



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

VANDERLEI SABOIA DOS SANTOS

SELEÇÃO DE BASIDIOMICETOS DA REGIÃO AMAZÔNICA COM POTENCIAL
PARA DEGRADAÇÃO DE BENZO(a)PIRENO

Manaus

2018

VANDERLEI SABOIA DOS SANTOS

**SELEÇÃO DE BASIDIOMICETOS DA REGIÃO AMAZÔNICA COM POTENCIAL
PARA DEGRADAÇÃO DE BENZO(a)PIRENO**

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.

Orientador: Prof^a Dr^a Sandra Patrícia Zanotto
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Hileia dos Santos Barroso

Manaus

2018

VANDERLEI SABOIA DOS SANTOS

**SELEÇÃO DE BASIDIOMICETOS DA REGIÃO AMAZÔNICA COM POTENCIAL
PARA DEGRADAÇÃO DE BENZO(a)PIRENO**

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.

Data da aprovação 28/04/2017

Banca Examinadora:

Rudi Emerson de Lima Procópio
Universidade do Estado do Amazonas - UEA

Valdir Florêncio Veiga Junior
Departamento de Química – ICE
Universidade Federal do Amazonas

Sandra Patrícia Zanotto
Centro de Biotecnologia da Amazonia - CBA

**Manaus
2018**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

8080s	<p>Santos, Vanderlei Saboia dos Seleção de Basidiomicetos da Região Amazônica com Potencial para Degradação de Benzo(a)Pireno / Vanderlei Saboia dos Santos. Manaus : [s.n], 2018. 80 f.: color.; 30 cm.</p> <p>Dissertação - PGSS - Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2018. Inclui bibliografia Orientador: Zanotto, Sandra Patrícia Coorientador: Barroso, Hiléia dos Santos</p> <p>1. Basidiomicetos da Amazônia. 2. Enzimas ligninolíticas. 3. biodegradação. 4. Benzo(a)Pireno. I. Zanotto, Sandra Patrícia (Orient.). II. Barroso, Hiléia dos Santos (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Seleção de Basidiomicetos da Região Amazônica com Potencial para Degradação de Benzo(a)Pireno</p>
-------	---

*Dedico este trabalho ao meu filho,
Vicente Vallentin dos Santos Sabóia, o
qual passou a ser minha fonte de
inspiração e força para continuar sempre
olhando para um futuro melhor.*

“As pessoas fortes não derrubam as outras, elas ajudam-nas a se erguerem.”.

Son Goku

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Regina Sabóia, a pessoa que mais me ajudou, a qual foi fundamental no meu desenvolvimento como pessoa, estudante e sempre me apoiou durante essa empreitada. Agradeço de todo coração por tudo.

Ao meu pai, Vivaldo Costa, um homem simples que conseguiu compreender a importância e dedicação aos estudos, te agradeço sempre meu pai.

À Ketellem Freitas dos Santos uma pessoa que soube me apoiar e ser paciente e que se transformou em uma grande amiga que entende minhas preocupações e minha personalidade forte e inflexível, agradeço ainda ao meu filho por ter lhe conhecido durante os anos do mestrado, a pessoa mais importante que conheci e que fez desses dois anos os melhores e mais felizes.

A minha irmã, Regiane Sabóia e meu irmão, Wanderlei Sabóia, agradeço a eles do fundo do meu coração.

Agradeço minhas orientadoras Prof^ª. Dr^ª. Sandra Patrícia Zanotto e Prof^ª. Dr^ª. Hileia dos Santos Barroso, pois foram essenciais para minha formação como mestre, as quais me deram muito apoio durante essa jornada e me ensinaram muito sobre tudo que conheço hoje. São pessoas das quais me orgulho de ter sido orientando e sempre apresentaram grande dedicação pelo projeto. Agradeço ainda ao Prof.^º Dr. Hilton Marcelo pela ajuda de sempre, com os textos e motivação ao trabalho. Israel Romano, grande amigo sempre disposto e apoiador de boas ideias, grato! O professor Rudi Procópio e a professora Ieda Batista, sempre presente para tirar as dúvidas. Ao professor Cleiton Fantin pela paciência e confiança.

Aos meus colegas e amigos do mestrado que caminharam comigo durante esses dois anos. Jéssica Varela se mostrou ser uma grande amiga, sempre presente e disposta a ajudar; ao Gilmar Seixas e Jonas “o Beduíno”, os amigos dos momentos de descontração e do café, grandes histórias foram contadas, grandes homens; ao Emerson Bacellar, o filósofo dos melhores momentos do laboratório, a engrenagem que faz todos os laboratórios funcionar, a peça fundamental do mestrado. Agradeço grandemente. Agradeço ainda ao Jhon Alemida e Kiandro Neves pela ajuda dedicada ao projeto.

As Agências de fomento, pela disponibilidade de bolsas de estudos que foram de suma importância para o desenvolvimento do projeto: Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

Os fungos basidiomicetos são bastante conhecidos por suas formas macroscópicas, tais como os cogumelos e orelha-de-pau, e desempenham um importante papel na ciclagem de nutrientes nos ecossistemas. Atualmente estudos relatam a importância dos basidiomicetos em degradar contaminantes ambientais, através do uso de um conjunto de enzimas ligninolíticas de baixa especificidade. O objetivo deste trabalho é selecionar basidiomicetos isolados da região Amazônica que apresentem potencial para degradação do Benzo(a)Pireno (BaP). Os isolados foram pré-selecionados pela capacidade em oxidar ácido gálico a quinona, esse teste indica a presença de enzimas ligninolíticas importantes para degradação de xenobióticos. Também foram avaliados seu potencial em descolorir o corante Azul brilhante de Remazol R (RBBR) derivado do Antraceno. Os fungos selecionados foram utilizados em ensaios para avaliar a atividade das enzimas lignolíticas Lacase, Lignina Peroxidases (LiP) e Manganês Peroxidase (MnP) na presença de corante RBBR e BaP. Os fungos que apresentaram atividade enzimática na presença dos xenobióticos foram selecionados para ensaios de biodegradação de BaP *in vitro*, a análise qualitativa de metabólitos de BaP também foi realizada. Dos isolados fúngicos, 42% apresentaram resultado para oxidação de ácido gálico com destaque para dois isolados fúngicos (UEAF26-2 e UEAF06-2). O isolado UEAF26-2 apresentou produção de MnP (12,73 UI L⁻¹) e LiP (21,65 UI L⁻¹) com destaque para Lacase (78,4 UI L⁻¹) em ensaio de atividade enzimática com corante RBBR e 94% de descoloração em 24 horas para concentração de 100 mgL⁻¹ de RBBR. O mesmo obteve produção das enzimas LiP (1,15 UI L⁻¹), com destaque para Lacase (28,52 UI L⁻¹), utilizando BaP como indutor. O isolado UEAF06-2 produziu Lacase (22,17 UI L⁻¹), MnP (9,91 UI L⁻¹) e LiP (8,89 UI L⁻¹) com indutor RBBR e em 24 horas descoloriu 38% do corante para concentração 100 mgL⁻¹ de RBBR. Em ensaios utilizando BaP como indutor da atividade enzimática o isolado obteve resultado para Lacase (4,46 UI L⁻¹) e LiP (1,59 UI L⁻¹). Em ensaio de degradação de BaP (1mg L⁻¹) o isolado UEAF26-2 apresentou 9,9% em 7 dias e 7,4% para 14 dias. O isolado UEAF06-2 apresentou degradação de 13% em 7 dias e 42,3% para 14 dias com BaP (1mg L⁻¹). Em análise de metabólitos do BaP, não foram detectados os metabólitos analisados (cumarina e ácido 1-hidroxi-2-naftóico). Os resultados destacam o potencial do isolado UEAF06-2 para degradação do BaP e a utilização desse fungo em ensaios posteriores de degradação de outros HPAs.

Palavras-chave: Basidiomicetos da Amazônia, Enzimas ligninolíticas, biodegradação, Benzo(a)Pireno.

ABSTRACT

Basidiomycetes fungi are well known for their macroscopic forms, such as mushrooms and wood ear, and play an important role in the cycling of nutrients in ecosystems. Currently, studies report the importance of basidiomycetes in degrading environmental contaminants through the use set of low specificity ligninolytic enzymes. The objective of this work is to select basidiomycetes isolated from the Amazon region that present potential for Benzo(a)Pyrene (BaP) degradation. The isolates were pre-selected for the ability in oxidize gallic acid to quinone, this assay indicates the presence of ligninolytic enzymes important for degradation of xenobiotics, in sequence, the isolates were evaluated for potential to discolor the Remazol Brilliant Blue R (RBBR) dye derived from Anthracene. The selected fungi were used in assays to evaluate the activity of lignolytic enzymes (Lacase, Lignin Peroxidases and Manganese Peroxidase) in the presence of RBBR dye and BaP. Fungi that showed enzymatic activity in the presence of xenobiotics were selected for in vitro biodegradation assays of BaP, BaP metabolism analysis was also performed. Of the fungal isolates, 42% presented results for gallic acid oxidation with highlight for two fungal isolates (UEAF26-2 and UEAF06-2). The isolate UEAF26-2 showed production of MnP (12.73 IU L^{-1}) and LiP (21.65 IU L^{-1}) with highlight Lacase (78.4 IU L^{-1}) in enzymatic activity assay with RBBR obtained 94% discoloration in 24 hours for the concentration of 100 mgL^{-1} of RBBR. In enzymatic activity assays using BaP as inducer the isolate presented LiP production (1.15 IU L^{-1}), with emphasis on Lacase ($28, 52 \text{ IU L}^{-1}$). The isolate UEAF06-2 showed production for Lacase (22.17 IU L^{-1}), MnP (9.91 IU L^{-1}) and LiP (8.89 IU L^{-1}) and in 24 hours discolored 38% of the dye to 100 mgL^{-1} concentration of RBBR. In assays using BaP as an inducer of enzyme activity, the isolate obtained results for Lacase (4.46 IU L^{-1}) and LiP (1.59 IU L^{-1}). In a BaP degradation assay (1 mg L^{-1}), the isolate UEAF26-2 showed 9.9% in 7 days and 7.4% in 14 days. Isolate UEAF06-2 presented degradation of 13% in 7 days and 42.3% for 14 days with BaP (1 mg L^{-1}). In analysis of BaP metabolites, the analyzed metabolites (coumarin and 1-hydroxysilane-2-naphthoic acid) were not detected. The results highlight the potential of isolate UEAF06-2 for degradation of BaP and the use of this fungus in later tests of degradation of other HPAs.

Keywords: Basidiomycetes from Amazon, Ligninolytic enzymes, biodegradation, Benzo(a)Pyrene.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas de alguns hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. Fonte: WHO/IPCS (1994).....	29
Tabela 2: Nomenclatura, estrutura e toxicidade dos 16 HPAs considerados prioritários pela USEPA. Fonte: WHO/IPCS (1994).....	30
Tabela 3: Organização de grupos de corantes quanto seu grupo cromóforo.....	35
Tabela 4: Alguns estudos com fungos apresentam potencial em aplicação de processos de biorremediação.....	39
Tabela 5: Organismos degradadores da lignina. Fonte: Tuomela et al (2000).....	43
Tabela 6: Isolados fúngicos que apresentaram resultados para produção de enzimas ligninolíticas em reação com ácido gálico.....	59
Tabela 7: Concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do corante RBBR após reação de descoloração por fungos do Filo Basidiomycota em período de 5 dias.....	60
Tabela 8: Avaliação enzimática para o isolado fúngico UEAF26-2 sem adição de RBBR e com adição do corante em 120 h de reação.....	62
Tabela 9: Avaliação da atividade enzimática para o isolado fúngico UEAF04-1 sem adição de RBBR e com adição de corante 120 h de reação.....	62
Tabela 10: Avaliação da atividade enzimática para o isolado fúngico UEAF06-2 sem adição do RBBR e com adição do corante em 120 h de reação.....	62
Tabela 11: Avaliação da atividade enzimática dos isolados fúngicos na ausência e presença de BaP como indutor.....	64

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Principais HPAs com baixo peso molecular presentes no petróleo e derivados estudados por Lima em 2009. Fonte: Lima (2009). 31
- Figura 2:** Alguns HPAs pirolíticos de alto peso molecular estudados por Lima em 2009. Fonte: Lima (2009). 322
- Figura 3:** Proposta de mecanismo da degradação de HPAs por micro-organismos. Fonte: Cerniglia, (1992). 377
- Figura 4:** Estruturas de compostos similar as estruturas da lignina, polímero natural e fonte de carbono de fungos da podridão branca. Fonte: Hofrichter et al. (1999). 38
- Figura 5:** Estrutura da lignina. Fonte: Neto (2010). 39
- Figura 6:** Enzima MnP isolada em nanopartícula de vault. Fonte: C&EN (2016). 40
- Figura 7:** Degradação de substratos lignocelulósicos por enzimas do complexo ligninolítico. Fonte: NETO (2006) adaptado de Leonowicz et al. (1999). 45
- Figura 8:** Estrutura tridimensional da Lacase do fungo *Coprinus cinereus*. Filamentos em azul são extremidades N-terminal e em vermelho, C-terminal. Os átomos de cobre estão representados por esferas nos sítios T1 (azul) e T3 (amarelo). Fonte: Ducros et al. (2001). 46
- Figura 9:** Ciclo catalítico da peroxidase dependente de manganês. Fonte: Hofrichter (2002). 47
- Figura 10:** Ciclo catalítico da Lignina peroxidase. Fonte: Neto (2006). 48
- Figura 11:** Imagem de satélite da área de coleta dos fungos, Localização geográfica: 3°07'38.1"S 60°44'32.2"W, fonte: IBGE/googleearth. 50
- Figura 12:** Estrutura química do Azul Brilhante de Remazol R, massa molar: 626.54 g/mol/L. 52
- Figura. 13.** Equação de determinação da porcentagem de descoloração. Onde $A_{\lambda \text{ inicial}}$ é a absorbância inicial do controle (meio + corante) e $A_{\lambda \text{ final}}$ é a absorbância final da amostra. .. 53
- Figura 14:** Cromatograma dos compostos utilizados nos ensaios de biodegradação. a: Padrão interno I (Antraceno m/z 178/179); b: analíto (benzo(a)pireno m/z 252/250); c: Padrão interno (*surrogate*) II (Perileno deuterado m/z 264/260). 57
- Figura 15:** Gráfico da porcentagem de descoloração do corante RBBR em período de 120 horas, para as concentrações: 100mgL^{-1} , 500mgL^{-1} e 1000mgL^{-1} 60
- Figura 16:** Gráfico da produção enzimática (Lacase, MnP e Lip) na ausência de BaP em período de 7 dias. 65
- Figura 17:** Gráfico da produção enzimática (Lacase, MnP e Lip) na presença de BaP em período de 7 dias. 65

Figura 18: Avaliação da degradação do BaP pelos fungos pré-selecionados, ensaio I e II.....	66
--	----

LISTA DE ABREVIACOES

- ABTS:** 2,2 – azino-bisetilbenzotiazolina
- ATSDR:** Agency for Toxic Substances and Disease Registry
- AVO:** lcool Veratrlico Oxidase
- BaP:** Benzo(a)pireno
- BDA:** Batata Dextrose gar
- BOD:** Demanda Biológica de Oxignio
- CG:** Cromatografia gasosa
- EDTA:** cido Etilenodiamino Tetra-acético
- EPA:** Environmental Protection Agency
- GC-MS:** Cromatógrafo gasoso acoplado em Espectrômetro de massas
- GOx:** Glioxal Oxidase
- HPAs:** Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
- HPLC:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- ITS:** Internal Transcribed Spacer
- LiPs:** Lignina Peroxidases
- MEA:** Malte Extrato gar
- MnPs:** Manganês Peroxidases
- OH:** Hidroxila
- PCR:** Reação em Cadeia de Polimerase
- RBBR:** Azul Brilhante de Remazol R
- SDA:** Sabouraud Dextrose gar
- SDS:** Dodecil Sulfato de Sódio
- SH:** Tiol
- SIM:** Monitoramento Seletivo de íons
- USEPA:** Environmental Protection Agency of United State

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	26
1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	28
1.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	28
1.2 Origem e Fonte de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	30
1.3 Comportamento dos HPAs no Meio Ambiente.....	32
1.4 Corante Textil	33
1.5 Uso de Fungos em Processo de Biodegradação	36
1.6 Fungos	40
1.7 Filo Basidiomycota.....	41
1.8 Enzimas Ligninolíticas	43
1.8.1 Lacase (Ec. 1.10.3.2).....	45
1.8.2 Manganês Peroxidase (MnP, Ec 1.11.1.13)	46
1.8.3. Lignina Peroxidase (LiP EC 1.11.1.14)	47
2 OBJETIVOS	49
2.1 Geral	49
2.2 Específicos.....	49
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3.1 Coleta e Isolamento de Macrofungos	50
3.2 Reação de Oxidação do Ácido Gálico.....	51
3.3 Identificação taxonômica dos isolados de basidiomicetos	51
3.4 Capacidade dos Fungos em Descolorir o Corante RBBR.....	52
3.5 Produção de Enzimas Ligninolíticas na Presença de RBBR.....	53
3.6 Produção de Enzimas Ligninolíticas na Presença de BaP.....	54
3.7 Ensaios de Biodegradação de Benzo(a)Pireno	55
3.8 Extração e Preparo de Amostras	55
3.9 Condições do CG-EM	56
3.10 Condições do HPLC para Análise de Metabólitos	57
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1 Coleta e Isolamento dos Fungos.....	58
4.2 Reação com Ácido Gálico.....	58
4.3 Ensaio de Descoloração do RBBR.....	59
4.4 Avaliação da Atividade Enzimática com o corante RBBR.....	61
4.5 Avaliação da atividade enzimática com o indutor BaP.....	63
4.6 Ensaio de Biodegradação do Benzo(a)Pireno.....	66
4.7 Análise de Metabólitos do Benzo(a)Pireno.....	68
5 CONCLUSÃO	69
6 REFERÊNCIAS	70
ANEXO I.....	79
ANEXO II.....	80
ANEXO III	81
ANEXO IV	82

INTRODUÇÃO

No mundo, a contaminação do meio ambiente por compostos tóxicos através de atividades realizadas por seres humanos é hoje uma consequência generalizada que remete preocupação com os ecossistemas. Os compostos têm origens muito variada, agrotóxicos, corantes químicos contaminantes de afluentes, queimas de combustíveis fósseis, resíduos industriais, entre outros. A partir destes, a contaminação do solo, ar, água e até mesmo alimentos é iminente.

Esses compostos são em sua maioria persistentes e de difícil degradação por agentes físicos, químicos ou por micro-organismos do meio devido sua hidrofobicidade. Também chamados de xenobióticos, esses comprometem a biota e a saúde de seres humanos. Dentre esses contaminantes, os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos – HPAs se destacam por serem poluentes bastante resistente e que apresentam grande periculosidade ao meio ambiente. Os HPAs foram caracterizados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos - EPA como, compostos que apresentam alto risco à saúde humana por seu caráter carcinogênico, mutagênico e teratogênico. (TONY HADIBARATA et al. 2009; CAO et al. 2009; DELLAMATRICE et al. 2012; PINTO et al. 2012).

HPAs são oriundos de várias fontes de poluição antrópicas, como queima incompleta de combustíveis fósseis, emissões automotivas e industriais, queima de plantações de cana-de-açúcar (biomassa), derramamento de petróleo e derivados, além de serem emitidos por fontes naturais. (VO DINH et al., 1998; MASTRAL et al., 2002).

A Amazônia é uma região onde se prevalece os transportes fluviais, a exploração da região, e o crescimento populacional, esses fatores estão intimamente ligados ao aumento da demanda industrial o que acarreta em alto consumo de combustíveis fósseis. Além desses problemas, as queimadas na região são constantes em épocas de clima seco e afeta milhares de quilômetros quadrados da floresta, isso provém de um costume do povo que vive na Amazônia, o uso do fogo para facilitar a formação de pastos para criação de gados ou para agricultura. O uso dessa prática acarreta na liberação de grande quantidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Porém a maior fonte de liberação desses xenobióticos é pirogênica, derivados de resíduos industriais, motores a diesel e processos de combustão em geral, além de derivados de petróleo a partir do derramamento direto do óleo no ambiente, efluentes industriais e domésticos (NRC, 1985; LIMA, 2009).

Conforme estudos realizados por Souza et al. em 2015, regiões portuárias de Manaus, como porto do CEASA, porto do PANAIR e Porto Manaus Moderna apresentam elevada taxa de concentração de HPAs, grande parte dessa contaminação é oriunda da alta movimentação de embarcações de pequeno e grande porte, além de regiões próximas como bacia do São Raimundo que recebe rejeitos industriais e domésticos carreados por igarapés que cortam parte da cidade de Manaus, a concentração de HPAs totais nessas áreas variou entre 6,5 e 5348 ng g⁻¹, para HPAs determinados pela Agencia Americana de Proteção Ambiental como prioritários que apresentam maior risco de contaminação a concentração variou entre 5,6 e 1187 ng g⁻¹. Os HPAs são dispersos na coluna d'água e rapidamente se incorporam aos sedimentos no fundo do rio, onde sofrerem oxidação química, biodegradação e se concentram na biota local, trazendo preocupação pelo seu potencial mutagênico e carcinogênico para organismos aquáticos e para humanos (NEFF, 1979).

