

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE –ESA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURIAIS**

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA OXIDATIVA DOS FUNGOS AMAZÔNICOS *Pleurotus* sp
(F-31), *Lentinus crinitus* e *Hexagonia glabra***

Manaus/AM

2009

JUCILEUZA CONCEIÇÃO DOS SANTOS

ATIVIDADE ENZIMÁTICA OXIDATIVA DOS FUNGOS AMAZÔNICOS *Pleorotus* sp

(F-31), *Lentinus crinitus* e *Hexagonia glabra*

Dissertação de Mestrado em
Biotecnologia e Recursos Naturais
para obtenção do título de Mestre
em Biotecnologia da Universidade
do Estado do Amazonas.

Orientador: Prof. Dr. Ademir Castro e Silva

Manaus/AM

2009

JUCILEUZA CONCEIÇÃO DOS SANTOS

ATIVIDADE ENZIMÁTICA OXIDATIVA DOS FUNGOS AMAZÔNICOS *Pleorotus* sp

(F-31), *Lentinus crinitus* e *Hexagonia glabra*

Dissertação defendida e aprovada em ____/____/____ pela banca julgadora:

BANCA EXAMINADORA:

PRESIDENTE: Prof. Dr. Ademir Castro e Silva

MEMBRO 1: Prof. Dra. Helena Teles Camarão

MEMBRO 2: Dra. Claudete Cantanhede

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por todas as oportunidades que ele tem me oferecido.

Aos meus pais, Martimiano Quaresma e Maria Izabel. Aos meus irmãos, em especial ao Wanderley, Gibion e Izabel Cristina. Às minhas cunhadas Rosilene e Rosiane pelo apoio, amor e carinho nessa jornada.

À Universidade do Estado do Amazonas, pela realização do curso.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ademir Castro e Silva pelo profissionalismo concedendo valiosos ensinamentos durante o preparo desta dissertação, pela confiança, e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Amazonas – FAPEM, pelo apoio financeiro concedido.

À minha amiga Dolores, que fez descobrir minha paixão por fungos, pelos ensinamentos iniciais e por me ouvir sempre que precisei.

Ao curso de Pós Graduação do MBT, aos secretários Felipe e Mayra meus sinceros agradecimentos.

À atual coordenadora Prof. Dr^a. Sandra Zanotto pela oportunidade em permanecer na Instituição.

Aos colegas do Laboratório de Biorgânica: Natália Alves, Celina, Tamara, Ana Hilda, Rosilane, Emerson e a todos que me ajudaram de alguma forma, meus sinceros agradecimentos.

À Prof. Dra Helena Camarão atual vice-coordenadora do MBT, pela amizade e apoio.

Aos colegas do curso de Pós – Graduação e a todos que me ajudaram de alguma forma, meus sinceros agradecimentos.

“O mundo não descrito dos fungos pode ser visualizado como um recurso potencial massivo que espera ser compreendido.”

Hawksworth (1991)

RESUMO

Este estudo procurou determinar parâmetros fisiológicos de crescimento e atividade enzimática de três fungos amazônicos. Os fungos utilizados foram (*Pleorotus* sp (F-31), *Lentinus crinitus* e *Hexagonia glabra*), obtidos da coleção de fungos do MBT. A avaliação do crescimento radial em testes de placa de Petri com os seguintes meios nutricionais: BDA, Malte e Jerimum. A avaliação do crescimento também foi realizada em diferentes concentrações do herbicida atrazina para verificar o potencial dos fungos para degradação desse herbicida. A atividade enzimática foi determinada para fenoxidase total, lacase e peroxidase. O crescimento micelial em diferentes meios nutricionais, pH e temperatura mostraram que os fungos testados apresentaram comportamento diferentes, influenciados pela temperatura, pH e meio nutricional. Todos os fungos testados aumentaram sua produção enzimática das enzimas oxidativas testadas na presença de tween-80. *Hexagonia glabra* produziu cerca de 10 vezes mais lacases do que os outros fungos testados na concentração de 1,5 g.L⁻¹ de surfactante não-iônico Tween, enquanto que *Pleorotus* sp (F-31) foi o que apresentou a menor atividade enzimática para todas as enzimas. O fungo *Hexagonia glabra* foi o que apresentou maior percentual de massa fúngica num maior período do experimento. O fungo *Pleorotus* sp (F-31) e *Hexagonia glabra* mostram-se capazes de crescer, com razoável biomassa em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de atrazina, demonstrando o possível potencial desses fungos para degradação desses herbicida.

Palavra-chave:

fungos - crescimento - enzimas oxidativas.

ABSTRACT

This study it find for to determine physiological parameters of growth and enzymatic activity of three Amazonian fungi. The used fungi had been (*Pleorotus* sp (F-31), *Lentinus crinitus* and *Hexagonia glabra*), gotten of the collection of fungi of the MBT. The evaluation of the radial growth in tests of plate of Petri with the following nutrition ways: BDA, Malte and Jerimum. The evaluation of the growth also was carried through in different concentrations of the atrazine herbicides to verify the potential of the fungi for degradation of this herbicides. The enzymatic activity was determined for phenoloxidase total, laccase and peroxidase. The micelial growth in different nutrition ways, pH and temperature had shown that different the tested fungi had presented behavior, influenced for the temperature, pH and half nutrition All the tested fungi had increased its enzymatic production of tested oxidative enzymes in the presence of tween-80. *Hexagonia glabra* produced more about 10 times laccases of what the other fungi tested in the concentration of 1,5 g.L⁻¹ of not-ionic surfactante Tween, whereas *Pleorotus* sp (F-31) was what it presented the lesser enzymatic activity for all the enzymes. Fungi *Hexagonia glabra* was what it presented percentile greater of fungi mass in a bigger period of the experiment. Fungi *Pleorotus* sp (F-31) and *Hexagonia glabra* reveal capable to grow, with reasonable biomass in way of culture supplemented with different concentrations of atrazine demonstrating the possible potential of these fungi for degradation of this herbicides.

Key-Word:

fungi - growth - oxidative enzymes.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
1 OBJETIVOS	15
1.1 Objetivo Geral.....	15
1.2 Objetivos Específicos.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Características dos fungos.....	16
2.1.1 Fungos basidiomicetos.....	19
2.2 Importância dos fungos.....	22
2.2.1 Importância ecológica.....	22
2.2.2 Importância econômica.....	23
2.3 Biodegradação dos componentes da madeira.....	26
2.4 Enzimas.....	30
2.4.1 Breve histórico.....	30
2.4.2 Enzimas ligninolíticas.....	31
2.4.1.1 Lacases (LAC) (E.C 1.10.3.2).....	31
2.4.1.2 Lignina peroxidase (LIP) (EC 1.11.1.7).....	32
2.4.1.3 Peroxidase dependente do manganês (MnP) (EC 1.11.1.13).....	33
2.4.2 Surfactantes.....	35
2.5 Biodegradação da madeira.....	36
2.6 Estrutura da madeira.....	39
2.6.1 Estrutura da parede celular.....	39
2.6.2 Composição química da madeira.....	42
2.6.2.1 Celulose.....	42
2.6.2.2 Hemiceluloses.....	43
2.6.2.3 Lignina.....	44
2.7 Decomposição da liteira.....	45
2.8 Degradação de atrazina por fungos.....	46
3 MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 Macromicetos.....	49
3.1.1 Isolamento.....	49
3.1.2 Meios de cultura utilizados.....	50

3.1.3 Tampão.....	51
3.1.3.1 Tampão citrato-fosfato.....	51
3.2 Fisiologia dos fungos.....	51
3.3	Massa 52
Micelial.....	52
3.4 Degradação de atrazina por fungos.....	53
3.5 Análise da atividade anzimática oxidativa.....	53
3.5.1 Atividade enzimática Fenoxidase.....	53
3.5.1.1 Produção de ligninase em meio líquido.....	53
3.5.1.1.1 Lacase – Lac.....	54
3.5.1.1.2 Fenoxidase Total.....	54
3.5.1.1.2 Peroxidase.....	54
3.6 Análise estatística.....	55
4. RESULTADOS	55
4.1.1 Crescimento em diferentes Meios de Cultura, pH e temperatura.....	58
4.1.2 Crescimento micelial diário.....	64
4.1.3 Produção de Massa micelial.....	65
4.2 Fenoxidase.....	66
4.3 Atividade enzimática Oxidativa.....	66
4.3.1 Atividade enzimática de <i>Pleorotus</i> sp (F-31), <i>Lentinus crinitus</i> e <i>Hexagonia glabra</i>	67
4.3.2 Atividade enzimática diária de <i>Pleorotus</i> sp (F-31), <i>Lentinus crinitus</i> e <i>Hexagonia glabra</i>	75
4.3.3 Variação do pH durante crescimento.....	77
4.3.4 Crescimento em meio contendo atrazina.....	79
DISCUSSÃO	79
5.1 Crescimento dos fungos em função dos meios de cultura, pH e temperatura... ..	79
5.1.1 Crescimento.....	83
5.2 Crescimento em Atrazina.....	84
5.3 Produção de Enzimas Ligninolíticas.....	86
CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida de um cogumelo.....	20
Figura 2: Ciclo da reprodução sexuada de um fungo basidiomiceto.....	21
Figura 3: Esquema tridimensional de uma parede celular vegetal.....	39
Figura 4: Fórmula estereoquímica de um fragmento de celulose.....	43
Figura 5: Crescimento Diário de <i>Pleorotus</i> sp (F-31) em pH 4,5 e em Diferente Meios de Cultura e Temperatura: A (28 ⁰ c) E B (30 ⁰ c).....	58
Figura 6: Crescimento Diário de <i>Pleorotus</i> sp (F-31) em pH 5,5 E em Diferente Meios de Cultura e Temperatura: A (28 ⁰ C) E B (30 ⁰ C).....	59
Figura 7: Crescimento Diário de <i>Pleorotus</i> sp (F-31) em pH 6,5 e em Diferente Meios de Cultura e Temperatura: A (28 ⁰ C) E B (30 ⁰ C).....	60
Figura 8: Crescimento Diário de <i>Lentinus crinitus</i> em diferentes pH, temperatura e meio de cultura (A) pH 4,5, 28 ⁰ C; (B) pH 4,5, 30 ⁰ C; (C) pH 5,5, 28 ⁰ C; (D) pH 5,5, 30 ⁰ C; (E) pH 6,5, 28 ⁰ C; (F) pH 6,5, 30 ⁰ C.....	61
Figura 9: Crescimento Diário de <i>Hexagonia glabra</i> em diferente pH, temperatura e meio de cultura (A) pH 4,5, 28 ⁰ C; (B) pH 4,5, 30 ⁰ C; (C) pH 5,5, 28 ⁰ C; (D) pH 5,5, 30 ⁰ C; (E) pH 6,5, 28 ⁰ C; (F) pH 6,5, 30 ⁰ C.....	63
Figura 10: Produção de Massa Micelial de <i>Pleorotus</i> sp (F-31), <i>Lentinus crinitus</i> e <i>Hexagonia glabra</i>	64
Figura 11: Fungos com reação de coloração indicativa de atividade Fenoloxidase.....	65

Figura 12: Efeito de Tween-80 em diferentes concentrações na produção de Lacase do Fungo <i>Pleorotus</i> (F-31) sob condição estacionária tendo bagaço-de-cana como fonte de carbono.....	68
Figura 13: Efeito de Tween-80 em diferentes concentrações na produção de Fenoxidase do Fungo <i>Pleorotus</i> (F-31) sob condição estacionária tendo bagaço-de-cana como fonte de carbono.....	69
Figura 14: Efeito de Tween-80 em diferentes concentrações na produção de Peroxidase do Fungo <i>Pleorotus</i> (F-31) sob condição estacionária tendo bagaço-de-cana como fonte de carbono.....	70
Figura 15: Efeito de Tween-80 em diferentes concentrações na produção de Lacase do Fungo <i>Lentinus crinitus</i> sob condição estacionária tendo bagaço-de-cana como fonte de carbono.....	71
Figura 16: Efeito de Tween-80 em diferentes concentrações na produção de Fenoxidase do Fungo <i>Lentinus crinitus</i> sob condição estacionária tendo bagaço-de-cana como fonte de carbono.....	72
Figura 17: Efeito de Tween-80 em diferentes concentrações na produção de Peroxidase do Fungo <i>Lentinus crinitus</i> sob condição estacionária tendo bagaço-de-cana como fonte de carbono.....	72
Figura 18: Efeito de Tween-80 em diferentes concentrações na produção de Lacase do Fungo <i>Hexagonia glabra</i> sob condição estacionária tendo bagaço-de-cana como fonte de carbono.....	73
Figura 19: Efeito de Tween-80 em diferentes concentrações na produção de Fenoxidase do Fungo <i>Hexagonia glabra</i> sob condição estacionária tendo bagaço-de-cana como fonte de carbono.....	74
Figura 20: Efeito de Tween-80 em diferentes concentrações na produção de Peroxidase do Fungo <i>Hexagonia glabra</i> sob condição estacionária tendo bagaço-de-cana como fonte de carbono.....	75
Figura 21: Variação do pH durante período de incubação. (A) <i>Pleorotus</i> sp (F-31); (B) <i>Lentinus crinitus</i> ; (C) <i>Hexagonia glabra</i>	76
Figura 22: Crescimento radial de fungo em meio contendo diferentes concentrações de atrazina. (A) <i>Pleorotus</i> sp (F-31); (B) <i>Lentinus crinitus</i> ; (C) <i>Hexagonia glabra</i>	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características dos Fungos.....	19
Tabela 2: Organismos degradadores da lignina.....	27
Tabela 3: Reações de degradação de madeira por fungos e espécies enzimáticas envolvidas.....	38
Tabela 4: Composição do Meio de Cultura de Batata.....	50
Tabela 5: Composição do meio de Cultura de Extrato de Malte.....	50
Tabela 6: Composição do meio de Jerimum.....	50
Tabela 7: Crescimento dos fungos (cm) em diferentes meios de cultura.....	57
Tabela 8: Influência da concentração de Tween-80 na atividade lignolítica dos fungos. Números em parênteses significam desvio padrão. Letras iguais (linha horizontal).....	67
Tabela 9: Valor médio do pH obtido no filtrado de diferentes concentrações de Tween-80.....	76
Tabela 10: Valor médio do crescimento radial em meio contendo diferentes concentrações de atrazina.....	77

INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um dos “campeões mundiais” de biodiversidade em função das formas de vida vegetais, animais e provavelmente fúngicas também. É consenso que existe um grande potencial de aplicação de espécies de fungos basidiomicetos nativos do Brasil a ser pesquisado (MATHEUS & OKINO,1998).

E é na região Amazônica que está concentrada a maior biodiversidade da Terra, e com boa parte das espécies que a decompõe ainda é desconhecida. Embora, apenas uma pequena parte da biodiversidade mundial tenha sido estudada, muito tem que ser feito para conhecer seu potencial biotecnológico. No contexto dessa biodiversidade encontram-se os fungos.

Os fungos são os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas (NOVO NORDISK, 1996; MENEZES, 1997).

Nos últimos 25 anos, o emprego de enzimas na indústria tem aumentado consideravelmente, mas ainda existe um grande campo para sua expansão, pois

novas enzimas vão penetrando em outros ramos da indústria, criando, desta maneira, novas oportunidades de desenvolvimento tecnológico. Do total do mercado de enzimas, estima-se que cerca de 85% correspondem a usos do tipo industrial e que os 15% restantes correspondem a outros usos: analíticos, médicos etc (LEMOS, 2006).

Os microrganismos sintetizam inúmeros compostos de importância industrial como vitaminas, antibióticos e enzimas. Dentre esses, as enzimas têm sido utilizadas em diversos processos industriais, principalmente no processamento de produtos alimentícios (celulases e xilanases) e despoluição ambiental (fenoloxidades) (GRAY & WILLIAM, 1975).

Os compostos lignocelulósicos são os principais componentes da membrana celular dos vegetais (FENNEMA, 1993). Este material é constituído principalmente de lignina, celulose e hemicelulose (MYBURGH, 1991). A lignina é um biopolímero aromático amorfo, tridimensional, formado via polimerização oxidativa. Este ocorre na parede celular de plantas superiores em diferentes composições: madeiras das folhosas 25 a 35%, madeiras das coníferas de 18 a 25% e gramíneas de 10 a 30% (GOLDSTEIN, 1976; BONONI, 1999; LARS *et al.*, 2000). Os principais agentes de degradação da lignina estão entre os fungos de decomposição branca que são dotados de um sistema ligninolítico constituído de peroxidases (Lignina e Manganês-Peroxidase) e da lacase; essas enzimas contribuem aos fungos a capacidade de desestabilizar a estrutura da lignina (BONONI, 1997; CLOETE & CELLIERS, 1999; BONONI, 1999; CHAGAS & DURRANT, 2001). As ligninases têm sido consideradas como uma promissora alternativa biotecnológica para a remoção de compostos

tóxicos do ambiente. Um dos principais exemplos tem sido na indústria têxtil, onde existe um vasto consumo de água e componentes químicos durante o processo de tingimento, o que resulta em efluentes altamente complexos e recalcitrantes. Além disso, estudos têm mostrado que algumas classes de corantes, principalmente azocorantes, e seus subprodutos, podem ser carcinogênicos e ou mutagênicos (KUNZ *et al.*, 2002). Enzimas como a Li-P, Mn-P e Lacase podem promover a degradação desses compostos.

Diante do exposto torna-se necessário incrementar o estudo de enzimas dos fungos amazônicos, tornando-se extremamente importante caracterizar as atividades lignolíticas presentes em determinadas condições de crescimento do fungo. Alguns parâmetros como: o pH; a temperatura, assim como, meio de cultura são fundamentais para se conhecer as condições ótimas de atuação destas enzimas.

Portanto, a presente pesquisa pretende avaliar a atividade enzimática oxidativa de fungos amazônicos notadamente no que diz respeito aos parâmetros necessários para uma maior atividade enzimática, além de verificar o potencial destes fungos para degradar o herbicida atrazina.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

- ❖ Avaliar a atividade enzimática oxidativa de fungos amazônicos, *Pleorotus* (F-31), *Lentinus crinitus* e *Hexagonia glabra*.

1.2 Objetivos Específicos

- ❖ Avaliar o comportamento fisiológico dos fungos: *Pleorotus* (F31), *Lentinus crinitus* e *Hexagonia glabra* em função da temperatura, pH e meio de crescimento;
- ❖ Determinar a massa micelial dos fungos *Pleorotus* (F-31), *Lentinus crinitus* e *Hexagonia glabra*;
- ❖ Verificar a degradação de atrazina pelos fungos testados;
- ❖ Identificar atividade enzimática fenoxidase nos fungos testados;
- ❖ Avaliar a influência de Tween-80 em diferentes concentrações na produção de lacases, Fenoxidase Total e Peroxidase;
- ❖ Verificar a variação do pH dos fungos testados durante o período de atividade enzimática.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características dos fungos

No passado os fungos foram considerados plantas degeneradas, que haviam perdido a clorofila e a capacidade de realizar a fotossíntese. Esse foi o motivo de, nas classificações mais antigas, eles terem sido incluídos no reino das plantas. A partir da década de 1950, os novos conhecimentos biológicos, provenientes principalmente do desenvolvimento das técnicas de microscopia e bioquímica mostraram que os fungos são mais apresentados com os animais do que com as plantas. Eles foram, então, transferidos para o reino Protista, juntamente com algumas algas e protozoários. Somente a partir de 1969 foram classificados em um reino à parte, o Reino Fungi (TRABULSI & TOLEDO, 1999; AMABIS, 2004).

Os fungos estão divididos em dois filos: Eumycota (fungos verdadeiros) e Mixomycota (fungos gelatinosos). Os Eumycota constituem a maioria das espécies que são distribuídas em quatro classes: Phycomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes e Deuteromycetes. O principal critério para a separação dos Ascomycota em quatro classes é o tipo de processo sexual e de estruturas reprodutivas que apresentam (Tabela 1).

Os fungos (do latim *fungus* = cogumelo) são microrganismos unicelulares (leveduras) ou multicelulares (filamentosos), formados por células eucarióticas, aclorofilados e aeróbios, heterotróficos (decompositores de matéria orgânica ou parasitas). Crescem rapidamente e formam filamentos celulares microscópicos denominados hifas, cujo conjunto constitui uma espécie de tecido próprio dos

fungos, o micélio, responsável por todas as funções vegetativas do organismo (HUDSON, 1986). Por causa da parede celular rígida, os fungos não são capazes de “engolir” microrganismos ou outras partículas. Comumente, o fungo secreta enzimas através do micélio sobre a fonte de alimento e absorve pequenas moléculas que são liberadas (RAVEN, 2001). Em outras situações, o micélio emite órgãos chamados haustórios, que penetram no tecido dos organismos hospedeiros, absorvendo o alimento (GRIFFIN, 1994). Outros, ainda, preferem viver em simbiose, formando associações, efêmeras ou duradouras, com organismos dos demais reinos de seres vivos. A parede celular de alguns fungos contém celulose, como alguns fungos aquáticos inferiores, mas a maioria deles possui parede celular com quitina (polissacarídeo, insolúvel e córneo formado por unidades de N-acetilglicosamina) (BLACK, 2002). A constituição da parede celular dos fungos é uma das características que levou à sua separação num reino a parte entre os seres vivos. O material de reserva energética dos fungos é o glicogênio (LAURENSE, 2005).

