

SÉRGIO LUIZ MOREIRA NETO

**Enzimas ligninolíticas produzidas por
Psilocybe castanella CCB444 em solo
contaminado com hexaclorobenzeno**

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

SÃO PAULO

2006

SÉRGIO LUIZ MOREIRA NETO

**Enzimas ligninolíticas produzidas por
Psilocybe castanella CCB444 em solo
contaminado com hexaclorobenzeno**

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

ORIENTADOR: DR. DÁCIO ROBERTO MATHEUS

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Moreira Neto, Sérgio Luiz

M838e Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno / Sérgio Luiz Moreira Neto -- São Paulo, 2006.

110 p. il.

Dissertação (mestrado)—Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2006

Bibliografia.

1. Basidiomicetos. 2. Biodegradação. 3. Biorremediação. I. Título

CDU 582.284

Aos meus pais, Luiz e Suely,
pelas valorosas lições de vida e
pela eterna confiança em minhas escolhas.

Aos meus irmãos Guilherme e Léo,
pelos momentos de felicidade.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Dácio R. Matheus pela orientação, confiança e amizade.

À Dra. Kátia M. G. Machado pela “co-orientação”, incentivos, amizade e pelas primeiras lições na pesquisa científica.

À toda equipe do projeto Biosol: Cida, Glauciane, Marina, Nara, Ricardo, Ricardinho, Stephanie, Dra. Vera Vitalli, Dra. Vera Bononi e William, pelo apoio durante a realização dos experimentos e à Dona Josefa, *in memorian*, que partiu deixando saudade.

Aos professores e pesquisadores da Seção de Micologia e Liquenologia, Dra. Adriana, Dra. Carmen, Dra. Iracema, Dra. Marina, PqC Michel, PqC Milena, Prof. Norberto, Dra. Rosely, e demais pesquisadores, pelos ensinamentos.

Às minhas irmãzinhas Carla e Lui e ao Ivan pela convivência e amizade.

Aos alunos da Micologia e Liquenologia, Adriano, Alexandra, Carol, Cristiane, Filipe, Maria Luiza, Milton, Luciana Canêz, Luciana Gimenez, Patrícia e Priscila.

À Galera do alojamento do IBt, Andréia, Bárbara, Denílson, Diógina, Eduardo, Izilda, Josimara, Neto, Vinícius e demais.

Aos colegas de Pós-Graduação e funcionários do IBt.

À Mirian e Amarílis da Seção de Ecologia pelo apoio técnico na determinação de nitrogênio do substrato fúngico.

À Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela colaboração nas análises cromatográficas.

À Dra. Ângela Machuca pelo curso de purificação e caracterização de enzimas ligninolíticas.

À Dra. Clarice A. Osaku pelas sugestões na caracterização enzimática.

À Dra. Adriane M. F. Milagres pelas críticas e sugestões.

Aos amigos de Santos.

Aos ex-alunos e professores do curso de Biologia da Unisantos, pelo incentivo e apoio.

Aos meus avôs Sérgio e Antônio, *in memorian*, saudade.

À minha Vó Dina pela ajuda e por todas as lições sobre a vida.

Aos meus pais Luiz e Suely, e aos meus irmãos Guilherme e Léo, graças a vocês conseguimos realizar esta etapa na minha vida.

À FUNDEPAG pelo suporte técnico-financeiro.

À CAPES pelo auxílio financeiro através da bolsa de mestrado, concedida pelo Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE QUADROS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
 I. RESUMO/ABSTRACT.....	 1
 II. INTRODUÇÃO.....	 3
 III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	 7
1. Hexaclorobenzeno (HCB).....	7
1.1 Características gerais.....	7
1.2 Emissões, distribuição mundial e contaminação na Baixada Santista.....	8
1.3 Efeitos à saúde humana e ao meio ambiente.....	13
1.4 Biodegradação.....	15
1.5 Biodegradação por basidiomicetos ligninolíticos.....	15
2. Basidiomicetos lignocelulolíticos.....	16
2.1 Biodegradação da lignina e de poluentes orgânicos.....	20
3. Enzimas ligninolíticas.....	31
3.1 Lignina peroxidases (LiP).....	32
3.2 Manganês peroxidases (MnP).....	34
3.3 Lacases.....	39
3.4 Peroxidases versáteis.....	46
 IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	 47
1. Fungo.....	47
2. Solo.....	47
3. Inóculo.....	48
3.1 Determinação do carbono orgânico do substrato sólido.....	49
3.2 Determinação de nitrogênio total do substrato sólido.....	49
3.2.1 Digestão sulfúrica.....	50
3.2.2 Destilação.....	50
3.3 Ajuste da relação C/N do substrato sólido.....	51

4. Sistema de cultivo.....	51
5. Inoculação e incubação.....	52
6. Determinação do crescimento micelial.....	52
7. Extrato enzimático.....	52
8. Atividades ligninolíticas.....	52
8.1 Lacases.....	52
8.2 Peroxidases.....	53
8.3 Manganês peroxidases (MnP).....	53
8.4 Lignina peroxidases (LiP).....	53
8.5 Cálculo da atividade enzimática.....	54
9. Caracterização físico-química das atividades ligninolíticas.....	54
9.1 pH ótimo e estabilidade ao pH.....	54
9.2 Temperatura ótima e estabilidade à temperatura.....	55
9.3 Ação de inibidores e metais na atividade enzimática.....	55
9.4 Efeito da concentração de substrato nas atividades de peroxidases e lacases.....	55
10. Determinação do HCB e organoclorados residuais.....	56
11. Determinação de cloretos.....	56
12. Análises estatística dos resultados.....	56
 V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 57
1. Crescimento e atividade ligninolítica de <i>P. castanella</i> em solo contaminado com HCB.....	57
2. Remoção de HCB e formação de cloretos em solo por <i>P. castanella</i>	62
3. Caracterização do sistema enzimático ligninolítico extracelular de <i>P. castanella</i> em solo contaminado com HCB.....	67
3.1. pH ótimo e estabilidade ao pH das atividades ligninolíticas.....	67
3.2. Temperatura ótima e estabilidade à temperatura das atividades ligninolíticas.....	74
3.3. Efeito de inibidores e metais e K_m aparente.....	80
 VI. CONCLUSÕES.....	 87
 VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 88
 VIII. ANEXO 1.....	 110

ABREVIATURAS

1-HBT = 1-hidroxibenzotriazol

2-Cl-1,4-DMB = 2-Cloro-1,4-dimetoxibenzeno

3-HAA = Ácido 3-hidroxiantrarílico

AAD = Aril álcool desidrogenase

AAO = Aril álcool oxidase

ABTS = ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico)

AV = Álcool veratril (3,4-dimetoxibenzil) ou álcool veratrílico

AVO = Álcool veratrílico oxidase

CCB = Coleção de Cultura de Basidiomicetos

CDH = Celobiose desidrogenase

CG = Cromatografia gasosa

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DMF = Dimetoxifenol

EC = *Enzyme comission* (classificação bioquímica das enzimas)

EDTA = Ácido damino tetra acético

EXG = Exoglucanase

GCH = Glucohidrolase

GOD = Glicose 1-oxidase

GOx = Glioxal oxidase

HCB = Hexalorobenzeno

HPAs = Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HRP = *Horseradish peroxidase* (peroxidase da raiz forte)

HVA = Ácido 3,4-dimetoxifenilacético

LiP = Lignina peroxidase

MEA = Ágar extrato malte

MnP = Manganês peroxidase ou peroxidase dependente do manganês

PCA = Pentacloroanisol

PCF = Pentaclorofenol

PeCB = Pentaclorobenzeno

POD = Piranose oxidase

POP's = Poluentes orgânicos persistentes

PVP = Polivinilpirrolidona

ROS = Espécies reativas de oxigênio

SOD = Superóxido dismutase

TCB-1 = 1,2,4,5 tetraclorobenzeno

TCB-2 = 1,2,3,4 tetraclorobenzeno

LISTA DE QUADROS

Páginas

Quadro 1	Características do hexaclorobenzeno.....	7
Quadro 2	Emissão global de hexaclorobenzeno durante a década de 90.....	10
Quadro 3	Organismos degradadores da lignina.....	17
Quadro 4	Enzimas que atuam na degradação de substratos lignocelulósicos.....	23
Quadro 5	Alguns mediadores sintéticos e naturais.....	27
Quadro 6	Características das enzimas ligninolíticas.....	31
Quadro 7	Enzimas ligninolíticas envolvidas na degradação de poluentes orgânicos.....	66
Quadro 8	pH ótimo de lacases de alguns basidiomicetos.....	70
Quadro 9	Temperatura ótima de lacases de alguns basidiomicetos.....	75

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1	Características físico-químicas do solo.....	48
Tabela 2	Efeito do pH na atividade de lacase de extratos obtidos do crescimento de <i>P. castanella</i> em solo contaminado com hexaclorobenzeno.....	68
Tabela 3	Perda de atividade enzimática após 24h de incubação de extratos obtidos de culturas de <i>P. castanella</i> em solo contaminado com HCB, em pH 2,5 e pH 3,6, à temperatura ambiente.....	71
Tabela 4	Meia vida ($t_{1/2}$) aproximada à 55°C das atividades de lacases e peroxidases de extratos obtidos de culturas de <i>P. castanella</i> em solo contaminado com HCB.....	78
Tabela 5	Perda de atividade enzimática após 24h de incubação à temperatura de 55°C, de extratos obtidos de culturas de <i>P. castanella</i> em solo contaminado com HCB.....	79
Tabela 6	K_m aparente das atividades de lacases e peroxidases, utilizando ABTS como substrato, de extratos obtidos do crescimento de <i>P. castanella</i> em solo contaminado com HCB.....	84

LISTA DE FIGURAS

Páginas

Figura 1	Biorreatores para ensaios de biorremediação de solo por basidiomicetos.....	4
Figura 2	Distribuição espacial de emissões totais de HCB no Hemisfério Norte.....	11
Figura 3	(A) Uma das áreas contaminadas na região da Baixada Santista. (B) Estação de Espera localizada no Km 67 da Rodovia Padre Manoel da Nóbrega, São Vicente-SP.....	12
Figura 4	Compostos xenobióticos que são degradados por basidiomicetos ligninolíticos.....	20
Figura 5	Segmento de um polímero de lignina.....	21
Figura 6	Unidades fenilpropanóides precursoras da lignina.....	22
Figura 7	Papel do mediador na atividade enzimática de lacase.....	26
Figura 8	Degradação de substratos lignocelulósicos.....	27
Figura 9	Formação de peróxido de hidrogênio por basidiomicetos ligninolíticos.....	28
Figura 10	Geração de radicais hidroxila e os agentes envolvidos na degradação da lignina.....	30
Figura 11	Ciclo catalítico da lignina peroxidase.....	33
Figura 12	Ciclo catalítico da manganês peroxidase.....	35
Figura 13	Mecanismo inicial de peroxidação lipídica por MnP.....	37
Figura 14	Formação de CO ₂ a partir de estruturas aromáticas de lignina por MnP.....	38
Figura 15	Estrutura tridimensional de lacase de <i>Coprinus cinereus</i>	40
Figura 16	Centro de cobre de lacase de <i>Bacillus subtilis</i>	41
Figura 17	Ciclo catalítico de lacases.....	42
Figura 18	Transformações redox de ABTS à radical catiônico e dicatiônico.....	44
Figura 19	Colônia de <i>Psilocybe castanella</i> CCB444 em MEA (2%).....	47
Figura 20	Inóculo de <i>Psilocybe castanella</i> crescido em substrato a base de bagaço de cana-de-açúcar e farinha de soja.....	48
Figura 21	Sistema de cultivo de <i>P. castanella</i> em solo contaminado com HCB.....	51
Figura 22	Crescimento de <i>Psilocybe castanella</i> em solo contaminado com HCB.....	58
Figura 23	Cinética de produção de atividade de peroxidases por <i>Psilocybe castanella</i> em solo contaminado com HCB.....	59
Figura 24	Concentração de hexaclorobenzeno (HCB) durante crescimento de <i>P. castanella</i> em solo contaminado com HCB e controle (solo não inoculado).....	63
Figura 25	Concentração de pentaclorofenol durante crescimento de <i>P. castanella</i> em solo contaminado com HCB e controle (solo não inoculado).....	63
Figura 26	Concentração de pentaclorobenzeno (PeCB) durante crescimento de <i>P. castanella</i> em solo contaminado com HCB e controle (solo não inoculado).....	64
Figura 27	Concentração de hexaclorobenzeno (HCB), pentaclorobenzeno (PCB), pentaclorofenol (PCF) e cloretos inorgânicos com 0 e 70 dias de crescimento de <i>P. castanella</i>	65
Figura 28	Efeito do pH na atividade relativa de peroxidases de extratos obtidos do crescimento de <i>P. castanella</i> em solo contaminado com HCB.....	68

Figura 29	Estabilidade das atividades de lacases e peroxidases ao pH 2,5 e ao pH 3,60, por 6 horas, de extratos obtidos do crescimento de <i>P. castanella</i> em solo contaminado com HCB.....	71
Figura 30	Estabilidade das atividades de peroxidases e lacases ao pH 3,60 por 24 horas, de extratos obtidos nos picos de máxima atividade ligninolítica de <i>P. castanella</i> em solo...	73
Figura 31	Efeito da temperatura nas atividades de peroxidases e lacases de extratos obtidos do crescimento de <i>P. castanella</i> em solo contaminado com HCB.....	74
Figura 32	Efeito da temperatura nas atividades de peroxidases e de lacases de extratos obtidos nos picos de máxima atividade ligninolítica de <i>P. castanella</i> em solo.....	76
Figura 33	Estabilidade das atividades de lacases e peroxidases a 55°C, por 60 minutos, de extratos obtidos do crescimento de <i>P. castanella</i> em solo contaminado com HCB.....	76
Figura 34	Estabilidade das atividades de lacases e peroxidases a 55°C, por 12 horas, de extratos obtidos do crescimento de <i>P. castanella</i> em solo contaminado com HCB.....	77
Figura 35	Estabilidade das atividades de peroxidases e lacases a 55°C, por 24 horas, de extratos obtidos nos picos de máxima atividade ligninolítica de <i>P. castanella</i> em solo.....	79
Figura 36	Efeito de inibidores na atividade enzimática de extratos obtidos do crescimento de <i>P. castanella</i> em solo contaminado com HCB.....	80
Figura 37	Efeito de metais na atividade enzimática de extratos obtidos do crescimento de <i>P. castanella</i> em solo contaminado com HCB.....	82
Figura 38	Efeito de inibidores e metais na atividade ligninolítica de extratos obtidos nos picos de máxima atividade ligninolítica, durante oxidação do ABTS à 420nm.....	83
Figura 39	Gráficos de Lineweaver-Burk das atividades de peroxidases de extratos obtidos do crescimento de <i>P. castanella</i> em solo-HCB.....	84
Figura 40	Gráficos de Lineweaver-Burk das atividades de peroxidases de extratos obtidos do crescimento de <i>P. castanella</i> em solo-HCB.....	84

I. RESUMO/ABSTRACT

O sistema enzimático ligninolítico de basidiomicetos é o principal responsável pela biodegradação de poluentes orgânicos. *Psilocybe castanella* CCB444 é um basidiomiceto que foi selecionado para avaliação em processos de biorremediação de solos contaminados com hexaclorobenzeno (HCB) e outros organoclorados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição do sistema enzimático de *P. castanella* em solo contaminado com HCB, bem como avaliar a influência deste organoclorado nas atividades ligninolíticas. O fungo foi previamente crescido em substrato a base de bagaço de cana de açúcar e farinha de soja (C/N 90) e inoculado em solo contendo HCB (1104 mg Kg⁻¹ solo), 2,5% de óleo vegetal com tween 20 (1:10) e 70% de umidade a 25°C por 70 dias. A biomassa foi quantificada através da determinação de ergosterol. Extração enzimática foi feita em tampão acetato de sódio, pH 4,8. Atividades de peroxidases e lacases foram determinadas pela oxidação do ABTS; atividades de manganês peroxidase e lignina peroxidase foram determinadas pela oxidação de vermelho de fenol e álcool veratrílico, respectivamente. pH ótimo das atividades ligninolíticas foi avaliado de 2,5-6,0, com tampão acetato de sódio e citrato-fosfato e temperatura ótima de 25-95°C. Estabilidades ao pH e à temperatura foram determinadas durante 24h. K_m aparente e efeito de inibidores e metais foram avaliado durante a oxidação do ABTS. HCB e organoclorados residuais foram quantificados por cromatografia gasosa e cloretos por titulometria potenciométrica. O HCB não interferiu no crescimento do fungo. Com 33 dias de crescimento teve início a fase estacionária. MnP e LiP não foram detectadas. A produção de atividade de peroxidases foi estimulada pela presença de HCB. Maior atividade de peroxidase foi aos 12 dias em solo-HCB, enquanto em solo-controle foi aos 19 dias. A redução da concentração inicial de HCB e a formação de cloretos evidenciaram a participação de *P. castanella* na biodegradação de HCB. Independente da origem do extrato, pH ótimo de atividade de peroxidases e lacases foi 3, com perda de cerca de 80% das atividades após 24h. Diferenças na estabilidade em pH 3,6 e K_m aparente evidenciaram influência do HCB na composição do sistema enzimático produzido por *P. castanella*. Os inibidores confirmaram atividade predominante de lacases.

PALAVRAS-CHAVE: lacase, peroxidases, biodegradação, biorremediação

The ligninolytic enzymatic system of basidiomycetes is the main responsible for the biodegradation of organic pollutants. *Psilocybe castanella* CCB444 is a basidiomycete that has been selected for studies of bioremediation of soils contaminated with hexachlorobenzene (HCB) and other organochlorine compounds. The aim of this dissertation was to evaluate the *P. castanella* enzymatic system composition in soil contaminated with HCB, and evaluate the influence of this organochlorine compound in ligninolytic activities as well. The fungus was previously grown in sugar cane bagasse and soy floor (C/N 90) substrate and inoculated in soil containing HCB (104 mg Kg⁻¹ soil), 25% of vegetal oil with tween 20 (1:10) and 70% of humidity at 25°C for 70 days. The biomass was quantified through ergosterol determination. Enzymatic extraction has been made using sodium acetate buffer, pH 4.8. Peroxidase and laccase activities were determined by phenol red and veratrylic alcohol oxidation, respectively. Optimum pH of ligninolytic activities has been evaluated from 2.5 to 6.0, with sodium acetate and phosphate citrate buffers and optimum temperature from 25 to 95°C. During 24 hours, stability to pH and temperature was determined. Apparent K_m and inhibitor and metals effects were evaluated during the oxidation of ABTS. Residual organochlorine and HCB were quantified by gas chromatography (GC), and chloride ions by potentiometric titration. The HCB did not interfere in the fungus growth. After 33 days of growth the idiophase began. MnP and LiP were not detected. The production of peroxidase activity was stimulated by the presence of HCB in soil. Higher peroxidase activity was determined in the 12th day of fungus incubation in HCB-soil, while in control-soil the same level of activity was determined in the 19th day. The depletion of the HCB initial concentration and production of inorganic chlorides evidenced the participation of *P. castanella* in the HCB biodegradation. In all of the extracts evaluated, optimum pH was 3, either for peroxidase activity or for laccase activity, with a loss of 80% of activity approximately, after 24 hours. Variation in enzymatic stability at pH 3.6 and apparent K_m evidenced influence of HCB in the enzymatic system composition produced by *P. castanella*. The enzymatic inhibitors confirmed predominant activity of laccases.

KEY-WORDS: laccase, peroxidase, biodegradation, bioremediation

II. INTRODUÇÃO

O hexaclorobenzeno (HCB) foi classificado pelo Programa das Nações Unidas para o meio Ambiente (PNUMA) como uma das doze moléculas poluentes orgânicas persistentes (POP) a serem banidas do planeta; seja sua produção direta, como biocida, seja sua produção indireta, como subproduto da fabricação de solventes clorados, seu armazenamento em depósitos ou ainda sua presença como contaminante ambiental. O HCB está largamente disperso no ambiente, tem sido detectado em ar, água, sedimento, solo, biota e sítios remotos em todo o mundo. Os riscos ambientais e à saúde humana são enormes, o que tem gerado um grande esforço mundial para a exclusão destas moléculas dos ciclos produtivos e do meio ambiente.

Nos anos 60 e 70 foram depositados, de forma irregular, resíduos industriais organoclorados em mais de dez pontos na região da Baixada Santista, estado de São Paulo. A contaminação do solo estendeu-se pelos municípios de Cubatão, São Vicente e Itanhaém, em vegetação predominante de restinga. Os resíduos depositados foram de dois tipos: um deles, proveniente da fabricação de tetracloreto de carbono e do percloroetileno, continha principalmente HCB e o outro, proveniente da fabricação de pentaclorofenato de sódio, que continha principalmente pentaclorofenol (PCF). Cerca de 33.000 toneladas de solos contaminados foram removidas e armazenadas num local denominado “Estação de Espera”, onde aguardam tratamento. Estes solos contêm, como contaminante principal, o HCB e constitui um dos maiores passivos ambientais brasileiros a espera de solução (Matheus *et al.* 2001, Machado *et al.* 2005a).

Com o objetivo de avaliar a capacidade de basidiomicetos nativos de degradar os compostos organoclorados presentes nos solos da Baixada Santista, 125 linhagens de fungos foram estudadas quanto à taxa de crescimento, produção de enzimas ligninolíticas, capacidade de descoloração do corante polimérico RBRR, tolerância a altas concentrações de HCB e capacidade de degradar e mineralizar este poluente. *Psilocybe castanella* foi uma das linhagens de fungos basidiomicetos selecionadas para aplicação em solos contaminados com HCB (Matheus *et al.* 2000, Matheus & Machado 2002). Trabalho recente demonstrou a capacidade de *P. castanella* em mineralizar 12% de HCB, onde foram otimizadas as condições de cultivo do fungo em solo com adição de ácidos graxos insaturados e controle da relação C/N do inóculo fúngico, sendo o primeiro relato de mineralização de HCB por basidiomicetos (Matheus 2003). Atualmente, este fungo está sendo avaliado em processo de biorremediação, em biorreatores com 400 Kg de solo, instalados em área no município de São Vicente-SP (Figura 1).

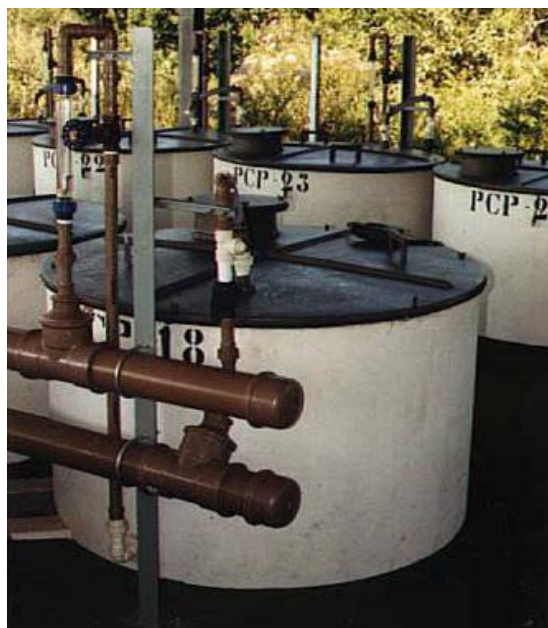


Figura 1. Biorreatores para ensaios de biorremediação de solo por basidiomicetos (Foto: Ricardo R. da Silva - 2004).

Os fungos apresentam uma série de características que os tornam interessantes para aplicação em sistemas de biorremediação. Eles são capazes de crescer sob as condições de estresse ambiental que limitam o crescimento bacteriano. E ainda, o modo de crescimento dos fungos – induzido quimiostaticamente em direção à fonte de carbono orgânico, através do alongamento e ramificação das hifas – permite a colonização de grandes áreas. Desta forma, o contato superficial com o contaminante é otimizado, aumentando sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, sua biodegradação (Dupont *et al.* 1997).

Somente a partir de meados da década de 80 foram apresentadas evidências de que o fungo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* tinha a capacidade de degradar e mineralizar compostos xenobióticos como DDT, lindano (1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano) (Bumpus & Aust 1987), TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina), algumas bifenilas policloradas (PCB's) (Bumpus 1989) entre outros.

Muitas são as evidências de que os mecanismos que atuam na regulação do sistema ligninolítico dos basidiomicetos são os mesmos que atuam na degradação dos xenobióticos e, portanto podem ser também estimulados pela variação das condições de cultivo dos fungos. A capacidade de degradação de diferentes classes de xenobióticos por basidiomicetos ligninolíticos está associada à natureza inespecífica do sistema enzimático ligninolítico e permite que até mesmo misturas complexas de poluentes sejam degradadas (Barr & Aust 1994).

A degradação da lignina e de poluentes orgânicos por fungos basidiomicetos constitui um processo oxidativo, extracelular e relativamente inespecífico. A degradação consiste em um processo multienzimático resultante da ação coordenada de uma série de enzimas do grupo das oxidoredutases, representadas principalmente por lacases, manganês peroxidases, lignina peroxidases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio e de compostos metabólitos intermediários de baixa massa molecular (Kirk & Farrell 1987, Vares *et al.* 1995, Leonowicz *et al.* 1999, Mayer & Staples 2002, Sugiura *et al.* 2003).

A atividade das enzimas ligninolíticas produzidas por estes fungos podem ser determinadas através de espectrofotometria UV/VIS, em reação onde se acompanha a formação de produto oxidado pela enzima. Os resultados são expressos pela Lei de Lambert-Beer em unidades enzimáticas (U), onde 1U é a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1μmol de produto por minuto sob condições definidas. Os substratos enzimáticos mais utilizados para a determinação das atividades de lacases, lignina peroxidases (LiP) e manganês peroxidases (MnP) são o ABTS, o álcool veratrílico e o vermelho de fenol, respectivamente (Kuwahara *et al.* 1984, Tien & Kirk 1984, Bourbonnais & Paice 1988). Estes métodos são simples, versáteis, muito sensíveis e de baixo custo.

Nos estudos com estas enzimas ligninolíticas, torna-se extremamente importante caracterizar as atividades ligninolíticas presente em determinadas condições de crescimento do fungo. Alguns parâmetros como: o pH ótimo de atividade e os limites em que ele se encontra; a temperatura ótima de atividade e estabilidade à temperatura, assim como, as propriedades cinéticas (K_m aparente) são fundamentais para se conhecer as condições ótimas de atuação destas enzimas.

Trabalhos nos laboratórios da Seção de Micologia do Instituto de Botânica têm indicado que o sistema ligninolítico de basidiomicetos varia consideravelmente quando cultivados em solo contaminado (Matheus *et al.* 1997, Machado *et al.* 2006a). Além disso, a presença de compostos orgânicos poluentes pode interferir no perfil do sistema enzimático ligninolítico produzido pelos basidiomicetos (Novotny *et al.* 2004).

As informações obtidas sobre as características físico-químicas das enzimas ligninolíticas presentes durante a biodegradação do HCB em solo por *P. castanella* fornecem quais são as condições ótimas de atuação destas enzimas ligninolíticas. Estas informações podem ainda contribuir para o desenvolvimento de estratégias no processo de biorremediação, visando otimizar a atuação de *P. castanella* na biodegradação de HCB em solo.

Pouco é conhecido sobre a fisiologia deste fungo, em particular em relação ao sistema ligninolítico e a participação dele no mecanismo de degradação de poluentes ambientais. Assim, é de grande importância conhecer as características do sistema ligninolítico produzido por *Psilocybe castanella* presente na degradação de poluentes orgânicos.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a composição do sistema enzimático ligninolítico produzido por *Psilocybe castanella* CCB444, durante crescimento em solo contaminado com HCB, bem como avaliar a influência deste organoclorado na composição do sistema ligninolítico e nas propriedades físico-químicas das enzimas produzidas, visando subsidiar a aplicação deste fungo em processo de biorremediação de solos.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Determinar o crescimento e as atividades ligninolíticas (lacase, peroxidases, LiP e MnP) produzidas por *P. castanella* em solo contaminado com HCB;
- Avaliar a influência do HCB na produção de atividades ligninolíticas durante crescimento de *P. castanella* em solo;
- Caracterizar as atividades ligninolíticas (pH ótimo e estabilidade ao pH, temperatura ótima e a estabilidade à temperatura e efeito de metais e inibidores e K_m aparente) presentes durante crescimento de *P. castanella* em solo contaminado com HCB;
- Avaliar a correlação da atividade ligninolítica e a degradação do HCB em solo por *P. castanella*.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

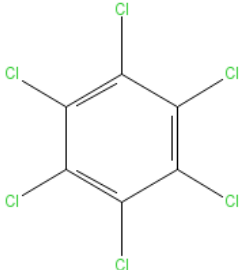
1. Hexaclorobenzeno (HCB)

O HCB é um organoclorado sintético, com atividade fungicida, que foi introduzido no mercado em 1945. À temperatura ambiente é um sólido cristalino branco, praticamente insolúvel em água, levemente solúvel em álcool frio, mas solúvel em éter, benzeno e clorofórmio. O HCB grau técnico contém, aproximadamente, 98% de HCB, 1,8% de pentaclorobenzeno e 0,2% de 1,2,4,5-tetraclorobenzeno, e é conhecido por ter uma variedade de impurezas, incluindo hepta- e octaclorodibenzofurano, octaclorodibenzo-*p*-dioxina e decaclorobifenil (Toledo 2002).

1.1. Características gerais

As características do HCB são mostradas no Quadro 1.

Quadro 1. Características do hexaclorobenzeno (Matheus 2003).

Estrutura química		
Outros nomes:	Amatin; Bunt-cure; Bunt-no-more; Co-op Hexa; HCB; Carbono clorado de Julin; No Bunt 40; No Bunt 80; Pentaclorofenil clorado; Perclorobenzeno; Snieciotox; 1,2,3,4,5,6-Hexaclorobenzeno; Benzeno hexaclorado; Hexaclorobenzol; Fenil percloril; Rcra waste number U127; Sanocid; UN 2729	
Fórmula		C ₆ Cl ₆
Peso molecular (g mol ⁻¹)		284,78
Número de registro CAS		118-74-1
Solubilidade em água (mg L ⁻¹ , 25°C).		0,0079
Ponto de fusão (°C)		226
Ponto de Ebulição (°C)		323-326
Pressão de vapor (mPa)		1,45
Volatilidade		baixa
log Kow (pH 4,7)		6,18
Mobilidade		baixa
Persistência		elevada
Limite aceitável em água para proteção da vida humana (EPA/USA).		zero

1.2. Emissões, distribuição mundial e contaminação na Baixada Santista

Dentre os compostos poluentes, o grupo dos organoclorados é um dos mais estudados devido, principalmente, aos problemas associados ao uso indiscriminado de pesticidas, como o DDT, e de solventes industriais. Este constitui um dos principais grupos de poluentes devido à sua introdução no meio ambiente em quantidades significativas (Swoboda-Coldeberg 1995). A maioria deles apresenta grande toxicidade, são mutagênicos ou carcinogênicos. Representam uma classe de químicos altamente persistentes no meio ambiente, muitos deles chegando a ser acumulados nos níveis tróficos superiores da cadeia alimentar. A vida extremamente longa desses compostos em ambientes naturais contribui para amplificar a sua toxicidade e os problemas de riscos à saúde humana (Chaudhry & Chapalamadugu 1991).

Geralmente presente em baixas concentrações, o HCB está largamente disperso no ambiente e tem sido detectado em ar, água, sedimento, solo, biota e sítios remotos, refletindo a persistência e o longo alcance desta molécula. O HCB é distribuído no meio ambiente porque ele é móvel e resistente à degradação. A volatilização da água para o ar e a sedimentação, seguindo a adsorção em particulados suspensos são os maiores processos de sua remoção da água (Toledo 2002). Embora o HCB não seja prontamente lixiviado de solos e sedimentos, alguma desorção pode ocorrer e tornar-se uma fonte continua de HCB para o meio ambiente, mesmo que cessem as entradas no sistema (Oliver *et al.* 1989).

Diversas pesquisas têm demonstrado a gravidade das emissões globais de HCB. Dados sobre suas fontes, emissões, níveis no ambiente, distribuição e tendências são estimados e utilizados para determinar seu destino e comportamento no ambiente global. A dinâmica do HCB no mundo considera trocas entre ar-superfície do solo, transporte à longa distância no ambiente global, balanço entre fontes primárias e secundárias e seus destinos finais no ambiente. A produção global excedeu a 100.000 toneladas e, provavelmente, emissões primárias à atmosfera ocorreram principalmente durante a década de 70. A partir deste período, uma tendência de declínio de emissões no ambiente ocorreu nos 20 anos seguintes. Tendências temporais de HCB no ambiente variam dependendo do período determinado, da metodologia utilizada e da localização do estudo, entretanto, a meia-vida média de HCB na maioria dos estudos é de aproximadamente 9 anos. Em seu pico de máxima emissão global, a quantidade de HCB emitido do solo para o ar pode ter sido de centenas a milhares de toneladas por ano, o que pode ser considerado uma fonte de emissão significativa de HCB para o ambiente (Barber *et al.* 2005).

O HCB é encontrado principalmente como resíduo em pesticidas (antrazina, simazina, lindano, pentaclorofenol e outros), resíduo da produção de solventes clorados e da indústria de metais (ferro, cobre e alumínio). O HCB também pode ser gerado pela combustão de compostos

clorados, sendo as maiores emissões provenientes da: incineração de resíduos perigosos, municipais e médico-hospitalares, produção de cimento, queima de carvão, incineração durante o processamento industrial de ferro, incineração durante tratamento de resíduos (lixo, esgoto), queima de biomassa vegetal, incluindo a queima de florestas, savanas e áreas agrícolas e a queima de combustíveis de automóveis. Durante a década de 90, as melhores estimativas da emissão mundial de HCB estabeleceram diferentes fontes, distribuídas nas seguintes categorias: concentrações traço de HCB em pesticidas - 6500 Kg ano^{-1} ; resíduos industriais (química e metalúrgica) - 9500 Kg ano^{-1} ; combustão - 7000 Kg ano^{-1} , incluindo 500 Kg de queima de biomassa. Todas estas emissões juntas somam aproximadamente $23000 \text{ Kg ano}^{-1}$ de novas moléculas de HCB distribuído no mundo. Porém, há uma incerteza com relação a estes dados de emissão mundial, devido a poucas medidas de emissões provenientes da combustão e processos industriais, o que fornece uma estimativa média de $23000 \text{ Kg ano}^{-1}$, dentro de uma faixa entre $12000\text{-}92000 \text{ Kg ano}^{-1}$ de emissão mundial total de HCB (Quadro 2). As maiores incertezas de emissões de HCB são devido a pouca informação de: concentrações de HCB em pesticidas em países em desenvolvimento, emissões provenientes de processo de indústrias químicas em países em desenvolvimento, emissões das indústrias de metais, concentrações de HCB no solo e a taxa de volatilização do HCB no solo, utilização ou produção de HCB em fumaças militares, principalmente na Rússia e Turquia e outros processos que não são informados ou encontrados e que podem emitir HCB (Bailey 2001).

Para criação de um modelo de transporte de HCB a longas distâncias no Hemisfério Norte, um esboço do cenário de emissão foi elaborado com o uso de diferentes estimativas. Valores de emissão de HCB nos Estados Unidos, Canadá e o total de emissões no Hemisfério Norte foram descritos por Bailey (2001). Para partes da Europa e Rússia (somente a parte na Europa), as estimativas de emissão de HCB foram descritas por Pacyna *et al.* (1999). Valores de emissão de HCB na China, Paquistão, República da Coreia, Rússia (parte Asiática da Rússia) e Japão foram estimados a partir de estudos e dados oficiais fornecidos por estes países. Os valores de emissão de HCB na Índia foram estimados a partir da diferença entre a emissão hemisférica total e a soma de emissões do continente Norte-americano, Europa e os países Asiáticos mencionados acima (Figura 2) (Meteorological Synthesizing Centre - East 2004).

Quadro 2. Emissão mundial de hexaclorobenzeno durante a década de 90, todas as quantidades em Kg ano⁻¹ (adaptado de Bayle 2001).

			Concentração de HCB		Uso anual de pesticidas (Kg ano ⁻¹)		Emissão de HCB (Kg ano ⁻¹)	
Produto contendo HCB								
Pesticidas								
DCPA			1.000 ppm			946.601		947
Antrazina			1 ppm			53.168.653		53
Simazina			1 ppm			5.703.261		6
Picloran			50 ppm			1.194.850		60
PCNB			500 e 1000 ppm			1.007.298		694
Clorotalonil			40 e 100 ppm			15.342.541		1.224
Lindano			50 ppm			3.936.045		197
HCH técnico			100 ppm			29.102.000		2.910
Pentaclorofenol (usado como moluscida na água)			100 ppm			3.500.000		350
Pentaclorofenol (usado no tratamento de madeira)			100 ppm			6.000.000		
Sub total de pesticidas						1.005.000.000		6.463
Uso de solventes clorados			1 ppb					1
Resíduos indústrias químicas								1.218
	Fator de baixa emissão de HCB (Kg HCB Kg ⁻¹)	Fator de media emissão de HCB (Kg HCB Kg ⁻¹)	Fator de alta emissão de HCB (Kg HCB Kg ⁻¹)	Produto (Kg ano ⁻¹)	Cálculo emissão HCB com fator baixo (Kg ano ⁻¹)	Cálculo emissão HCB com fator médio (Kg ano ⁻¹)	Cálculo emissão HCB com fator alto (Kg ano ⁻¹)	
Indústria metalúrgica								
Fundição alumínio	8,6E-04	2,2E-03	4,3E-03	HCE 3.500.000	3.010	7.700	15.050	
Cobre secundário	3,9E-09	3,9E-08	3,9E-07	2.673.000.000	10	104	1.042	
Magnésio					250	350	350	
Sub total de metais					3.370	8.154	16.442	
Combustão								
Resíduos municipais	2,9E-09	2,9E-08	2,9E-07	194.000.000.000	563	5.626	56.260	
Resíduos perigosos	1,9E-09	1,9E-08	1,9E-07	5.000.000.000	10	95	950	
Médico-hospitalar	2,9E-09	2,9E-08	2,9E-07	2.960.000.000	9	86	858	
Queima carvão	8,0E-12	8,0E-11	8,0E-10	4.369.000.000.000	35	350	3.495	
Produção cimento	1,7E-11	1,7E-10	1,7E-09	253.800.000.000	4	43	431	
Processamento de ferro	1,5E-10	1,5E-09	1,5E-08	46.900.000.000	7	70	704	
Tratamento de resíduos	4,7E-10	4,7E-09	4,7E-08	2.540.000.000	1	12	119	
Queima biomassa	6,0E-10	6,0E-11	6,0E-11	8.260.000.000.000	50	496	4.956	
Sub total de combustão					678	6.777	67.774	
Emissão mundial HCB					11.820	22.703	91.988	

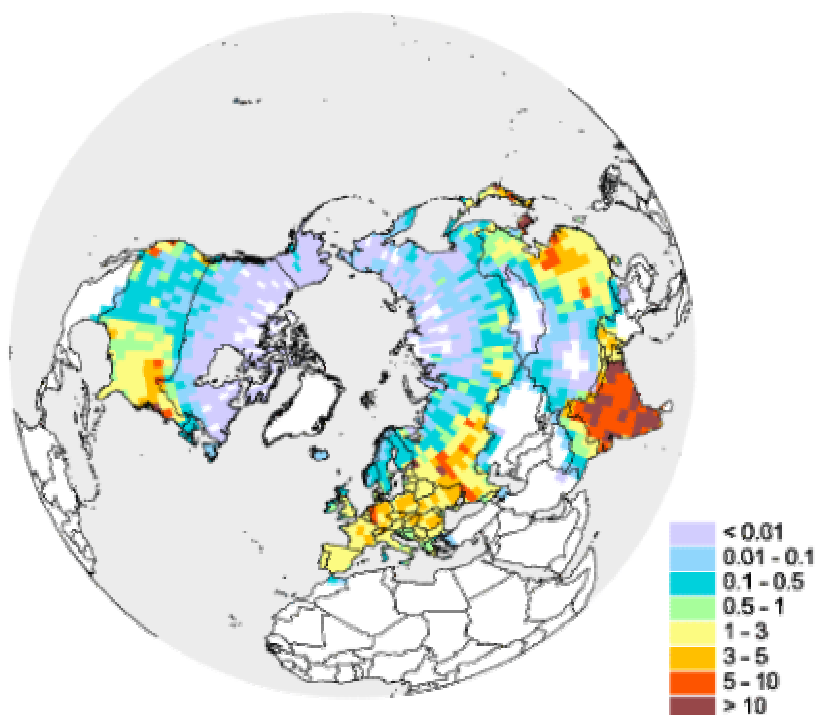


Figura 2. Distribuição espacial de emissões totais de HCB no Hemisfério Norte no ano 2000.

Legenda: g HCB km² ano⁻¹ (Meteorological Synthesizing Centre – East 2004).

Borghini *et al.* (2005) observaram a contaminação por organoclorados em solos e charcos em Victoria Land (Antártica), longe de fontes de emissão de organoclorados. Essas observações forneceram dados em que a temperatura é um fator determinante na distribuição de organoclorados em escala planetária e no acúmulo destes poluentes no solo, contribuindo para a hipótese do efeito de destilação global na distribuição de organoclorados no mundo.

No Brasil, o caso mais grave de contaminação ambiental por HCB e outros organoclorados ocorreu na Baixada Santista, durante as décadas de 70 e 80. Quando adquiriu a fábrica de produtos para tratamento de madeiras Clorogil, em 1976, a Rhodia herdou o maior passivo ambiental já registrado no Brasil. A existência de 11 depósitos clandestinos que abrigavam organoclorados descartados pela empresa veio a público em 1984. No interior da fábrica, que integrava o Pólo Industrial de Cubatão, cidade do litoral paulista, também havia depósitos irregulares de resíduos tóxicos industriais. A planta industrial de Cubatão fabricava compostos como pentaclorofenato de sódio e tetracloreto de carbono. Os principais resíduos da fabricação desses compostos foram HCB, PCF, pentaclorobenzeno, hexaclorobutadieno, tetraclorobeneno, hexacloroetano e hexaclorobutadieno (CONASQ 2003).

