UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

VALDEIR ARANTES

**Caracterização de compostos de baixa massa molar redutores
de ferro produzidos por fungos e mediação da reação de
Fenton para degradação de polissacarídeos e lignina**

Lorena – SP
2008

VALDEIR ARANTES

**Caracterização de compostos de baixa massa molar redutores
de ferro produzidos por fungos e mediação da reação de
Fenton para degradação de polissacarídeos e lignina**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Biotecnologia
Industrial.

Área de concentração: Microbiologia Aplicada
Orientadora: Dra. Adriane Maria Ferreira
Milagres

**Lorena - SP
2008**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca Universitária
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Arantes, Valdeir

Caracterização de compostos de baixa massa molar redutores de ferro produzidos por fungos e mediação da reação de Fenton para degradação de polissacarídeos e lignina / Valdeir Arantes ; orientadora Adriane Maria Ferreira Milagres. – Lorena : 2008.

163 f. : fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

1. Biodegradação 2. Fungos degradadores de madeira 3. *Wolfiporia cocos* 4. *Perenniporia medulla-panis* 5. Compostos redutores de ferro 6. Reação de Fenton 7. Enzimas ligninolíticas. I. Título.

579.26 - CDU

*É com muitas saudades
que dedico esta tese
à minha amada irmã
Cleide (in memoriam)*

AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação que agradeço:

A Adriane, na qualidade de amiga e orientadora, pelas valiosas orientações, pensamento crítico e apoio, que se tornaram fundamentais durante todo o processo de elaboração e desenvolvimento do projeto de pesquisa, facilitando o alcance dos objetivos desta tese. Sou grato, também, aos seus incentivos em momentos diversos, e especialmente pela sua postura aberta à criação, demonstrada através da disponibilidade irrestrita em ouvir e discutir idéias apresentadas.

Ao professor André L. Ferraz pelas observações críticas, aos valiosos comentários e sugestões que muito contribuíram para o desenvolvimento dos trabalhos de pesquisa que resultaram nesta tese.

A professora Priscila Benar que no exame de qualificação, também, contribuiu para o desenvolvimento dos trabalhos de pesquisa.

Ao professor Barry Goodell (University of Maine, EUA) por ter gentilmente me aceito em seus laboratórios, onde realizei parte do Doutorado, mas também pelo imenso empenho na minha integração profissional e pessoal durante minha estadia na UMaine. Agradeço, também, a professora Jody Jellison e ao doutorando Yuhui Qian, que juntamente com Barry contribuíram para o desenvolvimento das atividades na UMaine e conseqüentemente para o alcance de parte dos objetivos desta tese.

Ao professor Timothy Filley (Purdue University, EUA) pela gentil e hospitaleira recepção em seus laboratórios, e pela disponibilidade e toda a atenção devotada ao ensinamento dos princípios e utilização da técnica de ^{13}C -TMAH termoquimólise por ele desenvolvida. Agradeço também, a pós-doutorando Akiko Nakagaw-Uzumi que teve valiosa participação no que diz respeito à parte prática da aprendizagem.

Ao professor Emanuel Carrilho (IQ-USP São Carlos) e especialmente à Professora Ana Valéria C. Simionato (UNICAMP), os quais se mostraram prontamente

disponíveis em contribuir com este trabalho, através das análises de eletroforese capilar.

A todos os amigos e companheiros do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica pelos agradáveis momentos de convívio, e especialmente ao Ezequiel, Hévila, Joseane e Michel pelos tantos e inesquecíveis diálogos. Não poderia deixar de agradecer às alunas de iniciação científica Carolina Baldochi e Amanda P. R. Oliveira, que me auxiliaram em algumas etapas experimentais do projeto.

A todos os funcionários do Departamento de Biotecnologia, especialmente ao técnico Djalma A. Primo, que de forma direta ou indireta também contribuíram para a realização deste projeto.

A Fundação de amparo a pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de doutorado direto.

A Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior do Ministério da Educação (CAPES) pela oportunidade e concessão de bolsa de estágio de doutorado no exterior (Doutorado *Sandwich*).

RESUMO

ARANTES, V. **Caracterização de compostos de baixa massa molar redutores de ferro produzidos por fungos e mediação da reação de Fenton para degradação de polissacarídeos e lignina.** 2008. 163f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2008.

Os fungos de decomposição branca e parda produzem enzimas para degradar os componentes da madeira, os primeiros produzem enzimas hidrolíticas e oxidativas enquanto os outros produzem principalmente enzimas hidrolíticas. A degradação de polissacarídeos e lignina por fungos de decomposição parda e branca seletiva, respectivamente, não ocorre na região imediata à hifa, e, também, não pode ser explicada unicamente por ação enzimática devido a impermeabilidade das mesmas na parede celular. Neste trabalho estudou-se o sistema degradativo não enzimático envolvendo compostos de baixa massa molar (CBMM) redutores de ferro em fungos degradadores de madeira. O fungo de decomposição parda, *Wolfiporia cocos* e o de decomposição branca seletiva, *Perenniporia medulla-panis* foram cultivados em diferentes concentrações de ferro, e a atividade redutora de Fe^{3+} micelial e a extracelular, assim como a produção de quelantes específicos de ferro, como derivados de ácido hidroxâmico e de catecol, foram induzidas em condição de deficiência de ferro. Os géis de SDS-PAGE dos extratos fúngicos mostraram várias proteínas negativamente reguladas por ferro em *P. medulla-panis* e *W. cocos*, principalmente para proteínas entre 10 – 30 kDa. Quando os fungos foram cultivados em diferentes fontes de carbono simples com e sem suplementação de celulose microcristalina e deficiência de ferro, produziram CBMM redutores de Fe^{3+} , os quais tiveram a produção estimulada nos meios com celulose. Análises de eletroforese capilar dos compostos quelantes de metal extraídos dos meios que proporcionaram a maior atividade redutora (L-ornitina/celulose para *P. medulla-panis* e glicose/celulose para *W. cocos*) na presença e ausência de ferro, confirmaram que, principalmente *P. medulla-panis* produz compostos extracelulares que são regulados por ferro. Os CBMM purificados das frações < 5 kDa apresentaram atividade redutora de Fe^{3+} em pH 2,0 mesmo quando ácido oxálico foi adicionado na concentração 20 vezes maior que a concentração de Fe^{3+} . Em pH 4,5, a atividade redutora foi detectada até uma concentração de ácido oxálico 10 vezes superior a de Fe^{3+} . Em ambos os casos a atividade redutora foi observada quando Fe^{3+} estava presente na forma livre ou complexada como $\text{Fe}(\text{oxalato})^+$. Dentre os vários CBMM produzidos por *P. medulla-panis* e *W. cocos* aqueles com atividade redutora foram o ácido 4-hidroxi-fenilacético, 1,2-dihidroxi-3-metil-benzeno, 1,2,3-trihidroxi-benzeno e o ácido 4-hidroxi-cinâmico para *W. cocos*, e para *P. medulla-panis* os principais foram 1,2-dihidroxi-benzeno e 1,2,3-trihidroxi-benzeno. Além desses compostos, ambos os fungos produziram peptídeos de baixa massa molar com atividade redutora. Os CBMM redutores de Fe^{3+} de *P. medulla-panis* (Pmp) e de *W. cocos* (Wc) foram utilizados na ausência e presença de Fe^{3+} e H_2O_2 (reação de Fenton mediada) para oxidar polissacarídeos e lignina *in vitro*. Verificou-se que os maiores níveis de oxidação foram obtidos nas reações de Fenton mediadas (Wc- $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ e Pmp- $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$). A degradação da celulose por estes sistemas foi caracterizada por uma rápida e extensiva despolimerização, seguida de significativa oxidação. Análises dos monômeros de lignina liberados de conífera tratada e não tratada após ^{13}C -TMAH termoquimólise indicaram oxidação da lignina pelos sistemas Wc- $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ e Pmp- $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$, principalmente por desmetoxilação e/ou desmetilação. A ação sinérgica entre os CBMM redutores de Fe^{3+} e as enzimas ligninolíticas ficou evidenciada para os fungos de decomposição branca *Lentinula edodes*, *P. medulla-panis* e *Trametes versicolor* através da oxidação do corante Azure B.

Palavras-chave: Biodegradação. Fungos degradadores de madeira. *Wolfiporia cocos*. *Perenniporia medulla-panis*. Compostos redutores de ferro. Reação de Fenton. Enzimas ligninolíticas.