Alguns fungos são dimórficos, ou seja, tem a capacidade de estar sob forma de bolor na vida saprofítica, e na forma de levedura na vida parasitária. Ocorre com mudanças de pH, temperatura, etc.

A reprodução dos fungos ocorre por meio da formação de esporos que são formados sexuada ou assexuadamente, podendo ser formados dentro de uma estrutura, quando são denominados endósporos, ou livres, ectósporos. A reprodução assexuada ocorre através de brotamento, fragmentação e produção de conídios, no caso dos ascomicetos. Por outro lado, a reprodução sexuada culmina na produção de basidiósporos, como no caso de basidiomicetos (PELCZAR *et al.*,

1996; RAVEN, 2001). Aqueles fungos que apresentam apenas formação assexuada de esporos são considerados os fungos imperfeitos, enquanto que aqueles que só apresentam reprodução sexuada são os perfeitos.

Estima-se que existam pelo menos um milhão e quinhentas mil espécies de fungos espalhadas pelo mundo. Isto é uma estimativa muito superior àquela para as espécies de vegetais e animais somadas, excluindo-se os insetos. Desse total estimado apenas cerca de 70.000 espécies de fungos foram até hoje descritas, ou seja, menos de 5% das possivelmente existentes (ARAÚJO, 2007). Dentre essas espécies fúngicas conhecidas existem muitas de grande importância comercial, como as que entram na fabricação de alimentos, incluindo bebidas, de ácidos orgânicos, de fármacos e inúmeros outros produtos, pode-se imaginar o que se espera com a descoberta de novas espécies com distintas propriedades potencialmente de valor biotecnológico.

Tabela 1

Características dos Fungos

Categoria Taxonômica	Características relevantes
Filo Eumycota - Classe Phycomycota	unicelulares ou filamentosos (hifas cenocíticas) reprodução sexuada sem corpos de frutificação
Filo Eumycota - Classe Ascomycota	unicelulares ou filamentosos (hifas septadas) reprodução sexuada por scósporos contidos em corpos de frutificação (ascocarpo)
Filo Eumycota - Classe Basidiomycota	filamentosos com hifas septadas reprodução sexuada por basidiósporos contidos em corpos de frutificação (basidiocarpo)
Filo Eumycota - Classe Deuteromycota	filamentosos com hifas septadas não se conhecem formas de reprodução sexuada
Filo Mixomycota	cenocíticos sem hifas não possuem parede celular na fase vegetativa assemelham-se a amebas reprodução sexuada formando esporângios onde ocorre a meiose

Fonte: Modificado de WHITTAKER (1969).

2.1.1 Fungos basidiomicetos

Os basidiomicetos diferenciam-se dos demais fungos por produzirem esporos (basidiósporo) de origem sexuada (Figura 1) em uma estrutura especializada denominada de basídio e são popularmente chamados de cogumelos e orelhas-de-pau. Na realidade, o cogumelo constitui uma fase temporária no ciclo de vida destes fungos, e é a estrutura onde ocorre a reprodução sexuada, sendo também conhecido como corpo de frutificação, carpóforo ou basidiocarpo e, atualmente, denominado basidioma. Após a dispersão dos basidiosporos, os basidiomas acabam apodrecendo ou sendo comidos por insetos, enquanto o organismo em si é formado pelo micélio vegetativo, que coloniza e explora o substrato. (GUGLIOTTA &

CAPELARI, 1998). O micélio que é a fase vegetativa dos basidiomicetos dos *Basidiomycota* é sempre septado e os septos são perfurados. Em muitas espécies o poro do septo tem uma margem inflada ou em forma de barril chamada doliporo. Qualquer fungo com septo dolipórico pertence ao filo *Basidiomycota*. De ambos os lados do poro há capas membranosas chamadas parentossomos porque, em perfil, lembram um par de parênteses. Outros basidiomycota, incluindo as ferrugens e os carvões, têm septos que lembram os dos ascomicetos (GUGLIOTTA & CAPELARI 1998; RAVEN, 2001).

Quanto ao ciclo de vida de um cogumelo (Figura 2) os micélios primários, monocarióticos, são produzidos a partir de basidiósporo e dão origem aos micélios secundários, dicarióticos, pela fusão de linhagens diferentes, resultando micélios heterocarióticos. O micélio terciário, dicariótico, forma o basidioma, que contém os basídios alinhados no himênio, sobre as lamelas. Finalmente bilhões de basidióporos são liberados (RAVEN, 2001).

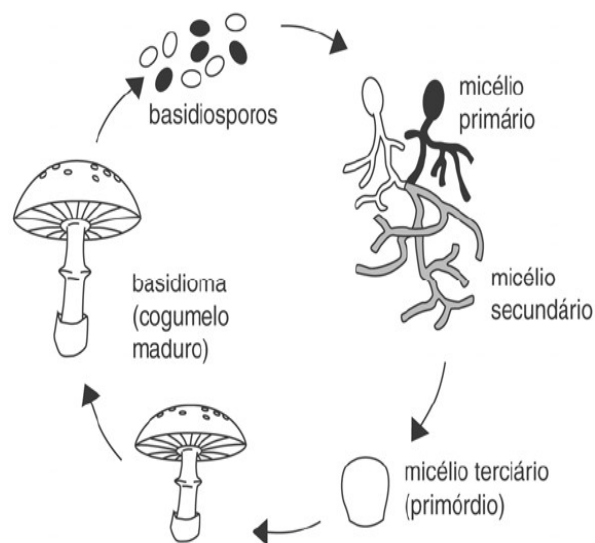


Figura 1: Ciclo de vida de um cogumelo.
Fonte: ROSA (2007)

Os basidiomicetos também são caracterizados por possuírem dois tipos básicos de basidiósporos. Os denominados balistosporos, que são liberados violentamente dos basídios e os denominados estatismosporos, que são liberados passivamente (GUGLIOTTA & CAPELARI 1998). São reconhecidos pelos produtos metabólicos que produzem como enzimas e polissacarídeos (MATHEUS & OKINO, 1998; GUGLIOTTA & CAPELARI 1998; RAVEN, 2001).

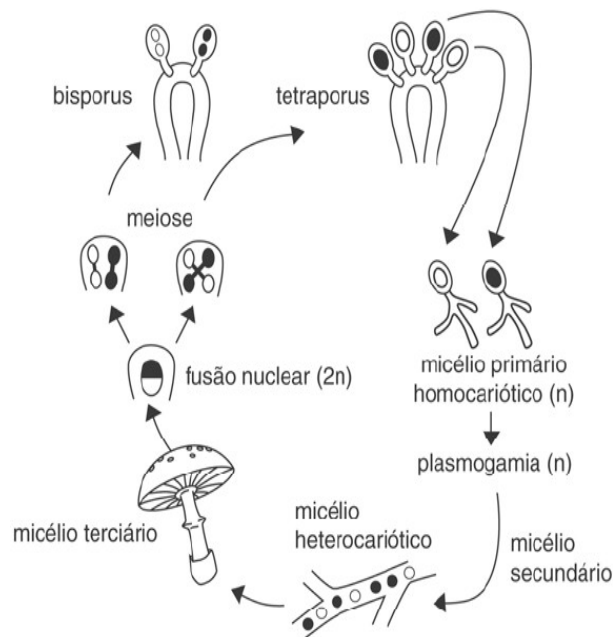


Figura 2: Ciclo da reprodução sexuada de um fungo basidiomiceto.
Fonte: ROSA (2007)

De acordo com Hawksworth et al. (1996) Filo Basidiomycota, consideram a existência de 1.428 gêneros e 22.244 espécies, dos quais os Basidiomycetes e gasteromicetos representam 473 gêneros e 13.857 espécies. Os restantes pertencem a Teliomycetes e Ustomycetes (230 gêneros e 8.198 espécies).

2.2 Importância dos fungos

Os fungos apresentam uma série de características econômicas e ecológicas que os transformaram em organismos indispensáveis para todo e qualquer ecossistema e presentes na vida de cada um de nós (PUTZKE, 2002).

2.2.1 Importância ecológica

Os fungos, juntamente com as bactérias heterotróficas podem ser consideradas os principais decompositores da biosfera, quebrando a matéria orgânica e reciclando o carbono, o nitrogênio e outros componentes, que são liberados no solo e no ar. Na realidade, esse microrganismo são capazes de translocar através de suas hifas, elementos entre microsítios, de forma a suprir recursos potencialmente limitantes para o seu metabolismo em um dado sítio (ANDERSON, 1988), sobrepujando as limitações físicas e químicas impostas pela estrutura e distribuição em manchas dos substratos orgânicos no solo (BEARE *et al.*, 1997). Ressalta-se, entretanto, que embora o micélio tenha a capacidade de penetrar nos materiais em decomposição, o mesmo é muito suscetível à ruptura física. Como decompositores, entram em conflito direto com os interesses do homem, atacando quase todas as substâncias concebíveis. A maioria dos fungos é sapróbia, isto é, vivem sobre a matéria orgânica em decomposição. Muitos fungos atacam organismos vivos e são agentes causadores de doenças em plantas, animais domésticos e no homem. Muitos fungos são economicamente importantes para o homem como destruidores de alimentos estocados e outros materiais orgânicos.

2.2.2 Importância econômica

A importância econômica está diretamente ligada ao interesse comercial, benefício ou prejuízo (patógeno) que podem aumentar ou diminuir a sua renda econômica, bem como na área de biotecnologia.

O interesse do homem pelos fungos vem desde a antiguidade em função da eterna busca por alimento. Logo se descobriu que eles eram uma nova fonte de alimentação, porém vários envenenamentos acidentais ocorreram e estes fungos venenosos receberam o nome de “fermentos venenosos da terra” (MORAIS *et al.*, 2003). Muitos fungos já eram empregados desde a mais longínqua antiguidade, quando o homem descobriu a metodologia e técnica de preparo do pão, do queijo e das bebidas. Na época, ignorando o que provocava a fermentação, pelo menos o pão e as bebidas alcoólicas surgiram praticamente em todos os cantos do planeta independentemente. Durante centenas de anos, várias tribos indígenas aprenderam com a natureza que determinadas espécies de fungos eram comestíveis, e de excelente valor nutritivo (PUTZKE, 2004).

A maioria dos processos biotecnológicos utilizando basidiomycetes, entre estes os agaricales, baseia-se nos seus produtos metabólicos, como enzimas e polissacarídeos. A importância do “pool” destes fungos está diretamente relacionada com a bioconversão de resíduos lignocelulósicos tanto para a produção de alimentos no cultivo de cogumelos comestíveis (MAU *et al.*, 1991; SONG *et al.*, 1991; STURION & RANZANI, 1997) quanto para a produção de polissacarídeos, que podem ser utilizados, principalmente, nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Além

disso, este mesmo aparato enzimático está relacionado com os processos de biodegradação de compostos xenobióticos, como por exemplo, na biorremediação de solos contaminados e no tratamento de efluentes da indústria papelreira e têxtil (MATHEUS & OKINO, 1998).

Silva e Coelho (2006) afirmam que os cogumelos possuem até cinco vezes mais proteínas que a carne de bovinos e suínos, além de serem destituídos das gorduras insaturadas altamente prejudiciais para o organismo de animais. Ressalta-se, que os produtos finais da degradação do substrato lignocelulósicos pelos fungos podem ainda ser utilizados como fertilizantes em plantações, suplementos para ração de animais ou ainda serem reciclados e misturados a outros materiais orgânicos, para utilização em terra de cobertura de plantações de champignon.

Pesquisadores americanos e chineses têm demonstrado em seus estudos as atividades antitumorais dos polissacarídeos e triterpenóides extraídos de várias espécies do gênero *Ganoderma* (SILVA & COELHO, 2006). Além disso, substâncias extraídas de outras espécies de basidiomicetos são aplicadas para a diminuição do colesterol, redutores de pressão sanguínea, potencializadores do sistema imunológico e também como drogas para controle cardíaco.

Os produtos a partir da fermentação da soja por fungos podem ser encontrados no mercado. O Tempeh é um fermentado de soja que a torna mais leve e nutritiva produzida a partir da utilização dos fungos *Rhizopus ligosporus*, *R. oryzae*, *R. arrhizus* ou *R. stolonifer*, e também com a participação, com menor relevância, de bactérias e outros fungos. O Tofu, também chamado de queijo de

soja, é preparado a partir da fermentação da soja utilizando-se outros zigomicetos, como *Actinomucor elegans* ou outras espécies do gênero *Mucor* e de *Rhizopus*. O oncom, uma comida típica da Indonésia, trata-se de uma pasta de amendoim fermentada pela espécie *Rhizopus oligosporus* (SILVA & COELHO, 2006).

Os fungos basidiomicetos lignocelulolíticos são utilizados para biodegradação de substâncias químicas recalcitrantes à degradação biológica no meio ambiente. Nos meados da década de 80 foram apresentadas evidências de que o fungo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* tinha a capacidade de degradar e mineralizar compostos xenobióticos como DDT, lindano (1,2,3,4,5,6-exaclorociclohexano) (BUMPUS & AUST, 1987), TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina), algumas bifenilas policloradas (PCB's) (BUMPUS, 1989) entre outros. São também utilizados espécies de zigomicetos. Por exemplo, espécies de zigomicetos degradadores de hidrocarbonetos são *Cunninghamella bainieri*, *C. elegans* e *Syncephalastrum racemosum*. As que promovem oxidações de alcanos são *Absidia spinosa*, *Rhizopus stolonifer*, e muitas espécies de *Cunninghamella* (SILVA & COELHO, 2006).

A biodegradação por fungos tem ampla vantagem em relação àquela por bactérias. Os fungos são capazes de crescer sob as condições de estresse ambiental que limitam o crescimento bacteriano. E ainda, o modo de crescimento dos fungos – induzido quimiostaticamente em direção à fonte de carbono orgânico, através do alongamento e ramificação das hifas – permite a colonização de grandes áreas. Desta forma, o contato superficial com o contaminante é otimizado, aumentando sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, sua biodegradação

(DUPONT *et al.* 1997). A degradação da lignina é extracelular e relativamente inespecífico. A degradação consiste em um processo multienzimático resultante da ação coordenada de uma série de enzimas do grupo das oxidoreduases, representadas principalmente por lacases, manganês peroxidases, lignina peroxidases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio e de compostos metabólitos intermediários de baixa massa molecular (KIRK & FARRELL 1987, VARES *et al.* 1995, LEONOWICZ *et al.* 1999, MAYER & STAPLES 2002, SUGIURA *et al.* 2003).

Outro grupo de fungos de importancia economica sao as leveduras. Certas leveduras, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, são úteis porque produzem etanol e dióxido de carbono, os quais tem papel preponderante na panificação, fermentação e bebidas alcoólicas tais como: Cerveja (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbetgensis*), rum, vinho (*Saccharomyces ellipsoideus*), saquê e produção industrial do etanol a partir da cana de açúcar. Outros fungos proporcionam sabor e aroma utilizados na fabricação de queijos. Também são matéria prima na produção de antibióticos, dos quais o primeiro, a penicilina, foi descoberto em 1928 por Alexander Fleming, isolado de um fungo do gênero *Penicillium*. (NEUFELD, 1997; RAVEN, 2001; LAURENCE, 2005).

2.3 Biodegradação dos componentes da madeira

Vários organismos, como bactérias e fungos (Tabela 2), são capazes de atacar e degradar a madeira, em ecossistemas terrestres naturais, porém sem

dúvida alguma, fungos superiores, especialmente os da classe Basidiomycetes, são os mais eficientes degradadores (BLANCHETE, 1991; TUOR et al,1995).

Tabela 2

Organismos degradadores da lignina

Organismo	Filo	Degradação da lignina	Ambiente	Alguns gêneros
Fungos da podridão branca	Basidiomycota (Ascomycota)	Mineralização da lignina, deslignificação seletiva ou não seletiva	Principalmente madeira folhosa	<i>Phanerochaete</i> , <i>Phlebia</i> , <i>Trametes</i>
Fungos da podridão parda	Basidiomycota	Modificação da lignina	Principalmente madeira conífera	<i>Poria</i> , <i>Polyporus</i>
Fungos da podridão mole	Ascomycota ou fungos anamorfos	Limitada degradação da lignina	Ambientes aquáticos, madeira com umidade elevada, serapilheira	<i>Chaetomium</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Fusarium</i>
Bactérias	Actinomycetes ou Mixobactéria	Limitada degradação da lignina	<i>Sapwood</i> , madeira saturada de água, madeira em estágio avançado de decomposição, serapilheira	<i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudomonas</i>

Fonte: Tuomela *et al.*; 2000

Os fungos basidiomicetos deterioradores de madeira são geralmente classificados com base nas diferenças dos respectivos padrões de degradação da madeira que apresentam, levando-se em consideração características macroscópicas da degradação. Assim, podem ser divididos em fungos de podridão branca (White-rot), podridão parda (Brown-rot) e degradação mole (soft-rot) (BLANCHETE, 1991; HATAKKA 1994; TUOR et al., 1995).

Fungos de podridão branca preferencialmente colonizam madeiras da subdivisão *Angiospermae* (folhosas, madeira dura) e degradam enzimaticamente os três componentes principais da madeira (celulose, hemicelulose e lignina), deixando a região da madeira degradada com uma coloração esbranquiçada. Existem por

outro lado, áqueles seletivos de lignina, cujo “pool” enzimático degradam preferencialmente esse elemento da parede celular da madeira.

Ressalta-se que dentre os componentes da madeira, lignina é o que apresenta maior resistência a biodegradação. Neste contexto, a biodegradação de lignina é um dos mais importantes fatores determinantes da degradação de madeira e conseqüentemente do ciclo de carbono na biosfera.

Lignina, diferentemente de processos hidrolíticos, comuns aos demais biopolímeros de ocorrência natural na madeira, sofre degradação através de reações oxidativas, envolvendo diretamente O_2 molecular ou peróxido como H_2O_2 , gerando assim compostos de baixa massa molecular, solúveis em meio aquoso. Tal característica se deve ao fato de que as ligações, entre as várias unidades recorrentes formadoras de lignina, não são hidrolizáveis (FENGEL, WEGENER 1989; HIGUCHI, 1990).

Embora existam ainda muitas lacunas, bem como muitos dados discrepantes, os dados disponíveis atualmente evidenciam que a eficiência de degradação da madeira por estes fungos depende das suas capacidades de produzir enzimas lignolíticas extracelulares, as quais são as responsáveis diretas pela disponibilização de nutrientes contidos na madeira, necessários para a manutenção e crescimento dos micélios (HATAKKA 1994; TUOR et al, 1995).

2.3.1 Materiais lignocelulósicos utilizados como substrato

Uma grande variedade de materiais lignocelulósicos pode ser utilizada para suportar o crescimento de fungos de podridão branca, tais como: palha, grãos enriquecidos com nutrientes misturados à serragem, polpa de beterraba, sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar. Esse último, por exemplo, pode ser diretamente inoculado com o fungo ou composto para cogumelos colonizado com o micélio fúngico. Além disso, muitos materiais lignocelulósicos, descartados como resíduos por indústrias florestais, agrícolas e papelreira, podem ser usados na aceleração natural da degradação, favorecendo o reaproveitamento destes materiais e o não acúmulo de tais resíduos no ambiente (POINTING 2001, KRISHNA, 2005).

Um dos maiores resíduos celulósicos agro-industriais é o bagaço de cana-de-açúcar, resíduo fibroso de sobras do talo da cana-de-açúcar, após extração do suco. Consiste de aproximadamente 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. Quimicamente, esse resíduo contém cerca de 50% de α -celulose, 30% de pentoses e 2,4% de minerais. Na fermentação sólida com bagaço de cana-de-açúcar, esse substrato pode ser utilizado como fonte de carbono (energia) ou apenas como um suporte sólido inerte (PANDEY *et al.* 2000).

Nos últimos anos, um grande número de microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos, está sendo utilizado em cultivo no bagaço de cana-de-açúcar. Fungos filamentosos, especialmente os basidiomicetos foram empregados nesse tipo de cultivo, como *Lentinus crinitus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Psilocybe castanella*, *Trametes villosa*, entre outros (DZUL-PUC *et al.* 2005, BALLAMINUT &

MATHEUS 2006, COMPART *et al.* 2006). O bagaço de cana-de-açúcar pode também ser empregado como suplemento em meios para crescimento de fungos de podridão branca estimulando a produção de enzimas ligninolíticas (PANDEY *et al.* 2000).

2.4 Enzimas

2.4.1 Breve histórico

A catálise biológica foi inicialmente reconhecida e descrita no início do século XIX, em estudos sobre a digestão de carne por secreções do estômago e a conversão do amido em açúcares simples pela saliva e por vários extratos vegetais. Na década de 50, Louis Pasteur concluiu que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura é catalisada por “fermentos”. Ele postulou que esses fermentos, depois nomeados enzimas, eram inseparáveis da estrutura das células vivas do levedo, uma hipótese que prevaleceu por muitos anos como verdadeira. A descoberta, por Eduard Buchner, em 1897, de que os extratos de levedo podiam fermentar o açúcar até o álcool, provou que as enzimas envolvidas na fermentação continuavam funcionando mesmo quando removidas da estrutura das células vivas (LEHNINGER, 1995).

A catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Sob condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas. Considerando o potencial enzimático dos fungos, os mesmos são os mais

importantes microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas (NOVO NORDISK, 1996; MENEZES, 1997).