Um dos municípios que recebeu grandes quantidades de resíduos foi São Vicente, em áreas localizadas no distrito de Samaritá. No final da década de 70 havia nesta região uma floresta de

restinga relativamente preservada, sob a qual havia grandes depósitos de areia industrial, que vinham sendo explorados para fabricação de vidro. Tal exploração implicava na abertura de clareiras na floresta e a remoção da areia em pequena profundidade e grandes extensões. Com caminhos abertos e grandes áreas desocupadas em meio à vegetação, nestes locais foram depositados, a céu aberto, grande parte dos resíduos organoclorados oriundos da unidade fabril de Cubatão (Figura 3. A). No início da década de 80 começaram a surgir as primeiras denúncias e suspeitas sobre a localização de tais depósitos, sendo que as primeiras áreas localizadas foram as do município de São Vicente, seguidas pelas áreas de Cubatão e Itanhaém (Matheus 1998).

Em 1986 a empresa construiu um incinerador no local, para destruir os resíduos e solos contaminados. Enquanto se aguardava a instalação do incinerador, foi construída uma “Estação de Espera” (Figura 3. B) onde estão armazenados cerca de 33 mil toneladas de solo contaminado e resíduos, removidos de três áreas do Distrito de Samaritá, em São Vicente. O incinerador começou a operar em dezembro do ano seguinte. Segundo a empresa, cerca de 67 mil toneladas de material foram queimadas ali ao longo de sete anos. Em 1993, uma liminar obtida pelo Ministério Público determinou a paralisação completa da unidade química de Cubatão e de seu incinerador industrial, devido à contaminação do solo e do lençol freático com PCF e HCB. A maioria dos depósitos clandestinos se localiza perto de áreas povoadas, rios e mangues (CONASQ 2003).

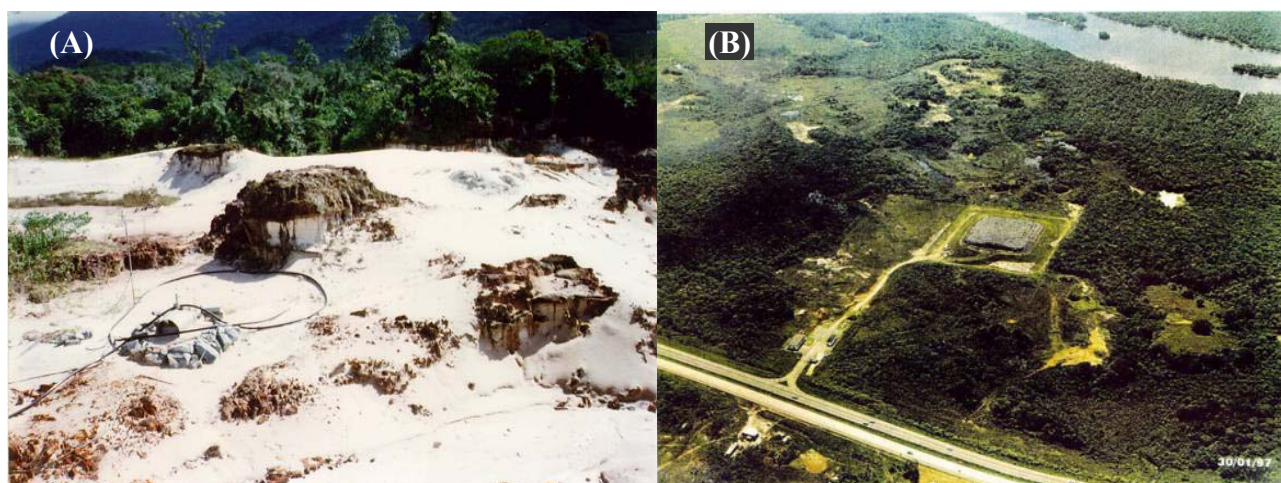


Figura 3. (A) Uma das áreas contaminadas na região da Baixada Santista. (B) Estação de Espera localizada no Km 67 da Rodovia Padre Manoel da Nóbrega, São Vicente-SP.

Nascimento *et al.* (2004) estudaram a dispersão de HCB e PCF em um dos depósitos contaminados na Baixada Santista. O sítio estudado está localizado em planície costeira que divide os rios Mariana e Piaçabuçu. Os resultados mostraram que os poluentes ainda estavam presentes no depósito e observaram contaminação subterrânea, afetando uma área a 500 m do depósito e também

observaram que a água atuou como vetor dos poluentes por toda paisagem. A área de manguezal apresentou um acúmulo maior dos poluentes. Os autores observaram que a dispersão de PCF e HCB foi, provavelmente, resultado da complexação e transporte com matéria orgânica dissolvida, porém observaram que o aquífero ainda não estava poluído, pois a concentração dos poluentes estudados em águas subterrâneas estava abaixo do limite de detecção. Estes autores descrevem, ainda, que a presença de HCB em concentrações maiores do que o PCF pode ser atribuída ao fato de que este pode ser fotodegradado, enquanto o HCB é muito mais persistente.

O rio Cubatão, Baixada Santista, poluído por depósito inadequado de HCB, apresentou concentração em água de HCB de $0,89 \mu\text{g L}^{-1}$, 80 vezes maior que no rio Reno, que já foi considerado um dos rios mais poluídos do mundo. Em Samaritá, distrito de São Vicente, um afluente do rio Branco apresentou níveis de HCB que variavam entre 0,3 e $6,2 \mu\text{g L}^{-1}$. Em Cubatão, os níveis de HCB no solo em uma determinada área contaminada variaram de 1,1 a $325,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (Mesquita 1995).

1.3. Efeitos à saúde humana e ao meio ambiente

O HCB é altamente tóxico para a vida aquática, plantas, animais terrestres e seres humanos. De acordo com o IARC (International Agency for Research on Câncer), o HCB recebe a classificação IIa, isto é, apresenta evidência de carcinogenicidade experimental suficiente e evidência epidemiológica insuficiente. O HCB pode causar danos para o feto em desenvolvimento, fígado, sistema imunológico (aumentando o risco de infecção), tireóide e rins. Uma exposição elevada ou repetida pode causar danos para o sistema nervoso e causar irritabilidade, dificuldade para andar e de coordenação, fraqueza muscular, tremor e/ou uma sensação de formigamento na pele. Exposição repetida pode levar a alteração permanente na pele, tais como mudanças na pigmentação, pele esticada e grossa, enrugamento fácil, cicatrizes, pele quebradiça e aumento no crescimento de pêlos, especialmente na face e antebraços (Toledo 2002). Labunska (1999) sugere que o HCB tem toxicidade semelhante à dioxina e que mais estudos epidemiológicos deveriam ser realizados, especialmente relativos a bebês alimentados com leite materno, em países com níveis de exposição ao HCB.

Devido à sua alta lipossolubilidade, o HCB é facilmente absorvido por difusão passiva no sistema gastrointestinal. Uma vez absorvido, o HCB se liga a proteínas plasmáticas e se distribui pelo organismo e, a partir de então, vai se depositando nos tecidos gordurosos. A afinidade do HCB, como qualquer organoclorado, em diferentes partes do organismo, é determinada pela quantidade de gordura contida em cada um dos tecidos. Após uma exposição, o HCB pode ser detectado na circulação sanguínea até, aproximadamente, 45 dias. O HCB é biotransformado no fígado, pelas

enzimas de oxidação NADPH-dependentes, em moléculas mais polarizadas e é eliminado, principalmente, pelas fezes, e apenas uma pequena parte é excretada pela urina. A administração oral de gorduras inabsorvíveis aumenta o teor lipídico do bolo fecal, estimulando a eliminação do HCB pelas fezes (Toledo 2002).

O HCB tem sido relacionado com alguns casos de “porfiria cutânea tardia” (PCT) (alterações no metabolismo de porfiria, com aumento de excreção de porfirias e precursores de porfirias). As manifestações clínicas incluíam lesões de pele, ulcerações, inchaço do fígado, perda de peso, aumento da glândula tireóide e dos nódulos linfáticos, efeitos neurológicos e urina com cor característica de vinho do porto, devido ao aumento na eliminação de porfirias. Em quase metade dos casos estudados, problemas como osteoporose das extremidades, deformações dos dedos ou artrites também foram notados. Um distúrbio chamado de “pembe yara” ou “chaga rosa” foi descrito em filhos de mães que tinham PCT ou haviam ingerido pão contaminado com HCB. Essas crianças desenvolveram lesões cutâneas rosas características e pelo menos 95% delas morreram no período de 1955 a 1960 (Toledo 2002). A maioria dos sintomas clínicos descritos acima foi observada na população turca, durante a década de 50, onde entre 3.000 a 5.000 pessoas foram contaminadas acidentalmente após ingerirem grãos de sementes tratadas com HCB (Ezendam *et al.* 2004).

Em revisão sobre o HCB, Toledo (2002) descreve que não foram encontrados publicações de estudos epidemiológicos de câncer nas populações expostas ao HCB no meio ambiente, porém há evidência suficiente de que o HCB é carcinogênico em animais. Randi *et al.* (2006) descrevem que o HCB é um agente co-cancerígeno, induzindo tumores mamários em ratos.

Foram identificados muitos problemas de saúde entre os trabalhadores de indústria química que manipulavam organoclorados, em Cubatão, como cloracne e lesões hepáticas orgânicas e funcionais (CONASQ 2003).

O HCB é altamente tóxico para os peixes ($LC_{50}/96h$ 0,05-0,2 mg L⁻¹) e tem sido detectado em invertebrados, peixes, répteis e mamíferos em todo o mundo. Quantidade elevada de HCB foi encontrada em aves predatórias, enquanto menores quantidades foram detectadas em peixes, mexilhões e aves aquáticas (Koeman *et al.* 1969). Estudos de campo indicaram que a exposição ao HCB via alimento é importante para os organismos nos níveis tróficos mais elevados e têm sido observada biomagnificação. A concentração de HCB em crustáceos, peixes e aves marinhas apresentou-se de forma biomagnificada, na ordem de 1 a 3 vezes (Borga 2000). As propriedades bioacumulativas do HCB resultam da combinação de suas propriedades físico-químicas (alto coeficiente de partição octanol/água) e de sua lenta eliminação, devido ao metabolismo limitado relacionado com sua alta estabilidade química. Geralmente os organismos acumulam o HCB da água e do alimento, embora organismos bênticos também possam acumular HCB diretamente de

sedimento (Gobas *et al.* 1989). Em Samaritá, Brasil, algumas espécies de animais aquáticos apresentaram níveis que variaram de 0,6 a 23,6 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (Mesquita 1995).

O Ártico tem apresentado contaminação de organoclorados em baixas latitudes e níveis relativamente altos têm sido encontrados em diferentes espécies da biota. Em estudos recentes com a gaivota *Larus hyperboreus*, um predador de topo da cadeia alimentar ártica, foi detectada elevada concentração de vários organoclorados no sangue desta espécie, e como consequência foi observada baixa performance na reprodução e a redução na sobrevivência de indivíduos adultos desta espécie (Bustnes *et al.* 2005). Espécimes do predador marinho de topo, o *Halichoerus grypus*, foram expostos a altas concentrações de compostos organoclorados por biomagnificação na cadeia alimentar. Esses poluentes lipofílicos foram transferidos da fêmea para a prole durante a lactação e observou-se um distúrbio endócrino nos filhotes (Sormo *et al.* 2005).

1.4. Biodegradação

Existem alguns estudos indicando a possibilidade de desalogenação redutiva de HCB. Fathepure *et al.* (1988) demonstraram que HCB foi desalogenado a tri e diclorobenzeno em lodo de esgoto, sob condições anaeróbias. A desalogenação completa de 50 mg de HCB L^{-1} ($\sim 190 \mu\text{M}$) ocorreu em três semanas. O HCB foi desalogenado por duas rotas diferentes. A principal rota foi a seguinte: HCB $\rightarrow$ pentaclorobenzeno $\rightarrow$ 1,2,3,5-tetraclorobenzeno $\rightarrow$ 1,3,5-triclorobenzeno. Mais de 90% do HCB inicial foi convertido a 1,3,5-triclorobenzeno, não se evidenciando a continuidade da desalogenação a partir desta última molécula.

No que diz respeito à degradação de HCB por culturas mistas de bactérias, quase que inexistem estudos indicando sua possibilidade. Fathepure & Vogel (1991) avaliaram a degradação completa de HCB presente numa mistura contendo tetracloroetileno e clorofórmio (0,5 a 1 ppm), utilizando um biorreator de dois estágios (anaeróbio-aeróbio). Na fase anaeróbia, a fonte de carbono que propiciou a degradação de HCB a compostos menos clorados (1,2,3-triclorobenzeno e 1,2-diclorobenzeno) foi o ácido acético. Após submeterem a mistura de organoclorados a um fluxo contínuo no biorreator cuja população microbiana tinha sido previamente aclimatada, 94% do HCB inicial foi convertido a metabólitos voláteis, não voláteis e CO_2 , numa proporção de 76% na fase anaeróbia e 18% na fase aeróbia.

1.5. Biodegradação por basidiomicetos ligninolíticos

Até recentemente considerava-se improvável a biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos. Bumpus & Aust (1987) observaram menos de 1% de mineralização de HCB por

Phanerochaete chrysosporium. No entanto, Matheus *et al.* (2000) selecionaram basidiomicetos de ecossistemas brasileiros quanto à tolerância ao HCB e observaram redução de até 25% do composto durante crescimento de *Psilocybe castanella* CCB444 e *Lentinus crinitus* CCB274 em solos contaminados com resíduos organoclorados.

Psilocybe castanella CCB444 é um representante da ordem Agaricales, família Strophariaceae. É uma espécie exclusivamente saprofítica que cresce apenas em resíduos vegetais presentes no solo. Esta linhagem foi isolada do solo arenoso na área do “Quarentenário”, no município de São Vicente, a poucos metros da cava onde foram removidos os solos contaminados. (Matheus 1998, Matheus 2003). O bagaço de cana-de-açúcar foi o substrato selecionado para produção de inóculos de *P. castanella* em estudo de biorremediação de solos contaminados com organoclorados devido ao seu baixo custo, facilidade de obtenção e por favorecer o crescimento dos fungos no solo em questão (Machado *et al.* 1996). A melhor idade fisiológica para a utilização de inóculos de *P. castanella* em biorremediação parece ser aos 21 dias de incubação, quando o fungo possui nutrientes suficientes para manter sua sobrevivência, vigor na colonização do substrato, biomassa crescente e atividade ligninolítica ativa, promovendo crescimento em contato com o poluente a ser degradado (Ballaminut 2004).

O ajuste da relação C/N do substrato fúngico para 80 (formulado a base de bagaço de cana-de-açúcar e farinha de soja) e a adição de óleo vegetal (contendo ácidos graxos insaturados, com Tween 20) ao sistema de cultivo de *P. castanella* melhoraram as taxas de mineralização de HCB por este fungo (Matheus 2003). O autor deste estudo descreve que a emulsão de óleo vegetal alterou o comportamento de *P. castanella* e suas interações com os compostos organoclorados no solo, aumentando a capacidade do fungo de mineralizar o HCB. O autor observou que os principais destinos do HCB nos solos tratados por *P. castanella* foram CO₂ e resíduos não-extraíveis e não houve acúmulo de clorobenzenos intermediários, com até quatro cloros no anel benzênico durante a degradação de HCB por *P. castanella*. O autor deste estudo descreve que o fungo degradou o HCB e PeCB rapidamente até compostos intermediários menos clorados, ou quebrou o anel benzênico rapidamente degradando os compostos diretamente a CO₂.

2. Basidiomicetos ligninolíticos

O grupo dos basidiomicetos inclui os fungos que produzem esporos (basidiósporos) de origem sexuada em uma estrutura especializada denominada de basídio e popularmente chamados de cogumelos e orelhas-de-pau. A fase vegetativa dos basidiomicetos é denominada micélio, que por sua vez é formado por muitos filamentos septados chamados hifas. O septo das hifas pode ser simples ou possuir ansas, que é uma estrutura característica do grupo e são conhecidos como septo

dolipórico em função da estrutura complexa que apresentam. Os basidiomicetos também são caracterizados por possuírem dois tipos básicos de basidiósporos. Os denominados balistósporos, que são liberados violentamente dos basídios e os denominados estatismósporos, que são liberados passivamente (Gugliotta & Capelari 1998).

Os basidiomicetos ligninolíticos secretam enzimas que convertem os polímeros externos em moléculas menores, que são assimiladas e utilizadas como nutrientes. A secreção de proteínas parece ocorrer durante o crescimento apical das hifas, sendo liberadas pela parede celular recém sintetizada (Wessels 1994). Os fungos decompositores da madeira podem ser classificados em grupos ecofisiológicos: causadores de podridão branca, de podridão parda e de podridão mole. Ao lado de outros microrganismos, os basidiomicetos ligninolíticos atuam na decomposição da matéria orgânica, dinamizando a ciclagem de nutrientes e regulando o equilíbrio energético dos ecossistemas terrestres (Tuomela *et al.* 2000) (Quadro 3). Além disso, estes organismos parecem ser os únicos capazes de mineralizar a molécula de lignina presente na madeira (Kirk & Farrell 1987, Leonowicz *et al.* 1999, Shan & Nerud 2002).

Quadro 3. Organismos degradadores da lignina (Tuomela *et al.* 2000).

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

Duante a biodegradação da madeira os fungos da podridão parda degradam extensamente celulosas e hemicelulosas, mas a degradação da lignina é limitada. A lignina é quimicamente modificada por desmetilação de suas unidades fenólicas e não fenólicas e também pode ocorrer limitada hidroxilação do anel aromático da lignina. Estes resíduos produzidos pela modificação da lignina contribuem para formação do húmus. Os fungos da podridão parda são capazes de mineralizar grupos metoxil da lignina, mas a mineralização de outras partes é muito menor quando comparado aos fungos da podridão branca (Kirk & Farrell 1987, Ötnerud *et al.* 2002).

Outros organismos como os fungos da podridão mole da madeira e alguns actinomicetos e mixomicetos fazem parte do processo de sucessão da decomposição da madeira em ecossistemas florestais, embora a taxa de degradação dos constituintes da madeira seja relativamente menor. Os

fungos da podridão mole são ascomicetos e fungos anamorfos que participam da degradação da madeira na natureza. Todos os componentes da madeira são degradados, mas as taxas de degradação são mínimas quando comparadas aos fungos da podridão branca e parda. Este grupo de fungos está associado em parte à decomposição da serapilheira em ecossistemas florestais, geralmente em ambientes mais úmidos. Fenóis e ácido vanílico são rapidamente degradados por fungos da podridão mole. Há também muitas espécies de actinomicetos e mixomicetos que degradam a lignina. Os actinomicetos podem solubilizar e modificar extensamente a estrutura da lignina, mas sua capacidade de mineralização é limitada. Várias espécies de bactérias como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Nocardia* e *Streptomyces* degradam compostos aromáticos mais simples. Estas bactérias geralmente atuam em ambientes quase anaeróbios, consumindo principalmente metabólitos intermediários de baixa massa molecular produzidos pelos fungos (Tuomela *et al.* 2000, Önnerud *et al.* 2002).

Há várias espécies de fungos da podridão branca da madeira, sendo a maioria deles os basidiomicetos ligninolíticos, além de alguns ascomicetos. Os fungos basidiomicetos causadores da podridão branca ou basidiomicetos ligninolíticos, atacam a madeira dura (*hardwood*) ou madeira mole (*softwood*), enquanto os ascomicetos provavelmente degradam unicamente madeira dura. A degradação da lignina por basidiomicetos ligninolíticos é mais rápida que quaisquer outros organismos e eles são responsáveis pela maior parte da degradação da lignina na natureza. Entretanto, o substrato de crescimento não é unicamente lignina, mas também hemiceluloses e celulose (Kirk & Farrell 1987, Blanchette 1995).

Os basidiomicetos ligninolíticos podem causar deslignificação seletiva ou não seletiva da madeira. Na deslignificação seletiva, a lignina é removida sem qualquer perda distinta de celulose e na deslignificação não seletiva, todos os componentes da parede celular são degradados (Blanchette 1995). Dentre os basidiomicetos ligninolíticos melhor estudados estão *Phanerochaete chrysosporium* e *Phlebia radiata*, que degradam seletivamente a lignina e *Trametes versicolor*, que degrada lignina não seletivamente (Hatakka 1994).

A lignina sabidamente não funciona como fonte primária de carbono e energia para os fungos basidiomicetos. Para sua degradação há necessidade de uma fonte de carbono adicional que funciona como um co-substrato. E este mecanismo de degradação é regulado pelo balanço entre as reações produtoras e consumidoras de energia (Kirk & Shimada 1985). A fonte de carbono utilizada pelo fungo também pode interferir na sua atividade ligninolítica. Monossacarídeos e polissacarídeos estimularam a atividade ligninolítica de alguns basidiomicetos (Leathan & Kirk 1983, Leathan 1986).

O sistema ligninolítico responsável pela biodegradação da lignina é o mesmo envolvido na degradação de poluentes orgânicos por basidiomicetos ligninolíticos e apresenta algumas vantagens

de aplicação na biorremediação de solos. Este sistema é extracelular, pode atuar em substâncias insolúveis ou complexadas ao solo. A inespecificidade do sistema enzimático permite a sua utilização para uma ampla variedade de poluentes orgânicos. Além disso, o sistema não precisa ser induzido e a degradação pode ocorrer até níveis não detectáveis, com mineralização (Barr & Aust 1994). Devido à baixa especificidade e elevado potencial de oxidação do sistema enzimático, os basidiomicetos ligninolíticos são também capazes de degradar uma variedade de compostos recalcitrantes (Fragoeiro & Magan 2005).

Muitos xenobióticos podem permanecer por longo tempo na natureza, e devido ao potencial das enzimas ligninolíticas produzidas por basidiomicetos, o interesse na aplicação destes fungos na biorremediação de solos contaminados vem aumentando nos últimos anos. Diversos estudos demonstraram que *Phanerochaete chrysosporium*, espécie referência nos estudos de biodegradação de poluentes orgânicos, degrada diferentes tipos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Bumpus (1993) demonstrou que este fungo foi capaz de degradar 22 tipos de HPAs, promovendo a remoção de 70-100% destes compostos em 27 dias. Outros estudos, demonstraram que lignina peroxidase produzida por *P. chrysosporium* oxidou benzo(a)pireno, antraceno, pireno, perileno, *p*-cresol, pentaclorofenol e fenol por meio de mecanismos parecidos com os observados na degradação da lignina e seus derivados (Barr & Aust 1994, Reddy 1993).

Novotny *et al.* (1999) descreveram que *Pleurotus ostreatus* foi uma espécie conveniente para a aplicação na biorremediação de solos contaminados com poluentes recalcitrantes porque este fungo apresentou um crescimento denso e eficiente produção de enzimas ligninolíticas extracelulares em solo, até mesmo na presença de concentrações relativamente altas de HPAs. Tal crescimento micelial denso em solo contaminado e a eficiente expressão de enzimas ligninolíticas são pré-requisitos para uma boa capacidade do fungo para remoção das moléculas poluentes no solo. As taxas de degradação de HPAs observadas com *P. ostreatus* em solo contaminado foram significativamente maiores que as encontradas em culturas com *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor*, especialmente no caso de antraceno e pireno.

Muitas moléculas xenobióticas, como corantes têxteis e organoclorados, têm sido degradadas por basidiomicetos isolados de ecossistemas brasileiros. Tais linhagens de fungos envolvidas na degradação destas moléculas incluem as espécies: *Higrocybe* sp., *Lentinus crinitus*, *Peniophora cinerea*, *Phellinus gilvus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Psilocybe castanella*, *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes villosa* (Gugliotta 2001, Matheus *et al.* 2001, Machado *et al.* 2005a, Machado *et al.* 2005b).

2.1. Biodegradação da lignina e poluentes orgânicos

Enquanto os processos de degradação de celulose e hemicelulose são de natureza hidrolítica e ocorrem com relativa facilidade (Wood & Garcia-Campayo 1994), a degradação da lignina representa um processo oxidativo complexo, não específico e estritamente dependente das condições do meio de cultivo do organismo. Estudos conduzidos com *P. chrysosporium*, revelaram que diversos parâmetros de cultivo afetaram a degradação de lignina pelo fungo (Kirk *et al.* 1978, Kirk & Farrell 1987). Estes e outros estudos sobre a biodegradação da lignina por basidiomicetos ligninolíticos forneceram informações para aplicação destes fungos em inúmeras pesquisas envolvendo a biodegradação de diversos xenobióticos (Figura 4) (Bumpus & Aust 1987, Bogan & Lamar 1995, Durán & Esposito 2000, Wesenberg *et al.* 2003).

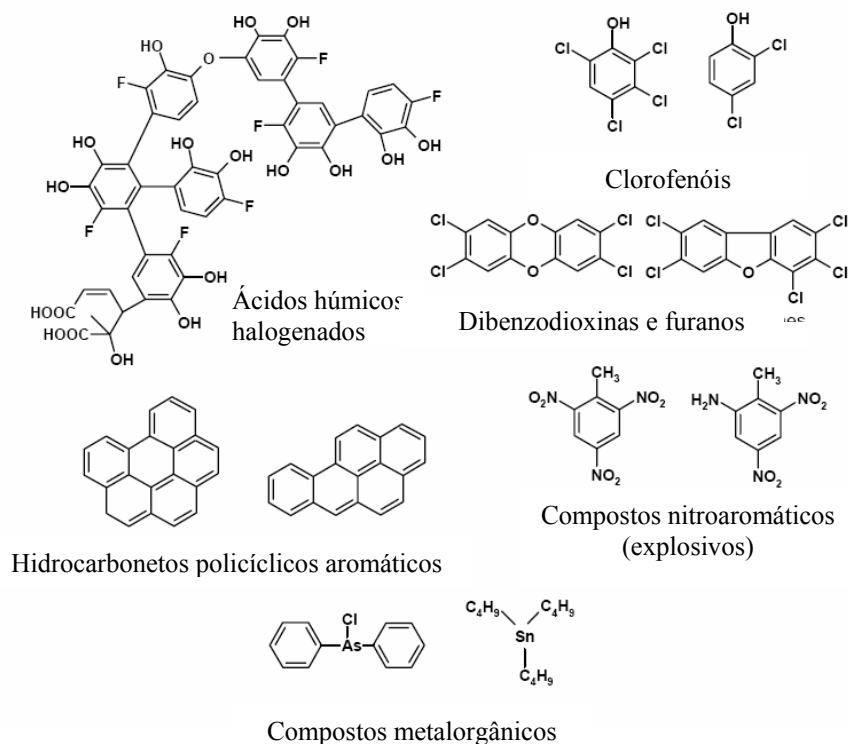


Figura 4. Alguns exemplos de compostos xenobióticos que são degradados por basidiomicetos ligninolíticos (Hofrichter *et al.* 1999).

A lignina é um constituinte da parede celular de todas as plantas vasculares. É um dos biopolímeros mais abundante na biosfera, sendo uma parte considerável do carbono fixado por fotossíntese. Devido à estreita associação entre celulose, hemicelulose e lignina, esses compostos não estão uniformemente distribuídos na parede celular das plantas. A parede secundária 2, contém alta quantidade de celulose, enquanto a lamela média possui maior quantidade de lignina.

Entretanto, todos estes três compostos podem ser encontrados em todas as camadas da parede celular vegetal (Tuomela 2002).

As funções biológicas da lignina são: (1) Fornecer suporte estrutural à parede secundária de plantas vasculares. A parede celular lignificada pode ser vista como um complexo, com microfibrilas de celulose e hemicelulose, e a lignina como uma “matriz plástica” conferindo resistência ao material lignocelulósico; (2) Tornar a parede celular vegetal hidrofóbica, permitindo o desenvolvimento eficiente dos tecidos para transporte de água em plantas vasculares; (3) Conferir resistência contra ataques microbianos (Önnerud *et al.* 2002).

Do ponto de vista químico, a lignina é um composto heterogêneo, de alto peso molecular, de estrutura irregular, altamente insolúvel e recalcitrante (Figura 5). Este biopolímero é formado pela polimerização oxidativa de três precursores fenilpropanóides monoméricos: álcool sinapílico (propanol siringil), álcool coniferílico (propanol guaiacil) e álcool cumarílico (propanol *p*-hidroxifenil) (Figura 6), unidos entre si, e com os polissacarídeos da parede celular, por ligações éter e carbono-carbono. A proporção destes monômeros pode variar entre espécies de plantas, sendo as ligações β -O-4 as mais frequentes (Jeffries 1994, Hofrichter 2002, Önnerud *et al.* 2002).

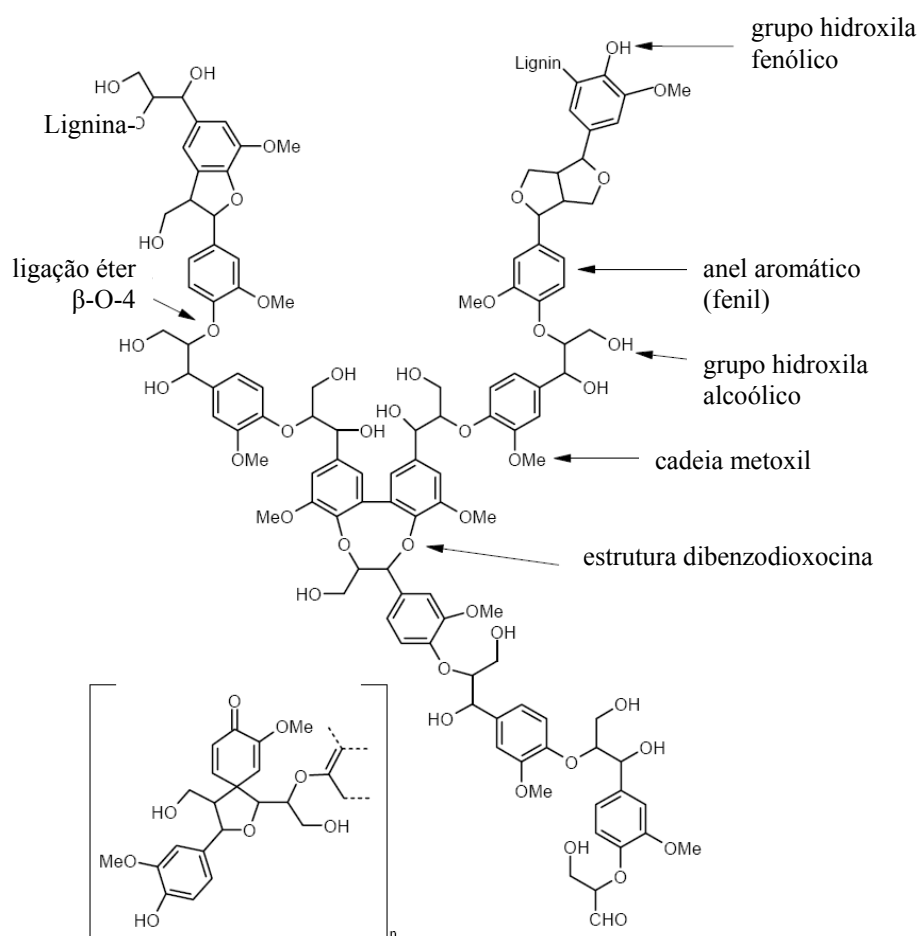


Figura 5. Segmento de um polímero de lignina (Brunow 2001).

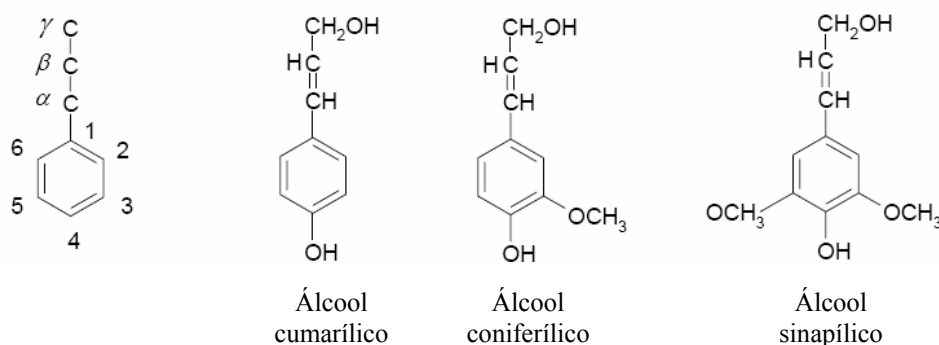


Figura 6. Unidades fenilpropanóides precursoras da lignina (Önnerud *et al.* 2002).

Apesar de vários dos seus aspectos necessitarem ainda serem investigados, a degradação da lignina pode ser entendida como um processo multienzimático resultante da ação coordenada de uma série de enzimas intra e extracelulares, do grupo das oxidoreduases (representadas por peroxidases, lacases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio) e de metabólitos intermediários de baixa massa molecular (Leonowicz *et al.* 1999, Shan & Nerud 2002, Cantarella *et al.* 2003).

Os basidiomicetos ligninolíticos produzem vários tipos de enzimas pertencentes ao grupo das oxidoreduases (Quadro 4). Produzem peroxidases contendo grupo heme: lignina peroxidases (LiP; EC 1.11.1.14), manganês peroxidases (MnP; EC 1.11.1.13) e outras peroxidases com ampla atuação. Produzem flavina oxidases: glicose oxidases (EC 1.1.3.4), piranose-2-oxidases (EC 1.1.3.10), metanol oxidases (EC 1.1.3.13) e aril álcool oxidases (AAO; EC 1.1.3.7), que reduzem oxigênio dissolvido à peróxido de hidrogênio, com simultânea oxidação de hidroxilas de substratos específicos à carbonilas. Produzem ainda celobiose desidrogenases (CDH; EC 1.1.99.18) que são flavohemeproteínas que reduzem radicais fenoxi e radicais catiônicos, íons de ferro ou quinonas e simultaneamente oxidam celobiose à celobionolactona. Outro grupo de enzimas são as oxidases que contém cobre, como as lacases (EC 1.10.3.2), que reduzem oxigênio dissolvido à água, com oxidação de substratos fenólicos e não fenólicos, formando radicais catiônicos, quinonas ou radicais fenoxi, além das glioxal oxidases e galactose oxidases (EC 1.1.3.9), que reduzem oxigênio à peróxido de hidrogênio, com oxidação de um álcool ou aldeído específico (Shan & Nerud 2002).

Quadro 4. Enzimas que atuam na degradação de substratos lignocelulósicos (Leonowicz *et al.* 1999).

Nome recomendado	Nome sistemático	EC	Reação
Endo-1,4-β-glucanase	1,4-(1,3; 1,4)-β-D-Glucan-4 glucanohidrolase	3.2.1.4	Endohidrólise de ligações 1,4-β-D-glicosídicas
Exo-1,4-β-glucanases	1,4-β-D-Glucano celobiohidrolase	3.2.1.91	Hidrólise de ligações 1,4-β-D-glicosídicas liberando celobiose
	1,4-β-D-Glucano glicohidrolase	3.2.1.?	Hidrólise de ligações 1,4-β-D-glicosídicas liberando glicose
β-glucosidase	β-D-Glucosideo glucohidrolase	3.2.1.21	Hidrólise de terminações não redutivas de resíduos β-D-glicose com liberação de β-D-glicose
Endo-1,4-β-xilanase	1,4-β-D-Xilano xilanohidrolase	3.2.1.8	Endohidrólise de ligações 1,4-β-D-xilosídicas em xilanos
β-Xilosidase	1,4-β-D-Xilano xilanohidrolase	3.2.1.37	Hidrólise de 1,4-D-xilanos para remover sucessivamente resíduos D-xilose
α-L-Arabinofuranosidase	α-L-Arabinofuranosideo arabinofuranohidrolase	3.2.1.55	Hidrólise de terminações não redutivas de resíduos α-L-arabinofuranosideo em α-L-arabinosideos
Acetilesterase	Ester acético acetilhidrolase	3.1.1.6	Um éster acético + H ₂ O = um álcool + acetato
α-Glucuronidase	α-D-Glucuronosideo glucuronosohidrolase	3.2.1.?	α-D-glucuronosideo + H ₂ O = um álcool + D-glucuronato
Endo-1,4-β-mananase	1,4-D-Manano mananohidrolase	3.2.1.78	Hidrólises aleatórias de ligações 1,4-β-D-manosídicas em mananos
β-Manosidase	β-D-Manosideo manohidrolase	3.2.1.25	Hidrólise de terminações não redutivas de resíduos β-D-manose em β-D-manosideos
α-Galactosidase	α-D-Galactosideo galactohidrolase	3.2.1.22	Hidrólise de terminações de resíduos α-D-galactose em α-D-galactosideos
Lignina peroxidase	diarilpropano O ₂ , H ₂ O ₂ oxidoredutases	1.11.1.14	Catalisa várias oxidações em cadeia laterais alquil, quebra de ligações C-C
Manganês peroxidase	Mn(II): H ₂ O ₂ oxidoredutase	1.11.1.13	Cataliticamente dependente de H ₂ O ₂ e íons Mn ²⁺
Lacase	Benzenodiol:oxigênio oxidoredutase	1.10.3.2	4-Benzenodiol + O ₂ = 4-benzosemiquinona + H ₂ O
Horseradish peroxidase (peroxidase da raiz forte)	Doador:peróxido de hidrogênio oxidoredutase	1.11.1.7	Doador + H ₂ O ₂ = doador oxidado + 2H ₂ O
Protocatecóico 3,4-dioxigenase	Protocatecoato:oxigênio 3,4-oxidoredutase	1.13.11.3	3,4-Dihidroxibenzoato + O ₂ = 3-carboxi- <i>cis,cis</i> muconato
Catecol 1,2-dioxigenase	Catecol:oxigênio 1,2-oxidoredutase	1.13.11.1	Catecol + O ₂ = <i>cis,cis</i> muconato
Superóxido dismutase	Superóxido:superóxido oxidoredutase	1.15.1.1	O ₂ ⁻ + O ₂ ⁻ + 2H ⁺ = O ₂ + H ₂ O ₂
Glioxal oxidase	Glioxalato:oxigênio oxidoredutase	1.2.3.5	Glioxalato + H ₂ O + O ₂ = oxalato + H ₂ O ₂
Glicose-1-oxidase	β-D-Glicose:oxigênio 1-oxidoredutase	1.1.3.4	β-D-Glicose + O ₂ = D-Glicano-1,5-lactano + H ₂ O ₂
Aril álcool oxidase	Aril álcool:oxigênio oxidoredutase	1.1.3.7	Álcool aromático primário + O ₂ = aldeído aromático + H ₂ O ₂
Piranose-2-oxidase	Piranose:oxigênio 2-oxidoredutase	1.1.3.10	D-Glicose + O ₂ = 2-desidro-D-glicose + H ₂ O ₂
Celobiose:quinona oxidoredutase	Celobiose:quinona 1-oxidoredutase	1.1.5.1	Celobiose + quinona = celobiona-1,5-lactona + fenol
Celobiose desidrogenase	Celobiose:(aceptor) 1-oxidoredutase	1.1.99.18	Celobiose + aceptor = celobiona-1,5-lactona + aceptor reduzido

Além das oxidoredutases, esses fungos produzem um complexo sistema de hidrolases, que atuam na degradação de pectinas, hemiceluloses e celulose. Esse sistema hidrolítico compreende dois tipos de exoglucanases (celobiohidrolases, CBH, EC 3.2.1.91; e glucohidrolases, GCH, EC 3.2.1.?) e um conjunto de endoglucanases (EC 3.2.1.4), xilanases (EC 3.2.1.8, 3.2.1.37, e 3.2.1.72),

mananases (EC 3.2.1.78 e 3.2.1.100), glicosidasas (EC 3.2.1.20 a 3.2.1.25, 3.2.1.40, 3.2.1.51, e 3.2.1.55) e acetilxilanases, que asseguram a completa degradação dos polissacarídeos da madeira (Wood & Garcia-Campayo 1994, Shan & Nerud 2002). Assim como na degradação da lignina, a degradação dos polissacarídeos da madeira envolve a participação de várias enzimas. Durante a degradação de hemicelulose de madeira dura (*hardwood*), por exemplo, o acetil xilano ramificado é convertido por várias enzimas diferentes como: endo-1,4- β -xilanase, β -xilosidase, α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase e acetilesterase (EC 3.1.1.6). Para completa hidrólise de galactoglucomanos, constituintes da hemicelulose em madeira mole (*softwood*), ocorre a atuação das endo-1,4- β -mananase, β -manosidase, β -glucosidase e α -galactosidase (Wood & Garcia-Campayo 1994, Leonowicz *et al.* 1999).

Outro grupo de importância ao complexo enzimático ligninolítico inclui as superóxido dismutases (SOD; EC 1.15.1.1). Estas enzimas, assim como as glioxal oxidases, geralmente atuam de forma coordenada, cooperando com as enzimas ligninolíticas, celulasas e hemicelulasas. Entretanto, elas nunca atacam os componentes da madeira de forma isolada. As superóxido dismutases são enzimas de distribuição universal, contendo ferro (FeSOD), manganês (MnSOD) ou cobre e zinco (CuZnSOD) em seu sítio ativo. Elas são as enzimas chave na proteção da célula fúngica contra o estresse oxidativo causado por espécies de oxigênio reativo (ROS) como: o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os radicais superóxidos aniônicos ($O_2^{\cdot-}$) e os radicais hidroxila ($\cdot OH$). As SODs catalisam a reação dos radicais superóxido aniônicos à oxigênio e peróxido de hidrogênio. Estes radicais superóxido aniônicos comumente aparecem durante a redução cíclica de quinonas e também durante a atuação de lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases por fungos ligninolíticos. ROS agem como agente oxidante ou redutor, reagindo com outros radicais produzidos pelas enzimas ligninolíticas, contribuindo ainda para vários processos essenciais na transformação da lignina, como por exemplo, a quebra do anel aromático ou desmetoxilação (Leonowicz *et al.* 1999, Gonzales *et al.* 2002).

Além da atuação das enzimas ligninolíticas e das ROS, há outros mecanismos não-enzimáticos de ligninólise, os quais envolvem o sistema contendo ferro e íons de peróxido de hidrogênio (a conhecida reação de Fenton), íons metálicos de transição e os mediadores redox, transportando equivalentes redox entre a hifa e a matriz de lignina (Hammel 1996, Gonzales *et al.* 2002, Shumakovich *et al.* 2006). Estas reações não-enzimáticas podem sofrer influência do pH e temperatura, o pH próximo de 3, por exemplo, parece ser ideal para geração de radicais livres a partir da reação de Fenton (Andrade 2005).

