

Glauciane Danusa Coelho

**Purificação parcial do sistema enzimático
produzido por *Psilocybe castanella* CCB444
durante crescimento em solo**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL
E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração
de Fungos e Plantas Avasculares.

ORIENTADORA: DRA. MARINA CAPELARI

COORIENTADORA: DRA. KÁTIA MARIA GOMES MACHADO

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	i
Lista de Figuras	iii
1. Introdução.....	3
2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1. Basidiomicetos e a degradação da lignina.....	4
2.2. Enzimas ligninolíticas.....	7
2.2.1. Peroxidases.....	8
2.2.1.1. Peroxidase da Lignina (LiP, EC 1.11.1.7).....	8
2.2.1.2. Manganês Peroxidase, a peroxidase dependente do manganês (MnP, EC 1.11.1.13).....	10
2.2.2. Fenoloxidasas.....	12
2.2.2.1. Lacases.....	12
2.3. Enzimas ligninolíticas e a degradação da lignina e compostos poluentes.....	16
2.4. Importância dos mediadores de baixa massa molecular para a degradação da lignina e de compostos xenobióticos.....	18
2.4.1. Ação das oxidases na geração de peróxido de hidrogênio	22
2.4.2. Formação de radicais hidroxilas.....	24
2.5. Pentaclorofenol (PCP).....	26
3. Objetivos.....	30
4. Artigo 1: Purificação e caracterização da lacase extracelular produzida por Psilocybe castanella CCB444 durante crescimento em solo.....	31
4.1. Introdução.....	32
4.2. Materiais e métodos.....	34
4.3. Resultados e discussão.....	39
4.4. Referências bibliográficas.....	51
4.5. Resumo.....	57
4.6. Abstract.....	58
5. Artigo 2: Transformação do pentaclorofenol pela lacase de Psilocybe castanella CCB444.....	59
5.1. Introdução.....	60
5.2. Material e método.....	62
5.3. Resultados e discussão.....	64
5.5. Referências bibliográficas.....	69
5.5. Resumo.....	76
5.6. Abstract.....	77
6. Considerações finais.....	78
7. Referências bibliográficas.....	79
6. Resumo geral.....	97
ANEXO 1.....	98
Resumo.....	98
Variável.....	98

<u>Subtraído de.....</u>	<u>98</u>
<u>Resumo.....</u>	<u>99</u>
<u>Variável.....</u>	<u>99</u>
<u>Subtraído de.....</u>	<u>99</u>
<u>Resumo.....</u>	<u>100</u>
<u>Variável.....</u>	<u>100</u>
<u>Subtraído de.....</u>	<u>100</u>

1. Introdução

Xenobióticos podem ser definidos como compostos orgânicos sintetizados industrialmente e que durante o processo de evolução não foram expostos aos microrganismos. Os microrganismos, por sua vez, não desenvolveram estratégias metabólicas para degradar tais compostos. Desse modo, compostos xenobióticos são estáveis sob condições aeróbias e anaeróbias acumulando-se e persistindo no ambiente (Leisinger 1983, Häggbloom 1992).

Os processos de degradação de xenobióticos utilizando tecnologias químicas e físicas são eficientes quando aplicados e operados corretamente, mas são muito dispendiosos quando feitos em grande escala (Haggblom & Valo 1995). De outro modo, a biorremediação de águas subterrâneas e de solos contaminados permite o tratamento de grandes volumes de efluentes e de solos, com transformação dos compostos orgânicos tóxicos em gás carbônico e água (ou gás metano e gás carbônico), com custos relativamente baixos (Freire *et al.* 2000, van der Gast *et al.* 2003, D'Annibale *et al.* 2006). Como os processos de biorremediação podem ser desenvolvidos em condições de pressão e de temperatura ambientes, além de não gerarem resíduos químicos, são altamente recomendados para a descontaminação ambiental (Shannon e Unterman 1993, Matheus & Machado 2002).

Fungos são interessantes para a aplicação em sistemas de biorremediação, pois são capazes de crescer sob condições de estresse ambiental, as quais geralmente limitam o crescimento bacteriano. Ainda, o crescimento dos fungos (induzido quimiosstaticamente em direção à fonte de carbono orgânico), por meio do alongamento e da ramificação das hifas, permite a colonização de grandes áreas, otimizando o contato do microrganismo com o contaminante, uma vez que aumenta sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, sua biodegradação (Dupont *et al.* 1997).

O fungo *Psilocybe castanella* utilizado neste trabalho é um basidiomiceto saprofítico da família Strophariaceae que ocorre em solo, e o isolado utilizado está depositado na Coleção de Cultura do Instituto de Botânica de São Paulo (CCB 444). Este isolado CCB444 foi obtido na cidade de São Vicente, na região da Baixada Santista, em local próximo à área em que ocorreu contaminação com resíduos industriais, contendo altas concentrações de organoclorados (Okino *et al.* 2000).

Este fungo despertou interesse para estudos de degradação de xenobióticos e aplicação em processo de biorremediação de solo, pois apresentou rápido crescimento, tolerância a altas concentrações de organoclorados e capacidade de mineralizar hexaclorobenzeno (HCB) e pentaclorofenol (PCP) em solo (Matheus *et al.* 2000, Machado *et al.* 2005). O isolado foi avaliado quanto a capacidade de degradar HCB em bioreatores contendo 400kg de solo contaminado (Matheus *et al.* 2003).

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Basidiomicetos e a degradação da lignina

A lignina é um biopolímero aromático heterogêneo que constitui de 20-30% da parede celular vegetal, sendo, portanto, o polímero natural mais abundante no planeta, depois da celulose. A lignina é também o polímero natural mais rico em anéis aromáticos, representando

cerca de 40% da energia solar estocada nos vegetais (Leonowicz *et al.* 1999). Este polímero confere rigidez à parede celular e aos tecidos das plantas vasculares, e está envolvida no transporte de água em plantas superiores, além de formar uma barreira contra o ataque microbiano, pois protege os polissacarídeos facilmente assimiláveis (Hofrichter 2002).

Do ponto de vista químico, a lignina é um polímero heterogêneo, opticamente inativo, constituído por três precursores de fenilpropanóides monoméricos: álcool sinapil (unidade siringil), álcool coniferil e álcool cumaril (unidades guaiacil), unidos entre si, e com os polissacarídeos da parede celular, por ligações covalentes (éter ou éster). A proporção entre os álcoois varia de acordo com a espécie vegetal, tecido e mesmo com a localização na parede celular (Kirk 1971). A estrutura dos precursores da lignina está apresentada na Figura 1.

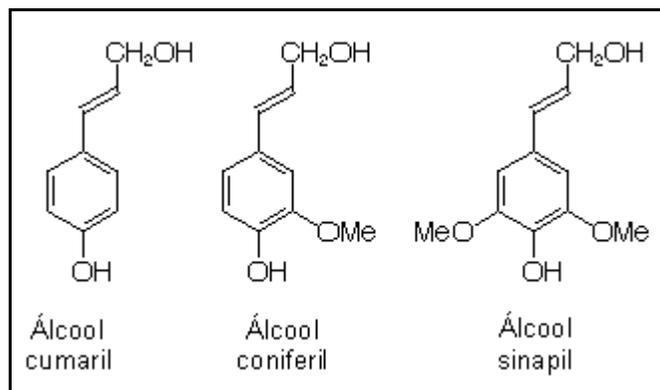


Figura 1. Álcoois precursores da lignina (Kirk 1971).

O processo de formação da lignina parece ter início com reações de oxidação de grupos fenólicos dos álcoois, catalisadas por peroxidases. Nestas reações, formam-se compostos radicais que, de maneira não enzimática, unem os álcoois uns aos outros. A polimerização prossegue resultando na produção de uma molécula extremamente complexa: um biopolímero tridimensional, amorfo, de alta massa molecular, altamente ramificado,

heterogêneo e de estrutura irregular (Kirk & Farrel 1987). Devido à heterogeneidade e às ligações presentes na molécula de lignina, esta não pode ser clivada por enzimas hidrolíticas, como acontece com a maioria dos polímeros naturais (celulose, amido e proteínas) (Hofrichter 2002).

A maioria dos fungos basidiomicetos utiliza-se de compostos da madeira para a nutrição. Entre os basidiomicetos degradadores de madeira são conhecidos dois grupos:

- 1) fungos causadores da podridão parda, que degradam principalmente celulose e hemicelulose;
- 2) fungos causadores da podridão branca, que apresentam sistemas enzimáticos capazes de utilizar fontes complexas de carbono, degradando celulose, hemicelulose e lignina.

Os fungos de podridão parda da madeira hidrolisam celulose e hemicelulose, deixando a lignina praticamente intacta. Mesmo sendo incapazes de despolimerizar a lignina, estes fungos podem promover pequenas modificações na molécula, interferindo na sua biodegradação (Duran & Esposito 1997).

Os fungos causadores da podridão branca da madeira, chamados lignocelulolíticos, são providos de um sistema enzimático capaz de transformar fontes complexas de carbono, como a lignina, em água e gás carbônico, o que os torna os organismos mais eficientes na degradação da lignina (Kirk & Farrel 1987, Hatakka 1994), sendo importantes no ciclo do carbono (Wesenberg *et al* 2003).

A degradação da lignina por basidiomicetos envolve enzimas extracelulares que, por abstração de elétrons do substrato, levam à formação de espécies radicais, as quais atuam na despolimerização da lignina e de uma série de compostos tóxicos e recalcitrantes (Fabbrini *et al.* 2002, Shah & Nerud 2002).

2.2. Enzimas ligninolíticas

As enzimas ligninolíticas fúngicas são excretadas e atuam na oxidação dos substratos em ambientes externos às células. Essas enzimas são produzidas durante o metabolismo secundário, visto que a oxidação da lignina, bem como de compostos poluentes, não fornece energia para o fungo (Hofrichter 2002).

Em alguns casos, tem-se verificado a expressão de enzimas ligninolíticas, peroxidases e fenoloxidasas, sob depleção de carbono ou nitrogênio (Kirk & Farrel 1987). Alguns fungos produzem tanto peroxidases quanto fenoloxidasas, enquanto outros produzem apenas uma classe enzimática, sendo que na maioria das espécies fúngicas, estas enzimas são expressas como isoenzimas (Rothschild *et al.* 2002, Wesenberg 2003). As características das principais enzimas do sistema ligninolítico estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características das enzimas peroxidase dependente do manganês (MnP), peroxidase da lignina (LiP) e Lacase provenientes de fungos causadores da podridão branca

Ec	MnP 1.11.1.13	LiP 1.11.1.14	Lacase 1.10.3.2
	Mn(II) H ₂ O ₂ oxidotases	diarilpropano O ₂ , H ₂ O ₂ oxidotases	p-benzenodiol, O ₂ - oxidotases
grupo prostético	heme	heme	-
Sítio ativo	-	-	cobre
massa molecular (KDa)	32-62,5	38-47	59-110
pH ótimo	2,6-4,5	3,2-4,7	2,6-4,5
PI	2,8-7,2	3,2-4,7	2,6-4,5
cliva ligações carbono-carbono	sim	sim	não
necessita de H ₂ O ₂	sim	sim	não
especificidade	restrita, Mn ⁺²	ampla, aromáticos fenólico e não fenólicos	ampla, compostos fenólicos
mediadores nativos	Mn ⁺² , Mn ⁺³	AV, 2Cl-1,4DMB	3-HAA
mediadores secundário e sintéticos	tióis, ácidos graxos insaturados	não há	ABTS, HBT, seringaldazina

Modificado de Wesenberg *et al.* 2003

AV: álcool veratrílico

2Cl-1,4DMB: 2-cloro1,4 dimetoxibenzeno

3-HAA: ácido 3-hidroxiantranílico

HBT: 1- hidroxibenzotriazol

ABTS: 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)

2.2.1. Peroxidases

Peroxidases são hemoproteínas que catalisam a oxidação da lignina e de compostos relacionados, na presença de peróxido de hidrogênio. As massas moleculares dessas enzimas variam entre 35 a 47 KDa e os pontos isoelétricos de 2,8 a 5,4. O ciclo catalítico das peroxidases inclui a enzima férrica nativa e os compostos reativos intermediários, compostos I e II. Entre as peroxidases produzidas por basidiomicetos ligninocelulolíticos destacam-se a peroxidase da lignina (LiP) e a peroxidase dependente do manganês (MnP) (Mester & Tien 2000). Recentemente, alguns autores têm admitido a existência de uma peroxidase versátil, que apresenta características híbridas entre a LiP e a MnP (Camarero 1996, Moreira *et al.* 2005).

2.2.1.1. Peroxidase da Lignina (LiP, EC 1.11.1.7),

A peroxidase da lignina (LiP) é uma glicoproteína que contém cerca de 20-30% de glicosilação e é dependente do peróxido de hidrogênio, contudo o excesso desta substância pode inativá-la. A inativação também pode ocorrer como consequência de forte agitação. Esta enzima apresenta ferroprotoporfirina IX (heme) como grupo prostético, consegue romper ligações C-C e C-O, polimerizar fenóis (Fiechter 1993, Duran & Esposito 1997) e é capaz de despolimerizar a lignina oxidativamente pelo mecanismo de transferência de um elétron (Gerini *et al.* 2003).

No ciclo catalítico da LiP (Figura 2), o ferro (III) é oxidado a ferro (IV), pelo peróxido de hidrogênio, formando o composto I que é capaz de oxidar a lignina e compostos

relacionados. Por meio da transferência de um elétron é formado o composto II e, em presença de um agente redutor a enzima volta à condição nativa, entretanto, o excesso de peróxido de hidrogênio torna o composto II inativo (Martinez 2002).

Inúmeros estudos têm demonstrado que o álcool veratrílico (3,4-dimetoxi-álcool), um metabólito secundário de fungos, age como redutor da LiP e a protege da inativação causada pelo peróxido de hidrogênio, pois impede que a enzima passe a um estado de oxidação superior, sendo inativada. Dessa forma, o álcool veratrílico parece ser o responsável pelo retorno da LiP a sua forma nativa (Gutiérrez 1995).

A LiP é um importante componente do sistema ligninolítico dos fungos, pois apresenta o maior potencial redox. Porém, nem todos os fungos ligninolíticos a secretam, pelo menos, em determinadas condições de cultivo (Raghukumar *et al.* 1999, Caramelo *et al.* 1999, D'Souza *et al.* 1999).

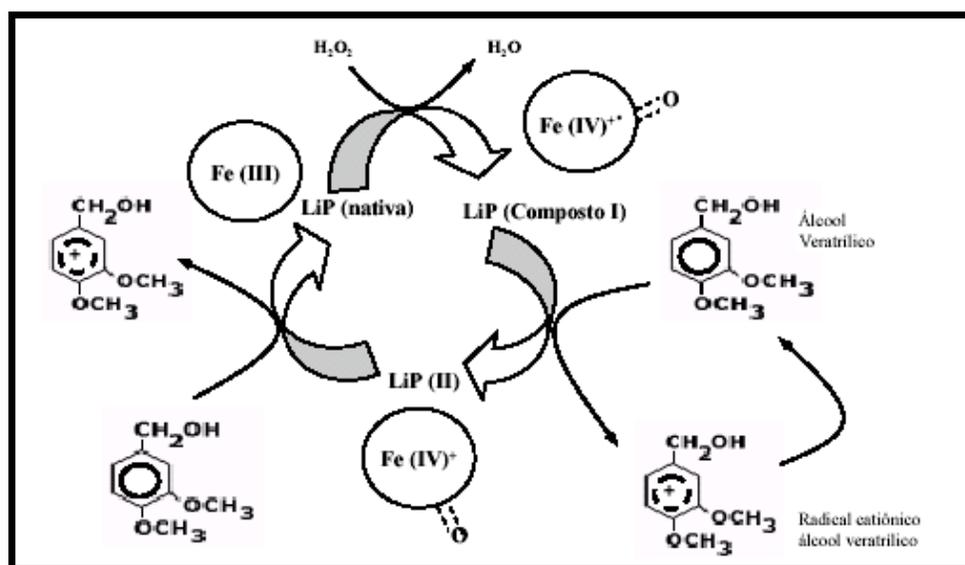


Figura 2. Ciclo catalítico da Peroxidase da lignina (LiP) (Moreira Neto 2006)

2.2.1.2. Manganês Peroxidase, a peroxidase dependente do manganês (MnP, EC 1.11.1.13)

A peroxidase dependente do manganês foi descrita pela primeira vez para *Phanerochaete chrysosporium* por Kuwahara e colaboradores (Kuwahara *et al.* 1984). Esta peroxidase contém o grupo prostético heme, necessita de peróxido de hidrogênio como co-substrato e catalisa a oxidação de Mn^{2+} a Mn^{3+} . O Mn^{3+} complexado com um ácido orgânico atua como agente primário na clivagem da lignina. Dessa forma, a MnP é considerada uma enzima chave na ligninólise por fungos da podridão branca (Hoshino *et al.* 2002). No entanto, há relatos de espécies fúngicas em que a MnP não é detectada mesmo sob condições de cultivo ligninolíticos (Saparrat *et al.* 2002).

O ciclo catalítico da MnP diferencia-se do de outras peroxidases, pois o íon Mn^{+2} é necessário para que o ciclo se complete. O ciclo catalítico da MnP é iniciado pela ligação do peróxido de hidrogênio ou de um peróxido orgânico à enzima férrica nativa formando o composto I. Um íon Mn^{+2} atua como doador de elétron para este composto, levando a formação do composto II, o qual abstrai um elétron de outro íon Mn^{+2} e retorna à forma nativa (Figura 3). Os íons Mn^{+3} gerados neste processo são estabilizados por ácidos orgânicos como o oxalato, malonato, tartarato ou lactato e agem como mediadores difusíveis de baixa massa molecular, os quais atacam moléculas orgânicas não específicas pela abstração de elétrons (Hofrichter 2002). A MnP age principalmente em compostos fenólicos, embora a oxidação de substratos não fenólicos tenha sido verificada durante o processo conhecido como peroxidação lipídica (Bao *et al.* 1994, Kapich *et al.* 1999).

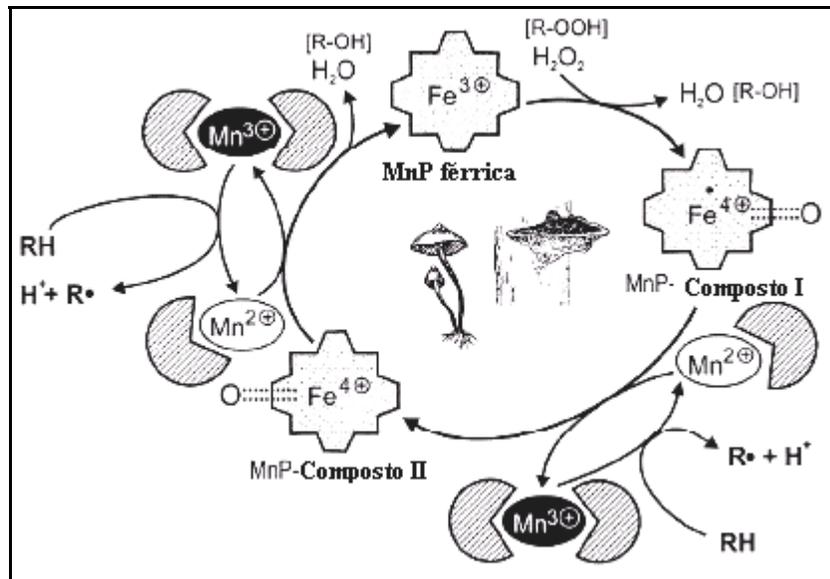


Figura 3. Ciclo catalítico Peroxidase dependente do manganês (MnP) (Hofrichter 2002).

MnP é uma enzima bastante difundida entre os fungos ligninolíticos, agindo conjuntamente com LiP (Hawari *et al.* 2000), com a lacase (Clemente *et al.* 2001, Schlosser e Höfer 2002) ou com a LIP e a lacase (Raghukumar *et al.* 1999) na biodegradação da lignina ou de compostos relacionados a ela. Dentre os fungos produtores de MnP pode-se citar *Phanerochaete chrysosporium* (Wariishi *et al.* 1989), *Phlebia radiata* (van Aken *et al.* 1999), *Ceriporopsis subvermispora* (Lobos *et al.* 1994), *Nematoloma frowardii* (Hofrichter *et al.* 1998), *Pleurotus eryngi*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* (Caramelo *et al.* 1999) e *Bjerkandera adusta* (Mester & Field 1998, Wang *et al.* 2001, Wang *et al.* 2003).

As MnPs de fungos causadores da podridão branca vêm sendo empregadas em estudos de biodegradação da lignina (Hilden *et al.* 2000), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Bogan & Lamar 1995, Wang *et al.* 2003), ácidos húmicos (Hofrichter *et al.* 1998), corantes sintéticos (Heinfling *et al.* 1998, Machado & Matheus 2006) e poluentes clorados (Haas *et al.* 2004). O notável potencial degradativo da MnP faz dela uma enzima atrativa para aplicações

biotecnológicas, como o branqueamento de polpa kraft e celulose e a remoção de resíduos poluentes (Hofrichter 2002).

2.2.2. Fenoloxidasas

As fenoloxidasas são oxidoredutases que catalisam a oxidação de compostos fenólicos. E estão divididas em duas subclasses, tirosinases e lacases, sendo que ambos os grupos reagem com o oxigênio e, diferente das peroxidases, não necessitam da adição de peróxido de hidrogênio (Saito *et al.* 2004). Além disso, essas enzimas catalisam a transformação de um grande número de compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos (Duran e Espósito 2000).

Fenoloxidasas apresentam baixo potencial redox, permitindo oxidação direta apenas das unidades fenólicas da lignina, que consistem em menos de 10% do total do polímero (Martinez *et al.* 2005). Durante muito tempo acreditou-se que a MnP e a LiP eram as duas únicas enzimas secretadas por fungos, que despolimerizavam a lignina, sendo a lacase considerada menos importante neste processo. No entanto, várias lacases fúngicas tem se mostrado úteis em processos de degradação da lignina, bem como de compostos poluentes (Ullah *et al.* 2000, Bollag *et al.* 2003, Rodríguez *et al.* 2004).