2.4.2 Enzimas ligninolíticas

Dentre o vasto arsenal de enzimas extracelulares, tanto hidrolíticas quanto oxidativas, que os fungos degradadores de madeira exibem, particularmente o grupo das fenoloxidasas é tido como o de maior importância ou determinante da capacidade degradativa destes organismos (HATAKKA, 1994). Fazem parte também deste grupo de enzimas como lacase, lignina peroxidase e Mn-peroxidase, as quais estão diretamente envolvidas na biodegradação de lignina.

2.4.1.1 Lacases (LAC) (E.C 1.10.3.2)

A lacase (E.C 1.10.3.2, p-diphenol: dioxygen oxidoreductase) é uma polifenoloxidase produzida por diversos fungos, plantas e bactérias (THURSTON, 1994). Lacase tem um importante papel na lignificação e deslignificação na natureza. Em plantas, lacases estão envolvidas na lignificação. Em fungos, além da degradação de lignina, as lacases parecem estar envolvidas na esporulação, produção de pigmentos e patogenicidade de plantas. Em insetos, esta enzima catalisa a união oxidativa de catecóis com proteínas envolvidas na esclerotização da cutícula (CLAUS 2004). A lacase fúngica é enzima glicoproteína que contém cobre no seu sítio ativo e que catalisa a redução de O₂ para água, com simultânea oxidação de substratos fenólicos. Em geral, as lacases contem 4 átomos de cobre

por molécula de enzimas embora existam enzimas com 2,3 e até 6 átomos de cobre (THURSTON, 1994).

Devido à capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, as lacases fúngicas estão recebendo grande atenção em várias aplicações industriais como deslignificação, produção de etanol, modificação de fibras da madeira, clareamento de corantes, síntese de produtos químicos/medicinais e remediação de solos e águas contaminadas. Pesquisas recentes têm sido intensas e muito tem sido elucidado sobre a diversidade de lacases e suas utilidades (DURÁN *et al.* 2002).

A maioria das lacases caracterizadas até o presente momento são derivadas de fungos, especialmente daqueles basidiomicetos que produzem podridão branca, e são eficientes na degradação da lignina.

2.4.1.2 Lignina peroxidase (LIP) (EC 1.11.1.7)

Este grupo ou família de enzimas tem sido intensamente estudado e sua ocorrência, extração e caracterização tem sido relatada em um grande número de fungos tais como, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Phlebia tremellosa*, *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Junghuhnia seprabilima*, *Phlebia ochraceofulva* (HATAKKA, 1994; KIRK, FARRELL, 1987).

Lignina peroxidase constitui um grupo de glicoproteínas contendo um grupamento heme, catalisa uma variedade de compostos fenólicos, não fenólicos,

hidratos de carbono aromáticos e outros compostos que são resistentes ao ataque microbiano. Requer peróxido de hidrogénio como cofator e a reação ocorre através do mecanismo de oxidação de um electrón seguido por uma série de reações não enzimáticas (GARG & MODI, 1999). Estas reacções incluem a degradação oxidativa das ligações β -O-4, C_a-C_β e outras ligações na lignina. Os fungos segregam para o meio de cultura várias isoenzimas que apresentam uma massa molecular entre 39 e 43 kDa e propriedades espectrais e catalíticas semelhantes (KIRK & FARELL, 1987).

2.4.1.3 Peroxidase dependente do manganês (MnP) (EC 1.11.1.13)

A Manganês Peroxidase (Mn-P) é muito semelhante à LiP, entretanto, além do peróxido de hidrogénio requer íons Mn^{2+} e oxida Mn(II) a Mn(III) (CRAWFORD & POMETTO, 1988). A MnP constitui o segundo grupo de glicoproteínas que contém o grupo heme que requer ions de manganês livres para a sua atividade. A atuação desta enzima requer também a presença de peróxido de hidrogénio. Inicialmente catalisa a oxidação do Mn^{2+} para o Mn^{3+} , que subsequentemente oxida vários compostos fenólicos (GARG & MODI, 1999). Os fungos também segregam várias isoenzimas da MnP para o meio de cultura, embora algumas também possam estar ligadas à parede celular (HATAKKA, 1994).

Em 1984, Kuwahara *et al.* descobriram uma peroxidase diferente da ligninase, presente em fluído extracelular de culturas ligninolíticas de *P. chrysosporium*. Esta enzima isolada mostrou necessidade por peróxido de hidrogénio (H_2O_2), Mn (II) e lactato. Semelhante a peroxidase da raiz forte (HRP), outra heme-peroxidase, a MnP

oxidou vermelho de fenol, *o*-dianisidina e corantes poliméricos (KIRK & FARRELL 1987, HOFRICHTER *et al.* 2001).

A peroxidase dependente de manganês é uma glicoproteína com Fe protoporfirínico IX como grupo prostético. As MnP participam de reações de despolimerização de ligninas sintéticas e degradação de cloroligninas, atuam também como mediador na etapa inicial da degradação de ligninas de alta massa molecular (KIRK & FARRELL 1987, MARTÍNEZ *et al.* 2005).

Além disso, atuam na oxidação de unidades fenólicas da lignina, sistemas baseados na mediação por ácidos graxos insaturados e seus derivados que, por exemplo, vem sendo relacionados com a degradação de estruturas não fenólicas de lignina por MnP (WATANABE *et al.* 2000, HOFRICHTER 2002).

A produção de MnP está aparentemente limitada a alguns fungos basidiomicetos e outros organismos. Entretanto, a habilidade de sintetizar MnP é difundida entre grupos taxonomicamente distintos de basidiomicetos (HOFRICHTER 2002).

A cooperação vantajosa de MnP com outras oxiredutases é evidenciada por MnP e lacase, bem como MnP e LiP, resultando assim no crescimento da aplicação de despolimerização de lignina. Muitos derivados de lignina biogeoquimicamente modificados, bem como organopoluentes, incluindo xenobióticos persistentes, mostraram suscetibilidade ao ataque da MnP (HOFRICHTER *et al.*, 2001, HOFRICHTER, 2002).

Alguns autores evidenciam essa ação conjunta de MnP e lacase relacionadas à degradação.

Em estudo de biorremediação em meio líquido e solo, Novotný *et al.* (2004) comentam a importância dos altos níveis dessas duas enzimas, detectadas no cultivo em solo e em culturas de *Pleurotus ostreatus*, relacionando-as às maiores taxas de degradação de hidrocarbonetos poliaromáticos.

Estudos de degradação de compostos orgânicos por meio da catálise enzimática da MnP estão sendo avaliados (LEONTIEVSKY *et al.* 2001, STEFFEN *et al.* 2003). Hofrichter *et al.* (1998), em um estudo com MnP de *Nematoloma frowardii*, relacionaram a mineralização de compostos alifáticos e aromáticos, incluindo pentaclorofenol, com a atividade de MnP.

2.4.2 Surfactantes

A produção de lacases também pode ser estimulada pela adição de detergentes (POINTING *et al.*, 2000). Surfactantes não-iônicos como o Tween-20 e o Tween-80 tem sido utilizados para aumentar a viabilidade das reações entre as enzimas e seus respectivos substratos (POZDNYAKOVA *et al.*, 2004). O Tween é um surfactante não-iônico, pouco tóxico para as membranas biológicas (Rege *et al.*, 2002), constituído por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol (Figura 1). Estimula a secreção de proteínas em microrganismos (STUTZENBERGER, 1992), além de alterar a morfologia e a superfície da parede celular tanto de bactérias (Van BOXTEL *et al.*, 1990) como de fungos (DOMINGUES *et al.*, 2000).

2.5 Biodegradação da madeira

A degradação da madeira é causada por numerosos fungos que podem crescer na madeira e liberar enzimas e/ou ácidos que geralmente atacam a fração carboidrato por hidrólise e, a uma extensão menor causam a oxidação da lignina. O crescimento de fungos é mais favorável onde oxigênio atmosférico é pleno em temperaturas entre 20 e 40 graus centígrados, e em madeira que é moderadamente ácida e que se encontra com teor de umidade entre 20 e 100%. As espécies de madeira variam grandemente na sua resistência à degradação, embora somente o cerne da madeira que apresenta resistência significativa. Esta é atribuída a materiais (frequentemente fenólicos) que são encontrados na fração de extrativos da madeira e são tóxicos a fungos e mofo (KLOCK *et al*, 2005).

Com relação ao apodrecimento causado pela atuação de enzimas produzidas pelos fungos, Seabright (1995) afirmou que estas são produzidas a partir de vários biocatalizadores, em que cada uma dessas substâncias desenvolve funções específicas, como a aceleração ou controle das reações bioquímicas. Esses biocatalizadores são macromoléculas de proteínas com estrutura supermolecular definida, contendo um centro ativo. A hifa secreta enzimas destruidoras de celulose, quebrando a estrutura cristalina por expansão intermolecular, resultando na clivagem de algumas ligações de hidrogênio e co-valentes. Várias outras enzimas agem também sinergisticamente, quebrando e degradando a celulose não cristalizada em cadeias oligoméricas mais curtas e em unidades de celobiose (duas unidades de anidro-glicose), chegando, finalmente, a simples monômeros de glicose, que podem ser digeridos pelas hifas. Pode-se afirmar que a quebra

enzimática consiste basicamente na transformação dos componentes insolúveis da madeira, em produtos solúveis, e em seguida em compostos químicos simples, capazes de serem metabolizados. Segundo Oliveira et al. (1986), esse processo pode ser relativamente rápido, demonstrando, assim, a eficiência dos fungos xilófagos em degradar substratos lignocelulósicos.

De acordo com a forma que degradam a madeira, os basidomicetos podem ser agrupados em: fungos causadores da podridão branca (PB) e fungos causadores da podridão parda (PP), conforme comentado anteriormente. Ambos possuem um sistema enzimático eficiente capaz de utilizar fontes complexas de carbono (Tabela 3). Os fungos da podridão branca e podridão parda se diferenciam pelo fato do primeiro produzir degradação seletiva da lignina na parede celular, deixando a celulose praticamente intacta, enquanto que o segundo produz uma quebra extensiva dos polissacarídeos da madeira (p.ex., celulose e hemicelulose) agindo muito pouco sobre a lignina (MATHEUS & OKINO, 1998; MATHEUS, 2003).

Existem mais de 1.500 espécies diferentes de fungos podridão branca, onde seus representantes possuem inerentes potencialidades de aplicação biotecnológica (BENNET *et al.*, 2002) por serem os únicos aparentemente capazes de degradar a lignina, o que torna o estudo desses organismos uma importante alternativa para bioconversão de resíduos lignocelulósicos e de grande aplicação nos processos de biodegradação de compostos xenobióticos, como, por exemplo, na biorremediação de solos contaminados e no tratamento de efluentes da indústria química, de papelaria, têxtil, de petróleo, agrícola, como também de resíduos sanitários e domésticos (POINTING, 2001; CAJTHAML *et al.*, 2006). O mecanismo de

descoloração de corantes poliméricos por fungos podridão branca envolve as enzimas lignina peroxidase (LiPs), as manganês peroxidases (MnPs) e lacases. Entretanto, estes fungos diferem na habilidade e capacidade de degradar corantes com base nas diferenças qualitativas e quantitativas dessas enzimas (VYAS & MOLITORIS, 1995).

Os fungos podridão branca isolados de ecossistemas brasileiros têm sido analisados para a degradação de muitas moléculas xenobióticas, como corantes têxteis e organoclorados. Algumas linhagens de fungos envolvidas na degradação destas moléculas pertencem às espécies: *Hygrocybe* sp., *Lentinus crinitus*, *Peniophora cinerea*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phellinus gilvus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus ostreatus*, *Psilocybe castanella*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes villosa* e *Trametes versicolor* (GUGLIOTTA, 2001; MATHEUS, 2003)

Tabela 3

Reações de degradação de madeira por fungos e espécies enzimáticas envolvidas

Tipo de Fungo	Degradação	
	Celulose	Lignina
Podridão Branca	Hidrolíticas (Endo e exoglucanases) Oxidativa (Celobiose) Oxiredutases (Celobiose-quinona oxiredutase)	Fenol oxidases Lacase, Liginina Peroxidase (LiPs), manganês Peroxidase (MnPs)
Podridão Parda	Despolimerizacão oxidativa (Radicais livres de oxigênio, Metaloproteínas) Hidrolíticas (Endoglucanases)	Desmetoxilação desconhecido

Fonte: Modificado de Alexopoulos *et al.* (1996).

2.6 Estrutura da madeira

A madeira é constituída principalmente por celulose (40 a 50%), hemicelulose (15 a 30%) e lignina (10 a 30%). Estes polímeros constituem a parede celular da madeira e são responsáveis pelo comportamento da maioria de suas propriedades tecnológicas. A parede celular vegetal é, por sua vez, composta de uma parede celular primária e uma parede celular secundária (Figura 3) (CASTRO E SILVA, 1996).

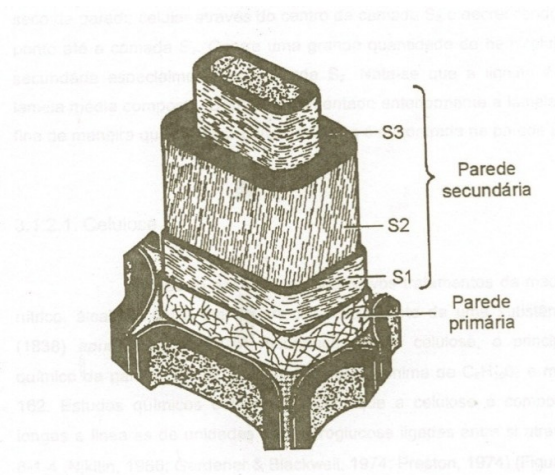


Figura 3: Esquema tridimensional de uma parede celular vegetal.
Fonte: Adaptado de Côté (1967).

2.6.1 Estrutura da parede celular (KLOCK et al, 2005).

Na **Parede Primária (P)** as fibrilas de celulose são arranjadas em delgadas camadas que se cruzam formando um aspecto de redes. A parede primária é a primeira camada depositada durante o desenvolvimento da célula, este sistema permite uma expansão (crescimento) da célula jovem. Por consequência, a orientação das fibrilas na camada mais externa é mais oblíqua. Ressalta-se que a

quantidade de celulose na parede primária é muito limitada, contém também polioses (hemiceluloses), pectina e proteínas imersos numa matrix de lignina; sua espessura varia de 0,1 a 0,2 μm

A **Parede Secundária** é a camada espessante da célula, depositada sobre a parede primária após seu crescimento superficial ter-se completado. Consiste de três camadas: externa - S1; média - S2 e interna - S3.

O espessamento da parede secundária é considerável, podendo variar de 1 a 10 μm . A porcentagem de celulose podendo chegar a 90% ou mais, resultando num arranjo denso e paralelo dependendo das fibrilas.

Na **camada S1**, com espessura de 0,2 a 0,3 μm , as fibrilas de celulose se apresentam em orientação helicoidal suave. Existem várias subcamadas extremamente finas que se sobrepõe. Sendo as lamelas muito finas, o arranjo helicoidal (espiral) das fibrilas pode ser visível como um arranjo cruzado em certas espécies. O ângulo formado entre as fibrilas em relação ao eixo da célula considerada pode variar entre 50 e 70°. É mais lignificada, assemelhando-se neste sentido mais à parede primária, sendo também mais resistente ao ataque de fungos que a S2.

A **camada S2** é a mais espessa da parede celular, forma a porção principal da célula, com espessamento variando de 1 a 9 μm . Nesta camada as fibrilas estão dispostas num ângulo praticamente reto em relação ao eixo da célula, podendo variar entre 10 e 30°, diminuindo com o aumento do comprimento da célula.

A variação do ângulo formado pelas fibrilas de celulose em relação ao eixo axial das células é o resultado de um número de influências internas e externas, as quais são difíceis de identificar. Porém de maneira geral as variações existem dentro de um anel de crescimento onde o ângulo decresce do início do lenho inicial ao fim do lenho tardio, no sentido radial. Em anéis anuais sucessivos o ângulo decresce continuamente da medula para a casca, até um estado em que permanece constante, ou apenas sujeito a pequenas mudanças.

A **camada interna S3**, considerada recentemente por alguns autores como parede terciária, por apresentar-se diferente das camadas S3 de células parenquimáticas (também fibras de monocotiledoneas, como bambus, que podem ter ainda quatro ou mais camadas). Nesta camada, as fibrilas de celulose são arranjadas numa inclinação suave, porém não numa forma estritamente paralela. Possui uma concentração maior de substâncias não estruturais, o que confere a superfície do lume uma aparência mais ou menos lisa.

Finalmente, os traqueóides de coníferas e as fibras libríformes de folhosas mais primitivas apresentam quase sempre uma camada ou zona verrugosa (warts), que é uma membrana delgada e amorfa, localizada na superfície interna da camada S3 ou parede terciária. É constituída de material semelhante a lignina em conjunto com pequenas quantidades de hidratos de carbono e substâncias pécticas.

Em conjunto, o sistema de arranjo e disposição das fibrilas de celulose, em combinação com as substâncias solidificantes não estruturais conferem às células

da madeira uma sólida, mas não inflexível constituição, a qual resiste a uma grande gama de forças que nela atuam.

Devido a pequena inclinação das fibrilas a S2 é provida de resistência à tração, enquanto que a S1, na qual as fibrilas bem inclinadas conferem resistência à compressão, ambas ao longo do eixo da célula.

2.6.2 Composição química da madeira (KLOCK et al, 2005)

Do ponto de vista da análise dos componentes da madeira, uma distinção precisa ser feita entre os principais componentes macromoleculares constituintes da parede celular: Celulose; hemiceluloses e lignina

2.6.2.1 Celulose

É o componente majoritário, perfazendo aproximadamente a metade das madeiras. Pode ser caracterizada como um polissacarídeo que se apresenta como polímero linear de alto peso molecular, constituído exclusivamente de β -D-glucose. Estritamente a celulose é composta por unidades monoméricas de celobiose, qual é formada pela junção de 2 moléculas de glicose seguido da eliminação de água através das hidroxilas ligadas aos carbonos 1 e 4. Este dímero se repete constantemente, apresentando o oxigênio que liga os anéis, na posição equatorial (Figura 4) (FENGER & WEGENER, 1984). Devido a suas propriedades químicas e físicas, bem como à sua estrutura supra molecular, preenche sua função como o principal componente da parede celular dos vegetais.

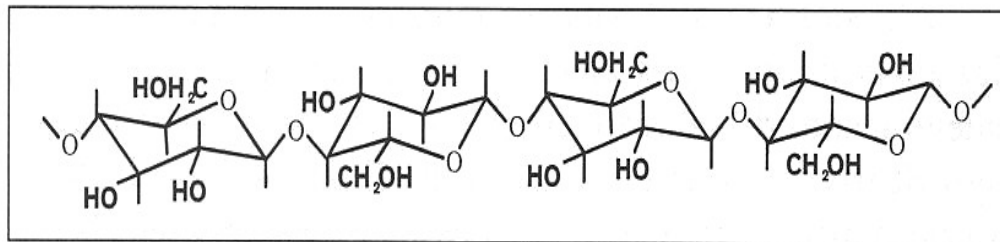


Figura 4: Fórmula estereoquímica de um fragmento de celulose (FENGEL,1984).

O estudo da química da celulose iniciou em 1838 com Payen, que mostrou por análise elementar que o tecido de plantas contém um componente majoritário com 44,4% de carbono; 6,2% de hidrogênio e 49,3% de oxigênio, o que é equivalente a uma fórmula empírica de $C_6H_{10}O_5$ e um peso molecular de 162. Desde que, a análise do peso molecular da celulose indicava pesos muito maiores que 162, era evidente que a celulose era, ou um alto polímero (molécula constituída por um grande número de unidades repetidas relativamente simples conectadas por ligações químicas), ou um agregado de moléculas simples unidas por forças de associação secundárias. Evidências conseguidas após 1930 provaram que a celulose é um polímero composto por um grande número de unidades repetidas. Posteriormente foi provado que estas unidades derivam-se da condensação da D-glucose, (um açúcar simples - monossacarídeo hexose $C_6H_{12}O_6$) (KLOCK et al, 2005).

2.6.2.2 Hemiceluloses

Estão em estreita associação com a celulose na parede celular. Cinco açúcares neutros, as hexoses: glucoses, manose e galactose; e as pentoses: xilose e arabinose são os principais constituintes das hemiceluloses. Possuem cadeia

ramificada e de baixa massa molecular. A ligação glicosídica mais freqüente nas hemiceluloses é a ligação do tipo β (1 \rightarrow 4), porém ligações do tipo β (1 \rightarrow 3) e a (1 \rightarrow 4), também podem ser encontradas (CHUA et al., 1982, 1983). Algumas hemiceluloses contém adicionalmente ácidos urônicos. As cadeias moleculares são muito mais curtas que a de celulose, podendo existir grupos laterais e ramificações em alguns casos.

2.6.2.3 Lignina

A lignina foi originalmente descoberta por Anselme Payen em 1838 após tratamento da madeira com ácido sulfúrico concentrado. O nome lignina vem do latim "lignum" que significa madeira. Em 1897, Peter Klason estudou a composição de lignosulfonatos, provenientes da polpação sulfito da madeira, e lançou a idéia de que a lignina é quimicamente relacionada com o álcool coniferílico. Em 1907, ele propôs que a lignina era uma substância macromolecular, e 10 anos mais tarde, que as unidades de álcool coniferílico eram unidos por ligação éter.