ABSTRACT

ARANTES, V. **Characterization of low molecular weight Fe^{3+} -reducing compounds produced by fungi and mediation of Fenton reaction to degrade polysaccharides and lignin.** 2008. 163p. Thesis (Doctoral in Industrial Biotechnology) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

Brown and white rot fungi produce enzymes to degrade wood. The former produce hydrolytic and oxidative enzymes while the latter produce mainly hydrolytic enzymes. The degradation of polysaccharides and lignin by brown and white-rot fungi, respectively, do not occur next to the fungal hyphae and cannot be explained only by the enzymatic action due to the small pore size of sound wood. In this work, it was studied a non-enzymatic degradative system involving low molecular weight compounds (LMWC) with Fe^{3+} -reducing activity in wood decay fungi. The brown rot fungus *Wolfiporia cocos* and the selective white rot *Perenniporia medulla-panis* were grown under varying concentration of iron. The micelial and extracellular Fe^{3+} -reducing activity as well as the production of specific iron chelators (catechol and hydroxamate derivatives) were induced under iron starvation. SDS-PAGE gels of cellular proteins showed several proteins negatively iron-regulated in *P. medulla-panis* and in *W. cocos*, especially for proteins of 10 – 30 kDa. When the fungi were grown with different simple carbon source with and without microcrystalline cellulose supplementation and under iron restriction, they produced LMWC with Fe^{3+} -reducing activity, which production was stimulated in the presence of cellulose. Capillary electrophoresis analyses of metal chelating compounds extracted from the growth media that promoted the highest Fe^{3+} -reducing activity (L-ornithine/cellulose for *P. medulla-panis* and glucose/cellulose for *W. cocos*) in the presence and absence of iron, confirmed that, especially *P. medulla-panis* produces extracellular compounds that are iron-regulated. LMWC purified from these media showed Fe^{3+} -reducing activity at pH 2.0 even when oxalic acid was added up to 20 fold the iron concentration. At pH 4.5, the Fe^{3+} -reducing activity was detected at an oxalic acid concentration up to 10 fold the iron concentration. In both cases the LMWC were capable of reducing Fe^{3+} only when it was in its free form or complexed with oxalate to form Fe^{3+} -mono-oxalate complex ($\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)^+$). Among the several LMWC produced by *P. medulla-panis* and *W. cocos* those with Fe^{3+} -reducing capability were 4-hydroxy-phenylacetic acid, 1,2-dihydroxy-methyl-benzene, 1,2,3-trihydroxy-benzene and 4-hydroxy-cinnamic acid to *W. cocos* and 1,2-dihydroxy-benzene, and 1,2,3-tri-hydroxy-benzene to *P. medulla-panis*. Both fungi also produce low molecular weight peptides with Fe^{3+} -reducing capability. The purified LMWC with Fe^{3+} -reducing activity from *P. medulla-panis* (Pmp) and from *W. cocos* (Wc) were utilized in the presence and absence of Fe^{3+} and H_2O_2 (mediated Fenton reaction) to oxidize polysaccharides and lignin in vitro. The highest oxidation levels were obtained with mediated Fenton reactions ($\text{Wc-Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ e $\text{Pmp-Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$). Cellulose degradation by these systems was characterized by a rapid and extensive depolymerization followed by significant oxidation. Analyses of the lignin monomers released from treated and untreated softwood after ^{13}C -TMAH thermochemolysis indicated lignin oxidation by the $\text{Wc-Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ and $\text{Pmp-Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ systems, mainly by demethoxylation and/or demethylation. The synergistic action between LMWC with Fe^{3+} -reducing activity and the ligninolytic enzymes was evidenced to the white rot fungi *Lentinula edodes*, *P. medulla-panis* and *Trametes versicolor* with Azure B oxidation assays.

Keywords: Biodegradation. Wood decaying fungi. *Wolfiporia cocos*. *Perenniporia medulla-panis*. Iron reducing compounds. Fenton reaction. Ligninolytic enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	A) Representação convencional das camadas da parede das células de madeira mostrando a lamela média (LM), parede celular primária (P), as camadas da parede celular secundária (S ₁ , S ₂ e S ₃). B) Seção transversal das células de madeira, mostrando LM, S ₁ , S ₂ e S ₃ , e o lúmen (L). Barra – 10 µm.	18
Figura 2.	Desenho esquemático mostrando as características micro-morfológicas de diferentes tipos de degradação da madeira por fungos. A) Degradação parda; B) Degradação branca seletiva; e C) Degradação branca simultânea.....	21
Figura 3.	Álcool veratrílico como um mediador redox na oxidação da lignina catalisada por LiP.	27
Figura 4.	Mecanismo proposto para a oxidação de Mn ²⁺ por LiP na presença de álcool veratrílico (AV), ácido oxálico (OA), e oxigênio.....	29
Figura 5.	Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica.	31
Figura 6.	Mecanismo proposto de peroxidação de ácido graxo insaturado e geração de radical peroxila.	31
Figura 7.	Uma dos possíveis mecanismos para a oxidação da celulose por •OH.	36
Figura 8.	Reações típicas de •OH com a estrutura principal da lignina (arilglicerol-β-aril éter).....	38
Figura 9.	Mecanismo proposto para a geração do radical hidroxila pela reação de Fenton mediada por glicopeptídeos de baixa massa molar produzidos por fungos de decomposição branca e parda.....	40
Figura 10.	Mecanismo proposto para a geração do radical hidroxila pela reação de Fenton mediada por compostos aromáticos com atividade redutora de Fe ³⁺ produzidos por fungos de decomposição parda.....	43
Figura 11.	Mecanismo proposto para redução extracelular de Fe ³⁺ e produção de H ₂ O ₂ pelo fungo <i>G. trabeum</i> envolvendo compostos aromáticos redutores de Fe ³⁺ e uma quinona redutase micelial (DMBQ - 2,5-dimetoxi-1,4-benzoquinona e DMHQ - 2,5-dimetoxi-1,4-hidroquinona).....	45
Figura 12.	Modelo para produção do radical hidroxila, a uma certa distância da hifa envolvendo a enzima CDH e ácido oxálico.....	47
Figura 13.	Efeito da concentração de ferro no crescimento de <i>P. medulla-panis</i> (□) e <i>W. cocos</i> (■) em meio sólido. BCF (baixa concentração de ferro); SCF (suficiente concentração de ferro); ECF (elevada concentração de ferro).....	80
Figura 14.	Ensaio de detecção de compostos quelantes de ferro produzidos por <i>P. medulla-panis</i> cultivado em meio sólido por 7 dias em diferentes concentrações de ferro: A – BCF; B – SCF; e C – ECF.....	81
Figura 15.	Ensaio de detecção de compostos quelantes de ferro produzidos por <i>W. cocos</i> cultivado em meio sólido por 7 dias em diferentes concentrações de ferro: A – BCF; B – SCF; e C – ECF.....	82
Figura 16.	Efeito de diferentes concentrações de ferro no crescimento de <i>W. cocos</i> . BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).....	82
Figura 17.	Efeito de diferentes concentrações de ferro no crescimento de <i>P. medulla-panis</i> . BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).	83

Figura 18.	Efeito de diferentes concentrações de ferro no pH dos extratos obtidos do cultivo de <i>P. medulla-panis</i> . BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).	84
Figura 19.	Efeito de diferentes concentrações de ferro no pH dos extratos obtidos do cultivo de <i>W. cocos</i> . BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).	84
Figura 20.	Efeito de diferentes concentrações de ferro na produção de compostos quelantes do tipo hidroxamato por <i>P. medulla-panis</i> . BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).	85
Figura 21.	Efeito de diferentes concentrações de ferro na produção de compostos quelantes do tipo hidroxamato por <i>W. cocos</i> . BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).	86
Figura 22.	Efeito de diferentes concentrações de ferro na produção de compostos quelantes do tipo catecolato por <i>P. medulla-panis</i> . BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).	86
Figura 23.	Efeito de diferentes concentrações de ferro na produção de compostos quelantes do tipo catecolato por <i>W. cocos</i> . BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).	87
Figura 24.	Efeito de diferentes concentrações de ferro na atividade redutora de Fe^{3+} presente nas frações de baixa massa molar (< 5 kDa) de <i>P. medulla-panis</i> . BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).	87
Figura 25.	Efeito de diferentes concentrações de ferro na atividade redutora de Fe^{3+} presente nas frações de baixa massa molar (< 5 kDa) de <i>W. cocos</i> . BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).	88
Figura 26.	Efeito de diferentes concentrações de ferro na atividade micelial redutora de Fe^{3+} de <i>P. medulla-panis</i> . BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).	89
Figura 27.	Efeito de diferentes concentrações de ferro na atividade micelial redutora de Fe^{3+} de <i>W. cocos</i> . BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).	89
Figura 28.	Efeito da concentração de ferro na expressão de proteínas celulares de <i>W. cocos</i> . 1 – marcadores de massa molar; BCF – baixa concentração de ferro; SCF – suficiente concentração de ferro; ECF – elevada concentração de ferro.	90
Figura 29.	Efeito da concentração de ferro na expressão de proteínas celulares de <i>P. medulla-panis</i> . 1 – marcadores de massa molar; BCF – baixa concentração de ferro; SCF – suficiente concentração de ferro; ECF – elevada concentração de ferro.	91
Figura 30.	Efeito do ácido succínico, ornitina e glicose como fonte de carbono no crescimento de <i>W. cocos</i> e <i>P. medulla-panis</i>	94
Figura 31.	pH final dos caldos das culturas de <i>W. cocos</i> cultivado em diferentes fontes de carbono.	94
Figura 32.	pH final dos caldos das culturas de <i>P. medulla-panis</i> cultivado em diferentes fontes de carbono.	95
Figura 33.	Eletoferogramas de WC em diferentes pHs (tampão fosfato 50 mM).	100
Figura 34.	Eletoferogramas de PMP em diferentes pHs (tampão fosfato 50 mM).	100
Figura 35.	Eletoferogramas de WC e WC-Fe (tampão fosfato 50 mM, pH 8,1).	101
Figura 36.	Eletoferogramas de PMP e PMP-Fe (tampão fosfato 50 mM, pH 8,1).	101
Figura 37.	Eletoferogramas de PMP em diferentes concentrações de eletrólito (tampão fosfato) no pH 8,1.	102