A Amazônia apresenta grande diversidade de organismos, dentre estes, existem organismo que apresentam condições biológicas para degradar variados tipos de compostos tóxicos. Podemos citar os fungos e bactérias, que apresentam complexos enzimáticos com potencial para degradar muitos compostos tóxicos, HPAs, corantes industriais azo ou antraquinona, Agrotóxicos e outros. Esses organismos locais isolados ou em consórcios podem dá alternativas eficiente para controle ou eliminação de compostos tóxicos.

O uso de micro-organismos isolados de regiões contaminadas ou do ambiente não antropizado é hoje uma das alternativas mais sustentáveis para eliminação completa ou parcial do xenobióticos. Souza et al. (2016) avaliou o potencial de 146 fungos filamentosos isolados de sedimentos contaminados do Rio Negro, em estudo o isolado identificado como *Megasporoporia* sp. S47 apresentou maior taxa de degradação de Benzo(a)Pireno (54%), considerando ser um basidiomiceto da podridão branca, esse fungo apresenta maior atividade de enzimas, como, Lacase e Manganês Peroxidase que atua diretamente na degradação de compostos aromáticos. Lee et al. (2014) isolou fungos da podridão branca de uma região de floresta da Coreia do Sul. Os fungos basidiomicetos foram capazes de degradar corante industrial e mineralizar HPAs. Outros estudos também destacam os fungos basidiomicetos da podridão branca como promissores em degradação de poluentes orgânicos, devido possuírem melhor aparato enzimático comparado com outros fungos não ligninolíticos e bactérias. Isso revela a importância e o potencial desses micro-organismos em processos de biorremediação. Diante do exposto, o atual trabalho estuda o potencial de fungos basidiomicetos isolados de uma área da floresta amazônica em degradar BaP, através de grupo específicos de enzimas

oxidativas que clivam os anéis aromáticos e em subsequentes reações que chegam a compostos menos tóxicos ou a completa mineralização dos contaminantes em H₂O e CO₂.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são agentes tóxicos que representam um grupo com mais de 100 compostos orgânicos formados por carbono e hidrogênio e as vezes apresentam enxofre, nitrogênio ou oxigênio em sua estrutura. Sua estrutura química é caracterizada pela presença de dois ou mais anéis benzeno condensados e são formados durante o processo de combustão incompleta da matéria orgânica, além de estarem presentes na composição do petróleo e derivados. As características físico-química dependem principalmente em sua maioria por sistemas de duplas conjugada variando de acordo com a quantidade de anéis. Todos o HPAs em temperatura ambiente são sólidos e apresentam altas temperaturas de fusão e ebulição (COSTA, 2001; MASTRAL et al., 2002; CARUSO e ALABURDA, 2008). A Tabela 1 mostra as principais propriedades para alguns HPAs.

De acordo com o peso molecular, os HPAs podem ser divididos dois grupos: HPAs de baixo peso molecular e de alto peso molecular. Os HPAs de baixo peso molecular, apresentam em sua estrutura química dois a três anéis aromáticos e estão associados com toxicidade aguda, sua degradação no meio ambiente ocorre com maior facilidade diminuindo sua vida no ambiente. Já os HPAs de alto peso molecular, apresentam quatro ou até oito anéis aromáticos em sua estrutura, alta toxicidade e são altamente recalcitrantes e de difícil degradação, uma vez que a angulação da molécula aumenta a hidrofobicidade e a estabilidade eletroquímica dos anéis (CELINO e QUEIROZ, 2006; OLIVEIRA, 2006).

A massa molar dos HPAs determina ainda uma relação de partição octanol/água (O_c/W), sendo a medida da lipofilicidade do composto e está definido como a razão da concentração do composto diluído em um sistema de duas fases (octanol e água) (PERÍN, 2010). A pressão de vapor diminui com o aumento da massa molar do HPA, portanto os que apresentam dois ou três anéis concentram-se na fase gasosa do ar, os compostos com quatro anéis estão distribuídos entre fases do ar e os com cinco ou mais anéis estão associados

principalmente a matéria orgânica suspensa na atmosfera, como indicado na Tabela 1 (COSTA, 2001, BOUROTTE et al., 2009).

Tabela 1. Propriedades físico-químicas de alguns Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. Fonte: WHO/IPCS (1994).

Compostos	Massa Mol.	Pto. Fusão	Pto. Ebul.	P. Vapor	Coef. Oc/W	Sol. H2O	Const. Henry
Naftaleno	128,1	81	217,9	10,4	3,4	3,1x10 ⁴	4,8x10 ⁻²
Acenafitileno	152,2	92-93	-	8,9x10 ⁻¹	4,0	-	1,1x10 ⁻³
Acenafteno	154,2	95	279	2,9x10 ⁻¹	3,9	3,9x10 ³	1,4x10 ⁻²
Fluoreno	166,2	115-116	295	8x10 ⁻²	4,1	1,9x10 ³	1,0x10 ⁻²
Antraceno	178,2	216,4	342	8x10 ⁻⁴	4,5	73,0	7,3x10 ⁻²
Fenantreno	178,2	100,5	340	1,6x10 ⁻²	4,6	1,2x10 ³	3,9x10 ⁻³
Fluoranteno	202,2	108,8	375	1,2x10 ⁻³	5,2	260,0	6,5x10 ⁻⁴
Pireno	202,2	150,4	393	6x10 ⁻⁴	5,1	135,0	1,1x10 ⁻³
Benzo(a)antraceno	228,2	160,7	400	2,8x10 ⁻⁵	5,6	14,0	-
Criseno	228,2	253,8	448	8,4x10 ⁻⁵	5,9	2,0	-
Benzo(a)fluoranteno	252,3	168,3	481	6,7x10 ⁻⁵	6,1	1,2*	5,1x10 ⁻⁵
Benzo(j)fluoranteno	252,3	165,4	480	2x10 ⁻⁶	6,1	2,5*	-
Benzo(k)fluoranteno	252,3	215,7	480	1,3x10 ⁻⁷	6,8	0,7	4,4x10 ⁻⁵
Benzo(a)pireno	252,3	178,1	496	7,3x10 ⁻⁷	6,5	3,8	3,4x10 ⁻⁵ *
Benzo(e)pireno	252,3	178,7	493	7,4x10 ⁻⁷	6,4	5,0	-
Perileno	252,3	277,5	503	-	5,3	0,4	-
Benzo(g,h,i)perileno	276,3	278,3	545	1,4x10 ⁻⁸	7,1	0,2	2,7x10 ⁵ *
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	276,3	163,6	536	1,3x10 ⁻⁸ *	6,5	62	2,9x10 ⁻⁵ *
Dibenzo(a,h)antraceno	278,3	266,6	524	1,3x10 ⁻⁸ *	6,5	0,5#	7,0x10 ⁻⁸
Coroneno	300,3	439,0	525	2x10 ⁻¹⁰	-	5,4	0,1

* valor a temperatura de 20oC; # valor a temperatura de 27oC; M. Mol.: Massa molecular (Dalton); Pto. Fus.: Ponto de fusão; Pto Ebul.: Ponto de ebulição; P. Vapor: Pressão de vapor a 25oC; Coef. Oc./W: Coeficiente de partição octanol/água (log kow); Sol. H2O: Solubilidade em água a 25 °C (ug/L); Const. Henry: Constante de Henry a 25 °C (kPa).

No ano de 1997 foi elaborada uma lista de substâncias com potencial tóxico para organismos aquáticos e seres humanos, chamada de CERCLAR Priorit List (Comprehensive Environmental Response, Compensation and Liability Act) divulgada pela Agency for Toxic Substances and Disease Registry – ATSDR e Environmental Protection Agency of United State – USEPA. A partir desta lista, a USEPA priorizou 16 HPAs com grande potencial tóxico e desde 2005 os HPAs ocupam o 7º ranking na lista de prioridade. A USEPA em estudos com cobaia utilizando o benzo(a)pireno, mostraram o potencial carcinogênicos e mutagênico deste composto, indicado pela USEPA como um dos mais importantes HPA juntamente com o benzo(a)fluorantraceno devido os seus efeitos na saúde, além de ser indicador da presença de outros HPAs, e apresentar ampla disseminação ambiental e está presente em solo, água, ar e

alimentos. (LIMA, 2009). A Tabela 2 apresenta nomenclatura e efeito de toxicidade de 16 HPAs considerados prioritários pela USEPA.

Tabela 2. Nomenclatura, estrutura e toxicidade dos 16 HPAs considerados prioritários pela USEPA. Fonte: WHO/IPCS (1994).

Nomenclatura (IUPAC)	Estrutura	Efeito	Nomenclatura (IUPAC)	Estrutura	Efeito
Naftaleno		tóxico	Acenaftileno		mutagênico
Acenafteno		mutagênico	Fluoreno		mutagênico
Antraceno		mutagênico	Fenantreno		tóxico e mutagênico
Fluoranteno		carcinogênico e mutagênico	Pireno		carcinogênico e mutagênico
Criseno		carcinogênico e mutagênico	Benzo (a) antraceno		carcinogênico e mutagênico
Benzo (b) fluoranteno		carcinogênico e mutagênico	Benzo (k) fluoranteno		carcinogênico e mutagênico
Benzo (a) pireno		carcinogênico e mutagênico	Dibenzo (a,h) antraceno		carcinogênico e mutagênico
Benzo (g,h,i) perileno		carcinogênico	Indeno (1,2,3-cd) pireno		carcinogênico

1.2 Origem e Fonte de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

A emissão dos HPAs no meio ambiente ocorre por três fontes potenciais:

1) Biogênica, é uma fonte limitada e diminuta quando comparada com outras fontes, os HPAs são sintetizados por plantas, algas, bactérias ou fungos a partir de alguns precursores naturais, segundo alguns autores (KNORR; SCHENK, 1968), no entanto outros autores dizem apenas que bactérias concentram os HPAs, mas limita-se em sua biossíntese (HASE; HITAS, 1976), além de serem produzidos por queima espontânea de florestas e erupções vulcânicas. Vários HPAs são de origem biogênica, tais como o reteno que é derivado do ácido abiético em resinas e ceras de plantas, o pimantreno, produto da redução do ácido primário de espécies de *Pinus* e o perileno derivado de muitos precursores como as quinonas (LIMA, 2009).

2) Petrogênica, formação por processos diagênicos, ou seja, mudança química, física ou biológica de um composto em sua degradação inicial sob baixa temperatura relativa e pressão em relação à escala de tempo geológico, que influenciam na composição de moléculas derivadas em geral de matéria vegetal fóssil ou através de precursores biogênicos. A emissão ocorre através de derramamento acidental de petróleo e descarte de efluentes industriais e domésticos (NEFF, 1979; COLOMBO et al., 1989; MEYER e ISHIWATARI, 1993). Os HPAs petrogênicos apresentam geralmente um ou mais grupo alquilado (metil, etil ou alquil-substituintes pesados) ligado a estrutura aromática. São HPAs com menor peso molecular, formados por um a três anéis aromáticos que apresentam toxicidade aguda aos organismos e estão associados com a presença de petróleo ou derivados. A Figura 1 apresenta os principais HPAs petrogênicos com baixo peso molecular analisados por Lima (2009).

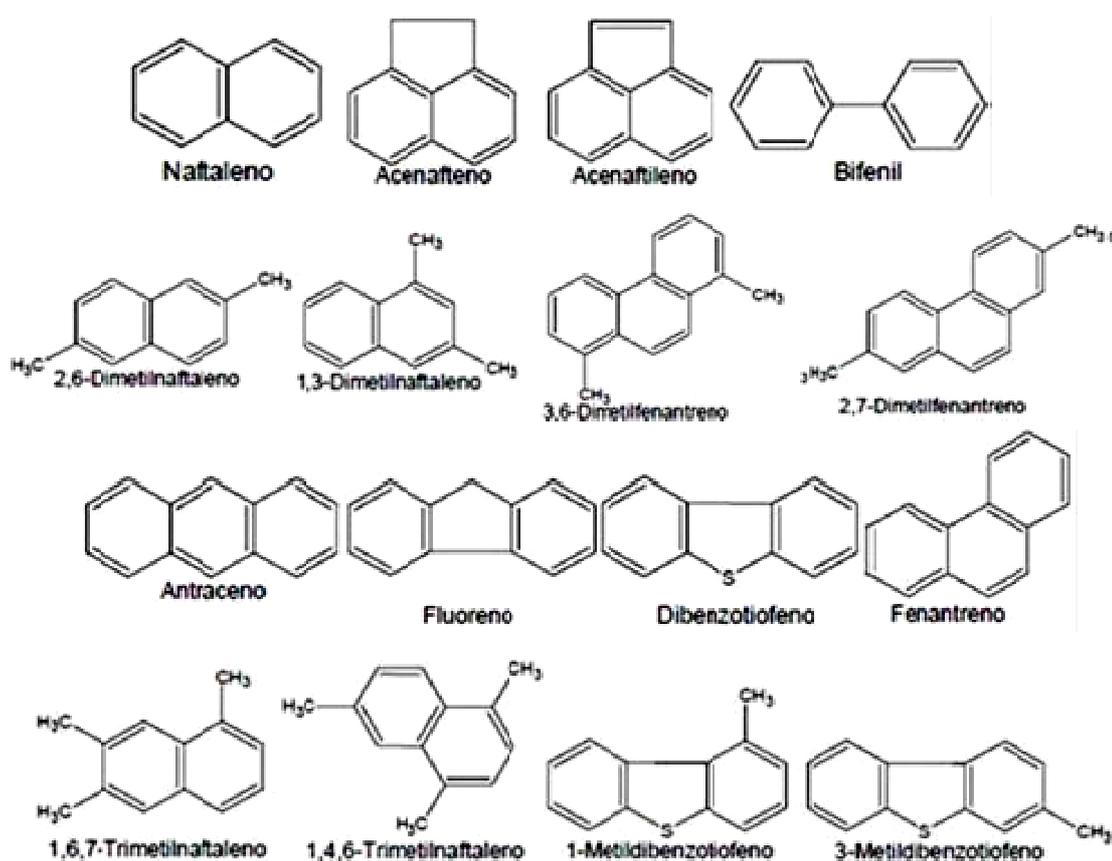


Figura 1: Principais HPAs com baixo peso molecular presentes no petróleo e derivados estudados por Lima em 2009. Fonte: Lima (2009).

3) Pirolítica, caracterizada por ser a maior fonte de emissão de HPAs, caracterizada por atividades antrópicas. Os HPAs são formados pela combustão incompleta da matéria orgânica

em condições de altas temperaturas, baixa pressão e curto tempo de formação (MEIRE, AZEREDO e TORRES, 2007). Alguns processos que ocorrem a formação de HPAs, queima de combustíveis fósseis por motores veiculares, caldeiras industriais, queima da biomassa etc. As moléculas são formadas por rompimento da matéria orgânica em moléculas menores que se rearranjam em HPAs não alquilados, sendo mais abundante a formação de fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzofluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno e benzo(g,h,i)pireno, (NEFF, 1979; BOULOUBASSI e SALIOT, 1993). Os HPAs pirolíticos apresentam alto peso molecular caracterizados por quatro ou mais anéis aromáticos não alquilados. Figura 2.

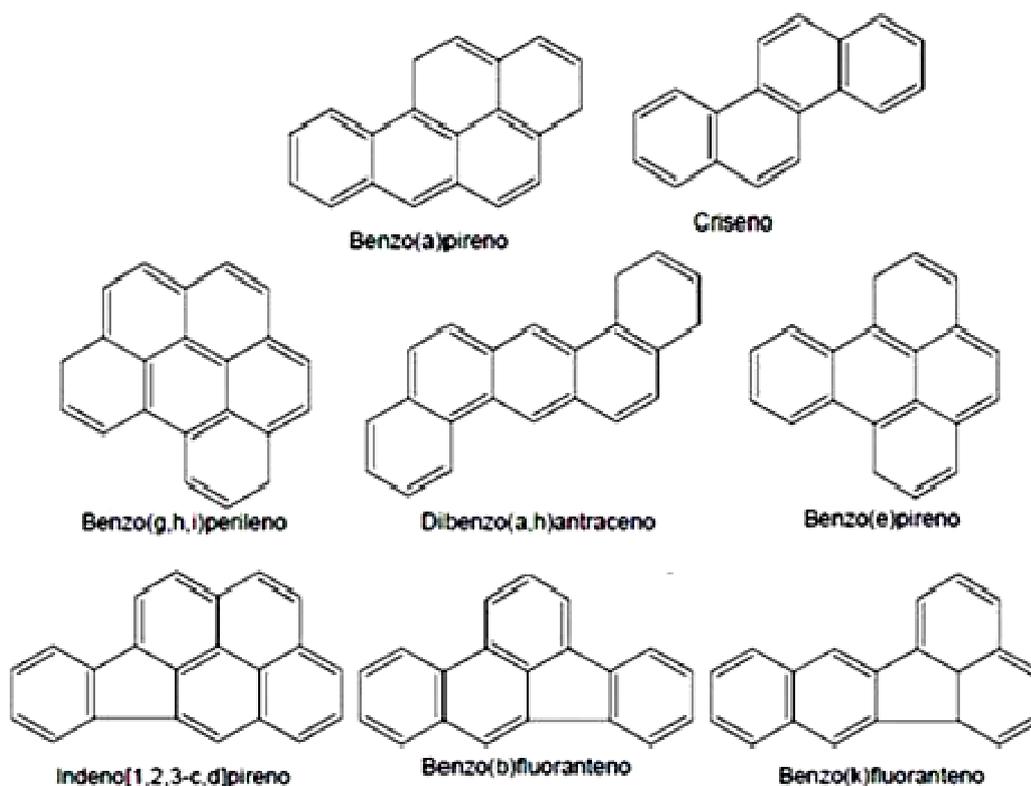


Figura 2: Alguns HPAs pirolíticos de alto peso molecular estudados por Lima em 2009. Fonte: Lima (2009).

1.3 Comportamento dos HPAs no Meio Ambiente

No meio ambiente os HPAs estão associados a partículas e matéria orgânica depositadas sobre o sedimento. Esses compostos aromáticos apresentam potencial recalcitrante e de difícil

degradação, diretamente influencia no aumento da biodisponibilidade desses HPAs no meio (LIU et al., 2001; GROSSER et al., 2000; HEEMKEN, 2000; MACENO, 2010).

Os efeitos biológicos dos HPAs presentes em sedimentos são agentes potenciais de mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade. Por apresentarem caráter lipossolúvel, são absorvidos por células do pulmão, intestino ou pele de animais, após absorção tornam-se metabolicamente ativos e reativos a grupos nucleofílicos de macromoléculas da célula, formando adutos de DNA (MEIRE, AZEREDO e TORRES, 2007).

Os HPAs são quimicamente estáveis, porém no ambiente esses estão vulneráveis fotodegradação, volatilização, oxidação química e degradação por micro-organismos, processos estes considerados como os principais na remoção desses compostos de sedimentos contaminados. O tempo de vida dos HPAs em suspensão no ar varia de horas a dias, em solo supõe-se que a meia vida seja de vários meses a muitos anos. Os HPAs com maior número de anéis aromáticos são menos suscetíveis a degradação, devido isso, são bioacumulativos. A biodegradação em geral ocorre geralmente por bactérias, que podem mineralizar os compostos diretamente ou por fungos em condições aeróbicas e cometabolicamente, além disso, a taxa de degradação está relacionada com quantidade de anéis aromáticos. (OLIVEIRA, 2006; OSTBERG et. al., 2007).

1.4 Corantes Têxteis

Os corantes sintéticos são versáteis com aplicações em diversas áreas industriais, têxteis, gráficas, fotográfica, petroquímica como aditivos de derivados de petróleo, alimentícia, cosmética entre outros setores. Os corantes têxteis são contaminantes de extrema preocupação por serem tóxicos e baixa degradabilidade e alta solubilidade em água (KUNZ et al., 2002; KAUSHIK, 2009).

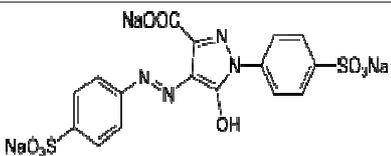
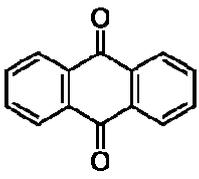
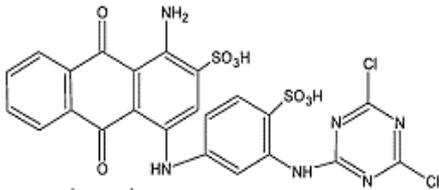
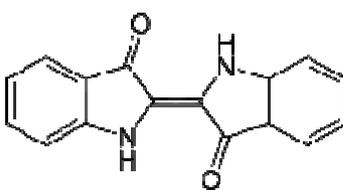
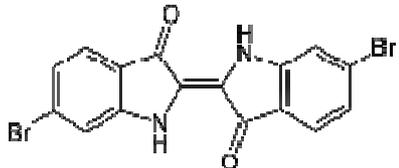
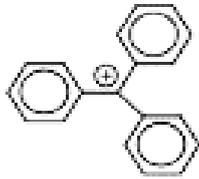
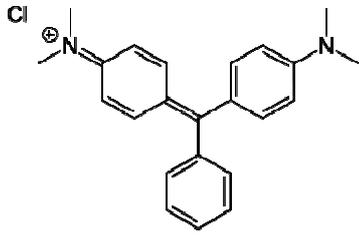
Rejeitos de indústrias têxteis são considerados os mais poluidores em relação a outros setores que utilizam corante, devido à alta demanda industrial e composição de efluentes tóxicos, mutagênicos, carcinogênico, além do impacto visual. Estima-se que a produção mundial de corante seja aproximadamente 800.000 toneladas por ano e 10% à 15% são lançados ao meio ambiente por efluentes (VANDERVIVERA, 1998; PODGORNIK, 2001; ACEMIOGLU, 2004; GANODERMAIERI, 2005; LOPEZ et al., 2006; REVANKAR, 2007, LYRA et al., 2009)

O uso dos corantes em processos têxteis é um grande consumidor de água, o que gera excessivos efluentes complexos, oriundos de tingimentos que se dividem em três etapas: migração, absorção e difusão/fixação do corante. A toxicidade é inerente nesses processos com agentes químicos que expõem os organismos a efeitos nocivos. Os rejeitos das indústrias têxteis são tóxicos à vida aquática, diminuem a taxa de oxigênio, a transparência e a solubilidade da água. (BALAN, 2002; CPRH, 2001).