2.2.2.1. Lacases

A lacase foi descrita pela primeira vez por Yoshida em 1883, sendo portanto, uma das primeiras enzimas já descritas (Shleev *et al.* 2005). Segundo Galhaup *et al.* (2002) a primeira referência da ocorrência de lacases em fungos foi feita provavelmente em 1897.

Na natureza, as lacases apresentam um papel multifuncional, sendo amplamente difundidas entre plantas superiores, alguns insetos, bactérias e fungos e estão envolvidas em várias funções fisiológicas. Em tecidos lenhosos esta enzima está envolvida na síntese da lignina (Hattaka 1994). Alguns autores acreditam que lacases sejam responsáveis pela

pigmentação em *Aspergillus nidulans* e *A. fumigatus*, bem como pela morfogênese do fungo comestível *Lentinula edodes* (Mayer & Staples 2002). No patógeno humano *Cryptococcus neoformans*, a lacase fortemente ligada à parede celular pode contribuir para a resistência a fungicidas (Zhu *et al.* 2001). Em fungos basidiomicetos, as lacases fazem parte do mecanismo enzimático que possibilita a degradação da lignina e de compostos relacionados a ela (Li *et al.* 1999).

Lacases são enzimas capazes de catalisar a oxidação de vários compostos aromáticos, principalmente fenóis, com a concomitante redução do oxigênio à água (Duran e Esposito 1997, Duran *et al.* 2002, Pozdnyakova *et al.* 2006), são glicoproteínas constituídas de carboidratos como hexosamina, glicose, manose, galactose, fucose e arabinose, e possuem cobre no sítio ativo, em geral quatro átomos por molécula, mas este número pode variar de dois a quatro (Yaropolov *et al.* 1994). As lacases podem ser encontradas intra, extracelularmente (Dekker & Barbosa 2001, Saparrat *et al.* 2002) ou associadas à parede celular (Zhu *et al.* 2001).

Comumente, as lacases fúngicas extracelulares apresentam de 10 a 25% de glicosilação, entretanto já foram detectados níveis de glicosilação de 32% e 44% para lacases de *Corioloropsis fulvocinnerea* (Shleev *et al.* 2004) e *Pleurotus pulmonarius* (De Souza & Peralta 2003), respectivamente. Todavia, baixo conteúdo de glicosilação foi verificado para lacase I e lacase II de *Pleurotus eryngii*, 7% e 1%, respectivamente (Munoz *et al.* 1997). A glicosilação das lacases é importante para que estas sejam protegidas contra a ação proteolítica (Baldrian 2006).

Os íons de cobre das lacases são distribuídos entre diferentes sítios de ligação, sendo classificados em três tipos: Cobre tipo 1, 2 e 3 (T1, T2 e T3, respectivamente), que se diferenciam pelas propriedades características. As propriedades de cada um dos sítios de cobre conferem a eles um importante papel no mecanismo catalítico da enzima (Duran & Esposito

2000). O sítio de cobre T1 fornece a cor azul à proteína e contém um único íon de cobre, o qual apresenta forte absorção à 600 nm. Os sítios de cobre T1 e T2 estão envolvidos na captura e/ou transferência de elétrons. Os sítios T2 e T3 formam um aglomerado trinuclear que é responsável pela ligação e redução do oxigênio (Shah & Nerud 2002).

No ciclo catalítico das lacases verifica-se que os substratos fenólicos são oxidados pelo sítio de cobre T1 e os elétrons extraídos são transferidos por meio de uma seqüência fortemente conservada do tripeptídio His-Cys-His, aos sítios T2 e T3, onde o oxigênio molecular é reduzido à água conforme apresentado na Figura 4 (Baldrian 2006).

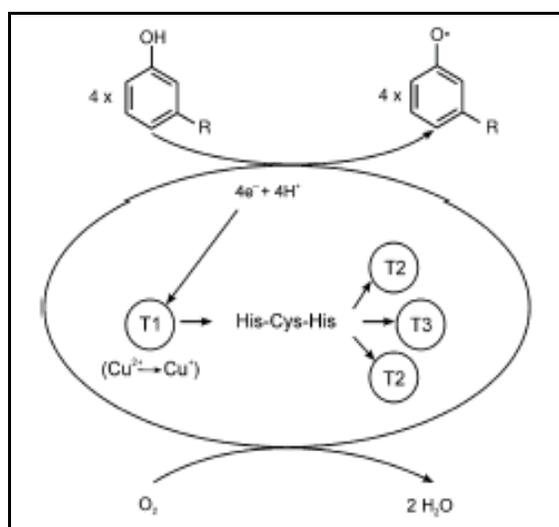


Figura 4. Ciclo catalítico da lacase (Baldrian 2006)

As lacases não conseguem oxidar estruturas não fenólicas da lignina por causa do seu baixo potencial redox (Kersten *et al.* 1985). Contudo, uma lacase de *Trametes versicolor* foi capaz de oxidar álcool veratrílico e dímeros não fenólicos de lignina na presença de 2,2-azinobis-(3-ethyl benzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS), substância que atuou como mediador redox da lacase. Depois da oxidação do ABTS a radicais catiônicos, o mediador pode oxidar substâncias com alto potencial redox como os compostos não fenólicos da lignina, os quais

representam cerca de 90% da matriz da lignina e não são atacados pela lacase na ausência de mediadores (Bourbonnais & Paice 1990). O interesse para aplicação biotecnológica das lacases aumentou a partir da descoberta da sua habilidade de oxidar substratos de alto potencial redox na presença de mediadores, uma vez que o uso de mediadores permite a oxidação de uma variedade de compostos poluentes (Martinez *et al.* 2005).

Dessa forma, encontra-se na literatura trabalhos de seleção de fungos com altos níveis de produção de lacase, trabalhos sobre a estrutura molecular (Ducros *et al.* 2001, Piontek *et al.* 2002), bem como de purificação e caracterização dessas enzimas (Duran *et al.* 2002, Baldrian 2006). Tem sido observada uma grande variação nos mecanismos de indução desta enzima, no grau de polimorfismo e nas propriedades cinéticas e físico-químicas, tais como massa molecular, ponto isoelétrico e conteúdo de carboidratos (Duran *et al.* 2002, Baldrian 2006).

Cerca de uma centena de lacases de fungos causadores da podridão branca purificadas foram analisadas por Baldrian (2006). Entre as lacases analisadas por este autor verifica-se que o pH ótimo de reação, tendo ABTS como substrato, está na faixa ácida (abaixo de 4), enquanto que para substratos como o DMP (2,6 dimetoxifenol), guaicol e seringaldazina as lacases exibem valores mais altos, entre 4 e 7. A temperatura ótima de reação dessas enzimas está na faixa de 50 °C a 70 °C, sendo que em poucos casos as lacases apresentaram temperatura ótima abaixo de 45°C.

A presença de isoformas de lacase é bem comum entre basidiomicetos. Isoformas de lacases de mesma origem podem apresentar diferentes propriedades bioquímicas, apesar das estruturas primárias destas proteínas serem muito similares, como no caso de *Trametes hirsutus*. No entanto, existem casos em que as propriedades bioquímicas das lacases são similares enquanto as estruturas primárias mostram-se diferentes, mesmo sendo elas provenientes do mesmo organismo (Shin & Lee 2000). Na verdade, ainda não é claro se

basidiomicetos possuem vários genes que codificam lacase, ou se a diversidade de isoenzimas deve-se a modificações postranscricionais e/ou a proteólise, que pode acontecer durante processos de cultivo e purificação (Shleev *et al.* 2005). Segundo Baldrian (2006), a ocorrência de isoenzimas pode estar relacionada à condição dicariótica desses organismos, responsável pela variabilidade alélica, e que proporcionou adaptações de fungos com necessidades especiais.

As lacases apresentam grande número de aplicações biotecnológicas, incluindo processamento de vinho e sucos, delignificação e biobranqueamento de polpa kraft, descoloração de corantes têxteis, tratamento de resíduos líquidos, aumento da digestibilidade de materiais lignocelulósicos e também biorremediação de solos (Couto e Herrera 2006). Nos últimos anos, trabalhos sobre lacases têm sido publicados devido ao envolvimento dessas enzimas em processos de bioremediação e pelo potencial destas para o desenvolvimento de biosensores (Gomes & Rebelo 2003, Shleev *et al.* 2005) e de cátodos de hidrogênio em células de combustível (Shleev *et al.* 2005).

2.3. Enzimas ligninolíticas e a degradação da lignina e compostos poluentes

Segundo Barr & Aust (1994) a natureza inespecífica do sistema enzimático dos fungos causadores da podridão branca permite que esses organismos degradem a lignina, bem como uma grande variedade de compostos químicos estruturalmente diferentes, até sua mineralização, sendo que o nível de degradação intensifica-se a partir do contato dos fungos com os poluentes. No entanto, este contato geralmente não ocorre originalmente em ambientes contaminados, já que estes fungos estão presentes principalmente em madeira e, com menor frequência, no solo e na água. A inespecificidade dos mecanismos de degradação por basidiomicetos pode oferecer as seguintes vantagens para os processos de biorremediação (Matheus & Machado 2002):

- 1) como o sistema enzimático responsável pela degradação é extracelular, pode atuar em substratos insolúveis ou complexados ao solo;
- 2) a inespecificidade do complexo enzimático permite a sua utilização para uma ampla variedade de poluentes orgânicos e para misturas deles;
- 3) o sistema enzimático não precisa ser induzido pela presença da lignina ou do composto poluente;
- 4) materiais lignocelulósicos podem ser usados como fonte de carbono, o que confere uma vantagem econômica ao uso desse grupo de fungos;

As enzimas ligninolíticas fúngicas são excretadas e atuam na oxidação dos substratos em ambiente externo às células, dessa forma são capazes de degradar uma mistura de vários poluentes (Matheus *et al.* 2000, Machado *et al.* 2005). Segundo Mester & Tien (2000) esta é a característica mais vantajosa do uso de fungos da podridão branca em processos de biorremediação, uma vez que misturas de diferentes poluentes são encontradas na maior parte dos sítios contaminados.

Uma das primeiras indicações da capacidade dos basidiomicetos ligninolíticos de degradar compostos orgânicos poluentes, tóxicos e recalcitrantes foi fornecida por Lyr em 1962, que descreveu a resistência de *Trametes versicolor* ao pentaclorofenol e a degradação deste pesticida por meio de reações de desalogenação inespecíficas em presença de oxidases produzidas por esse fungo. No entanto, a correlação do processo de degradação de xenobióticos com o metabolismo ligninolítico foi feita apenas na década de 80 a partir da observação da capacidade do *Phanerochaete chrysosporium* de degradar inúmeros compostos orgânicos poluentes, em alguns casos com significativas taxas de mineralização (Matheus & Okino 1998, Zouari *et al.* 2002).

As enzimas ligninolíticas são úteis para o tratamento de numerosos poluentes xenobióticos, sendo que os mecanismos da via oxidativa são discutidos por vários autores (Filip & Claus 1995, Durán & Espósito 2000, Hofrichter 2002, Moldes *et al.* 2004). Ainda, fenoloxidasas do tipo lacase são capazes de degradar clorofenóis, PAHs, compostos organofosforados, compostos modelo fenólicos e não fenólicos da lignina, bem como os corantes aromáticos (Wesenberg *et al.* 2003). Alguns trabalhos têm relacionado à ação das enzimas ligninolíticas com a transformação *in vitro* de poluentes não poliméricos recalcitrantes, como nitrotoluenos (van Acken *et al.* 1999), PAHs (Hammel *et al.* 1991, Johannes *et al.* 1996), corantes sintéticos e orgânicos (Ollikka *et al.* 1993; Heinfling *et al.* 1998) e PCP (Lin *et al.* 1990, Ullah *et al.* 2000, Novotny *et al.* 2004).

2.4. Importância dos mediadores de baixa massa molecular para a degradação da lignina e de compostos xenobióticos

Apesar de existirem muitas pesquisas sobre a fisiologia das enzimas ligninolíticas, o mecanismo de degradação da lignina, tal como da oxidação de compostos poluentes, não está completamente entendido. A dificuldade de compreensão da degradação desses compostos relaciona-se à complexidade do processo de biodegradação, que além das enzimas ligninolíticas pode ser afetado por outros sistemas enzimáticos e também por fatores não enzimáticos, entre os quais pode-se citar os cofatores de baixas massas moleculares que servem como mediadores de óxido-redução – mediadores redox (Mester & Tien 2000), os níveis de H₂O₂ e os radicais hidroxilas produzidos pelos fungos (Hammel *et al.* 2002, Shah & Nerud 2002). Na Figura 5 estão apresentados de forma esquemática os fatores envolvidos na degradação da lignina por fungos basidiomicetos.

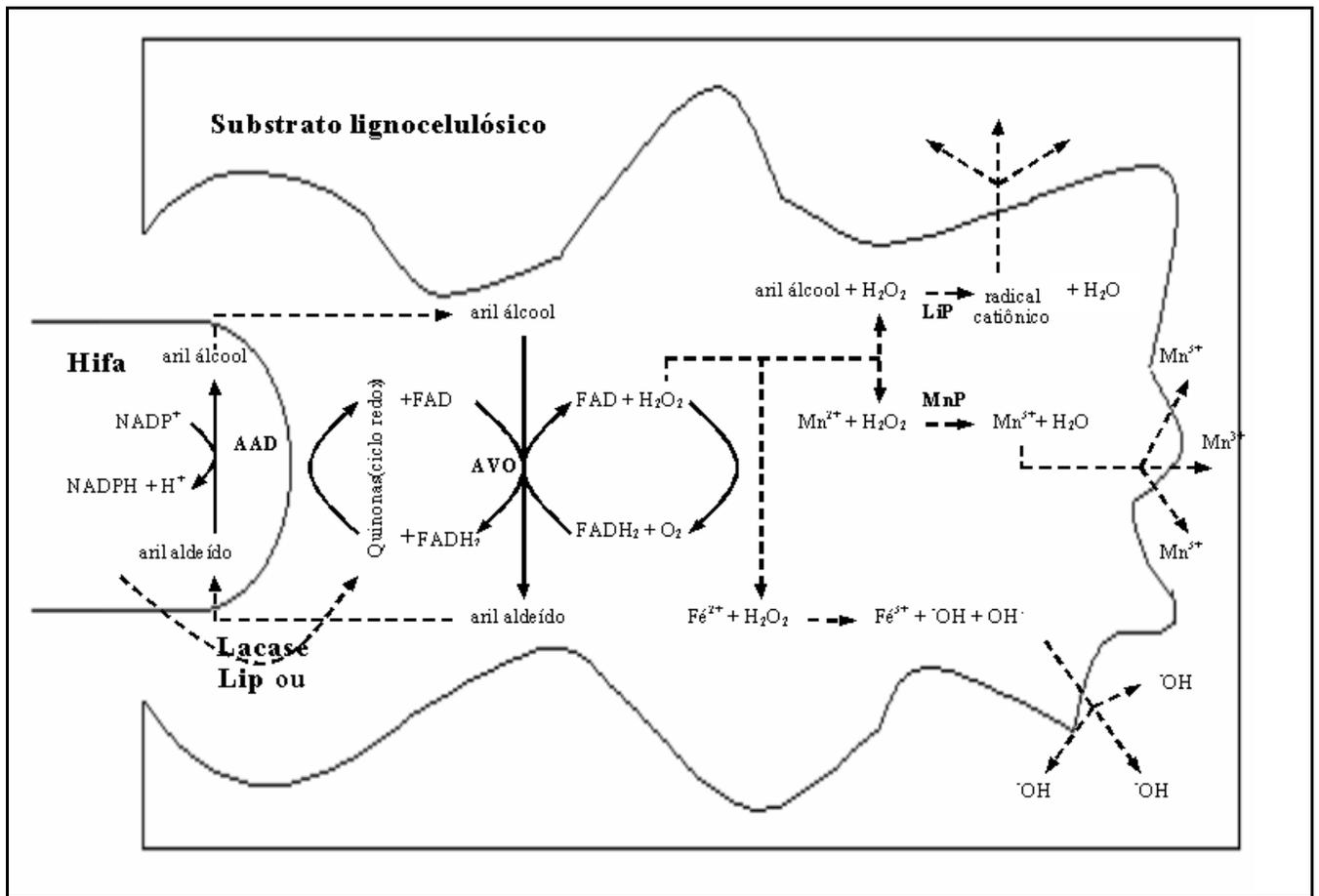


Figura 5. Modelo de transformação de substratos lignocelulósicos envolvendo as enzimas ligninolíticas, fatores de mediação e radicais reativos (modificado de Leonowicz *et al* 1999).

Os mediadores redox são produzidos como resultado do metabolismo secundário dos basidiomicetos e iniciam o processo de degradação da lignina, atuando como mensageiros das enzimas. O mediador é oxidado pela enzima e se difunde no substrato oxidando-o. Em seguida, o mediador retorna à sua condição inicial. O mediador oxidado conta com um

mecanismo de oxidação não disponível para a enzima (Fabbrini *et al.* 2002), visto que esta é tão grande que não consegue penetrar na madeira (Jung *et al.* 2002). Assim, as células fúngicas produzem mediadores que são excretados para o meio extracelular antes das enzimas e que, conseqüentemente, participam da oxidação da lignina. Na Figura 6 está apresentado um esquema da atuação de mediadores na atividade de lacase.

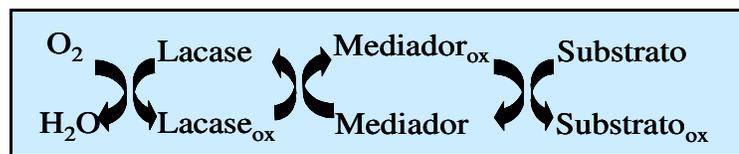


Figura 6. Papel do mediador na atividade de lacase (Fabbrini *et al.* 2002).

Entre os mediadores naturais pode-se citar o álcool veratrílico, oxalato, malonato, fumarato, ácido 3-hidroxi antranílico (3-HAA) (Leonowicz *et al.* 1999) e 2-cloro-1,4-dimetoxibenzeno (2Cl-1,4DMB) (Wesenberg 2003). Além dos mediadores naturais, é possível notar na literatura a importância de mediadores sintéticos, dentre os quais se destacam o 2,2'-azino bis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 1-hydroxybenzotriazole (HBT) e ácido violúrico (Wesenberg 2003).

Ácidos orgânicos excretados por vários fungos quelam e estabilizam o Mn⁺³. A MnP é capaz de, simultaneamente, decompor ácidos orgânicos como o malonato, e oxidar Mn⁺² a Mn⁺³ na ausência de peróxido de hidrogênio. Ácidos orgânicos são conhecidos por originar radicais de carbono (radicais de ácido acético), radicais peroxil e superóxido. Como esses radicais podem ser fontes de peróxidos, podem ser usados pela MnP como substrato em substituição ao peróxido de hidrogênio. Conseqüentemente, mesmo na ausência de oxidases produtoras de peróxido, fungos produtores de MnP podem ser eficientes na degradação de

lignina (Hofrichter *et al.* 1999) e, por extensão, na degradação de xenobióticos (Wesenberg *et al.* 2003).

O álcool veratrílico (VA, álcool benzil 3,4-dimetoxi) é um metabólito secundário produzido por vários fungos causadores da podridão branca da madeira. Depois da oxidação do VA ao radical catiônico VA⁺ pela LiP, este atua como um mediador para a degradação da lignina. Supõe-se que devido ao curto tempo de vida do VA⁺, não seja possível que ele atue a longas distâncias. As propriedades do VA⁺ podem ser otimizadas se ele estiver complexado à LiP. O VA protege a LiP contra os efeitos do peróxido de hidrogênio, e dessa forma favorece a ação desta enzima (Gutiérrez 1995).

A lacase em conjunto com mediadores torna-se capaz de degradar também estruturas não fenólicas da lignina (Bourbonnais *et al.* 1996, Call & Mucke 1997). Vários metabólitos fúngicos com função de mediadores da lacase foram isolados, entre eles pode-se citar o ácido 3-hidroxiantranílico que foi o primeiro mediador descrito para a lacase (Eggert *et al.* 1996). Entre os mediadores sintéticos destaca-se o ABTS 2,2'-azino-bis (3-ethylbenziazoline-6-sulphonate), descrito como um bom mediador redox, que favorece o ataque a compostos não fenólicos da lignina. Em adição a esses mediadores, o corante azul brilhante de remazol R (RBBR) também auxilia em reações de deslignificação por lacase (Bourbonnais *et al.* 1996). Na tabela 2 estão apresentados alguns mediadores naturais e sintéticos conhecidos.

Além dos mediadores, outros compostos de baixa massa molecular, como as espécies reativas de oxigênio atuam como agentes iniciadores da despolimerização da lignina e de poluentes orgânicos. A formação de tais moléculas envolve diferentes reações enzimáticas e não enzimáticas (Shah & Nerud 2002).

Tabela 2. Alguns mediadores sintéticos e naturais necessários para a atividade de enzimas do complexo ligninolítico.

MEDIADOR	ORGANISMO (ENZIMA)
Mediadores naturais	
Mn ³⁺	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (MnP)
Ácidos orgânicos (malonato, oxalato, etc)	<i>Armillaria mellea, Fomes annosus, Pleurotus ostreatus, Phanerochaete chrysosporium, Phlebia radiata, Cenporiopsis subvermispota, Namatoloma frowwardii</i> (LiP e MnP)
Álcool veratrílico	<i>P. chrysosporium</i> (LiP)
Ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA)	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> (lacase)
2-cloro-1,4-dimetoxibenzeno (2Cl-1,4DMB)	<i>Trametes versicolor</i> (LiP)
Mediadores sintéticos	
1-hidroxibenzotriazol (HBT)	<i>Trametes versicolor, T. vilosa, Pycnoporus cinnabarinus, Botrytis cinérea, Myceliophthora thermophila, Coriolopsis gallica, Pleurotus ostreatus</i> (lacase)
Ácido violúrico	<i>Trametes vilosa, P. cinnabarinus, Botrytis cinérea, Myceliophthora thermophila</i> (lacase)
2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS)	<i>Trametes versicolor, Coriolopsis gallica, Pleurotus ostreatus</i> (lacase)

(Wesenberg *et al.* 2003)

2.4.1. Ação das oxidases na geração de peróxido de hidrogênio

Para a geração de radicais de oxigênio, bem como para a atividade de peroxidases é necessária a presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) extracelular. A aril álcool oxidase (AAO) e a glioxal oxidase (Gox) são as principais enzimas responsáveis pela produção de H₂O₂ extracelularmente (Guillen *et al.* 1994; Shah & Nerud 2002). As vias enzimáticas de formação de H₂O₂ estão apresentadas na Figura 7.