A fisiologia da produção e as propriedades físico-químicas de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase de fungos ligninolíticos para degradação da lignina e de poluentes orgânicos têm

sido extensamente estudadas. A estas enzimas tem sido atribuído papel fundamental durante os mecanismos de biodegradação (Wesenberg *et al.* 2003).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a oxidação de estruturas não-fenólicas da lignina, que representam cerca de 80% do polímero. LiP é capaz de oxidar estruturas não-fenólicas de lignina; o radical catiônico intermediário do álcool veratrílico oxidado pela LiP quebra ligações C α -C β , os quais não são facilmente hidrolisáveis (Higuchi 2004). LiP tem sido utilizada para mineralizar uma variedade de compostos aromáticos recalcitrantes como: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) contendo três ou quatro anéis aromáticos, bifenilas policloradas e diversos corantes (Wesenberg *et al.* 2003).

Por muitos anos, a participação de lacase na degradação da lignina foi considerada limitada à oxidação de unidades fenólicas, que compreendem unicamente de 10 a 20% do polímero. Entretanto, durante as últimas décadas tem sido demonstrado que lacase também pode oxidar unidades não-fenólicas de lignina na presença de certos compostos, conhecidos como mediadores, que incluem substratos artificiais (Bourbonnais & Paice 1990, Call & Mücke 1997) e metabólitos fúngicos (Eggert *et al.* 1996a). Lacases oxidam muitas substâncias recalcitrantes como: anilinas (Hoff *et al.* 1985), estruturas relacionadas à lignina (Boyle *et al.* 1992, Bourbonnais *et al.* 1996), compostos organofosforados (Amitai *et al.* 1998), compostos modelos não-fenólicos de lignina (Majcherczyk *et al.* 1999), fenóis (Bollag *et al.* 1988, d'Acunzo *et al.* 2002), clorofenóis (Bollag *et al.* 2003), HPAs (Mougin *et al.* 2003), corantes aromáticos (Wesenberg *et al.* 2003) e outras.

MnP, que gera Mn³⁺, um poderoso agente oxidante, possui um papel chave no primeiro estágio de ligninólise. Mn³⁺ oxida determinadas estruturas aromáticas não-fenólicas de lignina, resultando na formação de radicais livres que reduzem Fe³⁺ e iniciam reações com o envolvimento de radicais hidroxila. Durante a oxidação da lignina, o Mn³⁺ é quelado e estabilizado por ácidos orgânicos, atuando desta forma como mediador de baixa massa molecular, longe do sítio ativo de MnP. O sistema Mn³⁺-quelados gera radicais reativos intermediários (radicais peroxi) a partir de ácidos graxos insaturados, como o ácido linolêico e outros derivados. O sistema MnP-lipídeo é forte o bastante para degradar ligações C α -C β de estruturas não-fenólicas de lignina, pela da abstração de hidrogênio do anel aromático (Collins *et al.* 1998, Hofrichter 2002, Higuchi 2004, Rabinovich *et al.* 2004). Além disso, MnP oxidam xenobióticos recalcitrantes como: corantes têxteis (Heinfling *et al.* 1998) e nitroaminotoluenos (Van Aken *et al.* 1999).

Os mediadores de baixa massa molecular são de grande importância para o processo de degradação de estruturas não-fenólicas da lignina. O tamanho das enzimas ligninolíticas não permite a completa penetração delas na madeira (Evans *et al.* 1994). Neste caso, as hifas fúngicas produzem os mediadores de baixa massa molecular, de alto potencial redox, de origem interna ou externa à hifa, que migram para longe das enzimas e oxidam a lignina ou outros componentes da

madeira pela geração de radicais livres. A interação destes radicais com as estruturas não-fenólicas de lignina facilita a quebra de anéis aromáticos. Este processo pode ocorrer em uma distância considerável da hifa, longe do local onde são secretadas as enzimas ligninolíticas, iniciando assim a decomposição da madeira (Leonowicz *et al.* 1999, Shumakovich *et al.* 2006). Entretanto, durante estudos de degradação de xenobióticos, mediadores naturalmente produzidos por alguns fungos podem estar ausentes nas condições de cultivo utilizadas, tendo como consequência baixas taxas de degradação, evidenciando a estreita correlação entre atividade ligninolítica (na presença de mediadores) e degradação de poluentes (Johannes & Majcherczyk 2000). Os mediadores podem ainda prevenir a polimerização de produtos da degradação de xenobióticos (Leontievsky *et al.* 2001).

O papel dos mediadores em uma oxidação enzimática de lacase é demonstrado na Figura 7. Um mediador pode ser uma pequena molécula que atua como uma espécie de “ponte de elétrons”. Assim, o mediador oxidado pode desenvolver um mecanismo de oxidação não disponível à enzima, estendendo a oxidação a uma série de substratos inacessíveis às enzimas (Fabbrini *et al.* 2002).

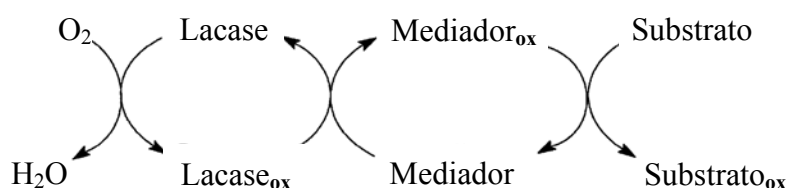


Figura 7. Papel do mediador na atividade enzimática de lacase (Fabbrini *et al.* 2002).

Alguns exemplos de mediadores naturais e sintéticos estão descritos no Quadro 5. Eles podem estar envolvidos em reações de oxidorredução com as enzimas ligninolíticas, gerando radicais reativos a partir de uma variedade de substratos semelhantes à lignina e também na formação de espécies de oxigênio reativo (ROS), as quais, direta ou indiretamente, podem atacar a lignina ou moléculas xenobióticas (Gonzales *et al.* 2002). Alguns destes mediadores naturais, como o álcool veratrílico, oxalato, malonato, fumarato e ácido 3-hidroxiantranílico são produzidos como resultado do metabolismo fúngico e suas secreções possibilitam ao fungo colonizar e degradar a madeira mais efetivamente que outros organismos (Leonowicz *et al.* 1999, Cantarella *et al.* 2003).

Quadro 5. Alguns mediadores sintéticos e naturais (Wesenberg *et al.* 2003).

Mediador	Organismo (enzima)
<i>Mediadores naturais</i>	
Mn ²⁺	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Ácidos orgânicos (malonato, oxalato, etc.)	<i>Armillaria mellea</i> , <i>Fomes annosus</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>P. chrysosporium</i> , <i>Phlebia radiata</i> , <i>Cenporiopsis subvermispora</i> , <i>Nematoloma frowardii</i> (LiP, MnP)
Álcool veratrílico	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (LiP)
Ácido 3-hidroxiantrílico (3-HAA)	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> (lacase)
2-Cloro-1,4-dimetoxibenzeno (2Cl-1,4DMB)	<i>Trametes versicolor</i> (LiP)
<i>Mediadores sintéticos</i>	
1-Hidroxibenzotriazol (1-HBT)	<i>T. versicolor</i> , <i>T. villosa</i> , <i>P. cinnabarinus</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Myceliophthora thermophila</i> , <i>Coriolopsis gallica</i> , <i>P. ostreatus</i> e outros organismos (lacase)
Ácido violúrico	<i>T. villosa</i> , <i>P. cinnabarinus</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>M. thermophila</i> (lacase)
ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico) (ABTS)	<i>T. versicolor</i> , <i>C. gallica</i> , <i>P. ostreatus</i> e outros organismos (lacase)

A ação da hifa fúngica na madeira e a relação entre as enzimas e radicais no processo de transformação de substratos lignocelulósicos são ilustrados na Figura 8. As enzimas são secretadas pelas hifas, onde cooperam com outras enzimas e com mediadores. Quelantes e mediadores oxidados são “exportados” para dentro da madeira, oxidando suas estruturas. Lacase oxida radicais derivados de lignina (p. ex. hidroquinonas e semiquinonas) a quinonas, produzindo oxigênio para glioxal oxidase (GOx) e/ou álcool veratrílico oxidase (AVO). AVO e GOx produzem H_2O_2 , substrato para atividade de LiP e MnP (Leonowicz *et al.* 1999).

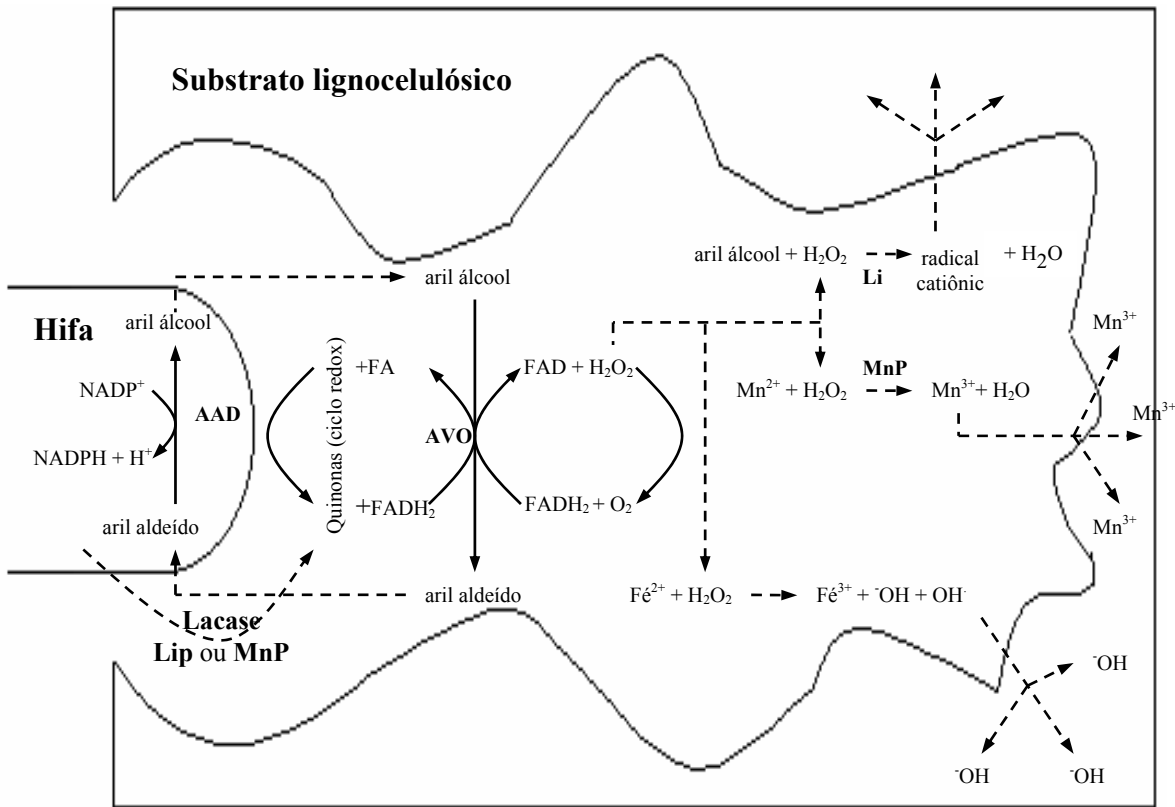


Figura 8. Degradação de substratos lignocelulósicos (adaptado de Leonowicz *et al.* 1999).

A geração de radicais de oxigênio reativos e a atividade de peroxidases requerem a presença de H_2O_2 extracelular. Diferentes fungos da podridão branca possuem diferentes mecanismos de geração de peróxido de hidrogênio. A Figura 9 esquematiza as vias bioquímicas desenvolvidas por estes fungos para produção de peróxido de hidrogênio. Aril álcool oxidase e glicoxal oxidase são as principais enzimas responsáveis pela produção de H_2O_2 extracelular (Shan & Nerud 2002). Os álcoois benzil são oxidados à benzaldeídos, e em menor extensão são também convertidos a ácidos benzóicos por aril álcool oxidases (AAO). Durante esta reação, H_2O_2 é produzido. Em seguida, aril álcool desidrogenase (AAD) reduz benzaldeído e ácidos benzóicos à álcoois benzil regenerados. Inicialmente, há uma redução de dois elétrons do aldeído por AAD e a subsequente transferência de elétrons do álcool benzil para o oxigênio, catalisado por AAO. AAD requer grande quantidade de NADPH como força redutora (Guillen *et al.* 1997, Jensen *et al.* 2002). Alguns substratos para AAOs (principalmente álcoois aromáticos) são formados durante a despolimerização da lignina, via redução enzimática de aldeídos aromáticos liberados pela quebra de ligações $C_\alpha-C_\beta$ de monômeros de lignina (Kirk & Farrel 1987). Alternativamente, os fungos ligninolíticos podem diretamente sintetizar esses álcoois aromáticos. Aril álcoois, como álcool veratrílico e álcool anisil são sintetizados por muitos fungos da podridão branca e desempenham importante função na formação de H_2O_2 . LiP e MnP, que são produzidas por muitos fungos estão também envolvidas na biosíntese de compostos aromáticos metilados e hidroxilados, como o álcool veratrílico (Pelaez *et al.* 1995, Shan & Nerud 2002).

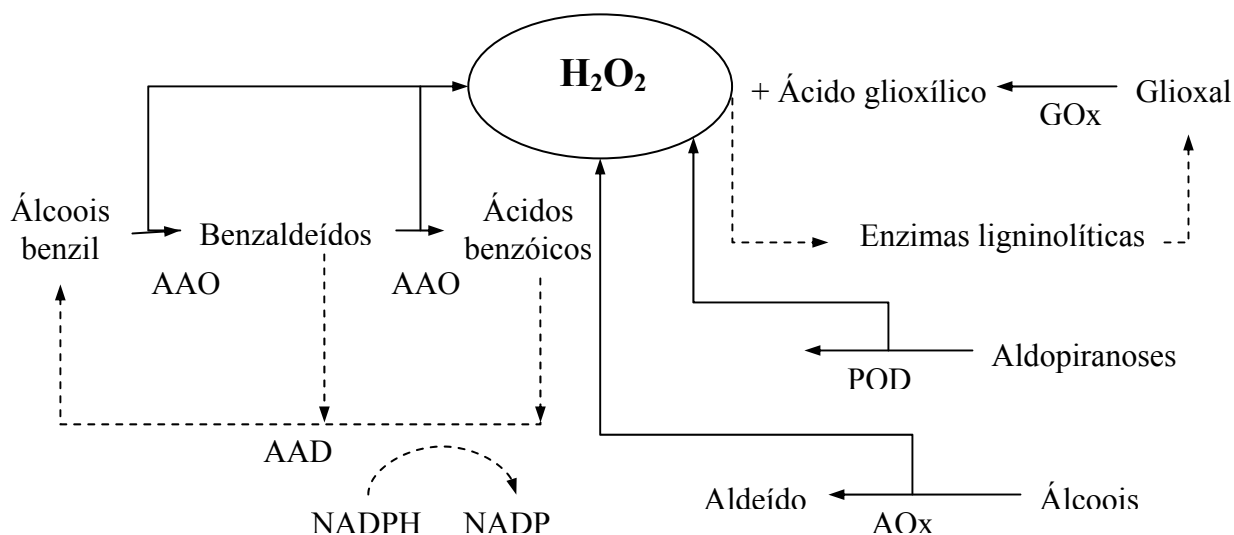


Figura 9. Formação de peróxido de hidrogênio em basidiomicetos ligninolíticos. GOx, glicoxal oxidase; POD, piranose oxidase; AOx, álcool oxidase; AAD, aril álcool desidrogenase; AAO, aril álcool oxidase (Shan & Nerud 2002).

Glioxal oxidase (GOx) é uma metaloenzima cúprica produzida por muitos fungos da podridão branca e também é um componente essencial das vias extracelulares envolvidas na degradação da lignina. GOx utiliza aldeído, compostos α -hidroxicarbonil ou α -dicarbonil como substrato, produzindo H_2O_2 (Kersten & Kirk 1987).

Pelo fato que das enzimas envolvidas na degradação da lignina e da celulose não penetrarem completamente na madeira, é pressuposto que o radical hidroxila ($\cdot OH$), junto com o Mn^{3+} e com mediadores naturais são responsáveis pela degradação inicial de substratos lignocelulósicos, participando também de outras reações importantes durante a degradação da lignina e de poluentes orgânicos. O radical hidroxila está entre as espécies químicas mais reativas, devido à sua alta reatividade ($E^\circ = 2,06$ V), menor apenas do que o elemento flúor, não é seletivo e pode reagir com uma grande variedade de poluentes orgânicos, promovendo a sua total mineralização. Assim, durante a biodegradação da lignina, o $\cdot OH$ oxida não somente lignina, mas também celulose (Guillén *et al.* 2000, Gonzales *e al.* 2002).

Os radicais hidroxila podem reagir com o ferro formando um complexo ferro-OH, sendo que este complexo é ligeiramente menos reativo do que unicamente $\cdot OH$ (Hammel 1996). A redução cíclica de quinonas também produz radicais hidroxila em basidiomicetos ligninolíticos. Guillén *et al.* (2000) descrevem a produção de radicais hidroxila em mistura de reações contendo lacase de *Pleurotus eryngii*, hidroquinonas derivadas de lignina e íons férricos quelados. Neste sistema, hidroquinonas primeiramente são convertidas à semiquinonas por lacase. A auto-oxidação de semiquinonas consequentemente direciona a ativação de oxigênio, produzindo radicais superóxido aniônicos ($O_2^{\cdot -}$), que reduzem íons férrico a ferroso e também oxigênio a novos radicais superóxido aniônicos. O radical $O_2^{\cdot -}$ não reage diretamente com a lignina, nem faz com que as enzimas ligninolíticas reajam. O radical superóxido aniônico reage com outros radicais produzidos pelas enzimas ligninolíticas, conduzindo a abertura do anel aromático de lignina ou desmetilação, atuando como agente redutor ou oxidante. Como oxidante, produz Mn^{3+} a partir de Mn^{2+} . O radical $O_2^{\cdot -}$ também participa da reação de Fenton, com conseqüente geração de $\cdot OH$. O $O_2^{\cdot -}$ também pode reagir com o H_2O_2 e formar $\cdot OH$ ($O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \rightarrow OH + \cdot OH + O_2$; reação de Haber-Weiss) (Guillén *et al.* 2000, Shan & Nerud 2002). Atualmente, pesquisas com enzimas ligninolíticas e estudos da biologia da degradação da lignina sugerem um possível papel das enzimas ligninolíticas na geração de radicais livres, que então atuam na lignina, juntamente com outras vias de formação de $\cdot OH$. A figura 10 descreve as reações existentes em basidiomicetos ligninolíticos que produzem radicais hidroxila e as reações subseqüentes.

Uma melhor compreensão do mecanismo ligninolítico de fungos basidiomicetos contribuirá para a geração de novas tecnologias ambientais "limpas" para aplicação industrial (Hammel 1996). Contudo, o mecanismo de degradação da lignina e de poluentes orgânicos não é o mesmo em todos os basidiomicetos ligninolíticos devido a composição e particularidades encontradas no sistema ligninolítico destes fungos. Galliano *et al.* (1991) estudaram a degradação da lignina (solubilização) por *Rigidoporus lignosus*, um organismo que não produz LiP, mas sintetiza lacase e MnP. Quando estas duas enzimas foram purificadas e suas propriedades estudadas *in vitro*, nenhuma destas enzimas foi capaz de solubilizar lignina radiomarcada. Quando ambas as enzimas foram adicionadas ao mesmo tempo à mistura de reação, a solubilização da lignina foi extensa; MnP e lacase atuaram sinergicamente. Além disso, glicose oxidase aumentou a solubilização da lignina por prevenção a repolimerização causada por radicais formados por MnP e lacase. Assim, torna-se importante o estudo do sistema enzimático ligninolítico de basidiomicetos que são utilizados em processos de biorremediação.

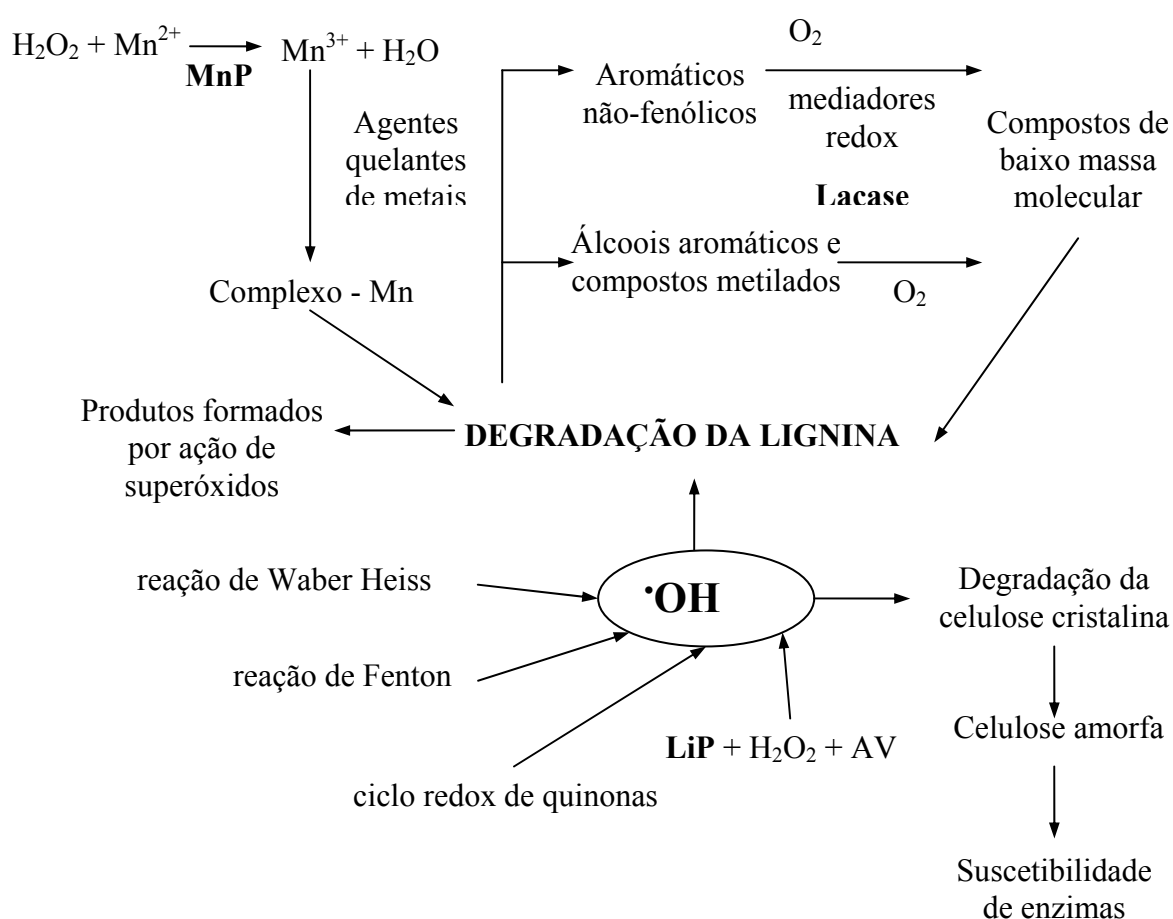


Figura 10. Geração de radicais hidroxila e os agentes envolvidos na degradação da lignina (modificado de Shan & Nerud 2002).

3. Enzimas ligninolíticas

Vários parâmetros de cultivo afetam a produção e a atividade das enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos. Estes parâmetros incluem: a disponibilidade de oxigênio, fonte e concentração de carbono e nitrogênio, microelementos, pH e temperatura (Van Der Merwe 2002).

A maioria das enzimas pode ser inibida por certas substâncias químicas. Por meio do estudo combinado de pH e temperaturas ótimos e a ação de determinados inibidores enzimáticos é possível identificar qual ou quais enzimas ligninolíticas estão presentes em determinados extratos enzimáticos. Além disso, a presença de alguns metais no ambiente pode influenciar a atividade das enzimas ligninolíticas. O teste padronizado da ação de inibidores nas enzimas ligninolíticas é realizado por pré-incubação da enzima com a substância inibidora em determinado tempo (usualmente 2-10 min) para assegurar que a inibição seja completa. O efeito de inibição é determinado no ensaio padrão de oxidação do substrato enzimático apropriado. A substância inibidora não deve reagir com o substrato inicial ou o produto final. No caso de sistemas enzimáticos complexos, deve-se observar a possível participação de reações não-enzimáticas empregando-se extrato enzimático previamente fervido por 10 minutos para completa desnaturação enzimática (Johannes & Majcherczyk 2000).

O conhecimento das características físico-químicas das enzimas ligninolíticas produzidas por fungos basidiomicetos é de fundamental importância para a aplicação destes fungos em processos de biorremediação. O Quadro 6 descreve as principais características das enzimas ligninolíticas.

Quadro 6. Características das enzimas ligninolíticas (Wesenberg *et al.* 2003).

EC	MnP (1.11.1.13)	LiP (1.11.1.14)	Lacase (1.10.3.2)
Grupo prostético	Mn(II): H ₂ O ₂ oxidoreductases Heme	diarilpropano O ₂ , H ₂ O ₂ oxidoreductases Heme	<i>p</i> -benzenodiol O ₂ oxidoreductases 1 Cobre tipo I, 1 cobre tipo II e 2 cobres pareados tipo III
MM (kDa)	32-62,5 (122)	38-47	59-110 (tetrâmeros ≤390)
Glicosilação	N-	N-	N-
Isoformas	monômeros; acima de 11	monômeros; acima de 15	mono-, di-, tetrâmeros, vários
pI	2,8-7,2	3,2-4,7	2,6-4,5
Faixa de pH	2,6-4,5	2,0-5,0	2,0-8,5
E° (mV)	1510	1450	500-800
Requer H ₂ O ₂	sim	sim	Não
Estabilidade	+++	+	+++
Mediadores naturais	Mn ²⁺ , Mn ³⁺	AV, 2Cl-1,4DMB	3-HAA
Especificidade	Mn ²⁺	ampla, aromáticos, incluindo não fenólicos	ampla, fenólicos
Mediadores secundários e sintéticos	Tióis, ácidos graxos insaturados	não	ABTS, HBT e siringaldazina

Em geral, os fungos basidiomicetos ligninolíticos são capazes de tolerar elevadas concentrações de poluentes orgânicos, o que possibilita a aplicação destes organismos na biorremediação (Barr & Aust 1994). Porém, a presença do poluente orgânico nas culturas fúngicas pode interferir em processos metabólicos vitais para o organismo, incluindo alterações na produção e na atividade das enzimas ligninolíticas. Em organismos eucariotos, os xenobióticos podem promover a alteração de sistemas enzimáticos responsáveis por processos vitais, podendo ocorrer (Jonsson 2005):

- aumento da atividade enzimática no meio extracelular por extravasamento da proteína para este meio, com conseqüente diminuição desta atividade no meio intracelular;
- aumento da atividade enzimática no meio extracelular ou intracelular por ativação enzimática, através da interação direta do agente químico com a enzima;
- aumento da atividade enzimática intracelular por indução na síntese da proteína;
- diminuição da atividade no meio extracelular ou intracelular por inibição, através da interação direta do agente químico com a proteína.

Duas estratégias têm sido propostas para a utilização de enzimas ligninolíticas para a degradação de compostos recalcitrantes: (1) transformação direta de poluentes por culturas ativas de basidiomicetos ligninolíticos, e (2) o uso de enzimas extraídas do meio de cultura. Contudo, a escolha da melhor estratégia irá depender dos objetivos e das condições ambientais empregadas durante o processo de biorremediação (Trupkin *et al.* 2003).

3.1. Lignina peroxidases (LiP)

Acredita-se que o mecanismo de secreção de proteínas vem sendo conservado ao longo da evolução, ocorrendo em leveduras e outros eucariontes, assim como em fungos filamentosos. Durante a evolução de fungos degradadores de lignina, LiP pode ter sido formada com função de destoxificação intracelular, promovendo reações de desaminação de produtos de ácidos amino-aromáticos, posteriormente o mecanismo extracelular, com a presença de LiP, possibilitou a degradação da lignina (Rabinovich *et al.* 2004).

LiP foi descoberta em 1984, em culturas de *Phanerochaete chrysosporium* (Tien & Kirk 1984). Essas enzimas são os maiores componentes do sistema envolvido na degradação de lignina por este organismo. Desde sua descoberta, LiP tem sido extensamente caracterizada molecular e bioquimicamente (Gold & Alic 1993, Chivukula *et al.* 1995, Johjima *et al.* 1999, Sugiura *et al.* 2003).

No processo de degradação da lignina, LiP é inicialmente oxidada pelo H_2O_2 e oxida núcleos aromáticos da molécula de lignina (fenólicos e não fenólicos), gerando radicais catiônicos. Estes reagem espontaneamente com nucleófilos (primariamente H_2O) e com oxigênio molecular, gerando uma “combustão enzimática” onde ligações C-C e C-O são quebradas, despolimerizando a lignina e abrindo os anéis aromáticos. Esta enzima é uma glicoproteína que contém Fe protoporfirínico IX como grupo prostético e é dependente de H_2O_2 para sua atividade (Kirk *et al.* 1978).

Durante o ciclo catalítico o Fe contido, no grupo heme da LiP, passa por estados de óxido-redução (Figura 11). O primeiro passo compreende a oxidação do Fe (III) da enzima nativa para Fe (IV), pela ação do H_2O_2 , gerando o composto I, tipo radical catiônico da LiP. Pela redução do composto I, por transferência de um elétron, é formado o composto II, que ainda contém Fe (IV). O agente redutor pode ser um substrato como o álcool veratrílico ou o H_2O_2 . Finalmente, uma etapa de redução por um elétron retorna a enzima a seu estado nativo, completando o ciclo catalítico. Na ausência do substrato redutor o composto II é oxidado pelo H_2O_2 para o composto III, uma forma da LiP com limitada capacidade catalítica, que com excesso de H_2O_2 é rapidamente inativada (Martínez 2002).

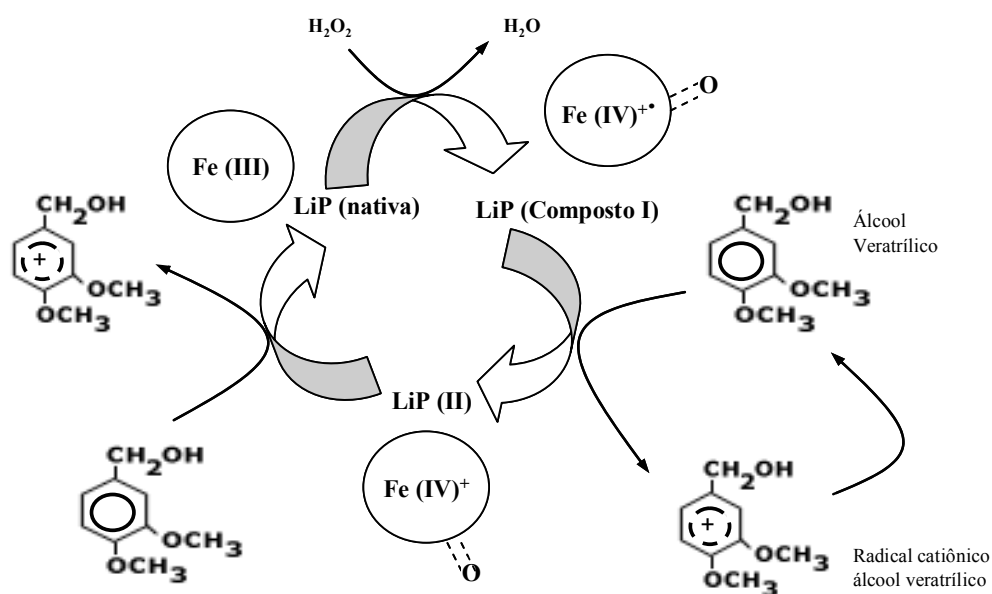


Figura 11. Ciclo catalítico da lignina peroxidase.

LiP é relativamente inespecífica para seus substratos, uma característica que compartilhada com outras peroxidases não-ligninolíticas, oxidando substratos fenólicos e corantes, mas difere destas pois os substratos preferidos de LiP são compostos aromáticos não-fenólicos. Ao passo que radicais fenoxi são os primeiros produtos de oxidação de substratos fenólicos por peroxidases, cátions aromáticos são formado depois da oxidação de compostos aromáticos não-fenólicos por LiP. Conseqüentemente, reações com os radicais formados são responsáveis pela variedade de

produtos detectados durante oxidação de compostos modelos de subestruturas de lignina por LiP (Martínez 2002).

O álcool veratrílico, um metabólito produzido por *Phanerochaete chrysosporium* e por outros fungos da podridão branca sob condições ligninolíticas, desempenha um papel importante no ciclo catalítico da LiP. Ele atua como redutor da enzima e aparentemente a protege da inativação por excesso de H_2O_2 . A oxidação do álcool veratrílico (AV) para veratraldeído pela LiP, na presença de H_2O_2 , é a reação mais utilizada como método de determinação da atividade catalítica da enzima (Tien & Kirk 1984). Isoenzimas de LiP de *Irpex lacteus* oxidam álcool veratrílico e uma variedade de compostos fenólicos, exibindo no geral, preferência pelo álcool veratrílico como doador de elétrons (Rothschild *et al.* 2002). O radical catiônico do AV atua como mediador redox, oxidando substratos que LiP não poderia interagir diretamente (Johima *et al.* 1999).

A presença de LiP em basidiomicetos ligninolíticos tem sido considerada rara. Apesar de apresentar propriedades catalíticas parecidas, as diferenças nas propriedades físicas de isoenzimas de LiP de *Irpex lacteus* sugeriram que o alto grau de diversidade é uma característica de LiP de basidiomicetos (Camarero *et al.* 2000). LiP de *Phlebia radiata* exibiu propriedades análogas a catalase animal (Niku Paavola *et al.* 1988). Mais recentemente, uma enzima híbrida exibindo atividade de LiP e MnP foi observada em linhagens de *Pleurotus eryngii* e *Bjerkandera* sp. Bos55 (Moreira *et al.* 2005). A identificação e caracterização de LiP em outros basidiomicetos ligninolíticos que exibem atividade ligninolítica poderia ajudar a determinar o grau de diversidade de LiP entre estes fungos (Rothschild *et al.* 2002).

3.2. Manganês peroxidases (MnP)

A produção de manganês peroxidase ou peroxidase dependente do manganês é aparentemente limitada a certos fungos basidiomicetos, e até agora, não se evidenciou qualquer bactéria, levedura e nenhum basidiomiceto micorrízico capaz de produzir esta enzima. A capacidade de sintetizar MnP está distribuída entre grupos de basidiomicetos taxonomicamente distintos. Espécies colonizadoras de madeira, pertencente às famílias Meruliaceae, Coriolaceae e Polyporaceae, assim como basidiomicetos decompositores de serapilheira, das famílias Strophariaceae (família de *Psilocybe castanella*) e Tricholomataceae expressam atividade de MnP. O peso molecular de MnP varia de 38 à 62,5 kDa, mas a maioria das enzimas purificadas têm peso molecular próximo à 45 kDa (Hofrichter 2002). Isoenzimas de MnP são freqüentemente produzidas e até 11 isoformas diferentes foram descritas para *Ceriporiopsis subvermispora*. Essas isoformas diferiram principalmente nos pontos isoelétricos (pI), que estiveram na faixa ácida (pH 3-4),

embora isoformas na faixa neutra e menos ácida foram encontradas em determinados fungos (Lobos *et al.* 1994).

A MnP é uma glicoproteína com Fe protoporfirínico IX como grupo prostético, dependente de H_2O_2 para sua atividade. A oxidação de lignina e outros compostos xenobióticos por MnP é dependente da disponibilidade de íons de manganês (Brown *et al.* 1991). Seu ciclo catalítico é semelhante ao de LiP; no entanto, o Mn^{2+} atua como doador de elétrons para gerar o composto II (Hofrichter 2002).

O ciclo catalítico da MnP é iniciado pela ligação de H_2O_2 ou um outro peróxido orgânico ao ferro nativo da enzima, formando um complexo ferro-peróxido (Figura 12). A quebra subsequente da ligação O-O do peróxido requer a transferência de 2 elétrons do grupo heme da enzima, que resulta na formação de um radical complexo Fe^{4+} -oxo-porfirina (MnP-I). Com a quebra da ligação dos oxigênios, uma molécula de água é liberada. Uma redução seguinte acontece formando o complexo MnP-II (Fe^{4+} -oxo-porfirina não radicalar). Um íon Mn^{2+} age como doador de 1 elétron para esse complexo intermediário e é oxidado à Mn^{3+} . A redução da MnP-II acontece de maneira similar e outro Mn^{3+} é formado de um Mn^{2+} , levando assim à geração da forma original da enzima, liberando uma segunda molécula de água. Ao passo que o MnP-I se comporta como LiP e como a peroxidase de raiz forte e pode, junto do íon Mn^{2+} , ser reduzido por outros doadores de elétrons, o MnP-II é pouco reduzido por outros substratos e requer exclusivamente Mn^{2+} para completar o ciclo catalítico (Hofrichter 2002). O Mn^{3+} formado é estabilizado por ácidos orgânicos, tais como ácido oxálico, e age como um agente oxi-redutor difuso, de baixo peso molecular, que ataca moléculas orgânicas inespecificamente pela subtração de um elétron (Gold & Alic 1993). Devido a inespecificidade do Mn^{3+} , o sistema MnP é eficiente para oxidação de vários poluentes orgânicos.

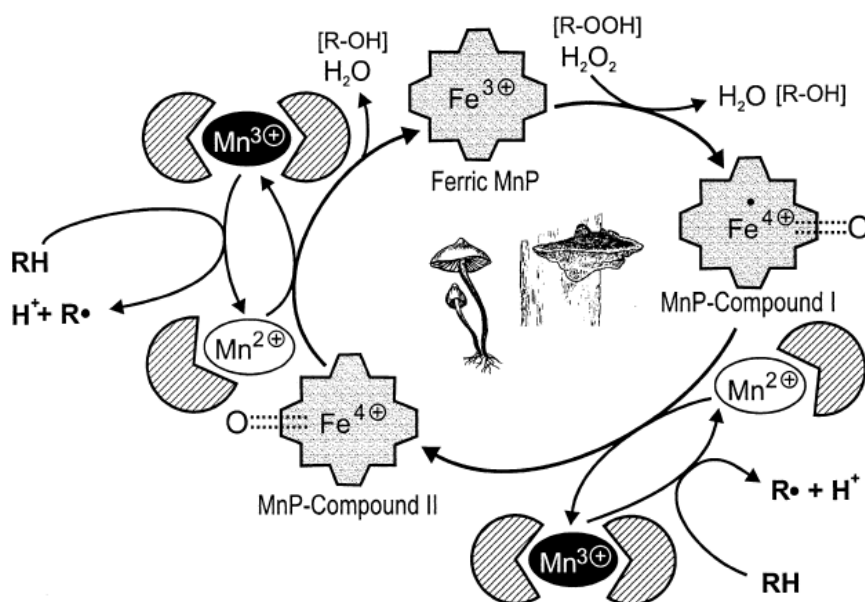


Figura 12. Ciclo catalítico da manganês peroxidase (MnP) (Hofrichter 2002).

Alem da atuação direta destes íons Mn^{3+} na transformação da lignina, outros sistemas têm sido esclarecidos para atuação da MnP na degradação da lignina e de poluentes orgânicos. Um destes sistemas é baseado na mediação por ácidos graxos insaturados e seus derivados (lipídeos) e tem sido relacionado com a degradação de estruturas não fenólicas de lignina por MnP. Este sistema atua pela geração de radicais intermediários reativos (radicais peroxil) a partir de estruturas de ácidos graxos insaturados, processo conhecido como peroxidação lipídica. Como resultado, este sistema MnP-lipídeo é forte o bastante para quebrar ligações C_{α} - C_{β} e β -aril éter de modelos não-fenólicos de lignina. Os ácidos graxos insaturados necessários para a peroxidação lipídica estão presentes em microambientes naturais de fungos ligninolíticos e há evidências que tais substâncias estão naturalmente presentes na madeira (Watanabe *et al.* 2000, Hofrichter 2002).

A atuação de MnP durante a peroxidação lipídica está envolvida na degradação de compostos xenobióticos recalcitrantes. Assim, a avaliação da capacidade de culturas fúngicas para promover a peroxidação lipídica é de grande importância. O estímulo da peroxidação de ácidos graxos insaturados com concomitante produção de radicais lipídicos é reconhecido como atividade pro-oxidante (Kapich *et al.* 2005). O Tween 80 é um surfactante aniônico feito de um ácido graxo insaturado, o ácido olêico. A adição de Tween 80 a culturas de *P. chrysosporium* aumentou a degradação de fenantreno. MnP produzida por *P. chrysosporium* promoveu a peroxidação lipídica, co-oxidando estruturas não-fenólicas de lignina e fenantreno (Hofrichter 2002). Em contraste, o Tween 20 que contém ácido graxo saturado, não age como mediador. A peroxidação lipídica de Tween 80 promovido por MnP possui um papel importante na descoloração de diferentes corantes têxteis reativos por *Phanerochaete sordida* (Harazono & Nakamura 2005).

A reação de peroxidação lipídica acontece com o consumo de oxigênio e conduz a geração de radicais peroxil lipídicos. O consumo de oxigênio também ocorre em reações subsequentes, portanto, a medição do consumo de oxigênio pode ser um indicador qualitativo da intensidade da peroxidação lipídica. Esta medição da peroxidação lipídica tem sido aplicada para reações envolvendo preparações de enzima purificadas (Kapich *et al.* 1999, Watanabe *et al.* 2000). Esta medição aproximada pode ser aplicada para determinar a atividade pro-oxidante em extratos de culturas fúngicas onde a atividade real de MnP pode ser muito baixa e compostos antioxidantes estão presentes de forma obscura. Contudo, MnP não é unicamente a responsável pela iniciação da peroxidação lipídica em culturas fúngicas. É possível que outras enzimas oxidativas como LiP e lacase, ou ainda, agentes não-enzimáticos estejam envolvidos em reações de peroxidação e consumo de O_2 (Kapich *et al.* 2005).

Há várias vias possíveis para geração de radicais livres a partir de ácidos graxos insaturados. Watanabe *et al.* (2000) propõem os mecanismos iniciais de peroxidação de ácido linolêico (Figura 13). O primeiro mecanismo é a atuação direta de MnP na abstração de hidrogênio da posição bis-

alílica de ácidos graxos insaturados (Figura 13, I). O segundo mecanismo é a geração de radicais livres de hidroperóxidos lipídicos produzidos por autooxidação (Figura 13, II) ou por abstração de hidrogênio de formas enólicas de ácidos carboxílicos por Mn^{3+} (Figura 13, III). Na formação de radicais livres do hidroperóxido lipídico intermediário, quatro mecanismos diferentes são propostos. O primeiro é a formação de radical alcooxil hidroperóxido lipídico com concomitante oxidação de Mn^{2+} como descrito na decomposição de hidroperóxido lipídico dependente de Fe^{2+} (Figura 13, A). Outra possível via é a formação de radicais peroxil do hidroperóxido lipídico com co-redução de Mn^{3+} (Figura 13, B). A transferência de dois elétrons do hidroperóxido lipídico à MnP nativa pode produzir radicais livres se este passo for acompanhado pela degradação de sua cadeia alquenil (Figura 13, C1). Uma redução de elétrons do composto I ou composto II por hidroperóxido lipídico (Figura 13, C2 e 3) é outra possível via para geração de radicais livres de hidroperóxido lipídico.