Há alguns tratamentos que procuram diminuir a toxicidade dos efluentes ou até a completa mineralização dos compostos tóxicos por tratamentos químicos, físicos e biológicos. O tratamento biológico apresenta desenvolvimento de tecnologias eficientes e de baixo custo para tratamento de efluentes, que inclui a reposição de agentes biológicos que atuaram como biorremediadores de poluentes ambientais como, corantes têxteis. O uso de basidiomicetos, fungos da podridão branca produtores de enzimas ligninolíticas, tem sido amplo devido o potencial de suas enzimas quando comparado com outros fungos, caso do *Tinctoporellus* sp. que após três dias descoloriu 100% o corante RBBR (PEIXOTO et al., 2008; BONUGLI et al., 2014).

Os corantes podem ser classificados de acordo com sua aplicabilidade e por seu grupo cromóforo responsável pela sua coloração, são mais comuns os azoicos, antraquinonas, indólicos e os derivados do triarilmetano Tabela 3. Corantes ainda podem ser classificados de acordo com o grupo eletrolítico responsável pela sua fixação, após reação com grupos SH, OH e NH₂ presentes nas fibras têxteis (HUNGER, 2007).

Tabela 3: Organização de grupos de corantes quanto seu grupo cromóforo.

Família	Grupo cromóforo	Exemplo
Azóicos	Ar-N=N-Ar Azo	 <p>Tartazina (cor: amarelo)</p>
Antraquinonas		<p>Antr aqui nona</p>  <p>Azul reativo (RB4)</p>
Indólicos	 <p>Índigo</p>	 <p>Púrpura Tiro</p>
Derivados do Triarilmetano	 <p>Cátio trifenilmetilo</p>	 <p>Ver de malaquita</p>

1.5 Uso de Fungos em Processo de Biodegradação

A biodegradação é um processo natural de degradação de um composto orgânico por micro-organismos, através de reações enzimáticas de oxidação, redução, hidrólise, desalogenação, desalquilação e lise de anéis aromáticos até mineralização do composto em CO₂ e H₂O sem alguma toxicidade, transformação em composto menos tóxicos ou mais tóxicos. É uma técnica de sobrevivência do micro-organismo, uma vez que, apresenta fonte de carbono e energia para o crescimento do organismo (DUA et al., 2002; ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006; ANDRADE et al., 2010).

A flexibilidade em adaptação deve-se ao mecanismo e quantidade de enzimas intra e extracelulares não específicas que apresentam capacidade de degradar inúmeros compostos tóxicos, sendo uma alternativa viável nos processos de biorremediação (SILVA e ESPÓSITO, 2004; HARAZONO et al., 2004; RIGAS e DRISTSA, 2005).

Estudos demonstram a versatilidade dos fungos em degradar xenobióticos incluindo corantes têxteis estando associado à produção de grupos de enzimas que apresentam capacidade em degradar o polímero natural, lignina. Contaminantes como HPAs, corantes industriais, agrotóxicos e outros, apresentam estrutura química com similaridade a estrutura da lignina, isso facilita a atuação das enzimas na oxidação e quebras de anéis aromáticos (Figura 4). A lignina é um composto natural que apresenta ampla diversidade em suas estruturas químicas (Figura 5). As fenoloxidasas é um grupo de enzimas comumente encontradas em fungos da podridão branca. Enzimas como lignina peroxidases, manganês peroxidase e lacase podem atuar sob o contaminante específico e facilitar o tratamento final dos efluentes (DURAN, 2004).

A rota de degradação de compostos recalcitrantes por micro-organismo não é exclusiva de fungos (Figura 3), porém esses em seus resultados apresentam maior capacidade enzimática. Os fungos são excelentes degradadores na natureza, apresentam conjuntos de enzimas com habilidade de degradar diversos compostos no ambiente, além de apresentarem maior tolerância a ambientes estressantes desfavoráveis com níveis de pH baixo, pouca fonte de nutrientes e água (ATAGANA, 2006; MOLLEA, 2005).

Estudos mostram que basidiomicetos ligninolíticos apresentam grande potencial para parcial ou completa eliminação de diversos xenobióticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, corantes têxteis azo e antraquinona, agrotóxicos entre outros, podendo ser

utilizados isoladamente ou em um consórcio de vários fungos com alta produção de enzimas (Lacase, MnP e LiP). Fungos dos gêneros *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Peniophora*, *Pleurotus*, *Marasmiellus*, *Phellinus* e *Polyporus* têm demonstrado potencial para remediação desses contaminantes (HARITASH, 2009; HARMS, 20011; BONUGLI, 20011; ARUN e EYINI, 20011; LEE et al., 2014) (Tabela 3).

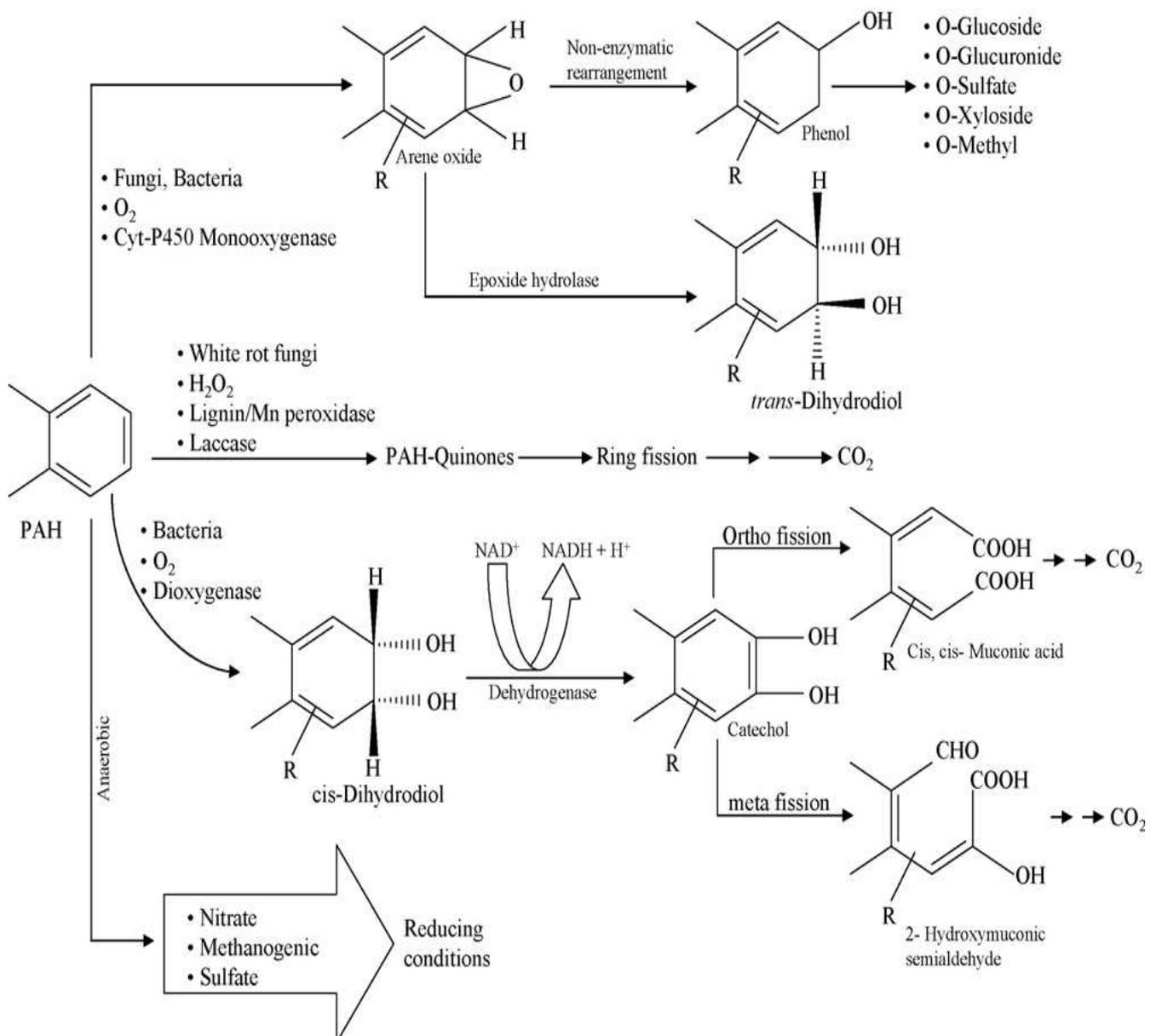


Figura 3: Proposta de mecanismo da degradação de HPAs por micro-organismos. Fonte: Cerniglia, (1992).

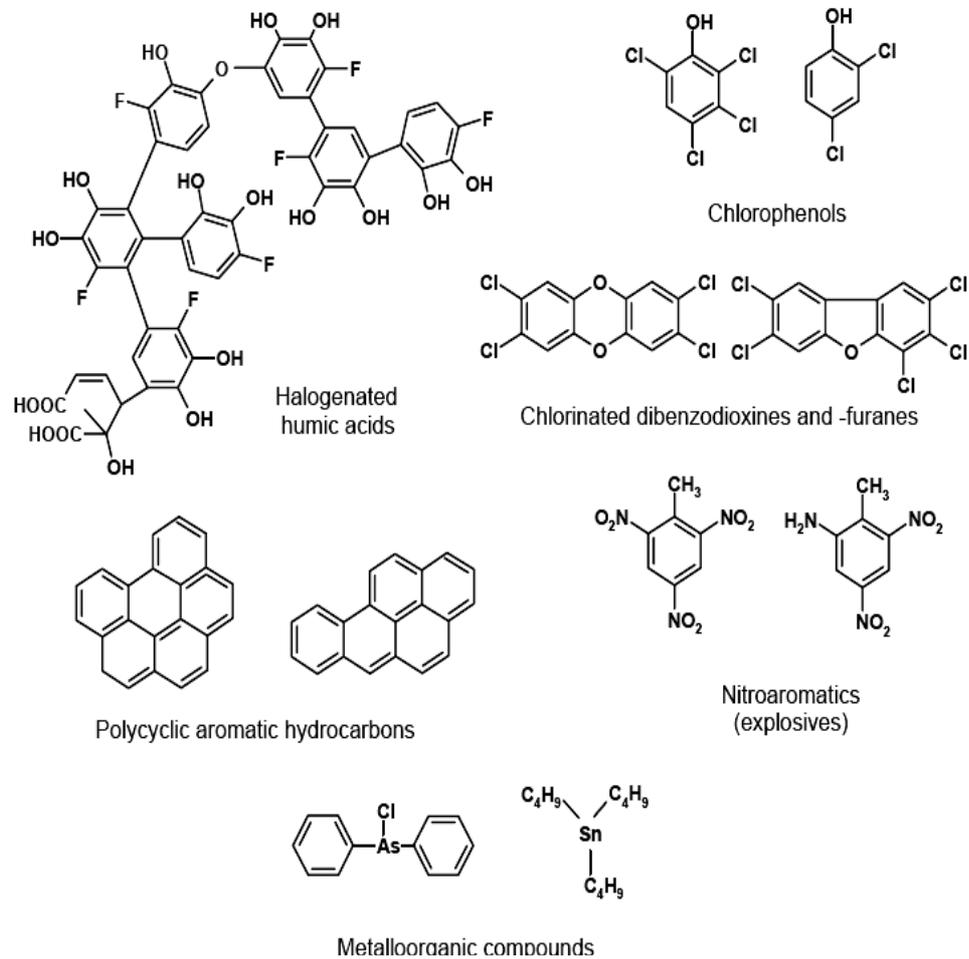


Figura 4: Estruturas de compostos similar as estruturas da lignina, polímero natural e fonte de carbono de fungos da podridão branca. Fonte: Hofrichter et al. (1999).

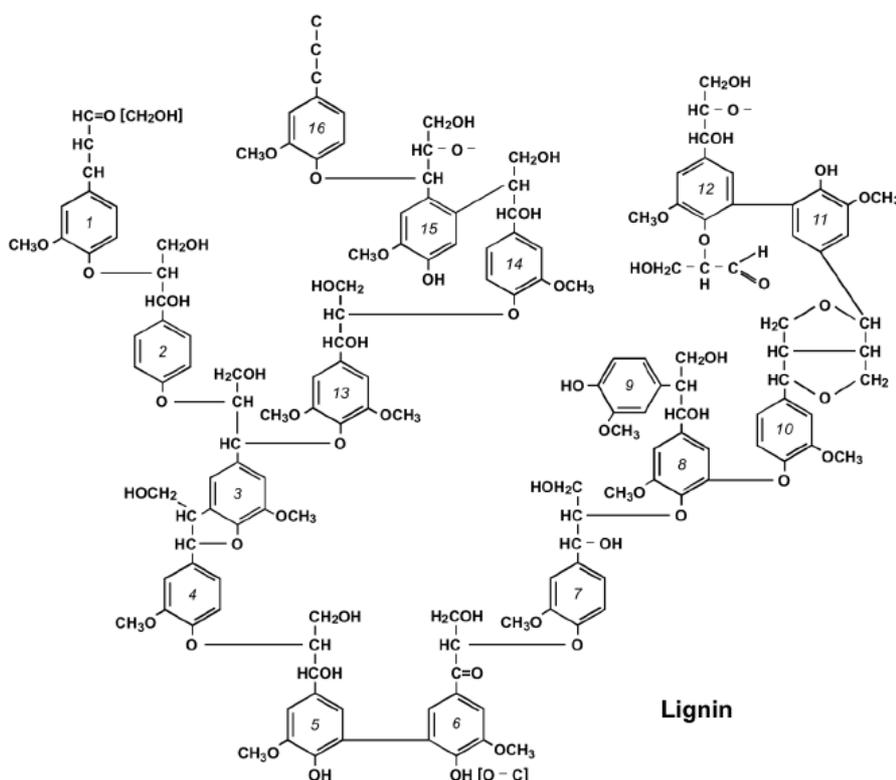


Figura 5: Estrutura da lignina. Fonte: Neto (2010).

Tabela 4. Alguns estudos com fungos que apresentam potencial em aplicação de processos de biorremediação.

Fungos	Contaminantes	Fonte
<i>Peniophora incarnata</i> ; <i>Phlebia brevispora</i>	HPA (fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno)	Lee et al., 2014
<i>Tinctoporellus sp.</i> ; <i>Marasmiellus sp.</i> ; <i>Peniophora sp.</i>	Corante Azul brilhante de remazol R – RBBR	Bonugli, 2011
<i>Phellinus sp.</i> ; <i>Polyporus sulphureus</i>	HPA (naftaleno, acenafteno, fluoreno, antraceno, pireno); Lignina	Arun e Eyini, 2011
<i>Gonoderma lucidum</i>	HPA (fenantreno e pireno)	Ting et al., 2010
<i>Stropharia rugosoannulata</i> ; <i>Stropharia coronilla</i>	HPA benzo(a)anthracene, benzo(a)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene	Steffen et al., 2007

Atualmente a partir da seleção de organismos que apresentam enzimas ligninolíticas, o isolamento e manipulação das enzimas é um mecanismo promissor que permite a aplicação dessas em ambientes contaminados. Como as enzimas são instáveis com o tempo, pesquisadores utilizam métodos de isolamento das enzimas em diversos materiais que estabilizam e aumentam sua atividade. Técnica utilizando *vault*, nanopartículas semelhante a

barris encontradas em células de mamífero, para isolamento de MnP mostrou maior eficiência em degradar bisfenol A. Com o uso desta técnica, 90% de bisfenol foi degradado enquanto que enzima sem *vault* degradou apenas 40% (C&EM, 2016) (Figura 6).

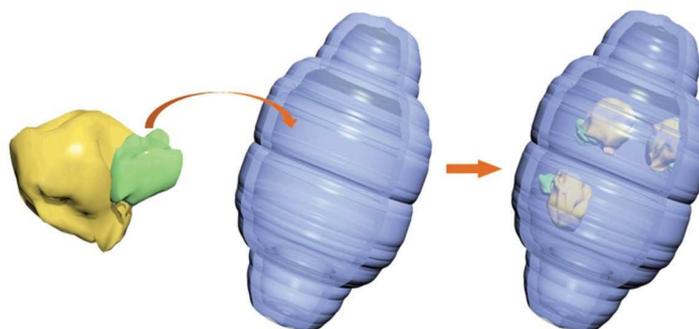


Figura 6: Enzima MnP isolada em nanopartícula de vault. Fonte: C&EN (2016).

1.6 Fungos

Fungos são organismos eucarióticos, microscópicos com fases macroscópicas, podem ser unicelulares (leveduriformes) ou multicelulares (filamentosos). A parede celular é constituída principalmente por quitina e β -glucanos o que atribui bastante resistência, não há presença de plastídios ou centríolos, as mitocôndrias presentes são compostas por cristas planas, está presente a estrutura de Golgi e peroxissomos. A reserva energética é por moléculas de glicogênio e lipídeos. Os fungos são heterotróficos, produzem enzimas que degradam os substratos e absorvem moléculas mais simples, também denominados de osmotróficos. Podem ser parasitas (obrigatórios ou facultativos) ou sapróbios. Estão constituídos por hifas que juntas formam o micélio, tecido não verdadeiro, no entanto há fungos unicelulares, as leveduras. As hifas geralmente são multinucleadas apresentando septos simples ou ainda do tipo doliporo, porém com função cenocítica. Apresentam fase haploide, diploide (fase curta) ou dicarióticas com núcleos homocarióticos ou heterocarióticos. A reprodução ocorre de forma sexuada ou assexuada com produção de esporos resistente e com fácil disseminação, gemação ou fissão binária, no caso das leveduras (BONONI e GRANDI, 1998; ALEXOPOULOS et al., 1996).

Os fungos são de extrema importância para o meio ambiente, pois estão diretamente relacionados com ciclo de carbono, na saúde eles estão associados a várias doenças e

apresentam alto valor econômico por seus metabólitos secundários, como a penicilina. Apresentam-se em vários grupos popularmente conhecidos por mofos, leveduras, cogumelos, bolores, orelha-de-pau, dentre outros. Assim como outros seres vivos, compreendem grupos que apresentam características semelhantes em um único Reino, no entanto já foram classificados junto às plantas, mas com estudos morfológicos, citológicos e bioquímicos na década de 60 isso foi alterado para constituição de um reino específico; o Reino Fungi (BONONI e GRANDI, 1998).

A utilização dos fungos em processos biotecnológicos é datada desde os antigos, com aplicação na produção de alimentos e bebidas fermentadas. Com o avanço do conhecimento científico foi possível a descoberta do potencial dos fungos em produzir metabólitos secundários que trouxeram grandes benefícios ao ser humano, como a descoberta da Penicilina produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum* relatada por Fleming em 1929 com potencial bactericida. Hoje há uma vasta aplicação dos fungos e suas enzimas em várias áreas da indústria que se beneficiam com o uso desses micro-organismos (MORAES et al., 2010; AZEVEDO, 1997).

1.7 Filo Basidiomycota

São fungos comumente conhecidos como orelha-de-pau, cogumelo ou chapéu de sapo. São fungos que formam uma estrutura reprodutiva visível, o basidioma, denominando o grupo que apresentam essas características como, basidiomicetos. A classe Agaricomycetes apresenta quase 98% dos fungos do Filo Basidiomycota, nesse grupo de fungos estão os basidiomicetos mais conhecidos como cogumelos e orelha-de-pau. As estruturas reprodutivas desses fungos constituem uma fase temporária, efêmera ou não, e caracteriza a fase sexuada dos fungos (HIBBETT et al., 2007). A estrutura denominada de corpo de frutificação, basidiocarpo ou carpóforo, atualmente é conhecida como basidioma. Após a fase reprodutiva, dispersão dos basidiósporos, o basidioma acaba apodrecendo ou consumido por insetos enquanto que o micro-organismo em si é formado pelo micélio vegetativo que coloniza o substrato, no caso dos cogumelos, nas estruturas reprodutivas dos Aphillophorales em muitos dos casos acaba mantendo por mais tempo devido sua estrutura ser lenhosa ou coriácea, muitos não são efêmeros permanecendo por vários anos, continuando crescendo a cada ano e apenas a superfície himenial é renovada e cobrindo a estrutura formada na estação anterior (GUGLIOTTA e CAPELARI, 1998).

Os fungos são organismos de grande importância, pois apresentam valores medicinais, comestíveis, micorrízicos, alucinógenos, saprofítico, parasítico, entre outros. Apresentam grande interesse para indústria alimentícia, farmacêutica, biotecnologia e de maior importância para o meio ambiente, são organismos que participam ativamente na ecologia de ecossistemas, atuando principalmente na ciclagem de nutrientes (ALEXOPOULOS et al., 1996; PULIDO, 1983).