Figura 38.	Eletoferogramas de PMP e PMP-Fe na concentração de eletrólito otimizada (tampão fosfato 60 mM, pH 8,1).	103
Figura 39.	Eletoferogramas de WC em diferentes concentrações de SDS, no pH 8,1. ...	105
Figura 40.	Eletoferogramas de WC e WC-Fe utilizando 40 mM SDS, pH 8,1.	106
Figura 41.	Eletoferogramas de PMP em diferentes concentrações de SDS, no pH 8,1..	107
Figura 42.	Eletoferogramas de PMP e PMP-Fe utilizando 40 mM de SDS.	107
Figura 43.	Redução de Fe^{3+} por compostos fungos de baixa massa molar em função do tempo.	117
Figura 44.	Redução de Fe^{3+} por compostos fungos de baixa massa molar em função da massa de CBMM de <i>P. medulla-panis</i> e <i>W. cocos</i>	117
Figura 45.	Redução de Fe^{3+} pelos CBMM de <i>P. medulla-panis</i> e <i>W. cocos</i> (expresso em Fe^{2+}) e a especiação de Fe-oxalato (Fe^{3+} , $\text{Fe}(\text{Oxalato})^+$, $\text{Fe}(\text{Oxalato})_2^-$ e $\text{Fe}(\text{Oxalato})_3^{3-}$) em função da concentração de ácido oxálico a pH 2,0.	119
Figura 46.	Redução de Fe^{3+} pelos CBMM de <i>P. medulla-panis</i> e <i>W. cocos</i> (expresso em Fe^{2+}) e a especiação de Fe-oxalato (Fe^{3+} , $\text{Fe}(\text{Oxalato})^+$, $\text{Fe}(\text{Oxalato})_2^-$ e $\text{Fe}(\text{Oxalato})_3^{3-}$) em função da concentração de ácido oxálico a pH 4,5.	119
Figura 47.	Liberação de <i>p</i> -nitrophenol a partir de pNPG (A) e pNPX (B) e de açúcares redutores a partir de xilana (C) após tratamento com Wc- $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (■), Pmp- $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (□), Wc- Fe^{3+} (●), Pmp- Fe^{3+} (○) e $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Δ).....	121
Figura 48.	Liberação de açúcares redutores a partir de CMC em função da fluidez específico ($1/n_{sp}$) após tratamento com Wc- $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (■), Pmp- $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (□), Wc- Fe^{3+} (▲), Pmp- Fe^{3+} (Δ) e $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (●).	123
Figura 49.	Formação de pontas redutoras nos resíduos de celulose microcristalina (Avicel) após tratamento com Wc- $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (■) e Pmp- $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (□).....	124
Figura 50.	Cromatograma parcial de madeira (<i>Picea rubens</i>) não tratada após ^{13}C -TMAH termoquimólise	126
Figura 51.	Principais produtos de degradação da lignina de coníferas após TMAH termoquimólise. G4 – 3,4-di-metóxi-benzaldeído, G6 – ácido 3,4-di-metóxi-benzóico, G7 e G8 – cis e trans-1-(3,4-di-metóxi-fenil)-2-metóxi-etileno, G14 e G15 treó/eritro 1-(3,4-di-metóxi-fenil) 1,2,3-tri-metóxi-propano (NIEROP; FILLEY, 2007).	126
Figura 52.	Grau de desmetoxilação dos principais monômeros de lignina liberados após ^{13}C -TMAH termoquimólise de madeira de <i>Picea rubens</i> tratada com reações de Fenton mediada com CBMM produzidos por <i>W. cocos</i> e <i>P. medulla-panis</i> , em relação à madeira não tratada.	127
Figura 53.	Cinética de produção de MnP (▲), lacase (□), LiP (Δ) e atividade redutora de Fe^{3+} (FeRA) (■) por <i>L. edodes</i> , <i>P. medulla-panis</i> e <i>T. versicolor</i>	131
Figura 54.	Deteção da atividade redutora de Fe^{3+} nos extratos produzidos por <i>L. edodes</i> , <i>P. medulla-panis</i> e <i>T. versicolor</i> . Os extratos avaliados foram os extratos iniciais (com a maior atividade redutora de Fe^{3+}), após serem fervidos, e após a separação dos extratos iniciais, depois de fervidos e nas frações < 5 kDa (FBMM) e > 5 kDa (FAMM).	133
Figura 55.	Descoloração de Azure B pelas frações FAMM _{Lac} (Lac), FAMM _{MnP} (MnP) e FBMM _{Fe} (FeRA) na presença de Fe^{3+} e H_2O_2	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – CBMM produzidos por fungos degradadores de madeira e seus respectivos sistemas degradativos propostos.....	26
Tabela 2 – Gel concentrador.....	60
Tabela 3 – Gel separador	60
Tabela 4 – Proteínas padrões.....	62
Tabela 5 – Detecção das atividades quelante e redutora de íons Fe^{3+} pelas frações < 5 kDa obtidas a partir do cultivo de <i>W. cocos</i> e <i>P. medulla-panis</i> em diferentes fontes de carbono.	96
Tabela 6 – Detecção de compostos quelantes do tipo catecol e ácido hidroxâmico nas frações < 5 kDa obtidas a partir do cultivo de <i>W. cocos</i> e <i>P. medulla-panis</i> em diferentes fontes de carbono.....	97
Tabela 7 – Detecção de peptídeos e atividade redutora nas amostras obtidas da precipitação com ácido tricloroacético das frações < 5 kDa.	98
Tabela 8 – Caracterização dos extratos iniciais das frações < 5 kDa de <i>P. medulla-panis</i> e <i>W. cocos</i>	108
Tabela 9 – CBMM produzidos por <i>W. cocos</i>	110
Tabela 10 – CBMM produzidos por <i>P. medulla-panis</i>	112
Tabela 11 – Concentração (ng/ μg amostra) de G6 e G6/64 liberados após ^{13}C -TMAH termoquimólise de madeira não tratada e trada com CBMM de <i>P. medulla-panis</i> e <i>W. cocos</i> na presença de ferro e peróxido de hidrogênio.....	128

