



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA– MBT**

**INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS FÍSICAS NA PRODUÇÃO DA LACASE E BIOMASSA
MICELIAL DE BASIDIOMICETOS AMAZÔNICOS E DE SUA INTERAÇÃO**

JAQUELINE DE OLIVEIRA SOUZA

**MANAUS
2013**

JAQUELINE DE OLIVEIRA SOUZA

**INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS FÍSICAS NA PRODUÇÃO DA LACASE E BIOMASSA
MICELIAL DE BASIDIOMICETOS AMAZÔNICOS E DE SUA INTERAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Helena Camarão Telles Ribeiro
Co-orientador: Prof. Dr. Cleiton Fantin Rezende

MANAUS
2013

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Antônio Ferreira e Rosinéia Pires, pela dedicação a mim e às minhas irmãs, sempre nos proporcionando o melhor que podem. Vocês foram a ponte para essa conquista. O que sou hoje é fruto do amor e educação que vocês me ofertaram.

Ao meu pai Antônio, por sempre investir na minha educação, por apoiar e respeitar as minhas decisões sempre torcendo pelas minhas conquistas. Obrigada por acreditar e confiar em mim.

À minha mãe, pelo amor e incentivo as novas descobertas. Sou grata por ter dedicado a sua juventude a minha criação. A senhora é luz do meu caminho, amo-te infinitamente.

Ao meu amor Felipe Bacellar, pela ajuda, carinho e imensa compreensão durante esses dois anos de trabalho. Você foi o meu porto seguro em todos os momentos, alegres, tristes, de medo e desespero, mostrando-me sempre o melhor caminho a ser seguido. Obrigada por ter acreditado e sonhado junto comigo por essa conquista.

À minha avó, pelas orações e incentivos de todos os dias. Não existe pessoa nesse mundo que vibre mais com as minhas vitórias.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me guiar com minhas decisões e escolhas.

À minha orientadora, Dra. Helena Camarão, por todo apoio e orientação neste trabalho, sou eternamente grata pelo voto de confiança. Mesmo que de longe não mediu esforços para me acompanhar e ajudar, principalmente com os meus pedidos de “socorro”. Você foi mais que uma orientadora, foi uma amiga, irmã, mãe. Sou feliz por ter recebido suas orientações e por tanto carinho, atenção e compreensão a mim depositados.

Ao meu coorientador, Dr. Cleiton Fantin, pela contribuição e acompanhamento. Por ter aceitado a coorientação e ter me acolhido tão bem, sem dúvida, isso fez toda a diferença para que eu pudesse continuar firme no desenvolvimento dessa pesquisa.

À minha colaboradora, Dra. Hiléia Barroso, pela participação na elaboração deste projeto. A sua ajuda foi crucial para a finalização do mesmo. Sempre disposta a ajudar, sendo com materiais, equipamentos ou mesmo com palavras de incentivo as quais fizeram eu me manter confiante diante dos novos desafios.

Ao Dr. Aldo Procópio, pela ajuda com o desenvolvimento da primeira etapa deste trabalho. Sou grata por ter me aceitado como estagiária e ter me apresentado esta linha de pesquisa.

Aos colegas do laboratório do Núcleo de Apoio Instrumental de Análise Química e Estrutural da Universidade do Estado do Amazonas por terem me acolhido.

Ao Fernando Mendes e Emerson Bacellar, pela ajuda com os materiais e equipamentos, sempre dispostos a me auxiliar e orientar no laboratório mesmo que nos finais de semana e feriados. Sem a ajuda de vocês teria sido tudo mais difícil.

À Janaína Chaves, pela grande participação no desenvolvimento deste trabalho, seja ensinando ou acompanhando nos experimentos. A sua ajuda foi mais que essencial.

À Weena Pádua, por ter dedicado parte do seu tempo para me ajudar com os últimos experimentos. Sou grata, principalmente porque sei que conquistei uma grande amiga.

Às amigas de longa caminhada Danielle Rachel, Daniele Lobo e Glaucia Manço, pela amizade, carinho e confiança que nos mantém unidas desde a época da graduação. Vocês fizeram os meus dias no laboratório os mais felizes. Os anos se passam e só desejo que nossa amizade cresça cada vez mais.

Aos amigos conquistados Lorena Lima, Luciana Brito, Francisco Neto e Juliana Oliveira, conhecer vocês foi um dos melhores presentes que pude ganhar nesses dois anos.

Aos professores que ministraram disciplinas do Mestrado, pela dedicação e conhecimentos transmitidos, sempre nos despertando para novos caminhos.

Aos colegas de turma do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

Ao Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, em especial a Beverly Franklin, pela ajuda, eficiência e disponibilidade todas as vezes que precisei.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

E por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

OBRIGADA!

RESUMO

Os fungos possuem papel vital nos sistemas primários de produção e para manter a diversidade fúngica nos ecossistemas é muito importante entender os mecanismos determinantes da biologia e ecologia das monoculturas e das interações fúngicas. O uso destes microrganismos na área industrial e biotecnológica pode ser através de sua biomassa micelial ou então de suas macromoléculas isoladas. Basidiomicetos são produtores de lacases que possuem um enorme potencial de aplicação na indústria devido à grande diversidade de substratos que podem oxidar, assim como a sua utilização na hidrólise de subprodutos lignocelulósicos em processos fermentativos, na produção de biocombustível e entre outras aplicações. Neste trabalho, estudou-se a influência das variáveis físicas no crescimento do micélio, produção da lacase e biomassa micelial dos fungos *Hexagonia glabra* (UEA201), *Pycnoporus sanguineus* (UEA209), *Trametes lactinea* (UEA202) e de sua interação, preservados na coleção da Universidade do Estado do Amazonas, bem como avaliar a capacidade desses fungos em biodegradar os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes no diesel. Utilizaram-se os meios de cultura BDA e BD à temperatura de 28 °C em pH 5. Foram observadas variações no crescimento do micélio e na produção da biomassa nos diferentes regimes de luminosidade testados, sendo que, para todos os isolados, o regime de claro contínuo induziu um maior crescimento micelial e uma maior produção de biomassa fúngica, em um menor período de tempo. Os resultados das análises morfológicas das interações fúngicas, mostram que o crescimento do *T. lactinea* foi inibido pelo crescimento do *H. glabra*, entretanto, os mesmos crescem sobre o fungo *P. sanguineus*, ocorrendo a formação da zona de sobreposição, Constatou-se também que não houve diferenças morfológicas nos diferentes regimes de luminosidade. Foram observadas variações na produção da lacase em todas as temperaturas e regimes de tempo em vinte e dois dias de coleta, evidenciando que todos os basidiomicetos produziram enzima lacase em todas as temperaturas e fotoperíodos utilizados. Em todos os regimes de luminosidade a temperatura de 30 °C com incubação por 60 minutos proporcionou maior produção de lacase e independente das temperaturas utilizadas, o regime de luz contínuo, apresentou melhor produção enzimática com todos os fungos testados. Os experimentos com o indicador redox mostraram que apenas o fungo *H. glabra* e o consórcio, foram capazes de biodegradar o diesel em até 48 horas.

Palavras chave: lacase, enzima, temperatura, fotoperíodo, cultura mistas.

ABSTRACT

Fungi have vital role in primary production systems and to maintain fungal diversity in ecosystems is very important to understand the mechanisms of biology and ecology of monocultures and fungal interactions. The use of these microorganisms in industrial and biotechnological area may occur by its mycelial biomass or even by isolated macromolecules. Basidiomycete are laccases producers that have a large potential application in the industry due to the wide range of substrates that can oxidize, as well their use in the hydrolysis of lignocellulose-products in fermentation processes, biofuel production, among other applications. In this work, was studied the influence of physical variables in the growth of mycelium, Laccase production and mycelial biomass of the following fungi *Hexagonia glabra* (UEA201), *Pycnoporus sanguineus* (UEA209), *Trametes lactinea* (UEA202) and their interaction, preserved in the collection of University of the State of Amazonas, and evaluate the ability of these fungi to biodegrade polycyclic aromatic hydrocarbons present in diesel. BDA and BD microbiological growth media were used at 28 °C at pH 5. Changes were observed in mycelial growth and biomass production in different light regimes tested, and, for all the isolates, continuous light induced a higher mycelial growth and increased production of fungal biomass in a shorter period of time. The results of the morphological analysis of fungal interactions, showed that the growth of *T. lactinea* was inhibited by *H. glabra* growth, however, they grow on the fungus *P. sanguineus*, forming the overlap zone. It was also found that there was no morphological differences in the different light regimes. Changes were observed in laccase production in all temperatures and weather regimes in twenty-two days of collection, showing that all basidiomycetous produced laccase enzyme in all temperatures and photoperiods used. In all brightness schemes temperature of 30 °C with incubation for 60 minutes gave highest yield of laccase and beside the temperatures used, the system of continuous light, showed better enzyme production with all fungi tested. Experiments with redox indicator showed that only the fungus *H. glabra* and the consortium were able to biodegrade the diesel within 48 hours.

Keywords: laccase, enzyme, temperature, photoperiod, mixed culture.

1 LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

| | |
|---|----|
| Figura 01 – A: Crescimento do micélio em (mm) das culturas de <i>H. glabra</i> , <i>P.sanguineus</i> e <i>T. lactinea</i> sob fotoperíodo de luz contínua após oito dias de incubação. B: Crescimento do micélio em (mm) das culturas de <i>H. glabra</i> , <i>P.sanguineus</i> e <i>T. lactinea</i> sob fotoperíodo de escuro contínuo após oito dias de incubação. C: Crescimento do micélio em (mm) das culturas de <i>H. glabra</i> , <i>P.sanguineus</i> e <i>T. lactinea</i> sob fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro após oito dias de incubação..... | 57 |
| Figura 02 – Análise morfológica das interações fúngicas. A, B, C e D: Crescimento das culturas de <i>H. glabra</i> , <i>P.sanguineus</i> e <i>T. lactinea</i> sob fotoperíodo de luz continua, E, F, G e H: Crescimento das culturas de <i>H. glabra</i> , <i>P.sanguineus</i> e <i>T. lactinea</i> sob fotoperíodo de escuro contínuo, I, J, L e M: Crescimento das culturas de <i>H. glabra</i> , <i>P.sanguineus</i> e <i>T. lactinea</i> sob fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro..... | 60 |
| Figura 03 – Produção de biomassa miceliana (gramas), em diferentes regimes de luminosidade, após vinte e dois dias de incubação de <i>H. glabra</i> , <i>P. sanguineus</i> , <i>T. lactinea</i> e Interação..... | 61 |

CAPÍTULO II

| | |
|--|----|
| Figura 01 – Atividade enzimática da Lacase por (U/L) das culturas de <i>H. glabra</i> , <i>P.sanguineus</i> , <i>T. lactinea</i> e interação sob fotoperíodo de luz contínua, na temperatura de 30 °C por 30, 60 e 90 minutos respectivamente..... | 73 |
| Figura 02 – Atividade enzimática da Lacase por (U/L) das culturas de <i>H. glabra</i> , <i>P.sanguineus</i> , <i>T. lactinea</i> e interação sob fotoperíodo de luz contínua, na temperatura de 60 °C por 30, 60 e 90 minutos respectivamente..... | 74 |
| Figura 03 – Atividade enzimática da Lacase por (U/L) das culturas de <i>H. glabra</i> , <i>P.sanguineus</i> , <i>T. lactinea</i> e interação sob fotoperíodo de luz contínua, na temperatura de 90 °C por 30, 60 e 90 minutos respectivamente..... | 75 |

| | |
|--|----|
| Figura 04 – Atividade enzimática da Lacase por (U/L) das culturas de <i>H. glabra</i> , <i>P.sanguineus</i> , <i>T. lactinea</i> e interação sob fotoperíodo de escuro contínuo, na temperatura de 30 °C por 30, 60 e 90 minutos respectivamente..... | 78 |
| Figura 05 – Atividade enzimática da Lacase por (U/L) das culturas de <i>H. glabra</i> , <i>P.sanguineus</i> , <i>T. lactinea</i> e interação sob fotoperíodo de escuro contínuo, na temperatura de 60 °C por 30, 60 e 90 minutos respectivamente..... | 79 |
| Figura 06 – Atividade enzimática da Lacase por (U/L) das culturas de <i>H. glabra</i> , <i>P.sanguineus</i> , <i>T. lactinea</i> e interação sob fotoperíodo de escuro contínuo, na temperatura de 90 °C por 30, 60 e 90 minutos respectivamente..... | 80 |
| Figura 07 – Atividade enzimática da Lacase por (U/L) das culturas de <i>H. glabra</i> , <i>P.sanguineus</i> , <i>T. lactinea</i> e interação sob fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, na temperatura de 30 °C por 30, 60 e 90 minutos respectivamente..... | 83 |
| Figura 08 – Atividade enzimática da Lacase por (U/L) das culturas de <i>H. glabra</i> , <i>P.sanguineus</i> , <i>T. lactinea</i> e interação sob fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, na temperatura de 60 °C por 30, 60 e 90 minutos respectivamente..... | 84 |
| Figura 09 – Atividade enzimática da Lacase por (U/L) das culturas de <i>H. glabra</i> , <i>P.sanguineus</i> , <i>T. lactinea</i> e interação sob fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, na temperatura de 90 °C por 30, 60 e 90 minutos respectivamente..... | 85 |
| Figura 10 – Atividade enzimática da lacase por (U/L) das culturas de <i>H. glabra</i> , <i>P.sanguineus</i> , <i>T. lactinea</i> e interação sob os regimes de luminosidade de claro contínuo, escuro contínuo e 12 horas de claro e 12 horas de escuro alternadamente..... | 87 |

CAPÍTULO III

| | |
|---|----|
| Figura 01 – Reação redox do DCPIP..... | 96 |
| Figura 02 – Descoloração do DCPIP em 24 horas pelo fungo <i>Hexagonia glabra</i> | 98 |
| Figura 03 – Descoloração do DCPIP em mais de 24 horas pelo fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> | 99 |
| Figura 04 – Descoloração do DCPIP em mais de 24h pelo fungo <i>Trametes lactinea</i> | 99 |
| Figura 05 – Descoloração do DCPIP em 24 horas pela interação fúngica dos três basidiomicetos..... | 99 |

| | |
|---|-----|
| Figura 06 – Descoloração do DCPIP em 24 horas pelo fungo <i>H. glabra</i> submetido a uma maior quantidade de diesel..... | 100 |
| Figura 07 – Descoloração do DCPIP em 24 horas pela Interação fúngica submetida a uma maior quantidade de diesel..... | 101 |

2 LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|---|----|
| Tabela 01 – Classificação enzimática..... | 27 |
|---|----|

CAPÍTULO I

| | |
|--|----|
| Tabela 01 – Produção final do crescimento micelial no período de 08 dias nos diferentes regimes de luminosidade..... | 57 |
| Tabela 02 – Análise de variância (ANOVA) do crescimento micelial nos diferentes fotoperíodos..... | 58 |
| Tabela 03 – Análise de Tukey para o crescimento do micélio nos diferentes regimes de luz..... | 58 |
| Tabela 04 – Produção final de biomassa no período de 22 dias em diferentes regimes de luminosidade..... | 61 |
| Tabela 05 – Análise de variância (ANOVA) da biomassa produzida nos diferentes fotoperíodos..... | 62 |
| Tabela 06 – Análise de Tukey para produção de biomassa miceliana..... | 62 |

CAPÍTULO II

| | |
|--|----|
| Tabela 01 – Atividade de Lacase produzida pelos fungos basidomicetos durante 22 dias de crescimento sob regime de luz contínua..... | 71 |
| Tabela 02 – Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase em regime de luz contínua..... | 71 |
| Tabela 03 – Análise de Tukey para a atividade enzimática sob o regime de luz contínua..... | 72 |
| Tabela 04 – Atividade de Lacase produzida pelos fungos basidomicetos durante 22 dias de crescimento sob regime de escuro contínuo..... | 76 |

| | |
|---|----|
| Tabela 05 – Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase em regime de escuro contínuo..... | 76 |
| Tabela 06 – Análise de Tukey para atividade enzimática sob o regime de escuro contínuo..... | 77 |
| Tabela 07 – Atividade de Lacase produzida pelos fungos basidomicetos durante 22 dias de crescimento sob regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro..... | 81 |
| Tabela 08 – Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro..... | 81 |
| Tabela 09 – Análise de Tukey para atividade enzimática sob o regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro..... | 82 |

CAPÍTULO III

| | |
|---|----|
| Tabela 01 – Composição do meio mineral..... | 96 |
| Tabela 02 – Tabela 02. Espécies e tempo de resposta dos fungos selecionados ao teste DCPIP..... | 97 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO..... | 18 |
| 2.1 Diversidade e importância ecológica dos fungos..... | 18 |
| 2.1.1 Aplicações biotecnológicas..... | 19 |
| 2.2 Fungos deterioradores de madeira..... | 20 |
| 2.2.1 <i>Hexagonia glabra</i> | 21 |
| 2.2.2 Enquadramento taxonômico..... | 21 |
| 2.2.2.1 Basidioma do gênero <i>Hexagonia</i> | 22 |
| 2.2.2.2 Morfofisiologia..... | 22 |
| 2.2.2.3 Distribuição e Hábitat..... | 22 |
| 2.2.2.4 Sinônimos taxonômicos..... | 23 |
| 2.2.2.5 Composição química..... | 23 |
| 2.2.3 <i>Pycnoporus sanguineus</i> | 23 |
| 2.2.4 Enquadramento taxonômico..... | 23 |
| 2.2.4.1 Basidioma do gênero <i>Pycnoporus</i> | 24 |
| 2.2.4.2 Morfofisiologia..... | 24 |
| 2.2.4.3 Distribuição e Hábitat..... | 24 |
| 2.2.4.4 Sinônimos taxonômicos..... | 25 |
| 2.2.5 <i>Trametes lactinea</i> | 25 |
| 2.2.6 Enquadramento taxonômico..... | 25 |
| 2.2.6.1 Basidioma do gênero <i>Trametes</i> | 25 |
| 2.2.6.2 Morfofisiologia..... | 26 |
| 2.2.6.3 Distribuição e Hábitat..... | 26 |
| 2.2.6.4 Sinônimos taxonômicos..... | 26 |
| 2.3 Enzimas..... | 26 |
| 2.3.1 Enzimas fúngicas..... | 28 |
| 2.3.2 Lacase..... | 29 |
| 2.3.3 Lacase fúngica..... | 30 |
| 2.4 Interações fúngicas de basidiomicetos..... | 30 |

| | |
|---|----|
| 2.4.1 Características gerais de interações fúngicas..... | 30 |
| 2.4.2 <i>In vitro</i> (Em Meios de Cultura)..... | 31 |
| 2.4.3 Substrato Natural..... | 31 |
| 2.4.4 Tipos de interações..... | 32 |
| 2.5 Aplicações biotecnológicas e industriais de metabólitos e compostos produzidos nas interações com basidiomicetos..... | 33 |
| 2.5.1 Na Indústria Alimentícia..... | 33 |
| 2.5.2 Indústria de Polpa e Papel..... | 33 |
| 2.5.3 Indústria Textil..... | 34 |
| 2.5.4 Biorremediação..... | 34 |
| 2.5.5 Aplicações Químicas..... | 35 |
| 2.5.6 Aplicações Cosméticas..... | 35 |
| 2.5.7 Aplicações Farmacêuticas e Médicas..... | 36 |
| 2.5.8 Controle Biológico..... | 37 |
| 2.5.9 Nanotecnologia..... | 37 |
| 2.6 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (hpa) e o meio ambiente..... | 37 |
| 2.6.1 Biodegradação de HPAs..... | 38 |
| 2.7 Condições físico-químicas..... | 40 |
| 2.7.1 Estabilidade térmica..... | 40 |
| 2.7.2 Influência da luminosidade..... | 41 |
| Referências Bibliográficas..... | 42 |
| CAPÍTULO I..... | 51 |
| CAPÍTULO II..... | 66 |
| CAPÍTULO III..... | 90 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|--|
| BDA | Batata dextrose ágar |
| BOD | Demanda de oxigênio bioquímico |
| CEAB | Centro de Energia, Ambiente e Biodiversidade |
| cm | Centímetros |
| DCPIP | 2,6-diclorofenol indofenol |
| EPS | Exopolissacarídeos |
| HPA | Hidrocarboneto policíclico aromático |
| INCT | Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia |
| g | Gramas |
| ml | Militro |
| mm | Milímetro |
| M | Molar |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| HCl | Ácido clorídrico |
| Nm | Nanômetro |
| Ph | Potencial de hidrogênio |
| W | Watts |

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países mais ricos do mundo em megadiversidade, devido à sua extensão e à sua heterogeneidade de ecossistemas. Dentre os organismos mais conhecidos estão às plantas, os animais e uma grande variedade de microrganismos.

O Brasil detém cerca de 20% da biodiversidade mundial sendo a maior parte desta biodiversidade concentrada na região Amazônica. Esta abriga diversas formas de vida com grandes potenciais biotecnológicos, além de inúmeras outras não catalogadas ou mesmo desconhecidas pela ciência (MARTINS DA SILVA, 2010).

Na região Amazônica o clima quente e úmido é favorável ao desenvolvimento de microrganismos, especialmente os fungos que se reproduzem com grande eficiência neste habitat, podendo assim, ser constatado pela diversidade de espécies encontradas nesta região. A Amazônia abriga espécies desconhecidas de fungos, algumas das quais podem ter importantes aplicações biotecnológicas a serem aplicados de forma benéfica ao homem (MACIEL, 2011).

Fungos são organismos surpreendentes e imprescindíveis para o funcionamento dos ecossistemas terrestres, sendo responsáveis pela decomposição de matéria orgânica e pela ciclagem de nutrientes em florestas do mundo todo (BRAGA-NETO, 2012).

Os fungos têm sido bastante usados como produtores de diferentes substâncias de interesse econômico, tais como: enzimas, antibióticos, vitaminas, aminoácidos e esteróides (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004). São também utilizados na biorremediação, biopolpação, controle biológico de pragas, além de serem utilizados na alimentação humana, devido à sua grande quantidade de proteína.

Os efeitos produzidos pelas interações mistas de fungos basidiomicetos apresentam também uma importância fundamental na constatação experimental de que estas inter-atuações podem levar a um aumento significativo da degradação da lignina e de compostos xenobióticos (BALDRIAN, 2004; CHI et al., 2007; SILVA et al., 2008).

Tendo em vista a crescente demanda mundial por enzimas industriais e terapêuticas, os fungos têm despertado a atenção de várias indústrias biotecnológicas ligadas a diversos setores

da economia, pelo fato, de que as enzimas industriais são na sua maior parte, obtidas a partir de microrganismos (OLEMPSKA-BEER et al., 2006).

Entretanto, o estudo sobre as enzimas ligninolíticas secretadas pelos fungos basidiomicetos, se faz necessária para a determinação das características da colonização da madeira, bem como na resolução dos aspectos físicos necessários à produção metabólica envolvida na sua degradação, como: produção de massa micelial, temperatura, luminosidade, etc.

Com os estudos voltados para as enzimas de interesse comerciais, surge o interesse no uso de lacases. Dentre suas várias aplicações podemos destacar: tinturas capilares oxidativas, descoloração de corantes têxteis, descoloração de polpa em indústrias de papeis e celulose, no processamento de alimentos e bebidas, remoção de compostos fenólicos de vinhos, análises de drogas e produção de etanol (MACIEL et al., 2010; MAYER e STAPLES, 2002).

Nos processos biotecnológicos os fungos possuem muitas utilidades aplicadas e muitas outras a serem descobertas, necessitando assim de mais estudos que vinculem o potencial biotecnológico dos fungos às necessidades encontradas atualmente, como o grande problema da poluição dos rios e dos solos, doenças e entre outros.

Sendo assim, é necessária a avaliação de variáveis físicas, tais como a luminosidade e temperatura, no crescimento micelial, na produção da biomassa e na atividade enzimática dos fungos: *Hexagonia glabra*, *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes lactinea* e de sua interação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DIVERSIDADE E IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DOS FUNGOS

É estimada a existência de pelo menos um milhão e quinhentas mil espécies de fungos espalhadas pelo mundo. Desse total estimado apenas cerca de 80.000 espécies foram descritas, ou seja, pelo menos 5% das possivelmente existentes (ARAÚJO, 2007).

Estes organismos são amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados na água, no ar atmosférico, no solo, sobre animais e vegetais vivos parasitando-os, na matéria orgânica em decomposição, nos produtos alimentícios e produtos industriais (ESPÓSITO e AZEVEDO, 2004).

Os fungos são conhecidos como bolores, mofos ou cogumelos comestíveis ou alucinógenos. São tratados de forma pejorativa, como venenosos ou comidas exóticas. Além disso, estes microrganismos são mais lembrados por seus efeitos prejudiciais, como as doenças que causam nos homens e inúmeros materiais que degradam, do que pelos benefícios produzidos por eles. Este grupo de organismos é muito amplo, mesmo havendo espécies prejudiciais ao homem, a grande maioria deles é benéfica e é responsável pela sobrevivência de outros seres vivos, incluindo a espécie humana (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

Cada fungo responde com seu próprio comportamento ao ambiente e é este comportamento que lhe provê uma seletiva e competitiva vantagem em seu nicho ecológico. O fungo modifica o próprio ambiente como uma consequência de suas atividades de crescimento e, em alguns casos, para melhorar suas vantagens competitivas contra outros microrganismos (MORAES, 2001).

O crescimento de fungos, de modo geral, pode ser avaliado pelo aumento da massa celular ou pelo número de células, e é resultado de uma série de eventos altamente coordenados e enzimaticamente catalisados. A expressão máxima do crescimento fúngico é dependente do transporte dos nutrientes necessários, fontes de carbono, nitrogênio, vitaminas e sais minerais, que se transferem para célula e de parâmetros ambientais, como temperatura, luminosidade e pH, que devem ser mantidos no valor ótimo (GIMENES, 2010).

A produção de importantes ácidos orgânicos, fármacos, enzimas, bebidas fermentadas, como o vinho e a cerveja, fermentação de queijos e outros alimentos, controle biológico de pragas em

plantas e produção de etanol são efetuadas por fungos que contribuem assim significativamente na biotecnologia e em diversos setores industriais (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

Ecologicamente podem ser considerados os “lixeiros” do mundo, por degradarem todo tipo de restos orgânicos, transformando-os em elementos assimiláveis pelas plantas (PUTZKE e PUTZKE, 2004), deste modo a atividade fúngica é amplamente responsável pela fertilidade do solo. A produção de biomassa em um ecossistema florestal é, em grande parte controlada por fungos degradadores de madeira, esses seres determinam as taxas de nutrientes liberados no ecossistema (CHO et al., 2009).

2.1.1 Aplicações biotecnológicas

Os fungos causam imensos prejuízos econômicos. Suas atividades prejudiciais como saprófitas incluem os danos à madeira, combustível, alimentos e produtos manufaturados. Como parasitas causam perdas de safras, doenças em seres humanos e animais domésticos. Porém as atividades benéficas de leveduras e outros fungos, no entanto, também são de grande importância econômica (CARLILE, 2001).

