para reações de oxidação da lacase. Segundo Claus e colaboradores (2002), uso de mediadores melhora a taxa de descoloração e ainda amplia o espectro de atuação da enzima que passa a atuar sobre corantes inicialmente resistentes à descoloração enzimática. No presente trabalho esta atuação pode ser claramente constatada nos experimentos de descoloração do VermPonc.

3.3 Efeito da quantidade de enzima na descoloração

O efeito da quantidade de enzima na descoloração dos corantes em estudo foi avaliado para quantidades de 1 e 2 U.mL⁻¹ afim de avaliar se o aumento da quantidade de enzima teria

uma relação direta com a taxa de descoloração. Para este estudo utilizou-se o extrato bruto liofilizado. Conforme demonstrado na figura 3, após 24 de incubação, não houve diferença significativa na descoloração dos corantes RBBR e AzInd na presença de 1 ou 2 U.mL⁻¹ de lacase, mas para o corante VermPonc, houve um incremento de 30 % na taxa de descoloração que passou de 48 para 63%.

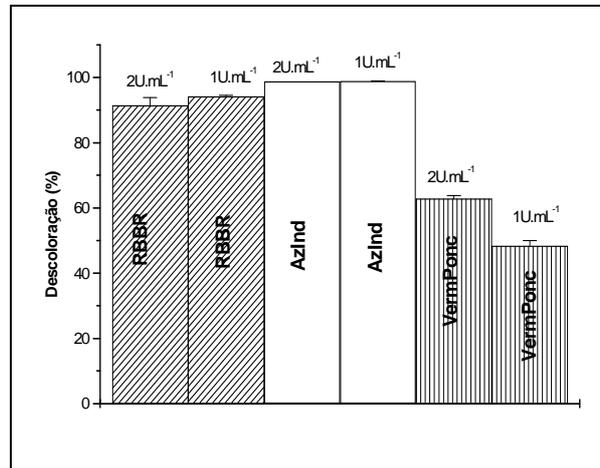


Figura 3- Descoloração do RBBR, AzInd e VermPonc com diferentes quantidades de enzima, após 24 horas de incubação.

Os corantes RBBR e AzInd foram mais facilmente descolorados pela ação do extrato bruto, mesmo na ausência de mediador e também não tiveram sua descoloração alterada pelo aumento da quantidade de enzima disponível, sendo este um resultado interessante quanto ao aspecto econômico que envolve a aplicação de enzimas uma vez que quantidades até menores que as utilizadas neste trabalho deverão ser investigadas afim de melhorar a relação custo-benefício visando uma aplicação em maior escala do extrato bruto de *P. sanguineus* para descoloração destes corantes.

No estudo utilizando extrato bruto de *G. lucidum* (Murugesan et al, 2007) verificou-se que houve um aumento proporcional da descoloração dos corantes RBBR e RB-5 com o aumento da quantidade de enzimas de 2 até 35 U.mL⁻¹ e a quantidade mínima de enzima para alcançar o máximo de descoloração do corante RBBR, aproximadamente 70 %, foi de 25 U.mL⁻¹, quantidade bem superior à observada neste trabalho em que na presença de 1 U.mL⁻¹ houve a descoloração de 70%, após 1 hora de incubação.

3.4 Efeito do processo de secagem de enzima na descoloração

No experimento com o corante VermPonc ($0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$) utilizando o extrato bruto seco por liofilização e por atomização, ambos contendo 1 U.mL^{-1} da enzima lacase observou-se que no início da incubação, apesar da pequena descoloração, o extrato atomizado foi mais eficiente, porém, após 24 horas o extrato liofilizado resultou em uma taxa de descoloração 35 % maior que o extrato atomizado (tabela 1).

Tabela 1-Descoloração do corante VermPonc pelo extrato bruto dessecado por liofilização ou atomização

Tempo de incubação	Descoloração (%)	
	Extrato liofilizado	Extrato atomizado
1 hora	$1,0 \pm 0$	$8,4 \pm 1,15258$
2 horas	$4,0 \pm 0$	$10,4 \pm 0,74953$
24 horas	$48,3 \pm 1,63342$	$35,8 \pm 0,17678$

A secagem de extratos enzimáticos apresenta vantagens como possibilidade de trabalhar com atividades mais elevadas, facilidade de transporte e armazenamento, conservação, entre outras. Há diferentes processos de secagem, mas é um desafio conseguir um protocolo de secagem capaz de manter a atividade enzimática, sendo os métodos de secagem objeto de diversos estudos. Neste trabalho verificou-se que para aplicação na descoloração a secagem por liofilização foi mais eficaz que o extrato atomizado utilizado. Uma hipótese possível seria a influência do adjuvante empregado na secagem por atomização na atividade da enzima sobre o corante, mas é necessário maiores estudos sobre os extratos atomizados para que se possa efetivamente fazer uma comparação da atividade de descoloração dos extratos secos por diferentes processos.