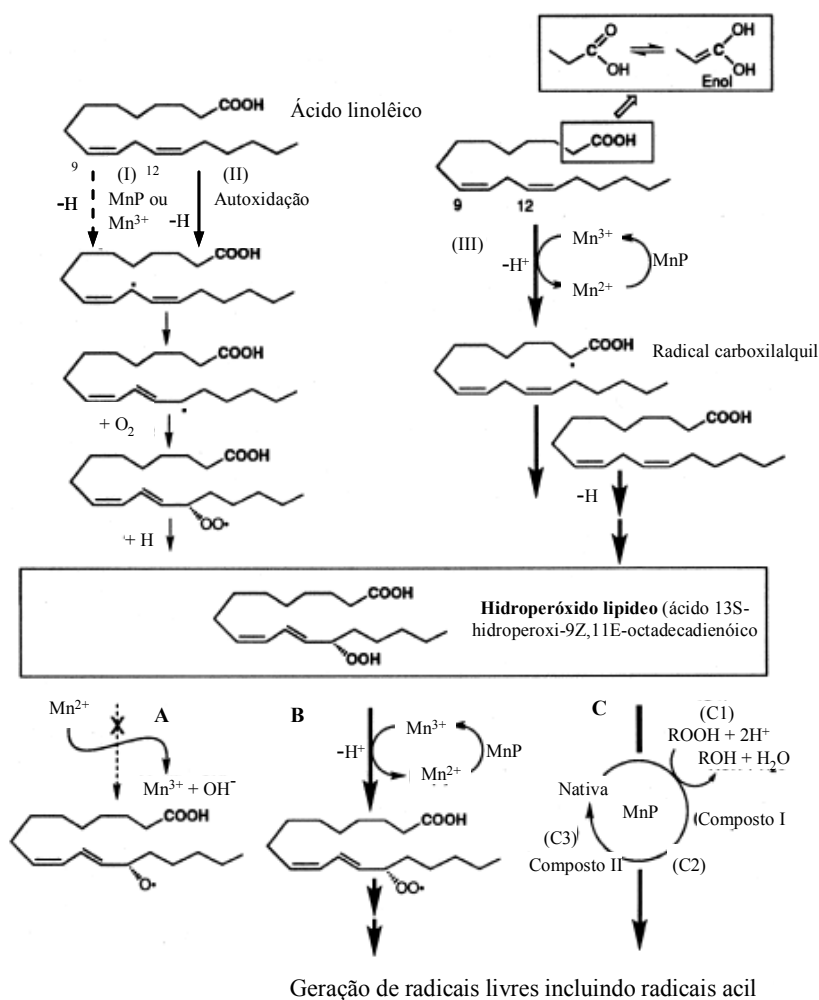


Figura 13. Mecanismo inicial de peroxidação lipídica por MnP (Watanabe *et al.* 2000).

Descobertas recentes sobre o papel de MnP na degradação da lignina permite a adoção dos conceito de Kirk & Farrell (1987), em que a degradação da lignina constitui um processo de “combustão enzimática” extracelular. Este conceito tem sido adotado por muitos microbiologistas

que estudam a decomposição da madeira, e este conceito tem sido usado para descrever a despolimerização de lignina de alta massa molecular pela atuação inespecífica das enzimas ligninolíticas (Hofrichter *et al.* 1998).

Neste contexto, alguns autores propõem o envolvimento de MnP na formação de dióxido de carbono a partir de lignina. Um esquema hipotético de formação de CO₂ por catálise de estruturas de lignina por MnP é mostrado na Figura 14. As reações propostas são baseadas na formação de radicais pelo sistema MnP-mediador (ácidos graxos insaturados, por exemplo). O ponto inicial da reação é um anél fenólico na lignina, que é convertido a um radical fenoxil. O último está apresentado em diferentes formas mesoméricas, como por exemplo, radicais de carbono-centralizados em um anél aromático quinóide. Simultaneamente, ácidos orgânicos quelantes (oxalato) são oxidados na presença de O₂ à radicais peroxil e outros radicais, que podem liberar superóxidos. O radical superóxido tende a reagir com o radical carbono-centralizado para formar um peróxido de éter instável, que sofre divisão espontânea do anél aromático resultando na formação de uma estrutura alifática (derivado do ácido mucônico) compreendendo um grupo carboxílico livre. Além disso, o radical alifático reage com o dioxigênio e está sujeito ao ataque de MnP, levando provavelmente, a mais dióxido de carbono e ácidos orgânicos de baixa massa molecular (Hofrichter 2002).

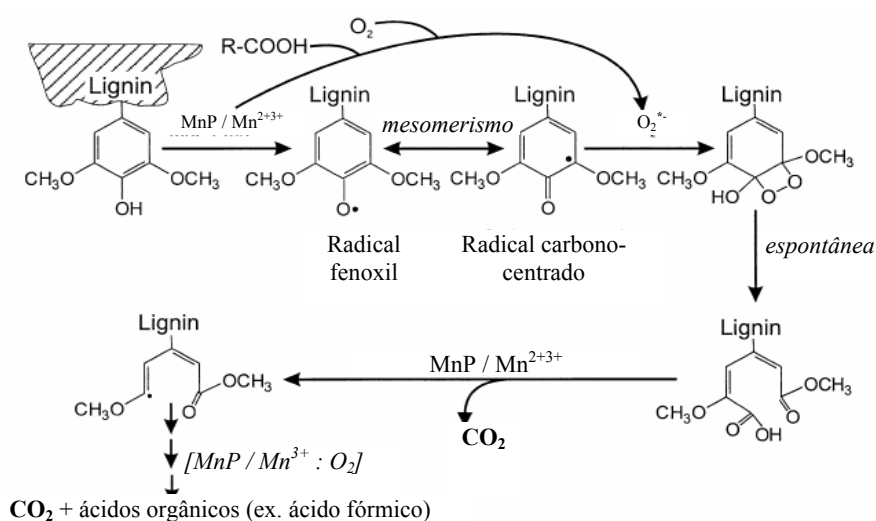


Figura 14. Formação de CO₂ a partir de estruturas aromáticas de lignina por MnP (Hofrichter 2002).

Uma cooperação "positiva" de MnP com outras oxidoredutases extracelulares como MnP e lacase, MnP e LiP, assim como MnP e celulasas (celobiose desidrogenase) resultaram no aumento da despolimerização de lignina. Futuros estudos utilizando ¹⁴C-ligninas, ¹⁴C-polissacarídeos, assim como diferentes concentrações de Mn, em experimentos *in vivo*, poderão ajudar a compreender melhor o processo de mineralização da lignina e de poluentes orgânicos por basidiomicetos ligninolíticos (Hofrichter 2002).

3.3. Lacases

Até recentemente lacase era estabelecida somente em eucariotos (fungos, plantas superiores e insetos), mas agora há evidência de sua distribuição em procariotos, e a primeira estrutura cristalina de uma lacase bacteriana foi obtida. Em plantas, lacases estão envolvidas na lignificação. Em fungos, além da degradação de lignina, lacases parecem estar envolvidas na esporulação, produção de pigmentos e patogenicidade de plantas. Em insetos, lacase catalisa a união oxidativa de catecóis com proteínas envolvidas na esclerotização da cutícula (Yaver *et al.* 1996, Enguita *et al.* 2003, Claus 2004).

Devido à capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, lacases fúngicas estão recebendo grande atenção em várias aplicações industriais como deslignificação, produção de etanol, modificação de fibras da madeira, clareamento de corantes, síntese de produtos químicos/medicinais e remediação de solos e águas contaminadas. Pesquisas recentes têm sido intensas e muito tem sido elucidado sobre a diversidade de lacases e suas utilidades (Schneider *et al.* 1999, Durán *et al.* 2002, Mayer & Staples 2002).

Filogeneticamente, lacases são membros da família de proteínas multi-cobres, que incluem ascorbato oxidase, ceruloplasmina e bilirrubina oxidases. Lacases geralmente são codificadas por uma família de genes. A expressão destes genes pode ser constitutiva ou indutiva. Conseqüentemente, em diferentes fungos, a produção desta enzima pode ser acentuada sob condições de cultura apropriadas (Klonowska *et al.* 2002, Mayer & Staples 2002, Claus 2004).

Em muitas espécies de fungos a presença de lacases indutivas ou constitutivas têm sido descritas. Usualmente a enzima origina-se no citoplasma, mas muitos exemplos de secreção têm sido descritos na literatura, entretanto, pouca atenção tem sido dada a localização sub-celular desta enzima e ao mecanismo de secreção (Mayer & Staples 2002). A produção de lacase é afetada por muitos fatores durante o desenvolvimento fúngico, como a composição do meio de cultura (relação carbono e nitrogênio), pH, temperatura, taxa de aeração, etc (Kahraman & Gurdal 2002).

Por muitos anos, a visão convencional foi a de que *P. chrysosporium* produzia unicamente LiP e MnP. Entretanto, tem sido observada baixa atividade de lacase produzida por *P. chrysosporium* sob condições de cultivo com altas concentrações de nitrogênio e cobre, o uso de celulose ao invés de glicose como fonte de carbono e o crescimento em cultivo semi-sólido. Entretanto, tem sido sugerido que a identificação de lacase baseada na oxidação do ABTS pode ser um artefato técnico causado por Mn^{3+} presente nas culturas de *P. chrysosporium* (Larondo *et al.* 2003).

Lacases são proteínas globulares contendo entre 10-25% de carboidrato *N*-ligado e elas podem ter estruturas monoméricas, diméricas ou multiméricas, compreendendo subunidades de 45 à

80 kDa, dependendo da espécie e isoforma (Figura 15). Fungos ligninolíticos frequentemente expressam múltiplos genes de lacase, codificando isoenzimas com alta similaridade na estrutura primária, mas diferentes características físico-químicas (Brown *et al.* 2002). Não há dúvidas que as propriedades bioquímicas e físico-químicas de lacase (atividade, estabilidade, pH e temperatura ótimos, etc.) fornecem muitas informações iniciais importantes para estudos básicos e para a aplicação de lacases na biotecnologia (Mougin *et al.* 2003, Shleev *et al.* 2004). Algumas características de lacases como, massa molecular, pH ótimo de atividade e substrato específico são extremamente diversos (Mayer & Staples 2002).



Figura 15. Estrutura tridimensional de lacase de *Coprinus cinereus*, com extremidades N-terminal (azul) à C-terminal (vermelho). Os átomos de cobre são mostrados como esferas, com os sítios T1 em azul e o par T3 em amarelo (Ducros *et al.* 2001).

Para a atividade catalítica de lacase são necessários quatro átomos de cobre por unidade de proteína ativa: tipo 1 (T1) - usualmente exibe um grande pico no espectro visível, próximo de 610 nm, quando o cobre está no estado cúprico (Cu^{2+}); tipo 2 (T2) - não é detectado no espectro visível, pode ser observado por espectroscopia de ressonância para-magnética (EPR); tipo 3 (T3) - consiste em um par de cobres centralizados, com máxima absorvância em 330 nm e são *anti*-ferromagneticamente emparelhados por uma ligação atravessada (Brown *et al.* 2002).

O cobre T1 é o aceptor primário de elétrons durante a catálise. Este cobre tipo 1 possui uma coordenação trigonal, com duas histidinas e uma cisteína com ligações equatoriais conservadas e uma outra posição usualmente variável. Esta última ligação axial é com metionina em bactérias e leucina ou fenilalanina em fungos (Claus 2004). Estas observações têm sido amplamente discutidas, pois esta ligação na posição axial influencia fortemente o potencial de oxidação da enzima, possivelmente regulando a atividade da enzima. Uma mutação de fenilalanina para metionina

reduziu significativamente o potencial de oxidação de lacase de *Trametes villosa* (Kumar *et al.* 2003). O cobre T1 confere a coloração azul, típica de proteínas multi-cobres, que resultam da absorbância eletrônica intensa causada pela ligação covalente cobre-cisteína. Devido ao seu alto potencial redox, de cerca de aproximadamente 790 mV, o cobre tipo 1 é o sítio onde ocorre a oxidação do substrato. O cobre tipo 2 não apresenta absorbância no espectro visível e revela propriedades paramagnéticas em estudos de EPR. Este cobre tipo 2 é posicionado estrategicamente perto do cobre tipo 3. Juntos, os sítios de cobre tipo 2 e 3 formam um centro trinuclear onde ocorre a redução de O₂ e liberação de H₂O. O cobre tipo 2 é coordenado por duas histidinas e o tipo 3 por seis. A forte união anti-ferromagnética entre os dois átomos de cobre tipo 3 é mantida por uma ponte hidroxila (Figura 16) (Brown *et al.* 2002, Enguita *et al.* 2003, Claus 2004).

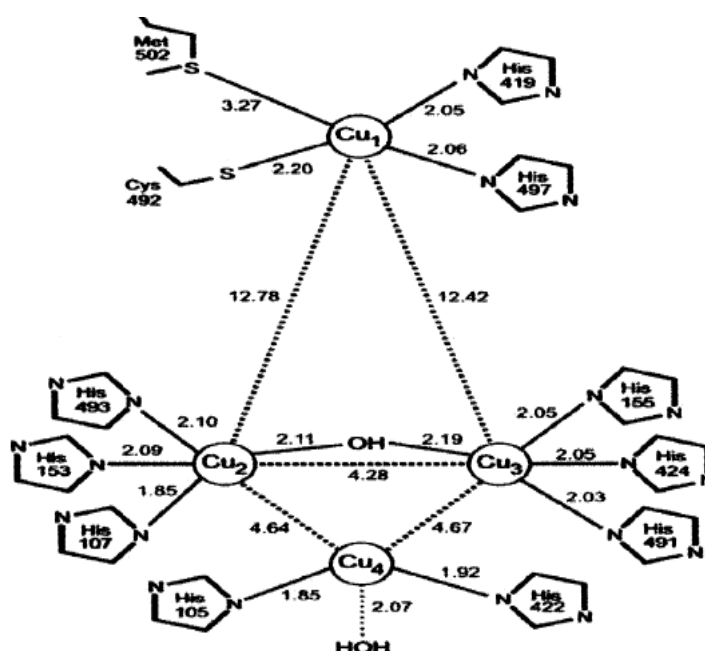


Figura 16. Centro de cobre de lacase de *Bacillus subtilis* (Enguita *et al.* 2003).

Palmieri *et al.* (1997) descreveram uma nova enzima de uma linhagem de basidiomiceto não identificada (UD4) como lacase “branca”, pois a enzima não apresentou coloração azul durante scan em comprimento de onda na região visível do espectro e devido à presença de um único átomo de cobre em sua estrutura, sendo que os outros três átomos de cobre comumente encontrados na maioria das lacases de basidiomicetos foram substituídos por dois átomos de zinco e um de ferro. Os autores conduziram pesquisas para determinar a natureza do centro metálico da lacase termoestável da linhagem UD4. Posteriormente, Jordaan *et al.* (2004) demonstraram a capacidade desta lacase de oxidar de forma simultânea 3-metil-2-benzotiazolina hidrazona (MBTH) e ácido 3-(dimetilamino) benzóico (DMAB), substratos de enzimas com elevada capacidade oxidativa, como a MnP (Castillo *et al.* 1994).

Os centros de cobre de lacases dirigem os elétrons de um substrato com redução do oxigênio molecular, sem liberação de peróxido. Durante o ciclo catalítico de lacase ocorre quatro oxidações monoelétrônicas do substrato catalisado pelo cobre tipo 1. Os elétrons são transferidos ao agrupamento trinuclear, onde ocorre redução de oxigênio molecular e liberação de H₂O. A oxidação do substrato gera radicais reativos que podem sofrer reações não-enzimáticas (Torres *et al.* 2003).

Um modelo do ciclo catalítico de lacases, consistente com os dados disponíveis sobre a dinâmica e a espectroscopia da enzima foi proposto (Figura 17). A maior dúvida permanece na parte redutiva do ciclo, onde o mecanismo do agrupamento trinuclear é reduzido. Começando do estado nativo da enzima, uma molécula de substrato reduz o sítio T1. A partir deste ponto, dois mecanismos diferentes podem proceder: (A) o sítio T1 transfere seus elétrons ao sítio T2 e o sítio T1 é reduzido novamente por uma segunda molécula de substrato; os sítios T1 e T2 transferem seus elétrons aos sítios T3. O sítio T1 é reduzido por uma terceira molécula de substrato e um elétron é outra vez transferido ao sítio T2. Este processo re-oxida o sítio T1, que é então reduzido por uma quarta molécula de substrato. Como resultado, uma forma completamente reduzida da enzima é obtida; (B) o agrupamento trinuclear é seqüencialmente reduzido durante três passos de transferência de elétrons do sítio T1, que é seqüencialmente reduzido por uma molécula de substrato, finalizando no mesmo estado reduzido da enzima (Torres *et al.* 2003).

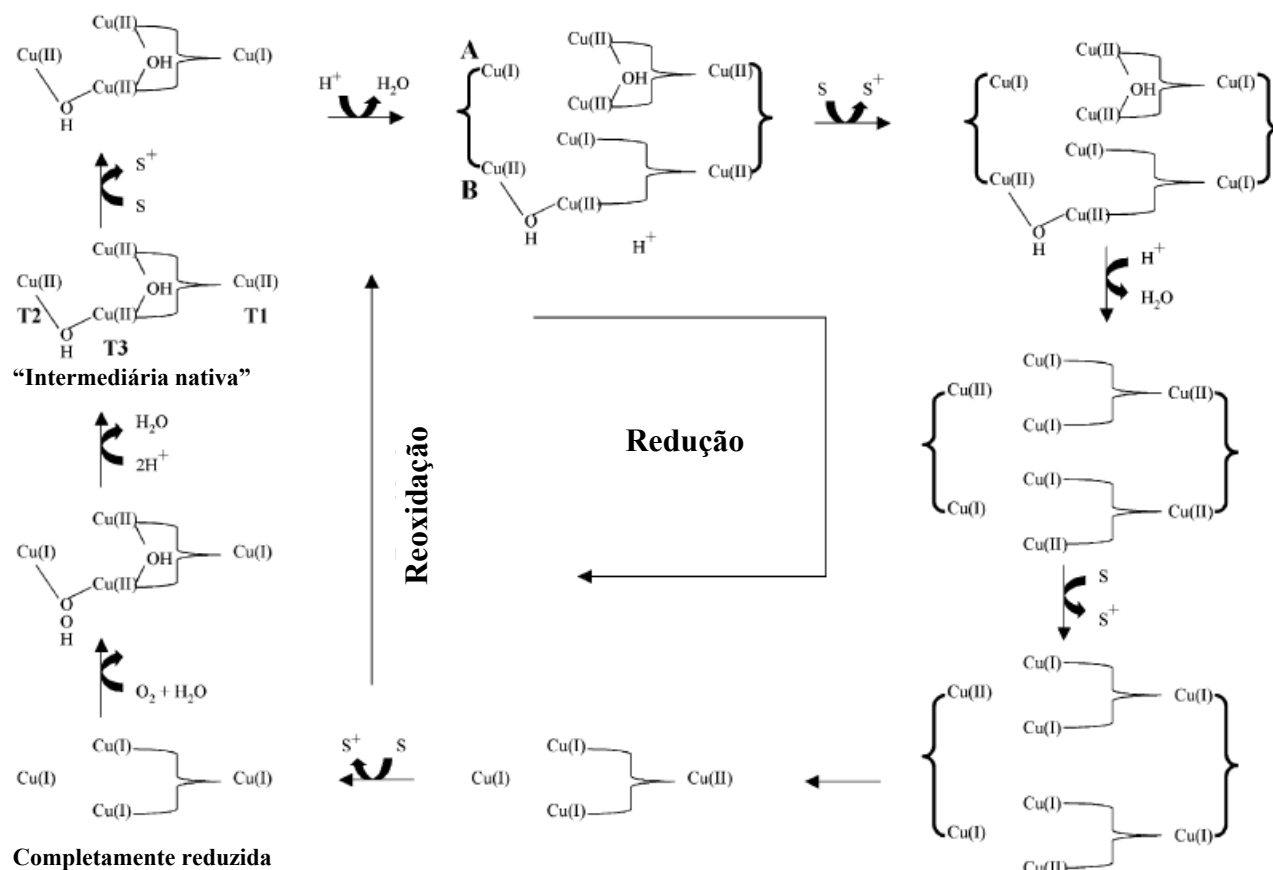


Figura 17. Ciclo catalítico da lacase (Torres *et al.* 2003).

O tipo de substrato oxidado por lacases pode ser ampliado por meio de um mecanismo de reação envolvendo os mediadores redox, que são facilmente oxidados por lacases (no centro T1) produzindo, em alguns casos, radicais catiônicos reativos e muito instáveis que podem oxidar substratos complexos antes de voltarem ao seu estado original. Neste mecanismo lacase-mediador, os mediadores oxidam substratos de alta massa molecular. Os elétrons recebidos pela lacase são finalmente transferidos reduzindo oxigênio para formação de água (nos sítios agrupados T2/T3) (Torres *et al.* 2003).

Lacases participam de outros eventos ligninolíticos de grande importância, que foram primeiramente atribuídos a outras enzimas do sistema ligninolítico. Esses eventos incluem a oxidação de unidades não-fenólicas de lignina, a geração de H_2O_2 , a formação de radicais hidroxila e a produção de Mn^{3+} a partir de Mn^{2+} . A participação de lacase na geração de espécies de oxigênio reduzida, p. ex., radicais superóxido aniônicos ($\text{O}_2^{\cdot-}$), H_2O_2 , e $\cdot\text{OH}$, têm sido demonstrado por meio da oxidação de hidroquinonas derivadas de lignina. Além disso, duas vias de oxidação de Mn^{2+} por lacase têm sido descritas: a oxidação de Mn^{2+} pode ocorrer diretamente e também por oxidação de hidroquinonas como consequência da geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Höfer & Schlosser 1999, Gonzales *et al.* 2002, Saparrat *et al.* 2002, Schlosser & Höfer 2002).

A atividade de lacases *in vivo* ou com enzimas purificadas é determinada principalmente por testes espectrofotométricos utilizando substratos fenólicos ou não-fenólicos, pelo monitoramento da coloração dos produtos de oxidação. A maioria dos testes utiliza guaiacol, 2,6-dimetoxifenol, siringaldazina ou o substrato não-fenólico ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico) (ABTS). Em contraste aos substratos fenólicos que formam quinonas, o potencial de oxidação do ABTS não é dependente do pH entre a faixa de 2 a 11 e resulta na formação de um radical catiônico com coloração ($\text{ABTS}^{\cdot+}$) (Figura 18). Uma das vantagens em utilizar $\text{ABTS}^{\cdot+}$ é sua alta estabilidade em solução. Além disso, substratos fenólicos utilizados em muitos testes enzimáticos podem ser oxidados por reações não-enzimáticas (Hofer & Schlosser 1999, Johannes & Majcherczyk 2000).

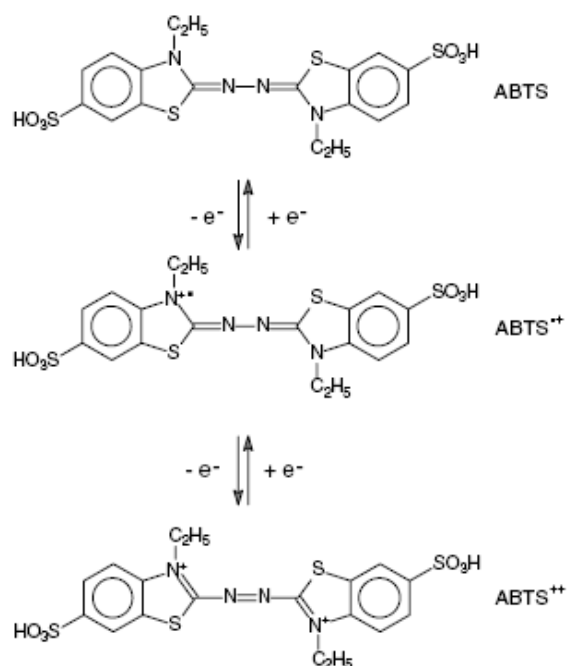


Figura 18. Transformações redox de ABTS à radical catiônico (ABTS^{•+}) e dicatiônico (ABTS²⁺) (Solis-Oba *et al.* 2005).

O sistema lacase-mediador tem demonstrado degradar não somente lignina, mas também vários xenobióticos alifáticos e aromáticos. Bourbonnais & Paice (1990) foram os primeiros a descrever um mecanismo em que lacases poderiam assumir algumas das funções de LiP. Na presença de ABTS como mediador, lacase de *Trametes versicolor* oxidou compostos modelos não-fenólicos de lignina, os quais não foram substratos para lacase. O ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA) foi o primeiro mediador natural descrito para lacase. Este mediador, junto com lacase, atuou na oxidação de estruturas não fenólicas de lignina (Eggert *et al.* 1996a). Radicais fenoxi foram descritos como mediadores, promovendo a transferência de elétrons de lacase a compostos não fenólicos (Johannes *et al.* 1996).

Shumakovich *et al.* (2006) estudaram as propriedades químicas e cinéticas de mediadores de lacase de *Trametes hirsuta*. Os experimentos eletroquímicos demonstraram que fenil-metil-pirazonas e N-hidroxinaftalimida apresentaram potencial de oxidar o álcool veratrílico (substrato modelo de lignina), ao passo que derivados do ácido benzóico não foram capazes de oxidar este composto. Fenil-metil-pirazonas teve eficiência 50% maior que o ABTS de degradar álcool veratrílico, ao passo que o N-hidroxinaftalimida mostrou a mesma eficiência que o ABTS. Os autores ressaltaram que os mediadores fenil-metil-pirazonas e hidroxinaftalimidas podem ser de interesse para biodegradação de diferentes xenobióticos por esta lacase.

A grande variedade de substratos oxidados por lacases na presença de mediadores específicos e a capacidade de lacases fúngicas de degradar compostos aromáticos recalcitrantes com elevado potencial redox fornecem a esta classe de enzimas um grande valor para desenvolvimento de tecnologias ambientalmente seguras nos processos industriais de papel e polpa, assim como na biorremediação de solos e efluentes industriais. Um obstáculo que ainda deve ser superado é a melhor compreensão do mecanismo pela qual lacases atingem seu potencial redox específico (Antorini *et al.* 2002, Durán *et al.* 2002, Fabrini *et al.* 2002).

Assim, muitas aplicações biotecnológicas são baseadas no sistema lacase-mediador. Pozdnyakova *et al.* (2004) observaram mais de 50% de deslignificação de polpa kraft pela combinação de lacase-ABTS, mas não por lacase sozinha. Essas observações têm despertado considerável interesse na catálise enzimática para branqueamento de polpa kraft. Além disso, tem sido observado que lacase de *Trametes versicolor* catalisa a oxidação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) contendo três anéis aromáticos e de antraceno na presença de HBT ou ABTS (Johannes & Majcherczyk 2000) e a oxidação de benzo(a)pireno na presença de ABTS (Collins *et al.* 1996). O tratamento utilizando o sistema lacase-mediador é descrito como um método eficiente para remoção de resinas produzidas por compostos lipofílicos de polpa de papel obtidas da madeira (Gutierrez *et al.* 2006).

Minussi *et al.* (2005) avaliaram a indução de lacase de *Trametes versicolor* e o sistema lacase-mediador N-OH no tratamento de efluente de manufatura de papel. Maior atividade de lacase foi obtida em cultura líquida de *Trametes versicolor* na presença de 1 mM de 2,5-xilidina e 0,4 mM de cobre. Na ausência de mediadores para lacase de *T. versicolor*, a maior redução de fenol foi de aproximadamente 23%. A presença de 1-hidroxibenzotriazol não aumentou a redução de fenol, entretanto o ácido acetohidroxâmico agiu com eficiência no efluente E1 (cloroligninas e clorofenóis), reduzindo 70% e 73% de fenóis totais e carbono orgânico total, respectivamente. Os autores deste estudo concluem que o ácido acetohidroxâmico foi um mediador eficiente para aplicação de lacase na biorremediação do efluente E1 da indústria papelreira.

Com adição de detergentes alcalinos, lacase foi capaz de oxidar vários corantes têxteis (Schneider *et al.* 1999). A oxidação de HPAs por lacases é baseada neste sistema lacase/mediador, utilizando surfactantes como mediadores. Para aumentar a disponibilidade do substrato para as hifas e enzimas, foram utilizados surfactantes não-iônicos como o Tween 20 e o Tween 80 (Giese *et al.* 2004, Shumakovich *et al.* 2006). Sulfosuccinato de sódio é um dos surfactantes iônicos de maior biocompatibilidade, utilizado para a oxidação de HPA's por "lacases amarelas" de *Pleurotus ostreatus* D1, na presença e ausência de mediadores (Pozdnyakova *et al.* 2004).

Estas lacases amarelas foram produzidas durante cultivo de *P. ostreatus* D1 em substrato natural contendo lignina. Estas lacases não exibiram o espectro de absorbância característico

próximo à 600 nm (coloração de lacases azuis) e no espectro de EPR e diferiram em espectro de *dichroism circular* (CD) de lacases azuis. Elas apresentaram atividade em substratos típicos de lacases azuis, mas em contraste a estas, as lacases amarelas foram capazes de oxidar compostos não-fenólicos na ausência de mediadores. Portanto, os autores destes estudos admitiram que estas lacases amarelas resultaram da ligação de produtos aromáticos de degradação da lignina com lacases azuis. Os autores pressupõem que lacases amarelas podem conter mediadores endógenos derivados de lignina, que possuem papel de mediadores exógenos na reação de oxidação de compostos não-fenólicos (Leontievsky *et al.* 1997, Pozdnyakova *et al.* 2004).

Lacases são enzimas excepcionalmente versáteis, catalisando reações com diferentes substratos, alguns destes recalcitrantes. São enzimas de ampla distribuição ocorrendo em todos os domínios dos seres vivos. Contudo, muitos estudos são necessários para melhor compreender sua importância fisiológica e sua utilização em processos biotecnológicos (Claus 2004).

3.4. Peroxidases versáteis

Moreira *et al.* (2001) observaram que uma linhagem de *Bjerkandera* sp. exibiu elevadas atividades de descoloração dos corantes poli R-478 e Azul Brilhante de Remazol R (RBBR). A determinação da atividade de peroxidases nos extratos enzimáticos extracelulares demonstraram a existência de atividade de lignina peroxidase, assim como MnP e de peroxidases independentes de manganês. Vários picos foram obtidos na cromatografia de troca iônica (Mono-Q) dos extratos enzimáticos, que caracterizaram atividades de enzima distintas. Um dos principais picos associado com a atividade de descoloração de corantes exibiu capacidade de oxidar manganês, assim como álcool veratrílico e dimetoxifenol em reações independentes de manganês. Esta nova enzima foi denominada peroxidase versátil. Posteriormente, Camarero *et al.* (1999) e Moreira *et al.* (2005) observaram que a enzima produzida pela linhagem *Bjerkandera* sp. B33/3, cujas características bioquímicas e moleculares foram avaliadas, pode ser incluída, juntamente com as enzimas produzidas por *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus pulmonarius*, *Bjerkandera adusta*, em uma nova classe de peroxidases versáteis, que compartilha propriedades catalíticas de LiP e MnP, apresentando alta afinidade ao manganês e corantes.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

1. Fungo

Psilocybe castanella Peck CCB444 está depositado na Coleção de Cultura de Basidiomicetos (CCB) do Instituto de Botânica, IBt, São Paulo, S.P. A cultura foi mantida a 4°C, em ágar extrato malte (MEA), com a seguinte constituição: extrato de malte 2%; peptona 0,1% e ágar 1,5% (Figura 19).



Figura 19. Colônia de *Psilocybe castanella* CCB444 em MEA (2%), após 20 dias de incubação, a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Foto: Dácio R. Matheus, 2004).

2. Solo

Solo não contaminado (solo controle) foi coletado no município de São Vicente-SP, de regiões próximas às áreas contaminadas. O solo-HCB foi obtido pela incorporação de HCB (pureza - 98%), na proporção de 2000 mg HCB Kg^{-1} solo, concentração que se pretende utilizar nos ensaios de biorremediação em biorreatores. As características químicas e físico-químicas do solo foram analisadas pelo Laboratório Lagro, Campinas, SP, e estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características físico-químicas do solo.

Parâmetros analisados	Valores
pH	5,07
Capacidade de troca catiônica (mEq. 100 mL ⁻¹)	5,50
Saturação de bases (V%)	5,60
Matéria orgânica (%)	0,13
Acidez total [H ⁺] (mEq. 100 mL ⁻¹)	5,07
Alumínio (mEq. 100 mL ⁻¹)	0,13
Cálcio (mEq. 100 mL ⁻¹)	0,20
Magnésio (mEq. 100 mL ⁻¹)	0,10
Nitrogênio total (%)	0,06
Fósforo (µg g ⁻¹)	1,00
Potássio (mEq. 100 mL ⁻¹)	0,01
Enxofre (µg g ⁻¹)	13,47
Sódio (µg g ⁻¹)	3,67
Ferro (µg g ⁻¹)	25,53
Manganês (µg g ⁻¹)	0,10
Cobre (µg g ⁻¹)	0,10
Zinco (µg g ⁻¹)	0,37
Boro (µg g ⁻¹)	0,10

Fonte: Matheus (2003)

3. Inóculo

Para preparo do inóculo, o fungo foi previamente crescido em placas de Petri contendo MEA 2%, a 25°C, até que o micélio colonizasse $\frac{3}{4}$ da superfície do meio. Foi inoculada meia placa picada para cada 1 Kg de substrato sólido, constituído de bagaço de cana-de-açúcar picado em tamanho de 0,5 a 1cm, suplementado com farinha de soja de modo a ajustar a relação C/N para 80. O substrato foi previamente esterilizado a 121°C, por 1 h. A incubação foi realizada a 28°C, durante 21 dias (Figura 20).



Figura 20. Inóculo de *Psilocybe castanella* crescido em substrato a base de bagaço de cana-de-açúcar e farinha de soja, a 28°C, durante 21 dias (Foto: Ricardo R. da Silva, 2003).

3.1 Determinação do carbono orgânico do substrato sólido

A determinação de carbono orgânico foi realizada segundo metodologia descrita por Kiehl (1985), em que a matéria orgânica oxidável foi atacada por uma mistura sulfo-crômica, numa reação exotérmica de bicromato de potássio e ácido sulfúrico. O excesso de agente oxidante, resultante da reação, foi determinado por titulação com sulfato ferroso.

Reagentes:

- solução de bicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) 1N;
- ácido fosfórico a 85%;
- solução de difenilamina (0,5g de difenilamina em 20 mL de água e 100 mL de H_2SO_4 concentrado,
- solução de sulfato ferroso 1N (recém preparada).

Determinação: Aliquota de 0,200 g seca de cada substrato foi transferida para frasco erlenmeyer de 500 mL, onde se adicionaram 20 mL de $K_2Cr_2O_7$ e 40 mL de H_2SO_4 concentrado. Após agitação por 1 min., e repouso de 30 min., adicionaram-se 200 mL de água destilada, 10 mL de ácido fosfórico e 1 mL de difenilamina. O excesso de oxidante foi titulado com solução de sulfato ferroso até ponto de viragem da cor púrpura para o verde.

O cálculo estequiométrico da porcentagem de carbono orgânico foi feito pela fórmula abaixo:

$$C\% = \frac{(V1 - V2) \times 0,003 \times 74,15}{p}$$

onde:

$C\%$ = porcentagem de carbono orgânico,

$V1$ = volume (mL) de $K_2Cr_2O_7$ adicionado na amostra,

$V2$ = volume (mL) de sulfato ferroso gasto na titulação,

p = peso seco da alíquota (g).

3.2 Determinação do nitrogênio total do substrato sólido

A determinação do nitrogênio total foi realizada conforme metodologia descrita por Kiehl (1985), pelo método de Kjeldahl, com adaptações, onde foi realizada a digestão ácida da amostra, na presença de catalisadores, seguida de destilação, em meio alcalino, do sulfato de amônio formado.

3.2.1 Digestão sulfúrica.

Reagentes da mistura de digestão:

- 350,0 mL de H_2O_2 30%,
- 14,0 g de $\text{LiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,
- 0,42 g de selênio em pó,
- 420,0 mL de H_2SO_4 concentrado.

Preparo da mistura de digestão: os três primeiros reagentes foram misturados em Becker de 2000 mL e resfriados em banho de gelo. Acrescentou-se o H_2SO_4 cuidadosamente, resfriando em banho de gelo.

Procedimento da digestão: pesou-se 0,27 g de amostra seca em tubos de digestão de 100 mL, onde foram acrescentados 8mL da mistura de digestão fria. Os tubos foram levados para um bloco de digestão e aquecidos lentamente até o máximo de 350°C. Nos primeiros 15 minutos de reação as amostras ficaram claras e transparentes, escurecendo em seguida e voltando a clarear quando a temperatura atingiu os 350°C. Continuou-se a digestão por mais 30 minutos. Após resfriamento até temperatura ambiente, completou-se o volume do tubo até 100 mL, com água destilada.

3.2.2 Destilação

Reagentes:

- 10 mL de ácido bórico 10%,
- 2 gotas de indicador: verde de bromo cresol (0,5%) + vermelho de metila (0,1%), diluídos em etanol (95%),
- 15 mL de NaOH 18N padronizado com ácido oxálico;
- HCl 0,05N, padronizado com NaOH padronizado.

Procedimento para a destilação: aqueceu-se o sistema de destilação até aproximadamente 100°C. Um frasco erlenmeyer de 150 mL, contendo 10 mL do ácido bórico e 2 gotas do indicador, foi colocado à saída do destilador. O tubo contendo a amostra digerida foi acoplado à entrada do destilador, onde se juntou 15 mL de NaOH (18N). A amostra foi destilada até que a amônia destilada se transferisse para a solução receptora de ácido bórico, triplicando o seu volume. Após a destilação, a amostra foi titulada com HCl padronizado até o ponto de viragem do indicador.

3.3 Ajuste da relação C/N do substrato sólido

Para ajustar a relação C/N para 80, as quantidades de cada componente da mistura foram calculadas através da seguinte expressão:

$$b = \frac{Q(C/N.Ns - Cs)}{C/N(Ns - Nb) + Cb - Cs}$$

$$s = Q - b$$

Onde:

Q = quantidade de substrato que se deseja produzir (peso seco)

b = quantidade de bagaço de cana-de-açúcar (peso seco)

s = quantidade de suplemento do substrato (peso seco)

C/N = relação carbono/nitrogênio que se deseja obter no substrato

Cb = % determinada de carbono orgânico total do bagaço de cana-de-açúcar (% peso seco)

Nb = % determinada de nitrogênio total do bagaço de cana-de-açúcar (% peso seco)

Cs = porcentagem determinada de carbono orgânico total do suplemento (% peso seco)

Ns = porcentagem determinada de nitrogênio total do suplemento (% peso seco)

4. Sistema de cultivo

Foram utilizados frascos de capacidade de 100 g contendo um sistema de cultivo constituído de 30 g de solo contaminado com HCB (solo-HCB), gesso (2,5%), 5% de emulsão de óleo vegetal (tipo soja) e tween 20 (1:9) e umidade ajustada para 70% da capacidade máxima de retenção de água (CMRA) (Figura 21). O solo foi esterilizado por fumigação com brometo de metila, por 48 horas. Solo não contaminado foi utilizado como controle (Matheus 2003).



Figura 21. Sistema de cultivo de *P. castanella* (30 g solo, gesso, óleo vegetal e 70% CMRA). Foto: Kátia M. G. Machado, 1997.

5. Inoculação e incubação

Ao sistema de cultivo foi adicionado 3,0 g de inóculo fúngico (10% base seca). A incubação foi realizada a 25-28°C durante 70 dias e a umidade foi corrigida semanalmente pela adição de água destilada esterilizada de acordo com a perda de peso dos frascos (Matheus 2003). Em determinados intervalos de tempo foram determinados o crescimento, as atividades enzimáticas e HCB, organoclorados residuais e cloretos. Os experimentos foram realizados em triplicata.

6. Determinação do crescimento micelial

A biomassa fúngica foi estimada pela quantidade de ergosterol extraído, empregando-se a constante de conversão 2,49 µg ergosterol mg⁻¹ de biomassa seca, determinada anteriormente para *P. castanella*, de acordo com metodologia descrita por Silva (2004). A amostra foi saponificada em KOH alcoólico durante 40 minutos, a 70°C. Após resfriamento, foram adicionados 5 mL de água destilada esterilizada e o conteúdo centrifugado a 10000 rpm. O sobrenadante foi fracionado com n-hexano, evaporado em rota-evaporador e ressuspensão em metanol grau CLAE. Análise do ergosterol foi feita em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), 282 nm, com taxas de 2 mL.min⁻¹ de metanol. O pico do ergosterol foi identificado aos 4 minutos de corrida e a biomassa estimada através de curva padrão construída com concentrações conhecidas de ergosterol (ANEXO I).

7. Extrato enzimático

O extrato enzimático foi obtido com solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5, na proporção sistema de cultivo:tampão de 1:3 (p/v). O solo foi homogeneizado manualmente, durante 3 minutos e colocado em agitação à 120 rpm durante 1 h., seguida novamente de homogeneização manual por 3 min. O extrato enzimático foi filtrado em membrana de 0,45 µm.

8. Atividades ligninolíticas

8.1 Lacases

Determinada pela oxidação do ABTS a 420 nm ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), durante 10min. (Bourbonnais & Paice 1988). A mistura de reação continha em 1mL:

- 0,25 mL de tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 3,0;
- 0,6 mL de extrato enzimático;
- 0,05 mL de catalase bovina (incubação por 5 min.); e
- 0,1 mL de ABTS 5 mM.

A reação teve início pela adição do ABTS. Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de substrato por minuto.

8.2 Peroxidases

Determinada pela mesma metodologia descrita para lacases, porém, ao invés da catalase, 0,05 mL de H_2O_2 foi adicionada à mistura de reação.