A biotecnologia é um conjunto de conhecimentos que permite a utilização de agentes biológicos, microbianos ou de culturas vegetais e animais, visando à obtenção de produtos de interesse industrial. Devido aos microrganismos apresentarem crescimento rápido, menor custo e menor espaço para crescimento, possibilitando maior controle dos processos operacionais (GUERRA e NODARI, 2006).

O desenvolvimento da Biotecnologia tem muita importância, sobretudo para o ambiente, pois ela busca alternativas no controle das atividades que causam degradação a natureza, visando solucionar diversos problemas encontrados atualmente.

A vantagem de métodos biotecnológicos é que suas reações são altamente específicas, não acarretam efeitos adversos ao ambiente, são mais econômicos e podem ser utilizados onde processos químicos são impraticáveis. Do ponto de vista biotecnológico, fungos são microrganismos atraentes por possuírem metabolismo dinâmico e rápido, produtores de metabólitos secundários de interesse e são bons degradadores de substratos (PEREIRA et al., 2008).

No ambiente natural, há interação entre diferentes espécies fúngicas que competem entre si por alimento e espaço. Recentemente, tais interações com os fungos basidiomicetos têm atraído à atenção considerável de diversos pesquisadores na sua aplicação prática para o setor biotecnológico e industrial.

Fungos em cultura mista apresentam diversas vantagens em relação as suas monoculturas, incluindo melhoramento na produtividade de vários metabólitos secundários, adaptação e utilização do substrato (DASHTBAN et al., 2009).

A maioria dos processos biotecnológicos utilizando fungos baseia-se nos seus produtos metabólicos como: fermentação, enzimas e polissacarídeos, que podem ser utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. Além dessas utilizações estas enzimas são utilizadas na biodegradação de compostos xenobióticos, como, por exemplo, no tratamento de efluentes da indústria papelreira e têxtil, e na biorremediação de solos, lençóis freáticos e sedimentos contaminados por compostos orgânicos tóxicos (MACIEL et al., 2010).

Este processo biotecnológico de remediação vem sendo pesquisado e testado, principalmente, em casos de contaminações por hidrocarbonetos. Os sistemas mais utilizados para a biorremediação são os fúngicos, principalmente os fungos filamentosos e leveduras (SILVA e ESPOSITO, 2004).

2.2 FUNGOS DETERIORADORES DE MADEIRA

Os fungos são organismos encontrados nos mais variados substratos, entre os quais se destaca a madeira, interferindo em suas propriedades físicas, químicas e mecânicas, causando sérios danos ao setor florestal e madeireiro (RIBEIRO E AGUIAR, 1993).

Quando atuam na deterioração da madeira, os fungos têm um importante papel ecológico na ciclagem de nutrientes para o solo (OLIVEIRA et al., 1986). Isso é possível, pois esses organismos são os principais agentes decompositores dos componentes primários da madeira, que são a celulose, a lignina e a hemicelulose (CARVALHO et al., 2009).

A madeira só se torna susceptível ao ataque por fungo quando se encontra com 20% ou mais de umidade. A madeira é degradada biologicamente porque os organismos reconhecem os polímeros naturais da parede celular como fonte de nutrição, e alguns destes possuem sistemas

enzimáticos específicos capazes de metabolizá-los em unidades digeríveis (BLANCHETTE et al., 2004).

As enzimas utilizadas para a degradação dos componentes da parede celular pelos fungos degradadores de madeira podem apresentar potencial para uso industrial. Cada componente químico pode ser metabolizado por diferentes enzimas, sendo assim, podemos classificar a podridão da madeira em função do tipo de componente químico que é atacado (LIMA et al., 2005).

Os fungos capazes de promover a degradação enzimática das paredes celulares da madeira podem ser classificados em três grupos ecofisiológicos: os causadores de podridão branca, os de podridão parda e de podridão mole (TUOMELA et al., 2000).

Os fungos basidiomicetos mais conhecidos formam estruturas de reprodução macroscópicas e são conhecidos popularmente por cogumelos e orelhas de pau. Estão presentes em ambientes aquáticos e terrestres, podem ser parasitas, sapróbios e micorrízicos. São na sua maioria saprófitas e participam da decomposição de folhas, galhos e troncos, sendo encontrados em uma grande variedade de substratos e em diferentes biomas. Sua grande importância, em termos ecológicos é o papel que desempenham na ciclagem de nutrientes (GIMENES, 2010).

2.2.1 *Hexagonia glabra*

2.2.2 Enquadramento taxonômico

De acordo com Gilbertson e Ryvarden (1986) o fungo *Hexagonia glabra* (P.Beauv) apresenta o seguinte enquadramento taxonômico.

Reino: Fungi

Subreino: Dikaria

Divisão: Eumycota

Filo: Basidiomycota

Classe: Basidiomycetes

Ordem: Polyporales

Família: Polyporaceae

Gênero: *Hexagonia*

Espécie: *Hexagonia glabra*

Nome Binominal: *Hexagonia glabra* (P.Beauv)

2.2.4.1 Basidioma do gênero *Hexagonia*

O basidioma do gênero *Hexagonia* é macroscópico, bem desenvolvido, possui superfície abhiminal vilosa, glabra na maturidade, concêntricamente zonadas. Consiste de Basidiósporos cilíndricos e grandes. Os Basidiocarpos são anuais e perenes, fileados, sésseis, flabeliformes a semicirculares e possuem consistência coriácea (GILBERTSON e RYVARDEN, 1986; MACIEL, 2011).

2.2.4.2 Morfofisiologia

O sistema hifal trimítico e os basidiósporos cilíndricos são características que podem ser confundidas com os gêneros *Trametes* e *Coriolopsis*. Por outro lado, possuem características peculiares: os poros grandes (1 por mm) e rasos, de formato hexagonal, o basidioma fino (1-3 mm de espessura), o píleo velutino e fortemente zonado concêntricamente (GILBERTSON e RYVARDEN, 1986).

2.2.4.3 Distribuição e Hábitat

Os basidiomicetos do gênero *Hexagonia* apresentam ampla distribuição nos biomas terrestres. Possuem papel fundamental na degradação da celulose e lignina dos materiais vegetais lenhosos, deste modo, ajudam na ciclagem de nutrientes e na manutenção dos ecossistemas. Seu hábitat natural é o interior de matas.

Há aproximadamente 136 espécies do gênero *Hexagonia*. A espécie *Hexagonia glabra* apresenta distribuição pantropical e está amplamente distribuída no mundo. No Brasil foi citada para os estados do Amazonas, Maranhão, Pará, Rio de Janeiro, Rondônia, Roraima e São Paulo (GILBERTSON e RYVARDEN, 1986).

2.2.4.4 Sinônimos taxonômicos

- *Favolus glaber* (P.Beauv.) 1819

- *Hexagonia glaba* (P.Beauv.) 1846

- *Daedalea flavida* (P.Beauv.) 1946

2.2.4.5 Composição química

O gênero *Hexagonia* produz substâncias denominadas de polissacarídeos que são encontradas amplamente nos fungos (CHEN et al. 1999).

2.2.5 *Pycnoporus sanguineus*

2.2.6 Enquadramento taxonômico

De acordo com Ryvar den e Johansen (1980) o fungo *Pycnoporus sanguineus* (L.: Fr.) Murr. apresenta o seguinte enquadramento taxonômico:

Reino: Fungi

Divisão: Eumycota

Filo: Basidiomycota.

Classe: Basidiomycetes

Ordem: Polyporales.

Família: Polyporaceae.

Gênero: *Pycnoporus*

Espécie: *Pycnoporus sanguineus*

Nome Binomial: *Pycnoporus sanguineus* (L.: Fr.) Murr.

2.2.6.1 Basidioma do gênero *Pycnoporus*

O basidioma do gênero *Pycnoporus* apresenta coloração vermelho-claro a vermelho-alaranjado, glabra no centro e tomentoso na base. No gênero *Pycnoporus* o *P. sanguineus* distingue-se das demais espécies encontradas pela sua cor avermelhada. Os basidiocarpos são anuais, sésil a subestipitado e possuem consistência coriácea (NOBLES e FREW, 1962).

2.2.6.2 Morfofisiologia

Esta espécie apresenta uma frutificação semi-circular e encontra-se distribuída horizontalmente contra os caules das árvores. Sua superfície é lisa e ligeiramente marcada em zonas concêntricas por sua coloração com dimensões que variam de 2,0 x 7,0 x 1,5-4,5 cm (LEPP, 2011).

2.2.6.3 Distribuição e Hábitat

Evidências genéticas e morfológicas indicam a presença de três espécies para o gênero *Pycnoporus*: *P. cinnabarinus* (Jacq. Ex Fr.) Karst., que ocorre em regiões de clima temperado no hemisfério Norte; *P. coccineus* (Fr.) Bond e Sing., que ocorre em regiões de clima temperado do hemisfério sul e em países vizinhos à Índia e oceano pacífico; e *P. sanguineus* (L. Ex Fr.) Murr., que caracteriza-se por ser um cogumelo de ocorrência ampla, sendo facilmente encontrado em regiões tropicais e subtropicais dos hemisférios Norte e Sul (NOBLES e FREW, 1962).

Pycnoporus sanguineus é cosmopolita e comum no Brasil, e está associado a clareiras em florestas, sugerindo uma provável adaptação a ambientes pouco úmidos ou com temperaturas elevadas (RYVARDEN e JOHANSEN, 1980).

O *P. sanguineus* desenvolve-se especialmente em locais com ações antrópicas destrutivas, tais como, troncos caídos ou queimados (HERRERA e ULLOA, 1998). De acordo com Smânia e colaboradores (1998), apesar do gênero *Pycnoporus* possuir ocorrência pantropical, a única espécie encontrada no Brasil é a de *P. sanguineus*. A sua distribuição é relatada para Amapá, Pará (SOTÃO et al., 2003), Paraná (RYVARDEN e MEIJER, 2002),

Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte (GIBERTONI et al., 2004), Rio Grande do Sul (GROPOSO e LOGUERCIO-LEITE, 2002).

2.2.6.4 Sinônimos taxonômicos

- *Polystictus sanguineus* (L.) G. Mey., 1818
- *Polyporus sanguineus* (L.) Fr., 1821
- *Microporus sanguineus* (L.) Pat., 1900
- *Coriolus sanguineus* (L.) G. Cunn., 1949

2.2.7 *Trametes lactinea*

2.2.8 Enquadramento taxonômico

De acordo com Ryvarden e Johansen (1980) o fungo *Trametes lactinea* (Berk) apresenta o seguinte enquadramento taxonômico:

Reino: Fungi

Divisão: Eumycota

Filo: Basidiomycota

Classe: Basidiomycetes

Ordem: Polyporales

Família: Polyporaceae

Gênero: *Trametes*

Espécie: *Trametes lactinea*

Nome Binominal: *Trametes lactinea* (Berk)

2.2.8.1 Basidioma do gênero *Trametes*

O basidioma do gênero *Trametes* é caracterizado por ser anual e por ter consistência flexível. Constituem-se de pileus semicirculares, com cerca de 4 cm de comprimento e 6 cm de

espessura. Enquanto fresco, apresenta coloração acinzentada e à medida que amadurece adquire cor amarelada (RECK, 2009).

2.2.8.2 Morfofisiologia

Crescimento rápido em meio de cultura (5,5 cm em uma semana). Pileus com 7,5 cm no raio, séssil, algumas vezes com a base discóide. Esporos medindo (5,5-6,6 x 2,5-3 um), branco, elipsoide para subcilíndrico. É constituído por hifas trimiticas (RYVARDEN e JOHANSEN, 1980).

2.2.8.3 Distribuição e Hábitat

A distribuição do *Trametes lactinea* é pantropical. Segundo Ryvarden e Johansen (1980) *T. lactinea* é uma espécie rara, e é conhecida no Sul da África, Austrália e Filipinas.

2.2.8.4 Sinônimos taxonômicos

- *Polyporus lactineus* (Berk) 1843
- *Coriolus lactineus* (Berk) 1843
- *Trametes levis* (Berk) 1847
- *Trametes lamaoensis* (Murrill) 1907

2.3 ENZIMAS

A palavra enzima, do grego énzymo (em: na; zymos: levedura) foi sugerida por Kunhe em 1878, no seu primeiro trabalho, como nome genérico para “fermentos” que atuavam na ausência de organismos ou fora deles (BON et al., 2008).

Segundo Forgiarini (2006) as enzimas podem ser classificadas de acordo com vários critérios. O mais importante foi estabelecido pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), que estabelece 6 classes (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação enzimática.

| Classe | Descrição | Sub-classe |
|----------------|---|--------------------------------------|
| Oxidoredutases | Catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja: reações de oxidação-redução. | desidrogenases, redutases e oxidases |
| Transferases | Catalisam reações de transferência de grupos funcionais como grupos amina, fosfato, acil e carboxil. | quinases e transaminases |
| Hidrolases | Catalisam reações de hidrólise de ligação covalente. | Peptidases |
| Liases | Catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico. | dehidratases e as descarboxilases |
| Isomerases | Catalisam reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos. | Epimerases |
| Ligases | Catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas já existentes, sempre às custas da energia (ATP). | Sintetases |

As enzimas são proteínas com propriedades catalisadoras sobre as reações que ocorrem nos sistemas biológicos. Elas têm um elevado grau de especificidade sobre seus substratos acelerando reações específicas sem serem alteradas ou consumidas durante o processo (MOTTA, 2009).

Segundo Lehninger (2010), a catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Sob condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas.

As enzimas são usadas, em grande escala, na indústria de tecidos (celulases), detergentes (proteases e lipases), de alimentos (amilases, pectinases, proteases e celulases) e de couro (proteases e lipases) (MOTTA, 2009).

A vantagem da utilização de enzimas em muitos processos deve-se à menor produção de subprodutos residuais, o que propicia a obtenção de produtos de melhor qualidade e com menor probabilidade de poluição do meio ambiente. Outras vantagens da aplicação de enzimas estão relacionadas com o custo de produção relativamente baixo, susceptibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, espectro amplo de características físico-químicas de diferentes enzimas (geralmente relacionadas ao habitat e fisiologia do microrganismo produtor), susceptibilidade de manipulação genética e por representarem um recurso natural renovável (MARTINS DA SILVA, 2010).

2.3.1 Enzimas fúngicas

O crescimento e as atividades metabólicas distintas dos organismos são uma resposta às condições ambientais que os rodeiam. Os fungos, como todos os organismos vivos, podem modificar seu ambiente e utilizar os compostos químicos presentes no meio como fonte de energia para seu crescimento e reprodução (MACIEL, 2011).

A maioria dos fungos produtores de enzimas necessárias à degradação de materiais lignocelulósicos (madeira, palhas, cascas, etc.) pertencem aos grupos Ascomycetes, Deuteromycetes e Basidiomycetes. Os fungos que vivem em madeiras mortas que preferentemente degradam um ou mais componentes da madeira, causam três tipos de degradação: marrom, branca e macia. A maioria destes é capaz de degradar lignina em alguma extensão, embora preferentemente ataquem a celulose na madeira (NEPOMUCENA, 2010).

São três as principais enzimas diretamente envolvidas na degradação da lignina por basidiomicetos: Peroxidase dependente do manganês (MnP), Peroxidase da lignina (LiP), e Lacases (Lac). Acredita-se ser encontrada agindo na superfície das hifas em contato com as células de parede celular, reagindo com um grande número de compostos fenólicos (MACIEL et al., 2010)

2.3.2 Lacase

A primeira descrição da enzima lacase foi feita em 1883 por Yoshida, originada na árvore de laca japonesa *Rhus vernicifera* e em 1985 foi caracterizada como uma oxidase contendo metal (MAYER e STAPLES, 2002). A distribuição de lacase é bastante ampla sendo reconhecidos dois grupos principais, as lacases extraídas de plantas superiores e as produzidas por fungos, apresentando estes grupos claras diferenças, mas há também relatos da presença de lacase em bactérias (BALDRIAN, 2006).

Devido à capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, 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; MAYER e STAPLES 2002).

Lacases (E.C.1.10.3.2) são oxiredutases que fazem parte de um grupo de enzimas denominadas enzimas constituídas por cobre que oxida os polifenóis utilizando o oxigênio como aceptor final de elétrons e que inclui entre outras, ácido ascórbico oxidase e ceruloplasmina (MAYER e STAPLES, 2002). As oxiredutases são enzimas que catalisam processos de oxidação e redução, e constituem um grupo que compreende quase um quarto de todas as enzimas conhecidas, entre as quais estão as lacases e as peroxidases.

As lacases são principalmente glicoprotéínas extracelulares ligadas ao cobre bivalente, o qual é reduzido durante a oxidação de fenóis e subsequentemente oxidado novamente ao estágio bivalente pelo oxigênio (KLONOWSKA et al., 2002; MAYER e STAPLES, 2002; CLAUS, 2004).

Lacases são proteínas globulares contendo entre 10-25% de carboidrato *N*-ligado e elas podem ter estruturas monoméricas, diméricas ou multiméricas, compreendendo subunidades de 45 à 80 kDa, dependendo da espécie e isoforma. Fungos ligninolíticos frequentemente expressam múltiplos genes de lacase, codificando isoenzimas com alta similaridade na estrutura primária, mas diferentes características físico-químicas (BROWN et al., 2002).

Vários estudos têm demonstrado a participação da lacase em eventos ligninolíticos significativos que incluem a oxidação de unidades não-fenólicas da lignina, a geração de H₂O₂

requerida tanto para as atividades peroxidases como para a formação de radical oxídrico (OH), e a produção de Mn^{3+} a partir de Mn^{2+} presente nos lignocelulósicos (NEPOMUCENA, 2010).

Não há dúvidas que as propriedades bioquímicas e físico-químicas de lacase (atividade, estabilidade, pH e temperatura ótimos, etc.) fornecem muitas informações iniciais importantes para estudos básicos e para a aplicação de lacases na biotecnologia (MOUGIN et al., 2003; SHLEEV et al., 2004). Algumas características de lacases como, massa molecular, pH ótimo de atividade e substrato específico são extremamente diversos (MAYER e STAPLES, 2002).

2.3.3 Lacases fúngicas

Lacases fúngicas têm sido encontradas em diferentes gêneros de ascomicetos, *Aspergillus*, *Neurospora* e *Podospora*, alguns deuteromicetos, *Botrytis* e principalmente basidiomicetos, *Collybia*, *Fomes*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Trametes* particularmente aqueles associados com madeira deteriorada ou em estágio terminal de decomposição (BALDRIAN, 2006).

Os melhores produtores de lacase são basidiomicetos pertencentes ao grupo dos fungos de decomposição branca, eficientes degradadores de madeira (MAYER e STAPLES, 2002).

As lacases fúngicas têm um enorme potencial de aplicação na indústria devido à grande diversidade de substratos que podem oxidar. Assim, pode se salientar a sua utilização na modificação de ligninas industriais para obtenção de produtos de valor agregado, na indústria de polpa e de papel para redução do volume de produtos químicos utilizados, nas indústrias têxtil e de detergente para inibição da transferência dos corantes sintéticos, e na produção de resinas fenólicas. A utilização das lacases fúngicas em escala industrial já é uma realidade (BALDRIAN, 2006).

2.4 INTERAÇÕES FÚNGICAS DE BASIDIOMICETOS

2.4.1 Características gerais de interações fúngicas

As interações fúngicas são drasticamente dependentes das condições ambientais, do tamanho relativo do território, da capacidade de utilização dos recursos nutritivos e da habilidade

combativa dos componentes ou constituintes envolvidos na associação (BODDY, 2000; WALD et al., 2004). Segundo Boddy (2000), os resultados de interações fúngicas com basidiomicetos em meios de cultura e substrato natural não são necessariamente os mesmos, devendo-se tomar muito cuidado ao interpretar os dados obtidos em laboratório.

2.4.2 *In vitro* (Em Meios de Cultura)

O teor d'água, pH e temperatura são fatores importantes no desfecho de interações fúngicas *in vitro*. Espécies diferentes são afetadas distintamente por estes parâmetros físicos, como observou Boddy (2000). O resultado de interações de linhagens diferentes de uma mesma espécie de fungo, não é sempre o mesmo contra um determinado oponente e há também algumas diferenças entre repicados (WALD et al., 2004).

Na literatura há relatos de que nas culturas mistas com basidiomicetos frequentemente ocorre a produção de pigmentos inter e intracelulares, barreiras na zona de interação e mudanças na atividade na oxidação fenólica (BODDY, 2000; CHI et al., 2007; HISCOX et al., 2010; PEIRIS et al., 2008; WALD et al., 2004). Outrossim, os estudos realizados por vários pesquisadores demonstraram que nas co-culturas com basidiomicetos há um aumento significativo na produção de metabólitos secundários (enzimas extra-celulares, compostos voláteis, compostos anti-tumorais, metabólitos anti-oxidantes, metabólitos anti-microbianos, etc..) em comparação com as suas monoculturas (BALDRIAN, 2004; CHI et al., 2007; HISCOX et al., 2010; PIERIS et al., 2008; WALD et al., 2004; ZHENG et al., 2011).

2.4.3 Substrato Natural

Nas interações fúngicas com basidiomicetos, frequentemente foram constatadas também mudanças morfológicas (tais como a formação de barreiras miceliais), alterações metabólicas (principalmente compostos fenólicos), indução das enzimas fenoxidases e peroxidases, aumento na produção de voláteis e mudanças químicas como o aumento ou redução no nível de gás carbônico durante a evolução do processo de associação (BALDRIAN, 2004; BODDY, 2000; HYNES et al., 2007; PEIRIS et al., 2008). Estudos revelaram ainda que em substrato natural, durante interações fúngicas inter-específicas, pode ocorrer alteração na função dos

micélios, incluindo a re-alocação e distribuição de nutrientes no interior dos mesmos e no mecanismo de respiração (BODDY, 2000).

2.4.4 Tipos de interações

De modo geral, há dois principais tipos descritos de interações para os fungos basidiomicetos: 1) a interferência ou antagonismo e 2) o sinergismo (BALDRIAN, 2004; BODDY, 2000; CHI et al., 2007; FALCONER et al., 2008; PEIRIS et al., 2008; SILVA et al., 2008). A interação do tipo interferência ou antagonismo é definido como o processo onde um organismo inibe o outro. Boddy (2000) efetuou uma boa revisão dos vários sub-tipos de interações antagônicas com basidiomicetos. Uma interação antagonista típica entre basidiomicetos comumente resulta em stress oxidativo, que consequentemente produz espécies reativas ao oxigênio, e, que por sua vez tem função importante no decaimento fúngico da madeira (HAMMEL et al., 2002).

Por outro lado, no que concerne as interações sinérgicas entre basidiomicetos, estas são definidas como mecanismos em que as espécies atuam conjuntamente ou coordenadamente de forma benéfica para as respectivas espécies associadas na degradação do mesmo substrato (BODDY, 2000). Aumento na atividade da enzima ligninolítica “lacase”, foi produzido durante as interações sinérgicas entre dois basidiomicetos de espécies diferentes (BALDRIAN, 2004; CHI et al., 2007; IAKOVLEV e STENLID, 2000). A indução da atividade da lacase é uma típica resposta de uma grande gama de basidiomicetos a interações inter-específicas (BALDRIAN, 2004). Dentre as enzimas ligninolíticas, a lacase é a que dá a resposta mais rápida nas interações fúngicas. Dessa forma, por meio de interações sinérgicas, culturas mistas fúngicas podem levar a uma produção enzimática elevada, cujo resultado final dependerá da combinação particular das espécies envolvidas, ou do modo de interação entre as espécies e das condições ambientais ou nutricionais do substrato sob colonização (CHI et al., 2007). Para compreensão deste processo, deve-se encorajar o emprego de co-culturas de basidiomicetos para o melhoramento da produtividade das enzimas ligninolíticas em escala comercial.

2.5 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS E INDUSTRIAIS DE METABÓLITOS E COMPOSTOS PRODUZIDOS NAS INTERAÇÕES COM BASIDIOMICETOS

2.5.1 Na Indústria Alimentícia

Durante as interações fúngicas entre basidiomicetos ocorrem frequentemente mudanças quantitativas, as quais podem incluir aumento significativo na produção de metabólitos secundários de importância econômica na indústria alimentícia. Na co-cultura dos basidiomicetos *Stereum hirsutum* e *Coprinus disseminatus*, por exemplo, ocorreu um aumento substancial na produção do ácido málico em comparação com as suas monoculturas (PEIRIS et al., 2008). O ácido málico (2-hidroxiutanodióico) é um ácido orgânico amplamente utilizado na indústria alimentícia na composição de geléias, marmeladas e bebidas de frutas (DEMAIN, 2000; MATTEY, 1992). Hynes e colaboradores (2007) constataram também um aumento importante na produção do volátil metil benzoato ou benzoato de metila, comumente empregado como flavorizante nos alimentos (KEMPLER, 1983; LOMASCOLO et al., 1999), durante a interação entre os basidiomicetos *Hypholoma fasciculare* e *Resinicium bicolor*. A produção de aromas e fragâncias de biosíntese microbiana via processos biotecnológicos têm grande importância na indústria de alimentos devido ao aumento de preferência do consumidor por aditivos alimentares naturais e outros compostos de origem biológica (LOMASCOLO et al., 1999; PANDEY et al., 2000a; 2000b; 2000c).

2.5.2 Indústria de Polpa e Papel

Na fabricação do papel a partir da madeira é necessário a redução da lignina (que é um dos principais componentes da madeira), a fim de produzir a massa do papel. Atualmente, a despolimerização da lignina por fungos basidiomicetos de decomposição branca (biopolpação) constitui uma alternativa importante nos tratamentos biotecnológicos de aplicação industrial e pode ser usada como um pré-tratamento efetivo para os processos de produção de celulose e papel (CHI et al., 2007). A biopolpação é uma tecnologia cuja aplicação apresenta benefícios em comparação aos demais tipos de pré-tratamentos, no que se refere a produção de polpas mais resistentes e também pela grande economia de energia ou de produtos químicos (FERRAZ,

2007). Contudo, nenhum experimento utilizando cultura mista de basidiomicetos de decomposição branca no processo de biopolpação tinha sido relatado na literatura até a publicação do trabalho recente de Chi e colaboradores, em (2007). Estes pesquisadores constataram o potencial de biopolpação na co-cultura dos basidiomicetos *Pleurotus ostreatus* e *Ceriporiopsis subvermispora*.

Portanto, deve ser encorajado o estudo mais profundo de interações fúngicas com culturas mista de basidiomicetos, para a compreensão efetiva do processo de degradação da lignina, e, outrossim, como um método de otimização de biopolpação (CHI et al., 2007).