ABREVIATURAS

DHBA	Ácido 2,3-dihidroxi-benzóico
AV	Álcool veratrílico
BCF	Baixa concentração de Fe^{3+}
CBMM	Compostos de baixa massa molar
CDH	Celobiose desidrogenase
CG-MS	Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	Carboximetilcelulose
CZE	Eletroforese capilar de zona
DCPIP	2,6-diclorofenol-indofenol
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
ECF	Elevada concentração de Fe^{3+}
FAMM	Fração de alta massa molar
FAMM_{Lac}	Fração de alta massa molar com atividade de lacase
FAMM_{MnP}	Fração de alta massa molar com atividade de MnP
FBMM_{Fe}	Fração de baixa massa molar com atividade redutora de Fe^{3+}
FBMM	Fração de baixa massa molar
KTBA	Ácido 2-ceto-4-tiometilbutírico
LiP	Lignina-peroxidase
MEKC	Cromatografia micelar eletrocinética capilar
MnP	Manganês-peroxidase
PMP	Compostos extraídos com a resina XAD-2 dos caldos de cultivo <i>P. medulla-panis</i> na ausência de Fe^{3+}
PMP-Fe	Compostos extraídos com a resina XAD-2 dos caldos de cultivo <i>P. medulla-panis</i> na presença de Fe^{3+}
Pmp	Compostos extraídos com a resina XAD-2 das frações < 5 kDa de <i>P. medulla-panis</i>
ROS	Espécies de oxigênio reativo
SCF	Concentração suficiente de Fe^{3+}
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TMAH	Hidróxido de tetra-metil-amônio
WC	Compostos extraídos com a resina XAD-2 dos caldos de cultivo <i>W. cocos</i> na ausência de Fe^{3+}
WC-Fe	Compostos extraídos com a resina XAD-2 dos caldos de cultivo <i>W. cocos</i> na presença de Fe^{3+}
Wc	Compostos extraídos com a resina XAD-2 das frações < 5 kDa de <i>W. cocos</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Madeira: Composição química e ultraestrutura	17
2.2 Biodegradação da madeira.....	17
2.2.1 Fungos causadores de decomposição parda.....	19
2.2.2 Fungos causadores de decomposição branca	19
2.2.3 Enzimologia da biodegradação da madeira	20
2.2.4 Evidências da participação de CBMM na biodegradação da madeira	23
2.2.5 CBMM envolvidas na biodegradação da madeira	25
2.2.5.1 Lacase/Mediador	25
2.2.5.2 Álcool veratrílico-LiP	27
2.2.5.3 Compostos aromáticos clorados-LiP	29
2.2.5.4 Peroxidação de ácidos graxos.....	30
2.2.5.5 Ácido Oxálico.....	32
2.2.5.6 Reação de Fenton mediada	34
2.2.5.6.1 Fundamentos da reação de Fenton.....	34
2.2.5.6.2 Reação de Fenton e a biodegradação da madeira	35
2.2.5.6.2.1 Peptídeos.....	39
2.2.5.6.2.2 Compostos aromáticos quelantes e redutores de Fe^{3+}	42
2.2.5.6.2.3 Celobiose-desidrogenase (CDH).....	46
2.3 Características e aplicações da reação de Fenton mediada por agentes redutores de Fe^{3+}	46
2.4 Agentes quelantes de Fe^{3+}	48
2.5 <i>Perenniporia medulla-panis</i> e <i>Wolfiporia cocos</i>	49
3 OBJETIVOS.....	52
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 Estudo da influência do ferro e da fonte de carbono no crescimento, atividade redutora de Fe^{3+} e produção de compostos de baixa massa molar.....	53
4.1.1.2 Espécies fúngicas e meio de manutenção	53
4.1.1.3 Efeito do ferro em meio sólido	53
4.1.1.4 Efeito do ferro em meio líquido.....	55
4.1.1.4.1 Determinação da biomassa fúngica	56
4.1.1.4.2 Atividade redutora de Fe^{3+} do micélio úmido.....	56
4.1.1.4.3 Obtenção e caracterização das frações < 5 kDa.....	57
4.1.1.4.3.1 Identificação de derivados de catecol.....	57
4.1.1.4.3.2 Identificação de derivados de ácido hidroxâmico	57
4.1.1.4.3.3 Atividade redutora de Fe^{3+}	58
4.1.1.4.4 Extração, quantificação e perfil de massa molar das proteínas celulares.....	58
4.1.1.4.4.4 Extração de proteínas celulares	58
4.1.1.4.4.5 Determinação de proteínas celulares totais	59
4.1.1.4.4.6 Eletroforese em gel desnaturante de poli(acrilamida) (SDS-PAGE).....	59
4.1.1.4.4.6.1 Preparo dos géis SDS-PAGE	60
4.1.1.4.4.6.2 Preparo das amostras e do tampão da amostra	60
4.1.1.4.4.6.3 Revelação com nitrato de prata e determinação das massas molares das proteínas celulares.....	61
4.1.2 Estudo da influência de diferentes fontes de carbono na produção de CBMM.....	62
4.1.2.1 Cultivo dos fungos em diferentes fontes de carbono.....	62
4.1.2.2 Método CAS para detecção de atividade quelante de Fe^{3+}	63
4.1.2.3 Isolamento determinação de peptídeos de baixa massa molar	63

4.1.2.3.1 Determinação de peptídeos de baixa massa molar	64
4.1.3 Análises estatísticas	64
4.1.4 Detecção de compostos regulados por ferro através de análises de eletroforese capilar	64
4.1.4.1 Extração em fase sólida com a resina XAD-2	65
4.1.4.2 Eletroforese capilar	65
4.2 Produção, isolamento e caracterização de CBMM com atividade redutora de Fe^{3+}	66
4.2.1 Cultivo dos fungos	68
4.2.2 Atividades enzimáticas	68
4.2.3 β -D-xilanase e endo-1,4- β -glucanase	68
4.2.4 β -D-xilosidase e β -D-glicosidase	69
4.2.5 Exo-1,4- β -glucanase	70
4.2.6 Celobiose-desidrogenase - CDH	70
4.2.7 Lacase	71
4.2.8 Manganês Peroxidase – MnP	71
4.2.9 Lignina Peroxidase – LiP	71
4.2.10 Determinação de ácido oxálico por CLAE	71
4.2.11 Identificação dos CBMM por ^{13}C -TMAH/CG-MS	72
4.2.12 Determinação da atividade redutora de Fe^{3+}	73
4.2.13 Efeito do ácido oxálico e do pH na redução de Fe^{3+}	73
4.3 Degradação oxidativa de polissacarídeos e lignina pela reação de Fenton mediada por CBMM	74
4.3.1 Xilana	74
4.3.2 Avicel	75
4.3.3 Carboximetilcelulose (CMC)	75
4.3.4 pNPX e pNPG	76
4.3.5 Tratamento de madeira com reações de Fenton mediada	76
4.3.6 ^{13}C -TMAH/termoquimólise	77
4.4 Estudo da interação dos CBMM redutores de Fe^{3+} com enzimas ligninolíticas	78
4.5 Fungos, condições de cultivo e determinação das atividades oxidativas e de redução de Fe^{3+}	78
4.6 Isolamento parcial de MnP, lacase e CBMM redutores de Fe^{3+}	79
4.7 Oxidação de Azure B	79
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
5.1 Estudo da influência do ferro e da fonte de carbono no crescimento e produção de compostos quelantes/redutores de ferro	80
5.1.1 Crescimento e produção de compostos quelantes de ferro em meio sólido	80
5.1.2 Crescimento em meio líquido	81
5.1.2.1 Efeito do ferro na produção de compostos quelantes de Fe^{3+}	84
5.1.2.2 Efeito do ferro na atividade redutora de Fe^{3+}	86
5.1.2.2.1 Atividade extracelular redutora de Fe^{3+}	86
5.1.2.2.2 Atividade micelial redutora de Fe^{3+} (Ferroredutase)	88
5.1.2.3 Expressão de proteínas celulares reguladas por ferro	90
5.1.3 Estudo da influência de diferentes fontes de carbono na produção de CBMM	93
5.1.3.1 Crescimento fúngico e pH das culturas	93
5.1.3.2 Detecção das atividades quelante e redutora de Fe^{3+} nas frações <5 kDa	95
5.1.3.3 Caracterização química das frações < 5 kDa	96
5.1.3.4 Detecção de compostos regulados por ferro utilizando eletroforese capilar	99
5.1.3.4.1 Variação do pH	99
5.1.3.4.2 Variação da concentração de eletrólito de separação	102
5.1.3.4.3 Cromatografia micelar eletrocinética capilar (MEKC)	103
5.1.3.4.3.1 Variação da concentração de surfactante	104
5.2 Purificação dos CBMM	108
5.2.1 Caracterização do extrato inicial	108

5.2.1.1 Identificação dos CBMM por CG-MS.....	109
5.2.2 Redução de Fe^{3+} por CBMM	116
5.2.2.1 Efeito de ácido oxálico e pH na atividade redutora de Fe^{3+} dos CBMM.....	116
5.3 Degradação oxidativa de polissacarídeos e lignina pela reação de Fenton mediada por CBMM	120
5.3.1 Degradação oxidativa de polissacarídeos	120
5.3.2 Oxidação da lignina em madeira com reações de Fenton mediada por CBMM	125
5.4 Estudo da ação conjunta de CBMM e enzimas ligninolíticas	129
5.4.1 Produção de atividade redutora de Fe^{3+} e enzimas ligninolíticas.....	130
6 CONCLUSÕES	137
REFERÊNCIAS.....	139

1 INTRODUÇÃO

A biodegradação de materiais lignocelulósicos é um processo natural de reciclagem de matéria orgânica, e o entendimento deste processo contribui com a compreensão do ciclo natural do carbono que tem início na biossíntese dos seus constituintes a partir de H_2O , CO_2 e energia solar, e termina com a mineralização destes constituintes e liberação de CO_2 e H_2O em decorrência da decomposição causada principalmente por fungos.

Por muito tempo a biodegradação foi foco de muitos estudos devido à grande quantidade de madeira e produtos a base de madeira que são danificados por ação de fungos e devido à necessidade do desenvolvimento de métodos de prevenção à degradação menos inofensivos ao meio ambiente. Estes fungos e/ou seus sistemas degradativos têm sido intensivamente estudados em razão do elevado potencial de utilização em aplicações biotecnológicas, como na biodegradação de compostos xenobióticos, bioremediação de solos, biopolpação da madeira e biobranqueamento de polpas celulósicas. Uma vez que o desenvolvimento e a eficácia destes métodos/processos dependem principalmente do conhecimento dos mecanismos químicos e bioquímicos envolvidos na biodegradação dos constituintes da madeira, o entendimento destes mecanismos certamente irá contribuir para o desenvolvimento de novas aplicações assim como a melhoria das já existentes.