8.3 Manganês peroxidase (MnP)

Determinada pela oxidação do vermelho de fenol à 610 nm ($\epsilon = 4460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), segundo metodologia descrita por Kuwahara *et al.* (1984). A reação (em 1 mL) constituía de:

- 0,3 mL de solução A (tampão succinato de sódio 0,2 M, pH 4,5; lactato de sódio 0,1 M; albumina bovina 0,5%);
- 0,05 mL de MnSO_4 2 mM;
- 0,5 mL de extrato enzimático;
- 0,05 mL de H_2O_2 2 mM; e
- 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%.

A reação teve início pela adição do vermelho de fenol e foi acompanhado o aumento na absorbância em 610 nm durante 10 minutos. Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de substrato por minuto.

8.4 Lignina peroxidase (LiP)

Determinada de acordo com Tien & Kirk (1984) pela oxidação do álcool veratrílico (álcool 3,4 - dimetoxibenzil) ($\epsilon = 9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A mistura de reação (em 1 mL) constituía de:

- 0,2 mL de solução álcool veratrílico 10 mM em tampão tartarato de Na 0,25 M, pH 3,0;

- 0,2 mL de H₂O₂ mM; e
- 0,6 mL de extrato enzimático.

A reação teve início pela adição do H₂O₂.

8.5 Cálculo da atividade enzimática

De acordo com a Lei de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \times l \times c$$

onde: A : variação da absorbância (Δ Abs)

ϵ : coeficiente de extinção molar ($M^{-1}cm^{-1}$)

l : caminho óptico (cm)

c : concentração molar (M)

9. Caracterização físico-química das atividades ligninolíticas

A caracterização físico-química foi realizada nos extratos enzimáticos obtidos nos tempo de cultivo de máxima produção de atividade ligninolítica, com 12 e 19 dias de crescimento de *P. castanella* em solo-HCB e controle.

Para remoção da cor do extrato enzimático foi adicionado Polivinilpirrolidona (PVP) 5% seguindo-se agitação branda durante 1 hora, a 4°C. Após centrifugação (10000 rpm, durante 10 min.) o extrato foi dialisado (18 horas) e utilizado para determinação das atividades enzimáticas.

Cada amostra foi composta pela mistura dos extratos enzimáticos obtidos de triplicatas dos sistemas de cultivo de solo-HCB e controle.

9.1. pH ótimo e estabilidade ao pH

O estudo da influência do pH na oxidação do ABTS pelo extrato enzimático foi conduzido com tampão citrato-fosfato (pH 2,5 a 6,0) e tampão acetato de sódio (pH 3,0 a 6,0) a 50 mM. As atividades enzimáticas foram determinadas como descrito na metodologia padrão, alterando-se apenas o tampão nos pH avaliados.

A estabilidade do extrato enzimático em função do pH foi determinada pela atividade enzimática residual, após pré-incubação do extrato enzimático em tampão citrato-fosfato 50 mM e acetato de sódio 50 mM (nos pH ótimos de atividade), durante 24 horas, à temperatura ambiente.

9.2. Temperatura ótima e estabilidade à temperatura

A influência da temperatura na atividade enzimática do extrato bruto foi verificada na faixa de 25-94°C, utilizando um banho termostático acoplado ao espectrofotômetro. O extrato enzimático foi pré-incubado nas temperaturas de reação de 25 à 94°C por 5 minutos e, logo após, determinada atividade enzimática pela oxidação do ABTS.

A termoestabilidade foi determinada por pré-incubação do extrato em banho Maria nas temperaturas ótimas obtidas, durante 24 horas. Uma alíquota do extrato enzimático foi retirada nos diferentes tempos de pré-incubação, esfriada até temperatura ambiente por 10 minutos, e a atividade residual foi determinada empregando-se a metodologia padrão de oxidação do ABTS.

9.3. Ação de inibidores e metais na atividade enzimática

A ação de inibidores foi verificada pela adição de: EDTA (1 mM), azida sódica (1 mM), ácido mercapto acético (ácido tioglicólico) (1 mM), L-cisteína (1 mM), oxalato (1 mM) e H₂O₂ (2 mM), no ensaio padrão de oxidação do ABTS. Para avaliação do efeito de metais foram utilizados: MnSO₄ (1 mM), CuSO₄ (1 mM), FeCl₃ (1 mM) e FeSO₄ (1 mM). Todas as substâncias foram pré-incubadas com o extrato enzimático por 5 min. (Johannes & Majcherczyk 2000). A mistura de reação continha em 1mL:

- 0,25 mL de tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 3,0;
- 0,6 mL de extrato enzimático;
- 0,05 mL de inibidor (incubação por 5 min.); e
- 0,1 mL de ABTS 5 mM.

A reação teve início pela adição do ABTS. Como controle foi avaliado a oxidação do ABTS na ausência das substâncias, que foi considerada como 100% de atividade.

9.4. Efeito da concentração de substrato nas atividades de peroxidases e lacases

A atividade do extrato enzimático foi determinada com ABTS (420 nm, $\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) na faixa de 0,1-50 mM, em tampão citrato-fosfato, pH 3,0. A constante de Michaelis (K_m) foi calculada mediante distribuição dos dados no gráfico dos duplos recíprocos de velocidade de reação *versus* concentração de substrato (Lineweaver & Burk 1934).

10. Determinação do HCB e organoclorados residuais

Periodicamente foram feitas as extrações de resíduos clorados dos solos tratados de acordo com método descrito por Andrea *et al.* (2001). Como controle foram analisados solos sem fungos inoculados sob as mesmas condições. Hexaclorobenzeno (HCB), pentaclorobenzeno (PeCB), 1,2,4,5 tetraclorobenzeno (TCB-1), 1,2,3,4 tetraclorobenzeno (TCB-2) e pentacloroanisol (PCA) foram quantificados por cromatografia gasosa (Matheus 2003).

As análises foram feitas em duplicatas em cromatógrafo a gás Varian 3400, equipado com detector de captura de elétrons e um injetor split/splitless, utilizando uma coluna megabore de fase estacionária DB-17 com 30 m de comprimento, 0,53 mm de diâmetro interno e filme de 1,0µm (marca Varian). O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio, a um fluxo de 1,5 mL min.⁻¹. A temperatura do injetor foi mantida em 220°C e a do detector em 300°C. O volume de injeção foi de 1 µL e a coluna foi mantida em 188°C por 26 min. após a injeção, aumentando numa taxa de 10°C min.⁻¹ até 243°C, que foi mantida até o final da corrida aos 46 min.

Os cromatogramas foram registrados em um integrador Modelo Star-Varian. A identificação individual de cada composto organoclorado foi baseada no tempo de retenção relativo de uma mistura de compostos padrões que incluía: HCB, PeCB, TCB-1, TCB-2, PCA e PCF. Os compostos foram quantificados a partir de curva padrão construída a partir de soluções dos compostos de concentrações conhecidas na mistura. Os picos identificados no extrato do solo sem inóculo fúngico e do solo tratado foram quantificados e comparados quanto à concentração para verificar a redução ou acréscimo dos organoclorados.

11. Determinação de cloretos

Determinação de cloretos foi realizada por titulação potenciométrica. O extrato foi agitado manualmente e filtrado em papel filtro de filtragem rápida (faixa preta). Foram adicionados 40 mL de água deionizada nas alíquotas de extrato (10 mL) e titulado contra solução de nitrato de prata (0,01 N) com auxílio de microbureta (Matheus 2003).

12. Análise estatística dos resultados

Foi feita análise de variância (ANOVA) dos resultados de redução de HCB e formação de cloretos por *P. castanella* em solo contaminado com HCB e solo sem fungo, seguindo-se de teste de comparação de médias (Tukey $P < 0,05$) sempre que ANOVA indicou efeito significativo entre os tratamentos.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Crescimento e atividade ligninolítica de *P. castanella* em solo contaminado com HCB

Quando os fungos são cultivados em substratos sólidos a quantificação do crescimento por técnicas como peso seco é inviável uma vez que se torna impossível separar o micélio do substrato. As metodologias utilizadas para quantificar a biomassa de fungos em substratos sólidos consistem em avaliar: 1) uma atividade biológica, como a determinação de adenosina trifosfato (ATP), atividades enzimáticas ou taxa de respiração; 2) o consumo de nutrientes e, 3) os constituintes celulares como quitina, ácidos graxos e ergosterol (Aidoo *et al.* 1981, Carrizales *et al.* 1981, Desgranges *et al.* 1991).

A utilização da molécula de ergosterol para determinação de crescimento fúngico em substrato sólido vem sendo muito estudada nas últimas décadas e vem ganhando a atenção de muitos pesquisadores para várias aplicações, seja para quantificar biomassa de amostras ambientais ou de processos biotecnológicos que utilizam fungos. A maior vantagem na utilização de ergosterol como indicador de biomassa fúngica em substratos sólidos é porque a molécula, após a morte celular, é rapidamente convertida em outros esteróis. Assim, o ergosterol é indicador de biomassa ativa de fungos (Eash *et al.* 1996). Silva (2004) demonstrou ótima correlação (80%) entre a quantidade de ergosterol e a biomassa fúngica de *P. castanella* em cultivo líquido. Este autor descreve ainda que a taxa de ergosterol de *P. castanella* não foi influenciada pelo HCB, quando este poluente estava presente em concentrações inferiores à 8000 mg L⁻¹.

A determinação do crescimento de *P. castanella* em solo foi estimada pela quantidade de ergosterol, a partir da curva padrão estabelecida para a análise cromatográfica (ANEXO 1). O crescimento de *P. castanella* em solo contaminado com HCB (1104 mg HCB Kg⁻¹ solo) não diferiu do observado no solo controle (Figura 22). Em ambos os solos foi observado aumento de biomassa no período entre 3 e 33 dias, quando então, teve início a fase estacionária de crescimento.

Alguns poluentes podem comprometer o crescimento fúngico, geralmente devido à toxicidade destes compostos. Novotný *et al.* (2000) observaram que hidrocarbonetos policíclicos aromáticos contendo 3 ou 4 anéis aromáticos (50 ppm) inibiram o crescimento de *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor* em solo. Dentre 36 linhagens de basidiomicetos brasileiros, *P. castanella* foi uma das linhagens que apresentou tolerância à 50000 mg HCB Kg⁻¹ solo (Matheus *et al.* 2000). *P. castanella* foi capaz de colonizar solo contaminado com 4600 mg PCP Kg⁻¹ solo, no entanto, outras linhagens avaliadas não foram capazes de colonizar o solo nesta mesma concentração (Machado *et al.* 2005a). Machado *et al.* (2006) observaram que alguns corantes sintéticos inibiram o crescimento de *Trametes villosa* e *Pycnoporus sanguineus*, no

entanto, estes fungos foram capazes de crescer na presença de outros corantes. Os autores sugerem que a estrutura química e a presença de átomos de cloro em alguns dos corantes podem ter sido os fatores responsáveis pela resistência dos corantes à ação fúngica.

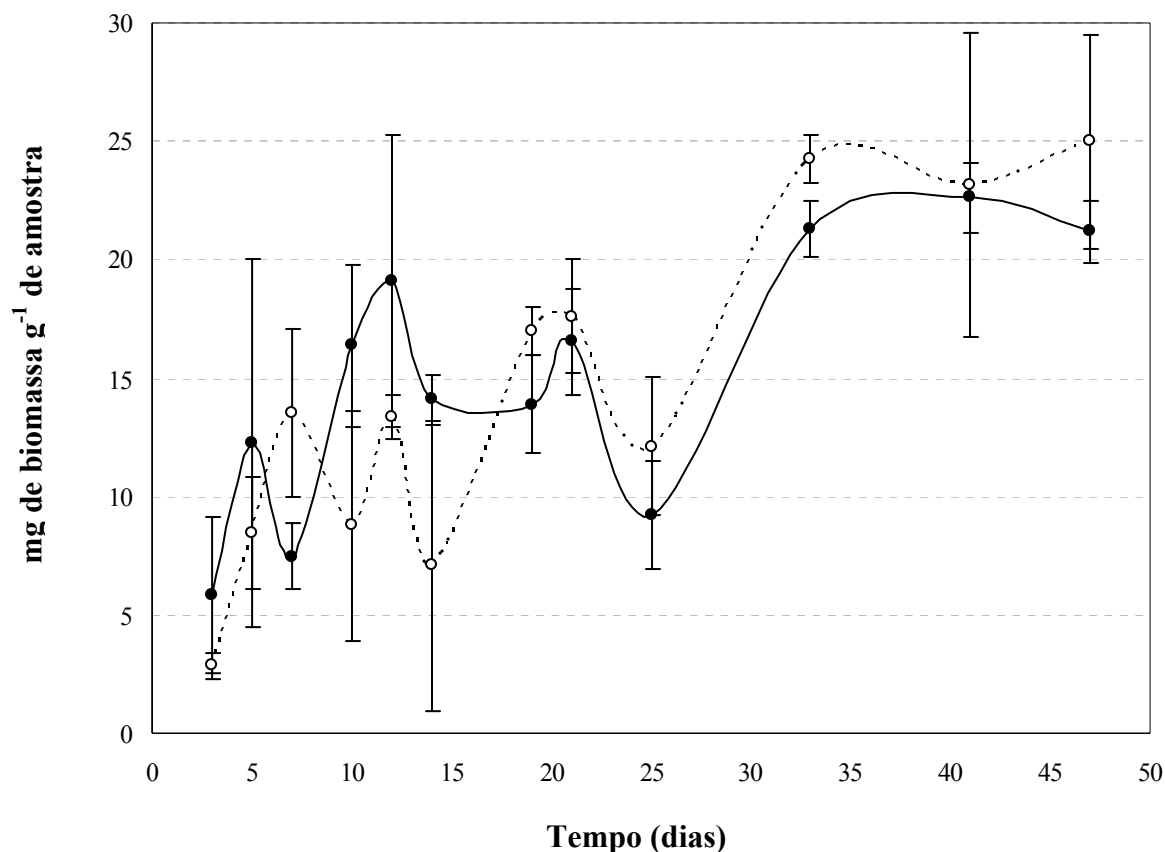


Figura 22. Crescimento de *Psilocybe castanella* em solo contaminado com hexaclorobenzeno (●). Controle: solo não contaminado (○). As barras indicam o desvio médio entre triplicatas.

P. castanella produziu atividade de peroxidases durante todo período de cultivo no solo com HCB e no solo-controle (Figura 23). Maior produção desta atividade foi observada durante o metabolismo primário do fungo. A presença do HCB influenciou a produção da atividade de peroxidases por *P. castanella*. No solo com HCB, maior atividade foi observada com 12 dias ($103,71 \text{ UL}^{-1}$), enquanto no solo-controle a maior atividade foi observada aos 19 dias de crescimento ($100,00 \text{ UL}^{-1}$). Não foi detectada produção das atividades de LiP e MnP por *P. castanella* nas condições de cultivo avaliadas.

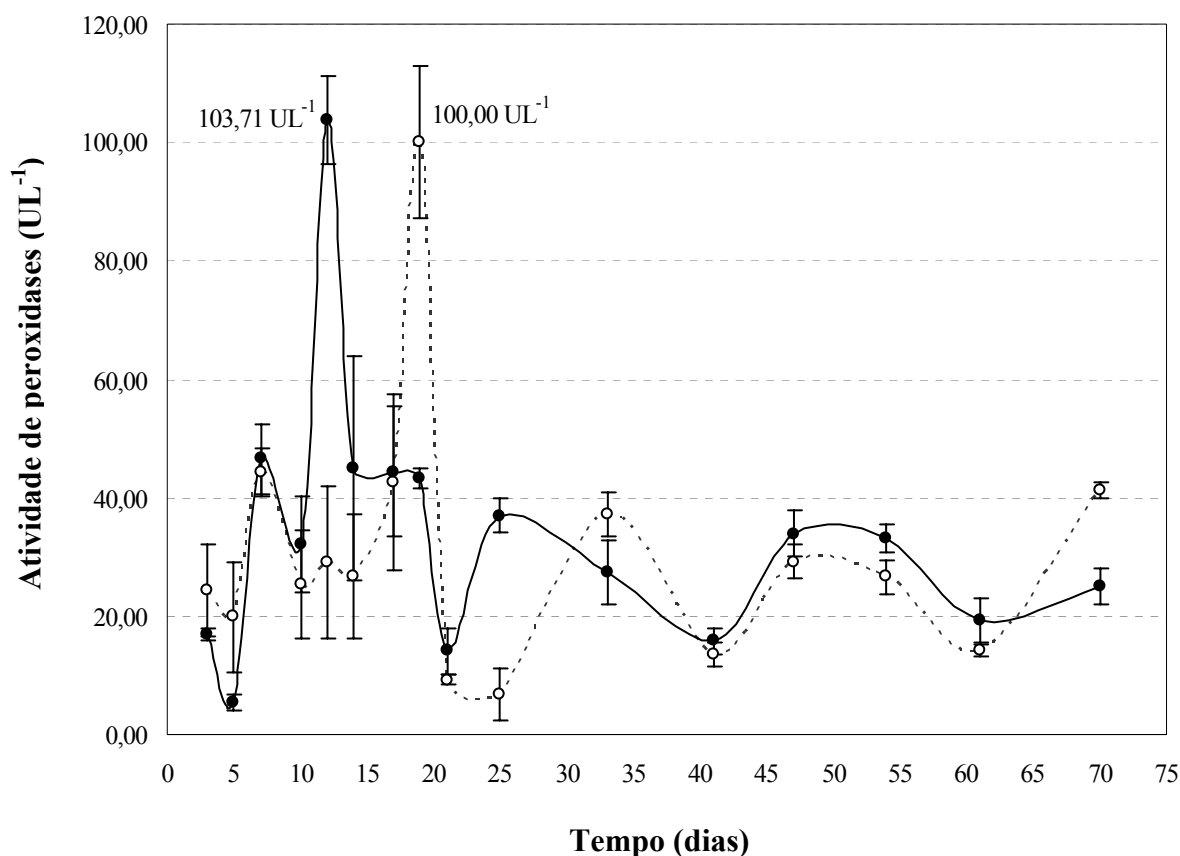


Figura 23. Cinética de produção de atividade de peroxidases por *Psilocybe castanella* em solo contaminado com hexaclorobenzeno (●). Controle: solo não contaminado (○). As barras indicam o desvio médio entre triplicatas.

A maior produção de enzimas ligninolíticas por *Phanerochaete chrysosporium* ocorreu durante o metabolismo secundário, pela influência do consumo de alguns nutrientes como carbono e nitrogênio (Kirk & Farrel 1987). Durante o crescimento de *Fomes sclerodermeus* atividades de lacase e de MnP aumentaram durante a tropofase (metabolismo primário) até o 18º dia, em paralelo com o crescimento do fungo, evidenciando que essas enzimas não são metabólitos secundários, mas parecem ser dependentes do crescimento fúngico (Pappinuti *et al.* 2001). Rodríguez *et al.* (2004) descreveram que, em contraste com *P. chrysosporium*, quatro espécies do gênero *Pleurotus* (*P. eryngii*, *P. ostreatus*, *P. pulmonaris* e *P. sajor-caju*) expressaram o sistema ligninolítico durante a fase de crescimento primário, e ainda a produção de enzimas ligninolíticas não foi inibida por altas concentrações de nitrogênio. *Ceriporiopsis subvermispora* e *Lentinus trigrinus* também produziram lacase e MnP durante todo o período de cultivo (Lobos *et al.* 1994, Lechner & Papinutti 2006).

Os basidiomicetos produzem enzimas ligninolíticas de forma constitutiva, porém elas podem ser induzidas pelas condições de cultivo. Diversas substâncias, incluindo compostos aromáticos e fenólicos têm sido utilizadas como indutores enzimáticos com o objetivo de aumentar a produção de

enzimas ligninolíticas. Têm se avaliado o tipo, a concentração e o tempo de adição dos indutores para estimular a produção destas enzimas. Produtos formados durante a decomposição da madeira por fungos, tais como ácidos *p*-hidroxicinâmico, ácido *p*-cumárico, ácidos ferrúlicos, catecol, guaiacol, *p*-hidroxibenzaldeído, *p*-hidroxibenzoato, vanilina e ácido vanílico podem atuar como precursores do álcool veratrílico e de outros indutores aromáticos endógenos, estimulando a síntese de enzimas ligninolíticas (Galhaup *et al.* 2002, Rabinovich *et al.* 2004, Pazarloglu *et al.* 2005). Terron *et al.* (2004) observaram aumento da produção de lacase por *Trametes* sp. I-62 com a adição de diversos compostos fenólicos (ácido *p*-cumárico, ácido ferrúlico, guaiacol, siringol, *p*-metoxifenol, pirocatecol, ácido 3,5-dihidroxibenzóico e siringaldazina). Os resultados deste estudo demonstraram que estes compostos aromáticos parecem ter efeitos diferentes tanto na atividade de lacase quanto na expressão de genes desta enzima por *Trametes* sp. Muitos isômeros de xilidinas (dimetilanilinas, utilizadas como corantes na indústria) e pentaclorofenol atuam como indutores de lacases (Lutarek *et al.* 1997, Jung *et al.* 2002, Kollmann *et al.* 2005).

A presença do HCB pode ter promovido estímulo da atividade de peroxidases, antecipando o pico de máxima atividade para o 12º dia de incubação que foi observado somente aos 19 dias de crescimento de *P. castanella* em solo não-contaminado. Provavelmente, como um mecanismo de destoxificação, *P. castanella* produziu alta atividade ligninolítica em resposta a concentração do xenobiótico. Indução ou ativação do sistema enzimático ligninolítico de basidiomicetos brasileiros pela presença de compostos organoclorados no solo foi descrita anteriormente por Machado *et al.* (2005a).

O substrato lignocelulósico pode induzir a produção de MnP e de lacase por basidiomicetos ligninolíticos (Schlosser *et al.* 1997, D'Souza *et al.* 1999, Hofrichter *et al.* 1999, Rodriguez *et al.* 1999, Papinutti *et al.* 2001). Alguns metabólitos presentes no substrato lignocelulósico podem influenciar a produção de MnP por basidiomicetos. Makela *et al.* (2002) observaram correlação entre o pico de atividade de MnP e a concentração extracelular de oxalato nos extratos obtidos de culturas de *Trametes ochracea* e *T. versicolor* crescidos em lascas de pinheiro. Galkin *et al.* (1998) observaram que os picos de atividade de MnP foram simultâneos ao acúmulo de ácido oxálico nas culturas de *Phlebia radiata*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Ceriporiopsis subvermispora* crescidos em palha de trigo.

A atividade de MnP é sensível à presença de alguns metais. Vários metais (cobre, ferro, manganês, molibidênio, zinco e níquel) são essenciais para o crescimento fúngico e também atuam como co-fatores enzimáticos induzindo a atividade ligninolítica (Baldrian *et al.* 2005). Entretanto, estes metais são tóxicos ao fungo quando em excesso, podendo inibir o crescimento e a atividade de enzimas ligninolíticas (Baldrian 2003, Hatvani & Mécs 2003).

O sistema de cultivo de *P. castanella* utilizado no presente estudo foi composto de solo e 10% de inóculo (base seca). Este solo apresenta baixa quantidade de matéria orgânica e deficiência em nutrientes. Assim, a não detecção da atividade de MnP durante crescimento deste fungo em solo pode ter sido devido à ausência de algum nutriente fundamental para a produção desta enzima. Além disso, a presença de alguns metais no solo, por exemplo, o ferro, pode ter promovido inibição da atividade ou da produção de MnP por *P. castanella*. Contudo, outros estudos são necessários para confirmar tal hipótese.

Quando *P. castanella* foi cultivado em substrato sólido a base de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com farinha de arroz foi detectada atividade de MnP (Oliveira *et al.* dados não publicados). No entanto, não foi observada atividade de MnP em extratos enzimáticos obtidos de *P. castanella* crescido em meio líquido definido (Yamanaka *et al.* 2004). Nesta condição de cultivo, a adição de óleo vegetal induziu a atividade de MnP de *P. castanella* (Soares & Machado 2005).

Durante a realização dos experimentos no presente estudo, foi constatada perda de mais de 90% das atividades nos extratos enzimáticos armazenados sob congelamento, não sendo possível determinar a cinética de produção de atividade de lacases em solo. Essa perda da atividade enzimática não é observada nos extratos obtidos de culturas de *P. castanella* em meio líquido, tais como o meio basal BIII (Kirk *et al.* 1978) ou caldo extrato malte 2% (Moreira *et al.* 2006), evidenciando que algum fator biótico ou abiótico afeta a estabilidade destas enzimas em soluções aquosas quando a origem do extrato é proveniente de culturas de *P. castanella* em solo.

As enzimas ligninolíticas podem ser inativadas por processos bióticos e/ou abióticos, como adsorção a matriz orgânica do solo ou do substrato fúngico, acidez ou alcalinidade extrema, ou biodegradação por proteases (Chefetz *et al.* 1998, Staszczak *et al.* 2000, Ahn *et al.* 2002). Gianfreda & Bollag (1994), estudando o comportamento de enzimas imobilizadas e não imobilizadas em solos, observaram que as atividades de peroxidases e lacases não foram afetadas pelo solo arenoso, pobre em matéria orgânica. Entretanto, um decréscimo na atividade enzimática foi observado quando a quantidade de matéria orgânica era elevada. Os autores concluem que o efeito inibitório da atividade enzimática foi causado pela presença de constituintes orgânicos no solo, como substâncias húmicas e fúlvicas. O solo utilizado no presente estudo apresenta baixa quantidade de matéria orgânica (Tabela 1). Entretanto, substâncias húmicas podem ser geradas pela reação de lacases com compostos fenólicos durante a degradação do bagaço de cana-de-açúcar pelo fungo, contribuindo para perda da atividade e da estabilidade de enzimas ligninolíticas (Chefetz *et al.* 1998, Ahn *et al.* 2002).

Não foram observadas atividades de LiP em todos extratos enzimáticos avaliados, mesmo após tratamento dos extratos com PVP (5%) para remoção de compostos polifenólicos. Um dos problemas encontrados na determinação de enzimas provenientes de culturas em substrato sólido é

a presença de compostos polifenólicos nos extratos enzimáticos, que podem interferir na detecção da atividade enzimática (Leatham 1986, Boer *et al.* 2004). Além de pigmentos castanho-escuros característicos, produzidos por *P. castanella*, os compostos polifenólicos conferem uma coloração escura, que resulta num decréscimo da resolução espectrofotométrica. Além disso, as condições de cultivo podem influenciar a expressão dos genes responsáveis pela produção de LiP (Ruttimann *et al.* 1992, Rajakumar *et al.* 1996, D' Souza *et al.* 1999). Alguns fungos produtores de LiP não produziram a enzima em solo (Novotný *et al.* 1999). Compostos fenólicos causam inativação da atividade de LiP e interferem na oxidação do álcool veratrílico por peroxidases, causando inibição competitiva pelo substrato enzimático (Caramelo *et al.* 1999). Nestas condições de cultivo torna-se necessária a utilização de outros substratos para a determinação da atividade de LiP, como por exemplo, o azure B, cujo pico de máxima absorbância é na região visível (651 nm). Além disso, seria necessária análise molecular para identificar a presença de genes de LiP, antes de se poder afirmar que *P. castanella* não produz atividade de LiP.

P. castanella é um fungo da família Strophariaceae, típico degradador de matéria orgânica no solo. Pesquisas recentes têm sugerido que a presença de LiP em basidiomicetos ligninolíticos é considerada rara e que LiP não é comumente produzido por fungos decompositores de serapilheira (Rabinovich *et al.* 2004). Contudo, estes fungos têm demonstrado mineralizar eficientemente lignina sintética, mesmo na ausência de LiP, sugerindo que a degradação de estruturas não-fenólicas de lignina e compostos xenobióticos por estes fungos é realizada por outras enzimas ligninolíticas, como lacase e manganês peroxidase (Pappinut *et al.* 2001, Rabinovich *et al.* 2004, Kapich *et al.* 2005).

2. Remoção de HCB e formação de cloretos em solo por *P. castanella*.

Foram determinados HCB e organoclorados residuais durante 70 dias de crescimento de *P. castanella* em solo contaminado com 1104 mg HCB Kg⁻¹ solo (Figuras 24, 25 e 26). Pentacloroanisol (PCA) e 1,2,3,5 tetraclorobenzeno (TCB-2) não foram detectados durante crescimento de *P. castanella* em solo contaminado com HCB. 1,2,3,4 tetraclorobenzeno (TCB-1), isômero de TCB-2, foi detectado somente com 0 dias: 25 mg TCB-1 Kg⁻¹ solo. Pentaclorofenol (PCF) e pentaclorobenzeno (PeCB) foram detectados durante todo período de incubação do fungo.

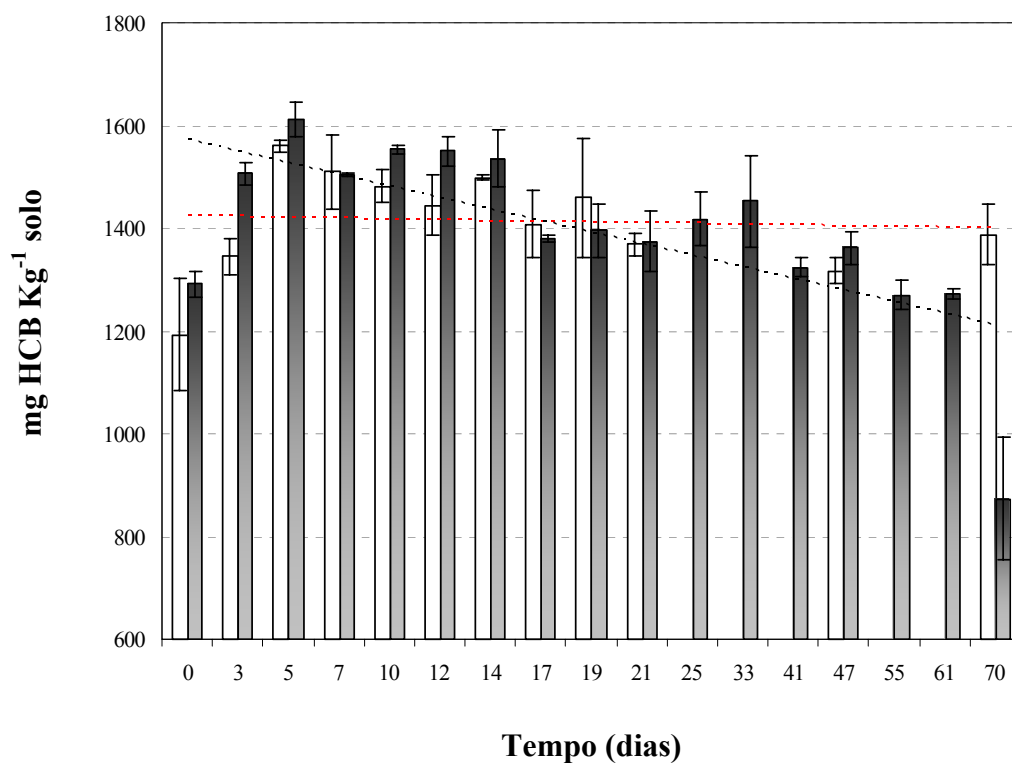


Figura 24. Concentração de HCB durante crescimento de *P. castanella* em solo contaminado com HCB (■). Controle: solo sem fungo (□). As barras indicam o desvio médio entre duplicatas.

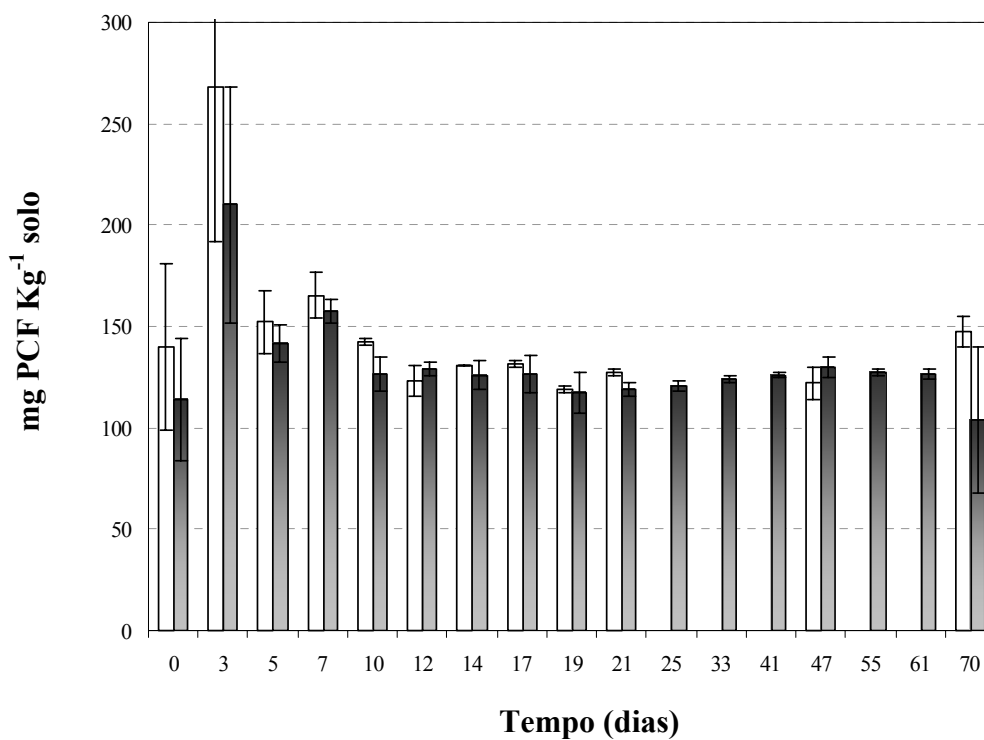


Figura 25. Concentração de pentaclorofenol (PCF) durante crescimento de *P. castanella* em solo contaminado com HCB (■). Controle: solo não inoculado (□). As barras indicam o desvio médio entre duplicatas.

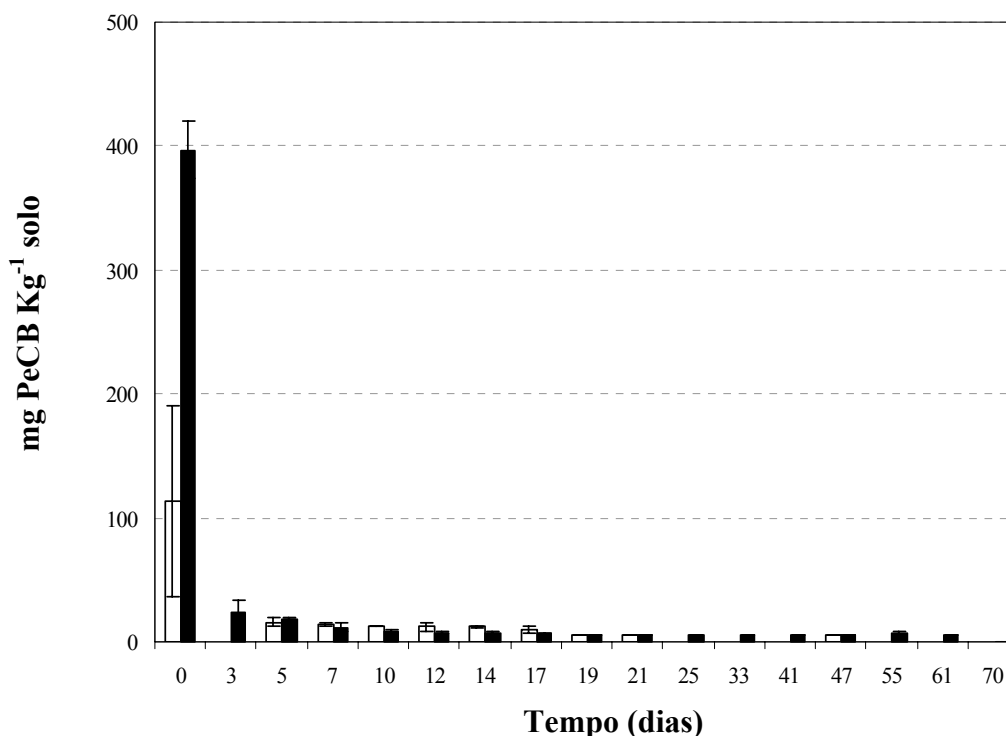


Figura 26. Concentração de pentaclorobenzeno (PeCB) durante crescimento de *P. castanella* em solo contaminado com HCB (■). Controle: solo não inoculado (□). As barras indicam o desvio médio entre duplicatas.

Foi observado efeito significativo de *P. castanella* na redução de 32,40 % da concentração inicial de HCB, quando comparado ao solo sem fungo, após 70 dias de incubação ($P=0,024$). No mesmo período observou-se efeito significativo do fungo no aumento de 53,34% na concentração de cloretos ($P=0,028$), também comparado ao solo sem fungo (Figura 27).

A determinação de íons cloreto pode ser usada como uma medida direta da biodegradação de compostos clorados em estudos *in vitro* ou em escala de campo (Aiken & Logan 1996). Observa-se que os níveis de cloretos inorgânicos detectados nos solos inoculados com *P. castanella* foram superiores aos do controle. A formação de cloreto inorgânico durante o processo de incorporação de compostos clorados na matéria húmica do solo pode ser responsável pelos níveis detectados no controle (Dec & Bollag 1994). Durante a degradação de clorofenóis por *P. chrysosporium*, a remoção dos átomos de cloro do anel aromático ocorre antes da clivagem do anel, por meio de vários ciclos de oxidação, redução e metilação de quinonas (Valli & Gold 1991).

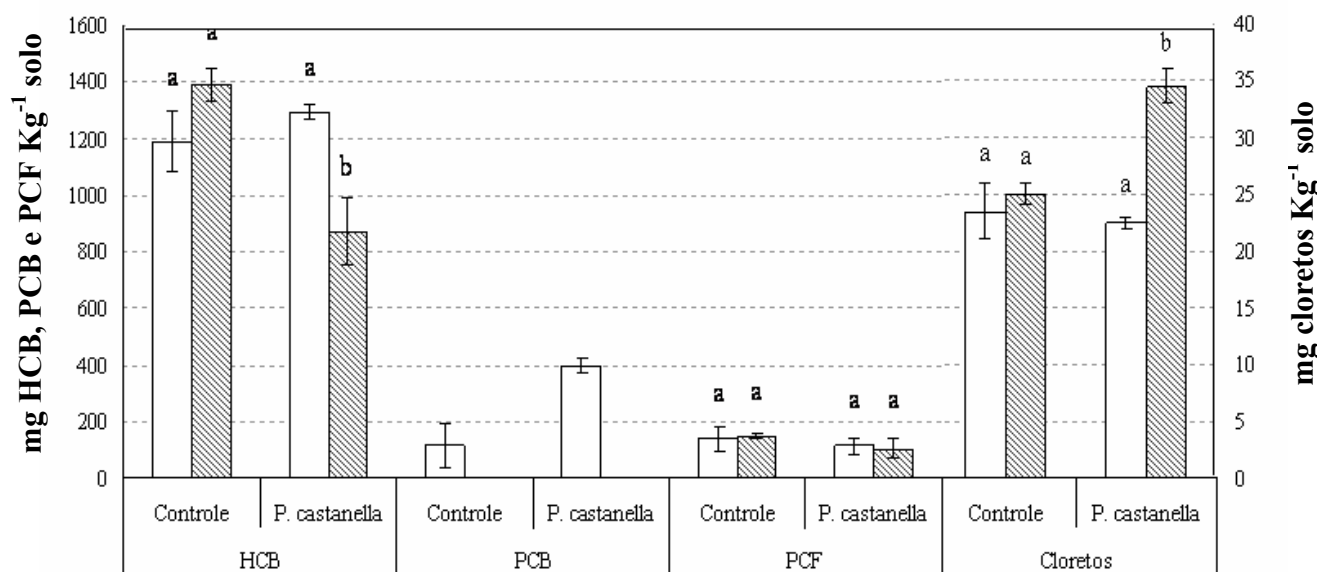


Figura 27. Concentração de hexaclorobenzeno (HCB), pentaclorobenzeno (PCB), pentaclorofenol (PCF) e clóretos inorgânico com 0 (□) e 70 (■) dias de crescimento de *P. castanella*. Controle: solo não inoculado. As barras indicam o desvio médio entre duplicatas (Letras diferentes dentro de cada composto indicam diferença estatística, Teste Tukey, $P < 0,05$).

Machado (1998) e Matheus (2003) não detectaram produção de PCA por *P. castanella* durante a degradação de PCF e HCB, respectivamente.

O presente estudo utilizou as mesmas condições de cultivo descritas por Matheus (2003), para crescimento de *P. castanella* em solo contaminado com HCB. A redução de 32,40% de HCB por *P. castanella* foi semelhante à obtida por Matheus (2003). No entanto, as atividades enzimáticas ligninolíticas não foram objeto de estudo por este autor. No presente estudo não foi possível estabelecer uma correlação direta entre os níveis de atividade enzimática e a taxa de degradação de HCB em solo por *P. castanella*. Porém, foi possível detectar atividade ligninolítica durante a redução de HCB em solo pelo fungo.

Já é bem conhecida a participação do sistema enzimático ligninolítico oxidativo e não específico produzido por fungos basidiomicetos na biodegradação de poluentes aromáticos. Assim, em muitos estudos, tem sido evidenciada a participação das enzimas ligninolíticas de basidiomicetos na biodegradação de diferentes poluentes orgânicos (Quadro 7).

Quadro 7. Enzimas ligninolíticas envolvidas na degradação de poluentes orgânicos.