2.5.3 Indústria Textil

Na cultura mista dos basidiomicetos *Stereum hirsutum* e *Coprinus disseminatus*, o metabólito 1,2 – dihidroxiantraquinona, composto análogo a alizarina que é amplamente empregado nas indústrias têxteis de tinturas (COLLIN, 2001), foi produzido em maior quantidade do que nas culturas puras ou simples destes respectivos fungos (PEIRIS et al., 2008). O desenvolvimento de processos têxteis envolvendo tais metabólitos resultantes de interações de basidiomicetos podem ser muito promissores, visto que provavelmente serão de remoção fácil dos efluentes industriais, uma vez que não possuem origem sintética (PEIRIS et al., 2008)

2.5.4 Biorremediação

O homem é responsável pela poluição ambiental e tem que efetuar ações necessárias para a recuperação e a preservação do meio que o cerca. O emprego de culturas fúngicas para o tratamento e eliminação de poluentes é mais e mais usado (IKEHATA et al., 2004; MACIEL et al., 2010; POINTING, 2001). Os resultados de algumas pesquisas sugerem claramente que os poluentes tóxicos industriais podem ser efetivamente removidos por basidiomicetos e a toxicidade pode ser eliminada por este tratamento biológico (D' SOUZA et al., 2006; IKEHATA et al., 2004; LEE et al., 2005; POINTING, 2001). Atualmente, alguns estudos mostram que interações de basidiomicetos de espécies diferentes podem ser utilizados como ferramentas potenciais na biodegradação de poluentes químicos.

Neste enfoque, Lee e colaboradores (2005) obtiveram degradação efetiva do bifesnol A e redução de sua atividade estrogênica nos estudos de interação dos basidiomicetos *Stereum hirsutum* e *Heterobasidium insulare* em meio de cultura mista. O bifesnol A (BPA: 4,4'-dihidroxi-2,2-difenil propano) é um composto químico usado amplamente na síntese química de polímeros industriais causando sérios problemas de poluição ambiental, e, além disso, suspeita-se fortemente de que é também um disruptor endócrino (mimetizando os hormônios do organismo), muito prejudicial à saúde humana (LEE et al., 2005).

A biorremediação empregando interações de basidiomicetos é uma tecnologia promissora na restauração de solo contaminado com poluentes tais como o bisfenol.

2.5.5 Aplicações Químicas

O crescimento na utilização de enzimas hidrolíticas fúngicas está muito impulsionado pela expansão contínua destas respectivas enzimas especializadas na geração de produtos químicos. E, neste enfoque, pesquisas estão sendo realizadas para a obtenção e melhoramento das enzimas hidrolíticas de fungos. Há um relato na literatura, no qual foi descrito que na interação interespecífica dos micélios dos basidiomicetos *Hypholoma fasciculare* e *Phanerochaete velutina* ocorreu um grande aumento na produção das enzimas hidrolíticas: N-acetilglucosaminidase, alfa-glucosidase e fosfomonoesterase, em comparação com a secreção das mesmas pelos fungos isoladamente (SNAJDR et al., 2011). Estas enzimas hidrolíticas estão entre os principais alvos da pesquisa biotecnológica pelo grande potencial de aplicação no setor de síntese orgânica e inorgânica de indústrias química (BARATTO et al., 2011; GOÉS e RIBEIRO, 2002).

2.5.6 Aplicações Cosméticas

Há mais de uma década, formulações cosméticas contendo alfa-hidroxiácidos tem sido amplamente utilizadas e constituem uma nova opção terapêutica para uma variedade de condições cutâneas (VAN SCOTT e YU, 1989a e b). Apesar dos inúmeros benefícios dos alfa-hidroxiácidos no setor de cosméticos, ainda há muito poucas pesquisas na obtenção destes compostos produzidos pela interação de fungos basidiomicetos.

Na cultura mista, por exemplo, dos basidiomicetos *Stereum hirsutum* e *Coprinus micaceus*, foi constatado a ocorrência de um grande aumento na produção do alfa-hidroxiácido piruvato em comparação com as suas culturas simples (PEIRIS et al., 2008). O piruvato ou ácido pirúvico é utilizado frequentemente em cosméticos no tratamento de verrugas simples e em altas concentrações (95% a 99%) nas queratoses (NARDIN e GUTERRES,1999).

2.5.7 Aplicações Farmacêuticas e Médicas

Atualmente, o grande problema da saúde mundial é o câncer, que ocasiona a segunda maior causa de morte de pessoas de várias raças e idades, conduzindo a elaboração de diversas técnicas e métodos para encontrar um tratamento eficaz contra esta doença. A enorme importância do emprego de compostos derivados de fungos basidiomicetos na atividade moduladora da resposta imune humana e na inibição de determinados tumores, têm focado a pesquisa na descoberta de novos metabólitos fungicos capazes de produzir efeitos anti-tumorais (DABA e EZERONYE, 2003). Neste contexto, o estudo realizado com a cultura mista dos basidiomicetos *Inonotus obliquus* e *Phellinus punctatus* foi altamente eficiente no aumento da produção de vários metabólitos anti-tumorais e anti-oxidantes, em comparação com as suas monoculturas (ZHENG et al., 2011).

O co-cultivo dos basidiomicetos *Lentinus edodes* e *Cordyceps sinensis* estimulou significativamente a produção de citoquinas em sistema *in vitro* utilizando macrófagos murinos (KAWANISHI et al., 2010). Sabe-se que há uma redução muito importante na imunidade de pacientes com câncer e assim se faz necessário elevar as citoquinas, as quais estimulam e regulam a resposta imunológica e constituem uma parte essencial da imunidade anti-tumoral humana (NISHIMURA et al., 2000).

Ainda, no que concerne ao câncer, o composto correlacionado de hexose ativa (AHCC) é um extrato preparado de co-cultura de várias espécies de micélios de basidiomicetos medicinais, incluindo o shitake (*Lentinus edode*), que apresenta atividade anti-tumoral (DABA e EZERONYE, 2003). Este composto fúngico demonstrou notável inibição de metástases de vários tipos de cânceres humanos (DABA e EZERONYE, 2003; GAO et al., 2006; KIDD, 2005). Desta forma, a cultura mista de basidiomicetos parece ser uma estratégia efetiva no

fornecimento de produtos naturais biologicamente ativos ou na biosíntese de metabólitos bioativos.

2.5.8 Controle Biológico

O uso potencial de basidiomicetos antagonistas como agentes de controle biológico na proteção contra fungos patógenos da madeira tem sido reconhecido nestas duas últimas décadas. Segundo Body (2000), o exemplo mais bem sucedido deste tipo de biocontrole ocorreu na interferência hifal do basidiomiceto *Phlebiopsis gigantea* contra o estabelecimento do basidiomiceto *Heterobasidion annosum*. O emprego de bioinseticidas em substituição ao químico apresenta vantagens principalmente no que concerne aos custos financeiros e ambientais (SILVA et al., 2008). Contudo, este tipo de controle biológico com basidiomicetos antagonistas permanece ainda um campo muito pouco explorado.

2.5.9 Nanotecnologia

O desenvolvimento de nanotecnologia está emergindo nesta última década e abre inúmeras perspectivas para novos tipos de produtos de grande importância econômica. As interações com basidiomicetos na produção de nanomateriais apresentam um grande significado biotecnológico e industrial, nas suas diversas aplicações.

Na interação fúngica dos dois basidiomicetos *Hypholoma fasciculare* e *Resinicium bicolor*, por exemplo, houve um aumento substancial na produção do metabólito álcool benzílico (HYNES et al., 2007), que é um composto que tem sido usado como solvente dielétrico para a reconfiguração dieletrorética de nanofios (HAYNES, 2010).

2.6 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA's) E O MEIO AMBIENTE

O petróleo é um recurso natural, não renovável, sendo utilizado como a principal fonte energética mundial. Nos processos que envolvem atividades com petróleo e seus derivados, ocorrem vazamentos rotineiros ou acidentais que impactam ecossistemas, sendo necessário a utilização de medidas corretivas e de controle (BENTO, 2005).

Em Manaus o intenso fluxo de embarcação e o vazamento de óleo diesel são as principais atividades antrópicas responsáveis pela introdução de compostos químicos do diesel nos rios, causando a contaminação das águas, sedimentos e solos na região.

A composição química do petróleo, conforme Freedman (1995) e Marques Jr. (2002), é complexa, variável e extremamente influenciada por condições físicoquímicas, biológicas e geológicas do ambiente de formação. O petróleo natural ocorre como uma mistura de compostos orgânicos, principalmente hidrocarbonetos que são, quantitativamente, os mais importantes constituintes do petróleo, podendo ser divididos em três partes: alifáticos, alicíclicos e aromáticos.

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são representantes de uma classe de compostos aromáticos denominados benzenóides e caracterizam-se por apresentar dois ou mais anéis benzênicos fundidos (SOLOMONS, 2012).

As propriedades químicas dos HPA's são dependentes do número de anéis aromáticos e da configuração da molécula. Geralmente, o aumento no tamanho e na angulação da molécula resulta no aumento da hidrofobicidade e estabilidade eletroquímica (OLIVEIRA, 2010).

Os HPA's possuem caráter lipofílico, hidrofóbico, baixa biodegradabilidade e potencial acumulativo. À temperatura ambiente todos os HPA's são sólidos e apresentam, comumente, altas temperaturas de fusão e ebulição (CARUSO E ALABUDA, 2008).

Podem ser encontrados em diversos compartimentos ambientais tais como atmosfera, solo, água, sedimento e por bioacumulação pode também estar incorporado aos organismos vegetais e animais (FURLAN JUNIOR, 2006). Geralmente as concentrações de HPA's encontradas no meio ambiente estão relacionadas as atividades humanas, como combustão incompleta de combustíveis fósseis, derrame de óleo, tráfego de navios e efluentes industriais (CHANG et al., 2002).

Os HPA's são altamente lipossolúveis e rapidamente absorvidos pelos pulmões, intestinos e pele de homens e animais. A partir do momento que são absorvidos pelas células, os HPA's são metabolicamente ativados tornando-se reativos a grupos nucleofílicos presentes em macromoléculas celulares (MEIRE, 2007).

Os efeitos biológicos dos HPA podem ser a mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade. Esses efeitos nos organismos são inversamente proporcionais à massa molar do composto, assim quanto menor a massa molar do HPA, 2 à 3 anéis aromáticos, prevalece caráter

tóxico, enquanto HPA que apresentam de 4 à 6 anéis aromáticos apresenta alto potencial de mutagenicidade (NASCIMENTO et al., 2007).

Esse grupo de compostos constitui uma potencial ameaça para a saúde de toda a população. Consumidores de alimentos defumados, fumantes, indivíduos em contato com ambiente contaminado (água e ar), e trabalhadores ocupacionais expostos de forma direta a HPA, podem apresentar elevadas propensões ao desenvolvimento de tumores e câncer (MEIRE et al., 2007).

2.6.1 Biodegradação de HPA's

Existem algumas tecnologias que permite a recuperação ou remediação de ambientes contaminados ou degradados. Tais tecnologias se baseiam nas propriedades químicas de substâncias ou processos físicos que serão utilizados para retenção, mobilização ou destruição de um determinado contaminante. Estas tecnologias podem ser aplicadas *in situ*, isto é, no local da contaminação, ou *on/off-site*, que primeiramente deve remover o material contaminado para outro local (AMBIENTALBRASIL, 2010).

A biodegradação é o processo pelo qual os compostos orgânicos são degradados biologicamente, através de reações em cadeia do tipo oxidação, redução, hidrólise, desalogenação, condensação entre outros. Por intermédio dessas reações, essas substâncias perigosas podem ser mineralizadas a CO₂ e H₂O, transformadas em outros compostos menos tóxicos ou, às vezes, com maior toxicidade do que o inicial. (ZAGATTO et al., 2006).

No meio ambiente os HPA podem sofrer transformações por diversos processos, como a foto-oxidação, volatilização e oxidação química. Porém, acredita-se, que a degradação realizada por Microrganismos é um dos principais processos para remover esses compostos de sedimentos contaminados, na realidade, ele representa uma estratégia primária pelo qual os contaminantes são eliminados do meio ambiente (OLIVEIRA, 2010; OSTBERG et al., 2007).

A biodegradação ocorre inicialmente por catabolismo aeróbico onde a microbiota nativa encontra-se em um ambiente com oxigênio e nutrientes necessários para poder utilizar os HPA'S como fonte de carbono e energia, este é um processo lento que sofre influência de fatores ambientais como o pH, temperatura, potencial redox, umidade e nutrientes (OLIVEIRA, 2010; RAYMOND et al., 2001; REGINATTO et al., 2011).

Em geral, a biodegradação do petróleo e de seus derivados é um processo sequencial, em que os n-alcenos são os primeiros hidrocarbonetos a serem quebrados, seguidos por iso-alcenos, cicloalcenos, aromáticos com 1-3 anéis, poliaromáticos, asfaltenos e resinas (GREENWOOD et al., 2008).

Os microrganismos são considerados biodegradadores eficientes devido a sua abundância, a diversidade de espécies, e sua versatilidade catabólica e anabólica, bem como a sua capacidade de adaptação a condições ambientais adversas (MORAES e TORNISIELO, 2009).

Desde o início do século XX são conhecidas espécies de bactérias e fungos com capacidade de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono aerobicamente. Entretanto, somente no fim da década de 1980, foram identificados organismos que realizam este processo em condições anaeróbias (POSSAMAI et al., 2011).

A década de 1950 pode ser considerado um marco em função de muito estudos terem sido realizados na época com a finalidade de atestar a capacidade dos microrganismos na degradação de HPA, como o isolamento de pertencentes principalmente aos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Paracoccus*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Gordonia*, *Flavobacterium* (MUTNURI et al., 2005) e diversos fungos dos gêneros *Chrysosporium*, *Phanerochaete*, *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *Cunninghamella*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Aspergillus*, *Bjerkandera*, e etc (JACQUES et al., 2005).

Entretanto algumas características dos fungos, como a bioatividade, de degradar materiais diversos no ambiente, sua capacidade de crescer sob condições ambientais de estresse, como meios com baixos valores de pH, pobres em nutrientes e com baixa atividade de água, o que favorece o seu desenvolvimento diante de outros microrganismos, além de seu crescimento morfológico, os tornam potencialmente melhores degradadores do que as bactérias (ATAGANA, 2006; MOLLEA et al., 2005).

Segundo Whiteley e Lee (2006) as enzimas Lacase, Lignina peroxidase e Manganês peroxidase também são responsáveis pela biodegradação oxidativa de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. De acordo com Majcherczyk e colaboradores (1998) a utilização de lacase pode ser estendida para a degradação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, por ser

considerada uma enzima oxidativa, produzida pelos fungos basidiomicetos, útil para recuperação de ambientes contaminados.

2.7 CONDIÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS

2.7.1 Estabilidade térmica

As enzimas ligninolíticas têm sido amplamente utilizadas na indústria, devido ao grande aumento de sua aplicação em diversos processos. As enzimas ligninolíticas têm potencial de uso em biocombustíveis, alimentos, bebidas, cosméticos, indústrias de fabricação de polpa e papel, setor têxtil, biorremediação, entre outros. Esse sistema enzimático também é utilizado em degradação de compostos xenobióticos, tinturas, e plásticos (MACIEL et al. 2010). Desse modo, as indústrias necessitam de cepas fúngicas produtoras de enzimas termoestáveis capazes de resistir ao processo industrial. Para responder a esta exigência, foi consagrado parte deste trabalho a caracterização das enzimas ligninolíticas termoestáveis.

2.7.2 Influência da luminosidade

A luz exerce efeito direto sobre o basidiomiceto, induzindo ou inibindo o crescimento micelial do fungo. A literatura é muito escassa no que concerne a ação da luminosidade sobre a produção de metabólitos secundários como a atividade de enzimas ligninolíticas secretadas por basidiomicetos (NOZAKI et al., 2004).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, W. L. **Genética e Melhoramento de Fungos na Biotecnologia**, 2007.

ATAGANA, H. I.; HAYNES, R. J. & WALLIS, F. M. Fungal Bioremediation of creosote contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 172, p. 201-219, 2006.

BALDRIAN, P. Increase of laccase activity during interpecific interactions of white-rot fungi **FEMS Microbiology Ecology** v. 50, p. 245–25, 2004.

BALDRIAN, P. Fungal laccase – Occurrence and properties, **FEMS Microbiology Letters**, v. 30, p. 215 – 242, 2006.

BENTO, D. M. Análise Química da Degradação dos Hidrocarbonetos de Óleo Diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica). Universidade Federal do Rio Grande, Rio grande –RS, 2005.

BLANCHETTE, R. A.; HELD, B. W.; JURGENS, J. A.; HAIGHT, J. E. Wood deterioration in Chacoan great houses of the southwestern United States. **Conservation and Management of Archaeological Sites**, v. 6, p. 203-212, 2004.

BODDY, L. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 31, p. 185–194, 2000.

BON, E. P. S.; PEREIRA, N.; GOTTSCHALK, M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT [Portugal], p. 532, 2008.

BRAGA-NETO, R. Novas espécies de fungos compravam riqueza da Amazônia. **Eco Fauna e Flora**. v. 46, p. 13 – 17, 2012.

BROWN, M. A.; ZHAO, Z.; MAUK, A. G. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. **Inorganica Chimica Acta**, v. 331, p. 232-238, 2002.

CARLILE, M. J.; GOODAY, G. W.; WATKINSON, S. C. **The Fungi**. 2ª ed. New York: Academic Press, p. 588, 2001.

CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. **Revista do Insituto Adolfo Lutz**. n. 67, p. 1-27, 2008.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 34, p. 1-5, 2009.

CAVALCANTE, R. M.; FILHO, N. S. M.; VIANA, R. B.; OLIVEIRA I. R. N.; NASCIMENTO, R. F.; SILVEIRA, E. R.; FREIRE, G. E. E. Utilização da extração em fase

sólida (SPE) na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em matrizes aquosas ambientais. *Química Nova*, v. 3, p. 560-564, 2007.

CHANG, B. V.; SHIUNG, S. Y.; YUAN, S. Y. Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. *Chemosphere*, v. 48, p. 717-724, 2002.

CHEN, D. H.; SHION, W. Y.; WANG, K. C.; HUANG, S. Y.; SHIE, Y. T.; TSAI, C. M.; SHIE, J. F.; CHEN, K.W. Chemotaxonomy of triterpenoid pattern of HPLC of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, v. 46, p. 47-51, 1999.

CHI, Y; HATAKKA, A; MAIJALA P. Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes. *International Biodeterioration & Biotechnology*, v. 59, p. 32–39, 2007.

CHO, N. S.; WILKOLAZKA, A.; STASZCZAC, M.; CHO, H. Y.; OHGA, S. The role of lacase from white rot fungi to stress conditions. *Journal of the Faculty of Agriculture*, v. 54, n. 1, p. 81–83, 2009.

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

COLLIN, H. A. Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, v. 34, p. 119–134, 2001.

DABA, A. S.; EZERONYE, O. U. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *African Journal of Biotechnology*, v. 2, p. 672–678, 2003.

DEMAIN, A. L. Microbial Technology. *Trends in Biotechnology*, v. 18, p. 26–31, 2000.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues: Opportunities & Perspectives. *International Journal of Biological Sciences*, v. 5, p. 78–595, 2009.

DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA L. Applications of laccases and tyrosinas (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 3, p. 907-931, 2002.

D'SOUZA, T. D.; TIWARI, R.; SAH, A. K.; RAGHUKUMAR, C. Enhanced production of laccase by marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, p. 504–511, 2006.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** Orgs. Elisa Esposito e João Lúcio Azevedo. Caxias do Sul: EDUCS, p. 510, 2004.

FALCONER, R. E.; BOWN, J. L.; WHITE, N. A, CRAWFORD, J. W. Modelling interactions in fungi. *Journal of the Royal Society Interface*, v. 5, p. 603–615, 2008.

- FERRAZ, A. Desenvolvimento de biopolpação no Brasil. **O Papel**, v. 68, p. 44–53, 2007.
- FORGIARINI, E. **Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis Pela Enzima Horseradish Peroxidase (HRP)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- FURLAN JÚNIOR, O. **Distribuição de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos na região da serra catarinense • comparação entre metodologias de extração e avaliação do impacto ambiental**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2006.
- GAO, Y.; ZHANG, D.; SUN, B.; FUFII, H.; KOSUNA, K-I.; Yin, Z. Active hexose correlated compound enhances tumor surveillance through regulating both innate and adaptative immune responses. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 55, p. 1258–1366. 2006.
- GIBERTONI, T. B.; RYVARDEN, L.; CAVALCANTI, M. A. Q. Poroid fungi (Basidiomycota) of the Atlantic Rain Forest in Northeast Brazil. **Synopsis Fungorum**, v. 18, p. 33-43, 2004.
- GILBERTSON, R. L.; RYVARDEN, L. **North American Polypores**. v. 1. Oslo. Fungiflora, 433 p. *Hexagonia glabra* (P. Beauvois) Ryvarden. 1986.
- GIMENES, L. J. Fungos Basidiomicetos: Técnicas de coleta, isolamento e subsídios para processos biotecnológicos. 2010. Disponível em: <http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Fungos_Basidiomicetos_Luciana_J_Gimenes.pdf>. Acesso em: 18 de Jan 2012.
- GOÉS, S. P.; RIBEIRO, M. L. L. Alpha-galactosidase: aspectos gerais e sua aplicação em produtos a base de soja. **Semina ciências agrárias**, v. 23, p. 111–119, 2002.
- GREENWOOD, C.; WIBROW, S.; GEORGE, S. J.; TIBBETT, M. Sequential hydrocarbon biodegradation in a soil from arid coastal Australia, treated with oil under laboratory controlled conditions. **Organic Geochemistry**, v. 39, p. 1336–1346, 2008.
- GROPOSO, C.; LOGUERCIO-LEITE, C. Fungos poliporóides xilófilos (Basidiomycetes) da Reserva Biológica Tancredo Neves, Cachoeirinha, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, série botânica**, v. 57, p. 39-59, 2002.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Introdução ao conceito de biotecnologia: cultura de tecidos vegetais. **Steinmacher**, v. 2, p. 1-40, 2006.
- GUGLIOTTA, A. M.; CAPELARI, M. **Taxonomia de basidiomicetos**. In: Bonomi, V. L. R. Grgl. Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas, Instituto de Botânica, São Paulo, p. 184, 1998.
- HAMMEL, K. E.; KAPICH, A. N.; JENSEN, J. R. K. A.; RYAN, Z. C. Reactive oxygen species as agent of wood decay by fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 445–453, 2002.
- HAYNES, W. M. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**, Boca Raton, CRC Press/ Taylor and Francis, 91 ed, p. 2610, 2010.

HERRERA, T.; ULLOA, M. **El reino de los hongos: Micología básica y aplicada**. Universidad nacional autónoma de México, p. 552, 1998.

HISCOX, J.; BALDRIAN, P.; ROGERS, H. J.; BODDY, L. Changes in oxidative enzyme activity during interspecific mycelial interactions involving the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, p. 562–571, 2010.

HYNES, J.; MULLER, C. T.; JONES, T. H.; BODDY, L. Changes in volatile production during the course of fungal mycelial interactions between *Hypholoma fasciculare* and *Resinicium bicolor*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, p. 43–57, 2007.

IAKOVLEV, A.; STENLID, J. Spatiotemporal patterns of laccase activity in interacting mycelia of wood decaying basidiomycete fungi. **Microbial Ecology**, v. 39, p. 236–245, 2000.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, L. D.; SMITH, D. W. Recent development in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. **Journal of Environmental Engineering Science**, v. 3, p. 1–19, 2004.

JACQUES, R. J. S. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas sp* isolated from a petrochemical sludge landfarming. **International Biodeterioration and Biodegradation, London**, v. 56, n. 3, p. 150–156, 2005.

KAWANISHI, T.; IKEDA-DANTSUJI, Y.; NAGAYAMA, A. Effects of two basidiomycete species on interleukin 1 and interleukin 2 production by macrophage and T cell lines. **Immunobiology**, v. 215, p. 516 – 520, 2010.

KEMPLER, G. M. Production of flavor compounds by microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v. 29, p. 29–51, 1983.

KLONOWSKA, A.; GAUDIN, C.; FOURNEL, A.; ASSO, M.; PETIT, J. L.; GIORGI, M.; TRON, T. Characterization of a low potential laccase from the basidiomycete C30. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 6119–6125, 2002.

KIDD, P. M. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. **Alternative Medicine Review**, v. 5, p. 4–7, 2005.

LEE, S. M.; KOO, B. W.; CHOI, J. W.; CHOI, D. H.; AN, B. S.; JEUNG, E. B.; CHOI, I. G. Degradation of bisphenol A by white rot fungi, *Stereum hirsutum* and *Heterobasidium insulare*, and reduction of its estrogenic activity. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 8, p. 201–207, 2005.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**, 4 edição. São Paulo: SARVIER, 2010.

LEPP, H. Cosmopolitan and pan-tropical species. Australian National Botanic Gardens, Fungi. 2011. Disponível em: <<http://www.anbg.gov.au/fungi/mycogeography-cos-pan.html>>. Acesso em: 13 de Jan 2012.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**, v. 3, São Paulo: Edgard Blucher, 2005.

LOMASCOLO, A.; STENTELAIRE, C.; ASTHER, M.; LESAGE-MEESSEN, L. Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 282–289, 1999.

MACIEL, M. J. M. **Influência e parâmetros físicos na atividade oxidativa do fungo *Hexagonia glabra* (P.Beauv) Ryvarden**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2011.

MACIEL, M. J. M.; CASTRO E SILVA, A.; RIBEIRO, H. C. T. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycetes. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 6, p.1-13, 2010.

MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO, J. F.; ROBBINS, P. W. Glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Shizoccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. **Analytical Biochemistry**, v. 336, n. 2, p. 202-212, 2005.

MARIANO, A. P. Aerobic Biodegradation of Butanol and Gasoline Blends. **Biomass and Bioenergy**, n. 33, p. 1175-1781, 2009.

MARTINS DA SILVA, N. **Avaliação do potencial antimicrobiano, enzimático e crescimento de um Isolado Amazônico do Fungo *Pycnoporus sanguineus***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2010.

MATTEY, M. The production of organic acids. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 43, p. 87 – 132, 1992.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccases: New functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551-565, 2002.

MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. M. Aspectos Ecotoxicológicos de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. **Oecology Brasil**, v. 11 , n.2, p. 188-201, 2007.

MIRANDA, V. J. M. Degradação de naftaleno, fenantreno e benzene(a)pireno em solos e sedimentos de ambientes cossteiros, oceânicos e antárticos. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.

MOLLEA, C.; BOSCO, F.; RUGGERI, B. Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. **Chemosphere**. n. 60, p. 636–643, 2005.

MORAES, I. O. Produção de Microrganismos. In: LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**, 1ª ed., v. 3, São Paulo: EDGARD BLUCHER, p. 199-214, 2001.

MORAES, B. E.; TORNISIELO, T. M. S. Biodegradation of Oil Refinery Residues Using Mixed- Culture of Microorganisms Isolated from a Landfarming. **Brazilian archives of Biology and technology**, v.52, n. 6, p. 1571-1578, 2009.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para o laboratório: Princípios e Interpretações**, 5ª ed., Rio de Janeiro: MEDBOOK, p. 400, 2009.