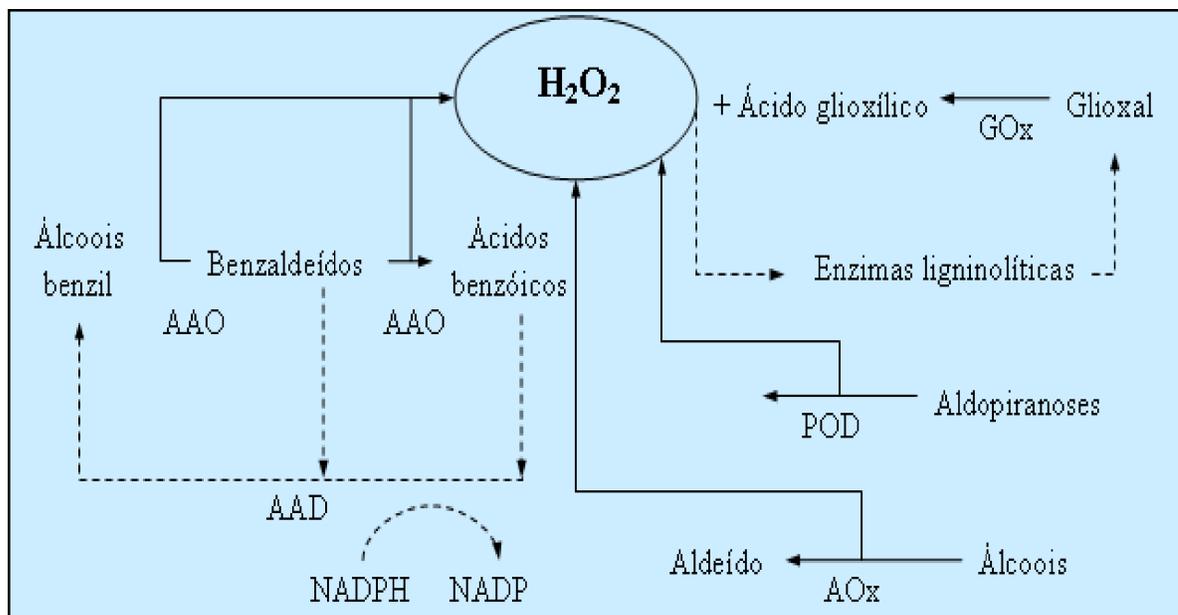


Figura 7. Diferentes vias na formação de peróxido de hidrogênio por fungos da podridão branca (Shah & Nerud 2002).

AAO: aril álcool oxidase
 AAD: aril álcool desidrogenase
 AOx: álcool oxidase
 Gox: glicoxal oxidase
 POD: piranosose oxidase

A geração de H_2O_2 pela AAO envolve um ciclo catalítico em que o álcool benzil é oxidado a benzaldeído e este em ácido benzóico sendo que, durante a reação, o H_2O_2 é produzido. A enzima aril álcool desidrogenase (AAD) reduz benzaldeídos e ácidos benzóicos a álcoois benzil (Guillen *et al* 1994; Shah & Nerud 2002). A AAO pode oxidar principalmente álcoois aromáticos como o álcool benzil, álcool 4-metoxibenzil e álcool coniferil (Shah & Nerud 2002).

A Gox é uma metaloenzima produzida por fungos degradadores de madeira e parece ser essencial para a degradação da lignina. Esta enzima apresenta um radical livre ligado ao sítio ativo de cobre, e pode utilizar aldeídos simples, α -hidroxicarbonil, ou compostos α -dicarbonil como substratos (Kersten & Kirk 1987), produzindo H_2O_2 (Shah & Nerud 2002).

Esta atividade enzimática é expressa durante metabolismo secundário do fungo, quando as ligninases também são produzidas (Shah & Nerud 2002).

Outras enzimas envolvidas na produção de H_2O_2 são a piranose oxidase (Pod) e álcool oxidase (AOx). A Pod atua na geração de H_2O_2 pela catálise da oxidação do carbono 2 de aldopiranoses, como D-glicose, D-xilose, D-manose e D-galactose (Shah & Nerud, 2002). Já a AOx atua sobre grupos metoxil da lignina convertendo-os a metanol e este a aldeídos, com produção de H_2O_2 (Shah & Nerud 2002).

2.4.2. Formação de radicais hidroxilas

Os radicais de oxigênio hidroxila ($OH\bullet$) e superóxido ($O_2\bullet^-$) são produzidos por fungos da podridão branca. Entre esses radicais destaca-se o radical hidroxila, que ataca rapidamente as subunidades da lignina pela abstração de átomos de hidrogênio das estruturas alifáticas ou pela adição destes à anéis aromáticos. O radical hidroxila pode ser gerado por diversos mecanismos, seja pela ação da enzima extracelular celobiose desidrogenase e pelo ciclo de oxi-redução de quinonas, bem como podem ser gerados pela reação de Fenton (Hammel *et al.* 2002, Shah & Nerud 2002). Saparrat *et al.* (2002) descrevem ainda, que em *Corioloropsis rigida* a produção do radical hidroxila é decorrente da ação da lacase produzida por este fungo. Na Figura 8 estão apresentadas, de forma resumida, várias reações realizadas por fungos da podridão branca para a produção de radicais hidroxilas.

No ciclo redox de quinonas, o radical hidroxila é produzido em reação contendo lacase de *Pleurotus eryngii*, hidroquinonas derivadas da lignina e íons férricos quelados (Shah & Nerud 2002). Nesse sistema, hidroquinonas são inicialmente convertidas a semiquinonas pela lacase e, subseqüentemente, a autooxidação das semiquinonas leva à ativação do oxigênio, produzindo radicais aniônicos superóxidos, os quais reduzem os íons ferrosos a férricos e também oxigênio ao radical superóxido (Shah & Nerud 2002).

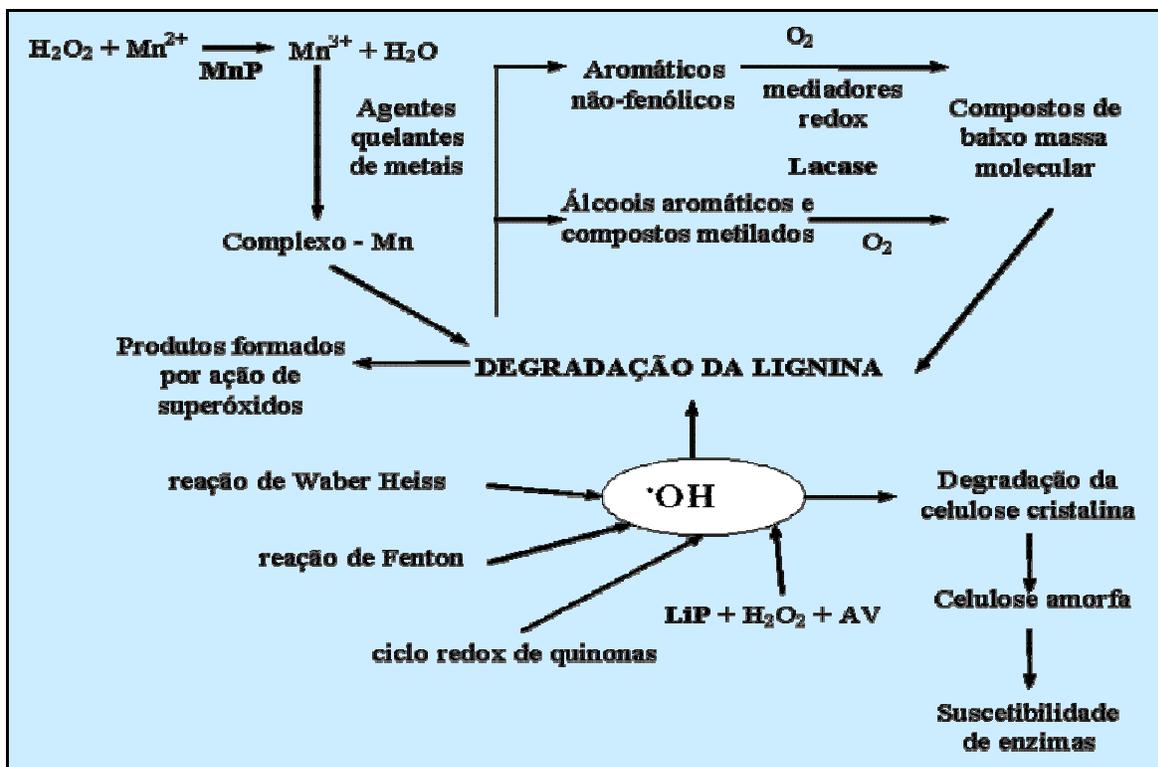


Figura 8. Geração de radicais hidroxilas e os agentes envolvidos na degradação da lignina (Shan & Nerud 2002)

O radical superóxido não reage com a lignina e nem participa na oxidação das enzimas que atuam na degradação da lignina. Entretanto, algumas reações relevantes envolvidas na degradação da lignina podem ser causadas por esse radical, o qual pode atuar como agente redutor ou oxidante. O radical superóxido produz Mn^{+3} a partir de Mn^{+2} e também pode participar em outras reações, como a reação de Fenton e Waber Heiss (nessa reação o radical superóxido reage com o peróxido de hidrogênio), gerando radicais hidroxilas. O radical superóxido pode ainda reagir com compostos radicais, produzidos pelas enzimas ligninolíticas, resultando na abertura de anéis aromáticos ou em processos de desmetoxilação (Haemmerli *et al.* 1987, Shan & Nerud 2002).

2.5. Pentaclorofenol (PCP)

O pentaclorofenol (PCP) foi sintetizado pela primeira vez em 1872 e foi usado desde, a década de 1930, como preservativo de madeira juntamente com o seu sal o pentaclorofenato de sódio, devido ao amplo espectro e ao baixo custo (Machado *et al.* 2005). O PCP foi amplamente usado como preservativo de madeira e pesticida, mas hoje está banido de muitos países (Hägglom & Valo, 1995) como Áustria, Índia, Indonésia, Nova Zelândia, Suécia e Suíça (Morales & Pazos 1998) devido ao seu potencial carcinogênico (Tayal *et al.* 1999).

O emprego do PCP como preservativo de madeira foi responsável por boa parte da produção deste composto (Hägglom & Valo 1995, Pointing 2001). Esse organoclorado, juntamente com o 2,4,6 triclorofenol, foi listado como um dos principais poluentes pelas Agências de Proteção Ambiental dos Estados Unidos e da União Européia (Ullah *et al.* 2000, Meunier 2002).

O uso inadequado, os derramamentos acidentais e a disposição inadequada dos resíduos de PCP têm causado a contaminação de inúmeros substratos. Os resíduos de PCP não encontram barreiras no ambiente, são arrastados para o mar pelas águas das chuvas, aderem ao solo e penetram diretamente nos corpos d'água, sendo assim disseminados por todos os ambientes. No solo, os resíduos de PCP aderem fortemente às partículas de solo e isto favorece sua migração para solos neutros e alcalinos (USEPA, 1988).

No Brasil, a portaria nº 329, de 02 de setembro de 1985 (Ministério da Agricultura), proibiu a comercialização, o uso e a distribuição do PCP como produto agrotóxico, juntamente com outros organoclorados destinados à agropecuária tais como: Aldrin, BHC, Canfeno Clorado (Toxafeno), DDT, Dodecacloro, Endrin, Heptacloro, Lindane, Endosulfan, Metoxicloro, Nomacloro, Dicofol e Clorobenzilato. Somente em agosto de 2006, por meio da resolução - RDC nº 164 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Ministério da Saúde)

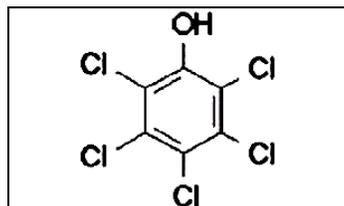
foram proibidos todos os usos do PCP e de seus sais no Brasil, ficando proibida a sua comercialização a partir de 30 de março de 2007, para qualquer finalidade, inclusive o tratamento da madeira.

O PCP é um pesticida clorofenólico, constituído de benzeno com cinco átomos de cloro substituídos, e apresenta caráter ácido. A estabilidade do anel aromático e o alto conteúdo de átomos de cloro dessa molécula a torna de difícil degradação (Montiel *et al.* 2004). Encontrado na forma de pó, e conhecido popularmente como pó da China, o PCP é uma substância volátil que se decompõe em presença de luz, é solúvel em álcoois e praticamente insolúvel em água, enquanto o sal pentaclorofenato de sódio (NaPCP) é muito solúvel em água (Morales & Pazos 1998) o que o torna um biocida versátil. No Quadro 1 estão apresentadas as principais características deste poluente.

O PCP atua como inibidor da fosforilação oxidativa, processo básico da respiração celular. Dessa forma, é tóxico a todas as formas de vida. A alta toxicidade do PCP associada à alta estabilidade molecular desfavorece os processos de biodegradação, tornando o PCP persistente, o que justifica sua meia vida superior a 178 dias no solo e de 200 dias em sistema aquosos (Law *et al.* 2003).

QUADRO 1. Características do pentaclorofenol

Estrutura química



Sinonímia	PCP, clorofenol, penta, 2,3,4,5,6, pentacloro
Fórmula bruta	C ₆ Cl ₅ HO
Grupo químico	organoclorado
Massa molecular (g mol ⁻¹)	266,5
Número de registro CAS	87-86-5
Ponto de fusão (°C)	187 a 191
Ponto de Ebulição (°C)	309 a 310
Pressão de vapor (atm)	0,00017 a 20°C e 0,14 a 100°C
Densidade (g/ml)	1,978 A 15 °C (SÓLIDO)
Persistência	elevada
Solubilidade em	metanol, etanol, benzeno e etileno glicol

Adaptado de Morales & Pazos 1998

A habilidade de basidiomicetos de degradar PCP e produtos relacionados deve-se a inespecificidade do sistema enzimático desses organismos que envolve peroxidases (LiP, MnP) (Tien & Kirk 1984, Okeke *et al.* 1997, Reddy e Gold 2000, Zouari *et al.* 2002) além da peroxidase versátil (Abou-Arab 2002, Rodriguez *et al.* 2004) e fenoloxidasas como lacases e tirosinases (Ullah *et al.* 2000, Montiel *et al.* 2004, Rodriguez *et al.* 2004).

As primeiras pesquisas sobre a degradação de poluentes por fungos basidiomicetos foram feitas na década de 1980 com linhagens de *Phanerochaete chrysosporium*. Desde então, vários autores evidenciaram a capacidade desse organismo degradar além da lignina, um amplo espectro de poluentes como DDT [1,1-bis(4clorofenol)-2,2,2-tricloetano], lindane (γ -

hexaclorociclohexano), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) e dioxinas (Bumpus *et al.* 1985, Cameron *et al.* 2000, Rodríguez 2004) e outros poluentes orgânicos clorados (Zouari *et al.* 2002).

O PCP é um composto organoclorado bastante estudado quanto a biodegradação por basidiomicetos (Mileski *et al.* 1988, Lamar & Dietrich 1992, Lamar *et al.* 1994, Shim e Kawamoto 2002, Law *et al.* 2003, Walter *et al.* 2004, Machado *et al.* 2005, Tortella *et al.* 2005, Walter *et al.* 2005, Marcial *et al.* 2006). A capacidade de fungos causadores da podridão branca na madeira de degradar poluentes tem sido demonstrada e alguns trabalhos têm relacionado esta capacidade à ação de enzimas ligninolíticas, com a transformação *in vitro* de poluentes não poliméricos e recalcitrantes como nitrotoluenos (van Acken *et al.*, 1999), PAHs (Hammel *et al.* 1991), corantes sintéticos (Ollikka *et al.* 1993, Heinfling *et al.* 1998) e PCF (Lin *et al.* 1990, Ullah *et al.* 2000, Novotny *et al.* 2004).

3. Objetivos

Objetivos gerais:

- Identificar o complexo enzimático produzido por *Psilocybe castanella* CCB444 durante crescimento em solo e avaliar a capacidade do principal componente enzimático de degradar pentaclorofenol *in vitro*.

Objetivos específicos:

- purificar parcialmente o principal componente enzimático presente no complexo produzido durante crescimento do fungo em solo;
- caracterizar o componente enzimático purificado quanto:
 - ao pH e à temperatura ótima;
 - à estabilidade a diferentes valores de pH e temperatura;
 - aos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max});
 - à massa molecular.
- avaliar a capacidade do componente enzimático purificado quanto à capacidade de degradar o pentaclorofenol *in vitro* em:
 - diferentes concentrações do poluente
 - diferentes valores de pH
 - presença de agentes mediadores e de inibidores

**4. Artigo 1: Purificação e caracterização da lacase extracelular produzida por
Psilocybe castanella CCB444 durante crescimento em solo**

4.1. INTRODUÇÃO

Durante a evolução, apenas os fungos basidiomicetos causadores da podridão branca na madeira conseguiram desenvolver um mecanismo capaz de degradar eficientemente a lignina, biopolímero altamente recalcitrante (Hofrichter 2002). A degradação da lignina por basidiomicetos envolve enzimas extracelulares que por abstração de elétrons do substrato levam à formação de espécies radicais, as quais atuam na despolimerização da lignina e de uma série de compostos tóxicos e recalcitrantes (Fabbrini *et al.* 2002, Shah & Nerud 2002). As principais enzimas ligninolíticas são a lignina peroxidase (LiP, EC 1.11.1.7), a peroxidase dependente do manganês (MnP, EC 1.11.1.13) e a lacase (EC 1.10.3.2).

Lacases são capazes de catalisar a oxidação de vários compostos aromáticos, principalmente fenóis, com a concomitante redução do oxigênio à água e, diferente das peroxidases, não necessitam de peróxido de hidrogênio para a sua atividade (Durán *et al.* 2002). São glicoproteínas extracelulares (Shah & Nerud 2002) que possuem quatro átomos de cobre no sítio ativo (Mayer & Staples 2002, Wesenberg *et al.* 2003). Na natureza, as lacases apresentam um papel multifuncional, sendo amplamente observadas em plantas superiores, alguns insetos, bactérias e fungos e estão envolvidas em várias funções fisiológicas, como a síntese da lignina em tecidos lenhosos (Hatakka 1994), a pigmentação em *Aspergillus nidulans* e *A. fumigatus*, a morfogênese em *Lentinula edodes* e, em *Cryptococcus neoformans*, lacases podem contribuir para a patogenicidade e resistência a fungicidas (Mayer & Staples 2002).

O interesse na aplicação biotecnológica das lacases aumentou a partir da descoberta da habilidade destas enzimas oxidarem substratos de alto potencial redox na presença de mediadores (Bourbonnais & Paice 1990; Martinez *et al.* 2005). Entre as aplicações das lacases incluem-se: a deslignificação, a biorremediação, o clareamento de vinho (Mayer & Staples

2002) e sucos, melhoramento da panificação, biobranqueamento de polpa kraft (Couto & Herrera 2006), e a descoloração de corantes têxteis (Wesenberg *et al.* 2003), o tratamento de resíduos líquidos (Durán & Esposito 2000). Nos últimos anos, tem sido evidenciado o potencial das lacases para o desenvolvimento de biosensores e de cátodos de hidrogênio em células de combustível (Shleev *et al.* 2005, Couto & Herrera 2006).

Como consequência do potencial biotecnológico das lacases, esforços têm sido realizados para identificar fungos com significativa produção dessa atividade enzimática, além de investigações para purificação e caracterização dessa enzima. Entre as lacases purificadas de fungos basidiomicetos observa-se grande variação nos mecanismos de indução enzimática, no grau de polimorfismo e nas suas propriedades cinéticas e físico-químicas, tais como massa molecular, ponto isoelétrico e conteúdo de carboidratos (Durán *et al.* 2002, Baldrian 2006). O pH ótimo de reação de lacases, tendo ABTS como substrato, é verificado na faixa ácida (abaixo de 4,0); já para substratos como 2,6 dimetoxifenol, guaicol e seringaldazina, as lacases exibem valores mais elevados de pH ótimo (entre 4,0 e 7,0). Os pontos isoelétricos das lacases também são verificados na região ácida e a temperatura ótima de reação está na faixa de 50°C a 70°C (Baldrian 2006).

O fungo *Psilocybe castanella* CCB444 é um basidiomiceto saprofítico da família Strophariaceae, que foi isolada na cidade de São Vicente, na região da Baixada Santista, com histórico de contaminação com resíduos industriais, contendo altas concentrações de hexaclorobenzeno (HCB) e pentaclorofenol (PCP) entre outros poluentes organoclorados (Okino *et al.* 2000). Este fungo despertou interesse pois apresenta rápido crescimento, tolerância a altas concentrações de organoclorados e capacidade de mineralizar HCB e PCP em solo (Matheus *et al.* 2000; Machado *et al.* 2005), e foi avaliado quanto à capacidade de degradar HCB em bioreatores contendo 400 kg de solo contaminado (Matheus *et al.* 2003). Entretanto, pouco se sabe sobre a fisiologia desse fungo e do sistema ligninolítico expresso

durante o crescimento em solo. Estas informações são relevantes para compreender o mecanismo enzimático envolvido na degradação de poluentes por *P. castanella*. O objetivo do presente trabalho foi identificar, purificar parcialmente e caracterizar a principal enzima produzida por *Psilocybe castanella* CCB444 durante crescimento em solo.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Fungo: *Psilocybe castanella* CCB444 está depositado na Coleção de Cultura de Basidiomicetos (CCB) do Instituto de Botânica, São Paulo, SP. O fungo foi mantido por repiques sucessivos em meio de ágar extrato de malte (MEA) 2 % (2 % extrato de malte, 0,1 % peptona, 2 % glicose e 1,5 % de ágar) a 4 °C.

Solo: foi usado solo de restinga coletado no município de São Vicente, São Paulo, Brasil (98,0 % areia, 1,3 % matéria orgânica, 0,06 % de nitrogênio, 1,0 µg g⁻¹ fósforo e 0,01 mEq 100 mL⁻¹ de potássio, pH 3,65, com capacidade de troca catiônica de 5,5 mEq 100 g⁻¹ solo).