Poluente orgânico	Enzima ligninolítica	Basidiomiceto	Referência
Antraceno	LiP	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Hammel <i>et al.</i> (1991)
	Lacase	<i>Trametes versicolor</i>	Johannes <i>et al.</i> (1996), Dodor <i>et al.</i> (2004)
	MnP	<i>Irpex lacteus</i> <i>Phanerochaete laevis</i>	Baborová <i>et al.</i> (2006) Bogan & Lamar (1996)
Benzoantraceno	MnP	<i>Phanerochaete laevis</i>	Bogan & Lamar (1996)
Benzopireno	Lacase	<i>Pleurotus eryngii</i> <i>T. versicolor</i>	Rodriguez <i>et al.</i> (2004) Collins <i>et al.</i> (1996), Dodor <i>et al.</i> (2004)
	MnP	<i>Phanerochaete laevis</i> <i>Stropharia coronilla</i>	Bogan & Lamar (1996) Steffen <i>et al.</i> (2003)
	Peroxidase versátil	<i>Pleurotus eryngii</i>	Rodriguez <i>et al.</i> (2004)
Bifenilas cloradas	Lacase	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> <i>Trametes</i> sp.	Schults <i>et al.</i> (2001) Tominaga <i>et al.</i> (2004)
Corantes têxteis, incluindo azocorantes	Lacase	<i>Trametes hirsuta</i>	Abadulla <i>et al.</i> (2000)
		<i>Trametes trogii</i>	Zouari-Mechichi <i>et al.</i> (2006)
		<i>T. versicolor</i>	Moldes <i>et al.</i> (2004)
	LiP	<i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Trametes hispida</i> <i>P. chrysosporium</i>	Rodríguez <i>et al.</i> (1999) Ollikka <i>et al.</i> (1993), Chivukula <i>et al.</i> (1995)
	MnP	<i>Bjerkandera</i> sp. <i>Bjerkandera adusta</i> <i>Pleurotus eryngii</i>	Mielgo <i>et al.</i> (2003) Heinfling <i>et al.</i> (1998)
Fenantreno	MnP	<i>P. chrysosporium</i> <i>Phanerochaete laevis</i>	Moen & Hammel (1994) Bogan & Lamar (1996)
Fenóis, incluindo clorofenóis	Lacase	<i>Coriolus versicolor</i>	Leontievsky <i>et al.</i> (2001), Itoh <i>et al.</i> (2000)
		<i>Pleurotus eryngii</i> <i>Pleurotus ostreatus</i>	Rodriguez <i>et al.</i> (2004) Hublik & Schinner (2000)
		<i>Poliporus pinsitus</i> <i>Rhizoctonia praticola</i> <i>Trametes</i> sp.	d'Acunzo <i>et al.</i> (2002) Bollag <i>et al.</i> (1988) Tanaka <i>et al.</i> (2003)
		<i>T. versicolor</i> <i>Trametes villosa</i>	Bollag <i>et al.</i> (1988) Bollag <i>et al.</i> (2003)
		<i>Panus tigrinus</i>	Leontievsky <i>et al.</i> (2001)
	MnP	<i>P. chrysosporium</i>	Valli & Gold (1991)
	Peroxidase versátil	<i>Pleurotus eryngii</i>	Rodriguez <i>et al.</i> (2004)
Organofosforados	Lacase	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Amitai <i>et al.</i> (1998)
Nitrotoluenos	MnP	<i>Phlebia radiata</i>	VanAcken <i>et al.</i> (1999)
Pentaclorofenol	Peroxidase versátil	<i>Bjerkandera adusta</i>	Davila-Vazquez <i>et al.</i> (2005)

Rodríguez *et al.* (1999) observou correlação direta entre a descoloração de corantes e a produção de lacases por 16 linhagens de basidiomicetos, porém a correlação não foi observada para LiP e MnP. Wesenberg *et al.* (2003) numa revisão sobre a atuação de enzimas ligninolíticas na degradação de diversos corantes sintéticos, relata a detecção de atividades de lacase, LiP e MnP em culturas de *Bjerkandera adusta*, *Dichomitus squalens*, *Irpex lacteus*, *Lentinus tigrinus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete sordida*, *Phlebia tremellosa*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Polyporus ciliatus*, *Stereum hirsutum*, *Trametes versicolor* e outros basidiomicetos durante a descoloração de corantes.

3. Caracterização do sistema enzimático ligninolítico extracelular de *P. castanella* em solo contaminado com HCB.

A caracterização do sistema enzimático ligninolítico extracelular foi realizada com extratos enzimáticos obtidos nos tempo de cultivo de máxima produção de atividade de peroxidases em solo contaminado com HCB e solo-controle, aos 12 e 19 dias de incubação. Foram avaliados diversos parâmetros como: pH ótimo e estabilidade ao pH e temperatura ótima e estabilidade à temperatura durante a oxidação do ABTS na presença e ausência de H₂O₂. Além disso, foi avaliada a ação de metais e de inibidores e determinado o *K_m* aparente da atividade enzimática para ABTS e siringaldazina.

3.1. pH ótimo e estabilidade ao pH

Foram determinadas as atividades de peroxidases e lacases dos extratos obtidos das culturas de *P. castanella* em solo-HCB e controle, na faixa de pH de 2,50-5,78, utilizando os tampões citrato-fosfato e acetato de sódio (Tabela 2 e Figura 28). Aumento do pH de reação, utilizando os dois tampões, promoveu um decréscimo nas atividades de peroxidases e lacases para os extratos avaliados. O pH ótimo de atividade de peroxidases e lacases situou-se na região ácida.

Como as enzimas são proteínas, as mudanças no pH da reação afetarão profundamente o caráter iônico dos grupos carboxila e amino na superfície da molécula, influenciando bastante a natureza catalítica. As enzimas têm um pH ótimo característico, no qual a sua atividade é máxima. As curvas de variação da atividade das enzimas em diferentes valores de pH demonstram em qual pH importantes grupos doadores ou receptores de prótons no sítio catalítico estão em seus estados de ionização adequados. O pH ótimo de uma enzima não é necessariamente idêntico ao pH do meio em que se encontram; este pode estar pouco acima ou abaixo do valor do pH ótimo. A atividade

catalítica das enzimas pode, portanto, ser regulada ao menos em parte por variações do pH do meio em que se encontram (Harper *et al.* 1982).

Tabela 2. Efeito do pH na atividade de lacase (UL^{-1}) em tampão citrato-fosfato e acetato de sódio com extratos obtidos aos 12 e 19 dias de crescimento de *P. castanella* em solo contaminado com hexaclorobenzeno (HCB). Controle: solo não contaminado.

Tampão citrato-fosfato					Tampão acetato de sódio				
pH	12 dias		19 dias		pH	12 dias		19 dias	
	controle	solo HCB	controle	solo HCB		controle	solo HCB	controle	solo HCB
2,50	340,76	nr	230,57	nr	3,60	128,71	50,93	131,49	43,52
3,00	149,54	nr	169,45	nr	3,94	90,75	44,91	111,12	37,50
3,72	116,67	50,00	92,60	24,08	4,36	64,82	27,32	78,71	22,69
4,25	44,44	24,53	55,56	12,03	4,90	35,19	18,52	55,56	11,58
5,10	20,37	13,42	25,69	6,48	5,43	23,15	16,21	38,89	6,95
5,78	12,03	10,64	12,50	4,16					

nr= não realizado

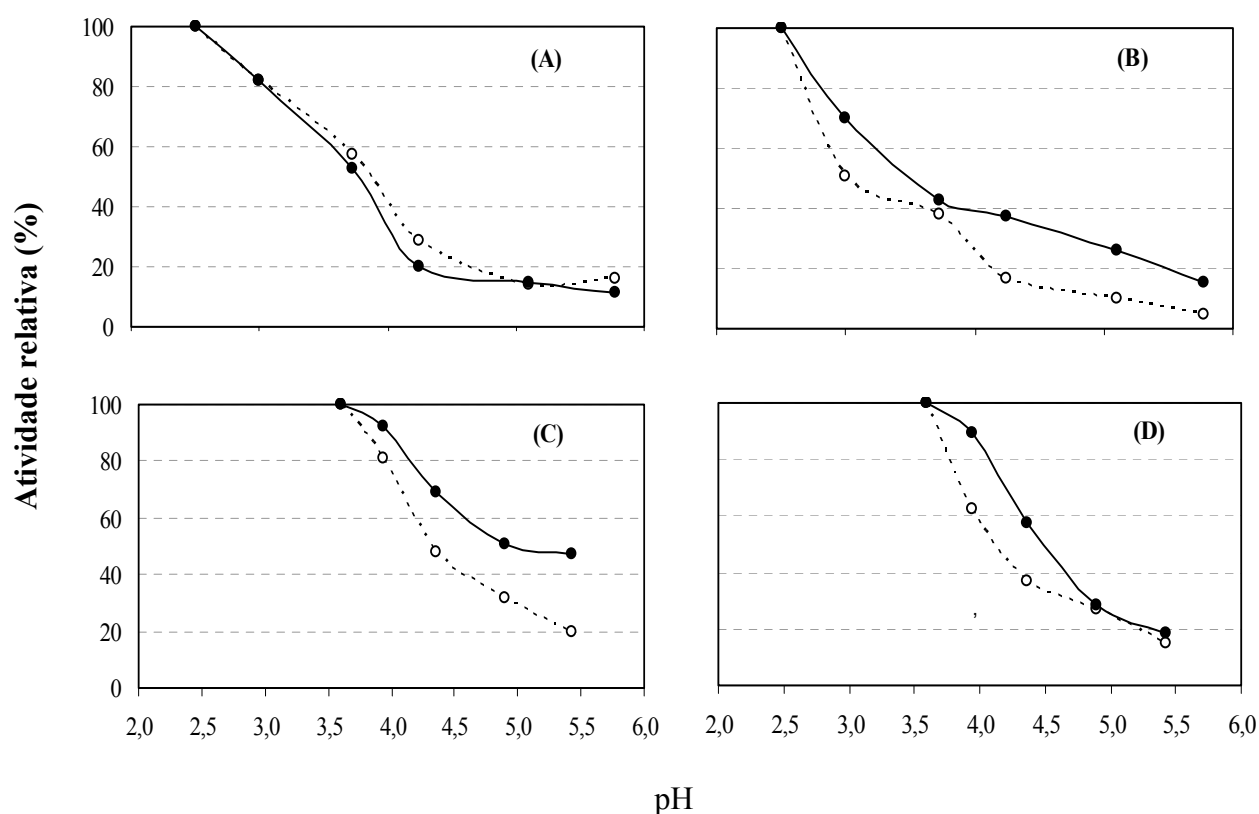


Figura 28. Efeito do pH na atividade relativa de peroxidases de extratos obtidos do crescimento de *P. castanella* em solo contaminado com HCB (●), com 12 (A) e 19 (B) dias, em tampão citrato-fosfato e; com 12 (C) e 19 (D) dias em tampão acetato de sódio em diferentes valores de pH. Controle: solo não contaminado (○).

Comparando as atividades de peroxidases e lacases de *P. castanella* dos extratos obtidos nos picos de máxima atividade ligninolítica, 12 dias de crescimento em solo-HCB e com 19 dias em solo-controle, observa-se o mesmo perfil de atividade enzimática, um decréscimo da atividade com o aumento do pH, evidenciando predomínio de atividade de lacase com pH ótimo próximo à 3. Desta forma, enzimas com mesmo pH ótimo de atividade foram produzidas tanto em solo-HCB quanto em solo não-contaminado, ou seja, a presença do poluente não influenciou nos tipos de enzimas ligninolíticas que são produzidas. Entretanto, isoenzimas podem ter o mesmo pH ótimo, porém diferenças na estabilidade e em propriedades catalíticas (Pickard & Duhalt 2001, Saparrat *et al.* 2002).

O pH ótimo de lacase é altamente dependente do substrato utilizado para determinação da atividade. Quando o ABTS é utilizado como substrato, o pH ótimo é mais ácido e são encontrados valores ótimos na faixa entre o pH 3 e 5. O pH ótimo de lacases varia com a espécie de organismo avaliada. Assim, como observado para *P. castanella*, lacases de muitos basidiomicetos apresentam o pH ótimo na região ácida, próximo a 3,0 (Quadro 8).

A estabilidade ao pH das atividades ligninolíticas produzidas por *P. castanella* foi avaliada em tampão citrato-fosfato e acetato de sódio, nos valores de pH ótimos obtidos anteriormente, durante 24 h. A Figura 29 mostra a estabilidade durante as 6 horas iniciais. Os valores de pH dos tampões influenciaram a estabilidade das atividades de peroxidases e lacases. Em tampão citrato-fosfato pH 2,5, as atividades de peroxidases e lacases foram instáveis, apresentando o mesmo perfil durante 6 horas (Figura 29 A e B), com perda de 80% das atividades após 24 h (Tabela 3). Por outro lado, em tampão acetato de sódio pH 3,6, as atividades de peroxidase em solo-HCB e de lacases solo-controle foram também instáveis, com perda de atividade entre 57,15 e 76,57% após 24h. (Tabela 3). No entanto, neste mesmo pH, as atividades de lacase de solo-HCB e de peroxidase solo-controle revelaram maior estabilidade, com perda de atividade inferior a 20% com 6 horas e perda menor que 30% após 24 h (Figura 29 C e D e Tabela 3).

Assim como observado anteriormente no estudo de pH ótimo, o perfil da curva de estabilidade ao pH 2,5 das atividades de lacases e peroxidases parece ser o mesmo, evidenciando o predomínio de lacases nos extratos enzimáticos. Diferenças entre as atividades relativas de peroxidases e lacases na estabilidade ao pH 3,6 podem ser evidências da presença de isoenzimas produzidas por *P. castanella* em solo-HCB e controle.

Quadro 8. valores de pH ótimo para lacases de basidiomicetos.

Fonte de lacase	Substrato para atividade	pH ótimo	Referência
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i> L1	ABTS	3	Fukushima & Kirk (1995)
	Guaiacol	3	
	Ácido siríngico	3	
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i> L2	ABTS	3	Fukushima & Kirk (1995)
	Guaiacol	5	
	Ácido siríngico	4	
<i>Coprinus friesii</i>	ABTS	5	Heinzkill <i>et al.</i> (1998)
<i>Coprinus cinereus</i>	ABTS	4	Schneider <i>et al.</i> (1999)
	Siringaldazina	6,5	
<i>Coriolus hirsutus</i>	ABTS	2,5	Shin & Lee (2000)
	DMF	4	
<i>Coriolopsis rigida</i>	ABTS	2,5	Saparrat <i>et al.</i> (2002)
	DMF	3	
<i>Lentinus tigrinus</i>	DMF	3	Lechner & Papinutti 2006
Linhagem I-4 (família Chaetomiaceae)	Siringaldazina	7	Saito <i>et al.</i> (2003)
Linhagem UD4	ABTS	4	Jordaan <i>et al.</i> (2004)
	Guaiacol	6	
	DMAB-MBTH	6	
	Ácido siríngico	4,5	
<i>Panaeolus sphinctrinus</i>	ABTS	3	Heinzkill <i>et al.</i> (1998)
<i>Panaeolus papilionaceus</i>	ABTS	3	Heinzkill <i>et al.</i> (1998)
<i>Peniophora</i> sp.	Guaiacol	4	Niku-Paavola <i>et al.</i> (2004)
<i>Phellinus ribis</i>	DMF	4-6	Min <i>et al.</i> (2001)
	ABTS	5	
	siringaldazina	6	
<i>Pleurotus ostreatus</i> D1	ABTS	4	Pozdnyakova <i>et al.</i> (2004)
	DMF	4	
	Siringaldazina	7	
<i>Pleurotus ostreatus</i> (POXA1)	ABTS	3	Palmieri <i>et al.</i> (1997)
<i>Pleurotus ostreatus</i> (POXA2)	ABTS	3	Palmieri <i>et al.</i> (1997)
	Guaiacol	6	
<i>Pleurotus ostreatus</i> (POXC)	ABTS	3	Palmieri <i>et al.</i> (1997)
	Guaiacol	6	
<i>Polyporus pinsitus</i>	ABTS	3	Heinzkill <i>et al.</i> (1998)
<i>Psilocybe castanella</i> CCB444	ABTS	2,5	Coelho <i>et al.</i> (2005)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Guaiacol	4	Eggert <i>et al.</i> (1995)
<i>Rigidoporus lignosus</i>	ABTS	3	Bonomo <i>et al.</i> (1998)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	ABTS	2,4	Ryan <i>et al.</i> (2003)
<i>Trametes trogii</i>	ABTS	2	Zouari-Mechichi <i>et al.</i> (2006)
	DMF	2,5	
<i>Trametes versicolor</i>	ABTS	5,5	Brown <i>et al.</i> (2002)
<i>Trametes villosa</i>	Siringaldazina	5 a 5,5	Yaver <i>et al.</i> (1996)
	ABTS	≤2,7	
<i>Trichophyton rubrum</i> LKY-7	ABTS	3	Jung <i>et al.</i> (2002)
	Guaiacol	3,5	

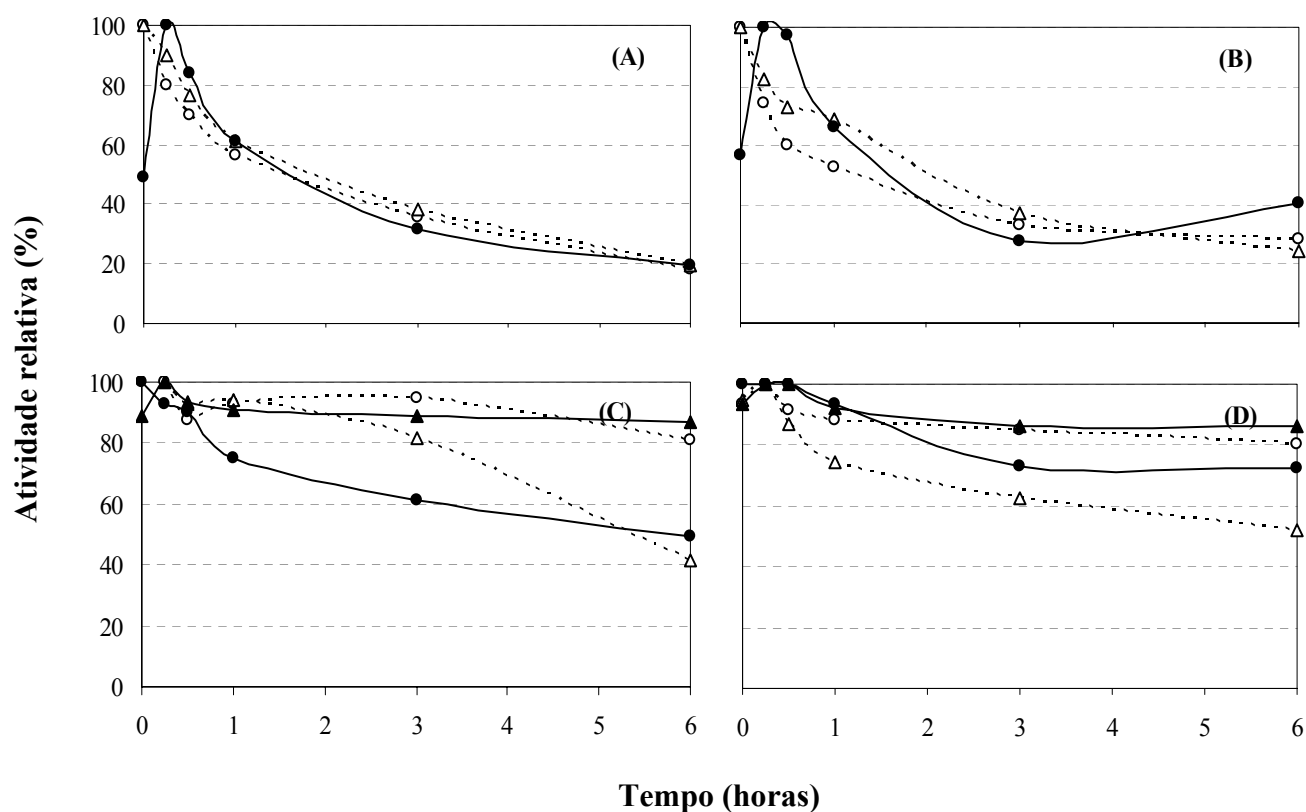


Figura 29. Estabilidade das atividades de lacases e peroxidases ao pH 2,5 (tampão citrato-fosfato, A e B) e ao pH 3,60 (tampão acetato de sódio, C e D), por 6 horas, de extratos obtidos com 12 (A e C) e 19 (B e D) dias de crescimento de *P. castanella* em solo contaminado com HCB. Legenda: (●) atividade de peroxidases em solo-HCB; (○) atividade de peroxidases em solo-controle; (▲) atividade de lacases em solo-HCB; (△) atividade de lacases em solo-controle.

Tabela 3. Perda de atividade enzimática (%) após 24h de incubação de extratos obtidos de culturas de *P. castanella* em solo contaminado com HCB em pH 2,5 (tampão citrato-fosfato) e pH 3,6 (tampão acetato de sódio), à temperatura ambiente. Controle: solo não contaminado.

pH de incubação	Tempo de cultivo	Atividade de lacases (%)		Atividade de peroxidases (%)	
		HCB	controle	HCB	controle
2,5	12 dias	nr	95,86	95,65	88,18
	19 dias	nr	94,38	86,77	82,54
3,6	12 dias	20,29	65,85	76,57	25,00
	19 dias	21,84	70,67	57,15	28,33

nr= não realizado

A instabilidade das enzimas ligninolíticas pode ser atribuída a vários fatores, como desnaturação por valores muito baixos de pH (Bonomo *et al.* 2001, Keum & Li 2004), degradação por proteases (Staszczak *et al.* 2000, Palmieri *et al.* 2000), desnaturação irreversível pela exposição prolongada a radicais produzidos pelas enzimas (Li *et al.* 1999) e inativação por substâncias húmicas e fúlvicas formadas durante a degradação de substratos lignocelulósicos (Ahn *et al.* 2002, Keum & Li 2004). Por outro lado, a maior estabilidade ao pH 3,6 das atividades ligninolíticas de *P. castanella* parece ser uma característica comum de enzimas ligninolíticas de basidiomicetos. Lacases de basidiomicetos ligninolíticos são muito mais estáveis em valores de pH acima de 4 (Xu *et al.* 1996, Cambria *et al.* 2000, Jung *et al.* 2002, Saparrat *et al.* 2002, Ryan *et al.* 2003). A elevada estabilidade ao pH de lacases de basidiomicetos ligninolíticos pode ser atribuída ao sítio ativo de cobre, que representa o núcleo mais estável destas enzimas (Bonomo *et al.* 2001).

A catálise de lacases fúngicas envolve: (a) a ligação de um substrato reduzido ao cobre T1 e subsequente redução do T1-Cu(II) à Cu(I), (b) a transferência interna de elétrons do centro T1 ao agrupamento T2/T3, e (c) a ligação e subsequente redução de uma molécula de O₂ à H₂O no centro T2/T3. Potencialmente, qualquer alteração no pH induz mudanças nas reações de oxidação do substrato, redução do O₂ e na própria lacase (particularmente em seus centros de cobre T1 e T2/T3), contribuindo para diferentes níveis de atividade em função do pH (Xu 1997).

Comparando o perfil de estabilidade ao pH 3,6 por 24h das atividades de peroxidases e de lacases nos extratos obtidos nos picos de máxima produção de atividade ligninolítica (12 dias em solo-HCB e 19 dias em solo-controle) observa-se que a presença do HCB pode ter influenciado na composição do sistema enzimático (Figura 30). A atividade de peroxidase teve baixa estabilidade em solo-HCB (atividade relativa de 20%) e alta em solo-controle (atividade relativa maior que 70%). Um perfil diferente foi observado para as atividades de lacases nos picos de máxima atividade ligninolítica. A atividade de lacase foi estável em solo-HCB (atividade relativa de 80%), enquanto em solo-controle esta atividade foi instável (30% de atividade relativa). O HCB pode ter influenciado a produção de isoenzimas que, apresentando o mesmo pH ótimo, diferem quanto à estabilidade ao pH 3,6. Dessa forma, o HCB pode ter induzido a produção de isoenzimas de lacases estáveis e de peroxidases instáveis ao pH 3,6.

Basidiomicetos ligninolíticos produtores de lacases (como *Ceriporiopsis subvermispora*, *Coriolus versicolor* e *Panus tigrinus*) e produtores de lignina peroxidase e manganês peroxidase (como *Phanerochaete chrysosporium* e *Bjerkandera adusta*) secretam isoenzimas com diferenças na estabilidade e nas propriedades catalíticas (Glumoff 1990, Maltseva 1991, Moroshi 1991, Salas *et al.* 1995). A existência de muitas isoformas de lacases em culturas de espécies de *Trametes* tem sido relatada. *Trametes versicolor* possui uma família de no mínimo seis genes de lacase e exibe a expressão constitutiva de várias isoenzimas (Bollag & Leonowicz 1984, Von Hunolstein *et al.*

1986). Em culturas ligninolíticas de *P. chrysosporium* foram descritas até 15 isoenzimas de LiP e 6 de MnP (Fiechter 1993). A produção de LiP e MnP por *P. chrysosporium* se faz sob múltiplas isoformas, sendo o tipo, o número e os níveis de cada isoenzima variável de acordo com a amostra, o tempo, as condições de cultivo e o processo de purificação utilizado (Reddy 1993). A diferença em modelos de expressão gênica de lacases de *Trametes versicolor* possibilitou revelar a presença de isoenzimas com características em comum: mesmo pH ótimo de atividade e mesma composição de sub-unidades e conteúdo de carboidratos. Entretanto, os autores deste estudo observaram que o gene *lccIV* não é expresso em condições de cultivo consideradas normais e a transcrição de mRNA *lccIV* tem sido induzida pela adição de 2,5 xilidina às culturas deste fungo (Brown *et al.* 2002).

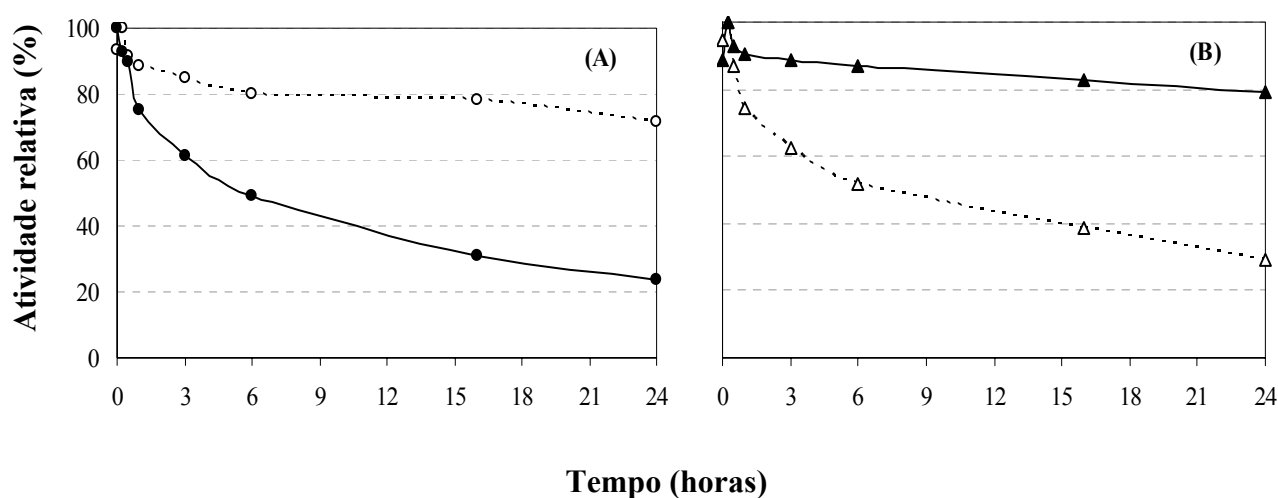


Figura 30. Estabilidade das atividades de peroxidases (A) e de lacases (B) ao pH 3,60, por 24 horas, a temperatura ambiente, de extratos obtidos nos picos de máxima atividade ligninolítica, 12 dias de crescimento de *P. castanella* em solo-HCB e 19 dias em solo-controle. Legenda: (●) atividade de peroxidases de solo-HCB (extrato obtido com 12 dias); (○) atividade de peroxidases de solo-controle (extrato obtido com 19 dias); (▲) atividade de lacases de solo-HCB (extrato obtido com 12 dias); (Δ) atividade de lacases de solo-controle (extrato obtido com 19 dias).

No ambiente extracelular, o controle do pH torna-se importante, pois resultaria numa mudança acentuada na velocidade das reações, caso o mesmo não fosse mantido. Durante crescimento de *P. castanella* em solo, o pH do sistema de cultivo encontra-se na região ácida, próximo a 4,0 (Matheus *et al.* 2003). A elevada estabilidade destas enzimas ligninolíticas na faixa de pH próximo a 4,0 pode ser considerada um aspecto favorável para aplicação de *P. castanella* em processos de biorremediação de solos contaminados. E ainda, o aumento do pH do solo pode diminuir a atividade de lacases produzidas pelo fungo.

3.2. Temperatura ótima e estabilidade à temperatura

O aumento da temperatura de reação promoveu aumento nas atividades de peroxidases e lacases (Figura 31). Nos extratos obtidos de culturas com 12 dias de crescimento de *P. castanella* foram observadas temperaturas ótimas de atividade de peroxidases a 60, 75 e 85°C em solo-HCB e 50°C em solo-controle (Figura 31 A). Nos extratos obtidos com 19 dias de crescimento de *P. castanella* foi observada temperatura ótima de atividade de peroxidases a 90°C tanto em solo-HCB quanto em solo-controle (Figura 31 B). Com 12 dias de crescimento de *P. castanella* as atividades de lacases apresentaram temperaturas ótimas a 55, 75 e 94°C em solo-HCB e 80°C em solo-controle (Figura 31 C). Com 19 dias, a temperatura ótima das atividades de lacases foi de 75 a 94°C em solo-HCB e 70°C em solo-controle (Figura 31 D). Diferenças nas temperaturas ótimas de atividade evidenciaram influência do HCB na composição do extrato enzimático obtido de culturas de *P. castanella* em solo. Como controle, foi avaliada a estabilidade do ABTS, na ausência de enzimas, a temperaturas até 94°C, não sendo observada qualquer oxidação do substrato.

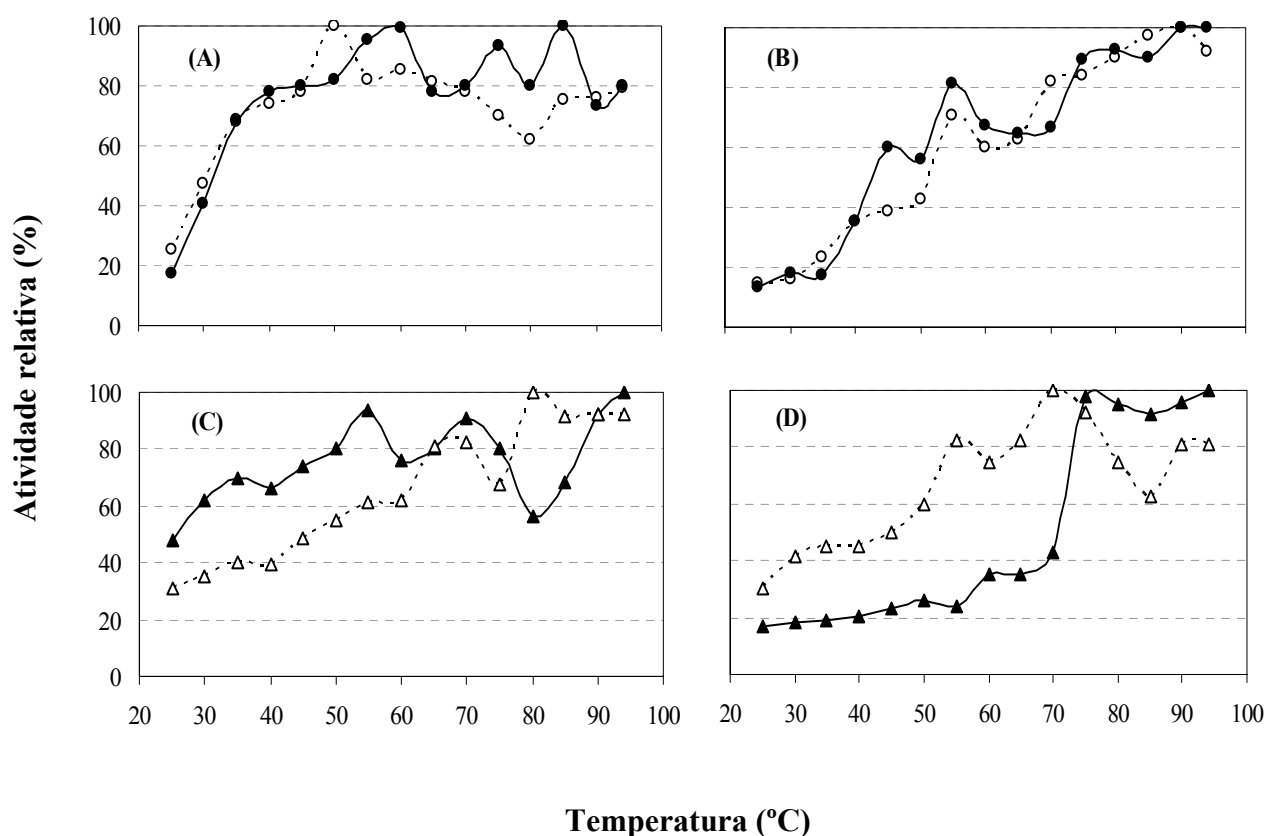


Figura 31. Efeito da temperatura nas atividades de peroxidases (●) e lacases (▲) de extratos obtidos com 12 (A e C) e 19 (B e D) dias de crescimento de *P. castanella* em solo contaminado com HCB.

Controles: atividade de peroxidases (○) e lacases (Δ) em solo não contaminado.

O aumento da temperatura de reação promove o aumento de agitação das moléculas com aumento da frequência das colisões entre substrato e enzima. Acima da temperatura ótima de atividade de uma enzima, a velocidade de reação cai de maneira aguda, geralmente devido à desnaturação da enzima pelo calor (Harper *et al.* 1982). A desnaturação térmica de enzimas multicobres azuis é irreversível. Para lacases de fungos tem sido relatado que a enzima é ativada por pré-incubação a temperaturas elevadas (acima de 60°C) (Agostinelli *et al.* 1995). A temperatura ótima de lacases de basidiomicetos situa-se na faixa de 40 a 70°C (Quadro 9).

Quadro 9. Temperatura ótima de lacases de alguns basidiomicetos

Fonte de lacase	Temperatura ótima (°C)	Referência
<i>Cerrena maxima</i>	>50	Shleev <i>et al.</i> (2004)
<i>Coprinus cinereus</i>	60-70	Schneider <i>et al.</i> (1999)
<i>Coriolopsis fulvocinerea</i>	>50	Shleev <i>et al.</i> (2004)
<i>Coriolus hirsutus</i>	45	Shin & Lee (2000)
Linhagem I-4 (família Chaetomiaceae)	42	Saito <i>et al.</i> (2003)
Linhagem UD4	70	Jordaan <i>et al.</i> (2004)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	45-65	Palmieri <i>et al.</i> (1997)
<i>Psilocybe castanella</i> CCB444	55	Coelho <i>et al.</i> (2005)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	62	Ryan <i>et al.</i> (2003)
<i>Trametes hirsuta</i>	>50	Shleev <i>et al.</i> (2004)
<i>Trametes ochraceae</i>	>50	Shleev <i>et al.</i> (2004)
<i>Trametes</i> sp. linhagem AH28-2	50	Xiao <i>et al.</i> (2003)

Comparando os picos de máxima atividade ligninolítica, foi observado que independente da origem dos extratos, a temperatura ótima de atividade de lacases foi de 75-80°C. Foram observadas temperaturas ótimas de atividade de peroxidases a 60°C e também na faixa de 75-85°C. A atividade de peroxidases observada na região de 75-85°C pode corresponder a ação de lacases uma vez que estas enzimas atuam na presença de H₂O₂. Provavelmente, o HCB induziu a produção de peroxidase com temperatura ótima a 60°C (Figura 32). Baborová *et al.* (2006) observaram que a temperatura ótima de MnP de *Irpex lacteus* foi entre 50-60°C.

Foram observadas perdas de 100% das atividades de peroxidases e lacases produzidas por *P. castanella* à temperatura de 85°C com 5 minutos (dados não mostrados). Devido a baixa estabilidade das atividades enzimáticas nesta temperatura, a estabilidade das atividades de lacases e peroxidases foram determinadas à 55°C durante 24 horas. As atividades de lacases e peroxidases de *P. castanella* nos extratos avaliados foram termoestáveis à 55°C por 60 min (atividade residual entre 60 e 80%) (Figura 33).

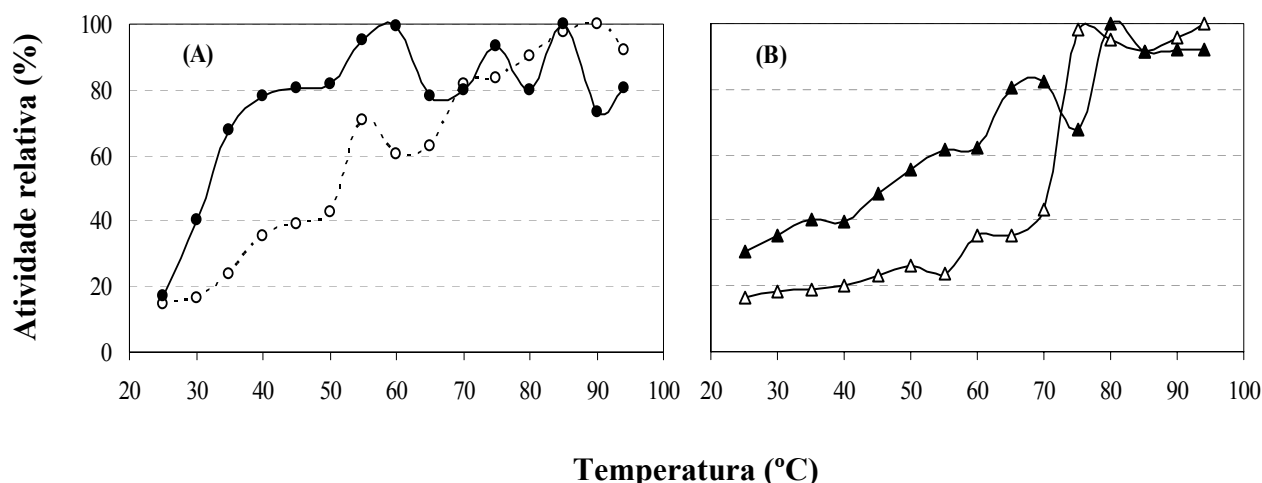


Figura 32. Efeito da temperatura nas atividades de peroxidases (A) e de lacases (B) de extratos obtidos nos picos de máxima atividade ligninolítica, 12 dias de crescimento de *P. castanella* em solo-HCB e 19 dias em solo-controle. Legenda: (●) atividade de peroxidases de solo-HCB (extrato obtido com 12 dias); (○) atividade de peroxidases de solo-controle (extrato obtido com 19 dias); (▲) atividade de lacases de solo-HCB (extrato obtido com 12 dias); (△) atividade de lacases de solo-controle (extrato obtido com 19 dias).

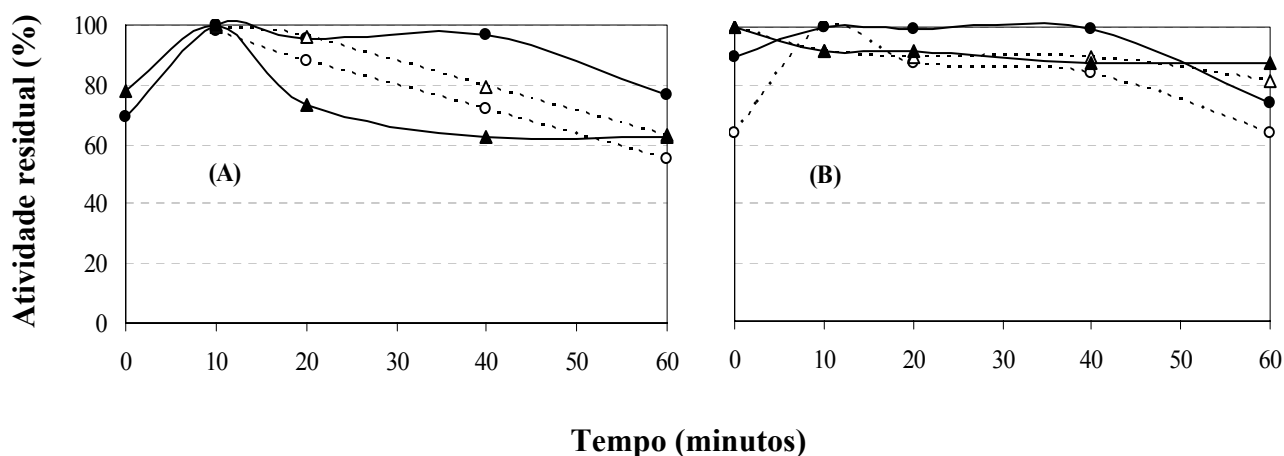


Figura 33. Estabilidade das atividades de lacases (▲) e peroxidases (●) à temperatura de 55°C, por 60 minutos, de extratos obtidos com 12 (A) e 19 (B) dias de crescimento de *P. castanella* em solo contaminado com HCB. Controles: atividade de peroxidases (○) e atividade de lacases (△) em solo não contaminado.

Muitas lacases de fungos são estáveis a temperaturas próximas a 50°C (De Vries *et al.* 1986). Lacases termoestáveis dos fungos termófilos *Myceliophthora thermophila* e *Coprinus cinereus* apresentaram menos de 70% de sua atividade à 60°C após 1 h (Xu 1996, Schneider *et al.*

1999). MnP termoestáveis de *Ganoderma* sp. YK-505 e *Lenzites betulinos* apresentaram 100 e 60% de atividade, respectivamente, a 60°C por 60 minutos (Kondo *et al.* 1996, Hoshino *et al.* 2002). Jordaan *et al.* (2004) observaram que lacase termoestável de uma linhagem de basidiomiceto não identificada (linhagem UD4) não apresentou perda de atividade com 9 h de incubação à 60°C.

Após 12 h de incubação dos extratos de *P. castanella* a 55°C, as atividades de lacases e peroxidases apresentaram pouco mais de 20% de atividade residual, exceto as atividades de lacases produzidas com 19 dias de crescimento do fungo em solo-HCB (60% da atividade residual) (Figura 34).