MOUGIN, C.; JOLIVALT, C.; BRIOZZO, P.; MADZAK, C. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. **Environmental Chemistry Letters**, v. 1, p. 145-148, 2003.

MUTNURI, S. Degradation of anthracene and pyrene supplied by microcrystals and non-aqueous-phase liquids. **APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**. v. 67, n.4, p. 569-576, 2005.

MUZZARELLI, R. A. A.; MILIANI, M.; CARTOLARI, M.; TARSI, R.; TOSI, G.; MUZZARELLI, C. Polyuronans obtained by regiospecific oxidation of polysaccharides from *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* and *Saprolegnia* sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, n.1, p. 55-61, 2000.

NARDIN, P.; GUTERRES, S. S. Alfa-hidroxiácidos: aplicações cosméticas e dermatológicas. **Caderno de Farmácia**, v. 15, p. 7–14, 1999.

NASCIMENTO, R. F. et al. Utilização da extração em fase sólida (SPE) na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em matrizes aquosas ambientais. **Química Nova**, n. 30, v. 3, 560-564, 2007.

NEPOMUCENA, R. M. P. **Avaliação do potencial microbiano de crescimento e secreção de lacase do fungo Amazônico *Lentinus crinitus* (L. ex Fr.) Fr.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2010.

NISHIMURA, T.; NAKUI, M.; SATO, M.; IWAKABLE, K.; KITAMURA, H.; SEKIMOTO M. The critical role of Th-1 dominant immunity in tumor immunology. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 46, p. 552–561, 2000.

NOBLES, M. K.; FREW, B. P. Studies in wood-inhabiting hymenomycetes. The genus *Pycnoporus* Karst. **Canadian Journal of Botany**, v. 40, p. 987-1016, 1962.

NOZAKI, M. H.; CAMARGO, M.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 429-432, 2004.

OLEMPKA-BEER, Z. S.; MERKER, R. I.; DITTO, M. D.; DINOVI, M. J. Food-processing enzyme from recombinant microorganisms – a review. **Regulation Toxicology Pharmacy**, vol. 45, n. 2, p. 144–158, 2006.

OLIVEIRA, C. R. **Avaliação da biodegradação de Pireno pela microbiota nativa em sedimento do Manguezal do Itacorubi**. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

OLIVEIRA, A. M. F.; LELIS, A. T. de; LEPAGE, E. S.; CARBALLERA LOPEZ, G. A.; SAMPAIO OLIVEIRA, L. C. de; CAÑEDO, M. D.; MILANO, S. Agentes destruidores da madeira. In: LEPAGE, E. S. (Coord.). Manual de preservação de madeiras. São Paulo: IPT, v. 01, p. 99-278, 1986

OSTBERG, T. L.; JONSSON, A. P.; BYLUND, D.; LUNDSTRÖM, U. S. The effects of carbon sources and micronutrients in fermented whey on the biodegradation of n-hexadecane in diesel fuel contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 60, p. 334-341, 2007.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, p. 135–152, 2000a.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153–1169, 2000b.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Biotechnology potential of agro-industrial residues, Part II, Cassava bagasses. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 81–87, 2000c.

PEIRIS, D.; DUNN, W. B.; BROWN, M.; KELL, D. B.; ROY, I.; HEDGER, J. N. Metabolite profiles of interacting mycelial fronts differ for pairings of the wood decay basidiomycete fungus, *Stereum hirsutum* with its competitors *Coprinus disseminates*. **Metabolomics**, v. 4, p. 52–62, 2008.

PEREIRA, N.; BON, E. P. S.; FERRARA M. A. **Tecnologia de bioprocessos**, v. 1, Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, p. 62, 2008.

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

POSSAMAI, P. S.; SPAGIARI, M. S.; WASZAK, D. Q.; BIZANI, D.; CUNHA, A. C. B. et al. Quantificação de Benzo(a)Pireno por CG-MS em solos próximos de termelétricas utilizando o processo de biorremediação. **Mouseion**, n.10, p. 191-207, 2011.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**, v. 2, Santa Cruz do Sul: EDUNISC, p. 521, 2004.

QIAN, L.; CHEN, B. Enhanced oxidation of benzo[a]pyrene by crude enzyme extracts produced during interspecific fungal interaction of *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, p. 1639–1646, 2012.

RAYMOND, J. W.; ROGERS, T. N.; SHONNARD, D. R.; et al. “ A review of structure-based biodegradation estimation methods” **Journal of Hazardous Materials**, B84, p. 189-215, 2001.

RECK, M. A. **Políporos (Basidiomycota) em remanescentes da mata atlântica**. Dissertação (Mestrado em Botânica), Instituto de Biociência, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

REGINATTO, C.; COLLA, L.; THOME, A. Biorremediação de Resíduos Oleosos em Solos. **Revista CIATEC – UPF**, v. 3, p. 19-31, 2011.

RIBEIRO M. N. S.; AGUIAR I. J. A. Hymenomyces deterioradores de madeira em serrarias de Manaus, AM, Brasil, **Acta Amazônica**, v. 23, p. 219–225, 1993.

RYVARDEN, L.; JOHANSEN, I. A preliminary polypore flora of east Africa, *Fungiflora*, oslo, p. 636, 1980.

RYVARDEN, L.; MEIJER, A. A. R. Studies in neotropical polypores: New species from the State of Paraná. Brazil. **Synopsis Fungorum**, v. 15, p. 34-69, 2002.

SHLEEV, S. V.; MOROZOVA, O. V.; NIKITINA, O. V.; GORSHINA, E. S.; RUSINOVA, T. V.; SEREZHENKOV, V. A.; BURBAEV, D. S.; GAZARYAN, I.; YAROLOPOV, A. Comparison of physico characteristics of laccases from different basidiomycetes. **Biochimie**, v. 86, p. 693-703, 2004.

SILVA, M; ESPOSITO, E. O papel dos fungos na recuperação ambiental In: ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. (Coords.) *Fungos: Uma introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia*. Caxias do Sul: EDUCS, p. 339, 2004.

SILVA, K. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; BOMFIM, M. P.; SILVA, S. D.; SÃO JOSÉ, A. R.; BENETT, C. G. S. Atividade antagônica in vitro de isolados de *Trichoderma spp* ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina ciências agrárias**, v. 29, p. 749–754, 2008.

SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA, A. Jr.; LOGUÉRCIO LEITE, C. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. **Revista de Microbiologia**, v. 29, n. 4, p. 1-7, 1998.

SNAJDR, J. J.; DOBIÁSOVA, P. P.; VETROVSKY, T. T.; VALASKOVA, V. V.; ALAWI A. A.; BODDY, L. L.; BALDRIAN, P. P. Saprotrophic basidiomycete mycelia and their interspecific interactions affect the spatial distribution of extracellular enzymes in soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78, p. 80–90, 2011.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. *Química Orgânica*. Traduzido por Júlio Carlos Afonso. 10 ed. v. 2, Rio de Janeiro: LTC, 2012.

SOTÃO, H. M. P.; CAMPOS, E. L.; GUGLIOTTA A. M.; COSTA, S. P. S. E. **Fungos macroscópicos: Basidiomycetes**. In: M.E.B. Fernandes (org.). **Os manguezais da costa norte brasileira**. Fundação Rio Bacanga, São Luís, p. 45-59, 2003.

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

VAN SCOTT, E. J.; YU, R. J. Alpha-hydroxy acids: procedures for use in clinical practice. **Cutis**, v. 43, p. 222–229, 1989a.

VAN SCOTT, E. J.; YU, R. J. Alpha hydroxy acids: therapeutic potentials. **Canadian Journal of Dermatology**, v. 1, p. 108–112, 1989b.

WALD, P.; PITKÄNEN, S.; BODDY, L. Interspecific interactions between the rare tooth fungi *Creolophus cirrhatus*, *Hericium erinaceus* and *H. Coralloides* and other wood decay species in agar and wood. **Mycological Research**, v. 108, p. 1447–1457, 2004.

WANG, T.; DENG, L.; LI, S.; TAN, T. Structural characterization of a water-insoluble (1 → 3) - α -D-glucan isolated from the *Penicillium chrysogenum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n.1, p. 133-137, 2007.

WHITELEY, C. G.; LEE, D.-J. Enzyme technology and biological remediation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 291–316, 2006.

ZAGATTO P. A.; BERTOLETTI, E. (Orgs.). **Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

ZHENG, W.; ZHAO, Y.; ZHENG, X.; LIU, Y.; PAN, S.; DAI, Y.; LIU, F. Production of antioxidant and antitumor metabolites by submerged cultures of *Inonotus obliquus* cocultured with *Phellinus punctatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 157 – 167, 2011.

CAPÍTULO I

**Efeito do regime de luz no crescimento do micélio e
biomassa miceliana de basidiomicetos Amazônicos e de sua
interação.**

Efeito do regime de luz no crescimento do micélio e biomassa miceliana de basidiomicetos Amazônicos e de sua interação.

Souza, J. O.; Fantin, C.; Barroso, H. S.; Ribeiro, H. C. T

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas, Brasil, Manaus.

Resumo

Neste trabalho, estudou-se o crescimento radial do micélio e produção de biomassa miceliana dos fungos *Hexagonia glabra* (UEA201), *Pycnoporus sanguineus* (UEA209), *Trametes lactinea* (UEA202) e sua interação, preservados na coleção da Universidade do Estado do Amazonas. Utilizaram-se os meios de cultura BDA (para o crescimento) e BD (para produção de biomassa) à temperatura de 28 °C em pH 5. Três diferentes regimes de luminosidade (12 h claro/ 12 h escuro, claro contínuo e escuro contínuo) foram utilizados para verificar a biomassa e o crescimento dos fungos. Foram observadas variações no crescimento do micélio e na produção da biomassa nos diferentes regimes de luminosidade testados, sendo que, para todos os isolados, o regime de claro contínuo induziu um maior crescimento micelial e uma maior produção de biomassa fúngica, em um menor período de tempo em relação aos demais regimes estudados. Em todos os regimes de luminosidade, as interações dos três basidiomicetos estudados produziram menor biomassa miceliana do que estas obtidas em suas monoculturas. Os resultados das análises morfológicas das interações fúngicas, mostram que o crescimento do *T. lactinea* foi inibido pelo crescimento do *H. glabra*, entretanto, os mesmos crescem sobre o fungo *P. sanguineus*, ocorrendo a formação da zona de sobreposição.

Palavras-chave: biomassa fúngica, crescimento micelial, fotoperíodo, cultura mista.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos basidiomicetos são muito importantes graças a sua ampla utilização como produtores de diferentes substâncias de interesse econômico em vários setores industriais e biotecnológicos (MACIEL et al., 2010). Estes fungos despertam grande interesse como possíveis fontes de inúmeros metabólitos secundários bioativos, fundamentais para a exploração biotecnológica (MACIEL, 2011). Estudos relacionados com agentes físicos que podem afetar o desenvolvimento destes microrganismos são essenciais para uma melhor compreensão dos seus mecanismos biológicos, e, dentre as variáveis físicas mais importantes diretamente relacionada com os mesmos está a luminosidade.

A luminosidade é um dos fatores abióticos mais importantes para o desenvolvimento do ciclo biológico dos fungos (LOUREIRO et al., 2002). Segundo Nozaki e colaboradores, (2004) a luz exerce efeito direto sobre o basidiomiceto, induzindo ou inibindo o crescimento micelial. Outrossim, a intensidade da luz é um fator que pode afetar tanto a taxa de crescimento vegetativo, como a forma e o tamanho de uma grande maioria das espécies fúngicas (SANTOS et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2001).

A luminosidade também é um fator de grande importância na peroração de culturas mistas de fungos *in vitro* (BODDY, 2000). De acordo, com Wald e colaboradores (2004) as interações fúngicas são drasticamente dependentes das condições ambientais, tais como a luminosidade. Há relatos na literatura de que espécies diferentes de fungos são afetadas distintamente por este parâmetro físico (BODDY, 2000).

No ambiente natural, há interação entre diferentes espécies fúngicas que competem entre si por alimento e espaço. Recentemente, tais interações com os fungos basidiomicetos têm atraído a atenção considerável de diversos pesquisadores na sua aplicação prática para o setor biotecnológico (WALD et al., 2004). Interações fúngicas em cultura apresentam diversas vantagens em relação as suas monoculturas, incluindo melhoramento na produtividade de vários metabólitos secundários, adaptação e utilização do substrato (DASHTBAN et al., 2009).

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a influência da presença e ausência de luminosidade, durante o período de cultivo *in vitro* de *Hexagonia glabra*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes lactinea* e de sua interação para se obter maior velocidade de crescimento do micélio e produção de biomassa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Para realização do experimento foram utilizadas culturas dos fungos *H. glabra* (UEA201), *P. sanguineus* (UEA209) e *T. lactinea* (UEA202), preservadas na coleção do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia/ Centro de Energia, Ambiente e Biodiversidade da Universidade do Estado do Amazonas. Foi utilizado o meio Batata-dextrose-ágar (BDA) para o desenvolvimento e manutenção da colônia dos fungos.

Os experimentos foram conduzidos avaliando-se o crescimento do micélio e a biomassa miceliana dos fungos selecionados, na temperatura de 28 °C, sob três fotoperíodos, luz contínua, escuro contínuo e regime alternado de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, iniciando-se o experimento com período de 12 horas sob luz. Todos os experimentos foram conduzidos em estufa incubadora BOD com controle de temperatura e iluminação fornecida por quatro lâmpadas fluorescentes Philips 15 W/75 (luz do dia) (CASA et al., 2007). Em todos os ensaios conduzidos, os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5.0.

2.2 Crescimento do micélio

O crescimento do micélio foi quantificado em placas de Petri de vidro de 84 mm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA, previamente esterilizadas em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Os meios de cultura foram feitos em triplicata utilizando discos de micélio, com sete dias de incubação e 10 mm de diâmetro. As placas foram incubadas conforme respectivos tratamentos.

As avaliações do crescimento micelial foram realizadas com o auxílio de um paquímetro, medindo-se o diâmetro da colônia em quatro direções ortogonais, a cada vinte e quatro horas, durante a incubação até a obtenção do crescimento em toda a placa (DONINI et al., 2006).

Para as análises morfológicas das interações fúngicas foi empregado o método de cultura pareada em disco de Ágar. Cada placa de Petri de 84 mm, contendo o meio de cultura BDA, recebeu dois discos de micélio de 10 mm de diâmetro, em lados opostos da placa. As avaliações morfológicas foram feitas a cada 12 horas, o que permitiu analisar o tipo de interação presente (SILVA et al., 2008).

2.3 Biomassa miceliana

A determinação da biomassa fúngica foi obtida pela filtragem do meio de cultura líquido batata-dextrose (BD) em papel filtro Watmann, transferindo-se a massa para pequenos vidros previamente pesados (Peso inicial – Pi), depois a biomassa foi seca em neofilizador até obter peso constante (Peso final – Pf). Através da diferença entre Pf e Pi obteve-se a biomassa miceliana (em gramas) para cada cultivo utilizado sob os diferentes tratamentos (BERNARDI, et al., 2008). As avaliações da produção foram realizadas no período de vinte e dois dias.

2.4 Análise dos dados

Para análise estatística dos dados coletados foi usado o software Bioestat 5.0 para obter os parâmetros descritos (média, desvio padrão, variância) e correlação entre as variáveis. Para a interferência sobre a relação entre as variáveis a serem mensuradas foi utilizado o teste ANOVA e para contraste das médias o Teste de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Crescimento do micélio nos diferentes fotoperíodos

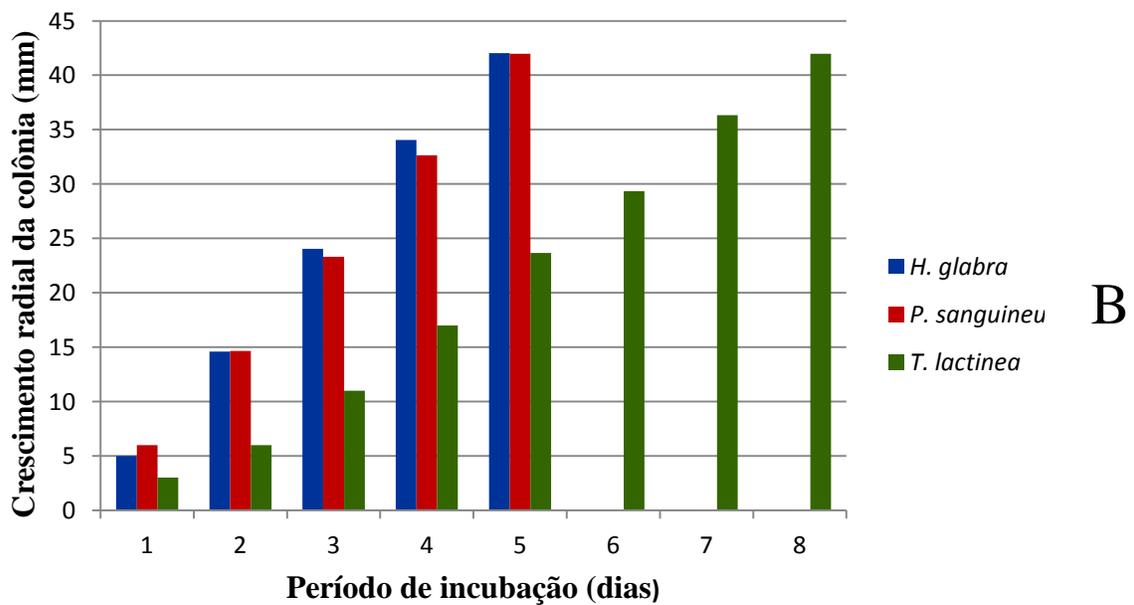
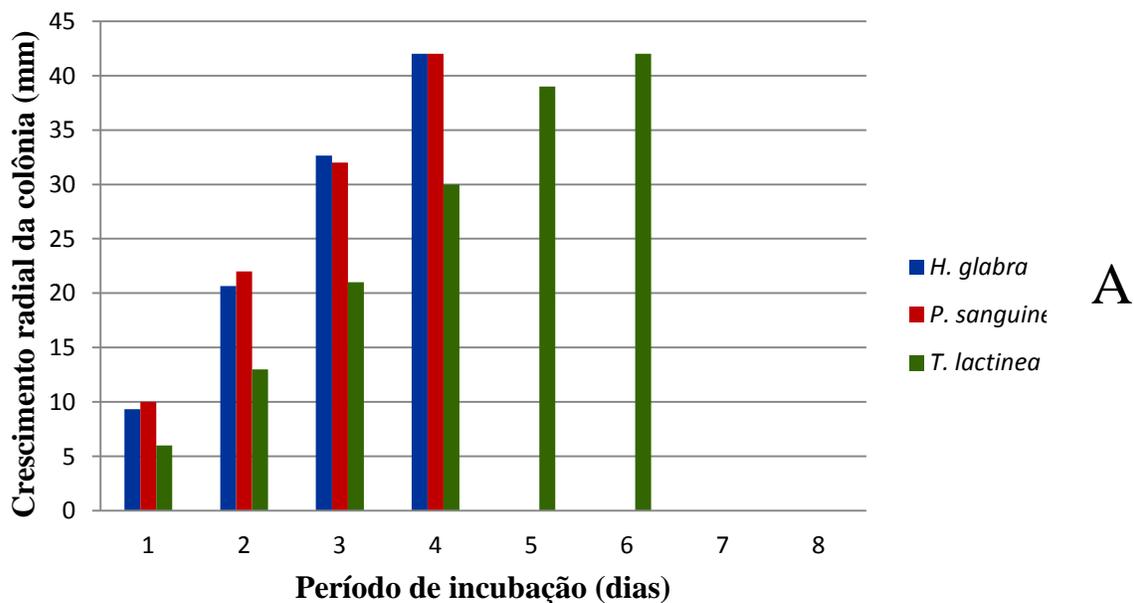
Considerando-se os períodos de luminosidade, observou-se que o crescimento do micélio tanto de *H. glabra* quanto de *P. sanguineus* foi mais rápido sob fotoperíodo de luz contínua, sendo que as colônias dos fungos atingiram as bordas das placas de petri 48 horas antes do isolado *T. lactinea*, submetido ao mesmo regime de luminosidade (Figura 01 A).

Entretanto, os mesmos isolados que obtiveram maior crescimento do micélio em luz contínua, tiveram seu crescimento micelial semelhante nos regimes de escuro contínuo e alternado. Observou-se também que o micélio do fungo *T. lactinea*, cobriu completamente a placa de Petri, após 168 horas de incubação sob regime alternado de luz, enquanto que sob escuro contínuo foram necessárias 192 horas de incubação (Figura 01 B e C)

Resultados semelhantes foram obtidos por Nozaki e colaboradores (2004) estudando o efeito da temperatura e os regimes de luz sobre o crescimento do micélio e a caracterização de *Diaporthe citri*. Neste, observaram que na presença de luz contínua, a maioria dos isolados apresentou maior crescimento micelial em relação aos demais regimes de luz.

Segundo Stolzer e Grabbe (1991), a velocidade de crescimento é fundamental na seleção de linhagens para o cultivo de fungos, pois nas etapas seguintes a competitividade entre

organismos habitantes do mesmo substrato é um fator preocupante, sendo que o de maior velocidade se estabelecerá primeiro inibindo o crescimento dos demais componentes deste ambiente.



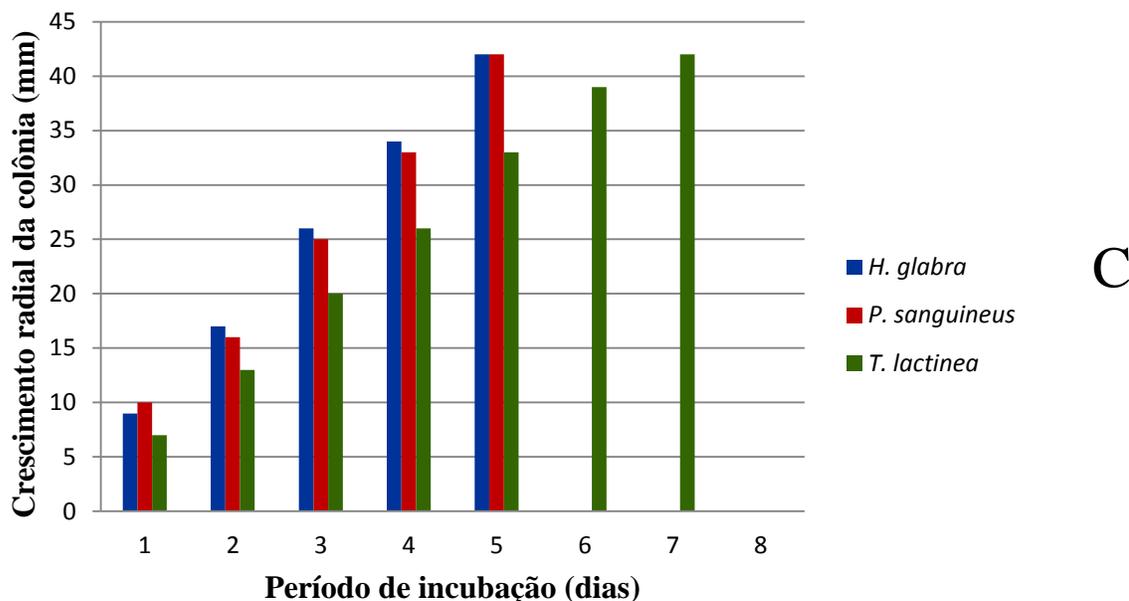


Figura 01- A: Crescimento do micélio em (mm) das culturas de *H. glabra*, *P.sanguineus* e *T. lactinea* sob fotoperíodo de luz contínua após oito dias de incubação. **B:** Crescimento do micélio em (mm) das culturas de *H. glabra*, *P.sanguineus* e *T. lactinea* sob fotoperíodo de escuro contínuo após oito dias de incubação. **C:** Crescimento do micélio em (mm) das culturas de *H. glabra*, *P.sanguineus* e *T. lactinea* sob fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro após oito dias de incubação.

De modo geral, para o crescimento do micélio, o fungo *T. lactinea* foi o que apresentou crescimento do micélio mais lento em todos os regimes de luminosidade (Tabela 01).

Tabela 01 – Produção final do crescimento micelial no período de 08 dias nos diferentes regimes de luminosidade.

| | Crescimento do micélio | | |
|----------------------------|------------------------|----------------------|--------------------|
| | <i>H. glabra</i> | <i>P. sanguineus</i> | <i>T. lactinea</i> |
| Crescimento (média) | 4,6667 | 4,6667 | 7,0000 |
| Desvio Padrão | 0,5774 | 0,5774 | 1,0000 |
| Variância | 0,3333 | 0,3333 | 1,0000 |
| Coef. Variação % | 12,37% | 12,37% | 14,29% |

Através da análise de variância, observaram-se diferenças estatísticas significativas no crescimento do micélio nos diferentes regimes de luminosidade (Tabela 02).

Tabela 02 – Análise de variância (ANOVA) do crescimento micelial nos diferentes fotoperíodos.

| Causas de variação | GL | SQ | QM | F | P |
|---------------------------|-----------|----------------|--------------|----------------|----------------|
| Tratamentos | 2 | 10,8889 | 5,444 | | |
| | | | | 13,0000 | 0,0196* |
| Blocos | 2 | 2,889 | 1,444 | | |
| Total | 4 | | | | |

* Significativo ao nível 95% = 0,005 (p<0,05 significativo)

No teste de Tukey foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 03), onde se evidenciou a diferença estatística no crescimento do micélio entre os diferentes regimes de luz.

Tabela 03 – Análise de Tukey para o crescimento do micélio nos diferentes regimes de luz.

| | Claro (C) | Escuro (E) | Claro/Escuro (C/E) |
|------------|----------------------|-----------------------|-------------------------------|
| C | | ** (6,92) | ** (5,19) |
| E | | | |
| C/E | | | |

** Significativo ao nível 95% = 0,05 (p<0,05 significativo)

Valores entre parênteses correspondem a diferença entre os regimes de luz

3.2 Observações morfológicas

Verificou-se que em todos os três regimes diferentes de luminosidade ocorreram crescimento micelial para os três fungos testados e para a interação dos mesmos. De modo geral não ocorreram diferenças morfológicas significativas nas interações fúngicas.

As respostas morfológicas se deram depois do contato micelial entre as espécies (3 dias), e ficaram sob observação durante o período de oito dias. Decorrido cinco dias o fungo *P. sanguineus* apresentou liberação de pigmentos alaranjados. Conforme Peiris e colaboradores (2008) tal coloração pode estar associada a enzima lacase que é produzida por basidiomicetos.

Constatou-se também que não houve diferenças morfológicas das interações fúngicas nos diferentes regimes de luminosidade. O fungo *T.lactinea* e *H.glabra*, quando entraram em contato, o crescimento do fungo *T.lactinea* foi inibido pelo crescimento micelial do basidiomiceto *H.glabra*, formando uma barreira micelial. De acordo com Silva e colaboradores (2008) essas interações se caracterizam por serem do tipo interferência ou antagonismo. Ou seja, quando o crescimento de um fungo é inibido pelo crescimento do outro. Pode-se sugerir que *H.glabra* inibiu o fungo *T.lactinea*, por este apresentar o crescimento micelial mais lento, em todos os regimes de luminosidade testados (Figura 02 A, E, I).