Inóculo fúngico: foi preparado em substrato sólido empregando bagaço de cana de açúcar suplementado com farinha de soja comercial (relação C/N = 90) com umidade ajustada para 50 % da capacidade máxima de retenção de água (Ballaminut & Matheus 2007). Parcelas de 200 g do substrato sólido foram distribuídas em sacos de polipropileno com respiro e estes foram autoclavados por 1h a 121 °C. Após o resfriamento, meia placa do fungo crescido em MEA (2 %) foi usada para inocular o substrato. Os sacos foram selados e incubados a 28 °C, durante 19 dias.

Crescimento do fungo em solo: foram empregadas condições de cultivo descritas anteriormente (Ballaminut & Matheus 2007). Frascos de 200 mL contendo 30 g de solo e

gesso comercial (2,5 %) foram esterilizados por fumigação com brometo de metila por 3 dias. A umidade foi ajustada para 50 % da capacidade de campo, com água destilada esterilizada. A proporção do inóculo fúngico foi de 10 % (base seca). Emulsão de óleo vegetal (5 %) e tween 20 (0,5%), previamente esterilizada, foi adicionada ao solo no momento da inoculação. A incubação foi feita a 28-30°C, durante 19 dias, e a umidade foi corrigida, com água destilada esterilizada, semanalmente por gravimetria.

Extração do complexo enzimático: o extrato enzimático foi obtido com solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5, na proporção de 1:3 (m/v). A homogeneização foi realizada manualmente (3 min.), seguida por agitação (1 h, 120 rpm) e filtração em funil de Büchner (Ballaminut & Matheus 2007).

Manutenção do extrato bruto: a única atividade ligninolítica detectada no extrato foi a atividade de lacase. Para avaliar a estabilidade da atividade de lacase do extrato bruto, alíquotas de 20 mL do extrato enzimático bruto foram submetidas a diferentes processos de conservação: 1) refrigeração a 4 °C; 2) congelamento (-18 °C) na presença de solução de sacarose 10 % e, 3) precipitação de proteínas com sulfato de amônio (0 a 90 %), seguida de refrigeração a 4 °C. A atividade de lacase foi acompanhada periodicamente pelo ensaio padrão.

Determinação de proteínas: foi empregado o método de Bradford (1976) tendo soro albumina bovina como padrão.

Determinação das atividades enzimáticas: uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µmol de substrato em um min. A atividade foi

expressa como UL^{-1} de extrato enzimático. A atividade específica foi expressa em unidades de atividade enzimática por miligramas de proteína.

Oxidação total do ABTS: foi determinada pela oxidação do 2,2-azinobis-(3-ethyl benzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS) a 420nm ($\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) conforme descrito anteriormente (Machado & Matheus 2006).

Lacase foi determinada do mesmo modo que a oxidação total do ABTS, substituindo-se o peróxido de hidrogênio por água destilada.

Peroxidase dependente de manganês (MnP): foi determinada por meio da oxidação do vermelho de fenol a 610 nm ($\epsilon = 22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) de acordo com Kuwahara *et al.* (1984).

Peroxidase da Lignina (LiP): foi determinada segundo metodologia descrita por Tien e Kirk (1984) por meio da oxidação do álcool veratrílico (álcool 3,4-dimetoxibenzil) a 310 nm ($\epsilon = 9,333\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Descoloração *in vitro* do corante RBBR: foi determinada pela descoloração do corante Remazol Brilliant Blue R segundo Machado & Matheus (2006). A mistura da reação continha em 1 mL: 250 μL de tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,0; 50 μL de peróxido de hidrogênio 2 mM; 100 μL de solução de RBBR 0,02 % e 600 μL de extrato enzimático. A reação foi incubada por 1 hora, seguida de leitura em espectrofotômetro a 592 nm. Neste caso, uma unidade de atividade de descoloração foi definida como aquela capaz de reduzir 0,01 na absorbância. Como controle foi empregado extrato enzimático inativado por calor (fervura, 10 min).

Determinação de peróxido de hidrogênio: a presença de peróxido de hidrogênio no extrato enzimático ou na enzima purificada foi determinada pela mesma metodologia descrita para a

lacase, substituindo-se o peróxido de hidrogênio por horseradish peroxidase 17,5 UL⁻¹ (Toyobo do Brasil) (Machado & Matheus 2006)

Purificação da lacase: o extrato bruto foi submetido à precipitação de proteínas com 90 % de saturação de sulfato de amônio. O precipitado foi ressuspensão em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5 e dialisado contra o mesmo tampão. O extrato dialisado foi clarificado com 4 % de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e o volume reduzido por ultrafiltração (membrana Amicon Ultra, 10 KDa). Alíquotas foram aplicadas em coluna de exclusão molecular Sephadex G-200 (1,35 x 70 cm), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio pH 4,0. A enzima foi eluída com o referido tampão a um fluxo de 0,3 mLmin⁻¹, e frações de 6 mL foram coletadas. O perfil de eluição foi acompanhado pela absorbância a 280 nm e por teste qualitativo da atividade de lacase (Dekker *et al.* 2000). As frações com atividade foram submetidas ao ensaio quantitativo padrão de lacase, reunidas e utilizadas na caracterização físico-química.

Determinação da temperatura e do pH ótimos de reação: a determinação do pH ótimo de reação da lacase parcialmente purificada foi feita na faixa de pH 1,0 a 8,0 usando tampão HCl (pH 1,0 a 2,4) e tampão citrato-fosfato (pH 2,5 a 8,0). A temperatura ótima de reação foi determinada no intervalo de 25 °C a 80 °C, empregando-se o pH ótimo. Todos os ensaios foram realizados, no mínimo, em triplicata.

Determinação da estabilidade térmica: Após incubação da enzima em banho-maria nas temperaturas de 25 °C, 50 °C, 60 °C e 80 °C procedeu-se à determinação da atividade enzimática residual. O ensaio foi realizado em triplicata.

Determinação da estabilidade em diferentes valores de pH: a enzima foi incubada à temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$), durante 2 h, em solução tampão citrato-fosfato pH 2,6, 4,0 e 5,0 e em seguida foi determinada a atividade residual. O ensaio foi realizado em triplicata.

Efeito de agentes inibidores e de mediadores: foi determinado pela incubação da enzima em presença de azida sódica, cloreto de ferro III, sulfato de cobre II, sulfato de ferro II, sulfato de manganês II, EDTA, l-cisteína, oxalato e ácido tioglicólico na concentração de 1mM, durante 5 min. à temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$). Em seguida procedeu-se a determinação da atividade enzimática residual. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Determinação dos parâmetros cinéticos: o efeito da concentração de ABTS na atividade da enzima foi avaliado na faixa de 1 mM a 200 mM. A constante de Michaelis & Menten (K_m) e a velocidade máxima (V_{\max}) foram determinadas conforme procedimento gráfico proposto por Lineweaver & Burk (1934). O ensaio foi realizado em triplicata.

Determinação da massa molecular por cromatografia de exclusão molecular: a massa molecular da lacase purificada foi estimada por cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-200 (1,35x 70 cm), equilibrada com tampão acetato de sódio pH 4,0 ao fluxo de 18 mLh^{-1} . Ovoalbumina e soro albumina bovina (Inlab) foram utilizadas como padrões. O perfil de eluição foi acompanhado por medida da absorbância a 280 nm. Os volumes de eluição de cada proteína (V_e) e do azul de dextrana (V_o) foram medidos, foi calculada a relação V_e/V_o . A massa molecular da lacase foi estimada por gráfico do logaritmo da massa molecular contra V_e/V_o das proteínas padrões.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A manutenção do extrato bruto obtido do crescimento de basidiomicetos é etapa essencial para o posterior estudo das atividades enzimáticas. Após congelamento do extrato bruto de *P. castanella* proveniente do cultivo em solo verificou-se perda de 92 % da atividade de oxidação do ABTS. Isso não tinha sido observado em estudos anteriores no nosso laboratório, nos quais usualmente o crescimento desses fungos foi feito em substratos sólidos ou meios líquidos sintéticos (Machado & Matheus 2006, Ballaminut & Matheus 2007). Dessa forma, a perda da atividade ligninolítica observada no presente estudo pode ter sido resultado da condição de cultivo empregada. Foi então avaliada uma forma de manter os extratos brutos provenientes do crescimento do fungo em solo, empregando-se o congelamento com adição de sacarose, o resfriamento e a precipitação de proteínas com sulfato de amônio (30 a 90 %). O congelamento reduziu em cerca de 90 % a atividade de lacase presente no extrato enzimático bruto, confirmando o resultado anterior. Adição de sacarose reduziu os danos do congelamento, com perda de 26,5 % da atividade. Resfriamento do extrato a 4 °C resultou em perda de 9 % da atividade após 5 dias; porém, ao final de 21 dias, a perda de atividade foi de 36 %. A precipitação de proteínas com sulfato de amônio foi obtida apenas com 90 % de saturação, este precipitado foi ressuspenso em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5, e conservado sob refrigeração durante um período de 30 dias, sem perda significativa da atividade inicial.

O precipitado mostrou coloração marrom escura, provavelmente devido à presença de polifenóis encontrados no bagaço de cana-de açúcar (substrato lignocelulolítico) e de pigmentos produzidos pelo próprio fungo. Em razão da cor do extrato, foi utilizado o polímero insolúvel polivinilpolipirrolidona (PVPP), capaz de adsorver compostos fenólicos e evitar a formação de quinonas, moléculas altamente reativas que comprometem a atividade de

fenoloxidasas. Os polifenóis oxidados podem prejudicar o processo de purificação por ligarem-se às proteínas de interesse causando sua inativação (Wilson & Walker 2000). O emprego do PVPP aumentou em 2,5 vezes a atividade específica, porém reduziu o rendimento, devido provavelmente à adsorção de proteínas. A proteína de interesse foi concentrada por ultrafiltração e o fator de purificação elevado em 5 vezes (Tabela 1).

O perfil de eluição em Sephadex G-200 (Figura 1) revelou um único pico de atividade de lacase. A cromatografia de exclusão molecular foi eficiente para a purificação (fator de purificação de 15 vezes), resultando em uma atividade específica de 32 Umg⁻¹, o dobro da atividade específica obtida para lacase de *Rigidoporus lignosus* (Cambria *et al.* 2000). Foi possível ainda estimar a massa molecular da lacase em 64 KDa, o que está de acordo com o verificado para a maioria das lacases fúngicas que apresentam massa molecular na faixa de 60 a 70 KDa (Farnet *et al.* 2002, Jung *et al.* 2002, Wesenberg *et al.* 2003, Jordaan *et al.* 2004, Niku-Paavola *et al.* 2004, Baldrian 2006, Murugesan *et al.* 2006). As atividades de MnP e de LiP, assim como a capacidade de descolorir *in vitro* o corante RBBR, não foram detectadas no extrato bruto e nos extratos provenientes das etapas de purificação. Além disso, não foi detectada em nenhum desses extratos a presença de peróxido de hidrogênio.

Tabela 1. Etapas de purificação da lacase de *Psilocybe castanella*

Etapa	Vol (mL)	Atividade (U/mL)	Atividade total (U)	Proteínas (µg/mL)	Proteínas totais (mg)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Extrato bruto	4070	0,022	87,627	10,24	41,66	2,1	100	1,0
Precipitação de proteínas	420	0,194	81,669	93,00	39,06	2,1	93,20	1,0
Clarificação	320	0,139	44,448	26,61	8,51	5,2	50,72	2,5
Ultrafiltração Exclusão Molecular	19	2,111	40,115	195,25	3,71	10,8	45,78	5,1
	115	0,203	23,321	6,355	0,73	31,9	28,56	15,3

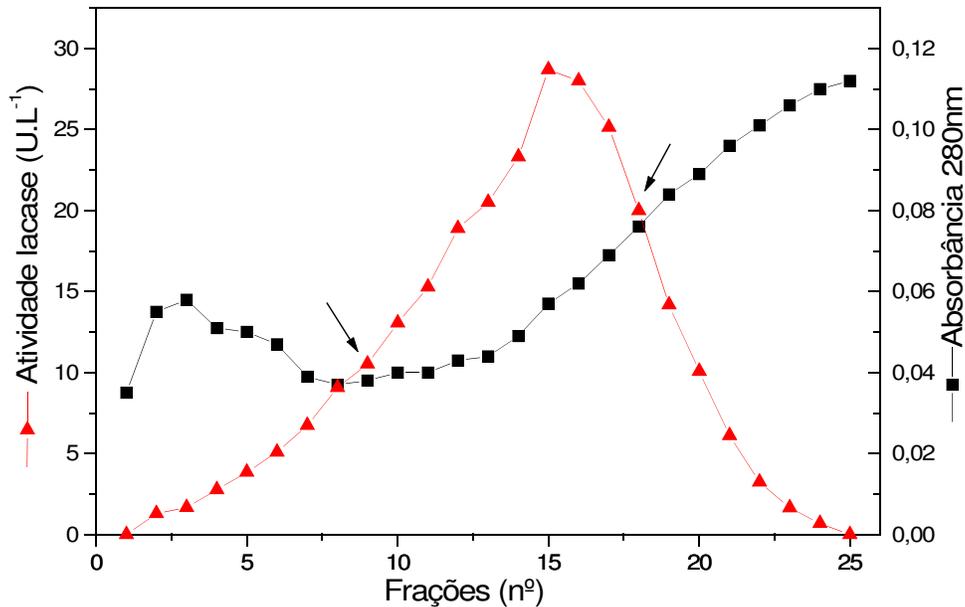


Figura 1. Perfil de eluição da atividade de lacase em cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-200). As seta indicam as frações reunidas.

Adição de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio não afetou a atividade da enzima parcialmente purificada (Figura 2). Isto confirma que a lacase é o principal componente enzimático produzido por *P. castanella* durante crescimento em solo, uma vez que fenoxidases do tipo lacase não necessitam de H₂O₂ (Baldrian 2006).

O perfil da atividade de lacase em função do pH (Figura 3a) evidenciou máxima atividade em pH 2,5 e redução da atividade com o aumento do pH. Não foi possível avaliar o efeito de valores de pH abaixo de 2,5, pois foi observada oxidação abiótica do ABTS na faixa de pH de 1,0 a 2,4. Tendo ABTS como substrato, o pH ótimo de 2,5 foi obtido também para lacases de *Corioloropsis rígida* (Saparrat *et al.* 2002), *Sclerotium rolfsii* (Ryan *et al.* 2003), *Clitocybula dusenii* e para as linhagens de *Pycnoporus sanguineus* PS6 e PS7 (Wesenberg *et al.* 2003). Em geral, verificam-se valores de pH ótimos para lacases de basidiomicetos entre 2,2 e 4,0 (Farnet *et al.* 2002, Baldrian 2006).

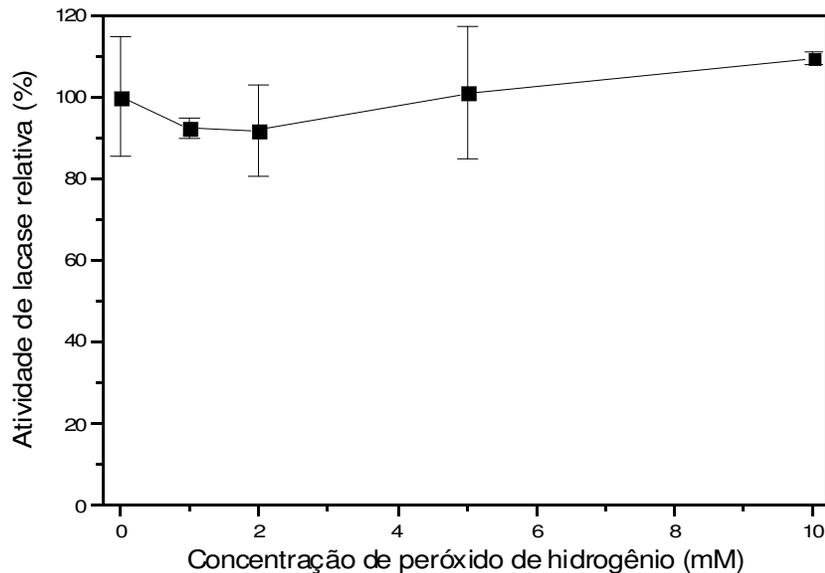


Figura 2. Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio na atividade de lacase parcialmente purificada de *Psilocybe castanella* CCB444. Os testes foram realizados em triplicata, utilizando-se tampão citrato-fosfato pH 2,5 e ABTS como substrato.

A máxima atividade relativa da enzima foi observada entre 50 e 55 °C (Figura 3b), faixa de temperatura verificada para lacases de fungos causadores da podridão branca em madeira (Baldrian 2006). Acima de 60 °C observou-se redução da atividade enzimática, com cerca de 60 % da atividade residual a 80 °C.

O perfil de termoinativação da lacase de *P. castanella* (Figura 4a) à temperatura de 55 °C revelou que esta enzima necessita de um período de incubação de 6 h para atingir sua capacidade máxima de oxidação do ABTS, tendo sido verificado meia vida ($T_{1/2}$) de 19 h a 55 °C e de 17 h a 60 °C. Lacases de *Peniophora* sp. e *Rigidoporus lignosus* foram consideradas como termoestáveis com $T_{1/2}$ de 5 h a 60°C e 0,5 h a 65 °C, respectivamente (Cambria *et al.* 2000, Niku-Paavola *et al.* 2004). Lacase

purificada de *Trametes sp.* AH28-2 apresentou $T_{1/2}$ de 27 min a 75 °C (Xiao *et al.* 2003). A termoinativação da lacase de *P. castanella* a 80 °C ocorreu de forma rápida com $T_{1/2}$ de 30 min. A essa mesma temperatura, lacase de *Sclerotium rolfsii* apresentou $T_{1/2}$ inferior a 2 min (Ryan *et al.* 2003) e para lacase de *Trichophyton rubrum* LKY-7 foi verificada perda de 90 % da atividade após 10 min (Jung *et al.* 2002). Segundo Palonen e colaboradores (2003), redução da atividade de lacases em valores de temperatura acima do valor ótimo deve-se à perda dos íons de cobre. Comparando-se os valores de $T_{1/2}$ da lacase de *P. castanella* com os de lacases proveniente de outros organismos, pode-se considerar que a enzima em estudo é termoestável. Estabilidade da lacase de *P. castanella* a 55 °C e 60 °C evidencia o potencial de aplicação dessa enzima em processos industriais.

Lacase de *P. castanella* mostrou-se estável à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) (Figura 4b), mantendo 96 % e 88 % da atividade após 1 e 5 dias, respectivamente. Alta estabilidade de lacases de basidiomicetos está relacionada à elevada concentração de carboidratos dessas enzimas, que podem variar de 10 a 45 % (Claus 2004).

A lacase de *P. castanella* foi estável nos valores de pH avaliados (Figura 5). Em pH 4,0 e 5,0 a enzima manteve atividade residual de 100 % e de 95 %, respectivamente, após 2 h de incubação a temperatura ambiente. No pH ótimo de 2,5 a estabilidade da enzima diminuiu, verificando-se atividade residual de 80 % após 2 h.

A atividade da lacase de *P. castanella* foi inibida completamente pela adição de azida sódica (1mM) e de sulfato de ferro (1mM), enquanto o cloreto de ferro (1mM) promoveu inibição parcial da atividade de lacase (Figura 6). Os íons de Fe^{2+} comportaram-se como inibidores das atividades de lacases de *Ceriporiopsis subvermispora*, *Panus trigrinus* e *Pleurotus sajor-caju* (Fukushima & Kirk 1995, Murugesan 2006). Na literatura, a inibição total de lacases fúngicas por azida sódica encontra-se bem documentada (Coll *et al.* 1993, Johannes & Majcherczyk 2000, Shin & Lee 2000, Jung *et al.* 2002, Niku-Paavola *et al.* 2004, Murugesan *et al.* 2006), e parece resultar da ligação da azida sódica aos sítios de cobre tipo 2 e 3, o que impede a transferência interna de elétrons (Ryan *et al.* 2003).

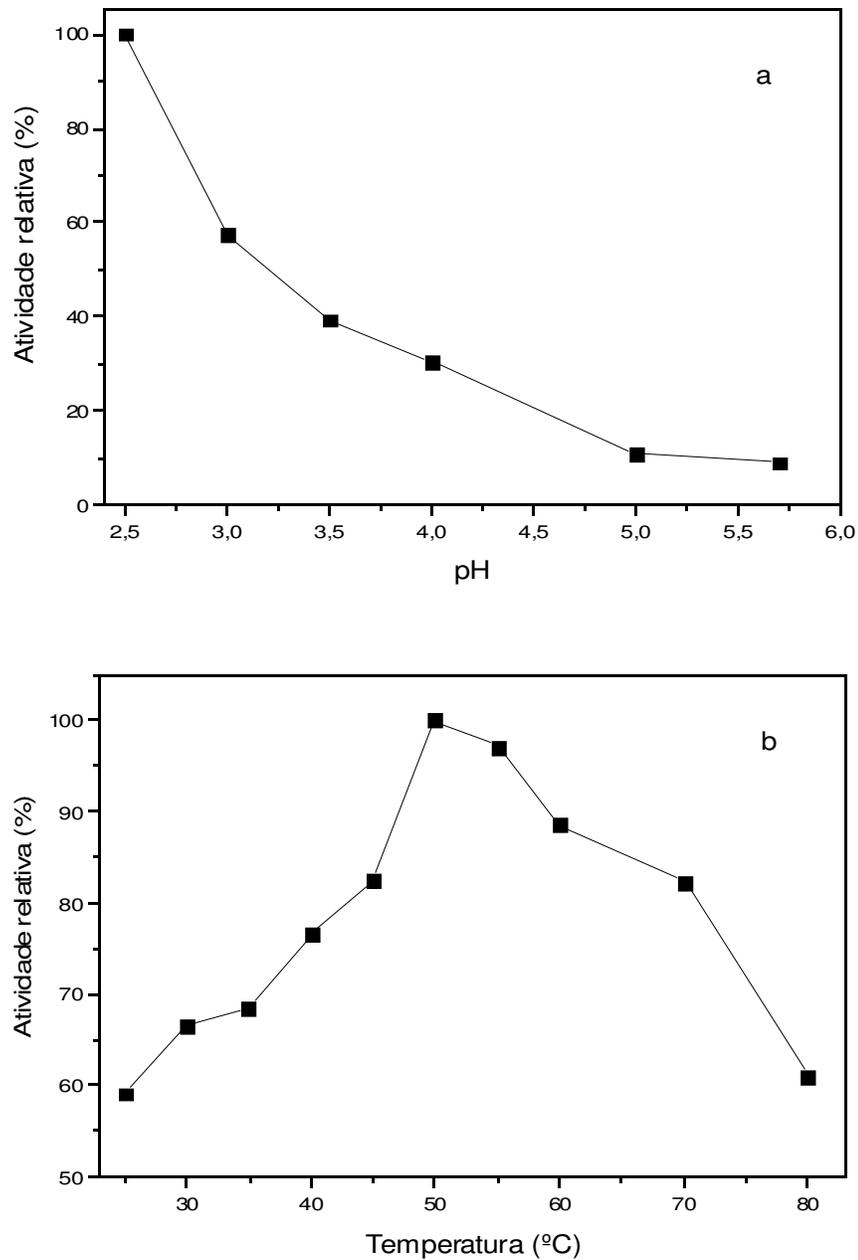


Figura 3. Efeito do pH (a) e da temperatura de reação (b) sobre a atividade da lacase parcialmente purificada de *Psilocybe castanella* CCB444 (31,9U.mg⁻¹). O pH ótimo foi determinado em tampão citrato-fosfato nos valores de pH de 2,5 a 5,6. O efeito da temperatura foi avaliado em

tampão citrato-fosfato pH 4,0. Ambos os testes tiveram ABTS como substrato e foram realizados em triplicata.