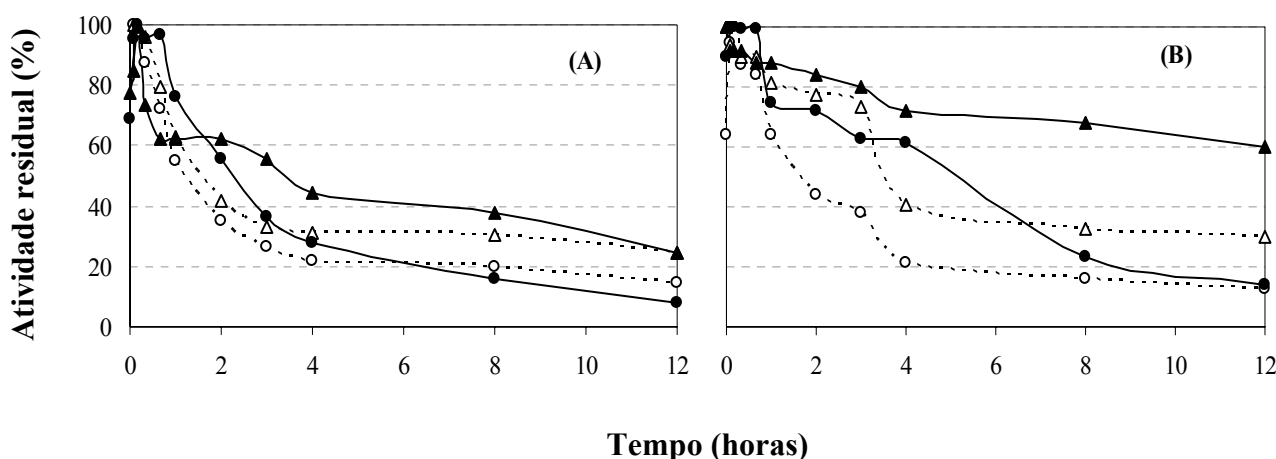


Figura 34. Estabilidade das atividades de lacases (▲) e peroxidases (●) à temperatura de 55°C, por 12 horas, de extratos obtidos com 12 (A) e 19 (B) dias de crescimento de *P. castanella* em solo contaminado com HCB. Controles: atividade de peroxidases (○) e atividade de lacases (Δ) em solo não contaminado.

A meia vida ($t_{1/2}$) aproximada à 55°C das atividades de lacases e peroxidases de *P. castanella* foi entre 1,5 e 5,5 horas, exceto a atividade de lacase produzida com 19 dias de crescimento do fungo em solo-HCB ($t_{1/2} > 12$ h) (Tabela 4).

Palmieri *et al.* (1997) caracterizando uma nova lacase "branca" termoestável de *Pleurotus ostreatus* POXA1 observaram meia-vida de 3h e 20 min à 60°C. Chefetz *et al.* (1998) observaram que lacase do fungo termófilo *Chaetomium thermophilum* teve meia vida à 50°C de 5 a 12 h. Schneider *et al.* (1999) observaram que a meia vida a 40°C de lacase de *Coprinus cinereus* expressa em *Aspergillus oryzae* foi de 3,3 h e 21,8 minutos na presença de 0 e 2 mM de H_2O_2 , respectivamente. Saito *et al.* (2003) em análise de termoestabilidade de lacase de um basidiomiceto da família Chaetomiaceae observaram meia vida de 150 e 20 h a 25 e 40°C, respectivamente. Niku-Paavola *et al.* (2004) descreveram que a atividade de lacase de *Peniophora* sp. permaneceu

inalterada por 2 h. de incubação à 40-50°C e a meia-vida a 60 e 70°C foi de 5 h e 15 min., respectivamente. Lacase de *Lentinus tigrinus* apresentou 100% de atividade após 42 h a 40°C (Lechner & Papinutti 2006).

Tabela 4. Meia vida ($t_{1/2}$) aproximada à 55°C das atividades de lacases e peroxidases de extratos obtidos de culturas de *P. castanella* em solo contaminado com HCB com 12 e 19 dias de crescimento. Controle: solo não contaminado.

Tempo de cultivo	Atividade de lacases		Atividade de peroxidases	
	HCB	controle	HCB	controle
12 dias	3,5 h.	1,5 h.	2,5 h.	1,5 h.
19 dias	>12 h.	3,5 h.	5,5 h.	2 h.

Foram observados anteriormente diferenças quanto à estabilidade ao pH 3,6 das atividades de peroxidases e lacases nos picos de máxima atividade ligninolítica de *P. castanella* (em solo-HCB e solo-controle com 12 e 19 dias, respectivamente). No entanto, nestes mesmos extratos, as atividades de peroxidases e lacases apresentaram a mesma estabilidade e mesmo $t_{1/2}$ a 55°C por 24 h (Figura 35 e valores em negrito da Tabela 4), ou seja, as isoenzimas produzidas por *P. castanella* não diferiram quanto à estabilidade nesta temperatura.

Após 24 h de incubação dos extratos de *P. castanella* à 55°C foram observadas perdas de atividades superiores a 75% (Tabela 5). Lacase de *Trametes trogii* perdeu mais de 90% da atividade após 24 h a 60°C (Zouari-Mechichi *et al.* 2006). Perda da atividade de lacases após 24 horas a temperaturas superiores à 55°C pode ser consequência da desnaturação das enzimas pelo calor. Podem ocorrer mudanças conformacionais nos sítios de cobre, que representam o núcleo mais estável da enzima. Os átomos de cobre possuem um papel importante na estabilização da estrutura de lacases (Koroleva-Skorobogatko *et al.* 1999, Koroleva *et al.* 2001 Ragusa *et al.* 2002).

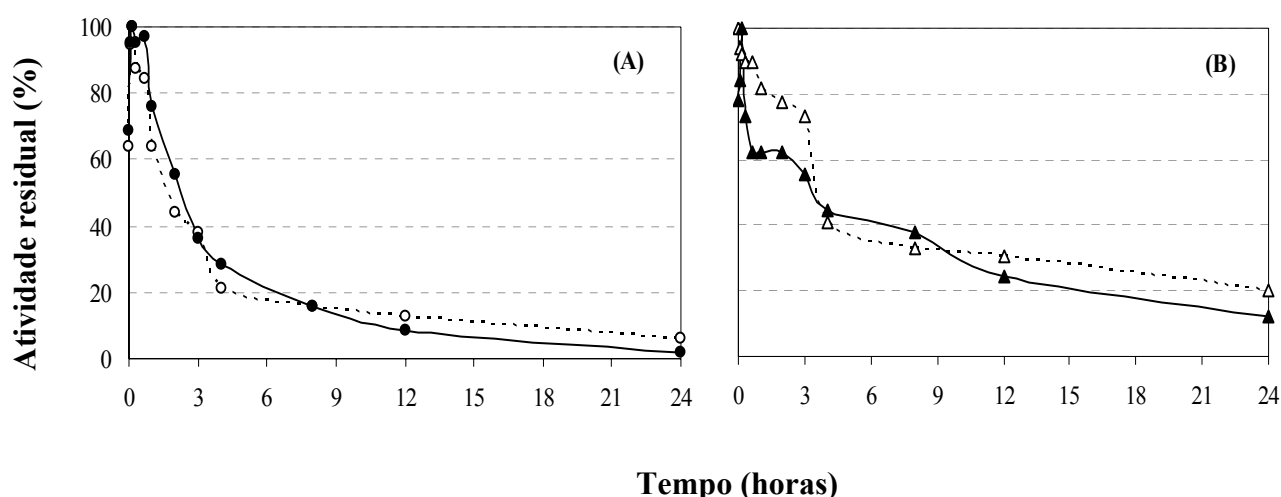


Figura 35. Estabilidade das atividades de peroxidases (A) e de lacases (B) à temperatura de 55°C, por 24 horas, de extratos obtidos nos picos de máxima atividade ligninolítica, 12 dias de crescimento de *P. castanella* em solo-HCB e 19 dias em solo-controle. Legenda: (●) atividade de peroxidases de solo-HCB (extrato obtido com 12 dias); (○) atividade de peroxidases de solo-controle (extrato obtido com 19 dias); (▲) atividade de lacases de solo-HCB (extrato obtido com 12 dias); (Δ) atividade de lacases de solo-controle (extrato obtido com 19 dias).

Tabela 5. Perda de atividade enzimática (atividade residual em %) após 24 h. de incubação à temperatura de 55°C, de extratos obtidos de culturas de *P. castanella* em solo contaminado com HCB com 12 e 19 dias de crescimento. Controle: solo não contaminado.

Tempo de cultivo	Perda de atividade de lacases (%)		Perda de atividade de peroxidases (%)	
	HCB	controle	HCB	controle
12 dias	88,00	81,60	97,92	89,92
19 dias	78,40	79,60	91,74	94,16

Do ponto de vista da aplicação de culturas de *P. castanella* em solo contaminado com HCB, podemos dizer que o aumento da temperatura de incubação pode promover aumento das atividades enzimáticas, incluindo de lacase. Durante crescimento de *P. castanella* em biorreatores com 400 Kg de solo, a temperatura de incubação pode chegar à 30°C (Matheus *et al.* 2003). A temperatura ótima de crescimento de *P. castanella* está próximo à 25°C e acima de 30°C o crescimento do fungo pode ser comprometido (Matheus 2003). Desta forma, temperaturas de incubação até 30°C não representam problemas na inativação das enzimas ligninolíticas, visto que lacases termoestáveis podem ser produzidas por *P. castanella* em solo contaminado com HCB.

3.3. Efeito de inibidores e metais e K_m aparente

O EDTA revelou não ser um inibidor eficiente das atividades ligninolíticas de *P. castanella* (Figura 36). Os níveis de inibição foram maiores nos extratos obtidos com 12 dias de crescimento do fungo, tanto de solo-HCB quanto controle. Nos extratos obtidos com 19 dias de crescimento, o EDTA inibiu menos de 20% da atividade inicial, enquanto nos extratos obtidos com 12 dias em solo contaminado e controle a inibição foi próxima à 40%. A azida sódica (NaN_3) foi o inibidor mais eficiente da atividade ligninolítica, inibindo totalmente a atividade em todos os extratos avaliados. Considerável inibição foi observada com ácido tioglicólico. L-cisteína e oxalato promoveram inibição em mais de 40 % da atividade. O H_2O_2 também promoveu inibição da atividade entre aproximadamente 40 e 60%.

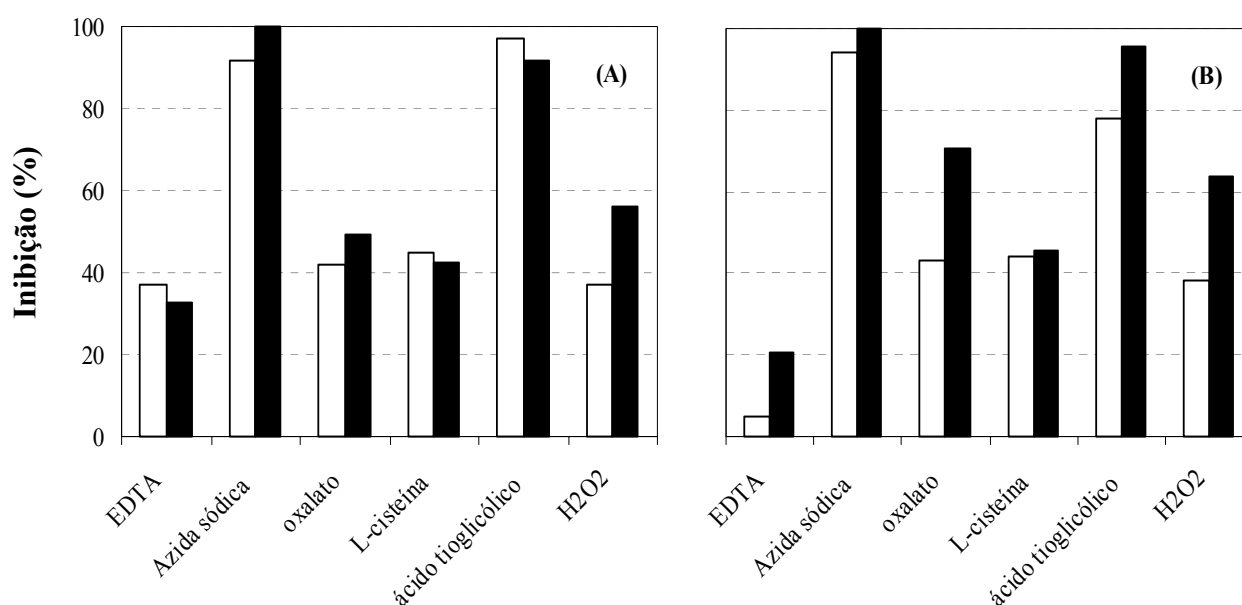


Figura 36. Inibição da atividade de lacase (%) de extratos obtidos com 12 (A) e 19 dias (B) de crescimento de *P. castanella* em solo-HCB (■) e solo-controle (□) durante oxidação do ABTS (2 mM) à 420nm. 100% de atividade correspondeu à oxidação do ABTS na ausência das substâncias avaliadas.

As atividades ligninolíticas de *P. castanella* de todos os extratos avaliados apresentaram inibição típica de lacases. Assim como observado na atividade enzimática de *P. castanella* em solo, outros estudos de inibição revelaram que o EDTA não foi um inibidor eficiente de lacases de basidiomicetos durante oxidação do ABTS (Fukushima & Kirk 1995, Heinzkill *et al.* 1998, Shin & Lee 2000, Saito *et al.* 2003, Jordaan *et al.* 2004, Niku-Paavola *et al.* 2004). Azida sódica é um inibidor de metaloenzimas, sendo considerada um dos inibidores mais eficientes da atividade de

lacases (Heinzkill *et al.* 1998, Johannes & Majcherczyk 2000, Jordaan *et al.* 2004, Niku-paavola *et al.* 2004). A ligação de NaN_3 aos sítios de cobres tipos 2 e 3 afeta a transferência interna de elétrons, inibindo a atividade de lacase (Ryan *et al.* 2003).

Cisteína e ácido tioglicólico não foram inibidores eficientes de lacase de *T. versicolor* (Johannes & Majcherczyk 2000). Jordaan *et al.* (2004) descrevem que o ácido tioglicólico exibiu uma inibição inicial na atividade de lacase durante aproximadamente 100 seg., posteriormente a atividade foi detectada novamente durante oxidação do ABTS. Os autores descrevem que esta fase lag foi devido à baixa inibição do ácido tioglicólico, que atua como quelante do oxigênio, sendo o oxigênio o aceptor final de elétrons para a reação catalisada por lacase, a sequência da reação não deveria ocorrer. Os autores concluíram que o ácido tioglicólico causou uma inibição competitiva. Da mesma forma, a inibição da atividade ligninolítica de *P. castanella* observada com ácido tioglicólico foi influenciada pelo tempo de incubação dos extratos. Foi observada recuperação da atividade durante oxidação do ABTS ao longo de 10 min., ou seja, o ácido tioglicólico foi um inibidor reversível.

O H_2O_2 pode causar inibição da atividade ligninolítica. Gill & Arora (2003) estudaram o efeito de condições de cultura na atividade de MnP. Os autores observaram que a inibição da atividade enzimática aumentou com o aumento da concentração de H_2O_2 . Tal efeito foi atribuído à formação de radicais superóxido aniônicos e de radicais hidroxilas, que podem ter sido formados pelo H_2O_2 , causando degradação da proteína.

Os extratos obtidos no presente estudo não foram purificados, assim, possivelmente, muitas substâncias como mediadores das enzimas ligninolíticas e alguns metais poderiam estar presentes nos extratos enzimáticos. Algumas lacases oxidam Mn^{2+} à Mn^{3+} , que por sua vez pode oxidar o ABTS (Schlosser & Hofer 2002). Assim, lacases presentes nos extratos de *P. castanella* poderiam estar atuando em conjunto com o Mn^{3+} durante a oxidação do ABTS. Com a adição de H_2O_2 à mistura de reação, o Mn^{3+} pode ser reduzido à Mn^{2+} (Wariishi *et al.* 1992), promovendo menores valores na oxidação do ABTS. Srebotnik & Boisson (2005) observaram que o H_2O_2 inibiu fortemente a peroxidação do ácido linolêico por lacase na presença de Mn^{2+} , mas não na ausência deste metal. Os autores argumentaram que o H_2O_2 reduz qualquer Mn^{3+} produzido por lacase/mediador à Mn^{2+} , segundo demonstra a equação: $2 \text{Mn}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{Mn}^{2+} + 2 \text{H}^+ + \text{O}_2$. Contudo, os autores sugerem que outros mecanismos de inibição pelo H_2O_2 necessitam ser compreendidos.

O efeito de metais durante a oxidação do ABTS por extratos de *P. castanella* foi avaliado com MnSO_4 , FeCl_3 , FeSO_4 e CuSO_4 , todos na concentração de 1 mM. O MnSO_4 e FeCl_3 causaram inibição parcial da atividade ligninolítica (Figura 37). No solo-controle não foi observada inibição pelo CuSO_4 , e nos extratos obtidos com 12 dias de crescimento de *P. castanella* houve estímulo da

atividade em 20%, enquanto em solo-HCB o CuSO_4 promoveu inibição da atividade (20%). O FeSO_4 foi o inibidor mais eficiente da atividade ligninolítica durante a oxidação do ABTS em todos os extratos avaliados.

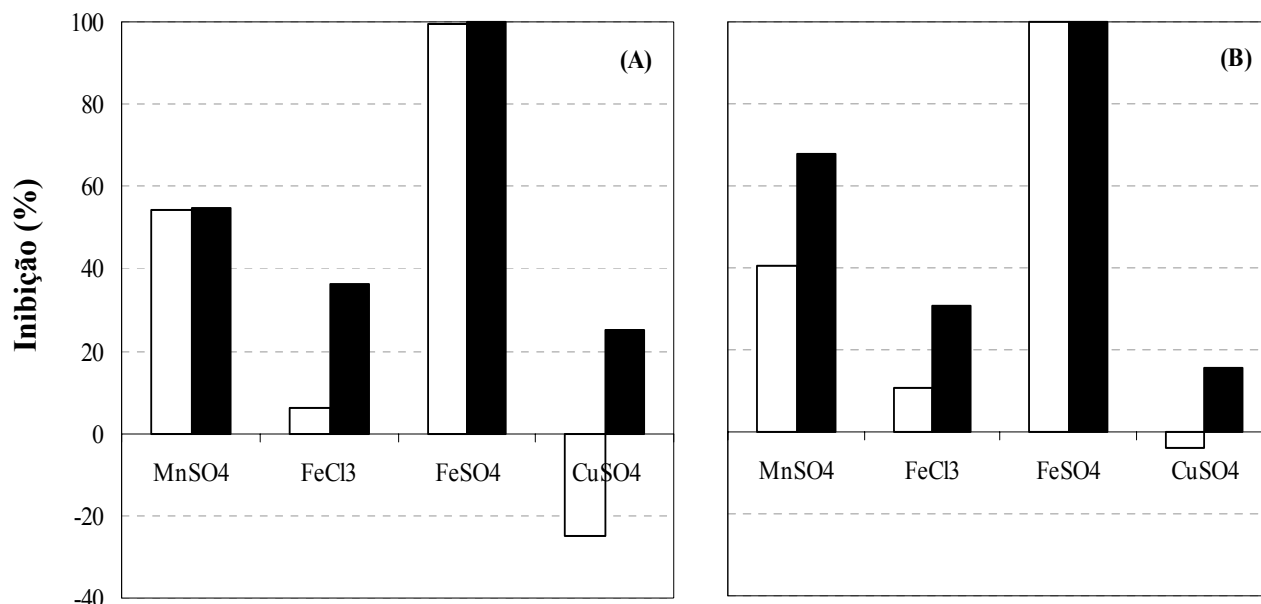


Figura 37. Efeito de metais na atividade enzimática relativa (%) de extratos obtidos com 12 (A) e 19 dias (B) de crescimento de *P. castanella* em solo-HCB (■) e solo-controle (□) durante oxidação do ABTS (2 mM) à 420nm. 100% de atividade correspondeu à oxidação do ABTS na ausência das substâncias avaliadas.

Dependendo da concentração, o CuSO_4 pode estimular a atividade *in vitro* de lacase ou causar inibição pela interação com grupos $-\text{SH}$ da enzima (De Souza & Peralta 2003, Lorenzo *et al.* 2005). Baldrian & Gabriel (2002) observaram que a adição de Cu (0,05-50 mM) ao meio de cultivo aumentou a atividade e a estabilidade de lacase produzida por *Pleurotus ostreatus*. Os autores sugeriram que o efeito tóxico de Cu na atividade da enzima causou uma indução enzimática por estresse oxidativo. 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+} . Um comportamento semelhante foi observado para lacase purificada de culturas de *Pleurotus pulmonarius* com concentrações de Cu^{2+} entre 0,1 e 1 mM (De Souza & Peralta 2003).

Os íons de Fe^{2+} e Cu^{2+} comportaram-se como inibidores das atividades de lacases de *Ceriporiopsis subvermispora*, *Lentinus edodes* e *Panus trigrinus* (Leontievskii *et al.* 1991, Kofujita *et al.* 1991, Fukushima & Kirk 1995). Baldrian & Gabriel (2002) e Baldrian (2004) descreveram

que o Mn^{2+} foi o inibidor mais eficiente da atividade de lacase do fungo *Daedalea quercina* (91% de inibição na concentração de 1 mM).

Comparando o efeito de metais e inibidores na atividade ligninolítica dos extratos obtidos nos picos de máxima atividade ligninolítica de *P. castanella* (12 dias em solo-HCB e 19 dias em solo-controle) observamos diferenças na inibição por EDTA, H_2O_2 , $MnSO_4$, $FeCl_3$ e $CuSO_4$ (Figura 38). As demais substâncias, azida sódica, oxalato, cisteína, ácido tioglicólico e $FeSO_4$ apresentaram valores de inibição muito próximos, tanto em solo-HCB quanto em solo-controle. Estes resultados sugerem que isoenzimas com diferenças na inibição podem estar sendo produzidas por *P. castanella* em solo-HCB e controle. Além disso, as isoenzimas produzidas pelo fungo em solo-HCB parecem ser mais sensíveis à ação de determinados inibidores (H_2O_2 , $MnSO_4$, $FeCl_3$ e $CuSO_4$) quando comparadas ao solo-controle.

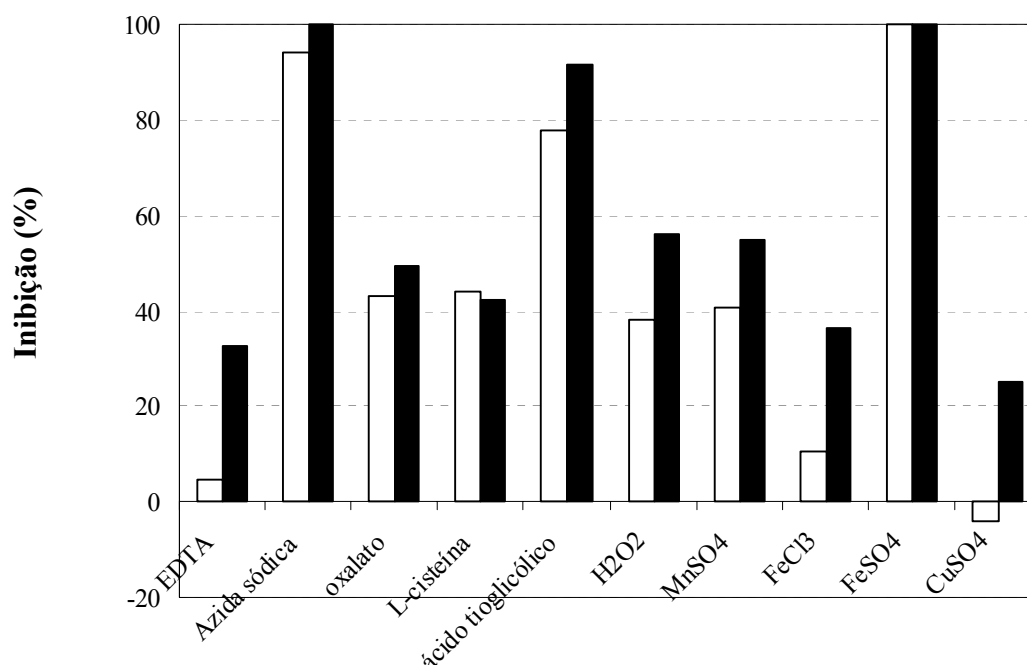


Figura 38. Efeito de inibidores e metais na atividade ligninolítica de extratos obtidos nos picos de máxima atividade ligninolítica, 12 dias de crescimento de *P. castanella* em solo-HCB (■) e 19 dias em solo-controle (□) durante oxidação do ABTS (2 mM) à 420nm. 100% de atividade correspondeu à oxidação do ABTS na ausência das substâncias avaliadas.

Os valores de K_m aparente das atividades de peroxidases e lacases dos extratos com 12 e 19 dias de crescimento de *P. castanella* em solo-HCB e controle foram obtidos pelos gráficos de duplos recíprocos (Lineweaver-Burk 1934) (Figura 39 e Figura 40). Em todos os extratos avaliados as atividades de lacases apresentaram maior afinidade ao ABTS quando comparada às atividades de peroxidases (os valores de K_m foram menores para as atividades de lacases) (Tabela 6).

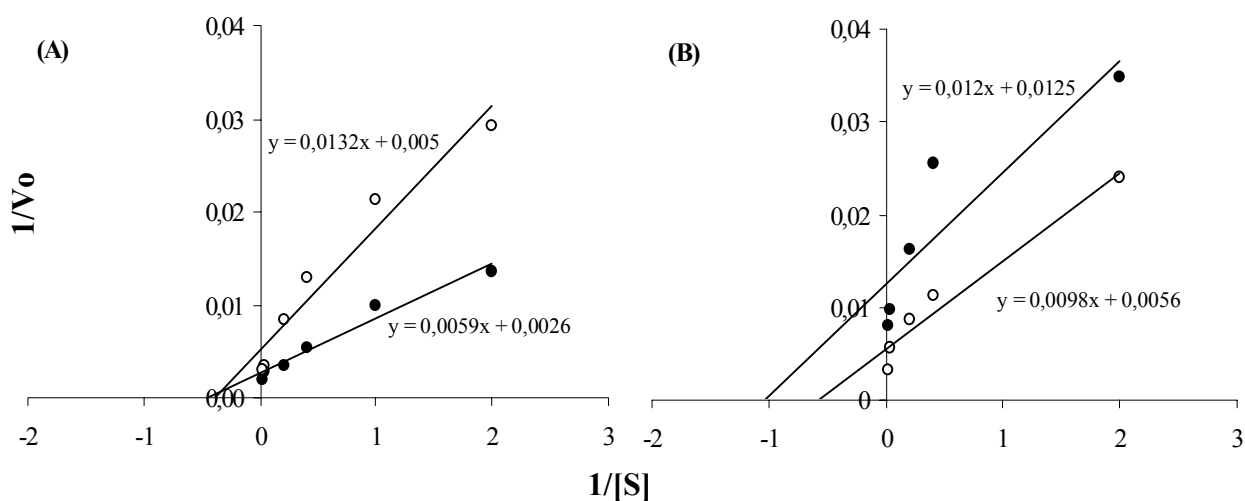


Figura 39. Gráficos de Lineweaver-Burk das atividades de peroxidases de extratos obtidos com 12 dias (A) e 19 dias (B) de crescimento de *P. castanella* em solo-HCB (●) e solo-controle (○).

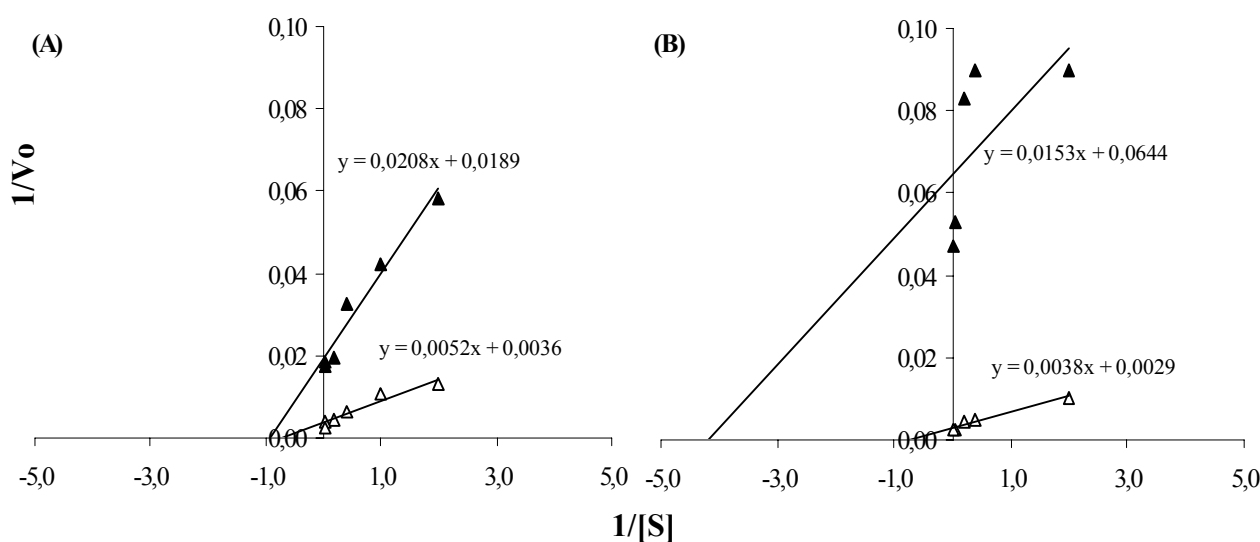


Figura 40. Gráficos de Lineweaver-Burk das atividades de lacases de extratos obtidos com 12 dias (A) e 19 dias (B) de crescimento de *P. castanella* em solo-HCB (▲) e solo-controle (△).

Tabela 6. K_m aparente (mM) das atividades de lacases e peroxidases, utilizando ABTS como substrato, de extratos obtidos do crescimento de *P. castanella* em solo-HCB e controle.

Tempo de cultivo	Atividade de lacases		Atividade de peroxidases	
	HCB	controle	HCB	controle
12 dias	1,10	1,44	2,27	2,64
19 dias	0,24	1,31	0,96	1,75

Como observado anteriormente, o H_2O_2 adicionado à mistura de reação promoveu inibição da atividade de lacase e conseqüentemente a enzima exibiu menor afinidade ao ABTS na presença de H_2O_2 . Apesar das limitações na determinação de K_m aparente de extratos enzimáticos brutos, diferenças obtidas nos valores de K_m tanto para a atividade de lacases quanto para a atividade de peroxidases, podem ser atribuídas a presença de isoenzimas com diferenças nas propriedades cinéticas. As diferenças nos valores de K_m aparente das atividades de lacases e peroxidases nos picos de máxima produção de atividade ligninolítica de culturas de *P. castanella* em solo-HCB e controle (Tabela 6, valores em negrito) podem indicar a presença de isoenzimas com diferenças nas propriedades cinéticas. Diferenças cinéticas foram observadas entre lacases purificadas de seis linhagens de *Pleurotus ostreatus* (Pickard & Duhalt 2001). Saparrat *et al.* (2002) observaram diferenças nas propriedades cinéticas entre isoenzimas de lacases de *Coriolopsis rigida*.

É bem conhecido que lacases oxidam polifenóis, diaminas e muitos outros compostos e não oxidam tirosina. Os substratos oxidados por lacases podem variar de acordo com diferenças no potencial redox existente em diferentes lacases fúngicas. A oxidação de um determinado substrato é dependente do potencial redox da enzima e do substrato (Shin & Lee 2000). O ABTS foi o substrato que apresentou maior afinidade às lacases de muitos basidiomicetos (Eggert *et al.* 1996b, Jung *et al.* 2002, Saparrat *et al.* 2002, Jordaan *et al.* 2004, Niku-paavola *et al.* 2004). O teste com ABTS continua sendo um dos melhores métodos para determinar a atividade de enzimas oxidativas. Substratos fenólicos, utilizados em muitos testes enzimáticos, podem ser oxidados por reações não-enzimáticas, além disso, apresentam uma série de outros problemas e, portanto não parecem ser adequados para estudos com lacases (Hofer & Schlosser 1999).

Lacase foi a principal atividade ligninolítica detectada em culturas de *P. castanella* em solo contaminado com HCB, contudo, diferenças observadas na estabilidade enzimática ao pH 3,6, efeito de inibidores e metais e nas propriedades cinéticas evidenciam a presença de isoenzimas. Assim, a presença do HCB no solo pode ter influenciado a produção de diferentes isoenzimas. A análise da ação de inibidores durante a oxidação do ABTS por extratos enzimáticos de *P. castanella* apontam para o predomínio de atividade de lacases. E ainda, o H_2O_2 revelou causar uma pequena inibição na atividade de lacase. Desta forma, na cinética de produção de atividades de peroxidases (Figura 23) há a atuação de lacases na presença de H_2O_2 na mistura de reação e esta cinética de atividade de peroxidases pode ser interpretada como atividade de lacases com valores subestimados pela inibição do H_2O_2 na mistura de reação.

Em geral, lacase e MnP são mais amplamente distribuídas em basidiomicetos ligninolíticos do que LiP (Pelaez *et al.* 1995). Alguns fungos carecem de uma ou mais destas enzimas ligninolíticas, sugerindo que há mais que um mecanismo envolvido na degradação da lignina e de

poluentes orgânicos. Os basidiomicetos ligninolíticos *Dichomitus squalens* e *Ceriporiopsis subvermispora* podem eficientemente degradar a lignina sem expressar LiP detectável (Périé & Gold 1991, Srebotnik *et al.* 1997). Além disso, *Pycnoporus cinnabarinus* parece ter unicamente uma destas enzimas (lacase), ainda assim degrada efetivamente lignina (Eggert *et al.* 1996a, Bermek *et al.* 1998). *Corioloopsis rigida* é um basidiomiceto ligninolítico que tem sido estudado devido à sua capacidade em degradar lignina em substratos contendo palha de trigo e frações aromáticas e alifáticas de petróleo em solo artificialmente contaminado (Colombo *et al.* 1996). *C. rigida* produziu lacase como única enzima ligninolítica (Eggert *et al.* 1996b, Saparrat *et al.* 2000, Saparrat *et al.* 2002).

Lacases produzidas por *P. castanella* em solo contaminado com HCB podem estar envolvidas na degradação deste poluente. Matheus (2003) observou que as maiores taxas de degradação de HCB em solo por *P. castanella*, nas mesmas condições utilizadas no presente estudo, ocorreram quando foi adicionada uma emulsão de óleo vegetal, contendo ácidos graxos insaturados, com Tween 20. O autor concluiu que a degradação de HCB em solo pode ter ocorrido por uma conjunção de fatores. A emulsão de óleo vegetal em Tween 20 pode ter aumentado a biodisponibilidade do HCB na solução do solo, promovendo maior crescimento fúngico e aumentando a produção de enzimas ligninolíticas, e ainda, sugeriu que estes ácidos graxos insaturados poderiam atuar como mediadores de MnP, gerando radicais altamente reativos capazes de quebrar o anel benzênico e transformá-lo até CO₂. Entretanto, no presente estudo, durante crescimento de *P. castanella* em solo contaminado com HCB, não foram observadas atividades de MnP, e sim predomínio de atividade de lacase. Portanto, a degradação de HCB em solo deve envolver principalmente a atuação de lacases produzidas por *P. castanella*. Lacase pode estar envolvida em um mecanismo de destoxificação em culturas de *P. castanella* em solo contaminado com HCB. O solo contaminado com mistura de organoclorados em concentrações elevadas, depositados na Estação de Espera, não apresenta uma distribuição homogênea de HCB e dos demais organoclorados. Possivelmente, para cada composto ocorre uma resposta diferente a destoxificação e a produção enzimática. O PCF, por exemplo, é muito mais tóxico que o HCB, embora este seja muito mais recalcitrante. Assim é esperado serem observados diferentes níveis de redução de HCB em solo em diferentes experimentos, até mesmo com as mesmas condições ambientais empregadas nos estudos. Novas pesquisas serão necessárias para esclarecer o mecanismo de atuação de lacases durante a degradação de HCB por *P. castanella* na presença de ácidos graxos insaturados.

VI. CONCLUSÕES

- A presença do HCB no solo não interferiu no crescimento de *Psilocybe castanella* CCB444;
- Lacases foram as principais enzimas ligninolíticas presentes durante crescimento de *P. castanella* em solo contaminado com HCB;
- A presença do HCB estimulou a produção de isoenzimas de lacase por *P. castanella*;
- Lacases de *P. castanella* apresentaram atividade ótima em pH ácido, próximo a 3 e elevada estabilidade na faixa de pH próximo a 4;
- Lacases de *P. castanella* foram termoestáveis a 55°C;
- A azida sódica e o FeSO_4 foram os inibidores mais eficientes das atividades de lacases de *P. castanella*;
- Não foi possível correlacionar a produção de lacases de *P. castanella* com a biodegradação de HCB em solo.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K.H., Cavaco-Paulo, A. & Gubitz G.M.** 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. Applied and Environmental Microbiology. 66: 3357-3362.
- Agostinelli, E., Cervoni, L., A. Giartosio, A. & Morpurgo, L.** 1995. Stability of Japanese-lacquer-tree (*Rhus vernicifera*) laccase to thermal and chemical denaturation: comparison with ascorbate oxidase. Biochemical Journal 306: 697-702.
- Ahn, M.Y., Dec, J., Kim, J.E. & Bollag, J.M.** 2002. Treatment of 2,4-Dichlorophenol Polluted Soil with Free and Immobilized Laccase. Journal of Environmental Quality. 31: 1509-1515.
- Aidoo, K.E.; Hendry, R.; Wood, J.B.** 1981. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. European Journal Applied Microbiol Biotechnol. Heidelberg. 12: 6-9.
- apud* Silva, R. R. 2004. Ergosterol para determinação da biomassa dos fungos *Lentinus crinitus* Berk e *Psilocybe castanella* Peck em biorremediação de solos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 108 p.
- Aiken, B.S. & Logan, B.E.** 1996. Degradation of pentachlorophenol by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown in ammonium lignosulphonate media. Biodegradation. 7: 175-182.
- Amitai, G., Adani, R., Sod-Moriah, G., Rabinovitz, I., Vincze, A. & Leader, H.** 1998. Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. FEBS Letters. 438: 195- 200.
- Andrade, J.A.** 2005. Otimização da reação de Fenton visando aplicações na remediação *in-situ* e *ex-situ* de águas subterrâneas. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 212 p.
- Andrea, M.M.** 1992. Formação e bio-liberação de resíduos ligados de [¹⁴C]-lindano e [¹⁴C]-paration em dois solos brasileiros. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 130 p.
- Andrea, M.M., Papini, S. & Nakagawa, L.E.** 2001. Optimizing Microwave-assisted Solvent Extraction of Pesticides from Soil. Journal of Environmental Science and Health. B36 (1): 87-93.
- Antorini, M., Herpoël-Gimbert, I., Choinowski, T., Sigoillot, J.C., Asther, M., Winterhalter, K. & Piontek, K.** 2002. Purification, crystallisation and X-ray diffraction study of fully functional laccases from two ligninolytic fungi. Biochimica et Biophysica Acta. 1594: 109-114.

- Baborová, P., Möder, M., Baldrian, P., Cajthamlová, K. & Cajthaml, T.** 2006. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Research in Microbiology*. 157: 248-253.
- Bailey, R.E.** 2001. Global hexachlorobenzene emissions. *Chemosphere*. 43: 167-182.
- Baldrian, P. & Gabriel, J.** 2002. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters*. 206: 69-74.
- Baldrian, P.** 2003. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 32 (1): 78-91.
- Baldrian, P.** 2004. Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. *FEMS Microbiology Ecology*. 50 (3): 245.
- Baldrian, P., Valášková, V., Merhautová, V. & Gabriel, J.** 2005. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Research in Microbiology*. 156 (5-6): 670-676.
- Ballaminut, N.** 2004. Caracterização do inóculo fúngico para processos de biorremediação de solo contaminado com organoclorados. Trabalho de conclusão de curso. Universidade do Grande ABC, Santo André, 51 p.
- Barber, J.L., Sweetman, A.J., Wijk, D.V. & Jones, K.C.** 2005. Hexachlorobenzene in the global environment: Emissions, levels, distribution, trends and processes. *Science of the Total Environment*. 349: 1-44.
- Barr, D.P. & Aust, S.D.** 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science and Technology*. 28 (2): 78-87.
- Bermek, H., Li, K. & Eriksson, K.** 1998. Laccase-less mutants of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* cannot delignify kraft pulp. *Journal of Biotechnology*. 66: 117-124.
- Blanchette, R.A.** 1995. Degradation of lignocellulose complex in wood. *Can. J. Bot.* 73: S999-S1010. *apud* Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. & Itavaara, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology* 72: 169-183.
- Boer, C.G., Obici, L., Souza, C.G.M. & Peralta, R.M.** 2004. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. *Bioresource Technology*. 94: 107-112.
- Bogan, B.W. & Lamar, R.T.** 1995. One-Electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (7): 2631-2635.
- Bogan, B.W. & Lamar, R.T.** 1996. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and Its Extracellular Ligninolytic Enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (5): 1597-1603.

- Bollag, J.M. & Leonowicz, A.** 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied and Environmental Microbiology*. 48: 849-854.
- Bollag, J.M., Chu, H.L., Rao, M.A. & Gianfreda, L.** 2003. Enzymatic Oxidative Transformation of Chlorophenol Mixtures. *Journal of Environmental Quality*. 32: 63-69.
- Bollag, J.M., Shuttleworth, K.L. & Anderson, D.H.** 1988. Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 3086-3091.
- Bonomo, R.P., Boudet, A.M., Cozzolino, R., Rizzarelli, E., Santoro, A.M. & Stergiades, R.** 1998. A comparative study of two isoforms of laccase secreted by the “white-rot” fungus *Rigidoporus lignosus*, exhibiting significant structural and functional differences. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 71: 205-211.
- Bonomo, R.P., Cennamo, G., Purrello, R., Santoro, A.M. & Zappala, R.** 2001. Comparison of three fungal laccases from *Rigidoporus lignosus* and *Pleurotus ostreatus*: correlation between conformation changes and catalytic activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 83 (1): 67-75.
- Borga, K.** 2000. Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain. *Environmental Pollution*. 113: 187-198. *apud* Toledo, H.H.B. 2002. Hexaclorobenzeno. *In*: Fernícola, N.A.G.G., Oliveira, S.S. (orgs.) *Poluentes Orgânicos Persistentes – POPs*, CRA, Salvador, 13: 479-500.
- Borghini, F., Grimalt, J.O., Sanchez-Hernandez, J.C. & Bargagli, R.** 2005. Organochlorine pollutants in soils and mosses from Victoria Land (Antarctica). *Chemosphere*. 58 (3): 271-278.
- Bourbonnais, R. & Paice, M.G.** 1988. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. *Biochemical Journal*. 255: 445-450.
- Bourbonnais, R. & Paice, M.G.** 1990. Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*. 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.
- Boyle, C.D., Kropp, B.R. & Reid, I.D.** 1992. Solubilization and mineralization of lignin by white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 3217-3224.
- Brown, J.A., Alic, M. & Gold, M.H.** 1991. Manganese Peroxidase Gene Transcription in *Phanerochaete chrysosporium*: Activation by Manganese. *Journal of Bacteriology* 173 (13): 4101-4106.
- Brown, M.A., Zhao, Z. & Mauk, A.G.** 2002. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. *Inorganica Chimica Acta*. 331: 232-238.