Entretanto, quando os mesmos colocados em contato com *P. sanguineus*, cresciam sobre ele, observou-se a formação da zona de sobreposição em todos os fotoperíodos (Figura 02).

Peiris e colaboradores (2008) estudando as interações fúngicas do basidiomiceto *Stereum hirsutum* em competição com os fungos *Coprinus micaceus* e *Coprinus disseminatus* observou os mesmos resultados obtidos neste trabalho com a inibição do crescimento de *C. micaceus* e *C. disseminatus* e a formação da barreira micelial.

Outro resultado similar foi observado por Albert e colaboradores (2011) estudando as interações fúngicas de diferentes basidiomicetos de podridão branca, para produção de biopalpação, que notou o antagonismo e a zona de sobreposição entre as diferentes espécies.

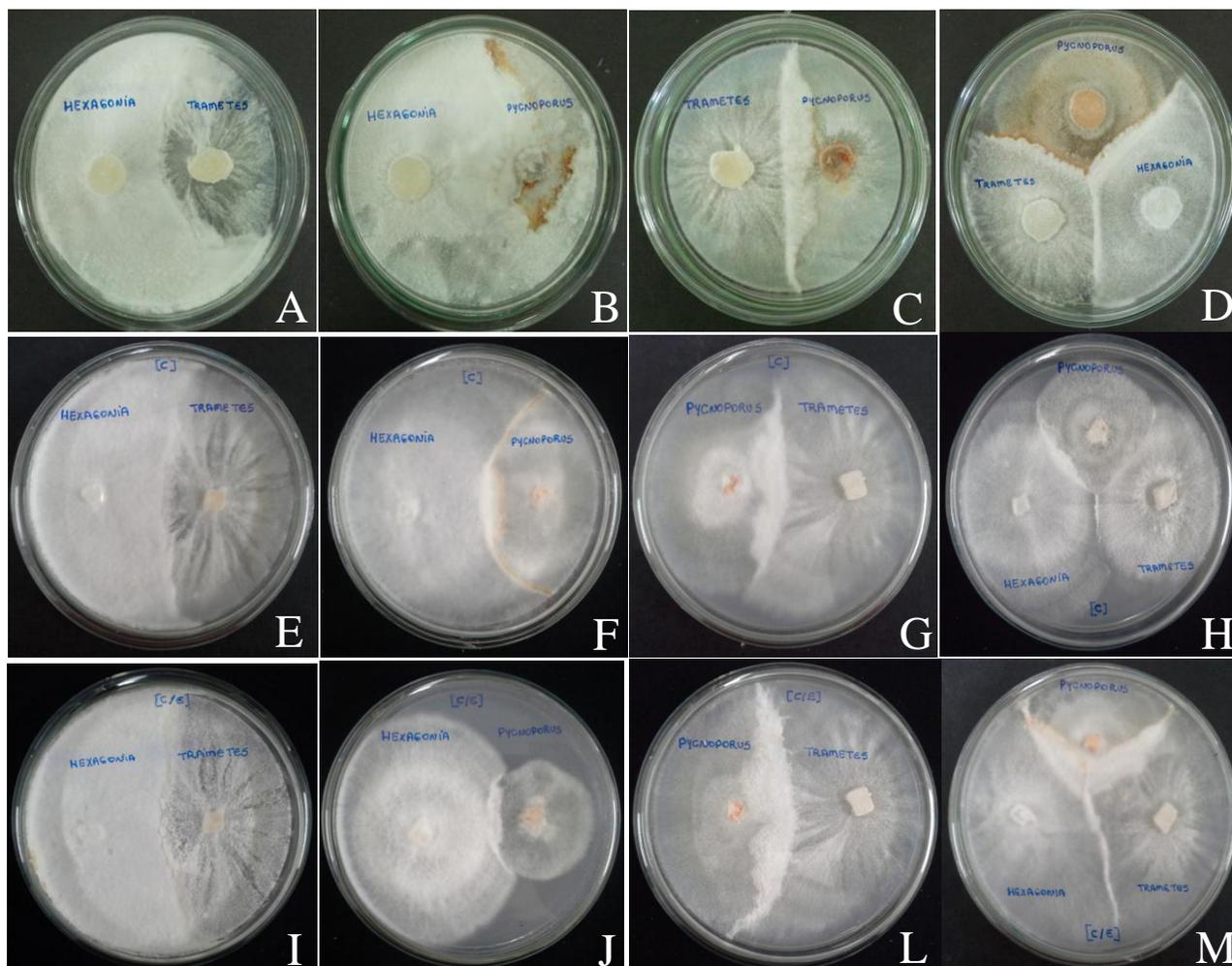


Figura 02 – Análise morfológica das interações fúngicas. **A, B, C e D:** Crescimento das culturas de *H. glabra*, *P.sanguineus* e *T. lactinea* sob fotoperíodo de luz contínua, **E, F, G e H:** Crescimento das culturas de *H. glabra*, *P.sanguineus* e *T. lactinea* sob fotoperíodo de escuro contínuo, **I, J, L e M:** Crescimento das culturas de *H. glabra*, *P.sanguineus* e *T. lactinea* sob fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

3.3 Produção de biomassa miceliana

Nos experimentos realizados com os diferentes fotoperíodos houve produção de biomassa para todos os fungos, em todos os regimes de luminosidade testados, no período de vinte e dois dias.

Conforme apresentado na Figura 03, a maior produção de biomassa ocorreu com o fungo *H. glabra* sob fotoperíodo de luz contínua e a menor produção de biomassa se deu na interação fúngica no regime de escuro contínuo.

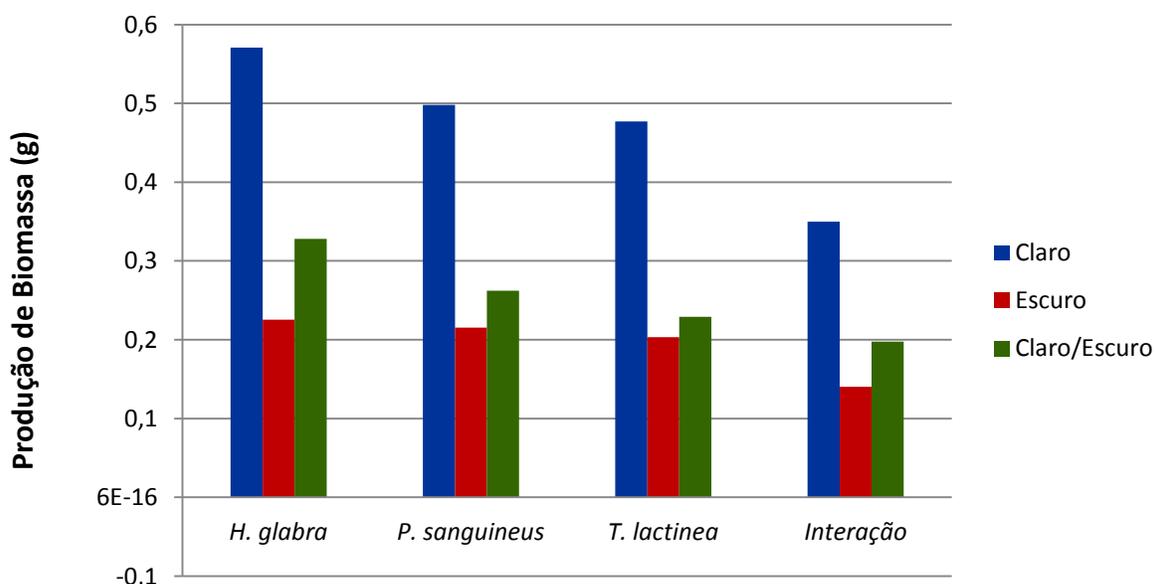


Figura 03: Produção de biomassa miceliana (gramas), em diferentes regimes de luminosidade, após vinte e dois dias de incubação de *H. glabra*, *P. sanguineus*, *T. lactinea* e Interação.

De modo geral, para a produção de biomassa de todos os basidiomicetos analisados, o fotoperíodo de luz contínua foi o que teve maior produção miceliana e o fungo *H. glabra* foi o que apresentou maior quantidade de biomassa (Tabela 04).

Tabela 04 – Produção final de biomassa no período de 22 dias em diferentes regimes de luminosidade.

| | Produção de biomassa miceliana | | | |
|----------------------------|--------------------------------|----------------------|--------------------|---------------|
| | <i>H. glabra</i> | <i>P. sanguineus</i> | <i>T. lactinea</i> | Interação |
| Crescimento (média) | 0,3747 | 0,3253 | 0,3097 | 0,2293 |
| Desvio Padrão | 0,1777 | 0,1513 | 0,1628 | 0,1084 |
| Variância | 0,0316 | 0,0229 | 0,0265 | 0,0118 |
| Coef. Variação % | 47,42% | 46,50% | 52,56% | 47,29% |

Bernardi e colaboradores (2008), em seu trabalho com massa miceliana e crescimento micelial para *Agaricus brasiliensis*, evidenciaram diferentes resultados de velocidade de crescimento e produção deste fungo diante de diferentes regimes de luz, resultados estes também observados neste trabalho, mostrando que a luz foi fator importante para o desenvolvimento miceliano.

Através da análise de variância, observaram-se diferenças estatísticas significativas na produção de biomassa nos diferentes regimes de luminosidade (Tabela 05).

Tabela 05 – Análise de variância (ANOVA) da biomassa produzida nos diferentes fotoperíodos.

| Causas de variação | GL | SQ | QM | F | P |
|--------------------|----|--------|-------|---------|---------|
| Tratamento | 3 | 0,0328 | 0,011 | | |
| | | | | 79,4611 | 0,0002* |
| Blocos | 2 | 0,179 | 0,089 | | |
| Total | 5 | | | | |

* Significativo ao nível 95% = 0,005 (p<0,05 significativo)

No teste de Tukey foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 06), onde se evidenciou a diferença estatística para a produção de biomassa entre os diferentes regimes de luz.

Tabela 06 – Análise de Tukey para produção de biomassa miceliana.

| | Claro (C) | Escuro (E) | Claro/Escuro (C/E) |
|-----|--------------|---------------|-----------------------|
| C | | ** (16,88) | ** (13,40) |
| E | | | |
| C/E | | | |

** Significativo ao nível 95% = 0,05 (p<0,05 significativo)

Valores entre parênteses correspondem a diferença entre os regimes de luz

Os resultados deste trabalho, onde se pode observar diferenças de crescimento e biomassa miceliana, também foram observadas por Bilay e colaboradores (2000) os quais notaram que algumas espécies de cogumelos avaliadas, apresentaram maior crescimento do micélio dependendo da condição em que eram submetido. Além disso, outro fator por eles analisados foi quanto ao pH, onde observaram que em diferentes faixas deste parâmetro ocorreram variadas velocidades no crescimento, fato este não possível de ser observado neste trabalho, pois todos os meios de cultivo utilizados encontravam-se na mesma faixa de pH.

Segundo Martins da Silva (2010) A possibilidade de utilização da biomassa em processos biotecnológicos tais como: absorção de metais pesados, remoção de substâncias xenobióticas e outros processos industriais torna o estudo de otimização da produção de biomassa de significativa importância.

4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos na presente pesquisa sobre os efeitos do regime de luminosidade no crescimento do micélio e biomassa miceliana para os três basidiomicetos e sua interação, pode-se concluir que:

- O regime de luz contínuo foi favorável tanto para o maior crescimento micelial quanto para a maior produção de biomassa fúngica de todos os isolados, em menor período de tempo;
- As análises morfológicas mostraram que o crescimento de *T. lactinea* foi inibido pelo crescimento de *H. glabra*, e que os mesmos crescem sobre o fungo *P. sanguineu*, formando a zona de sobreposição;
- Constatou-se também que não houve diferenças morfológicas das interações fúngicas nos diferentes regimes de luminosidade.

5 REFERÊNCIAS

ALBERT, S.; CHAUHAN, D.; PANDYA, B.; PADHIAR, A. Screening of Trichoderma Spp. As potential fungal partner in co-culturing with white rot fungi for efficient bio-pulping. Global Journal of Biotechnology & Biochemistry. v. 6, n. 3, p. 95-101, 2011.

BERNARDI, E.; DONINI, L. P.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Diferentes meios de cultivo e condições de luz no crescimento e massa miceliana de *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 75, n. 3, p. 375-378, 2008.

BODDY, L. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 31, p. 185–194, 2000.

BILAY, V. T.; SOLOMKO, E. F.; BUCHALO, A. S. Growth of edible and medicinal mushrooms on commercial agar media. In.: VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. (Ed.). Science and cultivation of edible fungi. Rotterdam: Balkema, p. 779-782, 2000.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues: Opportunities & Perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, p. 578–595, 2009.

DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; DO NASCIMENTO, J. S. Efeito da suplementação com farelos no crescimento *in vitro* de *Pleurotus ostreatus* em meios a base de capim-elefante (*Pennisetum* spp.). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 3, p. 303-309, 2006.

LOUREIRO, E.S.; BATISTA FILHO, A; ALMEIDA, J.E.M.; LEITE, L.G; LAMAS, C. **Efeito da temperatura e luminosidade no desenvolvimento do fungo *Sporothrix insectorum***. Arquivos do Instituto de Biologia, São Paulo, v.69, n.2,p.79-83, 2002.

MACIEL, M. J. M. **Influência e parâmetros físicos na atividade oxidativa do fungo *Hexagonia glabra* (P.Beauv) Ryvardeen**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2011.

MACIEL, M. J. M.; CASTRO E SILVA, A.; RIBEIRO, H. C. T. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycetes. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 6, p.1-13, 2010.

MARINO, R. H. **Produtividade de *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing. Em função dos métodos de isolamento e produção de inoculantes**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 1997.

MARTINS DA SILVA, N. **Avaliação do potencial antimicrobiano, enzimático e crescimento de um Isolado Amazônico do Fungo *Pycnoporus sanguineus***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2010.

MUZZARELLI, R. A. A.; MILIANI, M.; CARTOLARI, M.; TARSI, R.; TOSI, G.; MUZZARELLI, C. Polyuronans obtained by regiospecific oxidation of polysaccharides from *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* and *Saprolegnia* sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, n.1, p. 55-61, 2000.

NOZAKI, M. H.; CAMARGO, M.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p.429-432, 2004.

PEIRIS, D.; DUNN, W. B.; BROWN, M.; KELL, D. B.; ROY, I.; HEDGER, J. N. Metabolite profiles of interacting mycelial fronts differ for pairings of the wood decay basidiomycete

fungus, *Stereum hirsutum* with its competitors *Coprinus disseminates*. **Metabolomics**, v. 4, p. 52–62, 2008.

SANTOS, J.; REY, M.J.; ROSSETO, E.A.; PIEROBOM, C.R. Crescimento e esporulação de três raças de *Colletotrichum lindemuthinum* (Sacc&Magn) sob quatro condições de luminosidade. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v.11, n.14, p.493-495, 2005.

SILVA, S. K.; REBOUÇAS, T. N. H.; BOMFIM, M. P.; SILVA, S. D.; SÃO JOSÉ, A. R.; BENETT, C.G.S. Atividade antagônica in vitro de isolados de *Trichodermaspp* ao fungo *Phytophthoracitrophthora*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, p. 749 -754, 2008.

STOLZER, S.; GRABBE, K. Mechanisms of substrate selectivity in the cultivation of edible fungi. **The International Society for Mushroom Science**, v.13, p.13-24,1991.

TEIXEIRA, H.; CHITARRA, L. G.; ARIAS, S.M.S.; MACHADO, J.C. Efeitos de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação in vitro de fungos fitopatogênicos. *Ciência Agrotécnica*, Lavras, v.25, n.6, p.1314-1320, 2001.

WALD, P.; PITKÄNEN, S.; BODDY, L. Interspecific interactions between the rare tooth fungi *Creolophus cirrhatus*, *Hericium erinaceus* and *H.Coralloides* and other wood decay species in agar and wood. **Mycological.Research**, v. 108, p. 1447–1457, 2004.

CAPÍTULO II

Efeito da temperatura e de regime de luz na atividade enzimática da lacase de basidiomicetos da Amazônia

Efeito da temperatura e de regime de luz na atividade enzimática da lacase de basidiomicetos da Amazônia.

Souza, J. O.; Fantin, C.; Barroso, H. S.; Ribeiro, H. C. T

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas, Brasil, Manaus.

Resumo

Basidiomicetos são produtores de lacases que possuem um enorme potencial de aplicação na indústria devido a grande diversidade de substratos que podem oxidar, assim como a sua utilização na hidrólise de subprodutos lignocelulósicos em processos fermentativos, na produção de biocombustível, na alimentação de ruminantes e entre outras aplicações. Avaliou-se o efeito da temperatura e dos diferentes regimes de luminosidade na produção de lacase dos fungos *Hexagonia glabra* (UEA201), *Pycnoporus sanguineus* (UEA209), *Trametes lactinea* (UEA202) e de sua interação, preservados na coleção da Universidade do Estado do Amazonas. Utilizou-se o meio de cultura (BD) em pH 5 com diferentes temperaturas (30°C, 60°C e 90°C) por um período de tempo de 30, 60 e 90 minutos de exposição para cada uma das temperaturas. Também foram utilizadas três diferentes regimes de luminosidade (12 h claro/ 12 h escuro, claro contínuo e escuro contínuo). Foram observadas variações na produção da lacase em todas as temperaturas e regimes de tempo em vinte e dois dias de coleta, evidenciando que todos os basidiomicetos produziram enzima lacase em todas as temperaturas e fotoperíodos utilizados. Em todos os regimes de luminosidade a temperatura de 30 °C com incubação por 60 minutos proporcionou maior produção de lacase e independente das temperaturas utilizadas, o regime de luz contínuo, apresentou melhor produção enzimática com todos os fungos testados.

Palavras-chave: lacase, enzima, temperatura, fotoperíodo, cultura mistas.

1 INTRODUÇÃO

Lacases (E.C.1.10.3.2) são oxiredutases que fazem parte de um grupo de enzimas denominadas enzimas constituídas por cobre que oxida os polifenóis utilizando o oxigênio como acceptor final de elétrons e que inclui entre outras, ácido ascórbico oxidase e ceruloplasmina (MAYER e STAPLES, 2002).

As lacases são principalmente glicoprotéínas extracelulares ligadas ao cobre bivalente, o qual é reduzido durante a oxidação de fenóis e subsequentemente oxidado novamente ao estágio bivalente pelo oxigênio (KLONOWSKA et al., 2002; Mayer e STAPLES, 2002; CLAUS, 2004). Lacases fúngicas têm sido encontradas em diferentes gêneros de ascomicetos, alguns deuteromicetos e principalmente basidiomicetos, sendo considerados os melhores produtores, pertencentes ao grupo dos fungos de decomposição branca, eficientes degradadores de madeira (NEPOMUCENA, 2010).

Por outro lado, no que concerne as interações sinérgicas entre basidiomicetos, a lacase é a que também dá a resposta mais rápida nas interações fúngicas. Dessa forma, por meio de interações sinérgicas, culturas mistas fúngicas podem levar a uma produção enzimática elevada, cujo resultado final dependerá da combinação particular das espécies envolvidas, ou do modo de interação entre as espécies e das condições ambientais ou nutricionais do substrato sob colonização (CHI et al., 2007).

Não há dúvidas que as propriedades bioquímicas e físico-químicas de lacase (atividade, estabilidade, pH e temperatura ótimos, etc.) fornecem muitas informações iniciais importantes para estudos básicos e para a aplicação de lacases na biotecnologia (MOUGIN et al., 2003; SHLEEV et al., 2004).

As lacases fúngicas têm um enorme potencial de aplicação na indústria devido à grande diversidade de substratos que podem oxidar. Assim, pode se salientar a sua utilização na modificação de ligninas industriais para obtenção de produtos de valor agregado, na indústria de polpa e de papel para redução do volume de produtos químicos utilizados, nas indústrias têxtil e de detergente para inibição da transferência dos corantes sintéticos, e na produção de resinas fenólicas. A utilização das lacases fúngicas em escala industrial já é uma realidade (BALDRIAN, 2006).

Em virtude disso, este trabalho teve por objetivo avaliar a influência da presença e ausência de luminosidade, bem como os diferentes regimes de temperatura durante o período de

cultivo *in vitro* de *Hexagonia glabra*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes lactinea* e a sua interação para se obter maior produção de enzima lacase.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Para realização do experimento foram utilizadas culturas dos fungos *H. glabra* (UEA201), *P. sanguineus* (UEA209) e *T. lactinea* (UEA202), preservadas na coleção do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia/ Centro de Energia, Ambiente e Biodiversidade da Universidade do Estado do Amazonas. O meio Batata-dextrose-ágar (BDA) foi utilizado para o desenvolvimento e manutenção da colônia dos fungos.

2.2 Meio de cultura líquido

O meio de cultura líquido utilizado foi feito a partir da Batata (*Solanum tuberosum*), onde foi utilizado 200 g de matéria-prima, 1000 ml de água destilada e 10 g de glicose, sendo ajustado para pH 5 e colocados em erlenmeyer de 125 ml. Em seguida, o meio de cultura foi autoclavado durante 15 minutos a 121 °C. Em todos os experimentos realizados neste trabalho, os meios de culturas foram feitos em triplicata.

Os fungos foram transferidos em câmara de fluxo laminar e o disco de micélio de 10 mm de diâmetro, retirado da região periférica da placa, foi colocado no erlenmeyer contendo o meio de cultura líquido.

Os erlenmeyers com os inóculos do fungo foram mantidos em BOD a 28 °C em condição estacionária por 22 dias. A cada dois dias foi retirado 2 ml de caldo fúngico do meios de cultura líquido para a determinação da atividade enzimática.

2.3 Ensaio enzimático

Para determinação da atividade enzimática foi utilizado o aparelho espectrofotômetro ultravioleta de absorvância para leitura das amostras coletadas.

2.3.1 Lacase

A atividade da enzima lacase foi determinada em um comprimento de onda de 525 nm. A metodologia utilizada foi adaptada de Szklarz e colaboradores (1989) que consiste na oxidação do substrato enzimático de seringaldazina para sua forma de quinona que apresenta absorção a 525nm ($\Sigma=6\ 5000\ M^{-1}\ cm^{-1}$). De acordo com a atividade enzimática, uma unidade ativa de lacase corresponde a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μ mol de substrato por minuto. Para determinação da atividade lacase foi utilizado: 0,5 ml de caldo de cultura filtrado; 0,3 ml tampão citrato fostato a pH 5; 0,1 ml de solução etanólica de seringaldazina (1,0 mM) e 0,1 ml de água destilada.

2.4 Avaliação da estabilidade térmica da enzima

O estudo da estabilidade térmica foi determinado pela medida da atividade enzimática, após incubação do extrato enzimático a diferentes temperaturas (30°C, 60°C e 90°C) por um período de tempo de 30, 60 e 90 minutos de exposição para cada uma das temperaturas. Após a incubação a atividade da lacase foi determinada nas condições pré-estabelecidas (STOILOVA et al., 2010).

2.5 Determinação da influência da luminosidade

A produção da enzima lacase foi avaliada sob três fotoperíodos: luz contínua, escuro contínuo e regime alternado de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, iniciando-se o experimento com período de 12 horas sob luz. O ensaio foi conduzido em estufa incubadora BOD, com controle de temperatura e iluminação fornecida por quatro lâmpadas fluorescentes Philips 15 W/75 (luz do dia) (CASA et al., 2007).

2.6 Análise dos dados

Para análise estatística dos dados coletados foi usado o software Bioestat 5.0 para obter os parâmetros descritos (média, desvio padrão, variância) e correlação entre as variáveis. Para a interferência sobre a relação entre as variáveis a serem mensuradas foi utilizado o teste ANOVA e para contraste das médias o Teste de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção enzimática de Lacase em regime de luz contínua

Conforme apresentado na Tabela 01, em termos de valores absolutos a maior média de produção de lacase em regime de luz contínua e nas diferentes temperaturas ocorreu com o fungo *H. glabra* e a menor produção se deu com o fungo *P. sanguineus*.

De modo geral, os fungos apresentaram percentual médio superior a 15 U/L. Observa-se ainda que o fungo *H. glabra* em presença de luz contínua apresentou produção média de lacase de 47 U/L, destacando-se por sua fabricação superior aos dos demais basidiomicetos (Tabela 01).

Tabela 01: Atividade de lacase produzida pelos fungos basidomicetos durante 22 dias de crescimento sob regime de luz contínua.

| | Atividade enzimática | | | |
|--------------------|----------------------|----------------------|--------------------|-----------|
| | <i>H. glabra</i> | <i>P. sanguineus</i> | <i>T. lactinea</i> | Interação |
| Lacase (média U/L) | 47,000 | 15,333 | 41,667 | 45,333 |
| Desvio Padrão | 42,6654 | 9,2916 | 44,0384 | 39,4335 |
| Variância | 1820,333 | 86,333 | 1524,000 | 1774,333 |
| Coef. Variação % | 93,43% | 60,60% | 83,06% | 107,50% |

A análise de variância (ANOVA), mostra que existe diferença estatística significativa entre as médias de produção de lacase em fotoperíodo de luz contínua (Tabela 02).

Tabela 02 – Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase em regime de luz contínua.

| Causas de variação | GL | SQ | QM | F | P |
|--------------------|----|-----------|----------|---------|---------|
| Tratamentos | 3 | 1988,6667 | 662,889 | | |
| | | | | 14,0073 | 0,0092* |
| Blocos | 3 | 8903,167 | 4451,583 | | |
| Total | 6 | | | | |

* Significativo ao nível 95% = 0,005 (p<0,05 significativo)

No teste de Tukey foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 03), onde foi mostrada a diferença estatística superior entre as diferentes temperaturas (30°C, 60°C e 90°C) em regimes de luz contínua.

Tabela 03 – Análise de Tukey para a atividade enzimática sob o regime de luz contínua.

| | 30°C | 60°C | 90°C |
|------|------|------------------|------------------|
| 30°C | | ** (4,90) | ** (7,34) |
| 60°C | | | |
| 90°C | | | |

**** Significativo ao nível 95% = 0,05 (p<0,05 significativo)**

Valores entre parênteses correspondem a diferença entre os regimes de luz

A produção enzimática de lacase se deu em todas as temperaturas e regimes de tempo em vinte e dois dias de coleta sob fotoperíodo de luz contínua, apresentando uma melhor produção na temperatura de 30 °C por 60 minutos (Figura 01) e menor produção em 90 °C por 90 minutos (Figura 03).