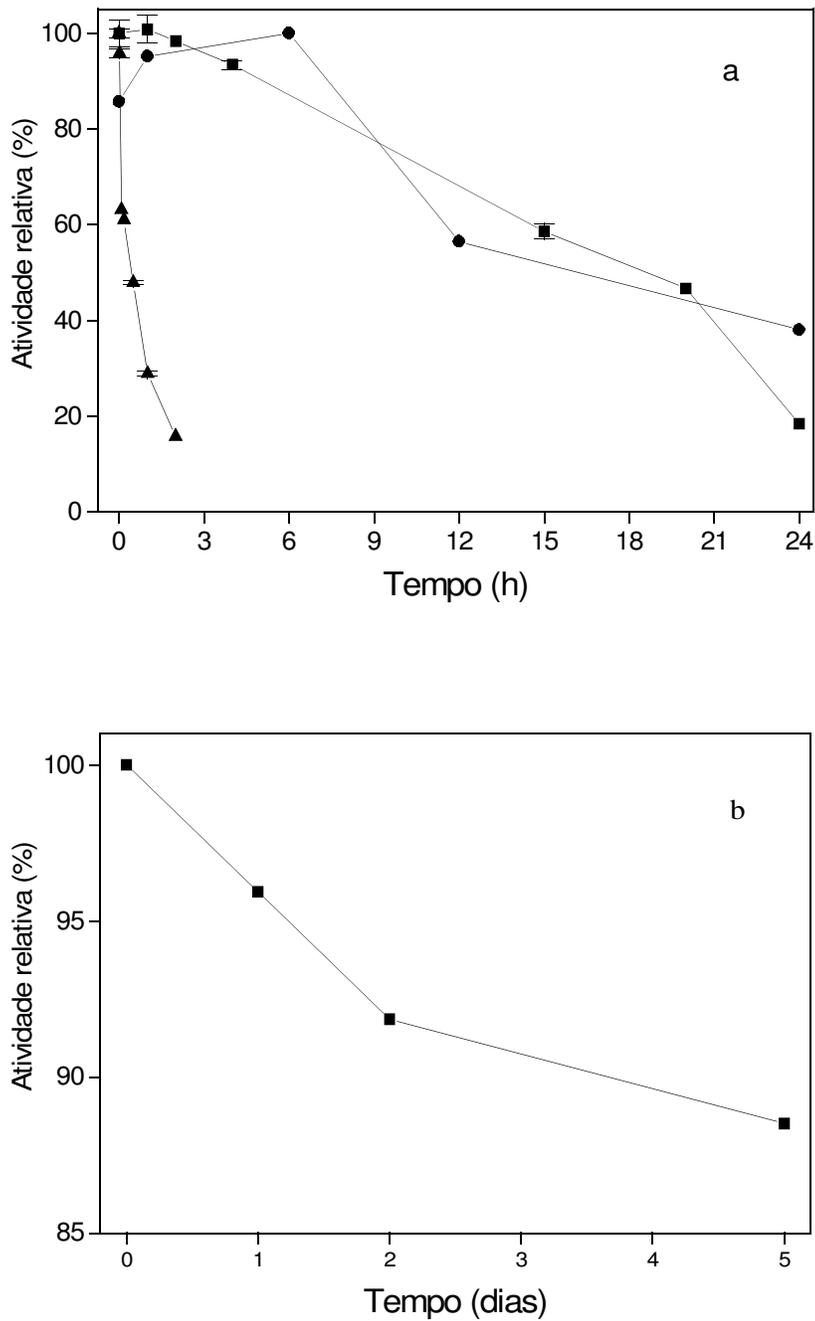


Figura 4. Termoestabilidade a 55 °C (—●—), 60 °C (—■—), 80 °C (—▲—) (a) e à temperatura ambiente (b) da lacase parcialmente purificada de *Psilocybe castanella* CCB444 (31,9U.mg⁻¹). A incubação foi realizada em tampão citrato-fosfato pH 2,5 nas temperaturas indicadas. Os testes tiveram ABTS como substrato e foram realizados em triplicata.

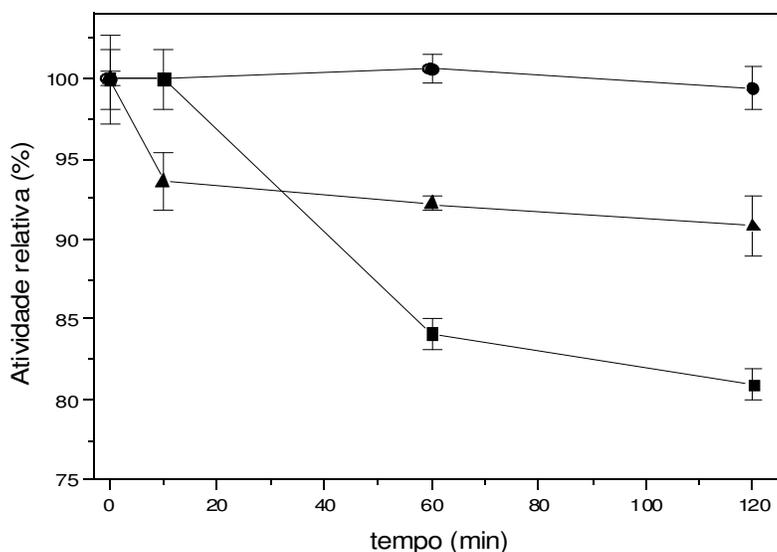


Figura 5. Estabilidade a diferentes valores de pH da lacase parcialmente purificada de *Psilocybe castanella* CCB444 ($31,9\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$). A incubação foi realizada a temperatura ambiente (25 ± 2) em tampão citrato-fosfato pH 2,5 (—■—), pH 4,0 (—●—) e pH 5,0 (—▲—). Os testes tiveram ABTS como substrato e foram realizados em triplicata.

A incubação da lacase de *P. castanella* em presença de EDTA e de oxalato a 1mM promoveu inibição de cerca de 20 % e 40% da atividade de lacase (Figura 6). Inibição parcial da atividade de lacase por EDTA e oxalato foi verificada para as lacases de *Trametes versicolor* (Lorenzo *et al.* 2005). Esses agentes, usualmente apresentam efeito inibitório das lacases pois formam compostos complexos com íons de cobre, modificando o sítio ativo dessas enzimas (Zavarzina *et al.* 2004).

Verificou-se um estímulo da atividade da lacase de *P. castanella* de aproximadamente 10 % e 20 % com a incubação desta com solução de sulfato de cobre e de sulfato de manganês a 1mM, respectivamente. Lorenzo *et al.* (2005) observaram que a adição de Cu^{2+} ao meio de cultivo em concentrações inferiores a 1 mM resultaram em estímulo da atividade de lacase, porém a atividade da

enzima foi inibida em concentrações de 2 a 80 mM de Cu^{2+} . Algumas lacases são capazes oxidar Mn^{2+} à Mn^{3+} , e estes íons por sua vez, podem oxidar o ABTS (Hofer & Schlosser 1999, Schlosser & Hofer 2002).

Ácido tioglicólico (1mM) também inibiu significativamente (80 %) a atividade de lacase de *P. castanella*, enquanto L-cisteína inibiu apenas 20 %. Segundo Johannes e Majcherczyk (2000), a utilização do ácido tioglicólico, assim como da L-cisteína para a caracterização de lacases é problemática, pois estas substâncias podem reagir com as moléculas oxidadas do substrato e não com a lacase, e dessa forma, o meio de reação permanece incolor. Esses autores demonstraram, pelo acompanhamento do consumo de oxigênio, que essas substâncias não inibem a atividade de lacase, mas previnem a formação de diquinonas e reduzem os radicais fenoxil e semiquinonas.

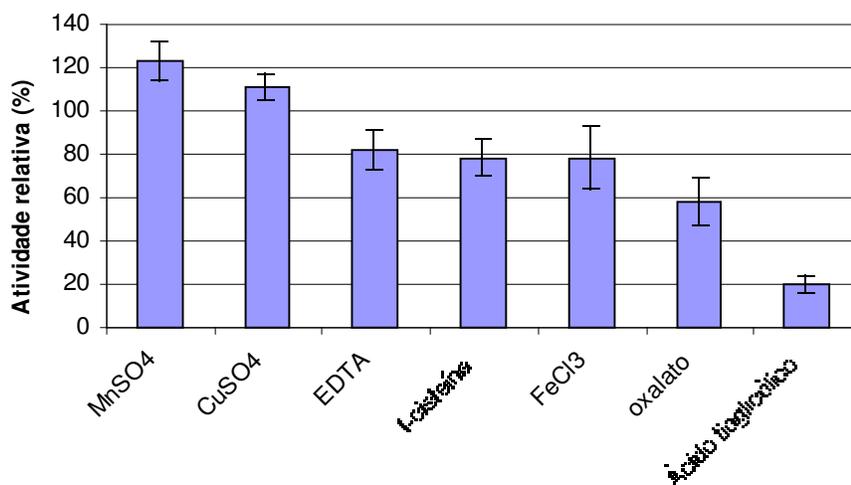


Figura 6. Efeito de agentes mediadores e de inibidores na concentração de 1 mM sobre a atividade de lacase parcialmente purificada produzida por *Psilocybe castanella* CCB444 ($31,9\text{U.mg}^{-1}$). Todos os testes foram realizados em triplicata, tendo ABTS como substrato. A azida sódica e o sulfato de ferro II inibiram completamente a atividade de lacase.

A partir do gráfico do duplo recíproco (Figura 7) foi possível determinar os valores das constantes K_m e V_{max} para a lacase de *P. castanella* em relação ao ABTS. Foi verificado K_m de 4,5 mM, o qual indica baixíssima afinidade desta lacase pelo ABTS. Uma grande variação com relação à afinidade das lacases de basidiomicetos pelo ABTS é observada na literatura. O valor de K_m para lacases de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Trametes sp.* e *Trametes versicolor* para o ABTS foram de 0,28 mM, 56 μ M, 25 μ M e 38 μ M, respectivamente (Palmieri *et al.* 1997; Murugesan *et al.* 2006, Xiao *et al.* 2002; Lorenzo *et al.* 2005). V_{max} da lacase de *P. castanella* para o ABTS foi de 11,16 μ mol.min⁻¹, enquanto a lacase purificada de *Trametes versicolor* apresentou V_{max} de 84 mmol.min⁻¹ para o ABTS (Lorenzo *et al.* 2005).

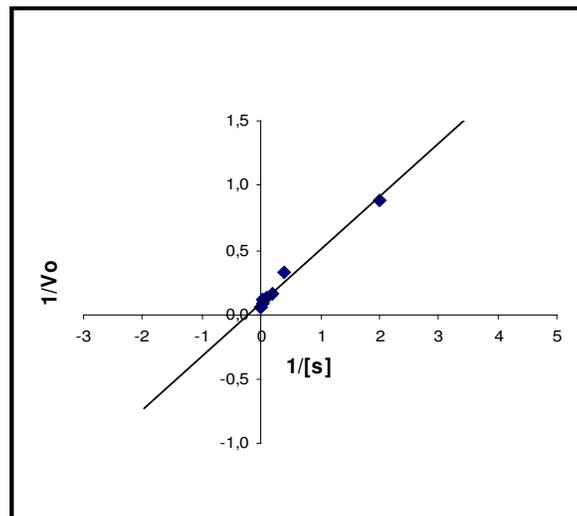


Figura 7. Duplo recíproco ou gráfico de Lineweaver-Burk para a velocidade inicial de lacase parcialmente purificada produzida por *Psilocybe castanella* CCB444 tendo ABTS como substrato. A determinação da atividade enzimática foi feita em tampão citrato-fosfato pH 2,5.

4.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baldrian, P.** 2006. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Letters* 30:215-242.
- Ballaminut, N., & Matheus, D. R.** 2007. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38: 248-252.
- Bourbonnais, R., & M. G. Paice.** 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *Federation of European Biochemical Societies* 267: 99–102.
- Bradford M. M.** 1976. A rapid, and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–54.
- Cambria, M. T., Cambria, A., Ragusa, S. & Rizzarelli, E.** 2000. Production, purification, and properties of an extracellular laccase from *Rigidoporus lignosus*. *Protein Expression and Purification* 18: 141–147.
- Claus, H.** 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Review Micron* 35: 93–96.
- Coll, P. M., Fernandez-Abalos, J. M., Villanueva, J. R.; Santamaria, R. & Perez, P.** 1993. Purification and characterization of a phenoloxidase (Laccase) from the lignin-degrading Basidiomycete PM1 (CECT 2971) *Applied and Environmental Microbiology* 59 (8): 2607-2613.
- Couto, S. R. & Herrera, J. L. T.** 2006. Research review paper: Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances* 24: 500–513.
- Dekker, R. F. H., Ling, K. L. & Barbosa, A. M.** 2000. A simple method for monitoring chromatography column eluates for lacase activity during enzyme purification. *Biotechnology Letters* 22: 105-108.

- Durán, N. & Esposito, E.** 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review *Applied Catalysis B: Environmental* 28: 83–99.
- Durán, N., Rosa, M. A., D’Annibale, A. & Gianfreda L.** 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 3: 907–931.
- Fabbrini, M., Galli, C. & Gentili, P.** 2002. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of lacase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16: 231–240.
- Farnet, A. M., Criquet, S., Pocachard, E., Gil, G. & Ferre, E.,** 2002. Purification of a new isoform of laccase from a *Marasmius quercophilus* strain isolated from a cork oak litter (*Quercus suber* L.). *Mycologia* 94: 735–740.
- Fukushima, Y. & Kirk, T.K.** 1995. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 872-876.
- Hatakka, A.** 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* 13: 125-135.
- Hofer, C., Schlosser, D.** 1999. Novel enzymatic oxidation of Mn^{2+} to Mn^{3+} catalyzed by a fungal Lacase. *FEBS Letters* 451: 186-190.
- Hofrichter M.** 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidases (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30: 454-466.
- Johannes, C. & Majcherczyk, A.** 2000. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology* 78: 193–199.
- Jordaan, J., Pletschke, B.I. & Leukes, W.D.** 2004. Purification and partial characterization of a thermostable laccase from an unidentified basidiomycete. *Enzyme and Microbial Technology* 34: 635–641.

- Jung, H., Xuc, F. & Lia, K.** 2002. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 161–168.
- Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A. & Gold, M. H.** 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* 169: 247-250.
- Lineweaver H. & Burk, D.** 1934. The determination of the enzyme dissociation. [Journal of the American Chemical Society](#) 56: 658-666.
- Lorenzo, M., Moldes, D., Couto, S. R. & Sanromán, M. A.** 2005. Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds. *Chemosphere*, 60: 1124-8.
- Machado, K. M. G. & Matheus, D. R.** 2006. Biodegradation of remazol brilliant blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 468-473.
- Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Monteiro, R. T. R. & Bononi, V. L. R.** 2005. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues *World Journal of Microbiology e Biotechnology* 21: 297–301.
- Martínez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M. J., Gutiérrez, A. & del Río, J. C.** 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8: 195-204.
- Matheus, D. R., Bononi, V. L. R. & Machado, K. M. G.** 2000. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16: 415-421.
- Matheus, D. R., Bononi, V. L. R., Machado, K. M. G., Silva, R. R. & Rodrigues, T. A.** 2003. Growing Basidiomycetes In: Magar, V. S., Kelley, M. E. (eds.) *Bioreactors to be Applied To Bioremediation of HCB in Soil*. Battelle Press, Columbus, pp 139-146.

- Mayer, A. M. & Staples, R. C.** 2002. Review - Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551–565.
- Murugesan, K., Arulmani, M; Nam, I. H., Kim, Y. M., Chang, Y. S. & Kalaichelvan, P. T.** 2006. Purification and characterization of laccase produced by a white rot fungus *Pleurotus sajor-caju* under submerged culture condition and its potential in decolorization of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72: 939–946.
- Niku-Paavola, M. L., Fagerström, R., Kruus, K. & Viikari, L.** 2004. Thermostable laccases produced by a white-rot fungus from *Peniophora* species. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 100–102.
- Okino, L. K., Machado, K. M. G., Fabris, C. & Bononi, V. L. R.** 2000. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16: 889-893.
- Palmieri, G., Giardina P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A. & Sannia, G.** 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of Biological Chemistry*. 272:31301–7.
- Palonen, H., Saloheimo, M., Viikari, L. & Kruus, K.** 2003. Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. *Enzyme and Microbial Technology*. 33: 854–862.
- Ryan, S., Schnitzhofer, W., Tzano, T., Cavaco-Paulo, A. & Gübitz, G. M.** 2003. An acid-stable laccase from *Sclerotium rolfsii* with potential for wool dye decolourization. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 766–774.
- Saparrat, M. C. N., Guillén, F., Arambarri, A. M., Martýnez, A. T. & Martýnez, M. J.** 2002. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Applied And Environmental Microbiology* 68: 1534–1540.

- Schlosser, D. & Höfer, C.** 2002. Laccase-catalyzed oxidation of Mn^{2+} in the presence of natural Mn^{3+} chelators as a novel source of extracellular H_2O_2 production and its impact on manganese peroxidase. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 3514-3521.
- Shah, V. & Nerud F.** 2002. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. *Canadian Journal of Microbiology*. 48: 857-870.
- Shin, K. S. & Lee, Y. J.** 2000. Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 384: 109–115.
- Shleev, S., Jarosz-Wilkolazka, A., Khalunina, A., Morozova, O., Yaropolov, A., Ruzgas, T. & Gorton, L.** 2005 Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes. [Bioelectrochemistry](#) 67: 115-124.
- Tien, M. & Kirk, T. K.** 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H_2O_2 -requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Science*. 81: 2280-2284.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I. & Agathos, S.** 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents *Biotechnology Advances* 22: 161–187.
- Wilson, K. & Walker, J.** 2000. Principles and techniques of practical biochemistry. 5^o ed. Cambridge Press.
- Xiao, Y. Z., Tu, X. M., Wang, J., Zhang, M., Cheng, Q, Zeng, W. Y. & Shi, Y. Y.** 2003. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 700–707.
- Zavarzina, A. G., Leontievsky, A. A., Golovleva, L. A., Tromov, S.** 2004. Biotransformation of soil humic acids by blue laccase of *Panus tigrinus* 8/18: an study *in vitro*. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 359–369.

Purificação e caracterização da lacase extracelular produzida por *P. castanella* CCB444 durante crescimento em solo

Glauciane Danusa Coelho¹, Kátia Maria Gomes Machado², Marina Capelari³

¹ Pós-graduanda em Biodiversidade e Meio Ambiente-Instituto de Botânica, ² Universidade Católica de Santos, ³ Pesquisadora do Instituto de Botânica

¹ e ³ Av. Miguel Estéfano, 3687, São Paulo. 04301-001, SP

² Av. Conselheiro Nébias, 300, Santos. 11015-002

4.5. RESUMO

Psilocybe castanella CCB444, com capacidade comprovada de mineralizar pentaclorofenol e hexaclorobenzeno, está sendo avaliado em processo de biorremediação de solo contaminado com organoclorados. Este trabalho descreve a identificação da principal enzima ligninolítica produzida por este fungo, sua purificação parcial e caracterização. Atividade de lacase foi detectada durante crescimento de *P. castanella* em solo acrescido de gesso, tween 20 e óleo vegetal, aos 19 dias de cultivo. O extrato enzimático extracelular foi obtido com tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5 (1:3 m/v). Para a purificação parcial da lacase foram empregados os processos de precipitação de proteínas com 90% de saturação de sulfato de amônio, clarificação (PVPP 4%), ultrafiltração (10KDa) e cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-200). A massa molecular da enzima foi estimada em 64 KDa, o Km aparente foi de 4,6 mM e a Vmax de 11,16 UL⁻¹. Os valores de temperatura e pH ótimos foram de 50°C e 2,5, respectivamente. A lacase apresentou-se estável a temperatura ambiente, mantendo 96% de atividade após 24 h de incubação. Meia-vidas de 19 h, 17 h e 47 min foram verificadas a 55°C, 60°C e 80°C, respectivamente. A atividade enzimática foi inibida totalmente pela adição de azida sódica e sulfato de ferro II e estimulada pelo sulfato de cobre II e de manganês II.