Basidiomicetos são em sua maioria degradadores de madeira ou matéria, apresentam um complexo enzimático específico ou inespecífico, o qual possibilita a degradação dos substratos por enzimas extracelulares. Além de serem bastante citados na literatura por seus aparatos enzimáticos e seus metabólitos secundários com interesse em diversas áreas da indústria, os fungos vêm sendo bastante estudados em relação a sua eficiência como biorremediadores de vários contaminantes persistentes como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, corantes azo e antraquinona, herbicidas e outros compostos principalmente por enzimas do complexo fenoloxidase- (SOUZA, 1980; LEE et al., 2014, HARMS et al., 2011).

As fenoloxidasas são um grupo de enzimas envolvidas no processo de degradação da lignina. Dentre estas, destacam-se as lacases (EC 1.10.3.2), lignina-peroxidases (LIP, EC 1.11.1.14) e peroxidases dependentes de manganês (MnP, CE 1.11.1.13), este grupo de metaloproteínas está comumente presente em fungos da podridão branca (Tabela 4), caracterizados por degradar o polímero lignina e apresentar um aspecto embranquecido na madeira colonizada (FERRAZ, 2004). O complexo enzimático desses fungos está intimamente ligado à degradação de diversos poluentes recalcitrantes devido às enzimas não apresentarem especificidade a substratos (MANCILHA, 2006). Assim, estudos que visam conhecer o potencial de produção destas enzimas por fungos basidiomicetos tornam-se necessários para selecionar cepas que possam ser utilizadas em programas de biorremediação.

Tabela 5. Organismos degradadores da lignina. Fonte: Tuomela et al. (2000).

Organismos	Filo	Degradação da Lignina	Ambiente	Alguns gêneros
Fungos podridão branca	Basidiomycota Ascomycota	Mineralização da lignina, deslignificação seletiva ou não seletiva	Madeira dura	<i>Phanerochaeta</i> , <i>Phlebia</i> , <i>Trametes</i>
Fungos podridão parda	Basidiomycota	Modificação da lignina	Principalmente madeira mole	<i>Poria</i> , <i>Polyporus</i>
Fungos podridão mole	Ascomycota fungos anamorfos	Limitada degradação da lignina	Ambientes aquáticos, madeira com humidade elevada, serrapilheira	<i>Chaetomium</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Fusarium</i>
Bactérias	Actinomycetes Mixobactéria	Limitada degradação da lignina	Madeira em estágio avançado de decomposição	<i>Straptomyces</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudomonas</i>

A biodegradação é um processo natural de degradação de um contaminante por microorganismos, técnica de sobrevivência, uma vez que, apresenta fonte de carbono e energia para o crescimento do organismo (DUA et al., 2002).

Os fungos apresentam alta capacidade adaptativa em ambientes contaminados, mudando seu metabolismo a diversos tipos de fonte de carbono rapidamente. A flexibilidade em adaptação deve-se ao mecanismo e quantidade de enzimas intra e extracelulares não específicas que apresentam capacidade de degradar inúmeros xenobióticos, sendo uma alternativa viável nos processos de biorremediação. (SILVA e ESPÓSITO, 2004; HARAZONO et al., 2004; RIGAS e DRISTSA, 2005). Estudos demonstram a versatilidade dos fungos em degradar xenobióticos incluindo corantes têxteis estando associado à produção de grupos de enzimas que apresentam capacidade em degradar o polímero natural, lignina. As fenoloxidasas é um grupo de enzimas comumente encontradas em fungos da podridão branca. Enzimas como lignina peroxidases, manganês peroxidase e lacase que podem atuar sob o contaminante específico e facilitar o tratamento final dos efluentes (DURAN, 2004).

1.8 Enzimas Ligninolíticas

Os fungos secretam ampla variedade de enzimas eficientes no ambiente que auxiliam em seu processo de nutrição, muitas enzimas são específicas a cada substrato, outras não apresentam especificidade alguma. As enzimas são capazes de converter polímeros

complexos em moléculas menores, e assim, assimiláveis ao organismo (WESSELS, 1994; BENNETT, 1998).

Os basidiomicetos ligninolíticos apresentam um complexo enzimático que os tornam muito eficiente como decompositores de madeiras, especificamente do polímero natural, lignina. Também chamados de fungos da podridão branca, esses participam ativamente na ciclagem de nutrientes e equilíbrio energético nos ecossistemas juntamente com outros microorganismos (TUOMELA et al., 2000). As fenoloxidasas compõem grupo de enzimas comumente presente nos fungos basidiomicetos ligninolíticos, as enzimas catalisam reações de degradação da lignina, polímero natural bastante presente em plantas superiores. A especificidade dessas enzimas é baixa, devido à grande variedade estrutural da lignina (KIRK e FARREL, 1987).

A lignina apresenta um dos compostos mais abundantes na biosfera, tendo função de atribuir suporte estrutural à segunda parede das células de plantas vasculares, conferindo rigidez e resistência as células, além de ter caráter hidrofóbico que auxilia na eficiência dos tecidos de transporte de água e resistência a ataques de microrganismos (ÖNNERUD et al. 2002). Estudos realizados com *Phanerochaete chrysosporium* (KIRK et al., 1978) mostraram que degradação da lignina é um processo oxidativo complexo não específico muito dependente de condições do meio de cultivo e diversos fatores que afetam a sua degradação pelo fungo.

Os fungos produzem um sistema ligninolítico induzido pela limitação de carbono, sulfato e nitrogênio, o complexo enzimático é altamente oxidativo e reage diretamente com o polímero. As enzimas que compõem esse complexo são as Lignina Peroxidases (LiPs), Manganês Peroxidases (MnPs), Lacase e outras enzimas que auxiliam no metabolismo da lignina como as glioxal oxidase (GOx) geradora de peróxido de hidrogênio (RAJARATHANAM et al., 1992).

As enzimas ligninolíticas são secretadas pelas hifas dos fungos e juntamente com outras enzimas e mediadores atuam no processo de degradação de substratos lignocelulósicos (Figura 7). Agentes quelantes e mediadores oxidados atuam como agentes primários na quebra da lignina produzindo radicais. A Lacase oxida hidroquinonas e semiquinonas em quinonas que produz oxigênio para as GOx ou álcool veratrílico oxidase (AVO) produzindo H₂O₂, substrato para a atividade de LiP e MnP (LEONOWICZ et al., 1999).

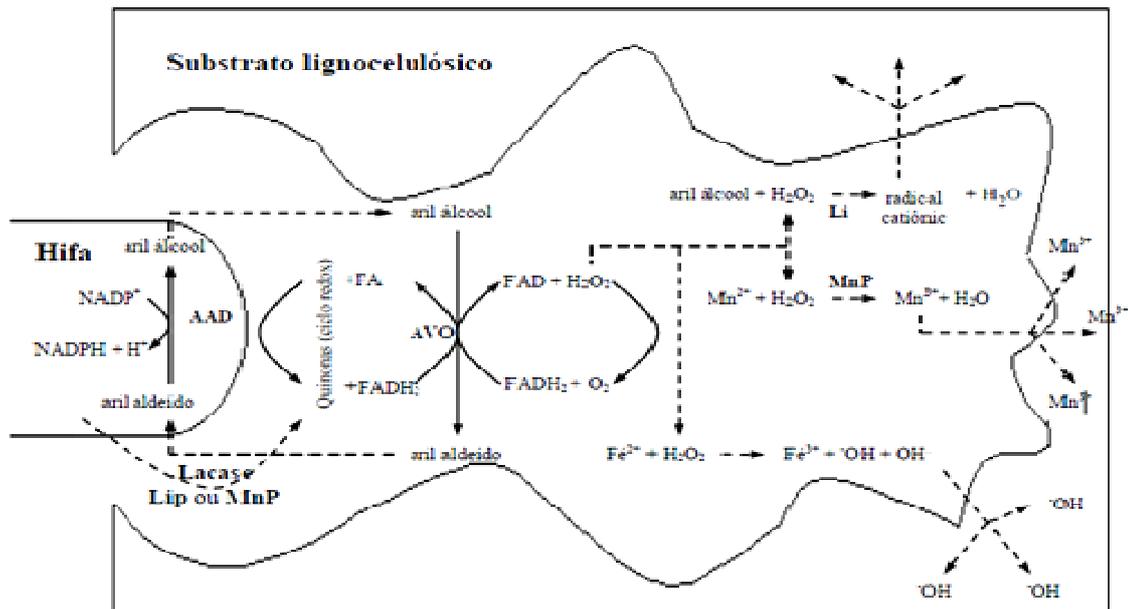


Figura 7: Degradação de substratos lignocelulósicos por enzimas do complexo ligninolítico. Fonte: NETO (2006) adaptado de Leonowicz et al. (1999).

1.8.1 Lacase (Ec. 1.10.3.2)

É uma cuproteína que compõe um pequeno grupo de oxidases azuis (THURSTON, 1994), que participam de ampla e diversificada superfamília de oxidases multicobre ou fenoloxidasas, grupo de enzimas que complexam o cobre em sua estrutura globular (Figura 8). Lacases são secretadas por plantas superiores onde estão relacionadas com o processo de lignificação, e por fungos, principalmente do Filo Basidiomycota, com função de degradação da lignina. Lacases fúngicas em grande maioria apresentam três ou quatro átomos de cobre como no caso do *Trametes versicolor*. Fungos ligninolíticos expressam vários genes de lacase, produzindo isoenzimas com alta similaridade estrutural, mas com características físico-químicas diferentes (BROWN et al. 2002).

O cobre encontra-se no estado oxidado Cu²⁺ em enzima nativa, a enzima catalisa oxidações retirando eletron de substratos fenólicos utilizando o oxigênio molecular como aceptor de eletron e formando radicais fenoxilos (MAYER, 2002; CLAUS, 2004; LUNDELL, 2010; DURÁN, 1997).

Além da degradação da lignina, as lacases também participam na pigmentação de fungos, patogenicidade em plantas e degradação de vários compostos aromáticos (CLUTTERBUCK, 1990; IYER e CHATTOO, 2003; XIAO et al., 2003). Essas enzimas não

apresentam especificidade por substratos e podem ser utilizadas em vários processos industriais, remoção de corantes têxteis de efluentes, remediação de áreas contaminadas com postos aromáticos etc (NYANHONG et al., 2002; SHIN, 2004).

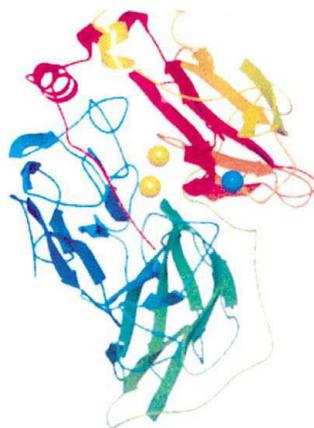


Figura 8: Estrutura tridimensional da Lacase do fungo *Coprinus cinereus*. Filamentos em azul são extremidades N-terminal e em vermelho, C-terminal. Os átomos de cobre estão representados por esferas nos sítios T1 (azul) e T3 (amarelo). Fonte: Ducros et al. (2001).

O cobre presente no sítio T1 (cobre tipo 1) é o primeiro aceptor de elétrons e onde ocorre a oxidação do substrato, apresentam uma coloração azul típica de enzimas multicobres. No sítio T3 estão presentes cobre do tipo 2 e 3 que formam centro trinuclear que reduz o O_2 em H_2O (BROWN et al., 2002; CLAUS, 2004).

1.8.2 Manganês Peroxidase (MnP, Ec 1.11.1.13)

Manganês peroxidase ou peroxidase dependente de manganês (MnP) é uma lignina peroxidase modifica e codificada pela maioria dos fungos basidiomicetos causadores da podridão branca e tem como função a degradação da lignina que não apresenta especificidade (SCHELLER e ULVSKOV, 2010), Meruliaceae, Coriolaceae e Polyporaceae são algumas famílias de fungos decompositores de madeira produtores dessa enzima, além de outros fungos que decompõem serapilheira como os da família Strophariaceae e Tricholomataceae (HOFRICHTER, 2002).

A MnP é uma glicoproteína com um grupo heme (Fe protoporfirínico IX) e apresenta peso molecular de 40 a 50 kDa. A MnP oxida manganês (II) (Mn^{2+}) presente em madeira e solo para sua forma mais reativa Mn^{3+} e estabilizado por agente quelantes produzido pelo

fungo, como o ácido oxálico (ZHANG et al., 2006). Para essa atividade o grupo prostético é dependente de H_2O_2 para sua atividade e onde inicia o ciclo catalítico formando complexo ferro-peróxido e logo em seguida pela quebra da ligação O-O a formação do complexo Fe^{4+} -oxo-porfíria (MnP-I) e subsequentemente é reduzido por ion de Mn^{2+} a MnP II não radicalar. A oxidação da lignina e outros xenobioticos está associada a disponibilidade de íons de manganês, e apresenta um ciclo catalítico similar ao da LiP, porem o Mn^{2+} atua como doador de elétrons para formação de um composto secundário (MnP II) (BROWN et al. 1991; HOFRICHTER, 2002). Figura 9.

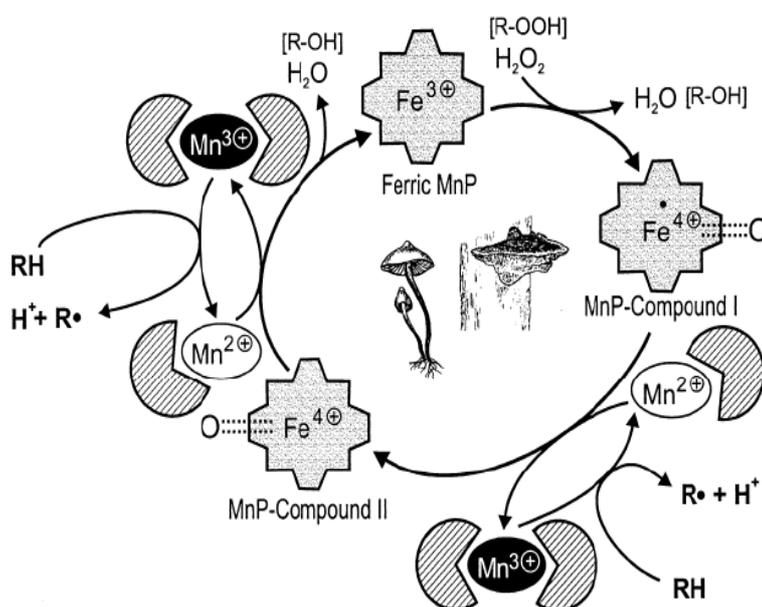


Figura 9: Ciclo catalítico da peroxidase dependente de manganês. Fonte: Hofrichter (2002).

1.8.3 Lignina Peroxidase (LiP EC 1.11.1.14)

Lignina Peroxidases (LiP) são enzimas que estão mais envolvidas na degradação da lignina por fungos. LiP é uma glicoproteína que contém grupo heme (Fe protoporfirínico IX) e é dependente de H_2O_2 para sua atividade, semelhante à MnP. A LiP é ativada por H_2O_2 o que permite a oxidação de compostos aromáticos, fenólicos ou não, que constituem a molécula de lignina gerando radicais catiônicos que reagem com nucleófilos (inicialmente H_2O) e com oxigênio molecular formando uma cascata enzimática atuando na quebra de ligações C-C e C-O. A LiP, portanto atua na despolimerização da lignina, abrindo os anéis aromáticos (KIRK et al., 1978).

Lignina Peroxidases apresentam inespecificidade muito relativa a substratos, assim como, outras peroxidases que oxidam substratos fenólicos, as LiPs têm como preferência compostos aromáticos não-fenólicos (MARTÍNEZ, 2002). O ciclo catalítico da LiP de fungos da podridão branca é diretamente dependente do álcool veratrílico, metabólito desses fungos que desempenha papel principal para evitar a inativação da enzima por ação de H_2O_2 em excesso (TIEN E KIRK, 1984). Figura 10.

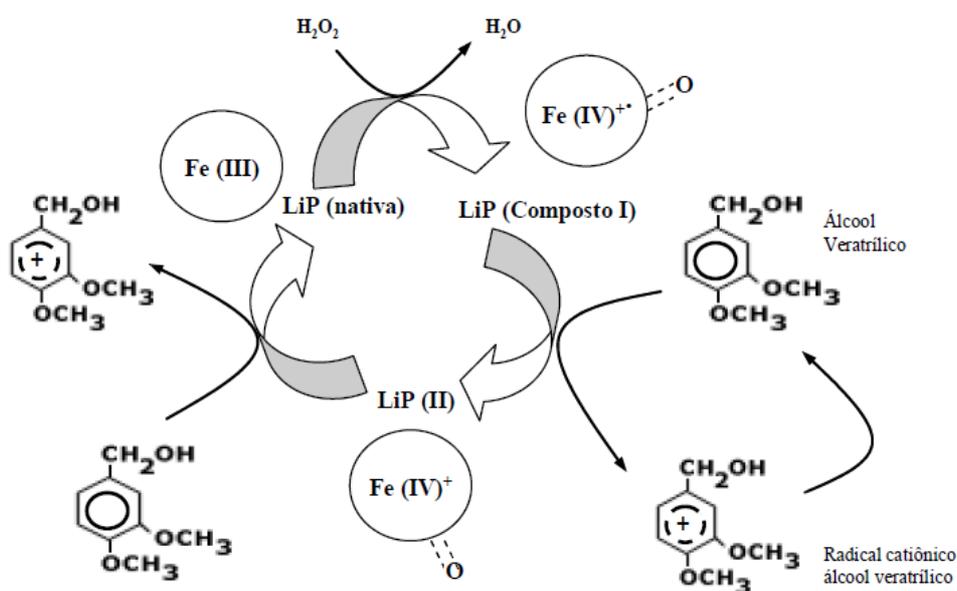


Figura 10: Ciclo catalítico da Lignina peroxidase. Fonte: Neto (2006).

A produção e estudos físico-químicos das enzimas lignina peroxidase, manganês peroxidases e lacase de fungos ligninolíticos tem atribuído papel importante em processos de biodegradação de poluente orgânicos (WESENBERG et al. 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o potencial biotecnológico de fungos basidiomicetos da região Amazônica em degradar benzo(a)pireno.

2.2 Específicos

- Isolar fungos basidiomicetos da região amazônica;
- Aplicar técnicas qualitativa e quantitativa para seleção de basidiomicetos com potencial na degradação do benzo(a)pireno;
- Avaliar a atividade de enzimas ligninolíticas (Lacase, Lignina Peroxidase e Manganês peroxidaes) em basidiomicetos selecionados utilizando benzo(a)pireno como indutor;
- Avaliar o potencial de basidiomicetos selecionados na degradação *in vitro* do benzo(a)pireno e produção de metabólitos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e Isolamento de Macrofungos

A coleta do material biológico foi realizada em uma área florestal localizada em uma região de terra firme, área de propriedade particular situada no km 23 da estrada AM-352 município de Manacapuru-AM, sob as coordenadas geográficas 3°07'38.1"S 60°44'32.2"W (Figura 11). Para coleta e isolamento de fungos foi utilizada a metodologia de Teixeira (1995). Os basidiomas foram coletados juntamente com o substrato, com auxílio de um canivete e foram condicionados em sacos de papel esterilizados e levados para o laboratório de Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas – UEA/Escola Normal Superior Núcleo de Manacapuru onde foi realizado o isolamento dos espécimes de fungos.

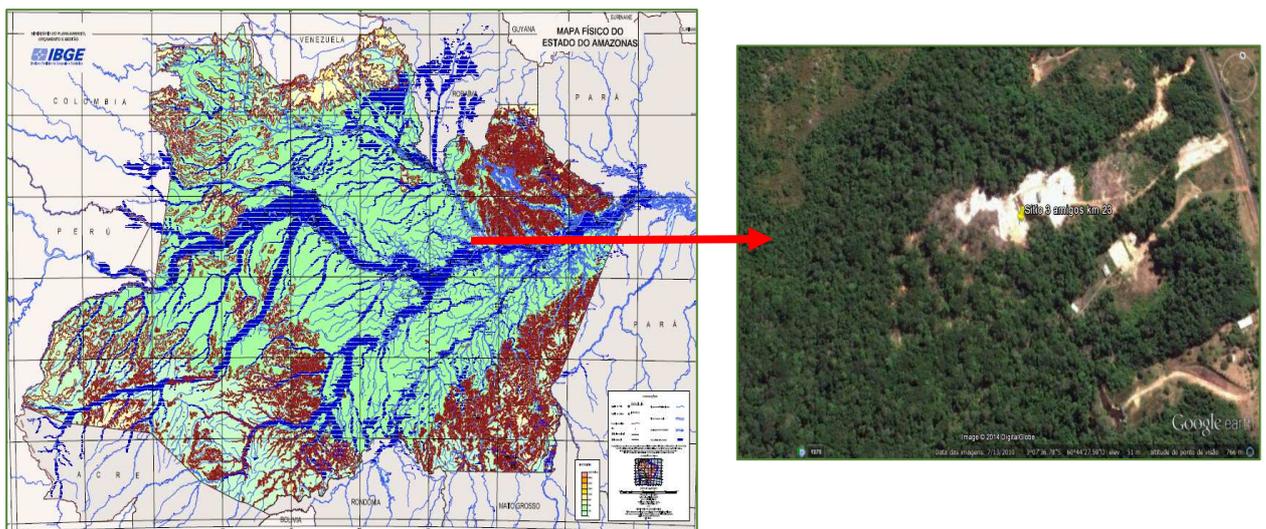


Figura 11. Imagem de satélite da área de coleta dos fungos, Localização geográfica: 3°07'38.1"S 60°44'32.2"W, fonte: IBGE/googleearth.