3 CONCLUSÃO

Considerando que efluentes industriais corados são gerados em grande volume e seu tratamento enzimático requer um grande volume de enzima, o uso de enzimas purificadas para esse fim tornaria o processo demasiadamente dispendioso e por isso não aplicável. Os

resultados observados neste estudo foram bastante satisfatórios principalmente para os corantes RBBR e AzInd em que foi possível a descoloração dos mesmos utilizando pequena quantidade do extrato bruto produzido pelo fungo filamentosso *P. sanguineus*, mesmo sem a adição de mediadores. A descoloração do corante VermPonc pelo extrato bruto foi incrementada pelo aumento da quantidade de enzima e pelo uso do mediador AV, estratégia comum nos processos de descoloração.

Agradecimentos: Ao professor Edemilson Cardoso da Conceição e à aluna Nayara Kelly Ribeiro Silva que gentilmente cederam o extrato dessecado por atomização para os testes de descoloração.

Referências Bibliográficas

BADIOCCO, P., BARRECA, A.M., FABBRINI, M., GALLI, C., GENTILI, P. Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccasemediator systems. **Org. Biomol. Chem.**, 1:191–197, 2003.

BATISTA, F. L. **Produção de lacase e bioconversão de flavonóides por *Pycnoporus sanguineus***. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2009.

CAMARERO, S., IBARRA, D., MARTÍNEZ, M.J., MARTINEZ, A. T. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 1775–1784, 2005.

CLAUS, H., FABER, G., KONIG, H. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 59:672 – 678, 2002.

COUTO, S. R., HERRERA, J. L. T. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. **Biotechnol. Adv.**, 24: 500–513, 2006.

FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILLI, P. Comparing the catalytic efficient of some mediators of laccase. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, 16: 231-240, 2002.

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

KUNAMNENI, A.Y., CAMARERO, S., BURGOS, C. G. PLOU, F. J., BALLESTEROS. A., ALCALDE, M. Review: Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. **Microb. Cell Factor.**, 7:32, 2008.

LEONOWICZ, A., GRZYWNOWICZ, K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. **Enzym. Microb. Technol.**, 3: 55 – 58, 1981.

LOPES, M. M. G. **Remoção do corante FD&C azul nº 2 Indigotina em água com uso de fungos de decomposição branca e processo de filtração lenta: avaliação em escala piloto.** 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente) – Escola de Engenharia Civil da Universidade Federal de Goiás , Goiânia, GO, 2008.

LU, L.; ZHAO, M.; ZHANG, B-B.; YU, S-Y.; BIAN, X-J.; WANG, W. & WANG, Y. Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 74 (6): 1232 – 1239, 2007.

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

MURUGESAN, K., NAM, I-Y., KIM, Y-M., CHANG, Y-S. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. **Enzym. Microb. Technol.**, 40: 1662–1672, 2007.

NEIFAR, M., JAOUANI, A., ELLOUZE-GHORBEL, R., ELLOUZE-CHAABOUNI, S. Purification, characterization and recolourisation ability of *Fomes fomentarius* laccase produced in solid medium. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, 64: 68–74, 2010.

OSMA, J. F., HERRERA, J. L. T., COUTO, S. R. Banana skin: A novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions. Application to synthetic dye decolouration. **Dyes and Pigments.**, 7 (1): 32 – 37, 2007.

OSMA, J. F., HERRERA, J. L. H., COUTO, R. S. Uses of Laccases in the Food Industry. **Enz. Res.**, 2010, 8 pages, 2010.

PERALTA-ZAMORA, P., PEREIRA, C. M., TIBURTIUS, E. R. L., et al. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. **Appl. Catal. B.**, 42 (2): 131–144, 2003.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends Biotechnol.**, 24 (5): 219 – 226, 2006.

SHARMA, S., SINGH, P., SWAMI, R., SHARMA, K. Exploring fish bioassay of textile dye wastewaters and their selected constituents in terms of mortality and erythrocyte disorders. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 83: 29–34, 2009.

SOARES, G. M. B., PESSOA, M. T. A., HRDINA, R., FERREIRA, M. C. Studies on the biotransformation of novel disazo dyes by laccase. **Process. Biochem.**, 37(6):581- 587. 2002.

SOUZA, A. F., ROSADO, F. R. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. **Rev Agroneg. Meio Amb.**, 2 (1): 121-139, 2009.

TEIXEIRA, R. S. S., PEREIRA, P.M., LEITÃO, V. S. F. Extraction and Application of Laccases from Shimeji Mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) Residues in Decolourisation of Reactive Dyes and a Comparative Study Using Commercial Laccase from *Aspergillus oryzae*. **Enz. Res.**, 10: 1-8, 2010.

VALERIANO, V. S.; SILVA, A. M. F.; SANTIAGO, M. F.; BARA, M. T. F.; GARCIA, T. A. Production of Laccase by *Pycnoporus Sanguineus* Using 2,5 - Xylidine and Ethanol **Braz. J. Microbiol.**, 40: 790-794, 2009.

VIANELLO, F., RAGUSA, S., CAMBRIA, M. T., RIGO, A. A high sensitivity amperometric biosensor using laccase as biorecognition element. **Biosens. Bioelectron**, 21: 2155 – 2160, 2006.