Palavras-chaves: purificação de lacase, enzima ligninolítica, basidiomicetos, *Psilocybe castanella*

Purification and characterization of laccase produced by *Psilocybe castanella* CCB444 during growth in soil

4.6. ABSTRACT

Psilocybe castanella CCB444, with confirmed capacity to mineralize pentachlorophenol and hexachlorobenzene, is being evaluated in organochlorine contaminated soil bioremediation process. The present work describes the identification of the main ligninolytic enzyme produced by this fungus, its partial purification and characterization. Laccase activity was detected during *P. castanella* growth in soil supplemented with gypsum, tween 20 and vegetable oil, after 19 days of culture. The extracellular enzymatic extractum was obtained with sodium acetate buffer 50 mM pH 4.5 (1:3 w/v). For laccase partial purification, protein precipitation with 90% ammonium sulfate saturation, clarification (PVPP 4%), ultrafiltration (10KDa) and molecular exclusion chromatography (Sephadex G-200) were used. The enzyme's molecular weight was estimated in 64 KDa, apparent K_m was 4.6 mM and the V_{max} was 11.16 UL^{-1} . Optimum temperature and pH values were 50°C and 2.5, respectively. Laccase presented itself stable in environmental temperature, maintaining 96% of activity after 24 h of incubation. Half-lives of 19 h, 17 h and 47 min were verified at 55°C, 60°C and 80°C, respectively. Enzymatic activity was inhibited by the addition of sodium azide and ferrous sulfate and stimulated by cupric sulfate and manganese sulfate.

Keywords: laccase purification, ligninolytic enzyme, basidiomycete, *Psilocybe castanella*

5. Artigo 2: Transformação do pentaclorofenol pela lacase de *Psilocybe castanella*

CCB444

5.1. INTRODUÇÃO

Uma grande variedade de compostos orgânicos encontrados na natureza é utilizada pelos microrganismos como fonte de energia, e dessa forma, a concentração destes compostos é mantida em equilíbrio por meio de processos de biossíntese e de biodegradação. A partir do século XX, a indústria química introduziu no ambiente novos compostos que não participavam dos ciclos biogeoquímicos uma vez que não são susceptíveis à degradação pelos sistemas biológicos existentes (Freire *et al.* 2000).

Nas décadas de 50 e 60, compostos aromáticos halogenados eram amplamente usados como pesticidas, herbicidas, solventes, lubrificantes, fluidos hidráulicos e resíduos sintéticos. O pentaclorofenol (PCP) foi usado como pesticida e como preservativo de madeira com meia vida superior a 178 e 200 dias, no solo e na água, respectivamente. Conhecido popularmente como pó da China, o PCP um importante clorofenol que está entre os poluentes ambientais mais persistentes, é uma substância volátil que se decompõe em presença de luz, é solúvel em álcoois e praticamente insolúvel em água (5-14 mgL⁻¹), lipofílico com baixa pressão de vapor e forte tendência a se adsorver a matéria orgânica do solo (Morales & Pazos 1998). A dose oral letal do PCP para ratos está entre 25 e 200 mg. Kg⁻¹ sendo considerado um composto tóxico da classe II, potencialmente carcinogênico ([http:// www.epa.gov](http://www.epa.gov)).

O PCP é considerado como um poluente prioritário pela United States Environmental Protection Agency (USEPA) e pela European Commission, e tem sido banido, juntamente com o seu sal pentaclorofenato de sódio, de muitos países (McAllister *et al.* 1996, Tayal *et al.* 1999). No Brasil, a portaria nº 329, de 02 de setembro de 1985, do Ministério da Agricultura, proibiu a comercialização, o uso e a distribuição do PCP como produto agrotóxico, e somente em agosto de 2006, por meio da resolução - RDC nº 164, (DOU) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, foram proibidos todos os usos do PCP e de seus sais no Brasil.

Os fungos basidiomicetos causadores da podridão branca da madeira, são providos de um sistema ligninolítico capaz de transformar fontes complexas de carbono, como a lignina, em água e gás carbônico, por isso representam reguladores chaves no ciclo do carbono (Wesenberg *et al* 2003). As enzimas que compõem o sistema ligninolítico dos basidiomicetos atuam extracelularmente e, por abstração de elétrons do substrato levam à formação de espécies radicais, as quais atuam na despolimerização da lignina e de uma série de compostos tóxicos e recalcitrantes e os mecanismos da via oxidativa destas enzimas foram discutidos por vários autores (Durán e Espósito 2000, Hofrichter 2002, Fabbrini *et al.* 2002, Shah & Nerud 2002, Moldes *et al.* 2004).

Muitos trabalhos têm relacionado à ação das enzimas ligninolíticas, lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase, com a transformação *in vitro* de poluentes recalcitrantes, como nitrotoluenos (van Acken *et al.*, 1999), PAHs (Hammel *et al.* 1991), corantes sintéticos (Ollikka *et al.* 1993; Heinfling *et al.* 1998) e PCP (Lin *et al.* 1990, Ullah *et al* 2000, Novotny *et al.* 2004) e outros poluentes organoclorados (Rodriguez *et al.* 2004).

Lacases são oxidoredutases que contém cobre no grupo prostético e são capazes de degradar clorofenóis, PAHs, compostos organofosforados, compostos modelo fenólicos e não fenólicos da lignina, bem como corantes aromáticos (Wesenberg *et al.* 2003), e clorofenóis, inclusive o PCP (Roy-Arcand and Archibald 1991, Bollag 1992, Ullah *et al.* 2000, Seradati *et al* 2003), com a concomitante redução do oxigênio à água (Pozdnyakova *et al.* 2006).

Em estudos de degradação de organoclorados por fungos basidiomicetos realizados no laboratório de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica destacou-se o isolado de *Psilocybe castanella* CCB444, que é um basidiomiceto saprofítico da família Strophariaceae. Este fungo foi isolado na cidade de São Vicente, na região da Baixada Santista com histórico de contaminação com resíduos industriais, contendo altas concentrações de hexaclorobenzeno (HCB) e PCP, entre outros poluentes organoclorados (Okino *et al.* 2000). Este fungo despertou

interesse, pois apresenta rápido crescimento, tolerância a altas concentrações de organoclorados, capacidade de mineralizar HCB e PCP em solo (Matheus *et al.* 2000; Machado *et al.* 2005), foi avaliado quanto à capacidade de degradar HCB em bioreatores contendo 400kg de solo contaminado (Matheus *et al.* 2003). O objetivo deste trabalho foi avaliar a degradação do PCP pela lacase produzida por *P. castanella* durante crescimento em solo.

5.2. MATERIAL E MÉTODO

Fungo: *Psilocybe castanella* CCB444 está depositado na Coleção de Cultura de Basidiomicetos (CCB) do Instituto de Botânica, São Paulo, SP. O fungo foi mantido por repiques sucessivos em extrato de malte e agar 2 % (2 % extrato de malte, 0,1 % peptona, 2 % glicose e 1,5 % agar) a 4 °C.

Obtenção da lacase. Foram empregadas as condições de cultivo descritas anteriormente. A frascos de 200 mL de capacidade foram adicionados 30 g de solo e gesso comercial (2,5 %), esterilizados por fumigação com brometo de metila por 3 dias, emulsão de óleo vegetal (5 %) e tween 20 (0,5%), previamente esterilizada, e substrato sólido (bagaço de cana de açúcar e farinha de soja comercial, C/N = 90) colonizado pelo fungo.(Matheus *et al.* 2003). A incubação foi feita a 28-30°C, durante 19 dias, e a umidade corrigida semanalmente por gravimetria. O extrato enzimático foi obtido com solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5, na proporção de 1:3 (m/v). Para a determinação de proteínas foi empregado o método de Bradford (1976), tendo soro albumina bovina como padrão. Purificação da lacase foi realizada por precipitação com sulfato de amônio, ultrafiltração (membrana Amicon Ultra, 10 KDa) e cromatografia de exclusão molecular – Sephadex G-200, conforme descrito anteriormente.

Determinação da atividade de Lacase. Foi determinada pela oxidação do 2,2-azinobis-(3-ethyl benzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS) a 420nm ($\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) na ausência de peróxido de hidrogênio (Machado & Matheus, 2006).

Degradação *in vitro* do PCP pela lacase de *P. castanella*. A reação de degradação do PCP continha: 300 μL de lacase ($7,5 \text{ UL}^{-1}$), 125 μL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,0, (ou o pH indicado), 100 μL de solução de PCP diluída convenientemente e 25 μL de água deionizada. A solução estoque de PCP foi preparada em etanol grau HPLC e mantida em freezer. A reação foi mantida em banho-maria a 26 °C, no escuro durante 24h. Controle de degradação abiótica foi feito com a enzima previamente fervida durante 10 minutos.

Efeito de agentes inibidores e de mediadores: foi determinado pela adição de azida sódica, azul brilhante de remazol R (RBBR), ABTS, soro albumina bovina (SAB), sulfato de ferro II, sulfato de manganês II e peróxido de hidrogênio na concentração de 2 mM em substituição a água deionizada na reação de degradação do PCP. O ensaio foi realizado em triplicata.

Determinação do PCP: o PCP foi determinado em HPLC (Cromatógrafo Varian ProStar 215) usando coluna de fase reversa Hipersyl 4,6 x 250 mm, empacotada com resina R - Sil C18 (10 μm) tendo como fase móvel isocrática acetonitrila: água: ácido acético (75:25:0,125) e fluxo de 0,9 mL/min. A detecção do PCP foi a 254 nm e o tempo de retenção foi de 6,9 a 7,2 min. O PCP residual foi identificado pelo tempo de retenção do padrão diluído em etanol. Para a calibração, a área do pico foi linear na faixa de 20 a 220 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Ullah *et al.* 2000).

Análise estatística: Os dados foram avaliados pelo programa estatístico MiniTab versão Release 1.5. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey sempre protegidas por análise de variância

(ANOVA) ($\alpha \leq 0,1$). Os dados percentuais foram transformados na expressão a seguir, de acordo com Vieira & Hoffmann (1989).

$$\text{Valor transformado} = \arcsen \text{ da raiz quadrada do valor percentual de pentaclorofenol recuperado dividido por 100}$$

Onde:

arcsen = arcoseno

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, avaliou-se a influencia do etanol, solvente empregado para dissolver o PCP, na atividade da lacase de *P. castanella*. A concentração de etanol influenciou a atividade enzimática, com perda de cerca de 17 %, 25 % e 34 % da atividade na presença de 10%, 15% e 20% de etanol, respectivamente após 24h de incubação da lacase (Tabela1).

Tabela 1. Efeito do etanol sobre a atividade da lacase de *Psilocybe castanella*

Etanol (%)	Perda de atividade lacase (%)	
	Tempo zero	Tempo 24h
10	14,14	17,17
15	21,58	24,89
20	24,58	34,01

As reações foram mantidas a temperatura ambiente. Os testes foram feitos em triplicata.

A concentração inicial de PCP influenciou significativamente a degradação desse poluente. A máxima degradação do PCP foi observada nas concentrações de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com redução de 26,1% e 26,55% da concentração inicial de PCP, respectivamente (Figura 1). Os valores de redução do PCP obtidos nas concentrações de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ diferiram significativamente ($P < 0,01$) dos observados nas concentrações de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e

200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A baixa degradação do PCP na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (0,7%), pode ter ocorrido devido a inibição enzimática, decorrente da alta concentração do poluente. O nível de degradação do PCP por lacase de *Coriolus versicolor* variou de acordo com a concentração inicial desse poluente, tendo-se verificado cerca de 55 %, 50 % e 35 % de degradação nas concentrações de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (Ullah *et al.* 2000). Itoh *et al.* (2000) verificaram que lacase de *Coriolus versicolor* foi incapaz de transformar o PCP na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

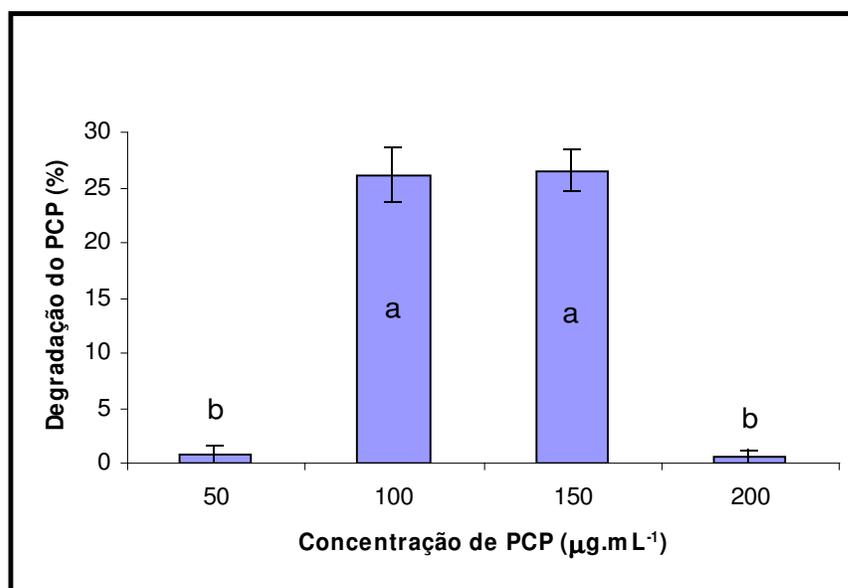


Figura 1. Influência da concentração de poluente no processo de degradação *in vitro* do PCP pela lacase de *Psilocybe castanella*. Os testes foram realizados em solução tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,0 e em quadruplicatas. Letras iguais indicam similaridade estatística entre os testes, letras diferentes representam diferença significativa entre os testes ($P < 0,01$).

Foi observada redução da degradação do PCP com o aumento do pH (Figura 2). A maior degradação do PCP ocorreu no pH 3,5, sendo significativamente diferente daquela detectada em

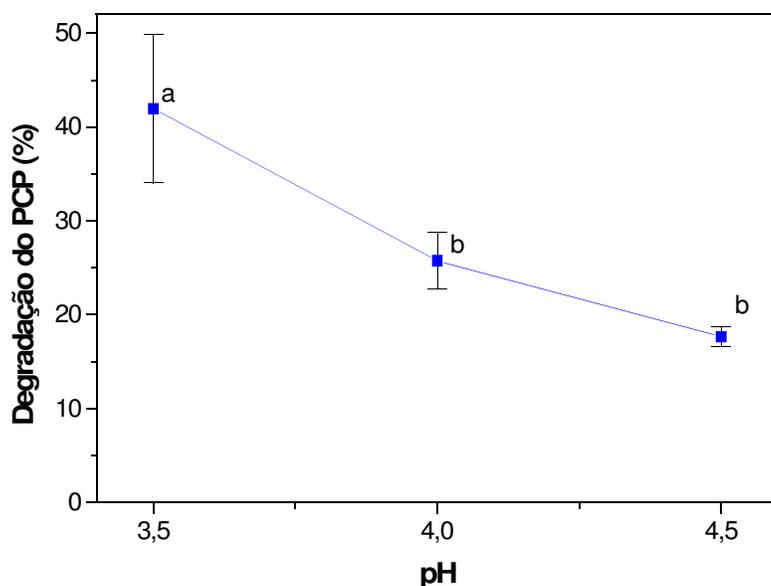
pH 4,0 ($P < 0,1$) e tendo diferença altamente significativa da degradação desse poluente em pH 4,5 ($P < 0,01$). Estudos da degradação de PCP, e de outros poluentes, por enzimas ligninolíticas devem ter o pH controlado, uma vez que o valor de pH do meio reacional pode alterar as propriedades eletrostáticas da superfície da proteína ou do sítio catalítico (Bonomo *et al.* 2001), afetando a eficiência da transformação do substrato (Keum & Li 2004). O efeito do pH na degradação do PCP pela lacase de *P. castanella* foi semelhante ao efeito desse parâmetro na atividade da lacase cuja atividade máxima foi observada em pH ácido (2,5) (Coelho *et al.* 2005). Este resultado evidencia a participação da lacase produzida por *P. castanella* no processo de degradação do PCP, como descrito por Ullah *et al.* (2000) para *Coriolus versicolor*. Estes autores observaram perfil de degradação do PCP similar ao obtido para o pH ótimo desta enzima, com máxima transformação do PCP no pH ótimo da enzima (pH 5,5).

A maior porcentagem de degradação do PCP foi observada na presença de azida sódica. Lacases fúngicas são completamente inibidas por esta substância (Coll *et al.* 1993, Johannes & Majcherczyk 2000, Shin & Lee 2000, Jung *et al.* 2002, Niku-Paavola *et al.* 2004, Murugesan *et al.* 2006). Recentemente, Coelho *et al.* (2005) verificaram a inibição total da lacase produzida por *P. castanella* na presença de azida sódica a 1mM, dessa forma a redução da concentração de PCP na presença de azida sódica observada no presente estudo pode ser resultado de reações abióticas e não à ação da lacase.

Os valores de degradação do PCP na presença de RBBR, ABTS e sulfato de manganês não diferiram significativamente entre si e do controle (água) (Tabela 2), evidenciando que essas substâncias não atuam como mediadores da lacase produzida por *P. castanella* na condição de reação empregada. Mediadores redox sintéticos são usados em processos biotecnológicos para aumentar o potencial de oxidação das lacases (Claus *et al.* 2002). Em presença dos mediadores sintéticos como ABTS (Bourbonnais & Paice 1990, Rodriguez *et al.* 2004) e RBBR (Couto *et al.* 2005), as lacases tornam-se capazes de degradar estruturas não fenólicas. A adição de ABTS na

reação enzimática contendo lacases de *Trametes versicolor* e de *Pleurotus ostreatus* promoveu, respectivamente, a otimização da degradação de bifenilas cloradas (Field e Sierra 2004) e de 2,4 diclorofenol (Rodriguez *et al.* 2004). O efeito desses mediadores também foi avaliado por Couto *et al.* (2005). Os autores apontaram a importância do sistema de mediadores de lacase para aumentar a descoloração de corantes têxteis.

Figura 2. Efeito do pH de reação na degradação do pentaclorofenol (PCP) pela lacase de



Psilocybe castanella. A reação de degradação foi realizada em tampão acetato de sódio 50mM nos valores de pH de 3,5, 4,0 e 4,5. Os testes foram feitos em quadruplicatas e tiveram os controles abióticos descontados. Letras iguais indicam similaridade entre os testes, letras diferentes representam diferença significativa entre os testes.

A degradação do PCP não foi afetada significativamente pela adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), tendo a adição de água como referência ($P=0,4141$). Isto era esperado, uma vez que fenoloxidasas do tipo lacase não necessitam de H_2O_2 para oxidar a lignina e nem

compostos relacionados a ela (Saito *et al.* 2004). A atividade de lacase produzida por *P. castanella* não foi influenciada pela adição de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (Coelho *et al.* 2005).

A albumina foi adicionada a reação de degradação do PCP com o objetivo de proteger a lacase contra a ação de produtos intermediários que poderiam inativá-la (Itoh *et al.* 2000), e assim melhorar a degradação do PCP. No entanto, isto não foi observado. A albumina inibiu a transformação do PCP pela lacase, sendo que o valor de degradação teve diferença altamente significativa do controle.

A degradação do PCP foi inibida completamente pelo sulfato de ferro II e pelo cloreto de ferro II (Tabela 2). Conforme descrito anteriormente, a atividade da lacase de *P. castanella* foi inibida por estas substâncias (Coelho *et al.* 2005).

Durante crescimento em solo, a linhagem de *P. castanella* utilizada neste trabalho foi capaz de transformar 50 % e 64,5 % de PCP nos períodos de 65 e 90 dias, respectivamente (Machado *et al.* 2005). O presente trabalho mostrou que a lacase produzida por *P. castanella* conseguiu reduzir cerca de 40% da concentração deste poluente em 24h de incubação, evidenciando a importância desta enzima para a degradação do PCP. O tratamento de solos contaminados com poluentes clorados, como o PCP, com enzimas fúngicas representa uma área promissora para processos de bioremediação.

Tabela 2. Degradação do pentaclorofenol (PCP) pela lacase de *Psilocybe castanella* em presença de agentes mediadores e inibidores

Agentes	Degradação do PCP (%)	Teste de Tukey
Azida sódica	44,44	a
RBBR	26,50	a, b
ABTS	24,05	b
MnSO ₄	16,71	b, c
H ₂ O ₂	11,99	c, d
Soro albumina bovina	5,92	d, e
FeCl ₃	0,00	f
FeSO ₄	0,00	f
Controle (água)	20,30	b, c

Todos os mediadores foram avaliados na concentração de 2 mM. A redução do PCP foi avaliada por HPLC. Os testes foram realizados em solução tampão acetato de sódio 50mM pH 4,0 e em triplicatas. As reações foram mantidas no escuro, a temperatura ambiente (25°C). Letras iguais indicam similaridade entre os testes, letras diferentes representam diferença significativa entre os testes.

5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bollag, J-M.** 1992. Decontaminating soil with enzymes. An *in-situ* method using phenolic and anilinic compounds. *Environmental Science and Technology* 26: 1876-1881.
- Bonomo, R. P., Cennamo, G., Puerrillo, R., Santoro, A. M., Zapala, R.** 2001. Comparison of three fungal laccases from *Rigidopus lignosus*, *Pleurotus ostreatus*: correlation between conformation changes e catalytic activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 83: 67-75.

- Bourbonnais, R., & M. G. Paice.** 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *Federation of European Biochemical Societies* 267: 99–102.
- Bradford M. M.** 1976. A rapid, and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–54.
- Claus, H.** 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Review Micron.* 35: 93–96.
- Claus, H., Faber, G. & König, H.,** 2002. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 59: 672–678.
- Coelho, G.D., Chu, E.P. & Machado, K.M.G.** 2005. Purificação parcial e caracterização da lacase produzida por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo (Resumo) Anais do V Congresso Latino Americano de Micologia, Brasília-DF, p. 249.
- Coll, P. M., Fernandez-Abalos, J. M., Villanueva, J. R.; Santamaria, R. & Perez, P.** 1993. Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971) *Applied and Environmental Microbiology* 59: 2607-2613.
- Couto, S. R. Sanromán, M. & Gübitz, G. M.** 2005. Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsuta*. *Chemosphere* 58: 417-422
- Durán, N. & Esposito, E.** 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review *Applied Catalysis B: Environmental* 28: 83–99.
- Fabbrini, M., Galli, C. & Gentili, P.** 2002. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of lacase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16: 231–240.
- Field, J. A. & Sierra, R.** 2004. Review of scientific literature on microbial dechlorination and chlorination of key chlorinated compounds *In: 14th Quarterly Report Euro Chlor* 6-55.