Para o isolamento de culturas microscópicas, foram retirados fragmentos dos corpos frutíferos com tamanho 1 cm. A assepsia dos fragmentos foi realizada através de consecutivas lavagens em solução de etanol 70% (30 segundos um minuto), hipoclorito de sódio 2% (um minuto) e água destilada esterilizada (2 minutos). Em seguida, os fragmentos foram colocados sobre papel filtro para retirada do excesso de água. Após assepsia, os fragmentos foram inoculados em placas de Petri contendo antibiótico clofenicol (100mgL^{-1}) e meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar (SDA), Batata Dextrose Ágar (BDA), Malte Extrato Agar (MEA) e mantidas em estufa BOD à temperatura de 28°C durante 7 a 12 dias, com observações diárias e repicagens sucessivas para purificação do micélio. Após purificadas, as culturas foram

conservadas em frascos contendo água destilada estéril (CASTELLANI, 1939), criopreservação e depositadas na coleção de micro-organismos do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia – Universidade do Estado do Amazonas-UEA/ESA.

3.2 Reação de Oxidação do Ácido Gálico

Para seleção de fungos produtores de fenoloxidasas, foi utilizada a metodologia de Lee *et al.*, (2014). A reação é caracterizada pela formação de um halo de coloração marrom em volta do micélio. No ensaio foram avaliados 19 fungos. Os fungos isolados foram repicados em meio SDA e incubados durante sete dias em BOD com temperatura de 28 °C. Após o período de incubação foram inoculados três discos de cultura dos fungos, com tamanho de 9 mm, retirados da parte periférica da colônia e adicionados em placa de Petri contendo meio de cultura Extrato de malte Agar 2% acrescido de ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (ácido gálico) 0,5%. O meio foi preparado utilizando concentração de 20 g L⁻¹ de extrato de malte, 15 g L⁻¹ Agar e 5 g L⁻¹ de ácido gálico em água destilada. O teste foi realizado em triplicata.

As placas inoculadas foram incubadas por um período de cinco dias a 28 °C. Observações diárias foram realizadas para avaliar a formação do halo de cor marrom que indica a oxidação do substrato à forma de quinonas por enzimas do grupo fenoloxidase. Os fungos com resultados positivos em reação de produção de fenoloxidasas em meio sólido foram classificados pela intensidade da coloração marrom (escuro, claro, avermelhado e amarelado) característica da reação de acordo com Lee (2014). O tamanho do halo também foi registrado após 5 dias de crescimento, foi utilizado um paquímetro digital para aferir o raio do halo.

3.3 Identificação Taxonômica dos Isolados de Basidiomicetos

A taxonomia clássica de espécimes de basidiomicetos coletados foi feita através de morfologia das estruturas macroscópicas e microscópicas dos corpos frutíferos. Foram feitos cortes a mão livre em cada basidioma. Logo após, os fragmentos foram corados com hidróxido de potássio a 3% e floxina 1%. Também foi utilizado o reagente de Melzer para análise de estruturas microscópicas (SINGER, 1986; TEIXEIRA, 1995; GUGLIOTTA, 1998; RYVARDEN, 2004).

3.4 Capacidade dos Fungos em Descolorir o Corante RBBR

Os fungos que apresentaram a capacidade de oxidar o ácido gálico foram utilizados em ensaios para avaliar a capacidade de descolorir o corante RBBR.

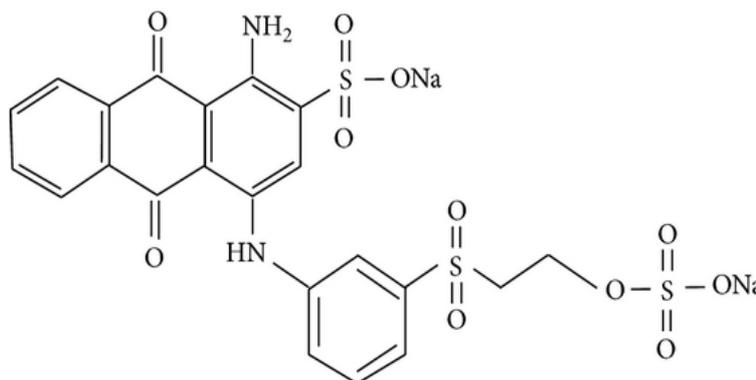


Figura 12. Estrutura química do Azul Brilhante de Remazol R, massa molar: 626.54 g/mol/L.

O corante Azul Brilhante de Remazol R (RBBR) ou Azul Reativo 19 é derivado do antraceno, um HPA e apresenta caráter tóxico e recalcitrante. É um corante reativo, aniônico e antraquinona, segundo grupo de corante mais utilizado pela indústria em tingimento de fibras de algodão e couro, atribuindo tonalidade azul brilhante com resistência a luz e meios ácidos e básicos (figura 12). É um corante altamente solúvel em água e considerado um xenobiótico de grande importância (HUNGER, 2007). O corante foi escolhido como método de seleção dos fungos, pois apresenta arranjos aromáticos, como HPAs, que podem sofrer degradação pela atividade das enzimas ligninolíticas e pode ser avaliada pela sua descoloração.

Os isolados pré-selecionados foram inoculados por um período de sete dias em meio SDA para crescimento micelial. O meio líquido utilizado para esse teste foi o Extrato de Malte em uma concentração de 2% (20 gL⁻¹). Após o crescimento micelial em placa de Petri, foram retirados 3 discos de 9 mm de diâmetro da margem da colônia cultivadas em meio SDA e inoculados em frascos erlemeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio ME2%. Os frascos foram incubados à temperatura de 28 °C sob agitação de 160 rpm por 72 horas.

Foram adicionados 5 mL de corante após 72 horas de incubação do fungo em meio líquido ME2%. Foi avaliado o potencial dos isolados em descolorir o corante Azul brilhante de Remazol R (RBBR) em diferentes concentrações, 100 mg L⁻¹, 500 mg L⁻¹ e 1000 mg L⁻¹. Logo após, os frascos foram incubados à temperatura de 28 °C e sob agitação de 160 rpm

durante 7 dias. Alíquotas de 1 mL foram retiradas periodicamente ao processo da reação de descoloração do RBBR e foram centrifugadas a 14.500 rpm (Eppendorf miniSpin-plus) por 10 minutos, o sobrenadante foi analisado em um espectrofotômetro. Paralelo ao ensaio foram realizados experimentos não inoculados (corante+meio ME2%) e inoculados sem RBBR (Fungo+meio) que foram utilizados como controle. O controle fungo+meio foi utilizado para desconsiderar a absorvância aceretada da formação de pigmentos pelos fungos. Foi realizado um controle para verificar se o micélio estava adsorvendo o corante e interferindo na leitura no espectrofotômetro, para isso, os fungos crescidos por 72 horas em meio ME2% foram submetidos à autoclavem para morte do micélio. Logo após, foi adicionado o corante RBBR nas mesmas concentrações das amostras e incubados nas mesmas condições. Também foi feita uma curva padrão para quantificar a concentração do corante após período de reação. Todos os testes foram realizados em duplicatas.

As alíquotas foram analisadas em espectrofotômetro UV-VIS (ExpectraMax Plus - Molecular Devices), medindo a absorvância em λ_{\max} 580 nm. O ensaio de controle não inoculado (corante+meio) foi utilizado como padrão de absorvância para medida da porcentagem de descoloração do corante RBBR, o meio ME2% foi utilizado como branco. A porcentagem de descoloração foi obtida através do cálculo da absorvância do controle e a absorvância da amostra (BONUGLI-SANTOS et al., 2012) (Figura 13).

$$\text{Descoloração (\%)} = \frac{A_{\lambda_{\text{inicial}}} - A_{\lambda_{\text{final}}}}{A_{\lambda_{\text{inicial}}}} \times 100$$

Figura. 13. Equação de determinação da porcentagem de descoloração. Onde $A_{\lambda_{\text{inicial}}}$ é a absorvância inicial do controle (meio + corante) e $A_{\lambda_{\text{final}}}$ é a absorvância final da amostra.

3.5 Produção de Enzimas Ligninolíticas na Presença de RBBR

Foram selecionados apenas três fungos para este ensaio, com base na ausência de pigmentação e quanto a atividade das enzimas fenoloxidasas em oxidar o ácido gálico. A metodologia de pré-inóculo para esse experimento estar descrito no item 2.4 deste trabalho.

Alíquotas de 2 mL foram retiradas periodicamente ao processo da reação de descoloração do RBBR. As alíquotas foram extraídas em microtudo e foram centrifugados a 14.500 rpm (Eppendorf miniSpin-plus) por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado como fonte de enzimas para avaliação da atividade das enzimas Lacase, MnP e LiP.

Foi avaliada a atividade das enzimas para cada concentração do RBBR (100, 500 e 1000 mg L⁻¹). O meio de cultura sem adição de corante foi utilizado como controle. A atividade das enzimas Lacase, Lignina Peroxidase (LiP) e Manganês Peroxidase (MnP) foi avaliada em duplicata utilizando um espectrofotômetro (ExpectraMax Plus - Molecular Devices). Foi utilizado o cálculo da diferença de absorbância ($\Delta\text{Abs} = \text{Abs inicial} - \text{Abs final}$) para quantificação das enzimas. Cada unidade de enzimas (UI), Foi definida como a quantidade de enzimas necessária para oxidar 1.0 μmol de produto formado por minuto (Umol/min).

Para determinar a atividade de Lacase foi utilizado o substrato 2,2-azino-bisetilbenzotiazolina (ABTS). A oxidação do substrato foi monitorada através do aumento da absorbância utilizando um comprimento de onda de 420 nm como descrito por Buswell *et al.* (1995). A mistura da reação consistiu de 300 μL de tampão acetato de sódio (0.1 M; pH 5.0), 600 μL de solução enzimática e 100 μL de solução de ABTS (0.03%, p/v). A atividade de LiP foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico, através do monitoramento do aumento da absorbância utilizando comprimento de onda 310 nm conforme descrito por Arora e Gill (2001). A mistura reacional foi composta de 600 μL de solução enzimática, 200 μL de álcool veratrílico (2 mM) em tampão tartarato de sódio (0.4 M; pH 4.5) e 200 μL de peróxido de hidrogênio (2 mM). A reação foi iniciada com peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida com 40 μL de NaOH (2 N). A atividade de MnP foi determinada pela oxidação do vermelho fenol em aumento de absorbância a 610 nm (KUWAHARA *et al.* 1984 apud BONUGLI-SANTOS *et al.* 2011). A reação foi composta de 500 μL do estoque enzimático, 100 μL de vermelho fenol (0,01%), 100 μL lactato de sódio (0,25 M), 200 μL de albumina bovina (0,5%), 50 μL de MnSO₄ (2 mM) e 50 μL de Peróxido de hidrogênio diluído em tampão succinato de sódio (20 mM, pH 4,5). Para interromper a reação, foi utilizado 40 μL de NaOH (2 N). Todas as misturas foram incubadas em banho-Maria a 37°C durante 10 minutos.

3.6 Produção de Enzimas Ligninolíticas na Presença de BaP

As cepas isoladas que apresentaram capacidade em oxidar o ácido gálico foram utilizadas nos ensaios *in vitro* para estudo da produção de enzimas ligninolíticas em meio líquido contendo BaP (Sigma-Aldrich, 99%) (St. Louis, MO, USA), como indutor, conforme metodologia descrita por Souza *et al.* (2016).

Os fungos isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura dextrose Agar sabouraud e incubados durante 7 dias à 28°C. Após o período de incubação,

três discos (9 mm) da cultura fúngica foram retirados da borda das colônias e transferidos para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de caldo Extrato de Malte 2% em quadruplicata. Os frascos foram incubados por 72 horas à 30°C, sob agitação de 150 rpm. Após, uma duplicata foi suplementada com 2 mg de BaP dissolvido em 0,5 mL de dimetilformamida. Também foi realizado o controle em duplicata com e sem BaP. Os frascos foram incubados durante 7 e 14 dias nas mesmas condições descritas acima. Após esse período, o meio líquido foi filtrado a vácuo para obtenção do extrato bruto. O extrato foi centrifugado a 5.500 rpm por 45 minutos em temperatura de -4 °C (Thermo scientific centrifuge Heraeus Megafuge 16). O sobrenadante foi utilizado como fonte de enzimas. A atividade das enzimas: Lacase, MnP e Lip foi realizada de acordo com o item 2.5 deste trabalho.

3.7 Ensaio de Biodegradação de Benzo(a)Pireno

Os ensaios de biodegradação foram baseados na metodologia proposta por Passarini *et al.* (2011). Os fungos que apresentaram atividade de enzimas ligninolíticas na presença do corante RBBR e BaP, foram selecionados para teste de biodegradação. Os fungos foram inoculados em placas de Petri contendo meio SDA e incubados em BOD por 7 dias e temperatura de 28°C para crescimento micelial, após esse período, discos foram retirados da borda da colônia e inoculados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio ME2%. Os frascos foram incubados em incubadora por agitação à temperatura de 28 °C e 160 rpm durante 72 horas.

Após 72 horas de incubação, os frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de ME2% foram suplementados com 1 mg de BaP (Ensaio I) e 2 mg de BaP (Ensaio II), diluídos em dimetilformamida e incubados por 7 e 14 dias. Os experimentos foram realizados em triplicata e o grupo controle foi composto de ME2% suplementado com BaP.

3.8 Extração e Preparo de Amostras

A extração de BaP e seus metabólitos foi realizada usando o sistema Ultra-Turrax (Ika Labortechnik, Germany) e acetato de etila. Para o controle de recuperação do processo de extração empregado nas amostras foi adicionado uma solução de *surrogate*. A solução *surrogate* foi constituída de perileno deuterado (20 µg) com grau de pureza $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, 98%) (St. Louis, MO, USA). Para cada amostra com *surrogate* foram adicionados 40

mL de acetato de etila, e a biomassa submetida à homogenização a 14.500 rpm por 2 minutos. O material foi transferido para um funil de separação de 250 mL com o acompanhamento por cromatografia em camada delgada (CCD). A fase orgânica foi coletada e a fase aquosa foi submetida a nova extração por mais duas vezes com adição de 40 mL de acetato de etila. A fase orgânica coletada foi seca com sulfato de sódio anidro e filtrada. As amostras foram concentradas pelo evaporador rotativo à vácuo em temperatura de 45 °C, até redução do volume da amostra para aproximadamente 5 mL. As amostras concentradas foram novamente diluídas em acetato de etila para um volume de 25 mL e acondicionadas em ampolas âmbar celadas.

Para 1 mL de amostra foi adicionado 20 µg do padrão interno antraceno (99%, Sigma-Aldrich). O volume de 1 µL das amostras foi injetado em um Cromatógrafo a gás acoplado em Espectrômetro de massas - CG-EM. O *surrogate*, perileno deuterado, foi inserido nas amostras antes de iniciar o processo de extração. O uso destes padrões é indispensável para conhecimento de possíveis perdas durante o processo de extração. A área do analito (BaP) obtida foi corrigida utilizando a taxa de recuperação, usando a fórmula: $[AC_{ii} / AC_i] \times 100$, em que AC_i corresponde a área cromatográfica do padrão interno e AC_{ii} a área cromatográfica do *surrogate*. A porcentagem de degradação de BaP foi dada utilizando a fórmula: $[(c_i - c_r) / c_i] \times 100$, em que c_i foi a concentração de BaP no ensaio controle e c_r a concentração restante de BaP dos bioensaios (MACHÍN-RAMÍREZ et al., 2010). O analito foi quantificado por uma curva analítica, usando diferentes concentrações de BaP: 0.5, 10, 20, 30, 40, 50, 70 e 90 µg mL⁻¹.

3.9 Condições do CG-EM

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás (SHIMADZU, 2010) (Tokio, Japan) com espectrômetro de massas (Shimadzu QP 2010 Plus) acoplado e equipado com coluna capilar de sílica fundida, Restek RTX-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) (Bellefonte, Pensilvânia, USA). A temperatura da coluna no CG foi programada para iniciar em 40 °C que permaneceu por 2 minutos, seguido de uma taxa de aquecimento de 20 °C por minuto até alcançar 100 °C que permaneceu por 2 minutos. Após, foi submetida a um aquecimento de 10 °C por minutos até alcançar 200 °C e permanecendo por 3 minutos, em seguida houve um aquecimento de 30°C por minutos até alcançar 300°C que manteve por 7.5 minutos. A temperatura do injetor foi de 280 °C e o modo de injeção foi Split, utilizando o gás hélio como

carreador em uma velocidade de $1,50 \text{ mL min}^{-1}$. Os fragmentos de massa foram registrados pelo monitoramento seletivo de íons (SIM). Os íons usados foram: benzo(a)pireno (m/z 252, 250), padrão interno - antraceno (m/z 178, 179) e sorrogate – perileno Deuterado (m/z 264, 260) de acordo com o cromatograma apresentado na Figura 14.

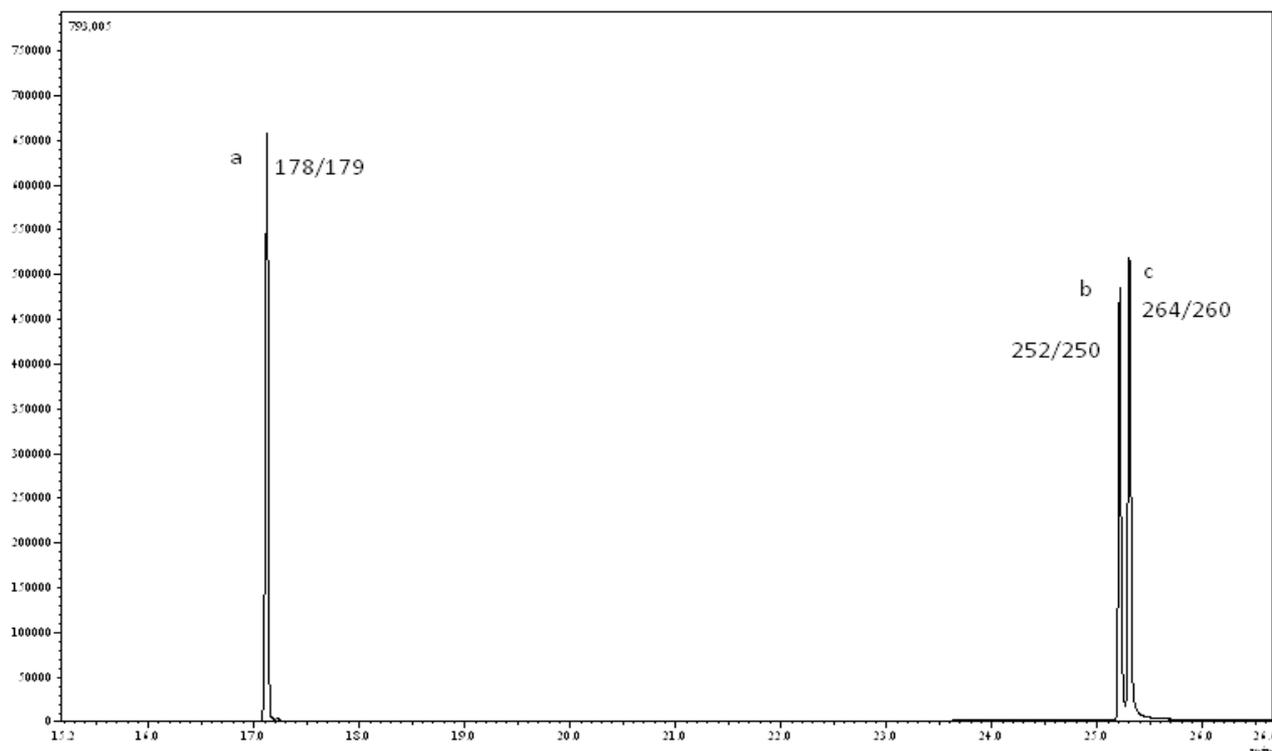


Figura 14. Cromatograma dos compostos utilizados nos ensaios de biodegradação. a: Padrão interno I (Antraceno m/z 178/179); b: analíto (benzo(a)pireno m/z 252/250); c: Padrão interno (*surrogate*) II (Perileno deuterado m/z 264/260).