Resultados semelhantes foram obtidos por Caesar e colaboradores (2009) estudando o efeito dos regimes de luz na produção de lacase dos basidiomicetos *Pleurotus ostreatus* e *Trametes versicolor* para degradar cercosporina e reduzir a toxicidade para as células vivas. Neste, observaram que a melhor produção e degradação se deram na presença de luz contínua, sugerindo que a lacase dos fungos basidiomicetos possui uma melhor produção e diminui o efeito tóxico da cercosporina para microrganismos.

Os resultados confirmaram a boa termoestabilidade da lacase em estudo, e mostraram que até a temperatura de 90 °C durante uma hora e meia de incubação, esta enzima preservou sua atividade, indicando que a mesma pode ser utilizada em posterior aplicação biotecnológica.

A termoestabilidade das enzimas é um fator muito relevante para a aplicação em processos industriais. Quanto maior for a manutenção da atividade da enzima em temperaturas elevadas, maior a capacidade de emprego desta enzima nas indústrias (KARIMA, 2008).

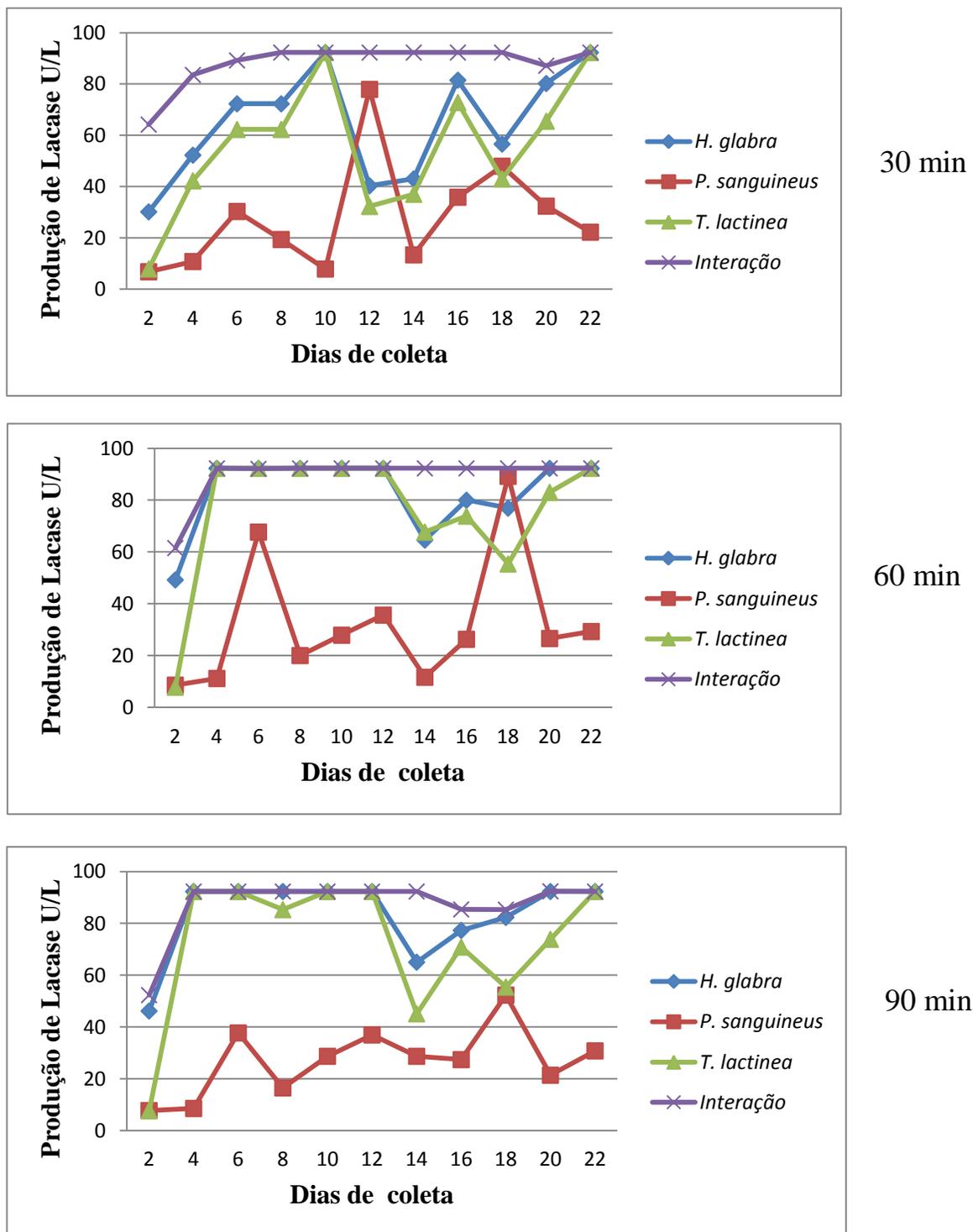


Figura 01- Atividade enzimática da lacase por (U/L) das culturas de *H. glabra*, *P.sanguineus*, *T. lactinea* e interação sob fotoperíodo de luz contínua, na temperatura de 30 °C por 30, 60 e 90 minutos respectivamente.

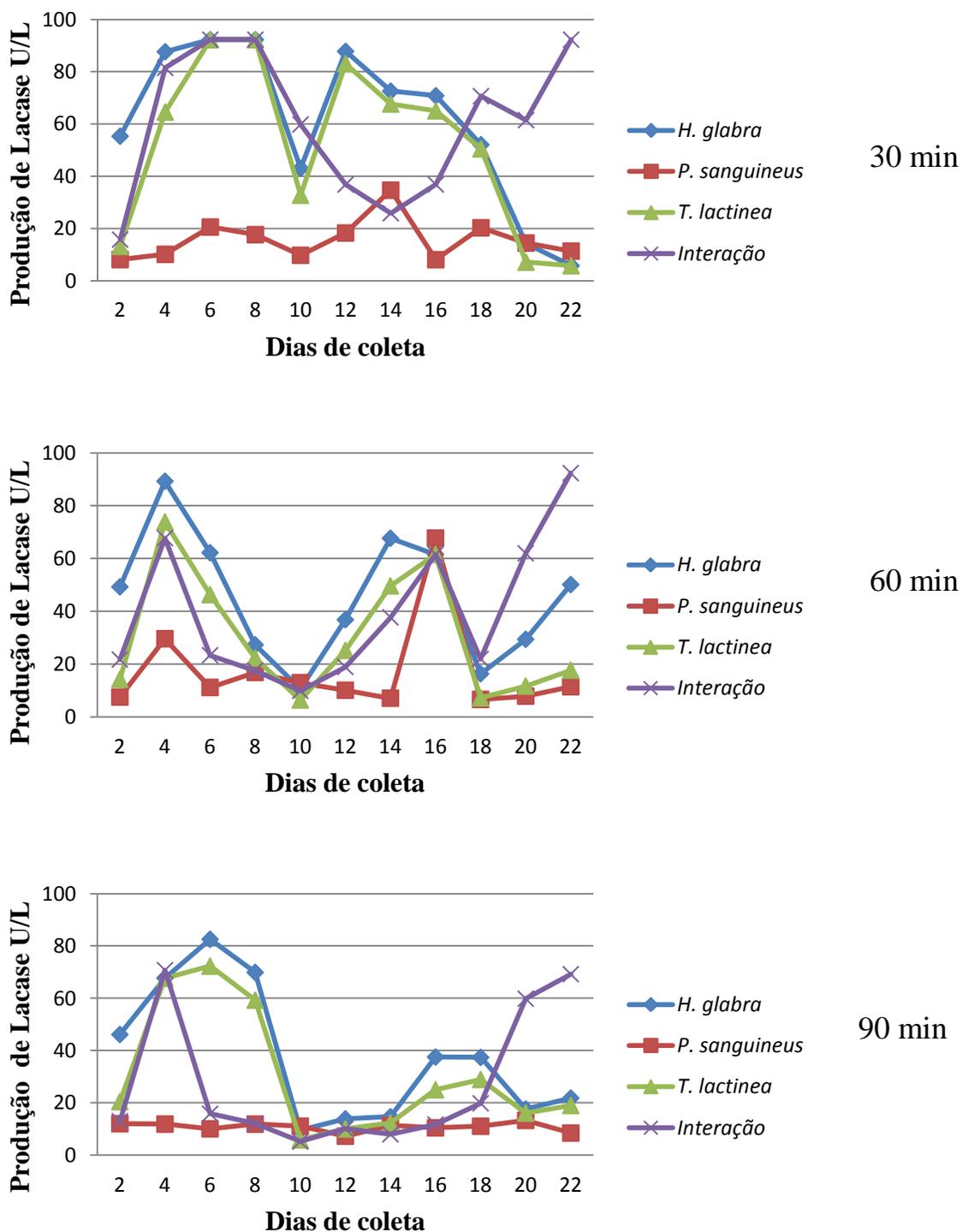


Figura 02- Atividade enzimática da lacase por (U/L) das culturas de *H. glabra*, *P.sanguineus*, *T. lactinea* e interação sob fotoperíodo de luz contínua, na temperatura de 60 °C por 30, 60 e 90 minutos respectivamente.

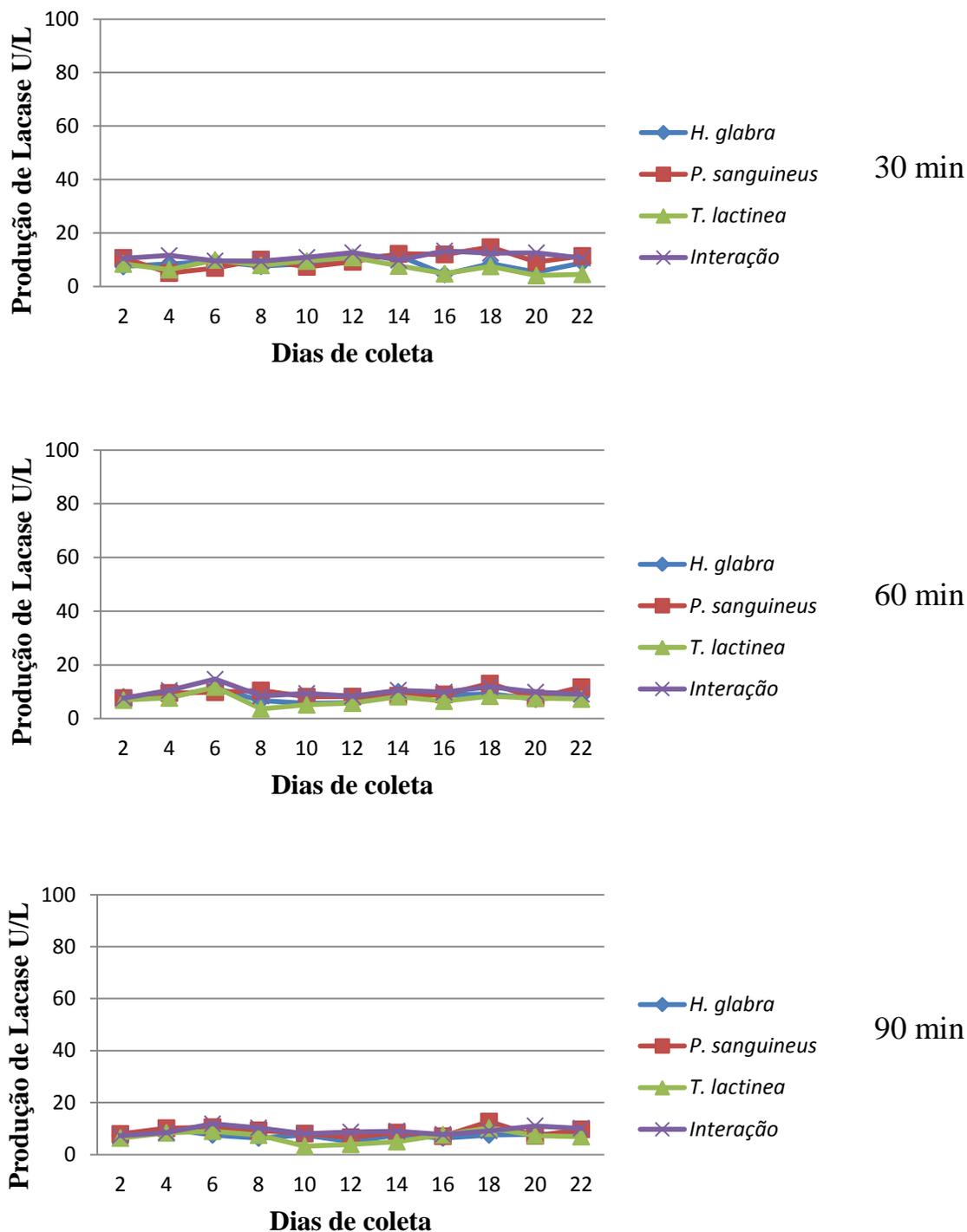


Figura 03- Atividade enzimática da lacase por (U/L) das culturas de *H. glabra*, *P.sanguineus*, *T. lactinea* e interação sob fotoperíodo de luz contínua, na temperatura de 90 °C por 30, 60 e 90 minutos respectivamente.

3.2 Produção enzimática de lacase em regime de escuro contínuo

De acordo com a Tabela 04, a maior produção média de lacase em escuro contínuo e nas diferentes temperaturas se deu com a interação fúngica dos basidiomicetos, sendo que a menor produção da enzima foi com o fungo *P. sanguineus*.

A média de produção enzimática de lacase foi superior a 28 U/L para todos os fungos, exceto para o fungo *P. sanguineus* que obteve média inferior, com uma produção de 11 U/L.

Tabela 04: Atividade de lacase produzida pelos fungos basidiomicetos durante 22 dias de crescimento sob regime de escuro contínuo.

| | Atividade enzimática | | | |
|--------------------|----------------------|----------------------|--------------------|-----------|
| | <i>H. glabra</i> | <i>P. sanguineus</i> | <i>T. lactinea</i> | Interação |
| Lacase (média U/L) | 28,666 | 11,000 | 28,000 | 34,333 |
| Desvio Padrão | 36,4966 | 10,4403 | 33,6502 | 41,5251 |
| Variância | 1332,333 | 109,000 | 1132,000 | 1724,333 |
| Coef. Variação % | 118,34% | 94,91% | 117,38% | 120,95% |

A análise de variância (ANOVA), mostra que existe diferença estatística significativa entre as médias de produção de lacase em fotoperíodo de escuro contínuo (Tabela 05).

Tabela 05 – Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase em regime de escuro contínuo.

| Causas de variação | GL | SQ | QM | F | P |
|--------------------|----|----------|----------|---------|---------|
| Tratamentos | 3 | 913,6667 | 304,556 | | |
| | | | | 19,4747 | 0,0031* |
| Blocos | 3 | 7448,000 | 3724,000 | | |
| Total | 6 | | | | |

* Significativo ao nível 95% = 0,005 (p<0,05 significativo)

No teste de Tukey foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 06), onde mostrou-se a diferença estatística superior entre as diferentes temperaturas (30°C, 60°C e 90°C) em regimes de escuro contínuo.

Tabela 06 – Análise de Tukey para atividade enzimática sob o regime de escuro contínuo.

| | 30°C | 60°C | 90°C |
|------|------|------------------|------------------|
| 30°C | | ** (7,08) | ** (8,09) |
| 60°C | | | |
| 90°C | | | |

**** Significativo ao nível 95% = 0,05 (p<0,05 significativo)**

Valores entre parênteses correspondem a diferença entre os regimes de luz

Foi possível observar que a produção enzimática de lacase se deu em todas as temperaturas e regimes de tempo por vinte e dois dias de coleta sob fotoperíodo de escuro contínuo, apresentando melhor produção na temperatura de 30 °C por 60 minutos (Figura 05) e menor produção em 90 °C por 90 minutos (Figura 06).

Os resultados obtidos neste trabalho no que se referem à enzima lacase mostram que a mesma apresenta uma estabilidade térmica superior aos alcançados na literatura para a lacase do basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus* CY788 estudada por Pointing e colaboradores (2000) sendo quase totalmente inativada quando incubada por períodos relativamente curtos de tempo em temperaturas acima de 35 °C. Quando mantida a 60 °C por um período de 90 minutos a lacase obtida em nossos experimentos foi capaz ainda de conservar alguma atividade.

Por outro lado, os dados alcançados por Lomoscolo e colaboradores (2002) estão de acordo com os conseguidos neste trabalho no que se refere a estabilidade térmica da lacase de basidiomicetos que manteve atividade mesmo quando submetida a temperatura de 50 °C por oito horas. Segundo Hasper e colaboradores (2002), as diferenças no comportamento face ao tratamento térmico são devido ao patrimônio genético particular de cada espécie e as diferenças na adaptação fisiológica do microrganismo ao nicho ecológico no qual ele vive.

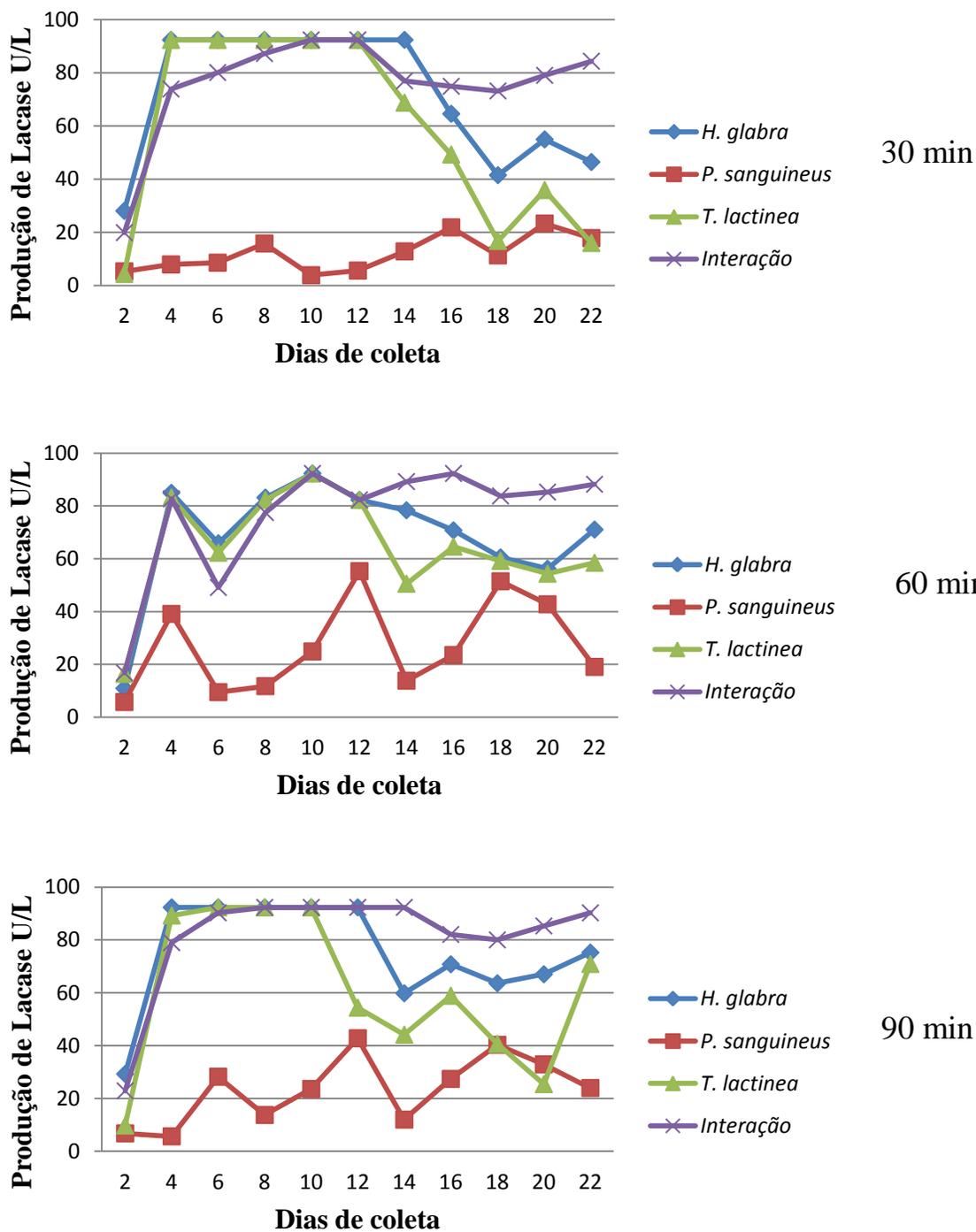


Figura 04- Atividade enzimática da lacase por (U/L) das culturas de *H. glabra*, *P.sanguineus*, *T. lactinea* e interação sob fotoperíodo de escuro contínuo, na temperatura de 30 °C por 30, 60 e 90 minutos respectivamente.

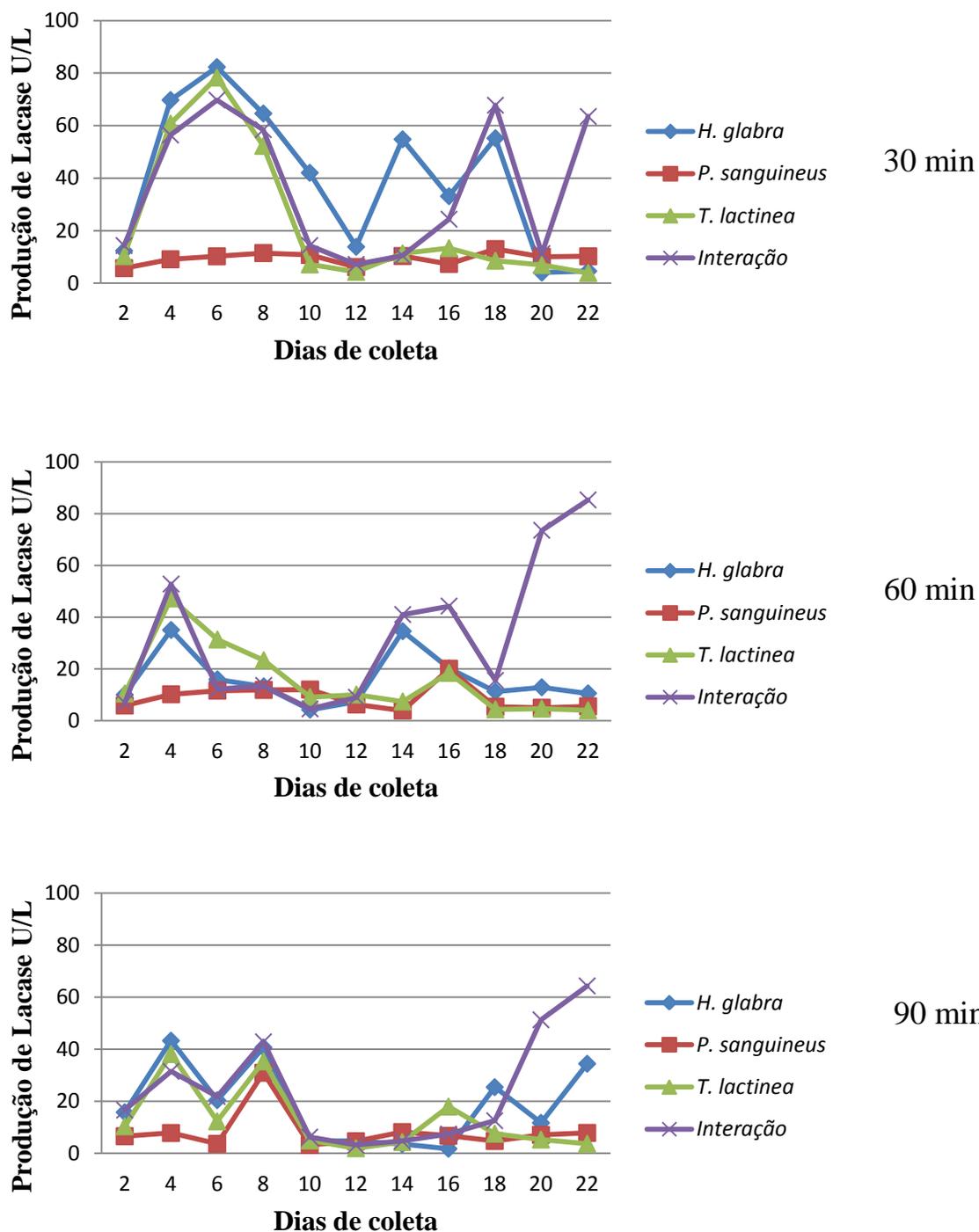


Figura 05- Atividade enzimática da lacase por (U/L) das culturas de *H. glabra*, *P.sanguineus*, *T. lactinea* e interação sob fotoperíodo de escuro contínuo, na temperatura de 60 °C por 30, 60 e 90 minutos respectivamente.

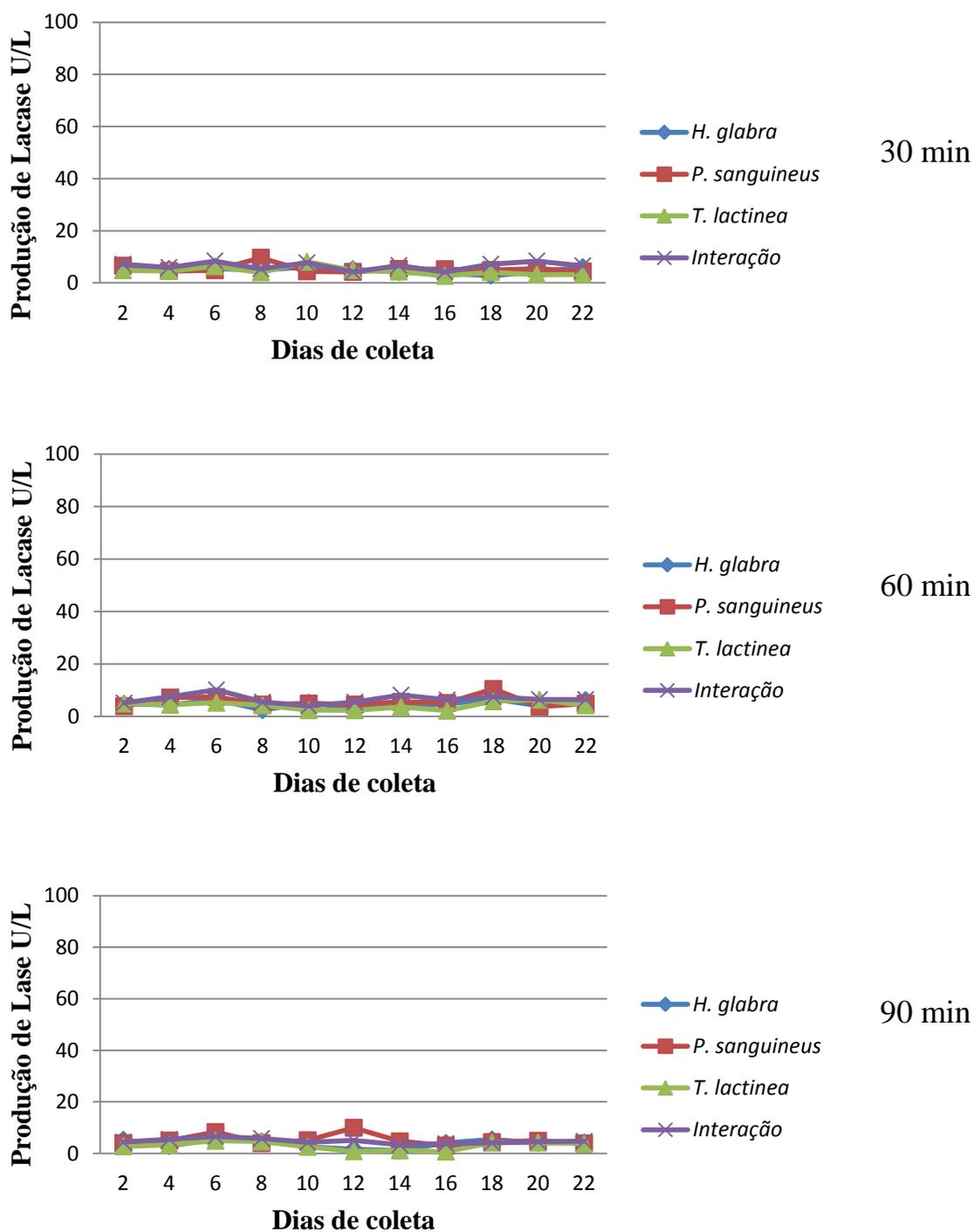


Figura 06 – Atividade enzimática da lacase por (U/L) das culturas de *H. glabra*, *P. sanguineus*, *T. lactinea* e interação sob fotoperíodo de escuro contínuo, na temperatura de 90 °C por 30, 60 e 90 minutos respectivamente.