Do ponto de vista morfológico a lignina é uma substância amorfa localizada na lamela média composta, bem como na parede secundária. Durante o desenvolvimento das células, a lignina é incorporada como o último componente na parede, interpenetrando as fibrilas e assim fortalecendo, enrijecendo as paredes celulares.

É a terceira substância macromolecular componente da madeira. As moléculas de lignina são formadas completamente diferente dos polissacarídeos,

pois são constituídas por um sistema aromático composto de unidades de fenilpropano (KLOCK et al, 2005). É uma substância cuja molécula é extremamente complexa, polimérica, heterogênea, formada a partir de três tipos diferentes de unidades monoméricas, derivadas de 4-hidroxiarilpropenil álcoois, sendo eles; álcool trans-para-cumário, álcool trans-sinapílico e álcool trans-coniferílico. Na molécula de lignina, tais unidades são distribuídas ao acaso e ligadas covalentemente por pelo menos dez tipos de ligações químicas diferentes. Os grupamentos funcionais que, portanto, definem as características estruturais e químicas de lignina são os grupos hidroxílicos de álcoois primários e secundários, hidroxílicos de fenóis, esterificados e livres, grupos carbonílicos de diferentes tipos, metoxilas ligadas à anéis aromáticos e insaturações (FENGEL, 1989).

2.7 Decomposição da liteira

Liteira é a camada de detritos orgânicos, principalmente de origem vegetal, produzidos pela própria floresta, como folhas, galhos, gravetos, flores, sementes, cascas e outros tecidos em decomposição junto ao solo (LUIZÃO, 2007).

Após a deposição do material decíduo, o seu acúmulo na superfície do solo será regulado pela sua taxa de decomposição (HAAG, 1987). O mecanismo de decomposição é regulado sobretudo por três grupos de variáveis: a) a natureza da comunidade decompositora (os macro e microrganismos), b) as características do material orgânico que determina sua degradabilidade (a qualidade do material) e c) as condições do ambiente (ABER & MELILO, 1978).

2.8 Degradação de atrazina por fungos

Atrazina (6-cloro-N-etil-N¹-(1-metiletil) -1,3,5-triazina – 2,4-diamina) é um membro importante da família dos herbicidas s-triazinas, usado para controlar ervas daninhas de folhas largas. É considerada moderadamente persistente nos solos, e registros sobre sua meia-vida reportam que esta varia de 4 a 47 semanas (MANDELBAUM et al., 1993).

Os herbicidas triazínicos vem sendo empregados na agricultura para o controle de ervas daninhas, devido a capacidade destes compostos orgânicos em inibir a fotossíntese. Dentre eles destacam-se a atrazina, simazina, propazina e ametratrazina em uso há mais de 30 anos, representa 12% (mais de 40 000 toneladas/ano) de todos os pesticidas empregados nos Estados Unidos em culturas de milho, sorgo, cana e abacaxi como também é largamente empregada nos Estados centrais e moderadamente em Estados do leste. O Brasil com as culturas da cana e milho liderança, emprega também elevadas quantidades de herbicidas triazínicos. Das 150000 toneladas/ano dos pesticidas consumidos, cerca de 33%, são herbicidas; somente cultura de cana de açúcar, vem consumindo acima de 20 000 toneladas, que representa em torno de 13% do total de pesticidas (UETA, 1999).

A atrazina é um contaminante potencial da água em virtude de suas características: alto potencial de escoamento, elevada persistência em solos, hidrólise lenta, baixa pressão de vapor, solubilidade baixa para moderada em água, absorção moderada à matéria orgânica e argila. De fato, a presença de atrazina em

águas subterrâneas americanas é cerca de 10 a 20 vezes mais frequente do que o contaminante (HALLBERG, 1989). No Canadá, os estudos constataram a presença de atrazina em poços, sendo que alguns apresentam índices da ordem de 10 ug/L de atrazina e um produto de degradação, também fitotóxico (BELLUCK et al,1991).

O uso intensivo de atrazina e sua relativa persistência associada a sua mobilidade tornam-na um poluente potencial de água subterrâneas e superficiais. Devido ao alto grau de contaminação em todo o mundo por herbicidas s-triazinas, alguns laboratórios tem dedicado-se a estudo sobre o seu destino e biodegradação. A quantificação da degradação desses compostos no ambiente é importante para melhor entender os processos envolvidos em seu destino e sua avaliação ecotoxicológica, no sentido de propor praticas de manejo que evitam seus efeitos indesejáveis.

O processo de mineralização de um pesticida significa sua completa degradação a moléculas inorgânicas como CO₂, CO, H₂O, NH₃, H₂S, Cl⁻ e outras, sendo essa a única maneira de eliminar um composto xenobiótico do ambiente (MANDELBAUM et al., 1993).

Os microrganismos utilizam, certos pesticidas como fonte de carbono e várias espécies de bactérias têm sido descritas como capazes de degradar parcialmente a atrazina, através da hidroxilação ou N-dealquilação. Muitas dessas espécies são capazes de mineralizar a atrazina através da clivagem do anel (MANDELBAUM et al., 1993; MANDELBAUM et al., 1995; ALVEY & CROWLEY, 1996).

Entretanto, há poucos relatos de estudos sobre culturas puras, capazes de metabolizar atrazina. Espécies de *Nocardia* e *Pseudomonas*, isoladas em solos contaminados com atrazina, utilizam a cadeia lateral da molécula como única fonte de carbono e energia. Mandelbaum et al., (1995) reportam bactérias de gênero *Pseudomonas*, capazes de mineralizar atrazina, utilizando-a como fonte de nitrogênio, tendo o citrato de sódio como fonte de carbono.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Macromicetos

Serão utilizadas amostras de carpóforos de fungos basidiomicetos, obtidas do material micológico depositado no laboratório de Biotecnologia da Escola Superior de Ciências da Saúde (ESA) da Universidade Estadual do Amazonas (UEA).

3.1.1 Isolamento

Utilizando-se um estilete (bisturi), foi retirado de cada carpóforo cerca de 3mm de uma de suas extremidades. A amostra do fungo foi submetida à assepsia, que constou das seguintes etapas:

- ❖ A amostra foi Mergulhada por 1 ou 2 minutos em álcool 70%;
- ❖ Mergulhada por 1 ou 2 minutos, em hipoclorito de sódio a 3%;
- ❖ Deixada imerso por 1 ou 2 minutos em água destilada;
- ❖ Colocada sobre papel filtro para absorver o líquido e secar amostra;
- ❖ Inoculada em placas com meio de cultura já esterilizados a 121°C por 15 minutos.

As placas de Petri com o inóculo foram identificadas e incubadas à uma temperatura de 28°C até total preenchimento da placa. Após esse procedimento foi retirado da borda dessa placa 3mm de diâmetro do micélio, colocados em placa de Petri com meio de cultura a 28°C, após o crescimento as culturas foram armazenadas em refrigerador a temperatura de 3.5°C.

3.1.2 Meios de Cultura utilizados

Tabela 4

Composição do Meio de Cultura de Batata

Composição	Concentração (g/L)	
	Meio líquido	Meio sólido
BDA	-	39
Ágar puro	3	-
Água destilada	1000mL	1000mL
Batata dextrose	200	-

Tabela 5

Composição do meio de Cultura de Extrato de Malte

Composição	Concentração (g/L)	
	Meio líquido	Meio sólido
Extrato de Malte	20	20
Ágar puro	15	-
Água destilada	1000mL	1000mL
Bagaço de cana-de-açúcar	15	-

Tabela 6

Composição do meio de Jerimum

Composição	Concentração (g/L)	
	Meio líquido	Meio sólido
Jerimum	20	20
Ágar puro	15	-
Água destilada	1000mL	1000mL
Glicose	20	20

3.1.3 Tampão

3.1.3.1 Tampão citrato-fosfato

- ❖ Solução A: 0,1 M ácido cítrico
- ❖ Solução B: 0,2 M de fosfato de sódio bibásico

Para 100mL foram misturadas 48,6 mL da solução A e 51,4 mL da solução B. O volume foi completado para 100mL.

3.2 Fisiologia dos fungos

Com cada linhagem de fungos foram realizadas repicagens para determinação do pH, temperatura e meio de cultura ótimos para o crescimento dos fungos. Para maior segurança na obtenção de resultados, como se trata de material fúngico e pode ocorrer fácil contaminação, a repicagem foi realizada utilizando-se triplicatas.

Para o estudo sobre a influência da temperatura, meio de cultura e pH no crescimento micelial, foi retirado da periferia da cultura pura cerca de 5mm do micélio dos fungos testados os quais foram inoculados em placas de Petri, contendo os meios diferentes de ágar extrato de malte, batata ágar dextrose e jerimum. Estas culturas foram testadas em temperatura de 28° e 30°C nos pHs (4,5; 5,5 e 6,5). O crescimento foi mensurado através da progressão linear da fronteira micelial, sendo as medidas tomadas em duas direções a cada 24 horas, até que completasse a placa de Petri. A mensuração do raio dessa colônia permite avaliar o crescimento

micelial, o qual se produz por alongamento das células e ramificação das hifas que crescem sobre o meio que será colonizado.

3.3 Massa micelial

Foram inoculados três discos de 9 mm de diâmetro do micélio inoculados em frascos de 250 mL contendo 100 mL de meio Agar malte. Amostras de 100 mL do meio de cultivo em triplicata foram coletadas no 4º, 8º, 12º e 16º dias para observação do período de maior produção de massa micelial que constou dos seguintes passos:

- ❖ Secar em estufa a 40-45⁰C o papel filtro até massa constante;
- ❖ Filtrar 100 mL do meio de crescimento;
- ❖ Lavar com 100 mL de água destilada;
- ❖ Secar em estufa a 40-45⁰C o papel filtro com o micélio até massa constante;
- ❖ Calcular a massa micelial ($\% = \frac{Pf-Pi}{Pi} \times 100$).

3.4 Degradação de atrazina por fungos

Os fungos estudados foram isolados em meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA), suplementado com herbicida atrazina como fonte de carbono nas concentrações 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0% e 2,0% à 28⁰C e avaliados quanto ao seu crescimento diário em placas de petri.

3.5 Análise da atividade enzimática oxidativa

3.5.1 Atividade enzimática fenoloxidase

A presença de fenoloxidase foi observada através da adição de orto-dianisidina 1,0 mM em etanol: água (70:30) sobre as placas cultivadas. O desenvolvimento de coloração avermelhada é observada após 12h segundo metodologia proposta por (ANDER e ERIKSSON, 1976).

3.5.1.1 Produção de ligninase em meio líquido

Para obtenção da atividade ligninase foram inoculados dois discos de 9 mm de diâmetro do micélio em frascos de 250 mL contendo 200 mL de meio extrato de malte com bagaço-de-cana (15g/L) e Tween em diferentes concentrações (1,0g/L, 1,5g/L e 2,0g/L). Os frascos foram incubados a 28^oC sob condição estacionária. Alíquotas foram coletadas no 5^o, 10^o, 12^o, 14^o, 16^o dia e utilizadas também para determinar a produção das enzimas Lacase, Fenoloxidase total e Peroxidase.

3.5.1.1.1 Lacase – Lac

A atividade de lacase foi determinada conforme metodologia proposta por SZKLARZ et al., 1989 –modificado, utilizando-se siringaldazina 0,1% em etanol como substrato. A mistura de reação foi constituída por 1,0 mL de caldo enzimático, 0,6 mL de tampão citrato-fosfato (pH 5,0), 0,2 mL de água deionizada e 0,2 mL de siringaldazina (1,0mM) preparada em etanol (0,1%). A oxidação da siringaldazina até sua forma de quinona foi determinada através da leitura da absorbância em

espectrofotômetro a 525nm. O branco deverá conter todos os reagentes exceto o caldo filtrado que deverá ser trocado por água.

3.5.1.1.2 Fenoloxidase total

A atividade de fenoloxidase Total foi determinada conforme proposta por SZKLARZ et al., 1989 – modificado, utilizando-se siringaldazina 0,1% em etanol como substrato. A mistura de reação foi constituída por 1,0 mL de caldo enzimático, 0,6 mL de tampão citrato-fosfato (pH 5,0), 0,2 mL de peróxido de hidrogênio e 0,2 mL de siringaldazina (1,0mM) preparada em etanol (0,1%). A oxidação da siringaldazina até sua forma de quinona foi determinada através da leitura da absorbância em espectrofotômetro a 525nm. O branco deverá conter todos os reagentes exceto o caldo filtrado que deverá ser trocado por água.

3.5.1.1.2 Peroxidase

Para a determinação de peroxidase subtraiu-se a atividade da fenoloxidase total da atividade de lacase. (SZKLARZ et al.1989).

3.6 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados será utilizada o software STATISTICA 5.0, onde se obteve os parâmetros descritivos (média, desvio padrão e variância) dos dados, teste de correlação entre as variáveis, e o teste ANOVA e de Tukey para contrastes das médias.

4. RESULTADOS

4.1.1 Crescimento em diferentes Meios de Cultura, pH e temperatura

Em termos absolutos o maior valor médio para o crescimento micelial ocorreu para o fungo *Pleorotus* sp (F-31) (1,59cm) em pH 5,5 a 30⁰C e em meio BDA e o menor para *Hexagonia glabra* (0,62) em pH 6,5 na mesma temperatura e mesmo meio nutricional (Tabela 6).

Para a temperatura de 28⁰C, nota-se que, similarmente como ocorreu para o fungo *Pleorotus* sp (F-31) o maior valor médio de crescimento para *Lentinus crinitus* também ocorreu em pH5,5, enquanto que para *Hexagonia glabra* ocorreu em pH 4,5 e meio malte. Por outro lado, na temperatura de 30⁰C o maior valor médio de crescimento tanto para *L. crinitus* como para *H. glabra* ocorreu em pH6,5 em meio de cultura de jerimum, enquanto que para *Pleorotus* (F-31) ocorreu em pH5,5 em meio BDA.

Teste ANOVA mostrou que para *Lentinus crinitus*, nas condições de pH 4,5 e 28⁰C não existe diferença estatística significativa ao nível de 95% de probabilidade, no crescimento em diferentes meios nutricionais. Entretanto, para o fungo *Pleorotus* sp (F-31) ocorre diferença significativa no mesmo nível de probabilidade em relação ao meio de malte, enquanto que para *H. glabra* a diferença ocorre para o crescimento e em meio jerimum (Tabela 7). Em outras palavras *Pleorotus* sp (F-31) apresentou menor crescimento no meio malte, enquanto que não houve diferença estatística no crescimento nos meios BDA e jerimum, porém na temperatura de 30⁰

houve diferença significativa ao nível de 95% de probabilidade ($p < 0,05$) em meio nutricional de malte tanto para *Pleurotus* como para *H. glabra*.

Para o pH 5,5 *Lentinus crinitus* houve diferença significativa no crescimento somente em temperatura de 30°C e meio de cultura de malte. Para *Pleurotus* sp (F-31) e *H. glabra* neste pH a temperaturas e meios de cultura não exerceram nenhuma influencia no sentido de aumentar ou diminuir a produção micelial.

No pH 6,5 o fungo *L. crinitus* mostrou melhor crescimento em meio BDA para ambas as temperaturas de 28 e 30°C testadas.

Tabela 7

Crescimento dos fungos (cm) em diferentes meios de cultura.

MEIO	<i>Pleorotus</i> (F-31)			<i>Lentinus Crinitus</i>			<i>Hexagonia glabra</i>		
	pH	T°	X	pH	T°	X	pH	T°	X
BDA	4,5	28°	1,26^(a) (0,34)	4,5	28°	0,84^(a) (0,25)	4,5	28°	0,83^(a) (0,16)
MALT			0,88^(b) (0,28)			0,76^(a) (0,14)			0,97^(a) (0,1)
JER			1,29^(a) (0,29)			0,85^(a) (0,3)			0,74^(b) (0,07)
BDA	4,5	30°	1,28^(a) (0,36)	4,5	30°	0,88^(a) (0,25)	4,5	30°	0,82^(a) (0,16)
MALT			0,92^(b) (0,31)			0,73^(a) (0,17)			0,94^(b) (0,18)
JER			1,27^(a) (0,27)			0,81^(a) (0,41)			0,8^(a) (0,07)
BDA	5,5	28°	1,55^(a) (0,56)	5,5	28°	0,97^(a) (1,31)	5,5	28°	0,73^(a) (0,23)
MALT			1,55^(a) (0,56)			0,95^(a) (0,24)			0,84^(a) (0,21)
JER			1,42^(a) (0,37)			0,77^(a) (0,36)			0,85^(a) (0,39)
BDA	5,5	30°	1,59^(a) (0,8)	5,5	30°	0,82^(a) (0,31)	5,5	30°	0,75^(a) (0,18)
MALT			1,53^(a) (0,63)			1,05^(b) (0,29)			0,98^(b) (0,19)
JER			1,36^(a) (0,41)			0,83^(a) (0,45)			0,89^(a) (0,5)
BDA	6,5	28°	1,38^(a) (0,21)	6,5	28°	0,68^(b) (0,28)	6,5	28°	0,88^(a) (1,48)
MALT			1,38^(a) (0,79)			0,85^(a) (0,21)			0,85^(a) (1,06)
JER			1,17^(a) (0,26)			0,99^(a) (0,18)			0,93^(a) (0,22)
BDA	6,5	30°	1,43^(a) (0,43)	6,5	30°	0,72^(b) (0,25)	6,5	30°	0,62^(b) (0,21)
MALT			1,48^(a) (0,77)			1,01^(a) (0,21)			0,86^(a) (0,19)
JER			1,34^(a) (0,29)			1,34^(a) (1,13)			1,00^(a) (0,27)

Nota: Números em parênteses significam desvio padrão. Letras iguais na coluna significam que não existe diferença significativa ao nível 95% de probabilidade.

4.1.2 Crescimento micelial diário

O crescimento diário em diferentes meios nutricionais, pH e temperatura mostrou que os fungos testados apresentam comportamento diferentes ora afetado pelo pH e temperatura ora pelo meio nutricional. *Pleorotus* sp (F-31), por exemplo, em pH4,5 atinge crescimento máximo em meio BDA, tanto para a temperatura de 28°C como para 30°C, após 48 horas de inoculação. No meio malte, nas mesmas condições de pH e temperatura de 28°C o crescimento máximo também ocorreu após 48 horas e o preenchimento total da placa de petri ocorreu em 120 horas. Por outro lado, na temperatura de 30°C o crescimento neste meio de cultura mostrou padrão decrescente de crescimento (Figura 5B) com preenchimento total da placa em 96 horas. No meio de jerimum, o pH 4,5 o crescimento máximo ocorreu á temperatura de 30°C também após 48 horas de incubação.

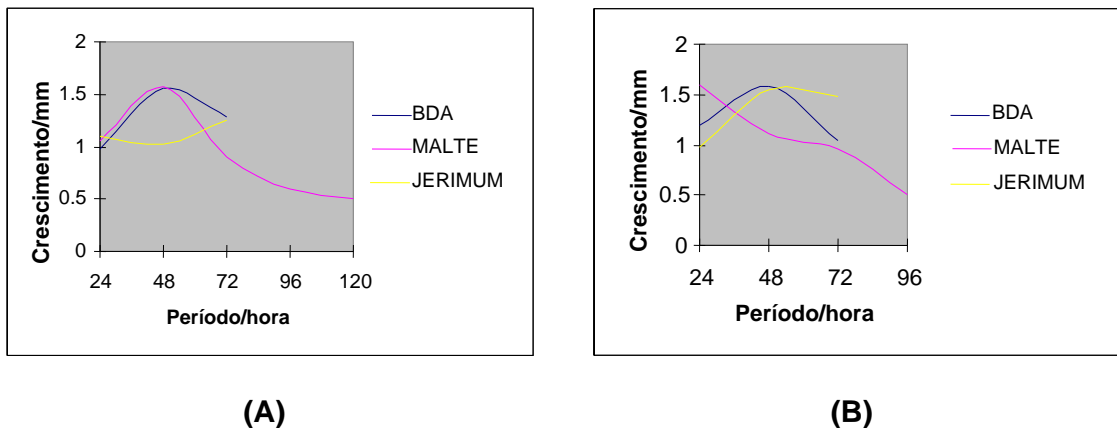


Figura 5: Crescimento Diário de *Pleorotus* sp (F-31) em pH 4,5 e em Diferente Meios de Cultura e Temperatura: A (28°C) E B (30°C).

O padrão de crescimento diário no pH 5,5 e temperatura de 28° (Figura 6A) para *Pleorotus* sp (F-31) alcançou máximo crescimento após 24 horas de incubação no meio de BDA decrescendo até o fim do experimento (96 horas). Na temperatura de 30°C (Figura 6B), o crescimento foi mais lento e pico máximo ocorreu em diferentes períodos. Em meio jerimum o crescimento máximo ocorreu após 72 horas após inoculação, preenchendo a placa em 96 horas. Em meio BDA o crescimento máximo foi 81% menor do que aquele na temperatura de 28°C, alcançado após 96 horas de inoculação, com preenchimento da placa com 120 horas de crescimento. O crescimento em malte foi o mais lento de todos os meios nutricionais testados preenchendo a placa de petri após 144 horas de inoculação.