3.10 Condições do HPLC para Análise de Metabólitos

Foi realizada análise qualitativa de identificação dos metabólitos da degradação de BaP através de Cromatografia Líquida de Alta performance – HPLC (SHIMADZU, 2013) (Tokio, Japan). Foi utilizado uma coluna de fase reversa C18 Ascentis® (25cm x 4,6mm1_5µm, Sulpeco). Foram avaliados a presença de dois metabólitos da rota de degradação de BaP descrito por Hadibarata e Kristanti (2012): ácido 1-hidroxi-2-naftóico e cumarina ($\geq 98\%$ Sigma Aldrich). A identificação foi realizada pela comparação cromatográfica entre o tempo de retenção dos padrões e das amostras. O preparo das amostras seguiu as mesmas condições descrito no item 2.8 deste trabalho. Foi injetado $10\mu\text{L}$ da amostra previamente filtrada (Chromafil® HPLC pore size: $0,45\mu\text{m}$), a fase móvel foi composta de aceto nitrila (grau

HPLC) e H₂O (ultra pura deionizada). A fase móvel foi programada para isocrática utilizando 60% aceto nitrila e 40% H₂O por 10 minutos. O fluxo utilizado foi de 1 mLmin⁻¹.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coleta e Isolamento dos Fungos

Foram coletadas um total de 27 estruturas reprodutivas de fungos do Filo Basidiomycota no período de abril a março de 2015. Foram identificados por taxonomia clássica os gêneros: *Trametes* (UEAF13-1), *Polyporus* (UEAF18-1), *Marasmius* (UEAF06-2), *Marasmiellus* (UEAF26-2), *Stereum* (UEAF04-1), *Ganoderma* (UEAF03-3) e *Fomitopsis* (UEAF16-1). Das 27 estruturas foram retirados fragmentos do micélio e inoculados em SDA, DBA e MEA2%, obteve-se 49 isolados fúngicos. Os isolados purificados foram depositados na coleção de trabalho de micro-organismos do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia – Universidade do Estado do Amazonas- MBT/UEA. O meio SDA foi avaliado como ideal para crescimento dos fungos.

4.2 Reação com Ácido Gálico

Em reação de oxidação do ácido gálico, foram avaliados 19 isolados que apresentaram bom desenvolvimento micelial entre 7 a 12 dias de cultivo. Todos os avaliados apresentaram capacidade de oxidar o ácido gálico conforme a tabela 5. No entanto, 10 isolados apresentaram resultados positivos quanto a formação do halo de cor marrom e 9 isolados (Tabela 6) apresentaram formação de halo com coloração marrom escuro, indicando maior atividade de enzimas fenoloxidasas, o tamanho do halo teve pouca relação com a capacidade do fungo produzir as enzimas, embora a maioria dos fungos que apresentaram coloração marrom escura, foram os fungos que tiveram maior diâmetro do halo da reação. O método de triagem a partir da oxidação do ácido gálico é um teste qualitativo que apresenta praticidade e tem sido largamente utilizado pela comunidade científica (DAVIDISON, 1938; MANCILHA, 2006; BONUGLI-SANTOS, 2012; ZANIN, et al., 2014; LEE et al., 2014; SOUZA, et al., 2016). Nesta reação, o ácido gálico é oxidado à quinonas por ação de enzimas do complexo fenoloxidasas (Lacase, MnP e LiP), originando um halo marrom no entorno do micélio (PARRAT et al., 2000). A formação da coloração marrom indica uma possível capacidade do

fungo em degradar compostos aromáticos, estando intimamente ligado a possível rota de degradação dos HPAs (BAVENDAMM, 1938; CONCEIÇÃO et al., 2005; LEE et al., 2014).

Tabela 6. Isolados que apresentaram resultado para produção de enzimas ligninolíticas em reação com ácido gálico.

Nº	Fungo	Coloração	Raio do halo (cm) 5 dias	Atividade
1	UEA_F01-1	Marrom escuro	2,3	++++
2	UEA_F02-2	Marrom amarelado	-	+
3	UEA_F04-1	Marrom escuro	2,5	++++
4	UEA_F05	Marrom claro	1,8	++
5	UEA_F06-2	Marrom escuro	2,0	++++
6	UEA_F07-3	Marrom escuro	1,8	++++
7	UEA_F08-1	Marrom escuro	1,3	++++
8	UEA_F08-2	Marrom escuro	-	++++
9	UEA_F09	Marrom claro	1,4	++
10	UEA_F13-1	Marrom escuro	2,1	++++
11	UEA_F14-1	Marrom claro	1,1	++
12	UEA_F16-1	Marrom amarelado	1,2	+
13	UEA_F18-1	Marrom amarelado	1,3	+
14	UEA_F19-1	Marrom amarelado	1,2	+
15	UEA_F20-1	Marrom amarelado	1,6	+
16	UEA_F23-1	Marrom escuro	2,3	++++
17	UEA_F23-2	Marrom claro	-	+
18	UEA_F26-1	Marrom avermelhado	-	+++
19	UEA_F26-2	Marrom escuro	1,8	++++

Legenda: marrom escuro ++++; marrom avermelhado +++; marrom claro ++; marrom amarelado +; sem atividade ou coloração do halo -.

4.3 Ensaio de Descoloração do RBBR

Nesse ensaio foram avaliados os isolados que apresentaram formação do halo marrom escuro em reação com ácido gálico foram eles: UEA01-1, UEA04-1, UEA06-2, UEA07-3, UEA13-1, UEA26-2). Os isolados UEA08-1; UEA8-2; UEA23-1 não foram selecionados por apresentarem pigmentação escura em meio SDA, pois isso pode interferir nas análises de espectrofotometria. No teste de descoloração do RBBR os isolados: UEA01-1, UEA13-1 e UEA07-3 apresentaram forte formação de pigmentação escura, dificultando as análises espectrofotométricas da descoloração do corante. A figura 15 mostra que o isolado UEA26-2 apresentou a maior taxa de descoloração diante de outros isolados. Em 24 horas foram obtidas as seguintes taxas de descoloração do corante RBBR em diferentes concentrações para os isolados UEA26-2; UEA04-1 e UEA06-2 respectivamente: 100mgL^{-1} (94%; 74% e 37%), 500mgL^{-1} (94%; 68% e 33%) e 1000mgL^{-1} (92%; 62% e 19%). O isolado UEA26-2 em 30 horas de reação obteve 100% de descoloração para a

concentração de 100mgL^{-1} . Não ocorreu adsorção do corante pelas hifas destes isolados, não havendo alteração da concentração do corante nos ensaios controles. Na tabela 7 está concentração do corante RBBR após período de reação de 120 dias.

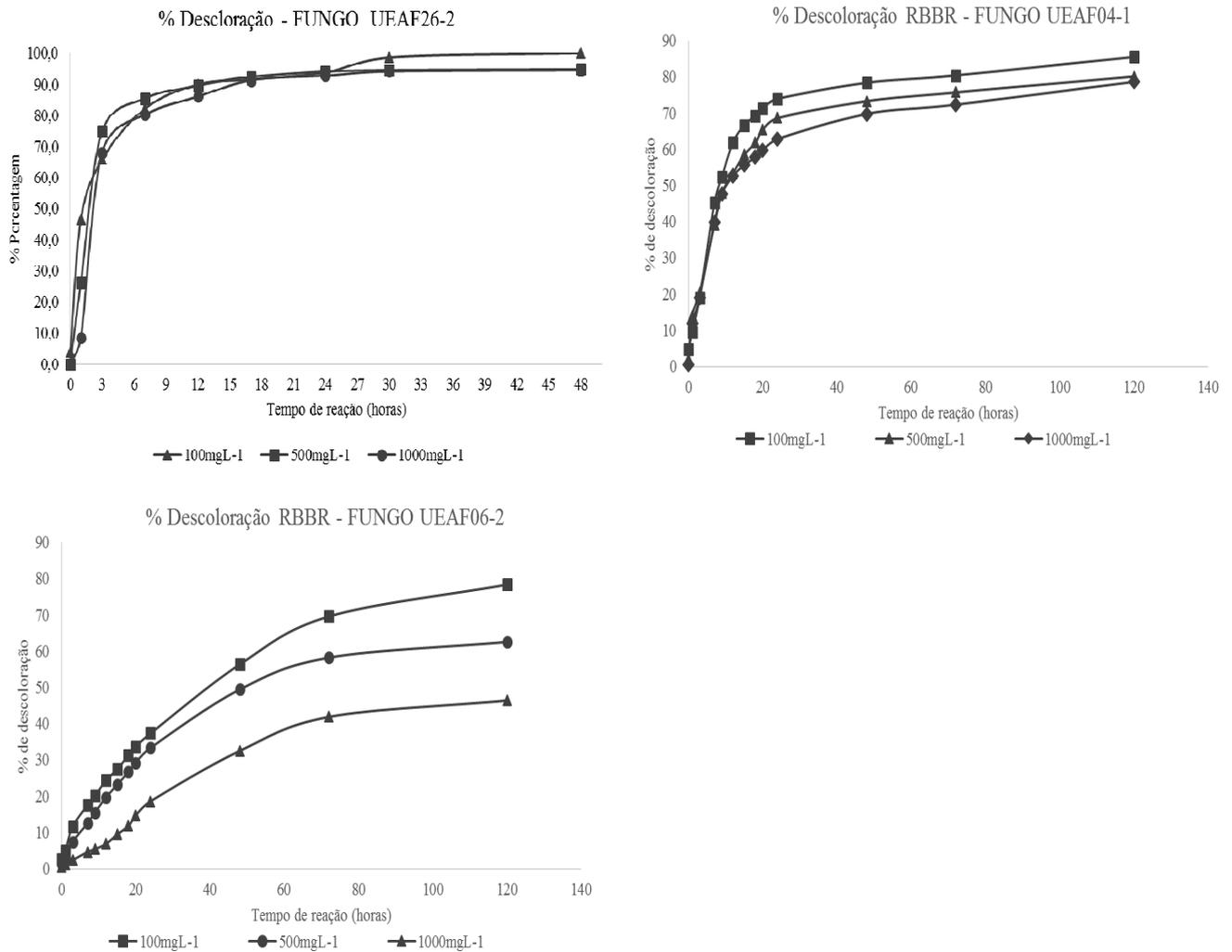


Figura 15. Gráfico da porcentagem de descoloração do corante RBBR em período de 120 horas, para as concentrações: 100mgL^{-1} , 500mgL^{-1} e 1000mgL^{-1}

Tabela 7. Concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do corante RBBR após a reação de descoloração por fungos do Filo Basidiomycota em período de 120 horas.

Fungo	Identificação	100 mgL^{-1}	500 mgL^{-1}	1000 mgL^{-1}
		$\mu\text{g mL}^{-1}$		
UEAF04-1	<i>Stereum sp.</i>	0,007	0,154	0,301
UEAF06-2	<i>Marasmius sp</i>	0,018	0,278	0,466
UEAF26-2	<i>Marasmiellus sp.</i>	0,000	0,001	0,014
CONTROLE		0,185	0,358	0,665

A utilização de corantes têxteis, como o RBBR, um derivado do HPA antraceno, vem sendo muito estudado na literatura como uma técnica de seleção de fungos que apresentam potencial na degradação de compostos tóxicos (HARMS et al., 2011, BONUGLI-SANTOS et al., 2012; LEE et al., 2014). A literatura relata que os basidiomicetos, conhecidos como fungos da podridão branca, vêm demonstrando capacidade eficiente na descoloração de corantes sintéticos. Em testes realizados com *Pleurotus* sp., Dellamatrice (2005) obteve bons resultados utilizando essa cepa para descoloração do corante índigo (97%) e RBBR (92%), enquanto que Pereira *et al.* (2010) em seus ensaios de descoloração de RBBR utilizando o fungo *Lentinula edodes* obtiveram um percentual de 70% em 15 dias de reação. Bonugli-Santos *et al.* (2012) também utilizaram fungos da podridão branca isolados de esponja marinha (*Marasmiellus* sp., *Tinctoporellus* sp. e *Peniophora* sp) para avaliar a degradação de RBBR. O fungo *Tinctoporellus* sp. descoloriu até 95% do RBBR em três dias para as concentrações 500 mg L⁻¹ e 1000 mg L⁻¹, o *Peniophora* sp. também obteve resultados similares. Já o isolado *Marasmiellus* sp. apresentou 75% de descoloração em 3 dias e completa descoloração em 7 dias. No presente estudo de descoloração do RBBR realizado com fungos amazônicos, o isolado UEAF26-2 (*Marasmiellus* sp.) apresentou desempenho superior aos isolados citados por Dellamatrice em 2005 e Bonugli-Santos em 2012, destacando o potencial enzimático deste fungo para descoloração do RBBR. Os outros fungos avaliados também mostraram resultados promissores que podem ser otimizados para maximizar a descoloração do corante.

4.4 Avaliação da Atividade Enzimática com o corante RBBR

Os resultados do ensaio anterior permitiram o avanço deste estudo para avaliação da produção de enzimas ligninolíticas pelos fungos na presença do corante RBBR (UEAF04-1, UEAF06-2; e UEAF26-2). Nesse ensaio, os isolados fúngicos selecionados foram inicialmente avaliados sem adição do corante RBBR, apresentando maior atividade enzimática para a Lacase (4,91 a 19,56 UI L⁻¹), sendo também observada a atividade de MnP (0,73 a 4,53 UI L⁻¹) e LiP (0,54 a 2,54 UI L⁻¹) no tempo máximo da reação de 120h. Por outro lado, os ensaios com a presença do RBBR, a avaliação da atividade enzimática dos isolados fúngicos apresentaram aumento considerável na produção de lacase (16,25 a 78,4 UI L⁻¹), MnP (2,63 a 12,73 UI L⁻¹) e LiP (1,25 a 21,65 UI L⁻¹) nas três concentrações de RBBR 100mgL⁻¹, 500mgL⁻¹ e 1000mgL⁻¹, conforme pode ser observado nas Tabelas 8; 9 e 10.

Tabela 8. Avaliação da atividade enzimática para o isolado fúngico UEAF26-2 sem adição de RBBR e com adição de corante em 120 h de reação.

Ensaio sem RBBR (UI L ⁻¹)			
	Lacase	LiP	MnP
	19,56 ± 0,17	1,35 ± 0,27	2,24 ± 0,24
Ensaio com RBBR (UI L ⁻¹)			
[] RBBR	Lacase	LiP	MnP
100 mgL ⁻¹	78,4 ± 0,03	21,65 ± 1,12	12,73 ± 0,92
500 mgL ⁻¹	50,93 ± 0,39	13,35 ± 0,03	9,66 ± 0,49
1000 mgL ⁻¹	45,81 ± 0,36	12,94 ± 0,61	9,71 ± 1,04

Legenda: UI L⁻¹unidade de enzima por litro.

Tabela 9. Avaliação da atividade enzimática para o isolado fúngico UEAF04-1 sem adição de RBBR e com adição de corante em 120 h de reação.

Ensaio sem RBBR (UI L ⁻¹)			
	Lacase	LiP	MnP
	5,92 ± 0,02	0,54 ± 0,03	0,73 ± 0,06
Ensaio com RBBR (UI L ⁻¹)			
[] RBBR	Lacase	LiP	MnP
100mgL ⁻¹	27,47 ± 0,25	2,79 ± 0,11	4,87 ± 0,31
500mgL ⁻¹	23,16 ± 0,44	2,17 ± 0,15	3,06 ± 0,18
1000mgL ⁻¹	19,64 ± 0,28	1,25 ± 0,05	2,63 ± 0,18

UI L⁻¹unidade de enzima por litro.

Tabela 10. Avaliação da atividade enzimática para o isolado fúngico UEAF06-2 sem adição de RBBR e com adição de corante em 120 h de reação.

Ensaio sem RBBR (UI L ⁻¹)			
	Lacase	LiP	MnP
	4,91 ± 0,12	2,54 ± 0,10	4,53 ± 0,07
Ensaio com RBBR (UI L ⁻¹)			
[] RBBR	Lacase	LiP	MnP
100mgL ⁻¹	22,17 ± 0,15	8,89 ± 0,15	9,91 ± 0,10
500mgL ⁻¹	20,11 ± 0,24	7,37 ± 0,09	8,29 ± 0,13
1000mgL ⁻¹	16,25 ± 0,13	5,15 ± 0,11	5,83 ± 0,08

UI L⁻¹unidade de enzima por litro.

Nos ensaios que foram utilizados apenas extrato de malte no meio cultura foi observado que os fungos apresentaram atividade enzimática principalmente para a Lacase, isso indica que estes isolados podem ser induzidos a uma maior expressão dessas enzimas utilizando substratos específicos. De acordo com Arora e Gill (2001), a atividade enzimática observada sem a adição do indutor RBBR, pode ser devido a presença de compostos aromáticos e fenólicos presentes no meio de cultura, como por exemplo o extrato de malte. Nos ensaios contendo corante como indutor, os isolados apresentaram um aumento exponencial da atividade enzimática após adição do corante RBBR, um aumento na atividade das enzimas de 57,3 a 78,4% para Lacase, 50,7 a 93,8% para LiP e 22,3 a 85% para MnP. Nos resultados obtidos da descoloração do corante, foi observado que a atividade das enzimas ligninolítica está diretamente relacionada com a desintegração do RBBR, a medida que a atividade enzimática aumenta e a concentração do corante no meio diminui, uma vez que este corante apresenta similaridade estrutural com lignina ou com HPAs. Na literatura, a intensa atividade de Lacase é justificada devido à sua maior afinidade por composto que apresentam grupos alquila, alcil e principalmente substratos fenólicos. A retirada de elétrons por adição de oxigênio molecular por atividade oxidativa da Lacase, pode desestabilizar os anéis aromáticos e facilitar subseqüentes clivagens dos anéis por outras enzimas como MnP e LiP (DURÁN, 1997; COUTO et al., 2004; LUNDELL, 2010). A produção de MnP e LiP está mais associada a abertura dos anéis aromáticos apresentando ou não grupos fenólicos, essas enzimas apresentam alto poder oxidativo, agregado pelo cofator H_2O_2 (KIRK et al., 1978). Harms *et. al.* (2011) descrevem ainda que outros mecanismos são importantes para o catabolismo de poluentes orgânicos, envolvendo enzimas ligninolíticas. Diante disso, foi observado que os isolados UEAF06-2 e UEAF26-2 (Tabelas 8 e 10) foram bons produtores de MnP e LiP juntamente com lacase, essas enzimas estão descritas como primordiais em processo de degradação de compostos aromáticos como os HPAs.

4.5 Avaliação da atividade enzimática com o indutor BaP

Com base na junção dos resultados anteriores, os isolados UEAF01-1, UEAF04-1, UEAF06-2, UEAF07-3, UEAF08-1 e UEAF26-2 foram utilizados em ensaios da produção de enzimas ligninolíticas *in vitro* contendo benzo(a)pireno, afim de avaliar o comportamento da atividade enzimática diante desse composto aromático que pode agir como indutor para expressão das enzimas ligninolíticas ou como inibidor diante da alta toxicidade. Em ensaios

sem BaP, quatro fungos (UEAF06-2, UEAf26-2, UEAf04-1, UEAf01-1) apresentaram produção de lacase ($2,03 \text{ U L}^{-1}$ à $11,31 \text{ U L}^{-1}$), LiP ($2,05 \text{ U L}^{-1}$ à $3,08 \text{ U L}^{-1}$) e MnP ($1,13 \text{ U L}^{-1}$). No ensaio contendo BaP como indutor também ocorreu produção de lacase ($4,46 \text{ U L}^{-1}$ à $28,52 \text{ U L}^{-1}$), LiP ($1,15 \text{ U L}^{-1}$ à $1,59 \text{ U L}^{-1}$) e MnP ($2,16 \text{ U L}^{-1}$) para os isolados: UEAf04-1, UEAf6-2, UEAf26-2 conforme demonstrado na Tabela 10. Os fungos que apresentaram produção de enzimas ligninolíticas na presença do RBBR também foram capazes de expressão enzimática mesmo diante de um composto mais tóxico. Corrobora o potencial desses isolados para os estudos de biodegradação *in vitro* de xenobióticos.

Tabela 11. Avaliação da atividade enzimática dos isolados fúngicos na ausência e presença de BaP como indutor.

Ensaio sem BaP (UI L ⁻¹)			
Isolados	Lacase	LiP	MnP
UEAF08-1	1,13±0,04	0,14±0,07	-
UEAF06-2	10,17±0,25	3,08±0,19	1,13±0,15
UEAF07-3	-	-	0,11±0,05
UEAF01-1	2,03±0,19	-	-
UEAF26-2	11,31±1,52	2,05±0,28	-
UEAF04-1	4,23±0,57	-	0,12±0,03
Ensaio com BaP (UI L ⁻¹)			
Isolados	Lacase	LiP	MnP
UEAF08-1	0,10±0,01	0,53±0,15	-
UEAF06-2	4,46±0,30	1,59±0,29	0,92±0,08
UEAF07-3	0,18±0,12	0,51±0,11	0,37±0,28
UEAF01-1	-	-	-
UEAF26-2	28,52±2,29	1,15±0,35	-
UEAF04-1	-	0,75±0,03	2,16±0,12

UI L⁻¹ unidade de enzima por litro.

De acordo com os resultados de atividade enzimática obtidos através de ensaios na ausência e na presença de BaP, mostraram que o isolado UEAf26-2 apresentou indução pelo BaP para a enzima Lacase. O aumento da atividade de lacase na presença de BaP pode ser um indicativo do potencial do isolado UEAf26-2 para biodegradação deste HPA. Em ensaio com o isolado UEAf04-1 o BaP induziu a produção de MnP ($2,15 \text{ U L}^{-1}$). De acordo com a figura 16 e 17 o fungo UEAf06-2 não apresentou aumento na atividade enzimática para nenhuma das enzimas e manteve uma baixa atividade para as enzimas Lacase e LiP. Os demais isolados fúngico avaliados, como UEAf08-1 e UEAf07-3 não apresentaram produção significativa para fenoloxidasas na ausência ou presença de BaP. O gênero *Marasmiellus* já é mencionado

na literatura pela capacidade de produção de enzimas ligninolíticas, tal como, a produção de lacase. A literatura demonstra ainda que há uma relação intrínseca de fungos da podridão branca e produção de enzimas ligninolíticas para biodegradação de HPAs de alto peso molecular, principalmente pela atuação das enzimas LiP e MnP, devido seu poder de clivar anéis aromáticos estáveis, inicialmente o ataque enzimático ao composto aromático acontece pela enzima Lacase (CAVALLAZI et al. 2005, ACEVEDO et al., 2011).