Apesar do considerável conhecimento adquirido a respeito da enzimologia da biodegradação dos constituintes da madeira alcançados nas últimas décadas, até os dias de hoje, não se conhece os mecanismos químicos e bioquímicos exatos empregados pelos fungos durante este processo. Contudo, sabe-se que o processo de biodegradação da madeira por fungos não pode ser explicado unicamente com base na ação das diversas enzimas lignocelulolíticas por eles secretadas. Dentro dessa abordagem, pesquisas recentes têm indicado uma participação expressiva de compostos de baixa massa molar (CBMM).

Dentre os CBMM até agora identificados e relacionados à biodegradação da madeira, encontram-se alguns com capacidade de quelar Fe^{3+} e reduzi-lo a Fe^{2+} , os quais há pouco mais de uma década, foram sugeridos como mediadores de um sistema oxidativo não enzimático de baixa massa molar que além destes compostos envolve ferro e peróxido de hidrogênio (reação de Fenton mediada) para a geração

de radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$). Uma vez formado, este radical atuaria oxidativamente nos constituintes da madeira, principalmente nos estágios iniciais de biodegradação.

Esta teoria, baseada quase que exclusivamente nos compostos isolados do fungo de decomposição parda *Gloeophyllum trabeum*, é amplamente aceita na comunidade científica para explicar a degradação não enzimática da madeira, principalmente no caso dos fungos de decomposição parda. Entretanto, muito pouco se sabe a respeito da produção destes compostos redutores, das condições que governam as reações envolvendo este sistema oxidativo não enzimático, e das modificações que ocorrem nos constituintes da madeira sujeito à degradação por este sistema, além da falta de informação se este sistema oxidativo é exclusivo de *G. trabeum*, ou comum a outros fungos degradadores de madeira.

Com base nesses aspectos e considerando a importância do conhecimento das vias degradativas dos fungos degradadores de madeira, tanto do ponto de vista biotecnológico quanto acadêmico, este trabalho teve como objetivo principal produzir, purificar e caracterizar CBMM com atividade redutora de Fe^{3+} de fungos degradadores de madeira. A extensão da degradação de polissacarídeos e lignina foi avaliada pela reação de Fenton mediada por estes compostos em condição similar ao que ocorre na madeira. Objetivou-se ainda estudar a ação sinérgica entre os compostos redutores de ferro e as enzimas ligninolíticas de fungos de decomposição branca na oxidação do Azure B.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Madeira: Composição química e ultraestrutura

A madeira é constituída de um arranjo ordenado de células com parede composta basicamente por (FENGEL; WEGENER, 1989):

- **celulose** (cerca de 50%): um homopolímero linear de elevado grau de polimerização/massa molar, com regiões amorfas e cristalinas, composto unicamente por unidades de β -D-glucopirranose associadas entre si por ligações β -1,4 glicosídicas, sendo a celobiose a unidade repetitiva do polímero;
- **polioses** (20 – 25%): são heteropolissacarídeos altamente ramificados, amorfos e com baixo grau de polimerização (50 – 300), formados por xilana, galactana e glicomanana como componentes das cadeias principais e com vários substituintes, como arabinose, galactose, entre outros.
- **lignina** (20 – 30%): macromolécula tridimensional, amorfa, composta basicamente por unidades de fenilpropano, contendo subestruturas fenólicas (10 – 20%) e não fenólicas (80 – 90%).

Na parede celular, celulose, polioses e lignina estão intimamente associadas e/ou ligadas quimicamente, formando diferentes camadas: a parede primária (P), formada pelas microfibrilas de celulose; e a parede secundária (S), composta principalmente por celulose e lignina, que é formada pelas subcamadas S_1 , S_2 e S_3 . As diferentes células encontram-se separadas pela lamela média (ML), rica em lignina (FENGEL; WEGENER, 1989). A Figura 1 ilustra a disposição das camadas e subcamadas de uma parede celular vegetal.

2.2 Biodegradação da madeira

A biodegradação da madeira na natureza envolve a ação simultânea de diversos microrganismos tais como fungos, bactérias e parasitas, dentre os quais os fungos são os mais eficientes (FENGEL; WEGENER, 1989). Entre estes fungos, destacam-se os basidiomicetos, que são os principais degradadores. A degradação causada por estes fungos ocorre necessariamente de forma extracelular, uma vez

Figura 1. A) Representação convencional das camadas da parede das células de madeira mostrando a lamela média (LM), parede celular primária (P), as camadas da parede celular secundária (S₁, S₂ e S₃). B) Seção transversal das células de madeira, mostrando LM, S₁, S₂ e S₃, e o lúmen (L). Barra – 10 µm.

Fonte. Adaptado de Schwarze (2007).

que os componentes da madeira devem ser inicialmente despolimerizados até compostos menores que são susceptíveis ao transporte através da parede celular e ao metabolismo intracelular dos fungos envolvidos. Estes fungos agem através da penetração de suas hifas pelo lúmen das células, as quais ali instaladas produzem uma variedade de metabólitos extracelulares que vão, assim, atuar degradando os componentes da parede celular vegetal (Figura 2).

As características de crescimento dos microrganismos na madeira e o tipo de sistema degradativo produzido resultam em diferentes tipos de degradação (BLANCHETTE, 1998). Dependendo do tipo de degradação, diferentes mudanças físicas, químicas e morfológicas ocorrem na madeira (BLANCHETTE, 2000). Com base nestas mudanças produzidas em estágios mais avançados de degradação da madeira por diferentes fungos, três tipos de degradação são sugeridos: branca, parda e macia. A decomposição branca e a parda são causadas por fungos basidiomicetos, embora alguns ascomicetos também sejam classificados como fungos de decomposição branca (SCHWARZE, 2007).

De uma forma geral, os fungos de decomposição parda são associados com coníferas, e os de decomposição branca com folhosas (GILBERTSON, 1980; WATLING, 1982).

2.2.1 Fungos causadores de decomposição parda

Este grupo de fungos degrada principalmente os polissacarídeos (celulose e polioses) presentes na madeira (ERIKSSON et al., 1990; RAYNER; BODDY, 1988), ao passo que a lignina não é completamente degradada e sim modificada estruturalmente, sendo que a desmetoxilação é a principal alteração ocorrida na estrutura da lignina, com pouca oxidação da cadeia lateral (ANDER et al., 1988; ENOKI et al., 1988). Entretanto, alguns estudos mais recentes mostram perda substancial de lignina (acima de 20%, lignina Klason) durante a biodegradação da madeira por algumas espécies causadoras de decomposição parda (BLANCHETTE et al., 1994, MACHUCA; FERRAZ, 2001; WORRALL et al., 1997), e que esta perda é aumentada em estágios mais avançados de degradação (MACHUCA; FERRAZ, 2001; WORRALL et al., 1997).

Do ponto de vista microscópico, a degradação dos polissacarídeos causada por estes fungos não está localizada próxima à hifa fúngica. A camada S₂ da parede celular da madeira é intensamente degradada durante o processo de biodegradação, ao passo que a camada S₃ pode permanecer relativamente intacta até estágios mais avançados de degradação (Figura 2) (ERIKSSON et al., 1990; HIGHLEY et al., 1985; LIESE, 1970; SCHWARZE et al., 2003, 2004; XU; GOODELL, 2001).

A madeira decomposta por estes fungos tem a aparência de um material marrom que quebra facilmente em cubos, no sentido transversal aos das fibras dos vegetais.

2.2.2 Fungos causadores de decomposição branca

A característica comum de todos esses fungos é a capacidade de degradar lignina, assim como celulose e polioses. Entretanto, as velocidades relativas de decomposição da lignina e polissacarídeos variam grandemente de acordo com a espécie fúngica. Outra característica comum destes fungos é que a madeira decomposta adquire uma aparência esbranquiçada.

Podem-se diferenciar dois modos distintos de degradação da célula vegetal por estes fungos. O primeiro, e mais comum, denominado de decomposição branca simultânea, carboidratos e lignina são atacados mais ou menos uniformemente (WORRALL et al., 1997). Neste caso, é observada uma erosão progressiva da

parede celular no sentido lúmen-lamela média, levando à diminuição progressiva e irregular da espessura da parede celular (Figura 2) (DANIEL, 2003; WORRALL et al., 1997; SCHWARZE, 2007). O outro modo, menos freqüente, comumente denominado de decomposição branca seletiva, polioses e lignina são preferencialmente atacadas, notoriamente nos estágios iniciais (WORRALL et al., 1997) sem a simultânea erosão da parede celular vegetal (DANIEL, 2003), ou seja, a degradação da lignina ocorre em pontos distantes da hifa fúngica (BLANCHETTE et al., 1997; SCHWARZE, 2007). As maiores dos fungos ditos seletivos são em estágios curtos, quando não se observa despolimerização significativa da celulose. Neste caso, a parede celular, apesar de degradada, mantém sua forma original (Figura 2).