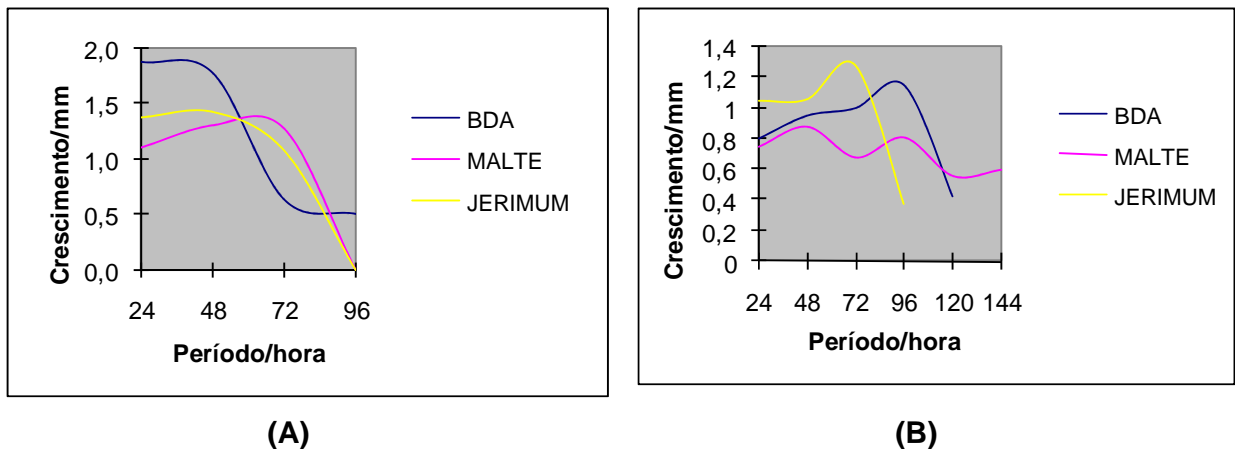


Figura 6: Crescimento Diário de *Pleorotus* sp (F-31) em pH 5,5 E em Diferente Meios de Cultura e Temperatura: A (28°C) E B (30°C).

De todas as condições testadas de pH e temperatura, *Pleorotus* sp (F-31) apresentou, em termos de valores absolutos, o maior avanço da fronteira micelial em pH6,5 e temperatura de 28°C no meio malte, alcançado após 48 horas de inoculação (Figura 7A). A velocidade de crescimento mostrou-se maior destas condições de pH

6,5 e temperaturas de 28° e 30°C (Figura 7B), preenchendo a placa de petri 72 horas após a inoculação.

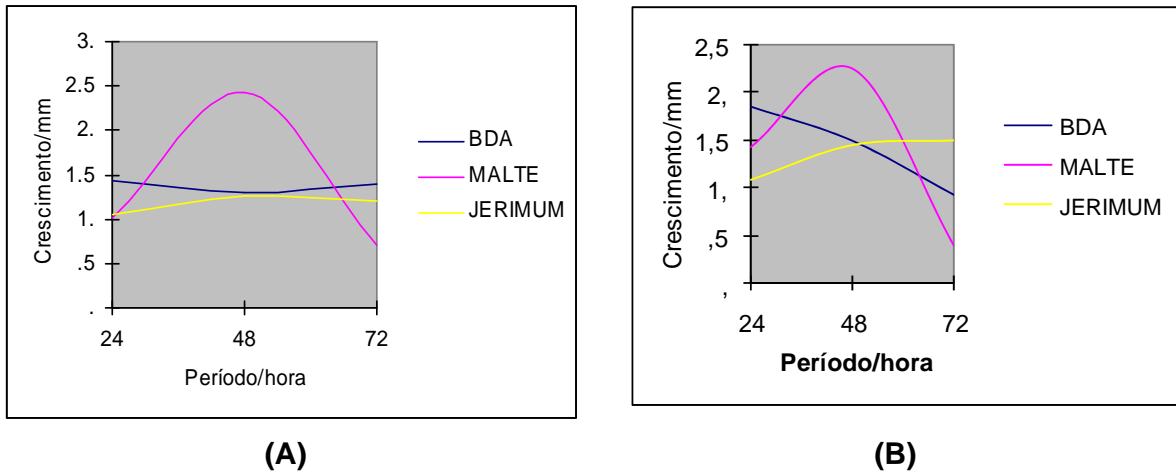


Figura 7: Crescimento Diário de *Pleorotus* sp (F-31) em pH 6,5 e em Diferente Meios de Cultura e Temperatura: A (28°C) E B (30°C).

O meio de jerimum foi onde o fungo *Lentinus crinitus* apresentou o maior pico de crescimento. De modo geral, após 72 horas de inoculação o fungo atinge crescimento máximo em todos os pHs e temperaturas testados, com exceção do pH 5,5 e temperatura de 30°C onde o pico máximo de crescimento ocorreu após 96 horas, decrescendo até o preenchimento total da placa de petri ocorrido 24 horas após ter atingido o crescimento máximo (Figura 8D).

Nos meios malte e BDA o crescimento foi mais lento no pH 4,5 á 30°C com preenchimento da placa somente após 144 horas de crescimento (Figura 8B).

O crescimento inicial, após 24 horas de inoculação no meio jerimum foi maior para pH 4,5 (28°C e 30°C) e pH 6,5 (30°C).

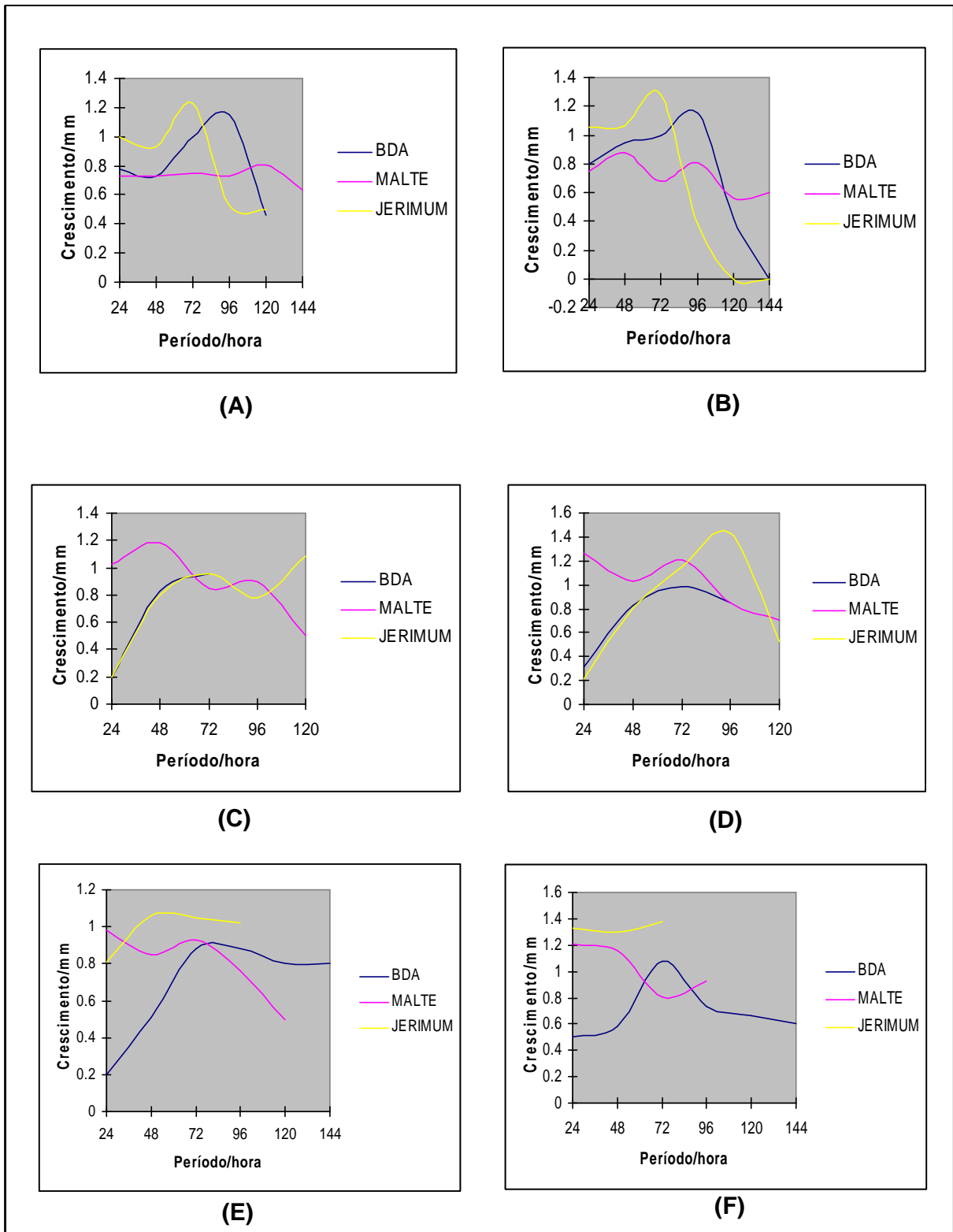
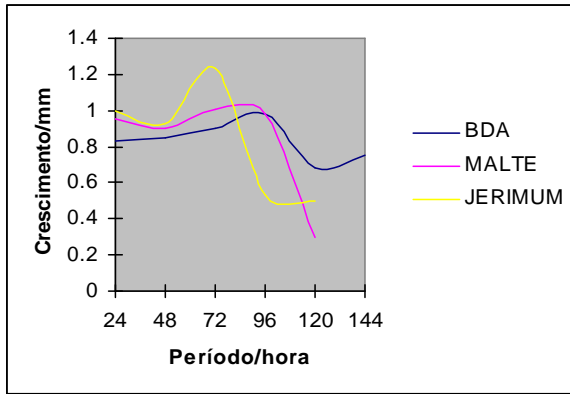


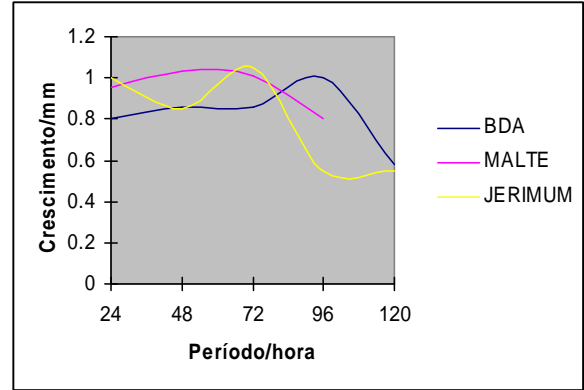
Figura 8: Crescimento Diário de *Lentinus crinitus* em diferentes pH, temperatura e meio de cultura (A) pH 4,5, 28^oC; (B) pH 4,5, 30^oC; (C) pH 5,5, 28^oC; (D) pH 5,5, 30^oC; (E) pH 6,5, 28^oC; (F) pH 6,5, 30^oC.

Hexagonia glabra mostrou maior valor médio absoluto de crescimento após 72 horas de inoculação em meio jerimum, pH 5,5 e 28°C (Figura 9C), preenchendo totalmente a placa de petri após 120 horas, período máximo também para quase todos os meios nutricionais e condições testadas.

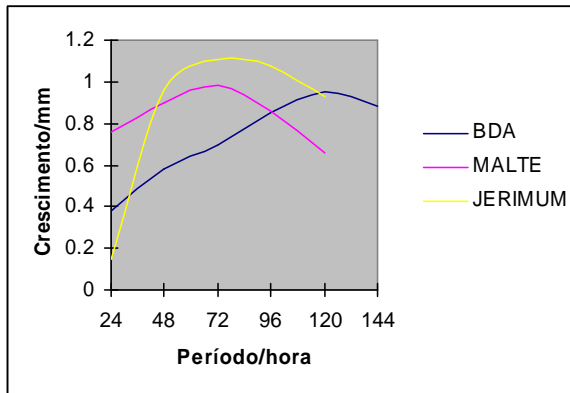
No meio BDA o crescimento mostrou-se mais lento em todos os pHs e temperaturas preenchendo a placa de petri em 144 horas após a inoculação, com exceção do pH 6,5 (Figura 9D e 9E) ambas temperaturas de 28°C e 30°C, onde o diâmetro total da placa de petri foi preenchido após 168 horas de inoculação.



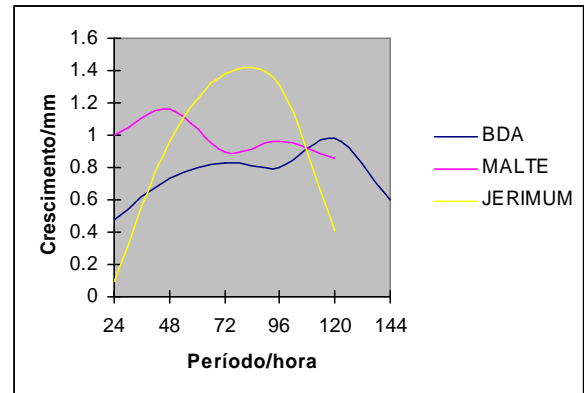
(A)



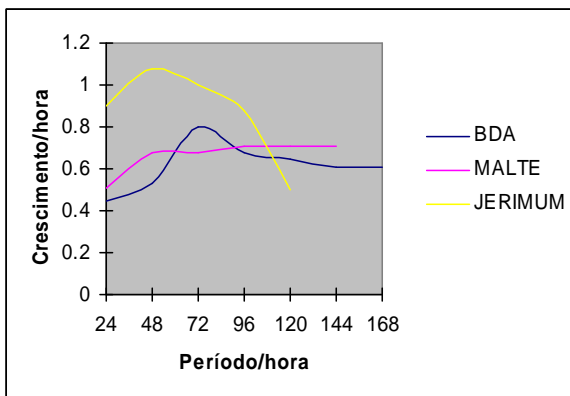
(B)



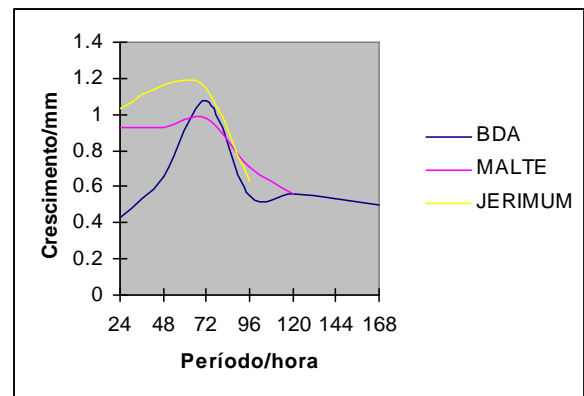
(C)



(D)



(E)



(F)

Figura 9: Crescimento Diário de *Hexagonia glabra* em diferente pH, temperatura e meio de cultura (A) pH 4,5, 28°C; (B) pH 4,5, 30°C; (C) pH 5,5, 28°C; (D) pH 5,5, 30°C; (E) pH 6,5, 28°C; (F) pH 6,5, 30°C.

4.1.3 Produção de Massa micelial

A produção de massa micelial, definida em termos de percentual peso seco de matéria produzida, foi maior em *Hexagonia glabra* (Figura 10).

De modo geral, a produção de massa micelial nesse fungo foi 75% a 87% maior em relação a *Pleorotus* sp (F-31) e *Lentinus crinitus* respectivamente.

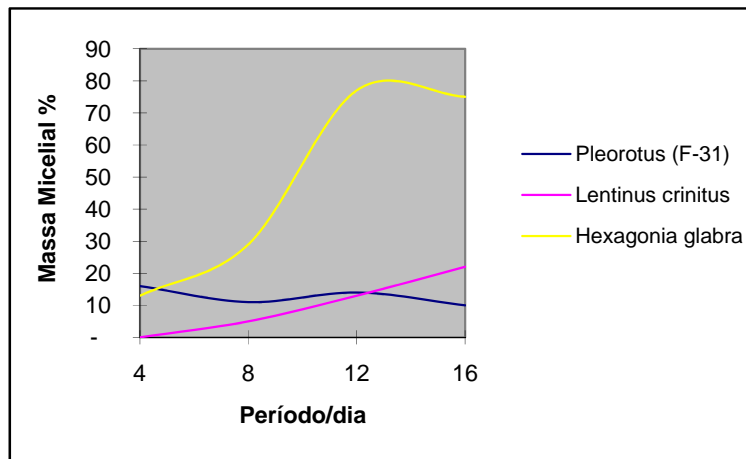


Figura 10: Produção de Massa micelial de *Pleorotus* sp (F-31), *Lentinus crinitus* e *Hexagonia glabra*.

Em valores absolutos médios o fungo *Hexagonia glabra*, foi o que apresentou maior percentual de massa fúngica no período do experimento. O maior percentual de massa micelial para *Pleorotus* sp (F-31) ocorreu no quarto dia (~17%), diminuindo sua atividade à medida que o meio foi se exaurindo de nutrientes. Por outro lado, o fungo *Lentinus crinitus* mostrou comportamento contrário, aumentando a produção micelial até o último dia do experimento.

4.2 Fenoloxidase

Dentre os fungos testados somente *Pleurotus* sp (F-31) não apresentou reação de coloração indicativa de atividade fenoloxidase. Os fungos *Lentinus crinitus* e *Hexagonia glabra* apresentaram coloração inicial azulada (Figura 11) logo após 10 minutos depois de adicionado orto-dianisidina, enquanto, que a coloração avermelhada, indicadora de reação fenoloxidase positiva, foi visualizada após 50 minutos de reação. Em síntese, esses dois fungos apresentam potencial para degradar compostos aromáticos em função da produção de enzimas do grupo das oxidativas.

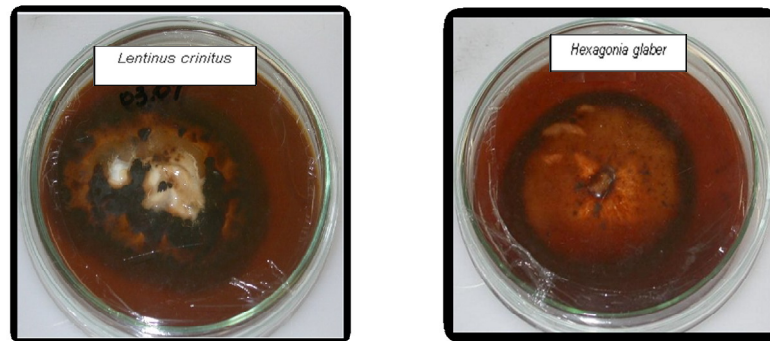


Figura 11: Fungos com reação de coloração indicativa de atividade fenoloxidase

4.3 Atividade Enzimática Oxidativa

4.3.1 Atividade enzimática de *Pleorotus* sp (F-31), *Lentinus crinitus* e *Hexagonia glabra*

A tabela 7 mostra as atividades enzimática em diferentes concentrações de Tween-80 para os fungos testados. *Hexagonia glabra* apresentou maior valor médio para a atividade de lacase e fenoloxidase na concentração $1,5\text{g.L}^{-1}$ de Tween-80. Para peroxidase ocorreu na concentração de $2,0\text{g.L}^{-1}$. Na concentração $1,0\text{g.L}^{-1}$ foi onde ocorreu a menor atividade de lacase para todos os fungos testados. Assim como ocorreu para *H. glabra* a maior atividade de fenoloxidase para *Pleorotus* sp (F-31) aconteceu na concentração de $1,5\text{g.L}^{-1}$ enquanto que para o fungo *Lentinus Crinitus* essa atividade foi maior na concentração de $2,0\text{g.L}^{-1}$ e a menor para ambos na concentração de $1,0\text{g.L}^{-1}$. Para peroxidase tanto para *Pleorotus* sp (F-31) como *Lentinus Crinitus* a maior atividade ocorreu na concentração de $1,0\text{g.L}^{-1}$ e a menor na concentração de $1,5\text{g.L}^{-1}$.

Teste ANOVA para os tratamentos da atividade de lacase e fenoloxidase mostrou que para as concentrações de $1,5$ e $2,0\text{g.L}^{-1}$ não existe diferença significativa ao nível de 95% de probabilidade da atividade fenoloxidase para fungos *Pleorotus* sp (F-31) e *Lentinus crinitus*. Isto é, as diferentes concentrações não exerceram influência na atividade enzimática. No entanto, para *Hexagonia glabra* houve diferença ao nível de 5% de significância entre os tratamentos. Teste de Tukey evidencia que para este fungo a maior atividade enzimática de lacase e

fenoxidase ocorreu na concentração de $1,5\text{g.L}^{-1}$ de Tween-80 conforme comentado anteriormente.

Tabela 8

Influência da concentração de Tween-80 na atividade lignolítica dos fungos.

Tween-80	Pleorotus (F-31)			Lentinus crinitus			Hexagonia glabra		
	LAC	FEN	PER	LAC	FEN	PER	LAC	FEN	PER
$1,0\text{g.L}^{-1}$	1.46^(a) (0.45)	2.21^(a) (0.58)	0.76^(a) (0.53)	2.17^(a) (0.55)	3.41^(a) (0.77)	1.27^(a) (0.81)	1.43^(a) (0.45)	3.42^(a) (3.59)	2.02^(a) (3.72)
$1,5\text{g.L}^{-1}$	2.85^(b) (1.11)	2.68^(a) (0.81)	0.11^(b) (0.15)	3.37^(b) (0.88)	3.35^(a) (0.69)	0.33^(b) (0.34)	31.83^(b) (8.3)	28.7^(b) (9.67)	1.68^(b) (3.57)
$2,0\text{g.L}^{-1}$	2.76^(b) (1.00)	2.68^(a) (1.00)	0.13^(b) (0.35)	3.87^(b) (0.91)	3.45^(a) (0.78)	0.68^(b) (1.29)	30.26^(b) (8.44)	25.51^(b) (8.25)	5.88^(b) (8.23)

Nota: Números em parênteses significam desvio padrão. Letras iguais na coluna significam que não existe diferença significativa ao nível 95% de probabilidade. .