- Freire, R. S., Pelegrini, R., Kubota, I. T., Duran, N. & Peralta-Zamora, P.** 2000. Revisão: Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova* 23: 504-511.
- Hammel, K.E., Green, B. & Gai, W.Z.** 1991. Ring fission of anthracene by a eukaryote. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA*. 88: 10605-10608.
- Heinfling, A., Martinez, M.J., Martinez, A.T., Bergbauer, M. & Szewzyk, U.** 1998. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2788–2793.
- Hofrichter M.** 2002. Lignin conversion by manganese peroxidases (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30: 454-466.
- Itoh, K., Fujita, M., Kumano, K., Suyama, K., Yamamoto, H.** 2000. Phenolic acids affect transformations of chlorophenols by a *Coriolus versicolor* laccase. *Soil biology & Biochemistry* 32: 85-91.
- Johannes, C. & Majcherczyk, A.** 2000. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology* 78: 193–199.
- Jung, H., Xuc, F. & Lia, K.** 2002. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 161–168.
- Keum, Y. S., Li, Q. X.** 2004. Fungal laccase – catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 56: 23-30.
- Lin, J-E., Wang, H. Y. & Hickey R. F.** 1990. Degradation kinetics of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotech Bioeng* 35: 112-1134.

- Machado, K. M. G. & Matheus, D. R.** 2006. Biodegradation of remazol brilliant blue r by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. Brazilian Journal of Microbiology 37:468-473.
- Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Monteiro, R. T. R. & Bononi, V. L. R.** 2005. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues World Journal of Microbiology & Biotechnology 21: 297–301.
- Matheus, D. R., Bononi, V. L. R. & Machado, K. M. G.** 2000. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. World Journal of Microbiology & Biotechnology 16: 415-421.
- Matheus, D. R., Bononi, V. L. R., Machado, K. M. G., Silva, R. R. & Rodrigues, T. A.** Growing Basidiomycetes In Bioreactors to be Applied To Bioremediation of HCB in Soil. Paper G-05, IN: Magar, V. S., Kelley, M. E. (Eds.), *In Situ and On-Site Bioremediation—2003*. Proceedings of the Seventh International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium (Orlando, FL; June 2003). -139-6, published by Battelle Press, Columbus, OH.
- Mc Allister, K. A., Lee, H. & Trevors, J. T.** 1996. Microbial degradation of pentachlorophenol. Biodegradation 7: 1-40.
- Ministério da agricultura**, portaria nº 329, de 02 de setembro de 1985.
- Ministério da Saúde**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária- RESOLUÇÃO - RDC Nº 164, DE 18 de agosto de 2006 Nº 160 – DOU 21/08/06
- Moldes, D., Lorenzo, M. & Sanromán, M. A.** 2004. Degradation or polymerisation of Phenol Red dye depending to the catalyst system used. Process Biochemistry 39: 1811–1815.
- Morales, I. C. & Pazos, C. B.** 1998. Pentaclorofenol: toxicología y riesgos para el ambiente. Madera y Bosques 4:21-37 21.
- Murugesan, K., Arulmani, M; Nam, I. H., Kim, Y. M., Chang, Y. S. & Kalaichelvan, P. T.** 2006. Purification and characterization of laccase produced by a white rot fungus *Pleurotus*

- sajor-caju under submerged culture condition and its potential in decolorization of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72: 939–946.
- Niku-Paavola, M. L., Fagerström, R., Kruus, K. & Viikari, L.** 2004. Thermostable laccases produced by a white-rot fungus from *Peniophora* species. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 100–102.
- Novotny, C., Svobodova, K., Erbanova, P., Cajthaml, T., Kasinatha, A., Lang, E. & Sasek, V.** 2004. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1545–1551.
- Okino, L. K., Machado, K. M. G., Fabris, C. & Bononi, V. L. R.** 2000. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16: 889-893
- Ollikka, P., Alhoniemi, K., Leppänen, V.-M., Glumoff, T., Rajola, T. & Suominen, I.,** 1993. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 4010–4016.
- Pozdnyakova, N. N., Turkovskaya, O. V., Yudina, E. N. & Rodakiewicz-Nowak, Y.** 2006. Yellow laccase from the fungus *Pleurotus ostreatus* d1: purification and characterization. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42: 56–61.
- Ricotta, A., Unz, R. F. & Bollag, J.-M.** 1996. Role of a laccase in the degradation of pentachlorophenol. *Bull. Environmental Contamination and Toxicology* 57: 560-567.
- Rodriguez, E., Nuero, O., Guillén, F., Martínez, A. T. & Martínez, M.J.** 2004. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 909-916.

- Roy-Arcand, L. & Archibald, F. S.** 1991. Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 13: 194-203.
- Saito, T., Kato, K., Yokogawa, Y., Nishida, M. & Yamashita, N.** 2004. Detoxification of bisphenol a and nonylphenol by purified extracellular laccase from a fungus isolated from soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98: 64–66.
- Sedarati, M. R., Keshavarz, T., Leontievsky, A. A. & Evans, C. S.** 2003. Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* immobilized on nylon mesh. *Electronic Journal of Biotechnology* 6: (2).
- Shah, V. & Nerud F.** 2002. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. *Can.J. Microbiol.* 48: 857-870.
- Shin, K. S. & Lee, Y. J.** 2000. Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 384: 109–115.
- Tayal, A. K., Das, L., & Kaur, I.** 1999. Biodegradation of pentachlorophenol (PCP) by white rot fungal strains screened from local sources and its estimation by high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography* 13: 220–224.
- Ullah, M. A., Bedford, C. T. & Evans, C. S.** 2000. Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolus versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 230-234.
- USEPA.** 1988. Health Advisory Office. Pentachlorophenol. *Contam. Toxicol.* 104:183-194.
- van Acken B., Hofrichter M., Scheibner K., Hatakka A. I., Naveau H. & Agathos S. N.** 1999. Transformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by manganese peroxidase from the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. *Biodegradation* 10: 83–91.
- Vieira. S. & Hoffmann, R.** *Estatística Experimental.* São Paulo: Atlas, 1989. 179 p.

Wesenberg, D, Kyriakides, I. & Agathos, S. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 22: 161–187.

Zouari, H., Labat, M. & Sayadi, S. 2002. Degradation of 4-chlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in free and immobilized cultures. *Bioresource Technology* 84: 145-150.

Biodegradação do pentaclorofenol pela lacase de *Psilocybe castanella* CCB444

Glauciane Danusa Coelho¹, Kátia Maria Gomes Machado², Dácio Roberto Matheus³, Marina Capelari³

1 Pós-graduanda em Biodiversidade e Meio Ambiente-Instituto de Botânica, 2 Universidade Católica de Santos, 3 Pesquisadores do Instituto de Botânica

1 e 3. Av. Miguel Estéfano, 3687. Água Funda, São Paulo. CEP: 04301-001, 2. Av. Conselheiro Nébias, 300, Santos. CEP 11015-002

5.5. RESUMO

Policlorofenóis estão entre os poluentes ambientais mais persistentes. O pentaclorofenol (PCP), um importante clorofenol, é usado desde a década de 1930 como agrotóxico e preservativo de madeira e tem sido banido de muitos países devido ao seu potencial carcinogênico. No Brasil, o PCP teve sua comercialização proibida em agosto de 2006. Os clorofenóis, incluindo o PCP, servem de substrato para enzimas oxidativas como lacases. Essas enzimas compõem o complexo enzimático de fungos basidiomicetos causadores da podridão branca da madeira. A lacase purificada do fungo *Psilocybe castanella* na concentração de 7,5 UL⁻¹ foi avaliada quanto à capacidade de degradar o PCP *in vitro*. A degradação do PCP foi determinada por HPLC. A eficiência da enzima foi avaliada em diferentes concentrações de PCP, valores de pH e presença de substâncias inibidoras e mediadoras. As maiores porcentagens de degradação do PCP foram obtidas nas concentrações de 100 e de 150 µg/mL de PCP e em pH 3,5. Substâncias como o ABTS e RBBR, conhecidas por serem mediadores de lacase, não favoreceram a degradação do PCP, enquanto o cloreto de ferro e o sulfato de ferro inibiram completamente a transformação do PCP pela lacase.

Palavras chaves: transformação *in vitro* do pentaclorofenol, lacase, enzima fúngica

Biodegradation of pentachlorophenol by laccase from *Psilocybe castanella* CCB444

5.6. ABSTRACT

Polichlorophenols are among the most persistent environmental pollutants. Pentachlorophenol (PCP) is used since the 1930's as pesticide and wood preservative and has been banished from many countries due its carcinogenic potential. In Brazil, PCP had its commercialization prohibited in August 2006. Chlorophenols, including PCP, are used as substrate to oxidative enzymes such as laccases. These enzymes compose the enzymatic complex of white-rot wood degrading basidiomycete fungi. Purified lacase produced by the fungus *Psilocybe castanella* was evaluated as its capacity to degrade PCP *in vitro*. It was utilized *P. castanella* purified laccase in the concentration of 7.5 UL⁻¹. PCP degradation was determined by HPLC. The enzyme's efficiency was evaluated in different PCP concentrations, pH values and in the presence of inhibitory and mediatory substances. PCP higher degradation percentages were obtained in the concentrations of 100 and 150 µg/mL of PCP. The maximum transformation of PCP by laccase was verified at pH 3.5. Substances such as ABTS and RBBR, known for being laccase mediators, not favored the degradation of PCP, while ferric chloride and ferrous sulfate completely inhibited the transformation of PCP by laccase.

Keywords: Transformation of pentachlorophenol *in vitro*, laccase, fungal enzyme.

6. Considerações finais

- O congelamento do extrato enzimático bruto resultou na perda quase total da atividade enzimática;
- Após precipitação de proteínas com sulfato de amônio o extrato enzimático bruto produzido por *Psilocybe castanella* CCB444 durante crescimento em solo manteve-se estável por aproximadamente 30 dias sob refrigeração;
- O principal componente do extrato enzimático produzido por *Psilocybe castanella* é uma lacase;
- A lacase produzida por *P. castanella* foi purificada parcialmente e apresentou temperatura e pH ótimos de 50°C a 55°C e 2,5, respectivamente, tendo ABTS como substrato;
- A enzima mostrou-se bastante estável a altas temperaturas com $T_{1/2}$ de 19h, 17h e 30 min, respectivamente, a 55°C, 60°C e 80°C, podendo ser considerada como termoestável;
- A estabilidade dessa lacase a temperatura ambiente (26°C) também foi alta, restando ainda cerca de 96% e 88% de atividade residual após 24h e 120h (5 dias), respectivamente;
- A lacase de *P. castanella* foi capaz de degradar o PCP *in vitro*, sendo que a redução do poluente foi afetada pela concentração inicial de PCP;
- A maior redução *in vitro* do PCP foi obtida em pH ácido, evidenciando a participação da lacase de *P. castanella* nesse processo;
- A degradação *in vitro* do PCP foi inibida pelo sulfato ferroso e cloreto férrico evidenciando a participação da lacase de *P. castanella* nesse processo;

7. Referências bibliográficas

- Abou-Arab, A. A. K.** 2002. Degradation of organochlorine pesticides by meat starter in liquid media and fermented sausage. *Food and Chemical Toxicology* 40: 33–41
- Baldrian, P.** 2006. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Letters* 30:215-242.
- Ballaminut, N., & Matheus, D. R.** 2007. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. *Brazilian Journal of Microbiology*. **in press.**
- Bao, W., Fukushima, Y. & Jensen, K.A.** 1994. Oxidative degradation of non phenolic lignin durin lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *Federation of European Biochemical Societies*. 354: 297-300.
- Barr, D. P. & Aust, S. D.** 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science and Technology* 28: 78-87.
- Bogan B. W. & Lamar R. T.** 1995. One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporum*. *Appl Environ Microbiol* 61:2631–5.
- Bollag, J.-M., Chu, H.-L., Rao M. A. & Gianfreda, L.** 2003. Enzymatic oxidative transformation of chlorophenol mixtures. *J. Environ. Qual.* 32:63–69.
- Bollag, J.-M.** 1992. Decontaminating soil with enzymes. An *in-situ* method using phenolic and anilinic compounds. *Environmental Science and Technology* 26: 1876-1881.
- Bonomo, R. P., Cennamo, G., Puerrillo, R., Santoro, A. M., Zapala, R.** 2001. Comparison of three fungal laccases from *Rigidoporus lignosus*, *Pleurotus ostreatus*: correlation between conformation changes e catalytic activity. *J. Inorg. Biochem.* 83: 67-75.

- Bourbonnais, R., & Paice, M. G.** 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. Federation of European Biochemical Societies. 267: 99–102.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., Freiermuth, B., Bodie, E. & Bornemann, S.** 1996. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. Applied and Environmental Microbiology. 63: 4627-4632.
- Bradford M. M.** 1976. A rapid, and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248–54.
- Bumpus, J. A., Tien, M., Wright, D. & Aust, S. D.** 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. Science 228: 1434-1436.
- Call, H.P.& Mücke, L.** 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic system, especialmente laccase-mediator-system (Lignozym –process). Journal of Biotechnology. 53, 2909-2913.
- Camarero, S., Bockle, B., Martinez, M.J. & Martinez, A.T.,** 1996. Manganese-mediated lignin-degradation by *Pleurotus pulmonarius*. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1070–1072.
- Cambria, M. T., Cambria, A., Ragusa, S. & Rizzarelli, E.** 2000. Production, Purification, and Properties of an Extracellular Laccase from *Rigidoporus lignosus*. Protein Expression and Purification 18: 141–147.
- Cameron, M. D., Timofeevski, S. & Aust, S. D.** 2000. Enzimology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. Applied Microbiology Biotechnology 54: 751-758.
- Caramelo L., Martinez M. J. & Martinez AT.** 1999. A search for ligninolytic peroxidases in the fungus *Pleurotus eryngii* involving alpha-keto-gamma- thiomethylbutyric acid and lignin model dimmers. Applied and Environmental Microbiology. 65: 916–22.
- Claus, H.** 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. Review Micron 35: 93–96.

- Claus, H., Faber, G. & König, H.,** 2002. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 672–678.
- Clemente, A. R., Anazawa, T. A. & Durrant, L. R.** 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi. *Brazilian Journal of Microbiology.* 32: 255-261.
- Coll, P. M., Fernandez-Abalos, J. M., Villanueva, J. R.; Santamaria, R. & Perez, P.** 1993. Purification and Characterization of a Phenoloxidase (Laccase) from the Lignin-Degrading Basidiomycete PM1 (CECT 2971) *Applied and Environmental Microbiology* 59: 2607-2613.
- Couto, S. R. & Herrera, J. L. T.** 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances* 24: 500–513.
- Couto, S. R. Sanromán, M. & Gübitz, G. M.** 2005. Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsute*. *Chemosphere* 58: 417-422
- D'Annibale, A., Rosetto, F., Leonardi, V., Federici, F. & Petruccioli, M.** 2006. Role of Autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental microbiology* 72: 28–36.
- D'Souza, T. M., Merrit, C. S. & Reddy, C. A.** 1999. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5307-5313.
- De Souza, C. G. & Peralta, R. M.** 2003. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *Journal of Basic Microbiology.* 43: 278-286.
- Dekker, R. F. H. & Barbosa, A. M.** 2001. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. *Enzyme and Microbial Technology* 28: 81-88.

- Dekker, R. F. H., Ling, K. L. & Barbosa, A. M.** 2000. A simple method for monitoring chromatography column eluates for laccase activity during enzyme purification *Biotechnology Letters* 22: 105-108.
- Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Ostergaard, P., Schneider, P., Svendsen, A. & Davies, G.J.** 2001. The structure of laccase from *Coprinus cinereus* at 1.6 Å resolution: evidence for different type 2 Cu-depleted isoforms. *Acta Crystallography*. D57: 333-336.
- Dupont, R.R., Bruell, C.J., Marley, M.C., Downey, D.C., Norris, R.D.,Hulling, S.G., Pivets, B.** 1997. *Bioremediation*. Annapolis: American Academy of Environmental Engineers and USEPA.
- Durán, N. & Esposito, E.** 1997. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (eds) *Microbiologia Ambiental*. Embrapa-CNPMA, Jaguariúna, pp.269-292.
- Durán, N. & Esposito, E.** 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental* 28: 83–99.
- Durán,N., Rosa, M. A., D’Annibale, A. & Gianfreda L.** 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 3: 907–931.
- Eggert, C., Temp, U., & Eriksson, K-E.** 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied And Environmental Microbiology* 62:1151–1158.
- Fabbrini, M., Galli, C. & Gentili, P.** 2002. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16: 231–240.

- Farnet, A. M., Criquet, S., Pocachard, E., Gil, G. & Ferre, E., 2002.** Purification of a new isoform of laccase from a *Marasmius quercophilus* strain isolated from a cork oak litter (*Quercus suber* L.). *Mycologia* 94: 735–740.
- Fiechter, A. 1993.** Function and synthesis of enzymes involved in lignin degradation. *Journal of Biotechnology* 30: 49-55.
- Field, J. A. & Sierra, R. 2004.** Review of scientific literature on microbial dechlorination and chlorination of key chlorinated compounds *In: 14th Quarterly Report Euro Chlor* 6-55.
- Filip Z. & Claus H.** Effect of soil minerals on the formation of enzymes and their possible use in remediation of chemically polluted sites. 1995. *In: Huang, P. M., Berthelin, J., Bollag, J.M., McGill, W.B., Page A.L. (eds). Environmental impacts of soil component interactions. CRC Press, Boca Raton, pp. 407–19.*
- Freire, R. S., Pelegrini, R., Kubota, I. T., Duran, N. & Peralta-Zamora, P. 2000.** Revisão: Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova* 23: 504-511.
- Fukushima, Y. & Kirk, T.K. 1995.** Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (3): 872-876.
- Galhaup, C. Wagner, H. Hinterstoisser & B. Haltrich, D. 2002.** Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 529–536.
- Gerini, F., Roccatano, D., Baciocchi, E., & Di Nola, A. .2003** Molecular dynamics simulations of lignin peroxidase in solution. *M. Biophysical Journal* 84: 3883–3893.
- Gomes, S. A. S. S. & Rebelo, M. J.F. 2003.** A new laccase biosensor for polyphenols determination. *Sensor* 3: 166-175.

- Guillen, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J. & Evans, C.S.** 1994. Hydrogen peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 41: 465-470.
- Gutiérrez, A.** 1995. Exopolissacarídios y metabolitos aromáticos de *Pleurotus*: Naturaleza y función en la degradación de la lignina. Tese de doutorado, Universidade de Sevilha, Sevilha 1213.
- Haas, R. Tsivunchyk, O. Steinbach, K. Löw, E. V. Scheibner & K. Hofrichter, M.** 2004. Conversion of adamsite (phenarsarzin chloride) by fungal manganese peroxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 564–566.
- Haemmerli, S.D.; Schoemaker, H.E.; Schmidt, H.W.H.; Leisola, M.S.** 1987 Oxidation of veratryl alcohol by the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 220: 149-154.
- Hägglom, M. M. & Valo, R.** 1995. Bioremediation of chlorophenol wastes. In: Young, L. Y, Cerniglia, C. E. (eds). *Microbiol – transformation and degradation of toxic organic chemical*. Wiley-Liss, New York, pp 379-434.
- Hägglom, M. M.** 1992. Microbiol breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiology Review* 103: 29-72.
- Hammel, K.E., Green, B. & Gai, W.Z.** 1991. Ring fission of anthracene by a eukaryote. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA*. 88: 10605-10608.
- Hammel, K. E., Kapich, A. N., Jensen Jr., K. A. & Ryan, Z. C.** 2002. Review: Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 445-453.
- Hatakka, A.** 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* 13: 125-135.

- Hawari, J., Beaudet, S., Halasz, A., Thiboutot, S. & Ampleman, G.** 2000. Microbial degradation versus mineralization. *Appl. Microbiol Biotechnol* 54: 605-618.
- Heinfling, A., Martinez, M.J., Martinez, A.T., Bergbauer, M. & Szewzyk, U.** 1998. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2788–2793.
- Hilden, L., Johansson, G., Pettersson, G., Li, J., Ljungquist, P. & Heriksson, G.** 2000 Do the extracellular enzyme cellobiose dehydrogenase form a pathway in lignin biodegradation? *Federation of European Biochemical Societies*. 477: 78-83.
- Hofer, C., Schlosser, D.** 1999. Novel enzymatic oxidation of Mn²⁺ to Mn³⁺ catalyzed by a fungal Lacase. *Federation of European Biochemical Societies* 451: 186-190.
- Hofrichter M.** 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidases (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30: 454-466.
- Hofrichter, M.** 1999. Review: Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 27, 175-185.
- Hofrichter, M., Ziegenhagen, D., Vares, T, Friedrich, M., Jäger, M.G. & Fritsche, W.** 1998. Oxidative decomposition of malonic acid as basis for the action of manganese peroxidases in the absence of hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 434: 362-6.
- Hoshino, F, Kajino, T, Sugiyama, H., Asami, O & Takahashi, H.** 2002. Thermally stable and hydrogen peroxide tolerant manganese peroxidases (MnP) from *Lenzites betulina*. *FEBS Letters*, 530: 249-252
- Itoh, K., Fujita, M., Kumano, K., Suyama, K., Yamamoto, H.** 2000. Phenolic acids affect transformations of chlorophenols by a *Coriolus versicolor* laccase. *Soil biology & biochemistry* 32: 85-91.

- Johannes, C. & Majcherczyk, A.** 2000. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology* 78: 193–199.
- Johannes, C., Majcherczyk, A. & Huttermann, A.** 1996. Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 46: 313-317.
- Jordaan, J., Pletschke, B.I. & Leukes, W.D.** 2004. Purification and partial characterization of a thermostable laccase from an unidentified basidiomycete. *Enzyme and Microbial Technology* 34: 635–641.
- Jung, H., Xuc, F. & Lia, K.** 2002. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 161–168.
- Kapich, A. N., Jensen, K. A. & Hammel, K.E.** 1999. Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. *Federation of European Biochemical Societies*. 461: 115-119.
- Kersten, J. P., Tien, M., Kalyanaraman, B. & Kirk, T.K.** 1985. The ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. *Journal of Biological Chemistry* 260: 2609-12.
- Kersten, P.J. & Kirk, T.K.** 1987. Involvement of a new enzyme, glioxal oxidase in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*. 169: 2195-2201.
- Keum, Y. S., Li, Q. X.** 2004. Fungal laccase – catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 56: 23-30.
- Kirk, T. K.** 1971. Effects of microorganisms on lignin. *Annual Review of Phytopatology* 9: 185-210.
- Kirk, T. K. & Farrel, R. L.** 1987. Enzymatic “combustión”: The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41: 465-505.

- Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A. & Gold, M. H.** 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. Federation of European Biochemical Societies. 169: 247-250.
- Lamar, R. T. & Dietrich, D. M.** 1992. Use of lignin-degrading fungi in the disposal of pentachlorophenol-treated wood. Journal of Industrial Microbiology 9: 181-191.
- Lamar, R. T., Davis, M. K., Dietrich, D. M. & Glaser, J. A.** 1994. Treatment of a pentachlorophenol and creosote-contaminated soil using the lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida*: a field demonstration. Soil Biology and Biochemistry 26: 1603-1611.
- Law, W. M., Lau, W. N., Lo, K. L., Wai, L. M. & Chiu, S.W.** 2003. Removal of biocide pentachlorophenol in water system by the spent mushroom compost of *Pleurotus pulmonarius*. Chemosphere 52: 1531–1537.
- Leisinger, T.** 1983. Microorganisms and xenobiotic compounds. Experientia 39: 1183-1191.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A. Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-Wasilewska, M; Cho, N. & Hofrichter, M.** 1999. Review: Biodegradation of lignin by white rot fungi. Fungal Genetics and Biology, 27: 175-185.
- Li, K., Xu, F. & Eriksson, K-E. L.** 1999. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. Applied and Environmental Microbiology 65: 2654–2660.
- Lin, J-E., Wang, H. Y. & Hickey R. F.** 1990. Degradation kinetics of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnology and Bioengineering 35: 112-1134.
- Lineweaver H. & Burk, D.** 1934. The determination of the enzyme dissociation. J. Am. Chem Soc 56: 658-666.

- Lobos, S., Larraín, J., Salas, L., Cullen, D. & Vicuna, R.** 1994. Isozymes of manganese dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Microbiology*. 140: 1691-1698.
- Lorenzo, M., Moldes, D., Couto, S. R. & Sanromán, M. A.** 2005. Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds *Chemosphere*, 60 (8): 1124-8.
- Machado, K. M. G. & Matheus, D. R.** 2006. Biodegradation of remazol brilliant blue r by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 468-473.
- Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Monteiro, R. T. R & Bononi, V. L. R.** 2005. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 297–301.
- Marcial, J., Barrios-Gonzalez, J. & Tomasini, A.** 2006. Effect of medium composition on pentachlorophenol removal by *Amylomyces rouxii* in solid-state culture. *Process Biochemistry* 41: 496–500.
- Martínez, A. T.** 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microbial Technology*. 30: 425-444.
- Martínez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M. J., Gutiérrez, A. & del Río, J. C.** 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin *International Microbiology* 8: 195-204.
- Matheus, D. R. & Machado, K. M. G.** 2002. Biorremediação: potencial de aplicação para POPs. *In: Fernicola, N. A. G & Oliveira, S. S. (Orgs.). Produtos orgânicos Persistentes – POPs, CRA, Salvador*. 13: 479-500.

- Matheus, D. R. & Okino, L. K.** 1998. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. *In: Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos – noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas.* Bononi, V. L. R. e Grandi, R. A. P. (eds.). São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado de Meio Ambiente. 184p.
- Matheus, D. R., Bononi, V. L. R. & Machado, K. M. G.** 2000. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16: 415-421.
- Matheus, D. R., Bononi, V. L. R., Machado, K. M. G., Silva, R. R. & Rodrigues, T. A.** 2003. Growing Basidiomycetes In: Magar, V. S., Kelley, M. E. (eds.) *Bioreactors to be Applied To Bioremediation of HCB in Soil.* Battelle Press, Columbus, pp 139-146.
- Mayer, A. M. & Staples, R. C.** 2002. Review: Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551–565.
- Mc Allister, K. A., Lee, H. & Trevors, J. T.** 1996. Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation* 7:1-40.
- Mester T. & Field JA.** 1998. Characterization of a novel manganese peroxidase–lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. *Journal of Biological Chemistry.* 273: 15412–7.
- Mester T. & Tien, M.** 2000. Oxidation mechanism of lignolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46: 51-59.
- Meunier, B.** 2002. Catalytic degradation of chlorinated phenols. *Science* 296: 270-271.
- Mileski, G. J., Bumpus, J. A., Jurek, M. A. & Aust, S. D.** 1988. Biodegradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 2885-2889.

- Ministério da Saúde**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária- RESOLUÇÃO - RDC N° 164, DE 18 de agosto de 2006 N° 160 – DOU 21/08/06
- Ministério da agricultura**, portaria n° 329, de 02 de setembro de 1985.
- Moldes, D., Lorenzo, M. & Sanromán, M. A.** 2004. Degradation or polymerisation of Phenol Red dye depending to the catalyst system used. *Process Biochemistry* 39: 1811–1815.
- Montiel, A. M., Fernández, F.J., Marcial, J., Soriano, J., Barrios-González, J. & Tomasini, A.** 2004. A fungal phenoloxidase (tyrosinase) involved in pentachlorophenol degradation. *Biotechnology Letters* 26: 1353–1357.
- Morales, I. C. & Pazos, C. B.** 1998. Pentaclorofenol: toxicología y riesgos para el ambiente. *Madera y Bosques* 4:21-37 21.
- Moreira Neto, S. L.** 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação de mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo, 124 p.
- Moreira, P. R. Duez, C. Dehareng, D. Antunes, A. Almeida-Vara, E. Frere, J. M. Malcata, F. X. & Duarte, J.C.** 2005 Molecular characterisation of a versatile peroxidase from a *Bjerkandera* strain. *Journal of Biotechnology* 118 339–352.
- Munoz, C., Guillen, F., Martinez, A. T., & Martinez, M. J.** 1997. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2166–2174
- Murugesan, K., Arulmani, M; Nam, I. H., Kim, Y. M., Chang, Y. S. & Kalaichelvan, P. T.** 2006. Purification and characterization of laccase produced by a white rot fungus *Pleurotus sajor-caju* under submerged culture condition and its potential in decolorization of azo dyes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72: 939–946.

- Niku-Paavola, M. L., Fagerström, R., Kruus, K. & Viikari, L.** 2004. Thermostable laccases produced by a white-rot fungus from *Peniophora* species. *Enzyme and Microbial Technology* 35:100–102.
- Novotny, C., Svobodova, K., Erbanova, P., Cajthaml, T., Kasinatha, A., Lang, E. & Sasek, V.** 2004. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1545–1551.
- Okeke, B. C., Paterson, A., Smith, J. E., Watson-Craik, I. A.** 1997. Comparative biotransformation of pentachlorophenol in soils by solid substrate cultures of *Lentinula edodes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48: 563-569.
- Okino, L. K., Machado, K. M. G., Fabris, C. & Bononi, V. L. R.** 2000. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16: 889-893.
- Ollikka, P., Alhonmäki, K., Leppänen, V.M., Glumoff, T., Rajola, T. & Suominen, I.** 1993. Decolorization of azo, triphenylmethane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 4010-4016.
- Palmieri, G., Giardina P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A. & Sannia, G.** 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J. Biol. Chem.* 272(50):31301–7.
- Palonen, H., Saloheimo, M., Viikari, L. & Kruus, K.** 2003. Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. *Enzyme Microb Technol* 33: 854–862.
- Piontek, K., Antorini, M. & Choinowski, T.** 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 37663–37669.

- Pointing, S. B.** 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57: 20–33.
- Pozdnyakova, N. N., Turkovskaya, O. V., Yudina, E. N. & Rodakiewicz-Nowak, Y.** 2006. Yellow laccase from the fungus *Pleurotus ostreatus* d1: purification and characterization. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42: 56–61.
- Raghukumar, C., D'Souza, T.M. & Thorn, R.G.** 1999. Lignin – modifying enzymes of *Flavodon flavus*, a basidiomycete isolated from a coastal marine environment. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2103-2111.
- Reddy, G. V. B., & Gold, M. H.** 2000. Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. *Microbiology*:146 405–413.
- Ricotta, A., Unz, R. F. & Bollag, J.-M.** 1996. Role of a laccase in the degradation of pentachlorophenol. *Bull. Environmental Contamination and toxicology* 57: 560-567.
- Rodriguez, E., Nuero, O., Guillén, F., Martínez, A. T. & Martínez, M.J.** 2004. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 909-916.
- Rothschild, N., Novotny, C., Sasek, V. & Dosoretz, C. G.** 2002. Ligninolytic enzymes of the fungus *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*): isolation and characterization of lignin peroxidase. *Enzyme and Microbiol technology* 31: 627-633.
- Roy-Arcand, L. & Archibald, F. S.** 1991. Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 13: 194-203.
- Ryan, S., Schnitzhofer, W., Tzano, T., Cavaco-Paulo, A. & Gübitz, G. M.** 2003. An acid-stable laccase from *Sclerotium rolfsii* with potential for wool dye decolourization *Enzyme and Microbial Technology* 33: 766–774.

- Saito, T., Kato, K., Yokogawa, Y., Nishida, M. & Yamashita, N.** 2004. Detoxification of bisphenol a and nonylphenol by purified extracellular laccase from a fungus isolated from soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98: 64–66.
- Saparrat, M. C. N., Guillén, F., Arambarri, A. M., Martínez, A. T. & Martínez, M. J.** 2002. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Corioloopsis rigida* *Applied And Environmental Microbiology* 68: 1534–1540.
- Schlosser, D. & Höfer, C.** 2002. Laccase – catalyzed oxidation of Mn²⁺ in the presence of natural Mn³⁺ chelators as a novel source of extracellular H₂O₂ production and its impact on manganese peroxidase. *Applied and Environmental Microbiology* 68:3514-3522.
- Sedarati, M. R., Keshavarz, T., Leontievsky, A. A. & Evans, C. S.** 2003. Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* immobilized on nylon mesh. *Electronic Journal of Biotechnology* 6: (2).
- Shah, V. & Nerud F.** 2002. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. *Canadian Journal of Microbiology*. 48: 857-870.
- Shannon, M. J. R. & Unterman, R.** 1993. Evaluating bioremediation: distinguishing fact from fiction. *Annu. Rev. Microbiol* 47: 715-738.
- Shim, S. S. & Kawamoto, K.** 2002. Enzyme production activity of *Phanerochaete chrysosporium* and degradation of pentachlorophenol in a bioreactor. *Water Research* 36: 4445–4454.
- Shin, K. S. & Lee, Y. J.** 2000. Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus* *Archives of Biochemistry and Biophysics* 384: 109–115.
- Shleev, S. V., Morozova, O. V., Nikitina, O. V., Gorshina, E. S., Rusinova, T. V., Serezhenkov, V. A., Burbaev, D. S., Gazaryan, I. G. & Yaroplov, A. I.** 2004.

- Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. *Biochimie* 86: 693–703
- Shleev, S., Jarosz-Wilkolazka, A., Khalunina, A., Morozova, O., Yaropolov, A., Ruzgas, T. & Gorton, L.** 2005 Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes. [Bioelectrochemistry](#) 67: 115-124.
- Tayal, A. K., Das, L., & Kaur, I.** 1999. Biodegradation of pentachlorophenol (PCP) by white rot fungal strains screened from local sources and its estimation by high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography* 13: 220–224.
- Tien, M. & Kirk, T. K.** 1988. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. 81: 2280-2284.
- Tortella, G. R., Diez, M. C. & Durán, N.** 2005. Fungal Diversity and Use in Decomposition of Environmental Pollutants. *Critical Reviews in Microbiology* 31: 197–212.
- Ullah, M. A., Bedford, C. T. & Evans, C. S.** 2000. Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolus versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 230-234.
- USEPA.** 1988. Health Advisory Office. Pentachlorophenol. *Contam. Toxicol.* 104:183-194.
- van Acken B., Hofrichter M., Scheibner K., Hatakka A. I., Naveau H. & Agathos S. N.** 1999. Transformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by manganese peroxidase from the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. *Biodegradation* 10: 83–91.
- Van der Gast, C., Whiteley, A. S., Starkey, M., Knowles, C. J. & Tompson, I. P.** 2003. Bioaugmentation strategies for remediating mixed chemical effluents. *Biotechnology Progress.* 19:1156–1161.
- Vieira. S. & Hoffmann, R.** *Estatística Experimental.* São Paulo: Atlas, 1989. 179p.

- Walter, M., Boyd-Wilson, K., Boulb, L., Ford, C., McFadden, D., Chong, B. & Pinfeld, J.** 2005. Field-scale bioremediation of pentachlorophenol by *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 56: 51–57
- Walter, M., Guthrie, J.M., Sivakumaran, S., Parker, E., Slade, A., McNaughton, D. & Boyd-Wilson, K.S.H.**, 2004. Screening of New Zealand native white-rot isolates for PCP degradation. *Bioremediation Journal* 7: 119–128.
- Wang, Y., Vazquez-Duhalt, R. & Pickard, M. A.** 2001. Effect of growth conditions on the production of manganese peroxidase by three strains of *Bjerkandera adusta*. *Canadian Journal of Microbiology*. 47:277–82.
- Wang, Y, Vazquez-Duhalt, R. & Pickard, M.A.** 2003. Manganese–lignin peroxidase hybrid from *Bjerkandera adusta* oxidizes polycyclic aromatic hydrocarbons more actively in the absence of manganese. *Canadian Journal of Microbiology*. 49:675–82.
- Wariishi, H., Dunford, H. B., MacDonald, I. D. & Gold, M. H.** 1989. Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Transient state kinetics and reaction mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 264: 3335–3340.
- Wesenberg, D, Kyriakides, I. & Agathos, S.** 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents *Biotechnology Advances* 22: 161–187.
- Wilson, K. & Walker, J.** 2000. *Principles and Techniques of practical biochemistry*. 5^o ed. Cambridge Press.
- Wilson, K. & Walker, J.** 2000. *Principles and Techniques of practical biochemistry*. 5^o ed. Cambridge Press.
- Xiao, Y. Z., Tu, X. M., Wang, J., Zhang, M., Cheng, Q, Zeng, W. Y. & Shi, Y. Y.** 2003. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 700–707.

- Yaropolov, A.I.; Skorobogatko, O.V. & Vaartanov, S. S.** 1994. Laccase: properties, catalytic mechanism and applicability. *Applied and Biotechnology*. 49: 257-280.
- Yinghui, D., Qiuling, W. & Shiyu, F.** 2002. Laccase stabilization by covalent binding immobilization on activated polyvinyl alcohol carrier. *Letters in Applied Microbiology* 35: 451–456
- Zavarzina, A. G., Leontievsky, A. A., Golovleva, L. A., Tromov, S.** 2004. Biotransformation of soil humic acids by blue laccase of *Panus tigrinus* 8/18: an *in vitro* study. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 359–369.
- Zhu, X., Gibbons, J., Garcia-Rivera, J., Casadevall, A. & Williamson, P. R.,** 2001. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infection and Immunity*. 69:5589–5596.
- Zouari, H., Labat, M. & Sayadi, S.** 2002. Degradation of 4-chlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in free and immobilized cultures. *Bioresource Technology* 84: 145-150.

6. Resumo geral

Psilocybe castanella CCB444, com capacidade comprovada de mineralizar pentaclorofenol e hexaclorobenzeno, foi avaliado em processo de biorremediação de solo contaminado com organoclorados. Este trabalho descreve a identificação da principal enzima ligninolítica, lacase, produzida por este fungo, purificação parcial e caracterização, bem como a avaliação da capacidade dessa enzima em degradar o pentaclorofenol (PCP) *in vitro*. Atividade de lacase foi detectada durante crescimento de *P. castanella* em solo acrescido de gesso, tween 20 e óleo vegetal, aos 19 dias de cultivo. O extrato enzimático extracelular foi obtido com tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5 (1:3 m/v). Para a purificação parcial da lacase foram empregados os processos de precipitação de proteínas com 90% de saturação de sulfato de amônio, clarificação (PVPP 4%), ultrafiltração (10KDa) e cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-200). A reação de degradação do PCP incluiu, a lacase purificada na concentração de 7,5 UL⁻¹, tampão acetato de sódio, água e solução de PCP diluído em etanol. A mistura de reação foi incubada no escuro durante 24h. A quantificação do PCP foi determinada por HPLC. A eficiência da enzima foi avaliada em diferentes concentrações de PCP, valores de pH e presença de substâncias inibidoras e mediadoras. A massa molecular da enzima foi estimada em 64 KDa, o Km aparente foi de 4,6 mM e a Vmax de 11,16 UL⁻¹. Os valores de temperatura e pH ótimos foram de 50°C e 2,5, respectivamente. A lacase apresentou-se estável a temperatura ambiente, mantendo 96% de atividade após 24 h de incubação. Meia-vidas de 19 h, 17 h e 47 min foram verificadas a 55°C, 60°C e 80°C, respectivamente. A atividade enzimática foi inibida totalmente pela adição de azida sódica e sulfato de ferro II e estimulada pelo sulfato de cobre II e de manganês II. As maiores porcentagens de degradação do PCP foram obtidas nas concentrações de 100 e de 150 µg/mL de PCP e em pH 3,5. Substâncias como o ABTS e RBBR, conhecidas por serem mediadores de lacase, não favoreceram a degradação do PCP, enquanto o cloreto de ferro e o sulfato de ferro inibiram completamente a transformação do PCP pela lacase.

Palavras-chaves: purificação de lacase, enzima ligninolítica, basidiomicetos, *Psilocybe castanella*, degradação *in vitro* do pentaclorofenol.

ANEXO 1

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Redução do pentaclorofenol (%) versus variação da concentração inicial de pentaclorofenol**

(Minitab Release 15– 2007)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Concentração	fixo	4	50; 100; 150; 200

ANÁLISE DE VARIÂNCIA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE PENTACLOROFENOL, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Concentração	3	0,72824	0,72824	0,24275	56,33	0,000
Erro	8	0,03447	0,03447	0,00431		
Total	11	0,76271				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valor de F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo > 99% ($P < 0,01$); ** = Probabilidade de haver efeito significativo > 95% ($P < 0,05$); * = Probabilidade de haver efeito significativo > 90% ($P < 0,1$).

TESTE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE PENTACLOROFENOL

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
50	100	0,487667	0,05360	0,0001***
	150	0,492000	0,05360	0,0001***
	200	-0,005667	0,05360	0,9995
100	150	0,0043	0,05360	0,9998
	200	-0,4933	0,05360	0,0001***
150	200	-0,4977	0,05360	0,0001***

ANEXO 2

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Redução do pentaclorofenol versus valores de pH**

(Minitab Release 15– 2007)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
pH	fixo	3	3,5; 4,0; 4,5;

ANÁLISE DE VARIÂNCIA REDUÇÃO DO PENTACLOROFENOL USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
pH	2	0,098737	0,098737	0,049369	9,46	0,010**
Erro	7	0,036539	0,036539	0,005220		Total
	9	0,135276				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valor de F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo > 99% ($P < 0,01$); ** = Probabilidade de haver efeito significativo > 95% ($P < 0,05$); * = Probabilidade de haver efeito significativo > 90% ($P < 0,1$).

TESTE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: REDUÇÃO DO PENTACLOROFENOL EM DIFERENTES VALORES DE PH

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
3,5	4,0	-0,1331	0,05109	0,0797*
	4,5	-0,2655	0,06257	0,0093***
4,0	4,5	-0,1323	0,06257	0,1561

ANEXO 3

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Redução de pentaclorofenol versus Mediadores**

(Minitab Release 15– 2007)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Mediadores	fixo	9	NaN ₃ , RBBR, ABTS, H ₂ O, MnSO ₄ , H ₂ O ₂ , SAB, FeCl ₃ , FeSO ₄

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA REDUÇÃO DE PENTACLOROFENOL, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Mediadores	8	1,27303	1,27303	0,15913	52,88	0,000***
Erro	17	0,05115	0,05115	0,00301		Total
	25	1,32418				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studentt; *** = Probabilidade de haver efeito significativo > 99% ($P < 0,01$); ** = Probabilidade de haver efeito significativo > 95% ($P < 0,05$); * = Probabilidade de haver efeito significativo > 90% ($P < 0,1$).

TESTE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: MEDIADORES POR MEDIADORES

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
NaN ₃	RBBR	-0,1025	0,05008	0,5348
	ABTS	-0,1305	0,04190	0,1078*
	H ₂ O	-0,1763	0,04479	0,0226**
	MnSO ₄	-0,2290	0,04479	0,0022***
	H ₂ O ₂	-0,2895	0,05008	0,0006***
	SAB	-0,4210	0,04479	0,0000***
	FeCl ₃	-0,6430	0,04479	0,0000***
	FeSO ₄	-0,6430	0,04479	0,0000***
RBBR	ABTS	-0,0280	0,04751	0,9994
	H ₂ O	-0,0738	0,05008	0,8524
	MnSO ₄	-0,1265	0,05008	0,2856
	H ₂ O ₂	-0,1870	0,05486	0,0628*
	SAB	-0,3185	0,05008	0,0002***
	FeCl ₃	-0,5405	0,05008	0,0000***
	FeSO ₄	-0,5405	0,05008	0,0000***
ABTS	H ₂ O	-0,0458	0,04190	0,9674
	MnSO ₄	-0,0985	0,04190	0,3668
	H ₂ O ₂	-0,1590	0,04751	0,0705*
	SAB	-0,2905	0,04190	0,0001***
	FeCl ₃	-0,5125	0,04190	0,0000***
	FeSO ₄	-0,5125	0,04190	0,0000***

H ₂ O	MnSO ₄	-0,0527	0,04479	0,9513
	H ₂ O ₂	-0,1132	0,05008	0,4141
	SAB	-0,2447	0,04479	0,0011***
	FeCl ₃	-0,4667	0,04479	0,0000***
	FeSO ₄	-0,4667	0,04479	0,0000***
MnSO ₄	H ₂ O ₂	-0,0605	0,05008	0,9438
	SAB	-0,1920	0,04479	0,0113**
	FeCl ₃	-0,4140	0,04479	0,0000***
	FeSO ₄	-0,4140	0,04479	0,0000***
H ₂ O ₂	SAB	-0,1315	0,05008	0,2453
	FeCl ₃	-0,3535	0,05008	0,0001***
	FeSO ₄	-0,3535	0,05008	0,0001***
SAB	FeCl ₃	-0,2220	0,04479	0,0030***
	FeSO ₄	-0,2220	0,04479	0,0030***
FeCl ₃	FeSO ₄	0,0000	0,04479	1,000