Estas duas formas de degradação branca podem ser causadas por um mesmo fungo em diferentes partes da madeira (BLANCHETTE, 1991).

2.2.3 Enzimologia da biodegradação da madeira

Várias enzimas são produzidas por fungos durante a colonização da madeira, e basicamente os complexos enzimáticos produzidos constituem-se dos sistemas hidrolítico e oxidativo. As enzimas responsáveis pela degradação da celulose e das polioses são hidrolases que apresentam certa especificidade pelo respectivo substrato (KIRK; CULLEN, 1998), ao passo que as enzimas envolvidas na degradação da lignina são oxidases e em geral são pouco específicas (CULLEN; KERSTEN, 2004).

Os fungos de decomposição branca produzem todas as enzimas extracelulares necessárias para a hidrólise completa da celulose (endo-1,4- β -glucanase, exo-1,4- β -glucanase e 1,4- β -glicosidase), embora o nível de cada atividade enzimática varie entre os fungos. Em geral, eles não são bons produtores de celulasas e a seletividade de alguns está relacionada a uma atividade de celulase total baixa. Os fungos de decomposição parda produzem endo-1,4- β -glucanase e 1,4- β -glicosidase, mas não a exo-1,4- β -glucanase, que atua nas regiões cristalinas da celulose clivando as ligações glicosídicas a partir do grupo terminal não redutor e liberando unidades de glicose e celobiose (ENOKI et al., 1997). Dessa forma, a degradação da celulose, característica comum destes fungos não pode ser explicada unicamente pela ação enzimática.

Figura 2. Desenho esquemático mostrando as características micro-morfológicas de diferentes tipos de degradação da madeira por fungos. A) Degradação parda; B) Degradação branca seletiva; e C) Degradação branca simultânea.

Fonte. Adaptado de Schwarze (2007).

Celobiose-desidrogenase (CDH) é outra enzima que também participa do complexo celulolítico de alguns fungos, porém possui atividade oxidativa e não hidrolítica. A CDH oxida vários açúcares como a celobiose, oligômeros de glicose, lactose e até mesmo a celulose (HENRIKSSON; JOHANSSON; PETTERSSON, 2000).

Contrariamente à degradação enzimática da celulose, onde são exigidas somente enzimas que hidrolisam ligações β -1,4 glicosídicas, a degradação enzimática das polioses requer um conjunto enzimático mais complexo, uma vez que diferentes tipos de ligações e unidades monoméricas estão presentes na sua estrutura de heteropolissacarídeo ramificado. A completa degradação das polioses requer a ação de uma série de enzimas hidrolíticas, sendo as principais: endo-1,4- β -xilanase, β -xilosidase, e enzimas acessórias (α -glucuronidase, α -L-arabionofuranosidase, acetil esterase, mananases e galactanases) (VRIES; VISSER, 2001).

A biodegradação efetiva da lignina é observada somente com fungos de decomposição branca. Neste processo atuam um grupo de enzimas oxidativas que compreendem: duas peroxidases, lignina-peroxidase (LiP) e peroxidase dependente de manganês (MnP), que são heme proteínas capazes de oxidar subestruturas da lignina na presença de peróxido de hidrogênio (KIRK; CULLEN, 1998; KUHAD et al., 1997; MARTÍNEZ, 2002); e uma oxidase, a lacase, uma cupro-proteína que catalisa a redução de O_2 a H_2O , com simultânea oxidação de subunidades fenólicas da lignina (KIRK; CULLEN, 1998; KUHAD et al., 1997). A LiP apresenta potencial de oxidação suficientemente elevado para abstrair elétrons de subestruturas fenólicas e não fenólicas, ao passo que MnP, que apresenta menor potencial de oxidação é capaz somente de abstrair elétrons de subunidades fenólicas.

Embora sem participação direta na degradação e/ou modificação da lignina, a glicoxal oxidase e a aril-álcool oxidase são enzimas extracelulares que participam da produção de peróxido de hidrogênio, indispensável para a ação das peroxidases (KERSTEN; KIRK, 1987; KIRK; CULLEN, 1998; KUHAD et al., 1997).

A existência de espécies de fungos de decomposição branca que degradam eficientemente a lignina, mas produzem somente lacase e/ou MnP, e aquelas que produzem LiP além de lacase e/ou MnP (HATAKKA, 1994), lançou dúvidas quanto à forma com que fungos de decomposição branca oxidam a lignina e, também, sobre a real participação e exata função que cada uma dessas enzimas exerce no processo

global de oxidação. Contudo, estudos indicam que a biodegradação da lignina não pode ser efetuada eficientemente somente pelas enzimas ligninolíticas (HU et al., 2006). Um exemplo é a existência de alguns fungos de decomposição branca que são eficientes degradadores de madeira e que não produzem LiP, como *Ceriporiopsis subvermispora* e *Pycnoporus cinnabarinus* entre outros (KUHAD et al., 1997). Nestes fungos, a completa degradação da lignina não pode ser explicada unicamente pela ação enzimática quando LiP não é produzida, uma vez que a maior parte da lignina presente na madeira é lignina não fenólica, a qual é somente oxidada pela LiP, evidenciando a participação de outro (s) sistema (s) oxidativo (s) responsável (eis) pela completa degradação da lignina na ausência dessa enzima.

Os fungos de decomposição parda são comumente descritos como não produtores de ligninases. Entretanto, D'Souza et al. (1996) isolaram seqüências de genes de lacase e mostraram pela primeira vez atividade de lacase em culturas de fungos de decomposição parda, porém a máxima atividade observada (em torno de 16 nKatal/L) foi para o fungo *G. trabeum*, mas muito inferior aos níveis normalmente produzidos por fungos de decomposição branca. De acordo com Schlosser e Höfer (2002) lacase foi também, identificada e purificada de culturas de *Laetiporus sulfureus*. A atividade de LiP (DEY; MAITI; BHATTACHARYYA, 1991, 1994) e MnP (DEY; MAITI; BHATTACHARYYA, 1994) foram detectadas em culturas de *Polyporus ostreiformis*, porém, também, em níveis relativamente baixos, 50 nKatal/L e 40 nKatal/L, respectivamente. Machuca e Ferraz (2001) e Worrall et al. (1997) verificaram que algumas espécies de fungos de decomposição parda foram capazes de remover mais de 20% de lignina durante o processo de biodegradação, mas não foi encontrada atividade de peroxidase ou lacase. Isto evidencia a participação de outro (s) sistema (s) oxidativo (s) nesses fungos de decomposição parda que seja (m) responsável (eis) por essa perda significativa de lignina na ausência de peroxidases e lacase.

2.2.4 Evidências da participação de CBMM na biodegradação da madeira

A biodegradação da madeira por fungos causadores de decomposição parda e decomposição branca seletiva não ocorre na região imediata da hifa. Nesse sentido, as enzimas lignocelulolíticas extracelulares produzidas por esses fungos teriam então que difundir-se na parede celular através da camada S₃, para causar a

extensiva degradação dos polissacarídeos na camada S₂ (no caso da decomposição parda), e da lignina na parede celular e lamela média (no caso da degradação branca seletiva). No entanto, embora estes fungos secretem inúmeras enzimas lignocelulolíticas que são requeridas para a biodegradação destes componentes da madeira, sabe-se que estas enzimas são grandes para penetrarem na parede celular da madeira intacta em tempos curtos de biodegradação (BLANCHETTE et al., 1997; COWLING 1981; GOODELL et al., 1997). Nesse sentido, os fungos causadores desses tipos de degradação devem produzir compostos com massa molar relativamente baixa, os quais poderiam difundir-se pela parede celular e degradar os componentes ali existentes. Com isso, desestruturariam a parede celular a ponto de permitir a subsequente penetração de enzimas lignocelulolíticas, o que ocorreria nos estágios mais avançados de degradação. Um conjunto de resultados recentes reforça a hipótese de que a degradação da matriz lignocelulósica da madeira não é resultado somente da atividade enzimática, mas principalmente o resultado da ação de agentes não enzimáticos de baixa massa molar (BLANCHETTE et al., 1997; GOODELL et al., 1997).