4.3.2 Atividade enzimática diária de *Pleorotus* sp (F-31), *Lentinus crinitus* e *Hexagonia glabra*

Os fungos foram previamente incubados em meio de cultura malte, acrescidos de bagaço de cana de açúcar e Tween-80 em diferentes concentrações, e uma vez incubados, procedeu-se, periodicamente, às medidas de atividade enzimática em pequenas alíquotas, retiradas do meio de incubação por um período de 18 dias.

Para *Pleorotus* sp (F-31) a maior atividade de lacase ocorreu na concentração de $1,5\text{g.L}^{-1}$ no décimo oitavo dia (Figura 12). Nesta concentração a atividade de lacase foi 52,2% maior que a concentração de $1,0\text{g.L}^{-1}$ e 4,87% maior em relação à concentração de $2,0\text{g.L}^{-1}$. Ressalta-se, por outro lado, que após cinco dias de

crescimento a atividade de lacase para este fungo mostrou níveis consideráveis de produção enzimática nas concentrações $1,5\text{g.L}^{-1}$ e $2,0\text{g.L}^{-1}$ de Tween-80. A atividade enzimática na concentração de $1,5\text{ g.L}^{-1}$ foi de apenas 1,21% maior do que na concentração $2,0\text{g.L}^{-1}$ de $2,0\text{g.L}^{-1}$.

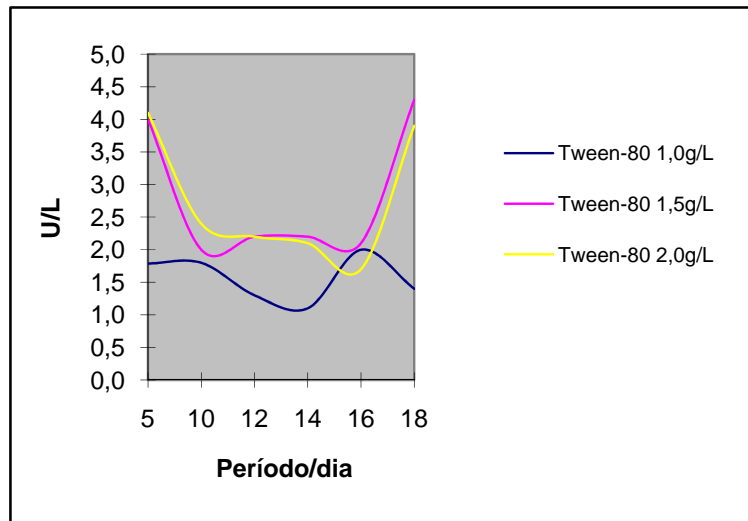


Figura 12: Efeito de Tween-80 em diferentes concentrações na produção de Lacase do Fungo *Pleorotus* (F-31) sob condição estacionária tendo bagaço-de-cana como fonte de carbono

A atividade de fenoloxidase para *Pleorotus* sp (F-31) atingiu seu valor máximo na concentração $2,0\text{g.L}^{-1}$ apresentando-se 2% maior que na concentração $1,5\text{g.L}^{-1}$ e 42,02% maior que na concentração de $1,0\text{g.L}^{-1}$ no décimo oitavo dia de produção (Figura 13). A menor atividade ocorreu na concentração $1,0\text{g.L}^{-1}$. Na concentração de $1,5\text{g.L}^{-1}$ a atividade foi cerca de 28% maior do que na concentração de $1,0\text{g.L}^{-1}$.

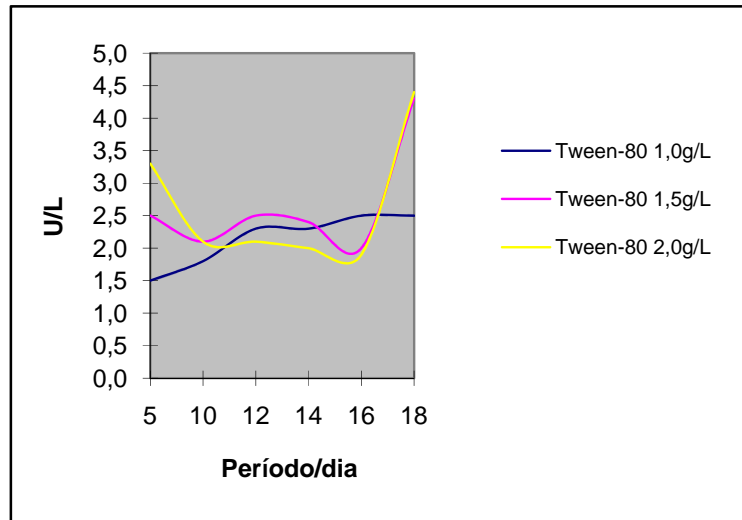


Figura 13: Efeito de Tween-80 em diferentes concentrações na produção de Fenoloxidase do Fungo *Pleorotus* (F-31) sob condição estacionária tendo bagaço-de-cana como fonte de carbono

Diferentemente das outras enzimas, a atividade de peroxidase de *Pleorotus* sp (F-31) foi maior na concentração de $1,0g.L^{-1}$ atingindo seu pico máximo de atividade no décimo quarto dia de crescimento (Figura 14). Em média, atividade de peroxidase na concentração de $1,0g.L^{-1}$ foi 84,2% maior do que nas outras concentrações. Na concentração de $1,5g.L^{-1}$ de Tween-80 a maior atividade de peroxidase para aquele fungo ocorreu no décimo oitavo dia, enquanto que na concentração de $2,0g.L^{-1}$ foi no décimo quarto dia. Reitera-se, entretanto, que em termos absolutos esta atividade é maior na concentração de $1,0g.L^{-1}$ conforme comentado anteriormente. Ressalta-se, que na concentração de $1,5g.L^{-1}$ a atividade de peroxidase somente detectada após dez dias de incubação do fungo.

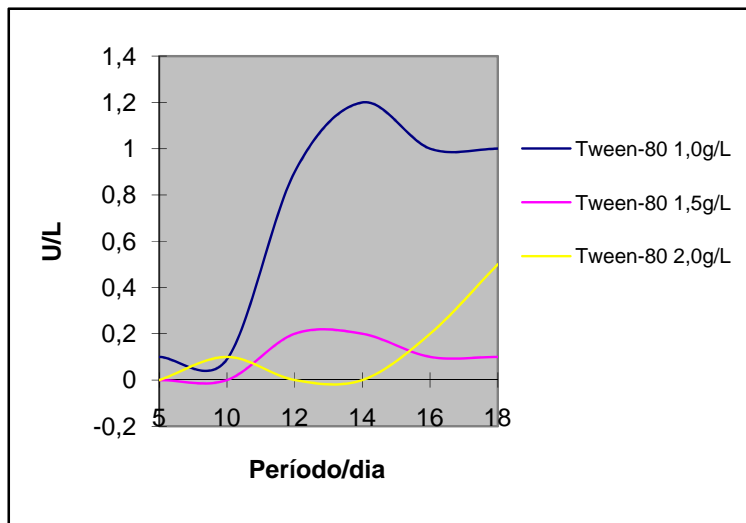


Figura 14: Efeito de Tween-80 em diferentes concentrações na produção de Peroxidase do Fungo *Pleorotus* (F-31) sob condição estacionária tendo bagaço- de- cana como fonte de carbono

Para *Lentinus crinitus* a atividade de lacase mostrou-se decrescente até o décimo sexto dia de crescimento para todas as concentrações testadas (Figura 13). Na concentração de $1,0g.L^{-1}$ de Tween-80 foi onde aconteceu a menor atividade de lacase, e na concentração de $2,0g.L^{-1}$ a maior.

No quinto dia de crescimento a atividade de lacase na concentração de $1,5g.L^{-1}$ de Tween-80 foi 16% maior do que na concentração de $2,0g.L^{-1}$ e 62% em relação à concentração de $1,0g.L^{-1}$. Entretanto, no décimo oitavo dia a maior atividade de lacase ocorreu na concentração de $2,0g.L^{-1}$ de Tween-80.

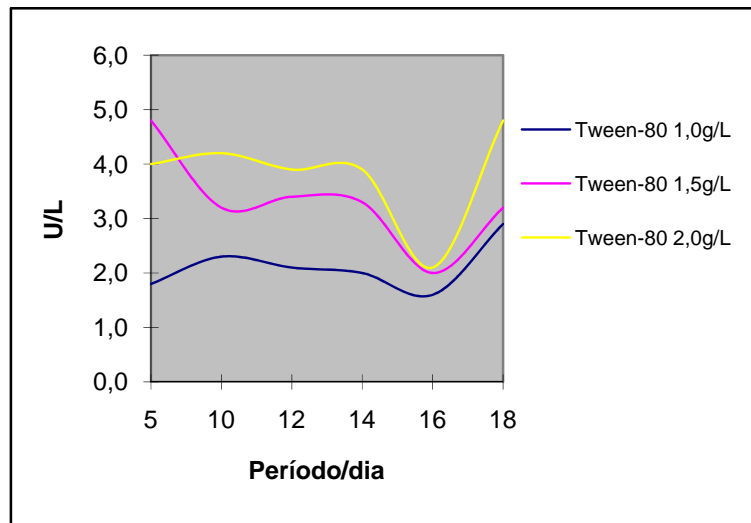


Figura 15: Efeito de Tween-80 em diferentes concentrações na produção de Lacase do Fungo *Lentinus crinitus* sob condição estacionária tendo bagaço-de- cana como fonte de carbono

Similarmente ao comportamento do fungo *Pleorotus* (F-31) a maior atividade inicial de fenoxidase para *Lentinus crinitus* detectadas no quinto dia de crescimento, também ocorreu na concentração de $2,0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Neste caso foi 4,8% maior que na concentração de $1,5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 7,9% maior que na concentração de $1,0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 16). A atividade de lacase para este fungo mostrou-se decrescente até o décimo sexto dia, aumentando a patamar idêntico àquela atividade inicial. Comportamento oposto aconteceu para a concentração de $1,0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ onde a atividade de lacase mostrou-se ligeiramente crescente até o décimo quinto dia, quando a partir deste ponto começou a diminuir.

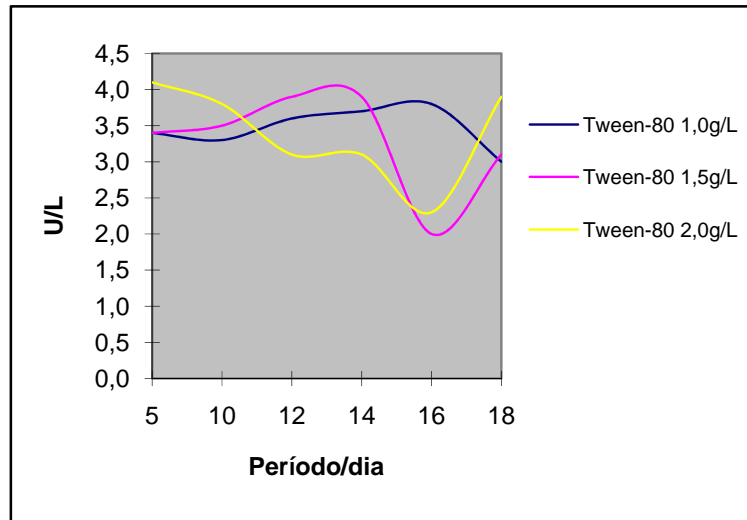


Figura 16: Efeito de Tween-80 em diferentes concentrações na produção de Fenoloxidase do Fungo *Lentinus crinitus* sob condição estacionária tendo bagaço- de- cana como fonte de carbono

A atividade de peroxidase foi crescente até o décimo sexto dia nas concentrações de $1,0g.L^{-1}$ e $1,5g.L^{-1}$ de Tween-80. Interessantemente, na concentração de $2,0g.L^{-1}$ de Tween-80 a atividade de peroxidase só foi detectável no décimo sexto dia, alcançando valor máximo dois dias depois (Figura 17).

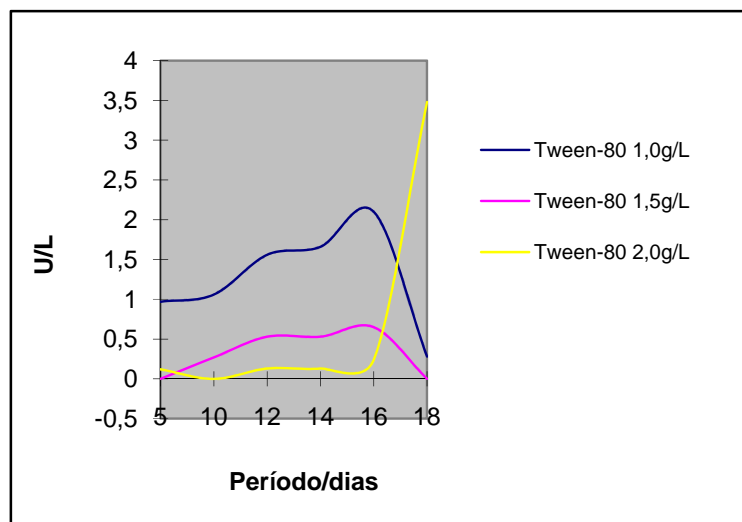


Figura 17: Efeito de Tween-80 em diferentes concentrações na produção de Peroxidase do Fungo *Lentinus crinitus* sob condição estacionária tendo bagaço- de- cana como fonte de carbono.

A atividade de lacase para *Hexagonia glabra* mostrou-se inicialmente maior (15U.L^{-1}) na concentração de $2,0\text{ g.L}^{-1}$ de Tween-80, mostrando um padrão crescente de atividade até o décimo quarto dia de crescimento, quando atinge seu valor máximo de atividade enzimática (Figura 17). Na concentração de $1,5\text{g.L}^{-1}$ de Tween-80 a atividade enzimática de lacase mostra-se crescente até o décimo oitavo dia quando atinge seu maior valor, sendo este 94% e 15,3% maior do que na concentração de $1,0\text{g.L}^{-1}$ e $2,0\text{ g.L}^{-1}$ respectivamente.

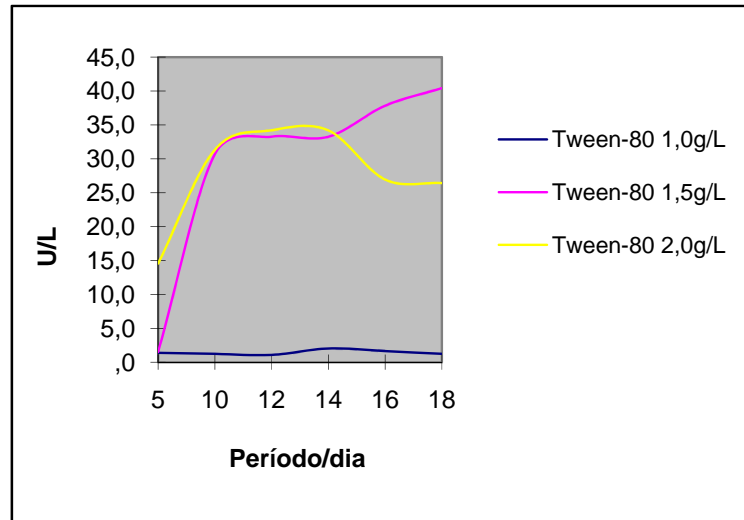


Figura 18: Efeito de Tween-80 em diferentes concentrações na produção de Lacase do Fungo *Hexagonia glabra* sob condição estacionária tendo bagaço-de-cana como fonte de carbono

Diferentemente do que aconteceu com *Pleorotus* (F-31) e *Lentinus crinitus* em que a maior atividade de fenoloxidase ocorreu na concentração $2,0\text{g.L}^{-1}$, para *Hexagonia glabra* a maior atividade enzimática ocorreu na concentração $1,5\text{g.L}^{-1}$ no décimo oitavo dia de crescimento do fungo (figura 19). Nestas condições a atividade fenoloxidase foi 80% e 9,5% maior do que na concentração de $1,0\text{ g.L}^{-1}$ e $2,0\text{ g.L}^{-1}$ de Tween-80, respectivamente.

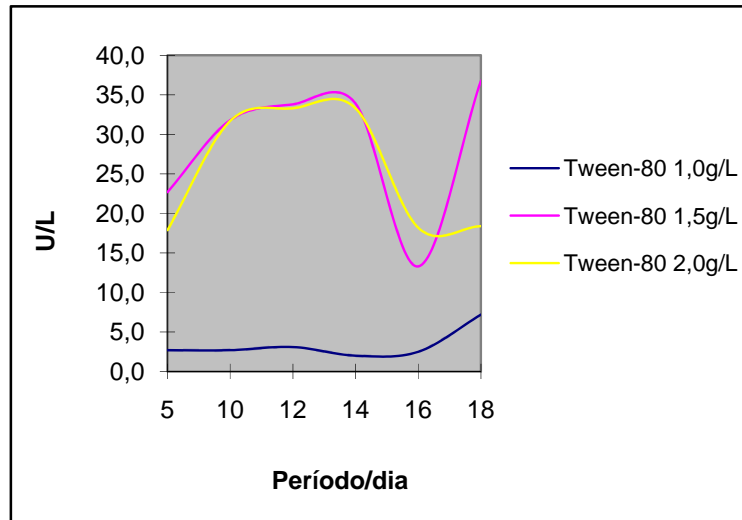


Figura 19: Efeito de Tween-80 em diferentes concentrações na produção de Fenoloxidase do Fungo *Hexagonia glabra* sob condição estacionária tendo bagaço- de- cana como fonte de carbono

Similarmente ao comportamento do fungo *Lentinus crinitus* a maior atividade de peroxidase para *Hexagonia glabra* também ocorreu na concentração de $2,0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, no décimo oitavo dia de crescimento, e diferente de *Pleorotus* sp (F-31) que ocorreu na concentração de $1,0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. A atividade máxima de peroxidase do fungo *H. glabra* na concentração de $2,0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ foi 72% maior que na concentração $1,0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 67% maior que na concentração $1,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Tween-80.

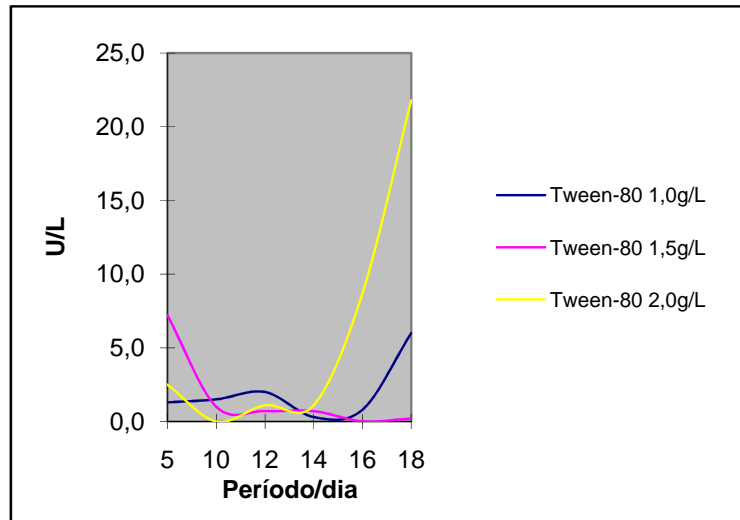


Figura 20: Efeito de Tween-80 em diferentes concentrações na produção de Peroxidase do Fungo *Hexagonia glabra* sob condição estacionária tendo bagaço- de- cana como fonte de carbono

4.3.3 Variação do pH durante crescimento

Na tentativa de se verificar a ocorrência de mudança no pH durante o processo de fermentação, o mesmo foi medido a cada dois dias de crescimento fúngico. De modo geral, não ocorreu variação no pH médio para as concentrações de Tween-80 testadas (Tabela 9). Entretanto, verificou-se um pequeno aumento o valor do pH no terceiro até o quarto dia de incubação para todos os fungos e concentrações de Tween testadas, com exceção para *Lentinus crinitus* que na concentração de 1g.L^{-1} apresentou decréscimo de pH no quarto dia (Figura 21B). *Pleorotus* sp (F-31) foi o que apresentou a menor variação de pH, enquanto que *Lentinus crinitus* a maior. Apesar da variação de pH (3,4 à 4,2) que ocorreu no meio, todos os valores, entretanto, ficaram na faixa de acidez.