- Brunow, G.** 2001. Methods to reveal the structure of lignin. *In*: Hofrichter M., Steinbüchel A. (Eds.). Lignin, Humic Substances and Coal. Wiley-VCH, Alemanha, 89-116.
- Bumpus, J.A. & Aust, S.D.** 1987. Biodegradation of chlorinated organic compounds by *Phanerochaete chrysosporium*, a wood-rotting fungus. *In*: Exner, J.H. (Ed.). Solvent Hazardous waste problems: learning from dioxins. Washington DC: American Chemistry Society, 340-349.
- Bumpus, J.A.** 1989. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology. 55: 154-158.
- Bumpus, J.A.** 1993. White-Rot Fungi and Their Potential Use in Soil Bioremediation Process. *In*: Soil Biochemistry. Bollag, J.M. & Statzkin, G. (Eds.). New York. Marcel Dekker Inc, 65-100.
- Bustnes, J.O., Miland, O., Fjeld, M., Erikstad, K.E. & Skaare, J.U.** 2005. Relationships between ecological variables and four organochlorine pollutants in an arctic glaucous gull (*Larus hyperboreus*) population. Environmental Pollution. 136 (1): 175-185.
- Call, H.P. & Mucke, I.** 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®- process). Journal of Biotechnology. 53: 163-202.
- Camarero, S., Ruiz-Duenas, F.J., Sarkar, S., Martinez, M.J. & Martinez, A.T.** 2000. The cloning of a new peroxidase found in lignocellulose cultures of *Pleurotus eryngii* and sequence comparison with other fungal peroxidases. FEMS Microbiology Letters. 191: 37-43.
- Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Duenas, F.J., Martinez, M.J. & Martinez, A.T.** 1999. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. Journal of Biological Chemistry. 274: 10324-10330.
- 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.
- Cantarella, G., Galli, C. & Gentili, P.** 2003. Free radical *versus* electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems: Catalytic or stoichiometric procedures. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 22: 135-144.
- Caramelo, L., Martínez, M.J. & Martínez, A.T.** 1999. A Search for Ligninolytic Peroxidases in the Fungus *Pleurotus eryngii* Involving α -Keto- γ -Thiomethylbutyric Acid and Lignin Model Dimers. Applied and Environmental Microbiology. 65 (3): 916-922.
- Carrizalez, V., Rodriguez, H. & Sardina, I.** 1981. Determination of the specific growth of molds on semi-solid cultures. Biotechnology and Bioengineering. 23: 321-333. *apud* Silva, R. R.

2004. Ergosterol para determinação da biomassa dos fungos *Lentinus crinitus* Berk e *Psilocybe castanella* Peck em biorremediação de solos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 108 p.
- Castillo, M.P., Stenstrom, J. & Ander, P.** 1994. Determination of manganese peroxidase activity with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone and 3-(dimethylamino)benzoic acid. *Analytical Biochemistry* 218: 399-404.
- Chaudhry, G.R. & Chapalamadugu, S.** 1991. Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiology Review*. 55 (1): 59-79.
- Chefetz, B., Chen, Y. & Hadar, Y.** 1998. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3175-3179.
- Chivukula, M., Spadaro, J.T. & Renganathan, V.** 1995. Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. *Biochemistry*. 34: 7765-7772.
- Claus, H.** 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*. 35: 93-96.
- 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.
- Collins, P., Dobson, A.D.W. & Field, J.A.** 1998. Reduction of the 2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) Cation Radical by Physiological Organic Acids in the Absence and Presence of Manganese. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (6): 2026-2031.
- Collins, P.J., Kotterman, M.J.J., Field, J.A. & Dobson, A.D.W.** 1996. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor* 290. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 4563-4567.
- Colombo, J.C., Cabello, M.N. & Arambarri, A.M.** 1996. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure culture of imperfect and ligninolytic fungi. *Environmental Pollution*. 94: 355-362.
- CONASQ – Comissão Nacional de Segurança Química.** 2003. Perfil Nacional da Gestão de Substâncias Químicas. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 280 p.
- D' Souza, T.M., Merritt, C.S. & Reddy, C.A.** 1999. Lignin-Modifying Enzymes of the White Rot Basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (12): 5307-5313.
- d'Acunzo, F., Galli, C. & Masci, B.** 2002. Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems Solubility and steric issues. *European Journal of Biochemistry*. 269: 5330-5335.

- Davila-Vazquez, G., Tinoco, R., Pickard, M.A. & Vazquez-Duhalt, R.** 2005. Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. Enzyme and Microbial Technology. 36: 223-231.
- 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 Basic Microbiology. 43: 278-286.
- De Vries, M.H., Kooistra, W.H.C.F. & Wessels, J.G.H.** 1986. Formation of an extracellular laccase by *Schizophyllum commune* dikaryon. Journal of Gen. Microbiology. 132: 2817-2826.
- Dec, J. & Bollag, J.-M.** 1994. Dehalogenation of chlorinated phenols during oxidative coupling. Environmental Science of Technology. 28: 484-490.
- Desgranges, C., Vergoignan, C., Georges, M. & Durand, A.** 1991. Biomass estimation in solid state fermentation. Applied Microbiology & Biotechnology. 35: 200-205. *apud* Silva, R. R. 2004. Ergosterol para determinação da biomassa dos fungos *Lentinus crinitus* Berk e *Psilocybe castanella* Peck em biorremediação de solos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 108p.
- Dodor, D.E., Hwang, H.M. & Ekunwe, S.I.N.** 2004. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. Enzyme and Microbial Technology. 35: 210-217.
- 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 Crystallogr. 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. 596p.
- 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. 31 (7): 907-931.
- Eash, N.S., Stahl, P.D., Parkin, T.B. & Karlen, D.L.** 1996. A simplified method for extraction of ergosterol from soil. Soil Science Society of America Journal. 60: 468-471. *apud* Silva, R. R. 2004. Ergosterol para determinação da biomassa dos fungos *Lentinus crinitus* Berk e *Psilocybe castanella* Peck em biorremediação de solos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 108p.

- Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D. & Eriksson, K.E.L.** 1996a. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters*. 391: 144-148.
- Eggert, C., Temp, U. & Eriksson, K.E.L.** 1996b. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 1151-1158.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D. & Eriksson, K.L.** 1995. Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid. *FEBS Letters*. 376: 202-206.
- Enguita, F.J., Martins, L.O., Henriques, A.O. & Carrondo, M.A.** 2003. Crystal Structure of a Bacterial Endospore Coat Component. A Laccase with enhanced thermostability properties. *The Journal of Biological Chemistry*. 278 (21): 19416-19425.
- Evans, C.S., Dutton, M.V., Guillen, F. & Veness, R.G.** 1994. Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiology*. 13: 235-240.
- Ezendam, J., Staedtler, F., Pennings, J., Vandebriel, R.J., Pieters, R., Harleman, J.H. & Vos, J.G.** 2004. Toxicogenomics of Subchronic Hexachlorobenzene Exposure in Brown Norway Rats. *Environmental Health Perspectives Toxicogenomics*. 112 (7).
- 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.
- Fathepure, B.Z. & Vogel, T.M.** 1991. Complete degradation of polychlorinated hydrocarbons by two-stage biofilm reactor. *Applied and Environmental Microbiology*. 57 (12): 3418-3422.
- Fathepure, B.Z., Tiedje, J.M. & Boyd, S.A.** 1988. Reductive dechlorination of hexachlorobenzene to tri- and dichlorobenzene in anaerobic sewage sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. 54 (2): 327-330.
- Fichter, A.** 1993. Function and synthesis of enzymes involves in lignin degradation. *Journal of Biotechnology*. 30: 49-55.
- Fragoeiro, S. & Magan, N.** 2005. Enzymatic activity, osmotic stress and degradation of pesticide mixtures in soil extract liquid broth inoculated with *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *Environmental Microbiology*. 7 (3): 348.
- Fukushima, Y. & Kirk, T.K.** 1995. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (3): 872-876.
- Gallaup, 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.

- Galkin, S., Vares, T., Kalsi, M. & Hatakka, A.** 1998. Production of organic acids by different white-rot fungi as detected using capillary zone electrophoresis. *Biotechnology and Technology*. 12: 267-271.
- Galliano, H., Gas, G., Seris, J.L. & Boudet, A.M.** 1991. Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase. *Enzyme and Microbial Technology*. 13: 478-482.
- Gianfreda, L. & Bollag, J.M.** 1994. Effect of soils on the behavior of immobilized enzymes. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 58: 1672-1681.
- Giese, E.C., Covizzi, L.G., Dekker, R.F.H. & Barbosa, A.M.** 2004. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 26 (4): 463-470.
- Gill, K. & Arora, S.** 2003. Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30(1): 28-33.
- Glumoff, T.** 1990. Lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *European Journal of Biochemistry*. 187: 515-520.
- Gobas, F.A.P.C., Bedard, D.C., Ciborowski, J.J.H. & Haffner, G.D.** 1989. Bioaccumulation of chlorinated hydrocarbons by mayfly (*Hexagenia limbata*) in Lake St. Clair. *J. Great Lakes Res.* 15: 581-588. *apud* Toledo, H.H.B. 2002. Hexaclorobenzeno. *In*: Fernícola, N.A.G.G., Oliveira, S.S. (orgs.) *Poluentes Orgânicos Persistentes – POPs, CRA, Salvador*, 13: 479-500.
- Gold, M.H. & Alic, M.** 1993. Molecular Biology of the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological Reviews*. 57 (3) 605-622.
- Gonzales, L., Hernández, J.R., Perestelo, F., Carnicero, A. & Falcón, M.A.** 2002. Relationship between mineralization of synthetic lignins and the generation of hydroxyl radicals by laccase and a low molecular weight substance produced by *Petriellidium fusoideum*. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 474-481.
- Gugliotta, A.M. & Capelari, M.** 1998. Taxonomia de basidiomicetos. *In*: Bononi, V.L.R. (Org.). *Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*, Institutuo de Botânica, São Paulo, 184 p.
- Gugliotta, A.M.** 2001. Utilização de basidiomicetos nativos na remoção de corantes em efluentes na indústria têxtil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 115 p.
- Guillen, F., Martinez, M.J., Munoz, C. & Martinez, A.T.** 1997. Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production of superoxide anion radical. *of Biochemistry and Biophysics*. 339: 190-199.

- Guillen, F., Munoz, C., Mez-Toribio, V.G., Martinez, A.T. & Martinez, M.J.** 2000. Oxygen Activation during Oxidation of Methoxyhydroquinones by Laccase from *Pleurotus eryngii*. Applied and Environmental Microbiology. 66 (1): 170-175.
- Gutierrez, A., Del Rio, J.C., Rencoret, J., Ibarra, D. & Martinez, A.T.** 2006. Main lipophilic extractives in different paper pulp types can be removed using the laccase-mediator system. Applied Microbiology and Biotechnology. *In Press*.
- Hammel, K.E.** 1996. Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungi. New Journal of Chemistry. 20: 195-198.
- 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.
- Harazono, K. & Nakamura, K.** 2005. Decolorization of mixtures of different reactive textile dyes by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete sordida* and inhibitory effect of polyvinyl alcohol. Chemosphere 59: 63-68.
- Harper, H.A., Rodwell, V.W. & Mayes, P.A.** 1982. Manual de Química Fisiológica. 5 ed. 736 p.
- Hatakka, A.** 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. FEMS Microbiology Reviews. 13: 125-135.
- Hatvani, N. & Mécs, I.** 2003. Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of *Lentinula edodes*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 55 (2): 199-203.
- Heinfling, A., Martínez, M.J., Martínez, 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.
- Heinzkill, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P. & Anke, T.** 1998. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (Family Coprinaceae). Applied and Environmental Microbiology. 64 (5): 1601-1606.
- Higuchi, T.** 2004. Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. Pro. Jpn. Acad. Ser B (80): 204-214.
- Hofer, C. & Schlosser, D.** 1999. Novel enzymatic oxidation of Mn^{2+} to Mn^{3+} catalyzed by a fungal laccase. FEBS Letters. 451: 186-190.
- Hoff, T., Liu, S.Y. & Bollag, J.M.** 1985. Transformation of Halogen-, Alkyl-, and Alkoxy-Substituted Anilines by a Laccase of *Trametes versicolor*. Applied and Environmental Microbiology. 49 (5): 1040-1045.
- Hofrichter M.** 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). Enzyme and Microbial Technology. 30: 454-466.

- Hofrichter, M., Vares, T., Kalsi, M., Galkin, S., Scheibner, K., Fritsche, W. & Hatakka, A.** 1999. Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ^{14}C -labelled lignin (^{14}C -DHP) during solidstate fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 1864-1870.
- Hofrichter, M., Vares, T., Scheibner, K., Galkin, S., Sipila, J. & Hatakka, A.** 1998. Mineralization and solubilization of synthetic lignin (DHP) by manganese peroxidases from *Nematoloma frowardii* and *Phlebia radiata*. *Journal of Biotechnology*. 67: 217-228.
- Hoshino, F., Kajino, T., Sugiyama, H., Asami, O. & Takahashi, H.** 2002. Thermally stable and hydrogen peroxide tolerant manganese peroxidase (MnP) from *Lenzites betulinus*. *FEBS Letters*. 530: 249-252.
- Hublik, G. & Schinner, F.** 2000. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology*. 27: 330-336.
- 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.
- Jeffries, T.W.** 1994. Biodegradation of lignin and hemicelluloses *In*: Ratledge, C. (Ed.). *Biochemistry of Microbial Degradation*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 590 p.
- Jensen, K.A., Ryan, Z.C., Wymelenberg, A.V., Cullen, D. & Hammel, K.E.** 2002. An NADH:Quinone Oxidoreductase Active during Biodegradation by the Brown-Rot Basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (6): 2699-2703.
- 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.
- Johjima, T., Itoh, N., Kabuto, M., Tokimura, F., Nakagawa, T., Wariishi, H. & Tanaka, H.** 1999. Direct interaction of lignin and lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry*. 96: 1989-1994.
- Jonsson, C.M.** 2005. Fosfatase ácida da microalga *Selenastrum capricornutum*: extração, caracterização e efeito de poluentes de origem agrícola. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 117 p.

- 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., Xu, F. & Li, K.** 2002. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 161-168.
- Kahraman, S.S. & Gurdal, I.H.** 2002. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. *Bioresource Technology*. 82: 215-217.
- Kapich, A., Hofrichter, M., Vares, T. & Hatakka, A.** 1999. Coupling of manganese peroxidase-mediated lipid peroxidation with destruction of nonphenolic lignin model compounds and ¹⁴C-labeled lignins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 259: 212-219.
- Kapich, A.N., Prior, B.A., Lundell, T. & Hatakka, A.** 2005. A rapid method to quantify pro-oxidant activity in cultures of wood-decaying white-rot fungi. *Journal of Microbiological Methods*. 61: 261-271.
- Kastner, M., Streibich, S., Beyrer, M., Richnow, H.H. & Fritsche, W.** 1999. Formation of bound residues during microbial degradation of [¹⁴C] anthracene in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 1834-1842.
- Kersten, P.J. & Kirk, K.** 1987. Involvement of a New Enzyme, Glyoxal Oxidase, in Extracellular H₂O₂ Production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*. 169 (5): 2195-2201.
- Keum, Y.S. & Li, Q.X.** 2004. Copper dissociation as a mechanism of fungal laccase denaturation by humic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 588-592.
- Kiehl, E.J.** 1985. Fertilizantes orgânicos. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres. 492 p.
- Kirk, T.K. & Farrel, R.L.** 1987. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*. 41: 465-505.
- Kirk, T.K. & Shimada, M.** 1985. Lignin biodegradation: The microorganisms involved and the physiology and biochemistry of degradation by white-rot fungi. *In*: Higuchi, T. (Ed.). Biosynthesis and biodegradation of wood components. San Diego: Academic Press, 21: 579-605.
- Kirk, T.K., Schultz, E., Connors, W.J., Lorenz, L.F. & Zeikus, J.G.** 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology*. 117: 277-285.
- Klonowska, A., Gaudin, C., Fournel, A., Asso, M., Petit, J.L., Giorgi, M. & Tron, T.** 2002. Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30. *European Journal of Biochemistry*. 269: 6119-6125.

- Koeman, J.H., Tem Noever, D.E., Brauw, M.C. & De Vos, R.H.** 1969. Chlorinated biphenyls in fish, mussels and birds from the river Rhine and the Netherlands coastal area. *Nature*. 221: 1126-1128.
- Kofujita, H., Ohta, T., Asada, Y. & Kuwahara, M.** 1991. Purification and characterization of laccase from *Lentinus edodes*. *Mokuzai Gakkaishi*. 37: 562-569.
- Kollmann, A., Boyer, F.D., Ducrot, P.H., Kerhoas, L., Jolival, C., Touton, I., Einhorn, J. & Mougin, C.** 2005. Oligomeric compounds formed from 2,5-xylydine (2,5-dimethylaniline) are potent enhancers of laccase production in *Trametes versicolor* ATCC 32745. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68: 251-258.
- Kondo, R., Harazono, K., Tsuchikawa, K. & Sakai, K. R.** 1996. Biological bleaching of kraft pulp with lignin degrading enzymes. *American Chemical Society*. 228-239.
- Koroleva, O.V., Stepanova, E.V., Binukov, V.I., Timofeev, V.P. & Pfeil, W.** 2001. Temperature-induced changes in copper centers and protein conformation of two fungal laccases from *Coriolus hirsutus* and *Coriolus zonatus*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1547: 397-407.
- Koroleva-Skorobogatko, O.V., Stepanova, E.V., Gavrilova, V.P., Biniukov, V.I., Jaropolov, A.I., Varfolomeyev, S.D., Scheller, F., Makower, A. & Otto, A.** 1999. Laccase of *Coriolus zonatus*: I. Isolation, purification and some physicochemical properties. *Applied Biochemistry and Biotechnology A* 76: 115-118.
- Kumar, S.V.S., Phale, P.S., Durani, S. & Wangikar, P.P.** 2003. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology Bioengineering*. 83, 386–394.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A.** 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*. 169: 247-250.
- Labunska, I., Stringer, R., Santillo, D. & Stephenson, A.** 1999. [15 de fevereiro de 2006]. Identificação e significado ambiental de poluentes orgânicos e metais pesados encontrados as amostras relacionadas com a Rhodia S.A., Cubatão e São Vicente, Brasil, 1998. Laboratório de Pesquisas do Greenpeace, Universidade de Exeter, Reino Unido. [http://www.greenpeace.org.br/toxicos/pdf/relatorio_rhodia_1999.pdf?PHPSESSID=5e38a8a5a04950158f517192e21d17ca].
- Larrondo, L.F., Salas, L., Melo, F., Vicuña, R. & Cullen, D.** 2003. A Novel Extracellular Multicopper Oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with Ferroxidase Activity. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (10): 6257–6263.
- Leatham, G.F. & Kirk, T.K.** 1983. Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. *FEMS Microbiology Letters*. 16: 65-67.

- Leatham, G.F.** 1986. The ligninolytic activities of *Lentinus edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Microbiology and Biotechnology. 24: 51-58.
- Lechner, B.E. & Papinutti, V.L.** 2006. Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw. Process Biochemistry. 41: 594-598.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N.S., Hofrichter, M. & Rogalski, J.** 1999. Biodegradation of lignin by white-rot fungi. Fungal Genetics and Biology. 27: 175-185.
- Leontievskii, L.A., Myasoedova, N.M., Maltseva, O.V., Terkhitarova, N.G., Krupryanko, V.S., Golovleva, L.A.** 1991. Mn-dependent peroxidase and oxidase of *Panus tigrinus* 8/18: purification and properties. Biochem. (Biokhimiya). 55: 1375-1380.
- Leontievsky, A., Myasoedova, N., Baskunov, B., Golovleva, L., Bucke, C. & Evans, C.** 2001. Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by free and immobilized fungal laccase. Applied Microbiology and Biotechnology. 57: 85-91.
- Leontievsky, A.A., Vares, T., Lankinen, P., Shergill, J.K., Pozdnyakova, N.N., Myasoedova, N.M., Golovleva, L.A., Cammack, R., Thurston, C.F. & Hatakka, A.** 1997. Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. FEMS Microbiology Letters. 156: 9-14.
- 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 (6): 2654-2660.
- Lin, J.E., Wang, H.Y. & Hickey, R.F.** 1990. Degradation kinetics of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnology Bioengineering. 35: 1125-1134.
- Lineweaver & Burk.** 1934. The determination of enzyme dissociation constants. Journal of American Chemistry Society. 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. & Sanroman, M.A.** 2005. Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds. Chemosphere. 60 (8): 1124-1128.
- Luterek, J., Gianfreda, L., Wojtas-Wasilewska, M., Rogalski, J., Jastek, M. & Malarczzyk, E.** 1997. Screening of the wood-rotting fungi for laccase production: Induction by ferulic acid, partial purification, and immobilization of laccase from the high laccase-producing strain. *Cerrana unicolor*. Acta Microbiologica Polonica. 46: 297-311.

- Machado, K.M.G.** 1998. Biodegradação de pentaclofenol por fungos basidiomicetos lignocelulolíticos em solo contaminado com resíduos industriais. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 172 p.
- Machado, K.M.G., Matheus, D.R. & Bononi, V.L.R.** 2005a. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21: 297-310.
- Machado, K.M.G., Matheus, D.R. & Bononi, V.L.R.** 2005b. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36:246-252.
- Machado, K.M.G., Matheus, D.R., Fabris, C. & Bononi, V.L.R.** 1996. Efeito da adição de substrato lignocelulósico no crescimento de fungos basidiomicetos em solo com baixo teor de matéria orgânica. *In: Workshop sobre biodegradação, 1., Anais...* Campinas: Embrapa. p. 240.
- Majcherczyk, A., Johannes, C. & Huttermann, A.** 1999. Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51: 267-276.
- Makela, M., Galkin, S., Hatakka, A. & Lundell, T.** 2002. Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 542-549.
- Maltseva, O.V., Niku-Paavola, M.L., Leontievsky, A.A, Myasoedova, N.M. & Golovleva, L.A.** 1991. Ligninolytic enzymes of the white rot fungus *Panus tigrinus*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 13: 291-302.
- Martínez, A.T.** 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 425-444.
- Matheus, D.R., Bononi, V.L.R., Machado, K.M.G., Silva, R.R. & Rodrigues, T.A.** 2003. Growing basidiomycetes in bioreactors to be applied to bioremediation of HCB in soil. Proceedings of the Seventh International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. *In: Magar, V.S. & Kelley, M.E. (Eds.). In Situ and On-Site Bioremediation*, Battelle Press, Columbus, p. G-05.
- Matheus, D.R. & Machado, K.M.G.** 2002. Biorremediação: potencial de aplicação para os POPs. *In: Fernícola, N.A.G.G., Oliveira, S.S. (Orgs.). Poluentes Orgânicos Persistentes – POPs*, CRA, Salvador, 13: 479-500.
- Matheus, D.R.** 1998. Biorremediação de solos contaminados com compostos organoclorados e biodegradação de hexaclorobenzeno por basidiomicetos brasileiros. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 166 p.

- Matheus, D.R.** 2003. Otimização da biodegradação de hexaclorobenzeno por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 130 p.
- Matheus, D.R., Bononi, V.L.R. & Machado, K.M.G.** 2001. New basidiomycetes on bioremediation of organochlorine contaminated soil, p. 99-106. *In: Glenn, V.S.M., Ong, J.S.K. & Leeson, A. (Eds.). Bioremediation of Energetics, Phenolics, and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.* San Diego, Battelle Press, 3v, pp. 99-106.
- Matheus, D.R., Machado, K.M.G., Capelari, M., Fulgaro, M.H. & Bononi, V.L.R.** 1997. Atividade ligninolítica (AL) de linhagens de *Trametes villosa* (CCB 176 e CCB 213) em solos contaminados com organoclorados. *In: Anais do XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Rio de Janeiro, p. 254.*
- 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 and Biotechnology.* 16: 415-421.
- Mayer, A.M. & Staples, R.C.** 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry.* 60 (6): 551-565.
- Mesquita, A.S.** 1995. Resíduos tóxicos industriais organoclorados em Samaritá: um problema. *apud Toledo, H.H.B.* 2002. Hexaclorobenzeno. *In: Fernícola, N.A.G.G., Oliveira, S.S. (Orgs.) Poluentes Orgânicos Persistentes – POPs, CRA, Salvador, 13: 479-500.*
- Meteorological Synthesizing Centre – East.** 2004. [11 de janeiro de 2006]. Emission of hexachlorobenzene (HCB). [http://www.msceast.org/pops/emission_hcb.html].
- Mielgo, I., López, C., Moreira, M.T., Feijoo, G. & Lema, J.M.** 2003. Oxidative Degradation of Azo Dyes by Manganese Peroxidase under Optimized Conditions. *Biotechnology Progress* 19: 325-331.
- Min, K.L., Kim, Y.H., Kim, Y.W., Jung, H.S. & Hah, Y.C.** 2001. Characterization of a Novel Laccase Produced by the Wood-Rotting Fungus *Phellinus ribis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 392 (2): 279-286.
- Minussi, R.C., Pastore, G.M. & Duran, N.** 2005. Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent. *Bioresource Technology. In Press.*
- Moen, M.A. & Hammel, K.E.** 1994. Lipid Peroxidation by the Manganese Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* Is the Basis for Phenanthrene Oxidation by the Intact Fungus. *Applied and Environmental Microbiology.* 60 (6): 1956-1961.
- 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.

- Moreira, P.R., Almeida-Vara, E., Sena-Martins, G., Polonia, I., Malcata, F.X. & Duarte, J.C.** 2001. Decolourisation of Remazol Brilliant Blue R via a novel *Bjerkandera* sp. strain. *Journal of Biotechnology*. 89: 107-111.
- Moreira, P.R., Dues, C., Dehareng, D., Antunes, A., Almeida-Vara, E., Frère, 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.
- Moreira, S.L., Matheus, D.R. & Machado, K.M.G.** 2006. Influence of pH on the growth and production of the ligninolytic system of tropical basidiomycetes. *Brazilian Archives of Biology and Technology. In Press*.
- Moroshi, N.** 1991. Laccases from the ligninolytic fungus *Coriolus versicolor*. *American Chem. Soc. Symp. Ser.* 460: 204-207.
- Mougin, C., Jolivalt, C., Briozzo, P. & Madzak, C.** 2003. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. *Environmental Chemistry Letters*. 1: 145-148.
- Nascimento, N.R.do, Nicola, S.M.C., Rezende, M.O.O., Oliveira, T.A. & Öberg, G.** 2004. Pollution by hexachlorobenzene and pentachlorophenol in the coastal plain of São Paulo state, Brazil. *Geoderma*. 121 (3-4): 221-232.
- Niku Paavola, M.L., Karhunen, E., Salola, P. & Raunio, V.** 1988. Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Biochemical Journal*. 254: 877-884.
- 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., Erbanova, P., Šásek, V., Kubatova, A., Cajthaml, T., Lang, E., Krah, J. & Zdražil, F.** 1999. Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. *Biodegradation*. 10: 159-168.
- Novotny, C., Erbanova, P., Cajthaml, T., Rothschild, N., Dosoretz, C. & Šásek, V.** 2000. *Irpex lacteus*, a white rot fungus applicable to water and soil bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 54: 850-853.
- Novotny, C., Svobodová, K., Erbanová, P., Cajthaml, T., Kasinath, A., Lang, E., Sasek, V.** 2004. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology & Biochemistry*. 36: 1545-1551.
- Oliver, B.G., Charlton, M.N. & Durham, R.W.** 1989. Distribution, redistribution, and geochronology of polychlorinated biphenyl congeners and others chlorinated hydrocarbons in Lake Ontario sediments. *Environ. Sci. Technol.* 23: 200-208. *apud* Toledo, H.H.B. 2002. Hexaclorobenzeno. *In: Fernícola, N.A.G.G., Oliveira, S.S. (orgs.) Poluentes Orgânicos Persistentes – POPs, CRA, Salvador*, 13: 479-500.

- Ollikka, P., Alhonmäki, K., Leppänen, V.M., Glumoff, T., Raijola, 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.
- Önnerud, H., Zhang, L., Gellerstedt, G. & Henriksson, G.** 2002. Polymerization of Monolignols by Redox Shuttle-Mediated Enzymatic
- Pacyna *et al.*** 1999 Environmental cycling of selected persistent organic pollutants (POPs) in the Baltic region. Technical Report of Environmental and climate research programme (No. ENV4-CT96-0214). *apud* Bailey, R.E. 2001. Global hexachlorobezene emissions. *Chemosphere*. 43: 167-182.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B. & Sannia, G.** 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 920-924.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A. & Sannia, G.** 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry*. 272 (50): 31301-31307.
- Papinutti, V.L., Diorio, L.A. & Forchiassin, F.** 2001. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30: 157-160.
- Pazarlıoğlu, N.K., Sariisik, M. & Telefoncu, A.** 2005. Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. *Process Biochemistry*. 40: 1673-1678.
- Pelaez, F., Martinez, M.J., Martinez, A.T.** 1995. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycological Research*. 99: 37-42.
- Péridé, F.H. & Gold, M.H.** 1991. Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 2240-2245.
- Pickard, T. & Duhalt, V.** 2001. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology*. 32 (5): 331.
- Pozdnyakova, N.N., Rodakiewicz-Nowak, J. & Turkovskaya, O.V.** 2004. Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 30: 19-24.
- Rabinovich, M.L., Bolobova, A.V. & Vasilchenko, L.G.** 2004. Fungal Decomposition of Natural Aromatic Structures and Xenobiotics: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 40 (1): 1-17.

- Ragusa, S., Cambria, M.T., Pierfederici, F., Scire, A., Bertoli, E., Tanfani, F. & Cambria, A.** 2002. Structure–activity relationship on fungal laccase from *Rigidoporus lignosus*: a Fourier-transform infrared spectroscopic study. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1601: 155-162.
- Rajakumar, S., Gaskell, J., Cullen, D., Lobos, S., Karahanian, E. & Vicuna, R.** 1996. liP-like genes in *Phanerochaete sordida* and *Ceriporiopsis subvermispora*, white rot fungi with no detectable lignin peroxidase activity. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 2660-2663.
- Randi, A.S., Cocca, C., Carbone, V., Nunez, M., Croci, M., Gutierrez, A., Bergoc, R. & Pisarev, D.L.K.** 2006. Hexachlorobenzene is a tumor co-carcinogen and induces alterations in insulin-growth factors signaling pathway in the rat mammary gland. *Toxicological Sciences*. 89 (1): 83-92.
- Reddy, C.A.** 1993. An overview of the recent advances on the physiology and molecular biology of lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*. 30: 91-107.
- Rodríguez E, Pickard, M.A. & Vazquez-Duhalt, R.** 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology*. 38: 27-32.
- Rodríguez, E., Nuero, O., Guillén, F., Martínez, A.T. & Martinez, 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., Novotný, C., Šašek, V. & Dosoretz, C.G.** 2002. Ligninolytic enzymes of the fungus *Irpex lacteus* (Polyporus tulipiferae): isolation and characterization of lignin peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology*. 31: 627-633.
- Ruttimann, C., Schwember, E., Salas, L., Cullen, D. & Vicuna, R.** 1992. Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycetes *Phlebia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 16: 64-76.
- Ryan, S., Schnitzhofer, W., Tzanov, 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., Hong, P., Kato, K., Okazaki, M., Inagaki, H., Maeda, S. & Yokogawa, Y.** 2003. Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (family Chaetomiaceae) isolated from soil. *Enzyme and Microbial Technology*. 33: 520–526.
- Salas, C., Lobos, S., Larrain, J., Salas, L., Cullen, D. & Vicuña, R.** 1995. Properties of laccase isoenzymes produced by the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 21: 323-333.

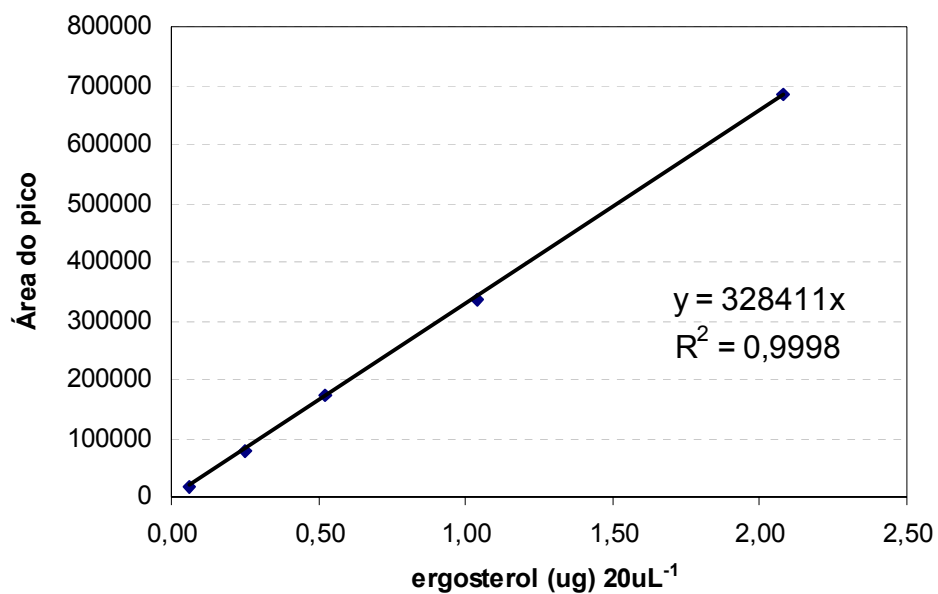
- Saparrat, M.C.N., Bucsinszky, A.M.M., Tournier, H.A., Cabello, M.N. & Arambarri, A.M.** 2000. Extracellular ABTS-oxidizing activity of autochthonous fungal strains from Argentina in solid medium. *Revista Iberoamericana e Micologia*. 17: 64-68.
- Saparrat, M., Guillén, F., Arambarri, A.M., Martinez, A.T. & Martinez, M.J.** 2002. Induction, Isolation, and Characterization of Two Laccases from the White Rot Basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (4): 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 (7): 3514-3521.
- Schlosser, D., Grey, R. & Fritsche, W.** 1997. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 47: 412-418.
- Schneider, P., Caspersen, M.B., Mondorf, K., Halkier, T., Skov, L.K. & Ostergaard, P.R.** 1999. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. *Enzyme Microbial Technology*. 25: 502-528.
- Schultz, A., Jonas, U., Hammer, E. & Schauer, F.** 2001. Dehalogenation of Chlorinated Hydroxybiphenyls by Fungal Laccase. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (9): 4377-4381.
- Shan, 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 (1): 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. & Yaropolov, A.** 2004. Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. *Biochimie*. 86: 693-703.
- Shumakovich, G.P., Shleev, S.V., Morozova, O.V., Khohlov, P.S., Gazaryan, I.G. & Yaropolov, A.I.** 2006. Electrochemistry and kinetics of fungal laccase mediators. *Bioelectrochemistry*. *In Press*.
- Silva, R. R.** 2004. Ergosterol para determinação da biomassa dos fungos *Lentinus crinitus* Berk e *Psilocybe castanella* Peck em biorremediação de solos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 108 p.

- Soares, C.F. & Machado, K.M.G.** 2005. Estímulo da atividade enzimática ligninolítica de *Trametes villosa* e *Psilocybe castanella* por óleo vegetal. (Resumo) Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos-SP.
- Solis-Oba, M., Ugalde-Saldivar, V.M., Gonzalez, I. Viniegra-Gonzalez, G.** 2005. An electrochemical–spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 579: 59-66.
- Sormo, E.G., Jussi, I., Jussi, M., Braathen, M., Skaare, J.U. & Jenssen, B.M.** 2005. Thyroid hormone status in gray seal (*Halichoerus grypus*) pups from the Baltic Sea and the Atlantic Ocean in relation to organochlorine pollutants. *Environmental Toxicology and Chemical*. 24 (3): 610-616.
- Srebotnik, E. & Boisson, J.N.** 2005. Peroxidation of linoleic acid during the oxidation of phenols by fungal laccase. *Enzyme and Microbial Technology*. 36: 785-789.
- Srebotnik, E., Jensen Jr., K.A., Kawai, S. & Hammel, K.E.** 1997. Evidence that *Ceriporiopsis subvermispora* degrades nonphenolic lignin structures by a one-electron-oxidation mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4435-4440.
- Staszczak, M., Zdunek, E. & Leonowicz, A.** 2000. Studies on the role of proteases in the white-rot fungus *Trametes versicolor*: effect of PMSF and chloroquine on ligninolytic enzyme activity. *Journal of Basic Microbiology*. 40: 51-63.
- Steffen, K.T., Hatakka, A. & Hofrichter, M.** 2003. Degradation of Benzo[a]pyrene by the Litter-Decomposing Basidiomycete *Stropharia coronilla*: Role of Manganese Peroxidase. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (7): 3957-3964.
- Sugiura, M., Hirai, H. & Nishida, T.** 2003. Purification and characterization of a novel lignin peroxidase from white-rot fungus *Phanerochate sordida* YK-624. *FEMS Microbiology Letters*. 224: 285-290.
- Swoboda-Coldeberg, N.G.** 1995. Chemical contamination of the environment: sources, types, and fate of synthetic organic chemicals. In: Young, L.Y. & Cerniglia, C.E. (Eds.). *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*, New York: Wiley-Liss, p. 27-74.
- Tanaka, T., Yamamoto, M., Takahashi, M., Fujii, T. & Taniguchi, M.** 2003. Enzymatic Oxidative Polymerization of 4-Chloroguaiacol by Laccase. *Journal of Chemical Engineering of Japan*. 36 (9): 1101-1106.
- Terrón, M.C., González, T., Carbajo, J.M., Yagüe, S., Arana-Cuenca, A., Téllez, A., Dobson, A.D.W. & González, A.E.** 2004. Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on lcc gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. *Fungal Genetics and Biology*. 41: 954-962.

- Tien, M. & Kirk, T.K.** 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Science*. 81: 2280-2284.
- Toledo, H.H.B.** 2002. Hexaclorobenzeno. *In*: Fernícola, N.A.G.G., Oliveira, S.S. (Orgs.) *Poluentes Orgânicos Persistentes – POPs*, CRA, Salvador, 13: 479-500.
- Tominaga, J., Michizoe, J., Kamiya, N., Ichinose, H., Maruyama, T. & Goto, M.** 2004. Factors Affecting the Oxidative Activity of Laccase towards Biphenyl Derivatives in Homogeneous Aqueous-Organic Systems. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 98 (1): 14-19.
- Torres, E., Bustos-Jaimes, I. & Borgne, S.L.** 2003. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental*. 46: 1-15.
- Trupkin, S., Levin, L., Forchiassin, F. & Viale, A.** 2003. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30: 682-690.
- Tuomela, M.** 2002. Degradation of lignin and other ¹⁴C-labelled compounds in compost and soil with an emphasis on white-rot fungi. *Dissertação de mestrado*, University of Helsinki, Helsinki, 70 p.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. & Itavaara, M.** 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*. 72: 169-183.
- Valli, K. & Gold, M.H.** 1991. Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*. 173 (1): 345-352.
- Van Der Merwe, J.J.** 2002. Production of laccase by the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*. *Dissertação de mestrado*, University of the Free State, Bloemfontein, South África, 125 p.
- VanAcken, B., Godefroid, L.M., Peres, C.M., Naveau, H. & Agathos, S.N.** 1999. Mineralization of ¹⁴C- ring labeled 4-hydroxylamino-2,6- dinitrotoluene by manganese-dependent peroxidase of the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. *Journal of Biotechnology*. 68: 159-169.
- Vares, T., Kalsi, M. & Hatakka, A.** 1995. Lignin peroxidase, manganese peroxidase, and others ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (10): 3515-3520.
- Von Hunolstein, C., Valenti, P., Visca, P., Antonini, G., Nicolini, L. & Orsi, N.** 1986. Production of laccases A and B by a mutant strain of *Trametes versicolor*. *Journal of Gen. Applied Microbiology*. 32: 185-191.
- Wariishi, H., Valli, K. & Gold, M.H.** 1992. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *Journal of Biological Chemistry*. 267: 23688-23695.

- Watanabe, T., Katayama, S., Enoki, M., Honda, Y. & Kuwahara, M.** 2000. Formation of acyl radical in lipid peroxidation of linoleic acid by manganese dependent peroxidase from *Ceriporiopsis subvermispora* and *Bjerkandera adusta*. European Journal of Biochemistry. 267: 4222-4231.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I. & Agathos, S.N.** 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. Biotechnology Advances. 22: 161-187.
- Wessels, J.G.H.** 1994. Development regulation of fungal cell wall formation. Annual Review Phytobiology. 32: 413-437. *apud* Pessoni, R. 2002. Isolamento e caracterização de enzimas extracelulares e de parede celular do fungo *Penicillium janczewskii*, crescido em diferentes fontes de carbono. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 163 p.
- Wood, T.M. & Garcia-Campayo, V.** 1994. Enzymes and mechanisms involved in microbial cellulolysis *In*: Ratledge, C. (Ed.). Biochemistry of Microbial Degradation. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 590 p.
- 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.
- Xu, F.** 1996. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. Biochem. 35: 7608-7614.
- Xu, F.** 1997. Effects of Redox Potential and Hydroxide Inhibition on the pH Activity Profile of Fungal Laccases. The Journal of Biological Chemistry. 272 (2): 924-928.
- Xu, F., Shin, W., Brown, S., Wahleithner, J.A., Sundaram, U.M. & Solomon, E.I.** 1996. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. Biochimica et Biophysica Acta. 1292: 303-311.
- Yamanaka, R., Machado, K.M.G. & Mateus, D.R.** 2004. Influência do Manganês sobre o Crescimento e a Atividade Ligninolítica de *Psilocybe castanella* CCB444. (Resumo) Anais do IV Congresso Brasileiro de Micologia.
- Yaver, D.S., Xu, F., Golightly, E.J., Brown, K.M., Brown, S.H., Rey, M.W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K. & Dalboge, H.** 1996. Purification, Characterization, Molecular Cloning, and Expression of Two Laccase Genes from the White Rot Basidiomycete *Trametes villosa*. Applied and Environmental Microbiology. 62 (3): 834-841.
- Zouari-Mechichi, H., Mechichi, T., Dhouib, A., Sayadi, S., Martínez, A. & Martínez, M.** 2006. Laccase purification and characterization from *Trametes troglia* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. Enz. Microbiol Technol. 39: 141-148.

VIII. ANEXO 1



Correlação da área de pico do cromatograma e concentrações padronizadas de ergosterol e equação de regressão linear para quantificação de ergosterol por análise cromatográfica.