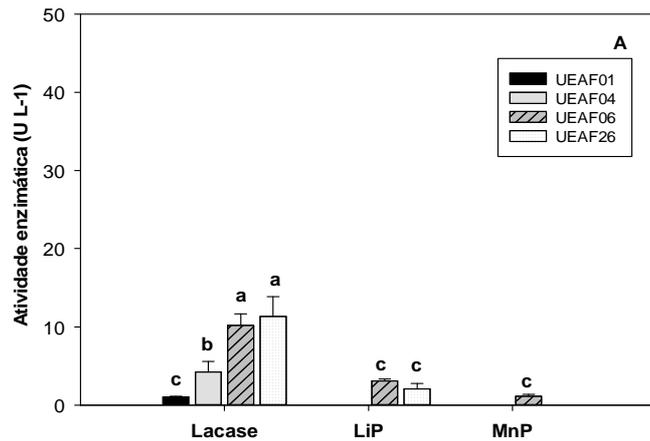


Figura 16. Gráfico da produção enzimática (Lacase, MnP e Lip) na ausência de BaP em período de 7 dias.

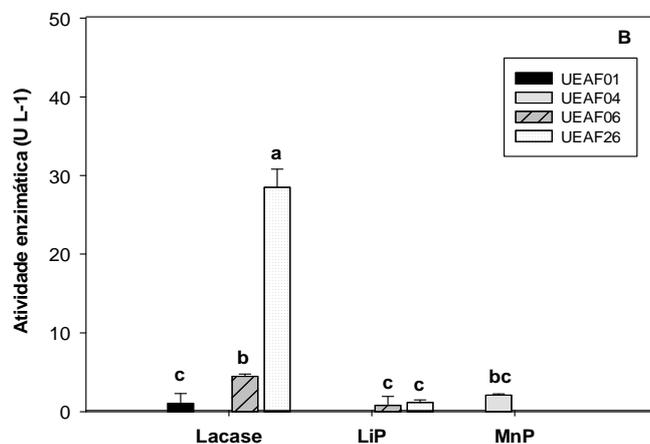


Figura 17. Gráfico da produção enzimática (Lacase, MnP e Lip) na presença de BaP em período de 7 dias.

Nos ensaios da atividade enzimática com a presença de BaP foi observado nos isolados UEAFO1-1, UEAFO8-1 e UEAFO7-3 forte pigmentação escura, também observada em ensaios de descoloração do RBBR. Essa pigmentação é descrita na literatura por fungos que apresentam um complexo melanínico em suas paredes celulares (PALOK, 1990). Esse pigmento é produzido no citosol por alguns precursores, como o catecol. O catecol pode ser um metabólito da degradação de anéis benzênicos ou HPA pelo complexo citocromo P450

(CYP 450), com isso podendo indicar uma atividade não ligninolítica dos fungos. A pigmentação também pode estar associada a oxidação de compostos fenólicos, presente no meio de cultura através da atividade de enzimas ligninolíticas sendo uma forma de defesa do micro-organismo contra compostos tóxicos (GRIFFITH, 1994; CONCEIÇÃO et al., 2005). Os resultados obtidos revelaram baixa atividade de Lacase pelo fungo UEAFO1-1 em ensaio com BaP. Esse isolado também apresentou forte pigmentação de coloração escura, segundo relatos na literatura, a Lacase pode estar associada com a produção dessa pigmentação para defesa do fungo.

4.6 Ensaio de Biodegradação do Benzo(a)Pireno

Os isolados UEAFO6-2 e UEAFO26-2 apresentaram melhor atividade enzimática para Lacase e LiP e melhores resultados nos ensaios anteriores, diante disso, foram selecionados para teste de degradação *in vitro* do BaP. As análises de degradação do BaP foram realizadas por padronização interna e apresentaram taxa de recuperação do *surrogate* entre 69% e 92% para o ensaio com 1 mg mL⁻¹ de BaP (ensaio I) e 72% a 83% em ensaios com 2 mg mL⁻¹ de BaP (ensaio II). O isolado UEAFO6-2 apresentou taxa de degradação de 13% para o ensaio I em 7 dias e 42% em 14 dias de reação. No ensaio II o mesmo apresentou porcentagem de degradação de 14% em 7 dias e 37,4% em 14 dias. O isolado UEAFO26-2 obteve taxas de biodegradação menores, no ensaio I, de 9,9% em 7 dias e 7,4% em 14 dias, no ensaio II, 0,9% e 0,2% para 7 e 14 dias, respectivamente, de acordo com a figura 18.

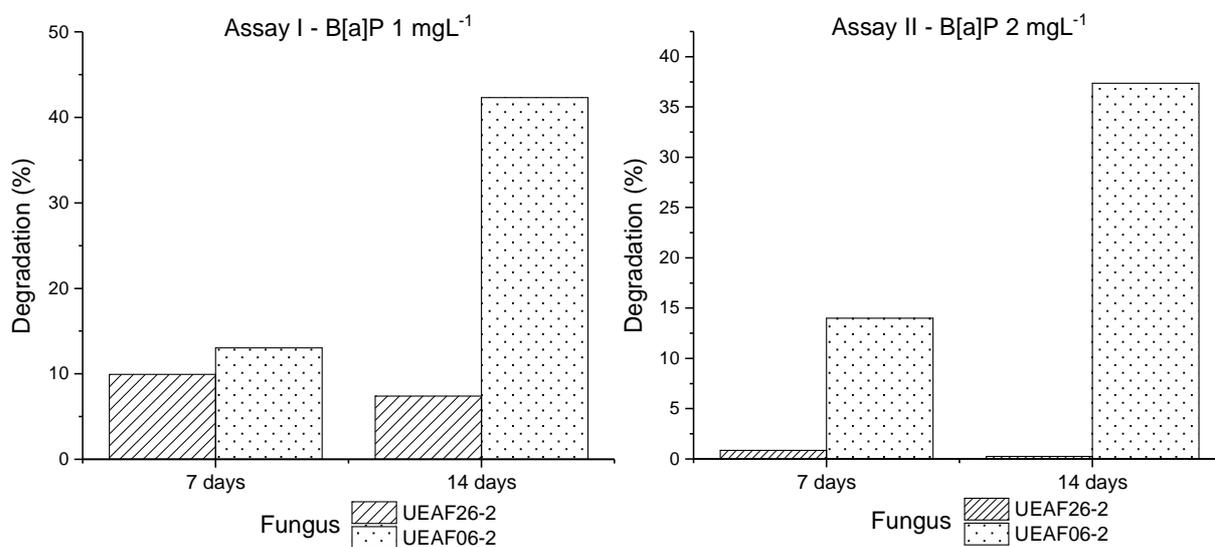


Figura 18. Avaliação da degradação do BaP pelos fungos pré-selecionados, ensaio I e II.

Na literatura são poucos as pesquisas de biorremediação de poluentes orgânicos que utilizam fungos dos gêneros *Marasmiellus* ou *Marasmius*. Estudos relatam o potencial do gênero *Marasmiellus* para a degradação de HPAs, como por exemplo, Magrini (2012) que avaliou a degradação de BaP e Pireno (0,02; 0,04 mgL⁻¹) por um fungo do gênero *Marasmiellus* que degradou até 90% de ambos HPAs após 7 dias, porém em concentrações baixas, com isso o autor concluiu o potencial dos fungos para testes otimizados de biodegradação.

Apesar do isolado UEAF26-2 apresentar maior atividade enzimática para Lacase em relação ao UEAF06-2, o mesmo não apresentou resultado significativo no ensaio de biodegradação da mesma forma que o isolado UEAF06-2.

Estudos relatam que a Lacase apresenta uma grande quantidade de isoenzimas, que atuam diferentemente conforme a toxicidade do composto, justificando que independente da produção dessa enzima, é necessário que haja a complementação por outras enzimas, como, MnP e LiP que estão mais ligadas com a clivagem de anéis aromáticos. O potencial oxidativo do sistema é independente para cada espécie. Além disso, a atividade enzimática pode ser induzida ou inibida por diferentes fatores que afetam a expressão, mas não a real capacidade de produzi-la (REGALADO et al., 1999), isto justifica que o potencial de degradação de BaP seja uma característica específica do UEAF06-2. Por outro lado o isolado UEAF26-2 apresentou maior potencial em degradar compostos mais simples como o RBBR.

Outro aspecto que deve ser levado em consideração nos resultados de degradação foi a alta concentração do BaP (2 mg mL⁻¹) utilizada, considerando esse HPA como altamente tóxico para os organismos, foi avaliado que o aumento de sua concentração em ensaio de degradação pode diminuir a atividade das enzimas ligninolíticas e conseqüentemente da degradação do composto, porém o isolado UEAF06-2 conseguiu manter uma taxa de degradação crescente mesmo em alta concentração de BaP. Estudos na literatura apontam que fungos da podridão branca apresentam potencial em degradar o BaP e outros HPAs com mais eficiência que outros micro-organismos. Nos resultados obtidos por Hadibara e Kristanti (2012) foi alcançada uma taxa de degradação de 76% com o BaP em ensaios de 30 dias, tempo maior que o avaliado neste trabalho com fungos amazônicos. Souza *et al.* (2016), obtiveram bons resultados em degradação de BaP, avaliando ensaios de 7 e 14 dias com fungos filamentosos isolados de áreas contaminadas com HPAs no Rio Negro. Em seus resultados a melhor taxa de degradação foi de 54% por *Megasporoporia* sp. em ensaio de 14

dias. *Megasporoporia* sp. é um fungo ligninolítico que apresenta potencial para produção de enzimas como Lacase, MnP e Lip. A versatilidade dos fungos tanto em descolorir RBBR quanto em degradar o BaP, apontam que os fungos apresentam enzimas com capacidade muito diversificada que podem ser induzidas a alta produção em compostos menos tóxicos e muito tóxicos, porém com boa atividade apenas em compostos menos tóxicos, caso do UEA26-2. Já o UEA06-2 apresentou ser mais eficiente em compostos mais tóxicos, mesmo com pouca produção enzimática. A possibilidade de otimização do método pode indicar melhorias para degradação de compostos mais ou menos tóxicos, podendo maximizar os resultados em processos de biodegradação de xenobióticos. Estudos posteriores podem avaliar a degradação de outros corantes têxteis e HPAs pelos fungos selecionados como potenciais.

4.7 Análise dos Metabólitos da Degradação do BaP

A degradação de HPAs por sistemas biológicos geralmente é incompleta, sendo possível identificar compostos intermediários. Magrini (2012) identificou alguns metabólitos intermediários da degradação de HPA de alto peso molecular por fungo do gênero *Marasmiellus* sp., em período de 5 e após 15 dias foram detectados 4 metabólitos: 1-hidroxipireno; pirenodihidrodiol; pirenodihidrodiol e dihidroxipireno. O resultado foi obtido através da análise de perfis cromatográficos utilizando modo SIM (Selected ion monitoring) em espectrômetro de massas, permitindo apenas uma sugestão através de íons de identificação descritos na literatura, não foram utilizados padrões para confirmação dos metabólitos. A investigação de metabólitos oriundos da degradação de HPAs por espécies de fungos geralmente é caracterizada pela presença de quinonas (HARITASH e KAUSHIK, 2009). Em avaliação desses metabólitos pode ser sugerido que através de lacase e outras peroxidases haja a formação de dois compostos que indicam uma rota de degradação que leva a mineralização, ácido 1-hidrodixi-2-naftóico e cumarina (HADIBARATA e KRISTANTI, 2012). Neste estudo, nos ensaios realizados para UEA26-2 e UEA06-1, não foram identificados os metabólitos, ácido 1-hidrodixi-2-naftóico e cumarina, na degradação de Benzo(a)pireno, porém, a diminuição na concentração do BaP, no ensaio de degradação, pode indicar a formação de outros metabólitos não analisados. Souza et al., (2016) também não conseguiu avaliar a presença desses dois metabólitos. Assim, estudos posteriores sobre a produção de metabólitos poderão ser realizados com análises de metabolitos diferentes dos analisados neste trabalho levando em consideração trabalhos como de Souza et al., (2016), Hadibarata e Kristanti (2012), Magrini, (2012).

5 CONCLUSÃO

Observou-se que os métodos avaliados para isolamento e seleção de fungos produtores de enzimas ligninolíticas demonstraram bastante eficiência quando aplicados a isolados de basidiomicetos amazônicos. Onde foi possível a seleção de fungos que apresentaram eficiência para descoloração de RBBR e degradação de compostos mais estáveis como o BaP. As metodologias utilizando o ácido gálico e o corante RBBR foram favoráveis, pois apresentaram resultados que facilitaram a seleção dos isolados com maior potencial para em biodegradação de contaminantes. A avaliação das enzimas em ensaios contendo HPA foi determinante para estudo do comportamento de inibição e indução de atividade enzimática. Neste estudo, dois fungos foram selecionados para bioensaios de degradação do BaP, UEA06-2 (*Marasmius* sp.) e UEA26-2 (*Marasmiellus* sp.) O melhor resultado encontrado para a biodegradação do BaP foi com o isolado UEA06-2 que apresentou uma porcentagem de degradação de 42% do poluente em 14 dias. Levando em consideração a alta toxicidade do BaP e a alta concentração utilizada nos ensaios, estudos com HPAs mais leves e em concentrações menores podem fornecer melhores resultados para os dois fungos avaliados. Diante dos resultados obtidos pelo isolado UEA06-2, a seleção deste para ensaios futuros de otimização para degradação do BaP e outros xenobióticos são necessários. Outros trabalhos complementares de identificação de metabólitos também podem ser aplicados, através da ampliação de padrões analisados e testes de outras metodologias descritas na literatura. Contudo a prospecção de novos fungos basidiomicetos utilizando esta metodologia otimizada pode elevar os números de isolados de interesse biotecnológico para uso em programas de biorremediação.

6 REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, F., Pizzul, L., Castillo, M. del P., Cuevas, R. & Diez, M.C. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthracoophyllum discolor*. **Journal of Hazardous Materials** 185: 212–219. 2011.
- ACEMIOGLU, B. Adsorption of Congo red from aqueous solution onto calcium-rich fly ash, **J. Colloid Interface Sci.** V.274, p.371-379, 2004.
- ANDRADE, J.A.; FABIO A.; JARDIM, S. F. Biorremediação de solos contaminados por Petróleo e seus derivados. **Eclética. Química.** São Paulo, 35 - 3: 17 - 43, 2010.
- ARORA, D. S.; GILL, P. K. Comparison of two assay procedure for lignin peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, V.28, p.602-605, 2001.
- 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.** Vol. 172: pag.201–219, 2006.
- BENNET, J.W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **J. Biotechnol.**, v.66, p.101-107, 1998.
- CAO & KARTHIGA NAGARAJAN & KAI-CHEE LOH. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches, **Applied Microbiology and Biotechnology**, V.85, iss:2 p.207-228, 2009.
- BONUGLI-SANTOS R. C., DURRANT L. R., SETTE L. D. The production of ligninolytic enzymes by marine-derived basidiomycetes and their biotechnological potential in the biodegradation of recalcitrant pollutants and the treatment of textile effluents. **Water Air Soil Pollution**, V.223, P.2333–2345, 2012.
- BONUGLI-SANTOS R.C; SANTOS V.M.R.; PASSARINI M.R.; VIEIRA G.A.L.; LOPES V.C.P.; MAINARDI P.H.; SANTOS J.A; AZEVEDO D.L.; OTERO I.V.; SILVA Y.A.M.; FEITOSA V.A.; PESSOA A.; SETTE L.D. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. **Front. Microbiol.** 6:269, 2015.
- BOULOUBASSI, I.; SALIOT, A. Investigation of anthropogenic and natural organic inputs in estuarine sediments using hydrocarbons markers (NAH, LAB, PAH). **Oceanologica Acta**, V.16, n.2, p.145-161, 1993.
- BOUROTTE, C.; FORTI, M. C.; LUCAS, Y.; MELFI, A. J. Comparison of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (HPAs) concentrations in urban and natural forests soils in the Atlantic Forest (São Paulo State). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, V.81, n.1, p.127-136, 2009.
- BROWN, J.A.; ALIC, M.; GOLD, M.H. Manganese Peroxidase Gene Transcription in *Phanerochaete chrysosporium*: Activation by Manganese. **Journal of Bacteriology.** V.173: p.4101-4106. 1991.

- 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.
- BUSWELL, J. K.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, V.128, p.81–88, 1995.
- CARUSO, M.S.F.; ALABURDA, J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - Benzo(a)pireno: uma revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, n.67, p.1-27, 2008.
- CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol.42, pag.225–226, 1939.
- CAVALLAZZI, JOSÉ RENATO P., KASUYA, CATARINA M. AND SOARES, MARCOS A. **Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium**. *Braz. J. Microbiol.*, Dec 2005, vol.36, no.4, p.383-387. ISSN 1517-8382
- CELINO, J.J.; QUEIROZ, A.F.S. Fonte de contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de baixa massa molecular em sedimentos da baía de Todos os Santos, Bahia. **REM- Revista Escola de Minas**, V.59, n.3, p.265-270, 2006.
- CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. **Micron**. 35: 93-96. 2004.
- CLUTTERBUCK, A. J. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. **Journal of General of Microbiology**, p.1731-1738, 1990.
- COLOMBO, J.C.; PELLETIER, E.; BROCHU, C.; KHALIL, M. Determination of hydrocarbon sources using n-alkanes and polyaromatic hydrocarbon distribution indices. Case study: Rio de La Plata Estuary, Argentina. **Environ. Sci. Technol.** V. 23, p.888-894, 1989.
- CONCEIÇÃO, D. M.; ANGELIS, D. A. de; BIDOIA, B. D.; ANGELIS, D. de F. Fungos filamentosos isolados do Rio Atibaia SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n.1, p. 99-106. 2005.
- COSTA, A.F. **Avaliação da contaminação Humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos : 1-hidroxipireno–urinário**. Rio de Janeiro, 2001. 190p. (Dissertação Mestrado). Centro de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana da FundaçãoOswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, 2001.
- C&EN. Putting enzymes in a cage to clean up the environment, acesso em: 24.03.2016 acesso em: <<http://acssandiego2016.cenmag.org/putting-enzymes-in-a-cage-to-clean-up-the-environment/>>.
- DELLAMATRICE, P. M.; COSTA, L. S.; MARQUES, A. S.; VIANA, M. S.; ARAÚJO, R. S. Degradação de agrotóxicos por fungos basidiomicetos em solo agrícola contendo altos níveis de três produtos diferentes. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, V.22, p.7-16, 2012.

DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N.; JOHN, A.K. Biotechnology and bioremediation: success and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 143-152, 2002.

DUCROS, V., BRZOZOWSKI, A.M., WILSON, K.S., OSTERGAARD, P., SCHNEIDER, P., SVENDSON, A.; DAVIES, G.J. The structure of laccase from *Coprinus cinereus* at 1.6 Å resolution: evidence for different type 2 Cu-depleted isoforms. **Acta Crystallogr.** V.57, p.333-336. 2001.

DURÁN, N.; ESPÓSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. **Microbiologia Ambiental**, Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p. 269-292. 1997.
GANODERMAIERI, G.; CENNAMO, G.; SANNIA, G. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. **Enzyme and Microbial Technology**. V.36, p.17-24, 2005.

GUGLIOTTA, A.B. ; CAPELARI, M. Taxonomia de Basidiomicetos. In: Bononi, V.L.R. ; GRANDI, R.A.P (Eds) *Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*. Instituto de botânica, São Paulo, SP. p. 68-105. 1998.

HADIBARATA, T.; KRISTANTI R. A. Fate and cometabolic degradation of benzo[a]pyrene by white-rot fungus *Armillaria* sp. F022. **Bioresource Technology**, vol.107, pag.314–318, 2012.

HARMS, H.D,S.; LUKAS Y.W. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Nature Reviews Microbiology** v. 9,3 p. 177, 2011.

HARITASH, A. K., & KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): a review. **Journal of Hazardous Materials**, vol.169, pag.1–15, 2009.

HASE, A.; HITAS, R.A. On the origin of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments: biosynthesis by anaerobic bacteria. **Geochim. Cosmochim. Acta**, V.40, p.1141-1143, 1976.

HIBBETT, D. S., BINDER, M., BISCHOFF, J. F., BLACKWELL, M., CANNON, P. F., ERIKSSON, O. E., HUHDORF, S., JAMES, T., KIRK, P. M., LÜCKING, R., LUMBSCH, T., LUTZONI, F., MATHENY, P. B., MCLAUGHLIN, D. J., POWELL, M. J. , REDHEAD, S., SCHOCH, C. L., SPATAFORA, J. W., STALPERS, J. A. , VILGALYS, R., AIME, M. C., APTROOT, A., BAUER, R., BEGEROW, D., BENNY, G. L., CASTLEBURY, L. A., CROUS, P. W., DAI, Y.-C., GAMS, W., GEISER, D. M. , GRIFFITH, G. W., GUEIDAN, C., HAWKSWORTH, D. L., HESTMARK, G., HOSAKA, K. , HUMBER, R. A., HYDE, K., IRONSIDE, J. E., KÖLJALG, U., KURTZMAN, C. P., LARSSON, K.-H., LICHTWARDT, R., LONGCORE, J., MIADLIKOWSKA, J., MILLER, A., MONCALVO, J.-M., MOZLEY-STANDRIDGE, S., OBERWINKLER, F., PARMASTO, E., REEB, V., ROGERS, J. D., ROUX, C., RYVARDEN, L., SAMPAIO, J. P., SCHÜBLER, A., SUGIYAMA, J., THORN, R. G., TIBELL, L., UNTEREINER, W. A., WALKER, C., WANG, Z. WEIR, A., WEIß, M., WHITE, M. M., WINKA, K., YAO, Y.-J., ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. 5, p.509-547, 2007.