Tabela 9

Valor médio do pH obtido no filtrado de diferentes concentrações de Tween-

80

CONCENTRAÇÃO DE TWEEN-80	FUNGOS		
	<i>Pleorotus (F-31)</i>	<i>L. Crinitus</i>	<i>H. glabra</i>
1,0g.L ⁻¹	3,7	3,4	3,8
1,5g.L ⁻¹	3,7	3,7	3,7
2,0g.L ⁻¹	3,7	3,7	3,7

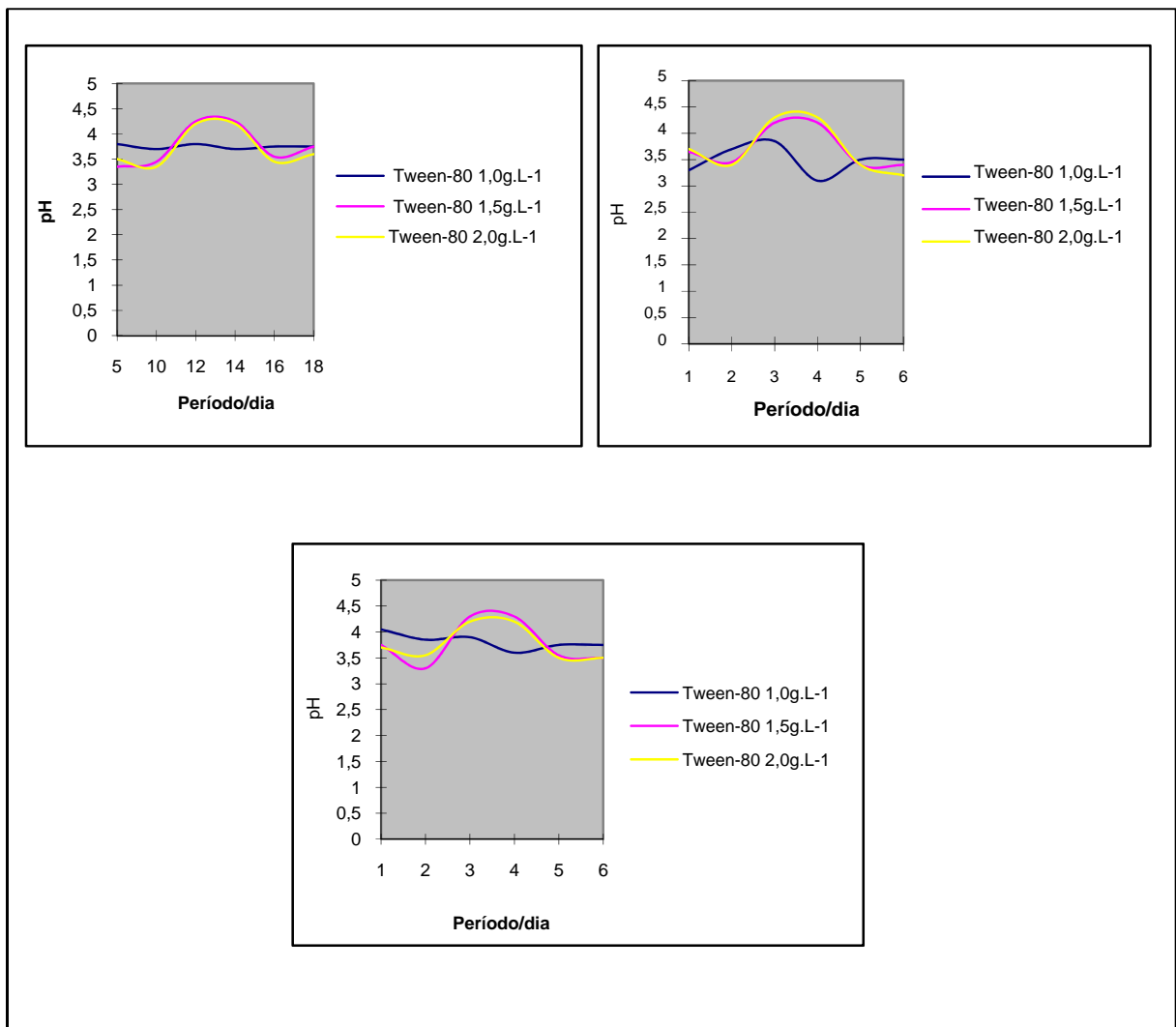


Figura 21: Variação do pH durante período de incubação. (A) *Pleorotus* sp (F-31); (B) *Lentinus crinitus*; (C) *Hexagonia glabra*

4.3.4 Crescimento em meio contendo Atrazina

De modo geral, todos os fungos mostraram crescimento em meio contendo atrazina *Hexagonia glabra* foi o que apresentou maior valor médio de crescimento em todas as concentrações testadas (Tabela 9). O crescimento inicial é lento, e somente no quarto dia a velocidade aumenta e os fungos mostram crescimento contínuo e preenchimento total do diâmetro da placa de Petri (Figura 22) Exceção ocorreu para *Hexagonia glabra* onde já no segundo dia apresentou crescimento máximo (Figura 22C).

O herbicida atrazina não mostrou efeito inibidor de crescimento para os fungos testados, mostrando que os mesmos estão utilizando como fonte de crescimento, ou ainda quebrando a estrutura de atrazina em estruturas menores, diminuindo a toxidez e/ou formando novos produtos.

Tabela 10

Valor médio do crescimento radial em meio contendo diferentes concentrações de atrazina

CRESCIMENTO MICELIAL (cm)					
Fungo	Concentração de Atrazina				
	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	2,5%
<i>Pleorotus</i> sp (F-31)	0.83 (0,66)	0.8 (0,75)	0.85 (0,63)	0.73 (0,52)	0.78 (0,77)
<i>Lentinus Crinitus</i>	0.63 (0,57)	0.68 (0,73)	0.67 (0,69)	0.64 (0,78)	0.55 (0,61)
<i>Hexagonia glabra</i>	1.09 (0,73)	1.18 (0,88)	1.09 (0,67)	0.96 (0,63)	1.08 (0,69)

Nota: Números em parênteses significam desvio padrão.

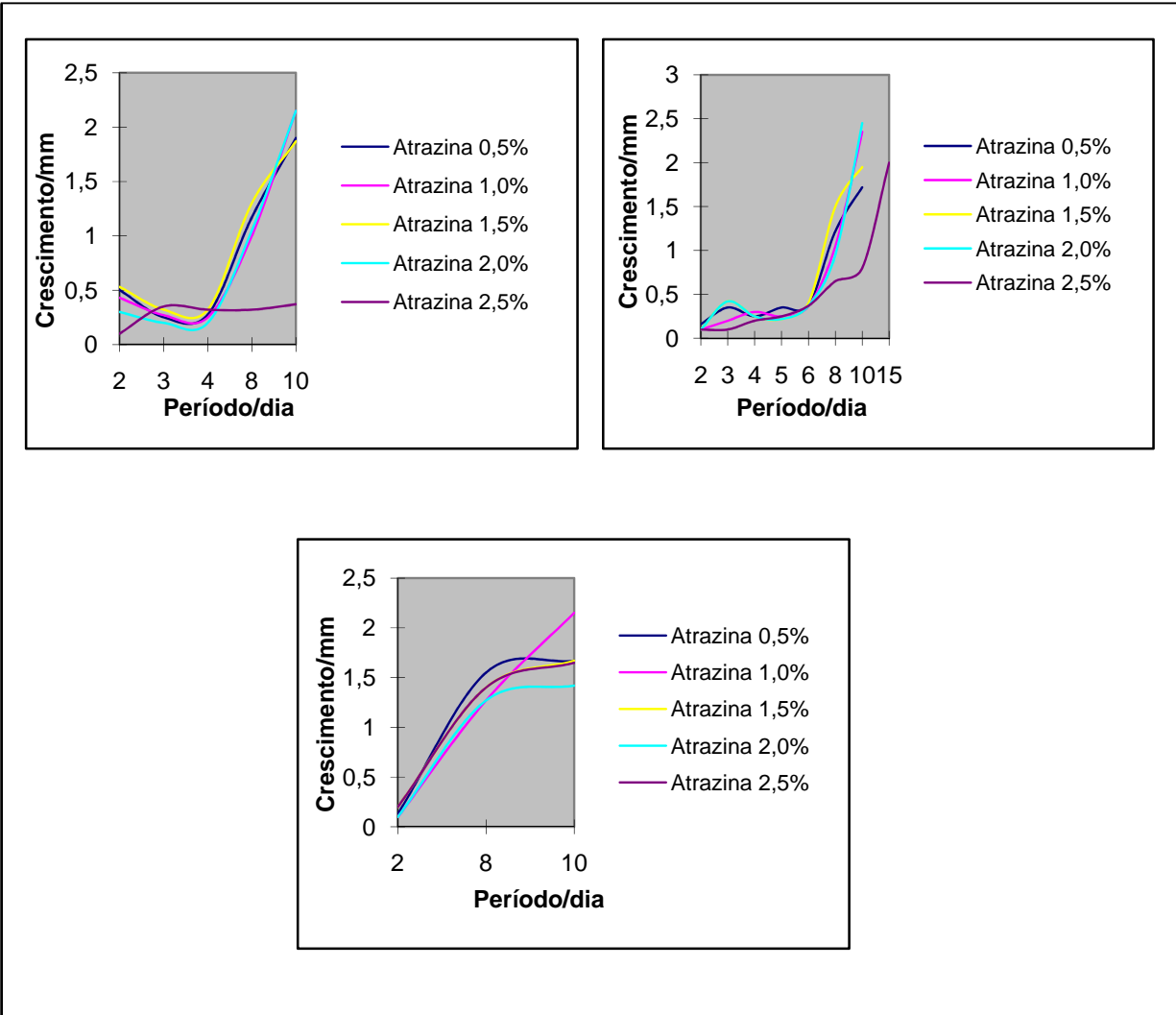


Figura 22: Crescimento radial de fungo em meio contendo diferentes concentrações de atrazina. (A) *Pleorotus sp* (F-31); (B) *Lentinus crinitus*; (C) *Hexagonia glabra*.

5 DISCUSSÃO

5.1 Crescimento dos fungos em função dos meios de cultura, pH e temperatura

5.1.1 Crescimento

Os requisitos nutricionais de qualquer organismo são determinados pelo seu metabolismo energético característico e pela sua capacidade Biosintética. No Caso específico dos fungos a adaptação evolutiva a diferentes situações ecológicas, conduziu a um alto grau de especialização com referência à forma química particular em que certos elementos podem ser usados como nutrientes (MENEZES, CASTLE & VILLAS BOAS Jr, 1972).

No caso específico dos fungos testados no presente trabalho, os meios nutricionais utilizados mostraram-se eficientes para o crescimento. Todos os meios tinham a presença de macroelementos requeridos por esses organismos para crescimento. As variáveis que tiveram maior influência nesse crescimento foram pH e temperatura. Ressalta-se, entretanto, que todos os fungos tiveram melhor crescimento no meio ácido, o que está de acordo com os resultados para outros fungos amazônicos (FERREIRA, 2005; CARMO, 2005; CASTRO E SILVA, 2006).

Embora não tivéssemos realizado a determinação físico-química do jerimum, podemos inferir que o mesmo apresenta, por exemplo, vitaminas, que não estavam presentes nos dois outros meios testados. Uma vez que estes fatores atuam apenas como unidades estruturais para alguns dos componentes do material celular

(MOORE-LANDECKER, 1982), eles são necessários em quantidades relativamente pequenas, comparadas às quantidades das principais fontes de carbono e energia. Isto é particularmente verdadeiro com relação às vitaminas, pois elas são usadas na produção de catalisadores (GOODAY, 1978).

Neste sentido, o fungo *Pleorotus* sp (F-31) crescendo em meio sólido de jerimum mostrou-se mais sensível em relação ao pH, uma vez que a medida que se diminuía a acidez desse meio o crescimento micelial também decrescia, ao contrário do observado nesse meio nutricional para *Lentinus crinitus* e *Hexagonia glabra*, que obtiveram maior valor médio de crescimento em pH alcalino.

Silva (2007) mostrou que certa concentração de biotina (vitamina H) no meio nutricional exerce influência positiva no crescimento dos fungos *P. sanguineus* e *Trametes* sp.

Nosso resultado confirma o que está bem definido em relação ao crescimento dos fungos amazônicos, de que cada fungo tem suas exigências nutricionais específicas. Todos os fungos estão em contato com solução aquosa na natureza ou em laboratório, e a concentração de íons de hidrogênio (pH), por exemplo dessas soluções exercem controle sobre o crescimento fúngico (HERRERA, 1991).

Um dos efeitos do pH está na disponibilidade de certos íons metálicos, os quais podem formar complexos que tornam-se insolúveis em certa faixa de pH.

No teste de atividade enzimática dos fungos onde os mesmos cresceram em meio líquido de malte acrescido de bagaço de cana-de-açúcar e diferentes concentrações do surfactante Tween-80, não foi observado mudanças drásticas do pH final. Para todos os fungos o pH final foi ácido com valor bem próximo daquele inicial, contrariando a afirmativa de Moore-Landecker (1982) na qual invariavelmente os fungos alteram o pH do meio onde crescem. Segundo este autor, a conversão de um componente neutro para metabólito ácido ou alcalino pode ser responsável pela mudança de pH no meio. Além disso, o pH exerce efeito sobre a permeabilidade da célula, a qual é alterada com diferente grau de acidez ou alcalinidade (VAN BOXTEL *et al.*, 1990). No caso do nosso resultado, o uso de surfactante não-iônico constituído por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol, pode estar contribuindo no processo de permeabilidade da célula, fazendo com que a membrana protoplasmática torne-se saturada com íons de hidrogênio de modo que a passagem de cátion é limitada, tornando a membrana com maior fluidez, (VASCONCELOS *et al.*, 2000) e conseqüentemente aumentado a secreção de enzimas fúngicas como o que ocorreu no nosso experimento, onde verificamos uma relação linear positiva entre a concentração do surfactante e a secreção de lacase no meio de cultura.

Outro requisito físico para crescimento é a temperatura. Em adição aos nutrientes, os fungos também devem estar expostos à condição favorável de temperatura para que o crescimento ocorra.

Começando com a temperatura mínima que permite crescimento, a quantidade de crescimento do fungo aumenta com o aumento da temperatura até

que um ótimo seja alcançado. No nosso experimento, as temperaturas testadas estão na faixa do ótimo para todos os fungos uma vez que não encontramos extrema diferenças no crescimento, concordando com Ferraz e Duran (1989) quando afirmamos que na faixa de temperatura ótima, a taxa de crescimento torna-se mais ou menos estável. Neste caso observamos mérito mais à influência da concentração de íons de hidrogênio no meio do que da temperatura isoladamente.

Outro aspecto determinado no nosso experimento foi produção de massa micelial (densidade micelial), onde pode-se constatar diferenças significativas na biomassa. Embora os fungos testados tivessem resultados similares de crescimento radial, a densidade micelial mostrou-se significativamente diferente sendo maior para *Hexagonia glabra*. Poucos trabalhos têm sido feito com relação a produção de biomassa fúngica . Swift (1973), por exemplo estimou a massa micelial de *Coriolus versicolor* a fim de apreciar a decomposição de resíduos vegetais na superfície do solo . Gurusiddaiam e colaboradores (1978) determinaram a biomassa de vários basidiomicetos presentes nos resíduos lignolíticos vegetais em associação com certos microrganismos. Nos dias atuais, entretanto, em função da possibilidade de se utilizar a massa micelial na tecnologia de biorremediação para absorção de metais pesados (FIORE, 2001), o interesse por essa variável tem aumentado. Diversos modelos de sistemas vêm sendo desenvolvidos e testados em laboratório e campo e alguns deles tem conseguido reduzir a quantidade de metais no meio. O avanço de tecnologia, desenvolvimento de técnicas para produção e acomodação da biomassa ou imobilização das células, é de grande importância, uma vez que baixos níveis de contaminação com metais são desejáveis por razões de proteção ambiental.

5.2 Crescimento em Atrazina

Dos três fungos testados *Lentinus crinitus* foi o que apresentou o menor e o mais lento crescimento micelial nas cinco concentrações de atrazina testadas no período de quinze dias.

De modo geral, *Pleorotus* sp (F-31) e *Hexagonia glabra* mostram-se capazes de crescer, com razoável biomassa em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de atrazina. Melo *et al.*, (1999), entretanto, chamam à atenção para o fato dessa característica não ser fator de degradação da atrazina. Verificaram esses autores que muito embora os fungos fossem capazes de crescer na presença do atrazina, somente algumas espécies dos grupos dos filamentosos foram capazes de degradar o herbicida. No presente estudo, não focamos o aspecto degradação, mas sim o crescimento micelial na presença de diferentes concentrações de atrazina. É possível que os fungos utilizem o composto como fonte de carbono e energia. É necessário o estudo do *pool* de enzimas produzidos por esses fungos e que estão envolvidas na degradação da atrazina. Kaufman & Blake (1970), por exemplo, demonstraram que três enzimas do grupo das hidrolíticas estão envolvidas na degradação da atrazina.

5.3 Produção de Enzimas Ligninolíticas

O Tween-80 tem sido testado como surfactante visando o aumento na produção de várias enzimas fúngicas. Giese et. al., (2004), por exemplo, relataram aumento de até 3 vezes na produção de lacases constitutivas PPO-I, pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria* sp na presença desse surfactante não-iônico. Por outro lado, relataram aqueles autores que a produção de lacase PPO-II não foi alterada pela adição de Tween-80. Kuhad et al., (1994) observaram aumento na produção de celulases pelo *Fusarium oxysporum* e Palma et al., (2000) na atividade de proteases em *Penicillium restrictum* com a adição de Tween-80. No presente estudo, todos os fungos apresentaram atividade das enzimas testadas sendo que *Hexagonia glabra* apresentou maior atividade enzimática para todas as enzimas do grupo oxidativa testadas (lacase, fenoxidase e peroxidase) na presença de diferentes concentrações de Tween-80.

Pozdnyakkova et al. (2004) comentam que em função da facilidade de solubilização de compostos poliaromáticos em meios aquosos e solventes orgânicos a adição de Tween em processos de degradação desses compostos, com envolvimento de lacases, também pode melhorar esse processo. Neste caso, *Hexagonia glabra* apresenta-se como potencial para uso no processo de degradação de compostos poliaromáticos.

Wieseman (1985) relatou que em condições adequadas os detergentes podem combinar-se com as lipoproteínas constituintes das membranas biológicas, tornando-as impermeáveis. Podemos inferir, por outro lado, que o Tween parece

alterar a parede celular favorecendo a secreção de enzimas para o meio extracelular, visto que como mostra o presente trabalho, todas as concentrações de Tween-80 testadas estimularam a produção de enzimas oxidativas. Jacques et al., (1985), descreveram o Tween-80 como estimulador da produção de glicosiltransferases, o que poderia de acordo com Giese et. al., (2004) também aumentar a produção de lacases.

CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos nas condições testadas podemos concluir que:

- ❖ O pH ácido (4-5,4), e temperatura de 28^o e 30^oC são parâmetros ótimos para obtenção do crescimento micelial;
- ❖ Os fungos *Pleurotus* sp (F-31) e *Hexagonia glabra* apresentam um possível potencial para uso na biodegradação do herbicida atrazina;
- ❖ Em função da grande densidade micelial produzida o fungo *Hexagonia glabra* apresenta potencial para uso em estudos de biosorção de metais pesados;
- ❖ O surfactante Tween-80 nas concentrações de 1,5 e 2,0g.L⁻¹ é potencializador da secreção de lacase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABER, J.D; MELILO, J.M. **Terrestrial ecossystems**. Orlando FL. Reinhart e Wintson, 1978. ALEXOPOULOS, C.J ; C.W.; M 1996. **Introductory Mycology**. John Wiley & Sons, New York. 869p.

ALVEY, S.; CROWLEY, D.E. **Survival and activity of an atrazine-mineralizing bacterial consortium in rizosphere soil**. Environmental Science & Technology, v.30, p. 1596-1603, 1996.

AMABIS, José Mariano; MARTHO, Gilberto Rodrigues. **Biologia dos organismos Biologia das células**. 2ª ed. São Paulo: Moderna, 2004.

ANDER, P. & ERIKSSON, K.E. **The Importance of Phenol-oxidase Activity in Lignin degradation by White-rot Fungus Sporotrichum pulverulentum**. Arch. Microbiol. 109:1-8. 1976.

ANDERSON, J. M. **Spatiotemporal effects of invertebrates on soil processes. Biology and Fertility of Soils**, v. 6, p. 216-22, 1988.

ARAÚJO, Wagner Luiz. **Genética e melhoramento de fungos na biotecnologia**. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/trab2002/MELHOR/MHR004.htm>. Acesso em: 10 de maio 2008.

BALLAMINUT, N & MATHEUS, D. R. 2006. Characterization **of fungal inoculum used in soil bioremediation**. Brazilian Journal of Microbiology *In Press*.

BEARE, M. H.; REDDY, M. V.; TIAN, G.; SRIVASTAVA, S. C. **Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics: the role of decomposer biota.** Applied Soil Ecology, v. 6, p. 87-108, 1997.

BELLUCK, D.A.; BENJAMIN, S.L.,and DAWSON, T. (1991) - **Groundwater contamination by atrazine and its metabolites: Risk assessment, policy, and legal implications.** In L. Somasundaram and J.R. Coats (eds.) *Pesticide Transformation Products: Fate and Significance in the Environment.* American Chemical Society, Washington, DC.

BENNET JW, KG WUANCH & BD FAISON. 2002. **Use of fungi biodegradation,** p. 960-971. In: CJ HURST (ed.). *Manual of environmental microbiology.* 2^a ed. Washington, D. C.: ASM Press. Biotechnology. 57: 20–33.

BLACK, J. G. **Microbiologia:** fundamentos e perspectivas. 4. ed. Rio de Janeiro.

BLANCHETE, R.A (1991). **Deslignification by Wood-Decay Fungi Annual Reviews Phytopatology** 29:381-398.

BONONI, V. L. R (org.). (1999) **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas.** São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, 184p.