3.3 Produção enzimática de lacase em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro

Conforme a Tabela 07, a atividade média de lacase obtida a partir do regime alternado de 12 h de luz e 12 h de escuro e nas diferentes temperaturas foi maior com a interação fúngica dos basidiomicetos, e a menor atividade se deu com o fungo *P. sanguineus*. A média de produção de Lacase foi superior a 30 U/L para todos os fungos, exceto para o fungo *P. sanguineus* que obteve média inferior.

Tabela 07: Atividade de lacase produzida pelos fungos basidomicetos durante 22 dias de crescimento sob regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro.

| | Atividade enzimática | | | |
|--------------------|----------------------|----------------------|--------------------|-----------|
| | <i>H. glabra</i> | <i>P. sanguineus</i> | <i>T. lactinea</i> | Interação |
| Lacase (média U/L) | 36,333 | 11,000 | 35,000 | 39,333 |
| Desvio Padrão | 39,3107 | 6,2450 | 35,6791 | 44,2869 |
| Variância | 1545,333 | 39,000 | 1273,000 | 1961,333 |
| Coef. Variação % | 111,26% | 56,77% | 99,11% | 112,59% |

A análise de variância (ANOVA), mostra que há diferença estatística significativa entre as médias de produção de lacase em fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro (Tabela 08).

Tabela 08 – Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro.

| Causas de variação | GL | SQ | QM | F | P |
|--------------------|----|-----------|----------|---------|---------|
| Tratamentos | 3 | 1535,5833 | 511,861 | 12,9853 | 0,0073* |
| Blocos | 3 | 7828,667 | 3914,333 | | |
| Total | 6 | | | | |

* Significativo ao nível 95% = 0,005 (p<0,05 significativo)

No teste de Tukey foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 09), onde mostrou a diferença estatística superior entre as diferentes temperaturas (30°C, 60°C e 90°C) em regimes de escuro contínuo.

Tabela 09 – Análise de Tukey para atividade enzimática sob o regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro.

| | 30°C | 60°C | 90°C |
|------|------|-----------|-----------|
| 30°C | | ** (5,35) | ** (6,85) |
| 60°C | | | |
| 90°C | | | |

**** Significativo ao nível 95% = 0,05 (p<0,05 significativo)**

Valores entre parênteses correspondem a diferença entre os regimes de luz

Pode-se observar que a produção de lacase se deu em todas as temperaturas e regimes de tempo em vinte e dois dias de coleta sob fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, verificando-se maior produção na temperatura de 30 °C por 60 minutos (Figura 07) e menor produção em 90 °C por 90 minutos (Figura 09).

Resultados semelhantes foram observados por Dantán-González e colaboradores (2008) estudando a termotolerância de *Pycnoporus sanguineus*. Neste, observaram que o isolado incubado na temperatura de 40 °C por cinco dias ainda apresentou atividade enzimática.

Stoilova e colaboradores (2010) também obtiveram bons resultados para a estabilidade térmica da enzima lacase do fungo *Trametes versicolor*, observando-se uma melhor produção na temperatura de 40 °C por 48 horas de incubação.

Segundo Litthauer e colaboradores (2007) a utilização potencial da enzima lacase capaz de sustentar a atividade em temperaturas elevadas durante períodos prolongados e que exibem níveis elevados de atividade, pode ser utilizada para possíveis usos biotecnológicos como o biobranqueamento e efluentes contendo contaminantes aromáticos.

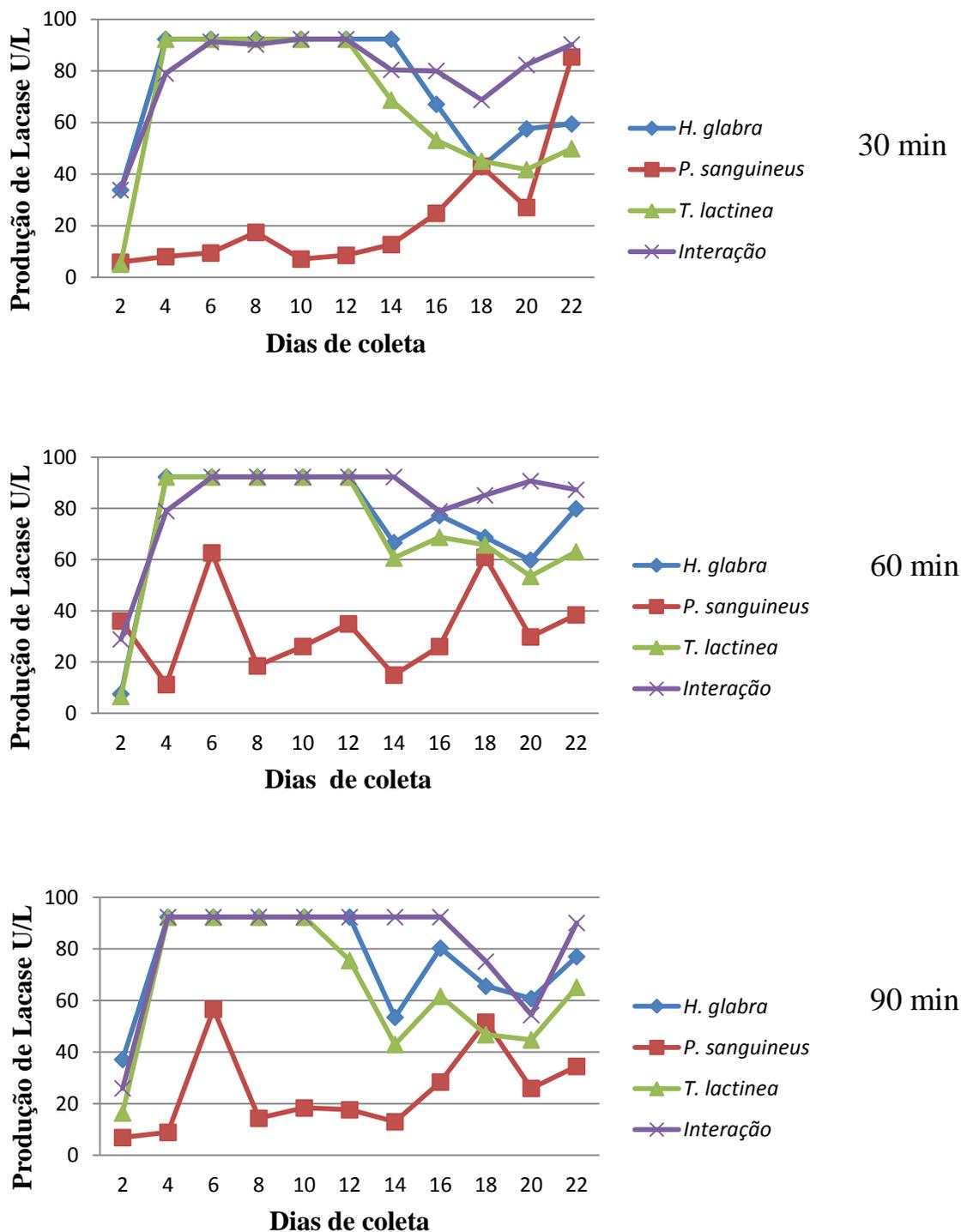


Figura 07- Atividade enzimática da lacase por (U/L) das culturas de *H. glabra*, *P.sanguineus*, *T. lactinea* e interação sob fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, na temperatura de 30 °C por 30, 60 e 90 minutos respectivamente.

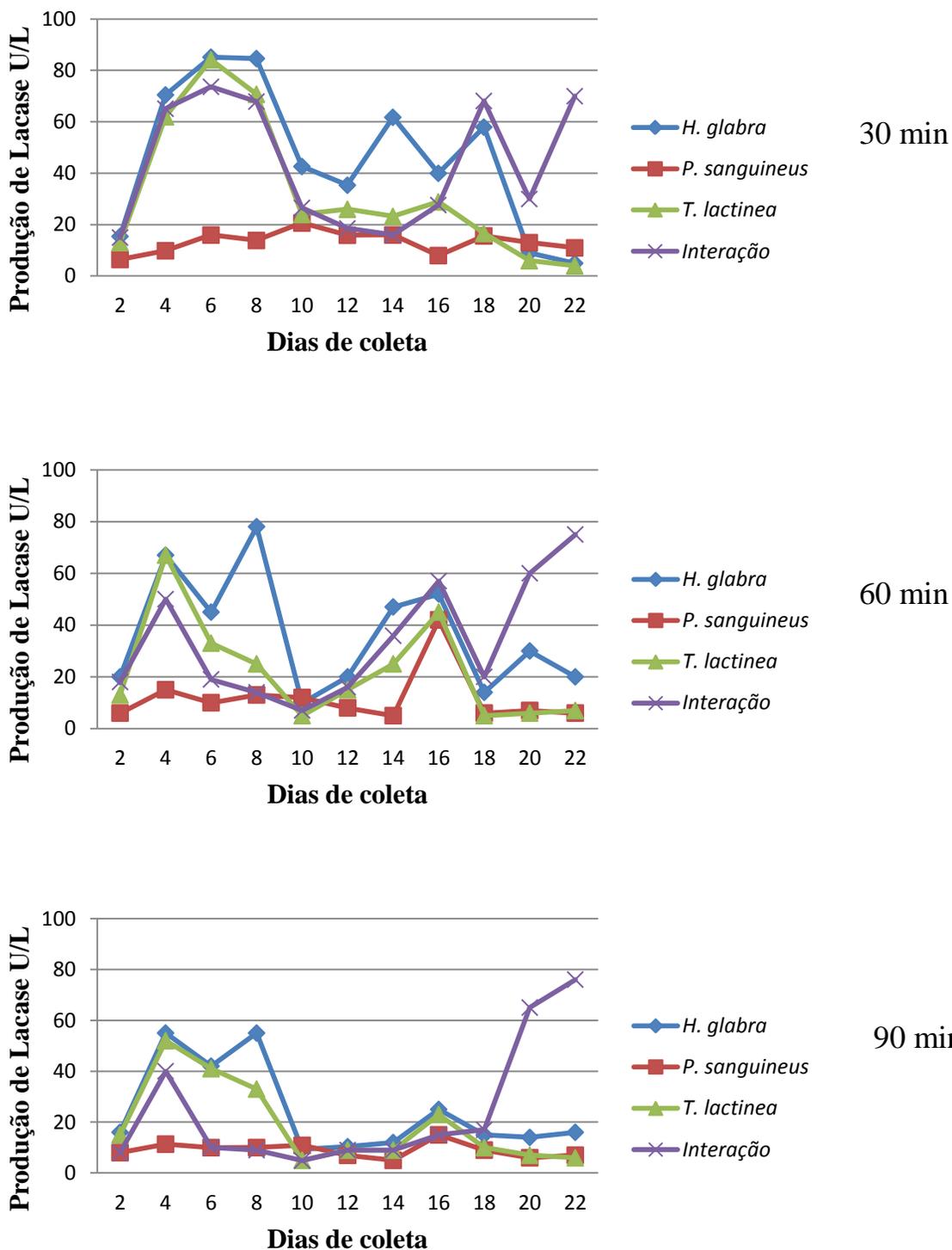


Figura 08- Atividade enzimática da lacase por (U/L) das culturas de *H. glabra*, *P.sanguineus*, *T. lactinea* e interação sob fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, na temperatura de 60 °C por 30, 60 e 90 minutos respectivamente.

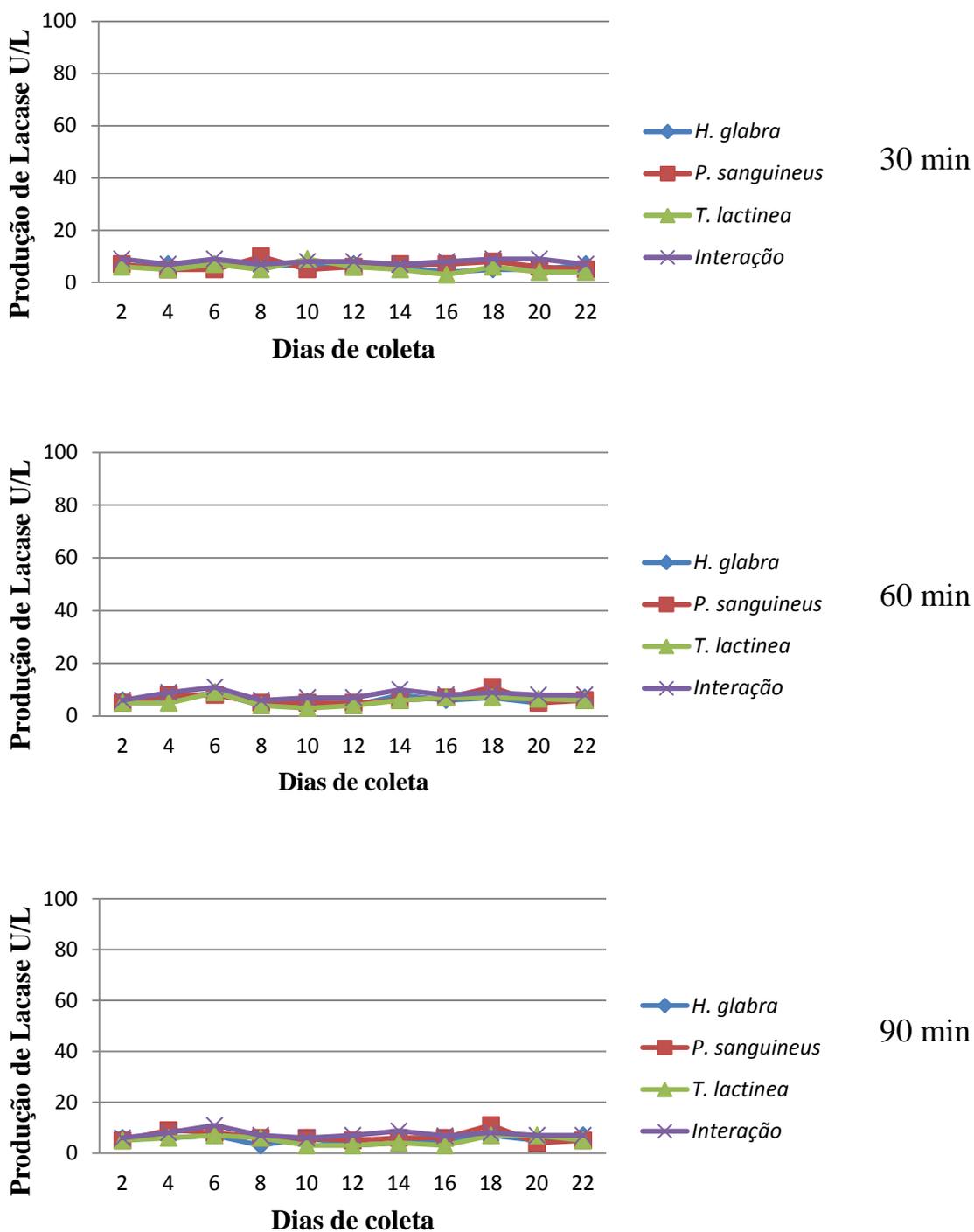


Figura 09- Atividade enzimática da lacase por (U/L) das culturas de *H. glabra*, *P.sanguineus*, *T. lactinea* e interação sob fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, na temperatura de 90 °C por 30, 60 e 90 minutos respectivamente.

3.4 Relação da atividade enzimática em todas as temperaturas e regimes de luminosidade

O estudo da estabilidade térmica da enzima lacase produzida pelos fungos *H. glabra*, *P. sanguineus*, *T. lactinea* e Interação fúngica dos basidiomicetos foram testados em diferentes temperaturas (30°C, 60°C e 90°C) por um período de tempo de 30, 60 e 90 minutos de incubação em diferentes regimes de luminosidade. De acordo com Castro e Silva (1996) e Santos (2009), os fungos amazônicos crescem melhor em meio ácido. Por este fato todos os experimentos foram testados em pH 5,0.

Todos os basidiomicetos produziram a enzima lacase após dois dias de crescimento e esta continuou a ser produzida durante todo período testado (22 dias), em todas as temperaturas e fotoperíodos utilizados. Nossos dados estão de acordo com a literatura que relata que muitos basidiomicetos produzem a lacase após 2 ou 3 dias de crescimento e tem um tempo bastante variável durante o qual a enzima continua a ser produzida (GARCIA, 2006). Pra a maioria dos fungos e condições testadas, ocorreu um decréscimo na produção de lacase, após dez dias de cultivo.

Os resultados nos mostram que em todos os regimes de luz utilizado a temperatura de 30 °C incubada por 60 minutos foi a que proporcionou maior produção de lacase em todos os fungos testados (Figuras 01, 04 e 07).

De acordo com Vieille e Zeikus (2001), a termoestabilidade é afetada diretamente por fatores como a presença de certas ligações na estrutura secundária e terciária das proteínas enzimáticas (ligações de hidrogênio, ligações secundárias, ligações entre metais e pontes de dissulfeto) permitindo consolidar a estrutura da enzima e então sua resistência ao tratamento térmico.

Com base nos dados obtidos pode-se observar que, independente das temperaturas utilizadas, o regime de luz contínuo foi o que apresentou melhor resultado para a produção enzimática de lacase para todos os fungos utilizados (Figura 10), seguido pelo regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, mostrando assim, que a luminosidade é um fator importante para obter uma melhor produção de lacase.

Poucos trabalhos foram realizados com o objetivo de estudar a influência da luminosidade na produção dessa enzima, assim pesquisas complementares serão necessárias para melhor compreensão dessas influências físicas em sua produção.

Com as aplicações biotecnológicas requerem grande quantidade de enzima, e normalmente lacases extracelulares são produzidas em pequenas quantidades (GARCIA, 2006), faz-se necessário o estudo para melhorar a produção desta enzima fúngica, visto que a mesma tem uma vasta aplicabilidade industrial e ambiental.

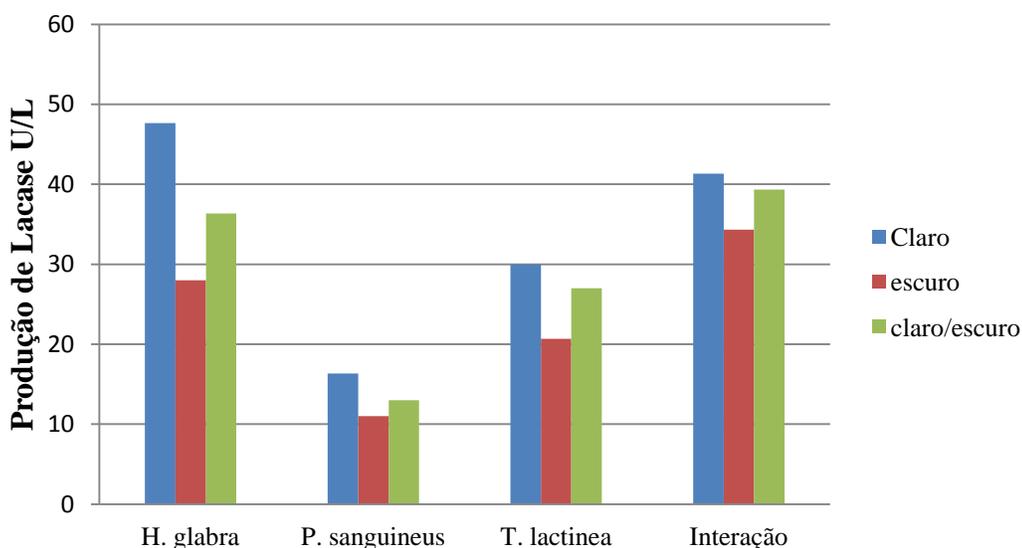


Figura 10- Atividade enzimática da lacase por (U/L) das culturas de *H. glabra*, *P.sanguineus*, *T. lactinea* e interação sob os regimes de luminosidade de claro contínuo, escuro contínuo e 12 horas de claro e 12 horas de escuro alternadamente.

4 CONCLUSÕES

- Todos os basidiomicetos produziram enzima lacase em todas as temperaturas e fotoperíodos utilizados;
- Em todos os regimes de luminosidade a temperatura de 30 °C com incubação por 60 minutos proporcionou maior produção de lacase;
- Independente das temperaturas utilizadas, o regime de luz contínuo, apresentou melhor produção enzimática com todos os fungos testados.

5 REFERÊNCIAS

- BALDRIAN, P. Fungal laccase – Occurrence and properties, **FEMS Microbiology Letters**, v. 30, p. 215–242, 2006.
- CAESAR, C. T.; LARTEY R. T.; SOLBERG, L. L.; CAESAR A. J. Effects of Basidiomycete Laccase on Cercosporin. **Journal of Plant Pathology**, vol. 91, p. 347-355, 2009.
- CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L.; MOREIRA, E. N. Efeito da temperatura e de regimes de luz no crescimento do micélio, germinação de conídios e esporulação de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 137-142, 2007.
- CASTRO E SILVA, A. **Micromorfologia da degradação de madeira da espécie amazônica *Hura creptans* L. Por fungos lignolíticos pertencentes a classe Hymenomyces**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1996.
- CHI, Y; HATAKKA, A; MAIJALA P. Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes. **International Biodeterioration & Biotechnology**, vol. 59, p. 32–39, 2007.
- CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. **Micron**, v. 35, p. 93-96, 2004.
- DANTÁN-GONZÁLEZ, E.; VITE-VALLEJO, O.; MARTÍNEZ-ANAYA, C., MÉNDEZ-SÁNCHEZ, M.; GONZÁLEZ, M. C.; PALOMARES, L. A.; FOLCH-MALLOL, J. Production of two novel laccase isoforms by a thermotolerant strain of *Pycnoporus sanguineus* isolated from an oil-polluted tropical habitat. **International Microbiology**, v. 11, p. 163-169, 2008.
- GARCIA, T. A. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus***. Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular), Universidade Nacional de Brasília, 2006.
- HASPER, A. A.; DEKKER, S. E.; MIL, M. Y.; VAN VONDERVOORT, P. J. L.; GRAAF, L. H. A new endonucanase from *Aspergillus Níger* with major activity towards xyloglucan. **Applied of Environmental Microbiology**, vol. 68, p. 1556–1560, 2002.
- KARIMA, A. N. **Étude de l’alpha amylase de levures isolées d’un écosystème extreme (sol environnant dès sources thermales) et cultivées sur um milieu à base de lactoserum**. Dissertation (Departement de Biochimie et Microbiologie), Faculté dès Sciences de La Nature et de La Vie, France, 2008.
- KLONOWSKA, A.; GAUDIN, C.; FOURNEL, A.; ASSO, M.; PETIT, J. L.; GIORGI, M.; TRON, T. Characterization of a low potencial laccase from the basidiomycete C30. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 6119–6125, 2002.
- LITTHAUER, D., VUUREN, M. J. V.; TONDER, A. V., WOLFAARDT, F. W. Purification and kinetics of a thermostable lacase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC108). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 563-568, 2007.

LOMASCOLO, A.; CAYOL, J. L.; ROCHE, M.; GUO, L.; ROBERT, J. L.; RECORD, E.; LESAGE-MEESSEN, L.; OLIVER, B.; SIGOILLOT, J. C.; ASTHERR, M. Molecular clustering by *Pycnoporus* strains from various geographic origins and isolation of monocaryotic strains for lacase hyperproduction. **Mycology Research**, vol. 106, p. 1193-1203, 2002.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccases: New functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551-565, 2002.

MOUGIN, C.; JOLIVALT, C.; BRIOZZO, P.; MADZAK, C. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. **Environmental Chemistry Letters**, v. 1, p. 145-148, 2003.

NEPOMUCENA, R. M. P. **Avaliação do potencial microbiano de crescimento e secreção de lacase do fungo Amazônico *Lentinus crinitus* (L. ex Fr.) Fr.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2010.

POINTING, S. B.; JONES, E. B. G.; VRIJMOED, L. L. P. Optimization of lacase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. **Mycologia**, vol. 12, p. 134-144, 2000.

SANTOS, J. C. **Atividade Enzimática Oxidativa dos fungos Amazônicos *Pleurotus* SP (F-31), *Lentinus crinitus* e *Hexagonia glabra*.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM, 2009.

SHLEEV, S. V.; MOROZOVA, O. V.; NIKITINA, O. V.; GORSHINA, E. S.; RUSINOVA, T. V.; SEREZHENKOV, V. A.; BURBAEV, D. S.; GAZARYAN, I.; YAROLOV, A. Comparison of physico characteristics of laccases from different basidiomycetes. **Biochimie**, v. 86, p. 693-703, 2004.

STOILOVA, I.; KRASTANOV, A.; STANCHEV, V. Properties of crude lacase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 1, p. 208-215, 2010.

SZKLARZ, G. D.; ANTIBUS, R. K.; SINSABAUGH, R. L.; LINKINS, A. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, v. 81, p. 234-240, 1989.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, J. G. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses and Molecular Mechanisms for Thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Review**, vol. 65, p. 1-43, 2001.

CAPÍTULO III

**Biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
presentes no diesel por fungos amazônicos**

Biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes no diesel por fungos amazônicos

Souza, J. O.; Barroso, H. S.; Fantin, C.; Ribeiro, H. C. T

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas, Brasil, Manaus.