Muitos trabalhos sugeriram que enzimas são grandes para penetrarem na parede celular intacta, porém poucos trabalhos realmente demonstram a impermeabilidade das enzimas lignocelulolíticas na parede celular nos estágios iniciais de degradação. Dentre estes, Srebotnik et al. (1988) e Messner e Srebotnik (1994) observaram que LiP e proteínas de alta massa molar não difundem na parede celular até que estágios avançados de degradação sejam evidentes. Mais tarde, BLANCHETTE et al. (1997) utilizando proteínas como marcadores mostraram claramente que durante a degradação de *Pinus* sp. por *C. subvermispora*, um fungo causador de degradação branca seletiva, a porosidade da parede celular gradualmente aumenta com o aumento do tempo de biodegradação. Estes autores verificaram que a insulina (5.730 Da), que possui massa molar muito inferior às enzimas lignocelulolíticas, penetrou em regiões mais externas da parede secundária após duas semanas de incubação, enquanto a mioglobina (17.600 Da) penetrou na parede celular somente após quatro semanas de degradação, quando uma alteração apreciável da parede celular começou a ser observada. Estes resultados indicam que proteínas com tamanho similar, como por exemplo, xilanases, são aparentemente impedidas de penetrar na parede secundária até que uma alteração apreciável da mesma tenha ocorrido. Ovalbumina (44.287 Da), que possui massa

molar similar à LiP, MnP e outras enzimas degradativas, permeou somente após oito semanas de degradação, quando a madeira já estava em estágios bem avançados de decomposição e extensiva desruptura da parede celular era evidente.

Somado a estas evidências está o fato de que o grupo heme da LiP está dentro da proteína e apresenta somente uma pequena abertura, a qual conecta o sítio ativo com a parte externa da enzima (POULOS et al., 1993), onde moléculas pequenas poderiam difundir-se para dentro e para fora desta abertura. Entretanto, não há evidências de que uma macromolécula como a lignina possa acessar o sítio ativo através desta abertura (HARVEY; SCHOEMAKER; PALMER, 1986; POULOS et al., 1993). Assim, o envolvimento de mediadores de baixa massa molar torna-se plausível.

Todos esses antecedentes, e outros existentes na literatura, reforçam a teoria de que a degradação da matriz lignocelulósica da madeira não é resultado somente da atividade enzimática, mas, também, o resultado da ação de diversos agentes não enzimáticos de baixa massa molar, principalmente nos estágios iniciais.

2.2.5 CBMM envolvidas na biodegradação da madeira

Os CBMM produzidos como resultado do metabolismo de fungos de decomposição branca e/ou parda até agora identificados e relacionados à degradação dos componentes da parede celular da madeira, estão listados na Tabela 1. A atuação direta ou associada as enzimas ligninolíticas compõem diferentes sistemas degradativos, e promovem a geração de diferentes espécies oxidativas de baixa massa molar que poderiam, então, atuar sobre os componentes da parede celular.

2.2.5.1 Lacase/Mediador

A lacase, com seu relativo baixo potencial redox (cerca de 0,6 – 0,8 V) está restrita a reagir com substâncias facilmente oxidáveis, como por exemplo, fragmentos fenólicos de lignina (HAVE; TEUNISSEN, 2001). Apesar disso, a inclusão de substâncias oxidáveis de baixa massa molar, conhecidas como mediadores, expande a atividade oxidativa desta enzima (BOURBONNAIS; PAICE, 1992; POTTHAST et al., 1995).

Tabela 1 – CBMM produzidos por fungos degradadores de madeira e seus respectivos sistemas degradativos propostos.

CBMM	Sistema Degradativo	Tipo de Degradação
ácido 3-hidroxi-antranílico	lacase/mediador	branca
ácidos carboxílicos ⁽¹⁾	oxalato (ataque direto)	branca,parda
	oxalato-Mn ³⁺ /MnP	branca
ácidos graxos insaturados ⁽²⁾	peroxidação de ácidos graxos	branca
álcool veratrílico (AV)	AV-LiP	branca
	AV-LiP/oxalato-Mn ³⁺	branca
compostos aromáticos clorados (CACI) ⁽³⁾	CACI-LiP	branca
compostos redutores de Fe ³⁺ ⁽⁴⁾	reação de Fenton mediada	parda
peptídeos	reação de Fenton mediada	branca,parda

Exemplos: ¹ ácido oxálico; ² ácido linoléico; ³ 2-cloro-1,4-di-metoxi-benzeno; ⁴ compostos do tipo catecol.

Um mediador é uma molécula de baixa massa molar que atua como um carreador de elétrons. Após ser oxidado pela enzima, difunde-se para fora do sítio ativo e ao encontrar o substrato retira seus elétrons, que não são diretamente oxidados pela enzima por impedimentos estéricos ou termodinâmicos. Dessa forma, este processo pode levar a um mecanismo de oxidação que não seria possível para a enzima sozinha, já que o radical formado a partir do mediador pode apresentar potencial de oxidação mais elevado que o da própria enzima, estendendo, portanto, a faixa de substratos oxidáveis (BANCI; CIOFI-BAFFONI; TIEN, 1999; CANTARELLA; GALLI; GENTILI, 2003).

O ácido 3-hidroxi-antranílico, um metabólito produzido pelo fungo de decomposição branca *P. cinnabarinus*, é o único mediador natural de lacase descrito até o momento, o qual proporciona a formação de um radical capaz de degradar porções de lignina não fenólica (EGGERT et al., 1996). Por outro lado, Li et al. (2001) mostraram que um mutante de *P. cinnabarinus*, deficiente na produção do ácido 3-hidroxi-antranílico, foi capaz de degradar eficientemente lignina, sugerindo que a presença deste mediador não foi necessária para a degradação efetiva da lignina ou que o fungo possa ter utilizado um outro mecanismo para a degradação. Resultados mais recentes demonstraram que compostos modelo de lignina foram eficientes mediadores de lacase (CAMARERO et al., 2007), indicando um possível envolvimento dos produtos de degradação da lignina e extrativos solúveis de baixa

massa molar como mediadores naturais de lacase durante a biodegradação da madeira por fungos de decomposição branca, principalmente nos estágios iniciais de biodegradação.

2.2.5.2 Álcool veratrílico-LiP

O álcool veratrílico (álcool 3,4-dimetoxi-benzílico, AV) é um metabólito secundário de baixa massa molar produzido e acumulado no meio extracelular de fungos de decomposição branca (SHIMADA et al., 1981; ZAPANTA; TIEN, 1997), principalmente aqueles que secretam LiP (ed JONG; FIELD; BONT, 1994).

O AV pode atuar como um mediador redox difusível da LiP. Neste mecanismo a oxidação de AV envolve a transferência de um elétron do composto I (espécie enzimática ativa), formada pela oxidação da enzima nativa com H_2O_2 , levando a formação de um radical catiônico ($AV^{+\bullet}$) (GILARDI et al., 1990; HARVEY et al., 1986; HAVE et al., 2001; KHINDARIA et al., 1995a; ZAPANTA; TIEN, 1997) ao passo que o composto I é reduzido a composto II. Este radical catiônico, de elevado potencial oxidativo e de baixa massa molar, poderia então difundir-se na parede celular vegetal e iniciar a degradação da lignina (Figura 3).

Figura 3. Álcool veratrílico como um mediador redox na oxidação da lignina catalisada por LiP.

Fonte. Adaptado de Baciocchi et al. (2002).

Um ponto crucial para determinar se AV pode atuar como um mediador redox difusível é estabelecer o tempo de vida da espécie AV^{++} , sendo que somente um radical com um tempo de vida suficientemente longo poderia difundir-se a certa distância da enzima induzindo a oxidação da lignina. Neste sentido, algumas tentativas foram feitas para medir o tempo de vida do AV^{++} . Em três estudos, este radical foi gerado quimicamente e sua decomposição foi monitorada espectrofotometricamente e a constante de velocidade de decomposição de primeira ordem foi de 17 s^{-1} , que corresponde a um tempo de meia vida de 41 ms, ou seja, um valor considerado pelos autores suficiente para permitir a oxidação de uma macromolécula a uma considerável distância da enzima (BACIOCCHI; BIETTI; STEENKEN, 1998; BALCIOCCHI et al.; 2002; CANDEIAS; HARVEY, 1995). Isto fornece evidência para a teoria de que AV^{++} pode servir como um mediador redox difusível entre LiP e a lignina. Contrariamente, Khindaria, Yamazaki e Aust (1995b, 1996) encontraram um valor completamente diferente para a decomposição do AV^{++} ($1,2 \times 10^{-3}\text{ s}^{-1}$, tempo de meia vida 0,58 ms), também gerado quimicamente, porém monitorado por ressonância paramagnética eletrônica. Com este valor, AV^{++} poderia não ser estável o suficiente para atuar como um oxidante difusível. Entretanto, quando AV^{++} foi gerado pela oxidação com LiP, a velocidade de decomposição foi muito lenta ($1,85\text{ s}^{-1}$). Assim, a formação de um complexo LiPII- AV^{++} com tempo de vida maior foi sugerido, o qual poderia ser a espécie que atua como mediador redox na oxidação da lignina (KHINDARIA; YAMAZAKI; AUST 1995b e 1996). Com base nessas observações, os autores sugeriram que AV^{++} gerado enzimaticamente pode atuar como um mediador redox somente como uma espécie ligada à enzima, e não como um oxidante difusível para degradação de lignina catalisada por LiP.