BONONI, V. L. R. (1997) **Biodegradação de organoclorados no solo por basidiomicetos lignocelulósicos.** In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. ed. *Microbiologia Ambiental,* Embrapa-CNPMA, Jaguariúna. p .243-268.

BUMPUS, J.A. & AUST, S.D. 1987. **Biodegradation of chlorinated organic compounds by Phanerochaete chrysosporium,** a wood-rotting fungus. In: Exner, J.H. (Ed.). *Solvent Hazardous waste problems: learning from dioxins.* Washington DC: American Chemistry Society, 340-349.

BUMPUS, J.A. 1989. **Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Phanerochaete chrysosporium.** Applied and Environmental Microbiology. 55: 154-158.

CAJTHAML T, P ERBANOVA, V SASK & M MOEDER. 2006. **Breakdown products on metabolic pathway of degradation of benz[a]anthracene by a ligninolytic fungus.** Chemosphere 64: 560-564.

CARMO, C.A. **Atividade enzimática hidrolítica dos fungos amazônicos Pycnoporus sanguineus (L.F.) Murr e Panus crinitus (L.ex.FR.) Singer.** Manaus,

2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia), Universidade do Estado do Amazonas, 2005.

CASTRO E SILVA, A. **Micromorfologia da degradação de madeira da espécie amazônica *Hura creptans* L.** Por fungos lignolíticos pertencentes a classe Hymenomycetes. Tese de doutorado. Manaus: INPA/FUA. 1996^a

CHAGAS, E. P., DURRANT, L. R. (2001) **Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*.** Enzyme and microbial technology, v. 29, p.473-477.

CLAUS, H. 2004. **Laccases: structure, reactions, distribution.** Micron 35: 93-96.

CÔTÉ, W. A., Jr. **Wood Ultrastructure – An Atlas of Electron Micrographs.** Seattle:Univ. of Washington Press. 1967.

CLOETE, T.E., CELLIERS, L. (1999) **Removal of Aroclor 1254 by the white rot fungus *Coriolus versicolor* in the presence of different concentrations of Mn(IV)oxide.** International Biodeterioration & Biodegradation., v. 44, p. 243-253.

COMPART, L. C. A., MACHADO, K. M. G., MATHEUS, D. R. & CARDOSO, A. V. 2006. **Immobilization of *Psilocybe castanella* on ceramic (slate) supports and its potential for soil bioremediation.** In Press.

CRAWFORD, D. L., POMETTO, A. L. (1988) **Lignin-depolymerization activity of *Streptomyces*.** In: WOOD, K., KELLOGG, S. T. Methods Enzymol., v. 161, p. 238-249.

DOMINGUES, F.C. *et al.* **The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30.** Enzyme Microb. Technol., New York, v. 26, p. 394-401, 2000.

DUPONT, R.R., BRUELL, C.J., MARLEY, M.C., DOWNEY, D.C., NORRIS, R.D., HULLING, S.G. & PIVETS, B. 1997. **Bioremediation.** Annapolis: American Academy of Environmental Engineers and USEPA. 596p.

DURÁN, N., ROSA, M.A., D'ANNIBALE, A. & GIANFREDA, L. 2002. **Applications of Laccases and Tyrosinases (Phenoloxidases) Immobilized on Different Supports: A Review.** Enzyme and Microbial Technology. 31 (7): 907-931.

DZUL-PUC, J. D., ESPARZA-GARCÍA, F., BARAJAS-ACEVES, M. & Rodríguez-Vaáquez R. 2005. ***Benzo[a]pyrene removal from soil by Phanerochaete chrysosporium grown on sugarcane bagasse and pine sawdust.*** Chemosphere 58: 1-7.

FENGEL, D. e WEGENER, G. 1984. ***Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions,*** Walter de Gruyter, NY, USA, p. 66-181.

FENGEL, D. e WEGENER, G. in ***Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions.*** Walter de Gruyter, Berlin pp 66-75. 1989.

FENGEL, D. e WEGENER, G. in ***Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions.*** Walter de Gruyter, Berlin pp 66-75. 1989.

FENNEMA, O.R.(1993) ***Química de los alimentos.*** Zaragoza : Acribia. 1993, p. 81-156.

FERRAS, A; DURAN, N. ***effect os various Conditions on the Chyssonilia sitofhila*** TFB 27441 Growth. Rev. Microbiol. São Paulo, 20:240-245, 1989.

FERREIRA, F. ***Crescimento e atividade ligninolíticas dos fungos amazônicos deterioradores de madeira, Pycnoporus sanguineus (L.:F.) Murr e Trametes sp. .*** Manaus, 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia), Universidade do Estado do Amazonas, 2005.

FIORI, M.F. ***Potencial das Cianobactérias na Biorremediação de Contaminados com Metais Pesados.*** Biodegradação. Itamar Soares de Melo et al. (EDITORES) Jaguariúna, São Paulo: AMBRAPA MEIO AMBIENTE, 2001.

GARG, S.K., Modi, D.R. ***Decolorization of pulp-paper mill effluents by white-rot fungi.*** Critical Reviews in Biotechnology 19 (2): 85-112 (1999).

GOLDSTEIN, I. S. (1976) ***Chemicals from Lignocellulose. Biotechnol. and Bioenginn. Symposium.*** v. 6, p. 293-301.

GIESE, E.C.; COVIZZI,L.G.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A de M. ***Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas por Botryosphaeria sp.*** Acta Scientiarum, Biological Sciences, 26(4): 463-470. 2004.

GRAY, T.R.G.; WILLIAMS, S.T. **Soil microorganisms**. Logman, Lectures in Botany, The University of Liverpool, 1975.

GRIFFIN, D. H.; **Fungal Physiology**, 2nd ed.; Wiley-Lis: New York, 1994, p. 168
Guanabara Koogan, 2002. p 275-277.

GOODAY, G.W. **The Enzymology of Hyphal Growth**. In: The Filamentous Fungi. Vol.3. Developmental Mycology. John E. Smith & David R, Berry (Eds). London: E. Arnod (Publishers) Limited, 1978.

GUGLIOTTA AM. 2001. **Utilização de basidiomicetos nativos na remoção de corantes em efluentes na indústria têxtil**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GUGLIOTTA, A.M. & CAPELARI, M. 1998. **Taxonomia de basidiomicetos**. In: Bononi, V.L.R. (Org.). Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas, Instituto de Botânica, São Paulo, 184 p.

GURUSIDAIAM S. BLANCHETTE R. A. et SHAW C.1978. **A modified technique for the determination of fungal mass in decayed wood**. Can. J. For. Res., 8, 486-490.

HAANG, H.P. **A nutrição mineral e o ecossistema**. In: CASTRO, P.R.C; S.O; YAMADA, T. Ecolofisiologia da produção agrícola. Piracicaba: Associação Brasileira para pesquisa do Potássio e do Fósforo. 1987. p. 49-52

HALLBERG, G.R.(1989) - **Agr. Ecosys**. Environ. 26: 299-367

HATAKKA, A (1994) **Lignin-Modifying Enzymes from selected White-Rot Fungi: Production and Role in Lignin Degradation**. FEMS Microbiological Reviews 13, 125-135.

HATAKKA, A. **Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation**. FEMS Microbiology Reviews 13:125-135 (1994).

HAWKSWORTH, D.L., KIRK, P.M., SUTTON, B.C. & PEGLER, D.N. 1996. Ainsworth & Bisby's **Dictionary of the fungi**. 8 ed., Egham, International Mycological Institute.

HIGUCHI, T. ***Lignin Biochemistry: Biosynthesis and Biodegradation Wood***. Science Technology 24: 23-63. 1990.

HERRERA, A.E.M. ***Thermoascus aurantiacus: Aspecto de Crescimento, Produção Enzimática e Utilização no Tratamento de material Lignocelulósicos***. Dissertação. Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Campinas, 1991.

HOFRICHTER, M. 2002. Review: ***lignin conversion by manganese peroxidase (MnP)***. Enzyme and Microbial Technology 30: 454-466.

HOFRICHTER, M. Lundell, T. & HATAKKA. A. 2001. ***Conversion of milled pine wood by manganese peroxidase from Phlebia radiata***. Applied and Environmental Microbiology 67 (10): 4588-4593.

HOFRICHTER, M.; SCHEIBNER, K.; SCHNEEGA, I.; FRITSCH, W. 1998. ***Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from Nematoloma frowardii***. Applied and Environmental Microbiology 399-404.

HUDSON, H. J.; WILLIS, A. J.; SLEIGH, M. A. ***Fungal Biology***. Edward Arnold Ltd: London, 1986, p. 289.

JACQUES. N.A. et al. ***Does an increase in membrane unsaturated fatty acids account for Tween 80 stimulation of glucosyltransferase secretion by Streptococcus salivarius?*** J. Gen. Microbiol. 131: 67-72. 1985.

KAUFMAN, D.D.; BLAKE, J. ***Degradation of atrazine by soil fungi***. Soil Biology & Biochemistry, 1970.v.2, p.73-80.

KIRK, T. K. e FARRELL, R. L (1987) ***Enzymatic "combustion": the Microbial Degradation of Lignin*** Annual Reviews Microbiology 41: 465-505.

KIRK, T.K. & FARRELL, R.L. 1987. ***Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin***. Annual Review of Microbiology. 41: 465-505.

KUHAD, R.C. et al. ***A hypercellulolytic mutant of Fusarium oxysporum***. Lett. Appl. Microbiol. , 19: 397-400. 1994.

KLOCK, U, MUÑIZ G.I.B., HERNANDEZ J.A, ANDRADE A.S. ***Química da Madeira***. Edição Revisada. Curitiba:Universidade Federal do Paraná, 2005.

KRISHNA, C. 2005. **Solid-state fermentation systems - an overview**. Critical Reviews in Biotechnology 25: 1–30.

KUNZ, A., ZAMORA-PERALTA, P., MORAES, G. A.S. & DURÁN, N. (2002) **Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis**. Quim. Nova, vol. 25, n. 1, p. 78-82.

LARS, H., GUNNAR, J., GÖRAN, P. JIEBING, L., PIERRE, L. & GUNNAR, H. (2000) **Do the extracellular enzymes cellobiose dehydrogenase and manganese peroxidase form a pathway in lignin biodegradation?** FEBS, v. 477, p. 79-83.

LAURENSE, J. **Biologia**. Volume único. 1 ed. Sao Paulo: Nova Geração, 2005.

LEHNINGER, Albert Lester et al. **Princípios de bioquímica**. 2 edição. São Paulo: SARVIER, 1995.

LEONOWICZ, A., MATUSZEWSKA, A., LUTEREK, J., ZIEGENHAGEN, D., WOJTAS-WASILEWSKA, M., CHO, N.S., HOFRICHTER, M. & ROGALSKI, J. 1999. **Biodegradation of lignin by white-rot fungi**. Fungal Genetics and Biology. 27: 175-185.

LEONTIEVSKY, A. A.; MYASOEDOVA, N. M.; BASKUNOV, B. P.; GOLOVLEVA, L. A.; BUCKE, C.; EVANS, C. S. 2001. Transformation **of 2,4,6-trichlorophenol by free and immobilized fungal laccase**. Applied Microbiology and Biotechnology 57: 85-91.

LUIZÃO, F. Divulgação Científica: **Cientistas do LBA mostram como os sistemas agro-florestais podem reverter a degradação da Amazônia**. Disponível em: <<http://lba.cptec.inpe.br/lba/site/?p=degradacao&t=0>>. Acesso em: 12 de abril de 2008.

MANDELBAUM, R.T.R WALCKET, L.P.; ALLAN, D.L. **Isolation and characterization of a Pseudomonas sp that mineralizes the s-triazine herbicide triazine**. Applied and Environmental Microbiology, v.61, p. 1451-1457, 1995.

MANDELBAUM, R.T.R WALCKET, L.P.; ALLAN, D.L. **Mineralization of thes-atrazine by stable bacterial mixed cultures**. Applied and Environmental Microbiology v.59, p. 1695-1701, 1993.

MANDELBAUM, R.T.R WALCKET, L.P.; ALLAN, D.L. **Mineralization of thes-atrazine by stable bacterial mixed cultures**. Applied and Environmental Microbiology v.59, p. 1695-1701, 1993.

MARTÍNEZ, M. J.; GUTIÉRREZ, A. & del Rio. J. C. 2005. **Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin**. International Microbiology 8: 195-204.

MATHEUS DR & LK OKINO. 1998. Utilização **de basidiomicetos em processos biotecnológicos**, p. 106-139. In: VLR BONONI (ed.). Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente.

MATHEUS DR. 2003. **Otimização da biodegradação de hexaclorobenzeno por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

MATHEUS DR. 2003. **Otimização da biodegradação de hexaclorobenzeno por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

MATHEUS, D. C.; OKINO, L. K. **Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos**. In: BONONI, V. L. R.; GRANDI, R. A. P. (Eds.). Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, 1998. p. 107-139.

MATHEUS, D. R. & OKINO L. K. 1998. **Utilização de Basidiomicetos em processos biotecnológicos**. In: Bononi, V. L. R. & Grandi, R. A. P. 1998. Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. Instituto de Botânica de São Paulo. SP. 107-139p.

MAU, J.; BEELMAN, R.B ZIEGLER, G.R; ROYSE, D.J. 1991. **Effect of nutrient supplementation on flavor, quality, and sheif life of the cultivated mushroom, Agaricus bisporus**. Mycologia, 83(2): 142-149.

MAYER, A.M. & STAPLES, R.C. 2002. **Laccase: new functions for an old enzyme**. Phytochemistry.60 (6): 551-565.

MELO, Itamar Soares de; SILVA, Célia M.M. de Souza; FAY, Elizabeth Francisconi; MONTEIRO, Regina Rosim; ROSAMIGLIA, Antonio C. **Degradação de Atrazina por fungos filamentosos**. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 24p. (Embrapa meio Ambiente boletim de Pesquisa, 5).

MENEZES, T. J.B; CASTLE, H & VILLAS BOAS JR, H. **Efeito da composição do meio na produção de celulase por Stachybotrys atra**. Revista Brasileira de Tecnologia, 2:189-195. 1972.

MENEZES, T.J.B. **Os fungos na indústria**. Boletim da SBCTA, v.31, n. 2, p. 116120, 1997.

MORAIS, A. M.L. et al.; FUNGOS: Ferramentas na saúde pública **As utilidades de um antigo vilão**. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. 2003. Disponível em < http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio07/7_b.asp> Acesso em 10/04/2008.

MOORE- LANDECKER, E. **Fundamentals of the Fungi**. New Jersey: Prentice-Hall, Inc. 1982).

MYBURGH, J.; PRIOR, B.A.; KILLIAN, G. (1991) **The temperature and pH properties of the extracellular hemicellulose-degrading enzymes of *Aureobasidium pullulans* NRRL Y 2311-1**. *Process Biochemistry*, Londres, v. 26 p.343-348.

NEUFELD, P. **Micologia. Curso** de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro - RJ. 1997.

NOVO NORDISK. Celluclast 1,5 L: ficha técnica. [Curitiba] 1996.4 p. Thompson, N.S. **Hemicellulose as a biomass resource**. (1983) In: SOLTERS, E.J. (Ed.). *Wood and agricultural residues: research on use for food, fuel and chemical*. Academic Press, New York, p.101-119.

NOVO NORDISK. **Celluclast 1,5 L**: ficha técnica. [Curitiba],1996. 3 p.

NOVOTNÝ, C.; ERBANOVA, P.; CAJTHAML, T.; ROTHSCHILD, N.; DOSORETZ, C. & SASEK, V. 2000. *Irpex lacteus*, **a white rot fungus applicable to water and soil bioremediation**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54: 850-853.

OLIVEIRA, A M. F. et al. **Agentes destruidores da madeira**. In: LEPAGE, E.S. (Coord.). *Manual de preservação de madeiras*. São Paulo: IPT, 1986. v.1. p.99-256.

PALMA, M.B et. al. **Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate**. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, (84-86): 1137-1145. 2000.

PANDEY, A., Soccol, C. R., Nigam, P. & Soccol, V. T. 2000. **Biotechnological potencial of agroindustrial residues**. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* 74: 69-80.

PELCZAR, M. J., CHANG, E. C. S., KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, Volume II, 2ª ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

POINTING SB. 2001. **Feasibility of bioremediation by white-rot fungi**. Applied Microbiology and Biotechnology 57: 20-33.

POINTING, S. B. 2001. **Feasibility of bioremediation by white-rot fungi**. Applied Microbiology and Biotechnology. 57: 20–33.

POINTING, S.B. *et al.* **Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture**. Mycologia, Lawrence, v. 92, p. 139-144, 2000.

POZDNYAKOVA, N.N. *et al.* **Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1**. J. Mol. Catal., Lausanne, v. 30, p. 19-24, 2004.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Os Reinos Dos Fungos**. Vol. 1. 2ed . Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004.

PUTZKE, Jair; PUTZKE, Terezinha Lopes. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2002. v.2.

RAVEN, PETER H., ET ALL. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

REGE, B.D. *et al.* **Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in *Caco-2* cell monolayers**. Eur. J. Pharm. Sci., Shannon, v. 16, p. 237-246, 2002.
SOMOGYI, M.A. A new reagent for determination of sugars. J. Biol. Chem., Bethesda, v. 160, p. 61-68, 1945.

ROSA, L.H. **Diversidade de fungos Agaricales (Basidiomycota) em dois fragmentos de Mata Atlântica do Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2002, 216p. (Dissertação, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG).

SEABRIGHT, D. **Eating away at the woodwork**. Asian Timber, v.14, n.3, p.46-47, 1995.

SILVA, R.R; COELHO, G.D. **Fungos: Principais Grupos e Aplicações Biotecnológicas**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2006.

SINGER, R.; ARAUJO, I.J.S. 1979. **Litter decomposition and ectomycorrhiza in Amazonian forests** I. A comparison of litter decomposing and ectomycorrhizal Basidiomycetes in latosol-terra-firme rain forest and white podzol campinarana. *Acta Amazonica*, 9(1): 25-41.

SONG, C.H.; CHO, K.Y.; NAIR, N.G. 1991. **Effect of low temperature shock treatment on sporophore initiation, lipid profile and nutrient transport in *Lentinula edodes***. *Mycologia*, 83(1): 24-29.

STEFFEN, K. T., HATAKKA, A.; HOFRICHTER, M. 2003. **Degradation of benzo[a]pyrene by the litterdecomposing basidiomycete *Stropharia coronilla*: role of manganese peroxidase**. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (7): 3957–3964.

STURION, G.L.; RANZANI, M.R.T.C. 1997. **Produção de cogumelo comestível *Pleurotus*: Opção promissora, especialmente na região do Vale do Ribeira**. Serie Produtor Rural, 2: 44p.

STUTZENBERGER, F.J. **Interference of the detergent Tween 80 in protein assays**. *Anal. Biochem.*, Orlando, v.207, p. 249-254, 1992.

SUGIURA, M., HIRAI, H. & NISHIDA, T. 2003. **Purification and characterization of a novel lignin peroxidase from white-rot fungus *Phanerochate sordida* YK-624**. *FEMS Microbiology Letters*. 224: 285-290.

SZLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L. & LINKINS, A.E. **Production of phenol – oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi**. *Mycol.*, n. 81, p. 234-240, 1989.

SWIFT M.J., 1973. **The estimation of mycelial biomass by determination oh the hexosamine content of wood tissue decayed by fungi**. *Soil Biol. Biochem.*, 5, 321-332.

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

TRABULSI, Luiz Rachid; TOLEDO, Maria Regina Fernandes de. **Microbiologia**. 2. ed Sao Paulo: Atheneu, 1996.

TUOMELA, M., VIKMAN, M., HATAKKA, A. & ITAVAARA, M. 2000. **Biodegradation of lignin in a compost environment: a review**. *Bioresource Technology*. 72: 169-183.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. **Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay**. *Journal of Biotechnology*, v. 41, p. 1-17, 1995.

UETA, J.; Pereira, NL; SHUHAMA, IK; Cerdeira, AL (1999) – **Biodegradação de herbicidas e biorremediação**. *Microorganismos degradadores do herbicida atrazida* Biotecnologia.

VAN BOXTEL, R.M. *et al.* **Effect of polyoxyethylene sorbate compounds (Tweens) on colonial morphology, growth, and ultra structure of *Mycobacterium paratuberculosis***. *APMIS*, Copenhagen, v. 98, p. 901-908, 1990.

VARES, T., KALSI, M. & HATAKKA, A. 1995. **Lignin peroxidase, manganese peroxidase, and others ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw**. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (10): 3515-3520.

VASCONCELOS, A.F.D *et al.* **Otimization of lacase production by *Botryosphaeria* sp in The presence of veratyl alcohol by the response- surface method**. *Process Biochem*, 35:1138. 2000.

VYAS BRM & HP MOLITORIS. 1995. **Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of remazol brilliant blue R**. *Applied Environmental Microbiology* 61(11): 3919-3927.

WATANABE, T.; KATAYAMA, S.; ENOKI, M.; HONDA, Y. & KUWAHARA, M. 2000. **Formation of acyl radical in lipid peroxidation of linoleic acid by manganese dependent peroxidase from *Ceriporiopsis subvermispota* and *Bjerkandera adusta***. *European Journal of Biochemistry* 267:4222-4231.

WISEMAN, A . **Handbook of enzyme biotechnology**. 2 ed. England: Ellis Horwood Limited, 1985.

WHITTAKER RH.1969. **New concepts of kingdoms of organisms**. [Science](#) 163: 150-160.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.