Resumo

A preocupação em diminuir a contaminação por petróleo e seus derivados tem levado ao desenvolvimento de soluções para a preservação e conservação dos recursos naturais. A composição química do petróleo é constituída principalmente por hidrocarbonetos. Os efeitos biológicos dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) podem ser a mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade. No meio ambiente, os HPA's podem sofrer transformações por diversos processos, um deles é a degradação por Microrganismos que é um dos principais meios para remover esses compostos de sedimentos contaminados. A capacidade dos Microrganismos em transformar contaminantes em formas menos tóxicas é chamada de biodegradação. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial dos fungos amazônicos em biodegradar os HPA's presentes no diesel. Foram utilizados os fungos *Hexagonia glabra*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes lactinea* e a interação dos respectivos basidiomicetos. O método utilizado para a avaliação da biodegradabilidade foi a técnica baseada no indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP). Onde foi observado que apenas o *H. glabra* e o consórcio, foram capazes de biodegradar o diesel em até 24 horas, mostrando assim, que podem ser utilizados em estudos de biodegradação de diesel para serem utilizados em processos de biorremediação da região amazônica.

Palavras-chave: fungos, biodegradadores, diesel, 2,6-diclorofenolindol.

1 INTRODUÇÃO

O petróleo é um recurso natural, não renovável, sendo utilizado como a principal fonte energética mundial. Nos processos que envolvem atividades com petróleo e seus derivados, ocorrem vazamentos rotineiros ou acidentais que impactam ecossistemas, sendo necessário a utilização de medidas corretivas e de controle (BENTO, 2005).

Em Manaus o intenso fluxo de embarcação e o vazamento de óleo diesel são as principais atividades antrópicas responsáveis pela introdução de compostos químicos do diesel nos rios, causando a contaminação das águas, sedimentos e solos na região.

A composição química do petróleo, conforme Freedman (1995) e Marques Jr. (2002), é complexa, variável e extremamente influenciada por condições físicoquímicas, biológicas e geológicas do ambiente de formação. O petróleo natural ocorre como uma mistura de compostos orgânicos, principalmente hidrocarbonetos que são, quantitativamente, os mais importantes constituintes do petróleo, podendo ser divididos em três partes: alifáticos, acíclicos e aromáticos.

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) são representantes de uma classe de compostos aromáticos denominados benzenóides e caracterizam-se por apresentar dois ou mais anéis benzênicos fundidos (SOLOMONS, 2012).

Os HPA's possuem caráter lipofílico, hidrofóbico, baixa biodegradabilidade e potencial acumulativo. À temperatura ambiente todos os HPA's são sólidos e apresentam, comumente, altas temperaturas de fusão e ebulição (CARUSO e ALABUDA, 2008). Os HPA's são altamente lipossolúveis e rapidamente absorvidos pelos pulmões, intestinos e pele de homens e animais (MEIRE, 2007).

Os efeitos biológicos dos HPA's podem ser a mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade. Tais efeitos no organismo são inversamente proporcionais à massa molar do composto, assim quanto menor a massa molar do HPA, 2 à 3 anéis aromáticos, prevalece caráter tóxico, enquanto HPA que apresentam de 4 à 6 anéis aromáticos apresenta alto potencial de mutagenicidade (NASCIMENTO et al., 2007).

No meio ambiente os HPA's podem sofrer transformações por diversos processos, como a foto-oxidação, volatilização e oxidação química. Porém, acredita-se, que a degradação realizada por Microrganismos é um dos principais processos para remover esses compostos de sedimentos contaminados, na realidade, ele representa uma estratégia primária pelo qual os contaminantes são eliminados do meio ambiente (OLIVEIRA, 2010; OSTBERG et al., 2007).

A capacidade metabólica que certos organismos possuem de transformar ou mineralizar contaminantes em formas menos tóxicas, as quais passam a ser integradas aos ciclos bioquímicos, é chamada de biodegradação (MIRANDA, 2008).

A biodegradação ocorre inicialmente por catabolismo aeróbico onde a microbiota nativa encontra-se em um ambiente com oxigênio e nutrientes necessários para poder utilizar os HPA's como fonte de carbono e energia, este é um processo lento que sofre influência de fatores ambientais como o pH, temperatura, potencial redox, umidade e nutrientes (OLIVEIRA, 2010; RAYMOND et al., 2001; REGINATTO et al., 2011).

Os microrganismos são considerados biodegradadores eficientes devido a sua abundância, a diversidade de espécies, e sua versatilidade catabólica e anabólica, bem como a sua capacidade de adaptação a condições ambientais adversas (MORAES e TORNISIELO, 2009).

Algumas características dos fungos, como a bioatividade de degradar materiais diversos no ambiente, sua capacidade de crescer sob condições ambientais de estresse, como meios com baixos valores de pH, pobres em nutrientes e com baixa atividade de água, o que favorece o seu desenvolvimento diante de outros Microrganismos, tornando-os potencialmente melhores degradadores do que as bactérias (ATAGANA, 2006; MOLLEA et al., 2005).

A maioria dos processos biotecnológicos utilizando fungos baseia-se nos seus produtos metabólicos como: fermentação, enzimas e polissacarídeos, que podem ser utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. As enzimas fúngicas são utilizadas na biodegradação de compostos xenobióticos, como por exemplo, no tratamento de efluentes da indústria papelreira e têxtil, e na biorremediação de solos, lençóis freáticos e sedimentos contaminados por compostos orgânicos tóxicos (MACIEL et al., 2010). Este processo biotecnológico de remediação vem sendo pesquisado e testado, principalmente, em casos de contaminações por hidrocarbonetos (SILVA e ESPOSITO, 2004).

Com os estudos voltados para as enzimas comerciais, surge o interesse no uso de lacases, pois, as lacases fúngicas, produzida por fungos basidiomicetos, estão recebendo grande atenção em várias aplicações industriais devido ter à capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos. Os melhores produtores de lacase são basidiomicetos pertencentes ao grupo dos fungos de decomposição branca, eficientes degradadores de madeira (MAYER e STAPLES, 2002).

Segundo Whiteley e Lee (2006) as enzimas Lacase, Lignina peroxidase e Manganês peroxidase também são responsáveis pela biodegradação oxidativa de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. De acordo com Majcherczyk e colaboradores (1998) a utilização de lacase pode ser estendida para a degradação dos HPA's, por ser considerada uma enzima oxidativa, útil para recuperação de ambientes contaminados.

Alguns estudos utilizam testes preliminares para selecionar microrganismo com potencial para degradar HPA's. O trabalho realizado por Luz e colaboradores (2011) avaliou a capacidade das interações bacterianas coletadas em uma área impactada de Porto Velho-Ro na biodegradação de compostos presentes no óleo diesel o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP).

A técnica para a verificação do potencial dos Microrganismos em degradar hidrocarbonetos foi desenvolvida por Hanson e colaboradores (1993) que utilizou o indicador DCPIP. O princípio deste teste consiste no fato que durante a oxidação microbiana dos hidrocarbonetos, elétrons são transferidos até aceptores como gás oxigênio, nitratos e sulfatos. Ao incorporar um aceptor de elétron como o DCPIP ao meio de cultura, é possível averiguar a capacidade dos Microrganismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato pela observação da mudança de cor do DCPIP de azul (oxidado) para incolor (reduzido) (MARIANO, 2009).

Com base nas informações da literatura e diante de dados científicos a respeito de Microrganismos como potenciais agentes biodegradadores de HPA's, é de grande importância a busca por fungos da região amazônica com atividade biodegradadora, pois não há dados na literatura de trabalhos sobre o potencial de fungos nativos da região para serem aplicados em processos de bioremediação em ambientes amazônicos contaminados, utilizando o teste com indicador DCPIP.

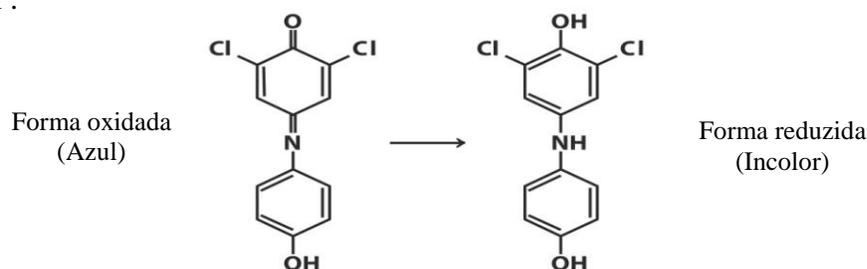


Figura 1: Reação redox do DCPIP (Fonte: biblioteca.biofisica).

Em virtude disso, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da utilização dos fungos *Hexagonia glabra*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes lactinea* e sua interação, na degradação de HPA's presentes no diesel.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo dos Microrganismos

Para realização do experimento foram utilizadas culturas dos fungos *H. glabra* (UEA201), *P. sanguineus* (UEA209), *T. lactinea* (UEA202) e sua interação, preservadas na coleção do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia/ Centro de Energia, Ambiente e Biodiversidade da Universidade do Estado do Amazonas.

Os fungos utilizados neste estudo foram mantidos em meio Batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados em B.O.D por um período de 7 dias a 28°C. Após este período, iniciou-se os testes de biodegradabilidade.

2.2 Estudo de biodegradação por 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) I

A análise dos fungos com potencial para degradar HPA foi realizada em tubos de ensaio, nos quais foram colocados 3 mL de meio mineral, composição (Tabela 01), acrescido de 0,05 g.L⁻¹ de 2,6-diclorofenol indofenol, 0,03 mL de diesel (1%) e um inóculo de 10 mm de diâmetro de cada cepa fúngica e da interação, sendo que na última o inóculo possui 1/3 de cada fungo. Da mesma forma foi feito o controle do ensaio, sem adição da cepa fúngica. Em seguida os tubos foram vedados com tampão de algodão, acondicionados em agitador do tipo Shaker sob a temperatura de 30 °C, 180 rpm, e observados a cada 24 horas, até 72 horas a mudança de cor do indicador de azul para incolor. As análises foram feitas em triplicata.

2.2 Estudo de biodegradação por 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) II

A análise dos fungos com potencial para degradar HPA foi realizada em tubos de ensaio, nos quais foram colocados 3 mL de meio mineral, composição (Tabela 01), acrescido de 0,05 g.L⁻¹ de 2,6-diclorofenol indofenol, 0,100 mL de diesel (3%) e um inóculo de 10 mm de diâmetro do fungo *H. glabra* e da interação, sendo que na última o inóculo possui 1/3 de cada

fungo. Foi feito da mesma forma o controle do ensaio, sem a adição do fungo. Em seguida os tubos foram vedados com tampão de algodão, acondicionados em agitador do tipo Shaker sob a temperatura de 30 °C, 180 rpm, e observados de hora em hora até 24 horas para verificar a descoloração do DCPIP. As análises foram feitas em triplicata.

Tabela 01. Composição do meio mineral

| Reagentes | Concentração |
|---|-------------------------|
| KH_2PO_4 | 1,0 g·L ⁻¹ |
| K_2HPO_4 | 1,0 g·L ⁻¹ |
| $\text{NH}_4\text{H}_2\text{SO}_4$ | 1,0 g·L ⁻¹ |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,20 g·L ⁻¹ |
| $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0,050 g·L ⁻¹ |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,020 g·L ⁻¹ |

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De forma geral, os três fungos analisados, *H. glabra*, *P. sanguineus* e *T. lactinea*, apresentaram resposta positiva ao teste com o DCPIP, indicando habilidade em degradar hidrocarbonetos existentes no óleo diesel. Dentre estes, o fungo *H. glabra* apresentou resposta em 24 horas e o *P. sanguineus* e *T. lactinea* apresentaram somente após 48 horas. A interação dos três fungos também apresentou resultado positivo até 24 horas.

Na Tabela 2, pode-se visualizar o tempo de resposta dos fungos ao teste da biodegradação por DCPIP.

Tabela 02. Tempo de resposta dos fungos e interação ao teste da biodegradação por DCPIP.

| Espécie | Tempo de resposta ao teste de DCPIP(h) |
|------------------------------|--|
| <i>Hexagonia glabra</i> | 24 h |
| <i>Pycnoporus sanguineus</i> | 72 h |
| <i>Trametes lactinea</i> | >72 h |
| <i>Interação</i> | 24 h |

Os resultados podem ser visualizados nas figuras 02 a 05, onde a figura 02 e 05 mostram os resultados de *H. glabra* e da interação na descoloração do meio em até 24 horas. E as figuras 3 e 4 mostram a descoloração realizada por *P. sanguineus* e *T. lactinea* que ocorreu apenas após 48 horas.

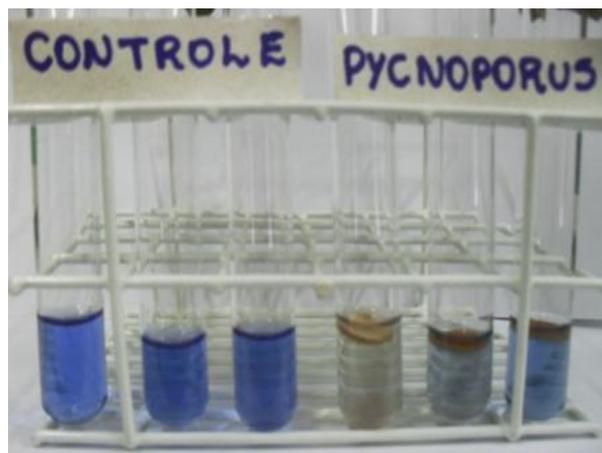


24 horas

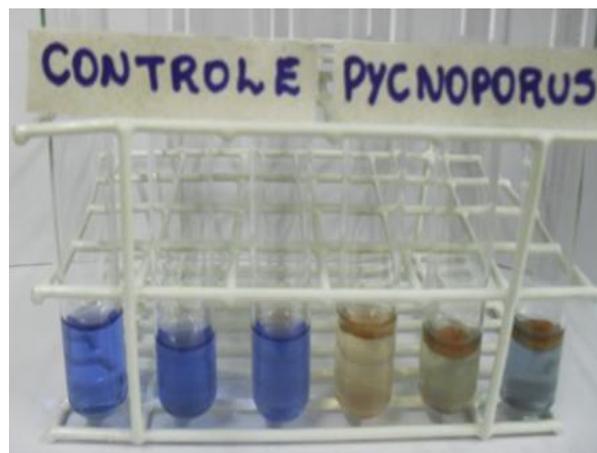


48 horas

Figura 02: Descoloração do DCPIP em 24 horas pelo fungo *Hexagonia glabra*.



24 horas



48 horas

Figura 03: Descoloração do DCPIP em mais de 24 horas pelo fungo *Pycnoporus sanguineus*.



24 horas



48 horas

Figura 04: Descoloração do DCPIP em mais de 24h pelo fungo *Trametes lactinea*.

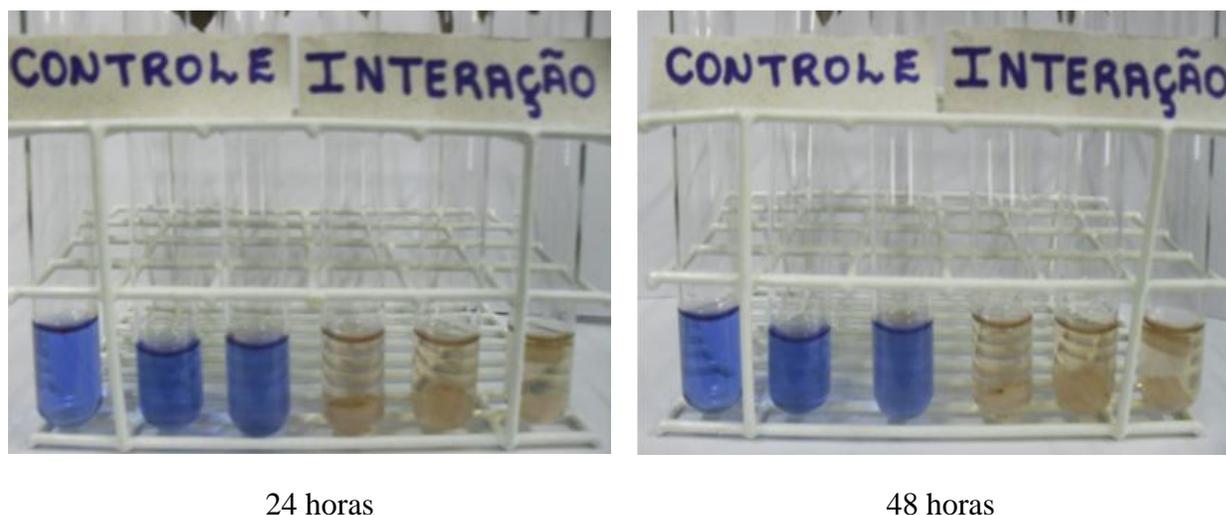


Figura 05: Descoloração do DCPIP em 24 horas pela interação fúngica dos três basidiomicetos.

O *P. sanguineus* apresentou descoloração parcial no período de 48 horas (Figura 03), mas pôde-se perceber a biodegradação em até 72 horas. O fungo *T. lactinea* não apresentou descoloração em 48 horas (Figura 04), porém foi observado um início de descoloração após 72 horas. Assim, o fungo *P. sanguineus* apresentou maior potencial em degradar HPA's em relação ao *T. lactinea* que apresentou degradação mais lenta.

Na comparação dos resultados entre os três fungos, *H. glabra* apresentou maior potencial de degradação em relação a *P. sanguineus* e *T. lactinea*, realizando a descoloração em 24 horas. Da mesma forma, na interação fúngica, obteve-se o mesmo tempo de resposta de *H. glabra* ao teste de descoloração. Assim, foi observado que tanto o fungo *H. glabra* quanto o consórcio obtiveram melhor resposta a descoloração do DCPIP em um período de 24 horas.

Estes resultados podem ser comparados com os obtidos nos testes de atividade enzimática, onde mostraram que as maiores médias de produção de lacase ocorreram para o fungo *H. glabra* e interação, indicando que o maior potencial em biodegradar HPA's do diesel pode ser devido a maior produção de lacase apresentada.

Com a obtenção destes resultados o fungo *H. glabra* e interação foram submetidos ao teste de DCPIP com uma maior porcentagem de diesel para avaliar se apresentariam o mesmo potencial para biodegradação em relação ao tempo de descoloração do indicador.

No segundo estudo de biodegradação, pôde-se perceber que o fungo *H. glabra* apresentou melhor resultado na descoloração em um período de 24 horas (Figura 06). Contudo, a interação fúngica apresentou descoloração parcial e inferior a de *H. glabra* (Figura 07). Mostrando assim, que o fungo *Hexagonia glabra* possui um maior potencial para biodegradar os HPA's em um menor período de tempo quando submetido a uma maior concentração de diesel.

Com base nos resultados obtidos no capítulo anterior, pode-se concluir que o fungo *H. glabra* apresenta uma porcentagem de 28 % de lacase maior que na interação fúngica. Podendo assim reafirmar que o fungo com a maior produção de lacase apresenta maior potencial em biodegradar hidrocarbonetos aromáticos.



Figura 06: Descoloração do DCPIP em 24 horas pelo fungo *H. glabra* submetido a uma maior quantidade de diesel.



Figura 06: Descoloração do DCPIP em 24 horas pela Interação fúngica submetida a uma maior quantidade de diesel.

De acordo com a literatura, o maior diferencial acerca dos consórcios microbianos, em detrimento do uso de espécies isoladas, é que o produto do metabolismo de um microrganismo pode ser substrato para outros, havendo uma complementaridade metabólica e ocorrendo um aumento na degradação dos compostos tóxicos (JACQUES, 2007). Contudo o resultado final dependerá da combinação particular das espécies envolvidas, ou do modo de interação entre as espécies e das condições ambientais ou nutricionais do substrato sob colonização (CHI et al., 2007).

Nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Qian e Chen (2012) onde mostram que a lacase secretada pela interação fungos basidiomicetos *Trametes versicolor* e *Phanerochaete chrysosporium* produziu um grande aumento na oxidação do hidrocarboneto policíclico aromático, benzo(a)pireno, que é um poluente orgânico altamente tóxico e mutagênico.

Lee e colaboradores (2005) obtiveram degradação efetiva do bifesnol A (composto químico que causa sérios problemas de poluição ambiental) e redução de sua atividade estrogênica nos estudos com consórcio dos basidiomicetos *Stereum hirsutum* e *Heterobasidium insulare*. E nos estudos realizados por Dodor e colaboradores (2004) obtiveram degradação dos HPA's, antraceno e benzo(a)pireno, com o basidiomiceto *Trametes versicolor*.

O primeiro trabalho utilizando o DCPIP como indicador foi conduzido por Hanson e colaboradores (1993) que analisou o potencial de bactérias em degradar óleo diesel, mostrando eficiência do método para obtenção de cepas capazes de realizar degradação do composto. Desde então, outros trabalhos tem utilizado este método (Mariano et al., 2007; Jacques et al., 2007), no entanto pouco se sabe sobre a utilização deste método para testar o potencial de degradação de HPA's por fungos.

Neste trabalho, os resultados dos testes utilizando o indicador DCPIP mostraram a eficiência deste método para determinar o potencial em biodegradar os hidrocarbonetos do óleo diesel, podendo assim, serem utilizados em estudos de seleção de fungos para biorremediação da região estudada.

4 CONCLUSÕES

- Todos os fungos analisados (*H. glabra*, *P. sanguineus* e *T. lactinea*) apresentaram resposta positiva ao teste com o DCPIP, indicando habilidade em degradar hidrocarbonetos existentes no óleo diesel.
- Em 1% de diesel o fungo *H. glabra* e a interação apresentaram maior potencial em relação aos fungos *P. sanguineus* e *T. lactinea*.
- O aumento da concentração do diesel para 3% influenciou no potencial de biodegradação da interação fúngica, pois a mesma em 24 horas, não apresentou descoloração total.
- No capítulo anterior *H. glabra* apresentou produção de lacase de 72 % e 08 % maior que em *P. sanguineus* e *T. lactinea* respectivamente. Assim podemos concluir que o fungo com a maior produção de lacase apresenta maior potencial em biodegradar HPA's do diesel.
- O método utilizando o indicador DCPIP também pode ser utilizado para pré-seleção de fungos com potencial em biodegradar hidrocarbonetos aromáticos presentes no petróleo e derivados.

5 REFERÊNCIAS

- ATAGANA, H. I.; HAYNES, R. J. & WALLIS, F. M. Fungal Bioremediation of creosote contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 172, p. 201-219, 2006.
- BENTO, D. M. Análise Química da Degradação dos Hidrocarbonetos de Óleo Diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica). Universidade Federal do Rio Grande, Rio grande –RS, 2005.
- CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. **Revista do Insituto Adolfo Lutz**. n. 67, p. 1-27, 2008.
- CHI, Y; HATAKKA, A; MAIJALA P. Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes. **International Biodeterioration & Biotechnology**, v. 59, p. 32–39, 2007.
- DODOR, D. E.; HWANG, HUEY-MIN, EKUNWE, S. I.N. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccasefrom *Trametes versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 210-217, 2004.
- FREEDMAN, B. Environmental ecology: the ecological effects of pollution, disturbance, and other stresses. 2 nd ed.San Diego, California. 1995.
- HANSON, K. G.; DESAI, J. D.; DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v. 7, p. 745-748, 1993.
- JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n.4, p.1192-1201, 2007.
- LEE SM, KOO BW, CHOI JW, CHOI DH, AN BS, JEUNG EB, CHOI IG. Degradation of bisphenol A by white rot fungi, *Stereum hirsutum* and *Heterobasidium insulare*, and reduction of its estrogenic activity. **Biological & Pharmaceutical Bulletin** v. 8, p. 201–207, 2005.
- LUZ, C. C.; SANTOS, M. O. S.; MUSSY, M. Y. ; YAMASHITA, M.; BASTOS, W. R.; BRUCHA, G.; REIS, M. M.; REIS, M. G. Estudos da biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano coletado em Porto Velho- RO, Amazônia. *Química Nova*, v. 34, n. 5, p. 775-779, 2011.
- MACIEL, M. J. M.; CASTRO E SILVA, A.; RIBEIRO, H. C. T. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycetes. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 6, p.1-13, 2010.
- MAJCHERCZYK, A., JOHANNES, C., HUTTERMANN, A. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by lacase of *Trametes versicolor*. **Environ. Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 335–341, 1998.

MARIANO, A. P. Aerobic Biodegradation of Butanol and Gasoline Blends. **Biomass and Bioenergy**, n. 33, p. 1175-1781, 2009.

MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. de F.; BONOTTO, D. M. Monitoramento de indicadores geoquímicos e avaliação da degradação em área contaminada com óleo diesel. **Engenharia sanitária e ambiental** n. 12, v. 7, p. 296-304, 2007.

MARQUES JR. A. N.; MORAES, R. B. C. & MAURAT C. M. *Biologia Marinha*. Rio de Janeiro. P: 311-334, IN: PEREIRA, R. C.; GOMES, A. S. (org.): Interciência, p. 382, 2002.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccases: New functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551-565, 2002.

MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. M. Aspectos Ecotoxicológicos de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. **Oecology Brasil**, v. 11, n. 2, p. 188-201, 2007.

MIRANDA, V. J. M. Degradação de naftaleno, fenantreno e benzene(a)pireno em solos e sedimentos de ambientes cossteiros, oceânicos e antárticos. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.

MOLLEA, C.; BOSCO, F.; RUGGERI, B. Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. **Chemosphere**. n. 60, p. 636–643, 2005.

MORAES, B. E.; TORNISIELO, T. M. S. Biodegradation of Oil Refinery Residues Using Mixed- Culture of Microorganisms Isolated from a Landfarming. **Brazilian archives of Biology and technology**, v.52, n. 6, p. 1571-1578, 2009.

NASCIMENTO, R. F. et al. Utilização da extração em fase sólida (SPE) na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em matrizes aquosas ambientais. **Química Nova**, n. 30, v. 3, p. 560-564, 2007.

OLIVEIRA, C. R. **Avaliação da biodegradação de Pireno pela microbiota nativa em sedimento do Manguezal do Itacorubi**. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

OSTBERG, T. L.; JONSSON, A. P.; BYLUND, D.; LUNDSTRÖM, U. S. The effects of carbon sources and micronutrients in fermented whey on the biodegradation of n-hexadecane in diesel fuel contaminated soil. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 60, p. 334 - 341, 2007.

QIAN, L.; CHEN, B. Enhanced oxidation of benzo[a]pyrene by crude enzyme extracts produced during interspecific fungal interaction of *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, p. 1639–1646, 2012.

RAYMOND, J. W.; ROGERS, T. N.; SHONNARD, D. R.; et al. “ A review of structure-based biodegradation estimation methods” **Journal of Hazardous Materials**, B84, p. 189-215, 2001.

REGINATTO, C.; COLLA, L.; THOME, A. Biorremediação de Resíduos Oleosos em Solos. **Revista CIATEC – UPF**, v. 3, p. 19 - 31, 2011.

SILVA, M; ESPOSITO, E. O papel dos fungos na recuperação ambiental In: ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. (Coords.) Fungos: Uma introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, p. 339, 2004.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. *Química Orgânica*. Traduzido por Júlio Carlos Afonso. 10 ed. v. 2, Rio de Janeiro: LTC, 2012.

WHITELY, C. G.; LEE, D. J. Enzyme technology and biological remediation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 291-316, 2006.