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

HUNGER, K.; HAMPRECHT, R.; MIEDERER, P.; HEID, C.; ENGEL, A.; KUNDE, K.; MENNICKE, W.; GRIFFITHS, J. Dye classes for principal application. In: HUNGER, K. **Industrial dyes: chemistry, properties, applications**. New York: Wiley, p.119-130, 2007.

IYER, G.; CHATTOO, B. Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **FEMS Microbiology Letters**, v.227, p.121-126, 2003.

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

KIRK, T.K., SCHULTZ, E., CONNORS, W.J., LORENZ, L.F. & ZEIKUS, J.G. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Microbiology**. V.117, p.277-285, 1978.

KIRK, T. K.; FARREL, R. L. Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, V.41, p.465–505, 1987.

KNORR, M.; SCHNK, D. About the question of the synthesis of PAH by bacteria. **Arch. Hyg. (Berl.)**. v.152, p.282-285, 1968.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S.G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, V.25, p.78-82, 2002.

LEE, H.; JANG, Y.; CHOI, Y.; KIM, M.; LEE, J.; LEE, H.; HONG, J.; LEE, Y.; KIM, G.; KIM, J. Biotechnological Procedures to Select White Rot Fungi for the Degradation of PAHs, **Journal of Microbiological Methods**. v.97, p.56-62, 2014.

LEONOWICZ, A., MATUSZEWSKA, A., LUTEREK, J., ZIEGENHAGEN, D., WOJTAS-WASILEWSKA, M., CHO, N.S., HOFRICHTER, M. & ROGALSKI, J. THURSTON, C. The structure and function of fungal lacasses. **Microbiology**, London, v.140, p.19-26, 1994.

LIMA, E. A. R; **Fontes E Distribuição De Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Em Sedimentos De Fundo E Testemunhos Sedimentares Da Zona Costeira Amazônica: Regiões De Belém E Barcarena (Pa) E Santana (Ap)**. Niteroi, 2009. (Tese de doutorado), Universidade Federal Fluminense, Centro de Estudos Gerais, Instituto de Química.

LYRA, E.S.; MOREIRA, K.A.; PORTO, T.S.; CARNEIRO DA CUNHA, M.N.; PAZ JÚNIOR, F.B.; NETO, B.B.; LIMA-FILHO, J.L.; CAVALCANTI, M.A.Q.; CONVERTI, A.; PORTO, A.L.P. Decolorization of synthetic dyes by basidiomycetes isolated from woods of the Atlantic Forest (PE), Brazil. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, V.25 p.499-1504, 2009.

LOPEZ, M.J.; GUISSADO, M.C.; VARGAS-GARCIA, ESTRELLA F.S.; MORENO, J. ,Decolourization of industrial dyes by lignolytic microorganisms isolated from composting environment, **Enzyme and Microbial Technology**, V.40, p.42-45, 2006.

LUNDELL, T. K.; MÄKELÄ, M. R.; HILDÉN, K. Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes – ecological, functional and phylogenetic review. **Journal of Basic Microbiology**, Helsinki, Finland, v.50, p.5-20, 2010.

MACHÍN-RAMÍREZ, C.; MORALES, D.; MARTÍNEZ-MORALES, F.; OKOH, A.I.; TREJO-HERNÁNDEZ, M.R. Benzo[a]pyrene removal by axenic- and co-cultures of some bacterial and fungal strains. **International Biodeterioration & Biodegradation** V.64, p.538-544, 2010.

MANCILHA, E. S. L.; **Seleção de Basidiomycetes Coletados e Isolados em Área de Mata Atlântica-PE com Atividade Fenoxidase e sua Aplicação na Descoloração de Corantes Sintéticos**. Recife, 2006 (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco – UFP.

MASTRAL, A.M.; GARCIA, T.; CALLEN, M.S.; LOPEZ, J.M.; NAVARRO, M.V.; MURILLO, R.; GALBAN, J. Three-ring PAH removal from waste hot gas by sorbents: influence of the sorbent characteristics. **Environ. Sci. Technol.** v. 36, p. 1821–1826, 2002.

MASTRAL, A.M.; GARCIA, T.; CALLEN, M.S.; LOPEZ, J.M.; NAVARRO, M.V.; MURILLO, R.; GALBAN, J. Three-ring PAH removal from waste hot gas by sorbents: influence of the sorbent characteristics. **Environ. Sci. Technol.** v. 36, p. 1821–1826, 2002.

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

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

MEYER, P.A.; ISHIWATARI, R. Lacustrine organic geochemistry – an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments. **Organic Geochemistry**, n. 20, p.867-900, 1993.

NEFF, J.M. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment Sources, fate, and biological effects. **Applied Science Publishers**: London, 1979.

NETO T.V. **Diversidade e seleção de fungos basidiomicetos Afiloforóides para produção de enzimas Lignocelulolíticas em área de mata atlântica do sul da Bahia**. Bahia, 2010 (dissertação de doutorado), Universidade Estadual de Feira de Santana. 2010.

NYANHONG, G. et al. Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. **Bioresource Technology**, v. 84, p.259-263, 2002.

OLIVEIRA, C.R. **Avaliação da biodegradação de Pireno pela microbiota nativa em sedimento do Manguezal do Itacorubi**, Florianópolis, 2006. (Dissertação de Mestrado), Instituto de química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

OSTBERG, Tomas L.; JONSSON, Anders P.; BYLUND, Dan; LUNDSTROM, Ulla 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**, n. 60, p. 334-341, 2007.

ÖNNERUD, H., ZHANG, L., GELLERSTEDT, G. & HENRIKSSON, G. Polymerization of Monolignols by Redox Shuttle-Mediated Enzymatic, 2002.

PASSARINI, M. R. Z.; SETTE, L. D.; RODRIGUES, M. V. N. Improved extraction method to evaluate the degradation of selected PAHs by marine fungi grown in fermentative medium. **Journal Brazilian Chemical Society**. V.22, p.564-570, 2011.

PEIXOTO, R.; ROSADO, A.; Rg, T. Bioprospecção da diversidade microbiana cultivável e não cultivável in: **Microbiologia Ambiental**. Melo and J. Azevedo. CNPMA/EMBRAPA, I ed. p83–106. Jaguariúna, 2008.

PINTO, A.P; SERRANO, C; PIRES, T; MESTRINHO, E; DIAS, L; MARTINS, TEIXEIRA, D; CALDEIRA, A.T. Degradation of terbuthylazine, difenoconazole and pendimethalin pesticides by selected fungi cultures. **Science of the total environment**, vol.435-436 p.402 - 10, 2012.

PODGORNIK, H.; POLJANSEK, I.; PERDIH, A., Transformation of indigo carmine by *Phanerochaete chrysosporium* lignolytic enzymes, **Enzyme and Microbial Technology**. V.29, p.166-172, 2001.

RAJARATHANAM, S.; SHASHIREKA, M.N.; BANO, Z. Biopotentialites of the basidiomycetes. **Advances in Applied Microbiology**. São Paulo, 2013.V.37 p.233-361, 1992.

REVANKAR, M.S., LELE, S.S., Synthetic dye decolorization by *Ganoderma sp.*, WR-1. **Bioresource Technology**. V.98, p.775-780, 2007.

RYVARDEN, L. **Neotropical polypores Part 1**. Oslo: Fungiflora, 2004. 229 p.

SILVA, M.; ESPÓSITO, E. O papel dos fungos na recuperação ambiental. In: Espósito, E.; Azevedo, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**, Caxias do Sul: Educs, p. 337-378, 2004.

SINGER, R. *The Agaricales in modern taxonomy*. 4th Edition, Koeltz Scientific Books, Koenigstein, Germany, 1986. 981pp.

SHELLER, H.V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review Of Plant Biology**, Emeryville, California, v. 61, p.263-289, 2010.

SHIN, K. S. The role of enzymes produced by white-rot fungus *Irpex lacteus* in the decolorization of the textile industry effluent. **Journal of Microbiology**, p.19-26, 2004.

SOUZA, H. Q., AGUIAR, I.J. Diversidade de Agaricales (Basidiomycota) na Reserva Biológica Walter Egler, Amazonas, Brasil. **ACTA AMAZONICA** vol. Vol.34(1): 43 – 51. 2004.

SOUZA, H.M.; SETTE, L.D.; NETO, J.F.; RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, T.B.; OLIVEIRA, L.A.; BARROSO, H.S.; ZANOTTO, S.P., Filamentous Fungi Isolates of Contaminated Sediment in the Amazon Region with the Potential for Benzo(a)pyrene Degradation. **Water Air Soil Pollut** Vol. 227:431, doi:10.1007/s11270-016-3101-y. 2016.

SOUZA H. L; TANIGUCHI; BÍCEGO M. C.; OLIVEIRA L. A.; OLIVEIRA T. C. S.; BARROSO H.S.; ZANOTTO S. P. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Superficial

Sediments of the Negro River in the Amazon Region of Brazil, **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 26, No. 7, 1438-1449, 2015.

TIEN, M.; KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂ requiring oxygenase. **Proceeding of the National Academy of Science USA**. V.81, p. 2280-2284, 1984.

TONY HADIBARATA; SANRO TACHIBANA; KAZUTAKA ITOH. Biodegradation of chrysene, an aromatic hydrocarbon by *Polyporus* sp. S133 in liquid medium. **Journal of hazardous materials**, vol:164 iss:2 pg:911 -917, 2009.

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

VANDERVIVERA, P.C.; BIANCHI, R.; VERSTRAETE, W., Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. V.72, p.289-302, 1998.

VO DINH, T; FETZER, J. & CAMPIGLIA, A. D. Monitoring and characterization of polyaromatic compounds in the environment. **Talanta**, 47:943-969, 1998.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. Whiterot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, Louvain-la-neuve, Belgica, v. 22, p.161-187, 2003.

WESSELS, J.G.H. Development regulation of fungal cell wall formation. **Annual Review Phytopathology**. 32: 413-437, 1994.

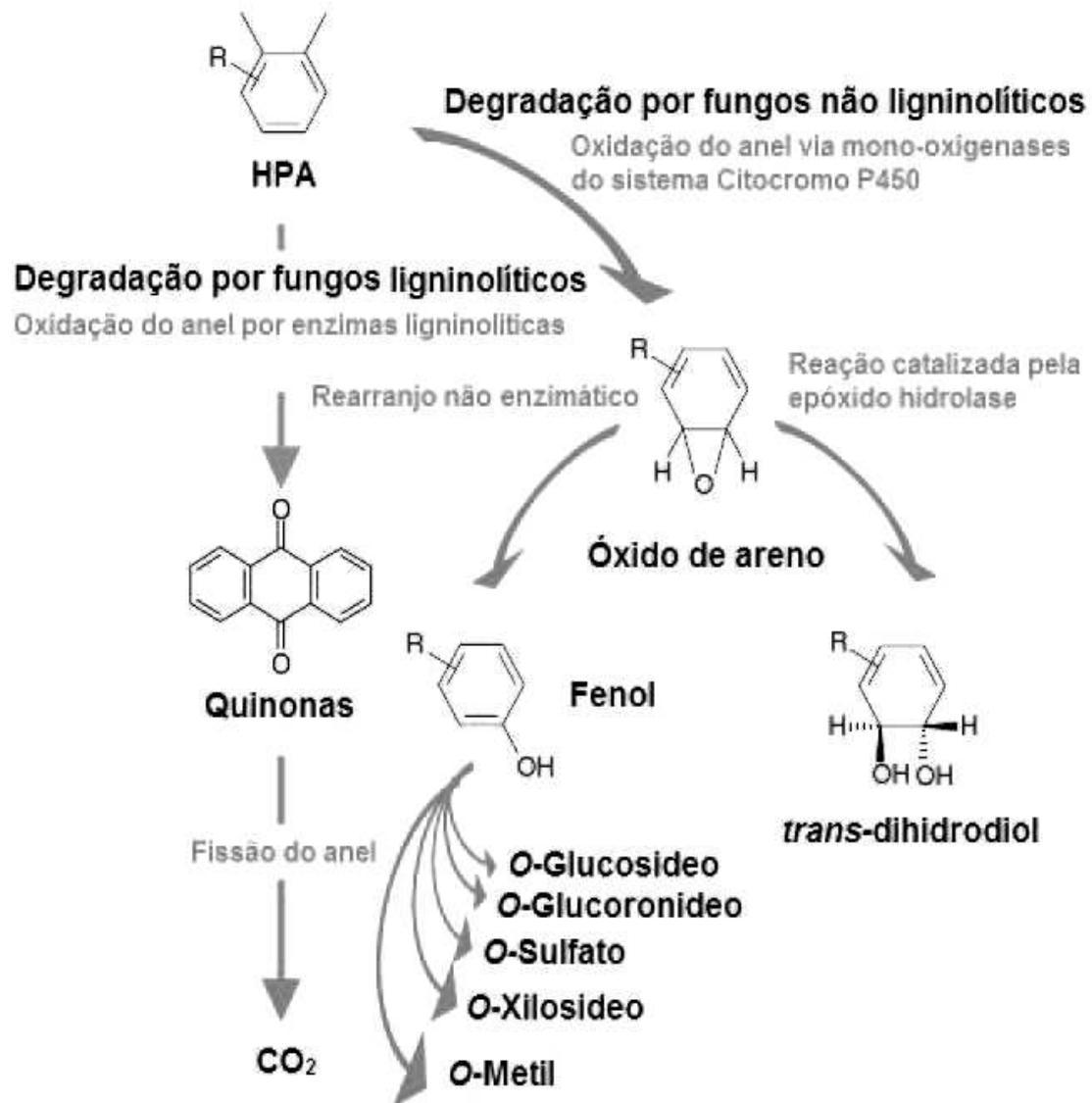
WHO/IPCS. Environmental Health Criteria 162, Brominated Diphenyl Ethers. **World Health Organisation**, I.P.C.S., Geneva, 1994.

XIAO, Y. et al. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p.700-707, 2003.

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

ZHANG, H. et al. Efficient production of laccases by *Trametes* sp. AH28-2 inocultivation with a *Trichoderma* strain. **Appl. Microbiol. Biotechnol Chemical Socyite**, v. 73, p.89-94, 2006.

ANEXO I



Duas principais rotas de degradação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos por fungos. (MAGRINI, 2012).

ANEXO II

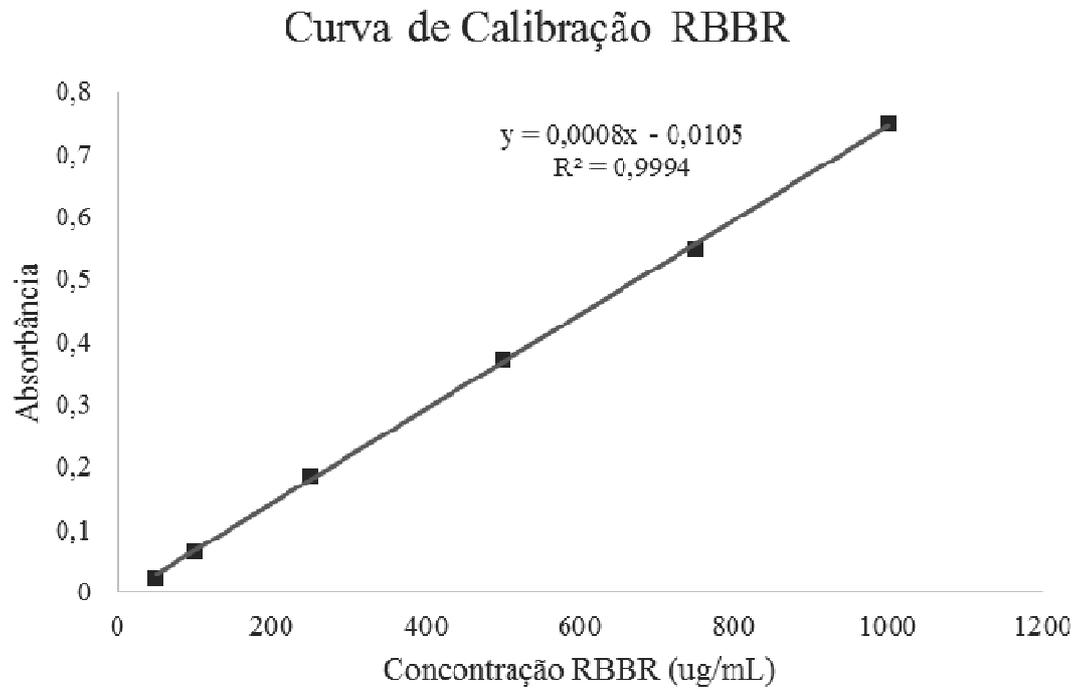


Gráfico da curva padrão do corante RBBR analisado em λ_{max} 580 nm e diferentes concentrações conhecidas.

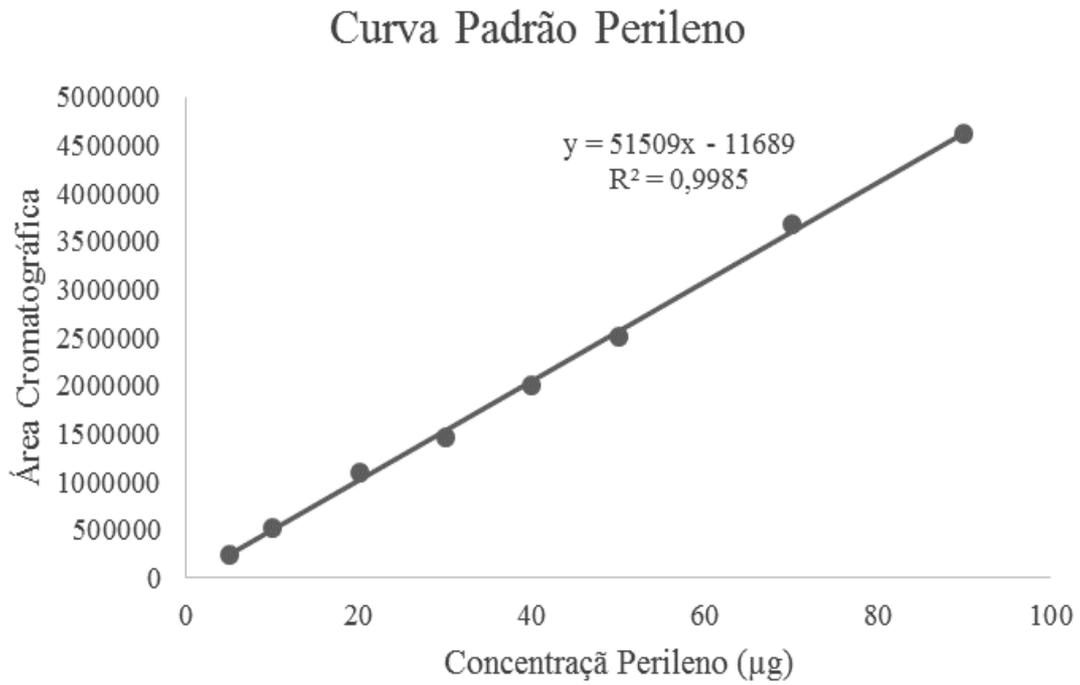
ANEXO III

Gráfico da curva padrão de Perileno deuterado analisado em CGMS para quantificação de Benzo(a)Pireno.

ANEXO IV



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Extrato da solicitação N° 52254 em PDF - Gerado em: 08/02/2016 as 20:02:14 horas

Dados básicos da Solicitação

N° da solicitação: 52254	Situação atual: Documento concedido	Data da situação atual: 08/02/2016
Tipo da solicitação: Comprovante de registro para coleta de material botânico, fungico e microbiológico		

Dados do pesquisador

Nome: VANDERLEI SABÓIA DOS SANTOS	Nacionalidade: Brasileira	CPF: 00592733211	E-mail: vanderleisaboia@hotmail.com	Identidade: 24574074 ssp AM
Endereço: AV. PADRE RAFAEL, N° 830				
Bairro: SÃO FRANCISCO	CEP: 69400-407	Município: MANACAPURU	UF: AM	Fone: (0xx92) 9937-4902 Fax:
Profissão: Outros		Nível escolar: Graduado		

Atividades da solicitação

Descrição das atividades/substrato	Tipo do item
Coleta/transporte de material botânico, fungico ou microbiológico	Atividades



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Táxon(s)

Táxon	Grupo taxonômico
Classe Basidiomycetes	Fungos
Filo Basidiomycota	Fungos

Histórico da Solicitação

Data/hora	Nome do funcionário	Unidade	Descrição da situação	Observação
08/02/2016 20:15			Documento concedido	
08/02/2016 20:15			Autorização/Licença liberada	
08/02/2016 19:51			Documento concedido	
08/02/2016 19:51			Autorização/Licença liberada	
08/02/2016 19:50			Documento concedido	
08/02/2016 19:50			Autorização/Licença liberada	
14/12/2015 12:22			Em elaboração	