Por outro lado, Popp, Kalyanaraman e Kirk (1990) demonstraram que na presença de ácido oxálico (ou malônico) e AV, Mn^{2+} é oxidado a Mn^{3+} indiretamente por LiP. O mecanismo proposto pelos autores depende da oxidação do oxalato por AV^{++} , resultando na formação do radical ânion carboxilato ($CO_2^{\cdot-}$), que reduz O_2 ao radical superoxiânion ($O_2^{\cdot-}$), que por sua vez oxida Mn^{2+} a Mn^{3+} (Figura 4). A produção de Mn^{3+} é importante porque ele pode servir como um oxidante difusível quando adequadamente que lado (para promover estabilização de Mn^{3+}), como por exemplo, pelo ácido oxálico (BENSON, 1976), como descrito em mais detalhes no item 2.2.5.5.

Figura 4. Mecanismo proposto para a oxidação de Mn^{2+} por LiP na presença de álcool veratrílico (AV), ácido oxálico (OA), e oxigênio.

Fonte. Adaptado de Popp, Kalyanaraman e Kirk (1990).

2.2.5.3 Compostos aromáticos clorados- LiP

Em uma revisão da literatura feita a pouco mais de uma década, de Jong e Field (1997) relacionaram 81 compostos halogenados produzidos por 46 gêneros diferentes de basidiomicetos, especialmente fungos de decomposição branca. Dentre estes compostos, 66 eram aromáticos halogenados produzidos por 35 gêneros diferentes, sendo os mais comuns os metoxi-benzílicos clorados (de JONG; FIELD, 1997).

Por meio de vários trabalhos o grupo de Teunissen (TEUNISSEN et al., 1998; TEUNISSEN; FIELD, 1998) demonstrou que o metabólito 2-cloro-1,4-dimetoxi-benzeno pode atuar como um mediador de baixa massa molar da LiP . Teunissen et al. (1998) mostram a partir de análises por ressonância paramagnética eletrônica e espectroscopia de UV/visível a formação de um radical relativamente estável durante a oxidação de 2-cloro-1,4-dimetoxi-benzeno por LiP , indicando uma possível habilidade deste radical em difundir-se a certa distância da enzima. Contudo, ainda não é certo se 2-cloro-1,4-dimetoxi-benzeno está na verdade envolvido na biodegradação da lignina, uma vez que sua biossíntese não coincide com a produção de LiP , como mostrado para AV (ten HAVE; TEUNISSEN, 2001).

De acordo com ten Have e Teunissen (2001), vários autores têm mostrado que 2-cloro-1,4-dimetoxi-benzeno pode substituir AV na oxidação de corantes azo e do corante polimérico Poly R-478 por LiP , sendo que os azo foram somente oxidados na presença de mediador.

2.2.5.4 Peroxidação de ácidos graxos

Ácidos graxos são encontrados naturalmente na madeira (extrativos) ou produzidos durante a biodegradação da mesma (FENGEL; WEGNER, 1989). A peroxidação de ácidos graxos insaturados gera radicais livres, principalmente o radical peroxila, que possuem potencial de oxidação suficientemente elevado para oxidar as subestruturas não fenólicas da lignina, e tem sido sugerida como uma via oxidativa para explicar a abstração de elétrons de subestruturas não fenólicas da lignina por fungos de decomposição branca deficientes em LiP (HAMMEL et al., 2002; HOFRICHTER, 2002; JENSEN et al., 1996; KAPICH; JENSEN; HAMMEL, 1999; SREBOTNIKI et al., 1997).

Basicamente o processo de peroxidação de ácidos graxos consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo insaturado (R) para produzir um hidroperóxido (ROOH) como produto primário inicial. Este processo pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação (Figura 5). A reação inicial ocorre pela ação de alguma fonte externa de energia, como calor, luz, radiação ou por meio de reações químicas, como as que envolvem íons metálicos. O ácido graxo insaturado sofre ataque de uma espécie oxidante, que é suficientemente reativa para abstrair um hidrogênio a partir de um grupo metileno (CH_2), formando um radical centrado no carbono ($\text{R}\cdot$). Este radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999), o qual reage com oxigênio formando o radical peroxila ($\text{ROO}\cdot$) (SOUTHORN e GARTPH, 1988). Este radical pode oxidar um novo grupo CH_2 alílico promovendo a etapa de propagação, abstrair um hidrogênio de algum doador e gerar um hidroperóxido (ROOH) (que é instável e irá se decompor) ou ainda dar origem a etapa de terminação, que envolve o acoplamento de radicais originando produtos não radicalares (GARDNER, 1989; GUTTERIDGE, 1999; HALLIWELL; LIMA; ABDALLA, 2001).

Durante a biodegradação da madeira, a peroxidação de lipídeos poderia ser mediada por MnP em uma reação iniciada por Mn^{3+} , gerado pela MnP (Figura 6) (WATANABE et al., 2000). Metais de transição (como Fe^{2+} e Cu^{1+}), o radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$) e o radical hidroperoxila ($\text{HOO}\cdot$), que resulta da protonação do radical superoxiânion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) em pHs abaixo de 4,7, também podem ser reduzidos à custa da

Figura 5. Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação de ácido graxo.

Fonte. Adaptado de Lima e Abdalla (2001).

Figura 6. Mecanismo proposto de peroxidação de ácido graxo insaturado e geração de radical peroxila.

Fonte. Adaptado de Hofrichter (2002).

oxidação de ácidos graxos insaturados (LIMA; ABDALLA, 2001). O papel do ferro na reação de iniciação da peroxidação de ácidos graxos tem sido estudado em uma variedade de sistemas. Fe^{3+} ou Fe^{3+} -complexado pode iniciar as reações de peroxidação desde que um agente redutor esteja presente para reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} (BRAUGHLER et al., 1986).

Recentemente, Kapich, Galkin e Hatakka (2007) demonstraram que ácidos fenólicos sintéticos e uma mistura de compostos fenólicos naturais inibem, mas não previnem, a peroxidação do ácido graxo insaturado ácido linoléico mediada por MnP e, também, a degradação de compostos modelo de lignina não fenólica. A inibição da peroxidação do ácido linoléico foi afetada principalmente por compostos com hidroxilas fenólicas livres e parece ser proporcional a quantidade dessas hidroxilas. Uma vez que intermediários com hidroxilas fenólicas livres podem ser formados durante a biodegradação da madeira por fungos, a real extensão da participação da peroxidação de ácidos graxos mediada por MnP na oxidação da lignina torna-se questionável.

Por outro lado, Srebotnik e Boisson (2005) demonstraram que lacase na presença de um mediador fenólico, como o ácido 4-hidroxi-benzóico ou uma preparação de lignina fenólica, pode catalisar reações que resultem na peroxidação do ácido linoléico, as quais foram largamente estimuladas quando o meio reacional continha Mn^{2+} . Os autores demonstraram que os radicais fenoxila formados podem oxidar Mn^{2+} a Mn^{3+} , que inicia a peroxidação do ácido linoléico, como já descrito para as reações de peroxidação catalisadas por MnP. Contudo, até o momento não foi descrita a degradação de porções de lignina não fenólica pelo sistema lacase/peroxidação de ácidos graxos.

2.2.5.5 Ácido Oxálico

Várias funções importantes têm sido atribuídas ao ácido oxálico durante a biodegradação da madeira, tanto por fungos de decomposição branca quanto parda (GOODELL et al., 1997; HOFRICHTER et al., 1999; URZÚA et al., 1998).

O ácido oxálico pode atuar de forma direta, através de um ataque sobre a celulose e polioses na madeira provocando hidrólise ácida (HIGHLEY; DASHEK, 1998), ou pelo abaixamento do pH no micro-ambiente próximo à hifa fúngica, protegendo o fungo, por exemplo, contra a geração de espécies de oxigênio reativo

(ROS) próximo à hifa (GOODELL et al., 1997). De acordo com Lequart et al. (1998) o ácido oxálico pode, também, reduzir MnO_2 presente na forma de precipitados escuros na madeira a Mn^{2+} , Mn^{3+} e outras espécies oxidantes que promovem a quebra de ligações $\beta\text{-O-4}$ em lignina de palha de trigo, atacam as microfibrilas de celulose e causam uma disruptura estrutural, o que facilita o processo de degradação enzimática (AUST, 1995; CAMERON; AUST, 1999). O ácido oxálico pode, também, quelar cálcio da parede celular, o que poderia provocar o aumento da porosidade da parede celular e a desestruturação entre microfibrilas (MEYER-PINSON et al., 2004). Jellison et al. (1997) sugeriam que a formação de oxalato de cálcio pode ser considerada também uma forma de proteção do fungo quanto à toxicidade do ácido oxálico em excesso.

Ácido oxálico também pode atuar de forma indireta, auxiliando a ação de outros metabólitos ou certos sistemas reacionais para degradar os componentes da madeira. Por exemplo, o grupo de Goodell (GOODELL et al., 1997; XU; GOODELL, 2001) sugere que o ácido oxálico produzido por fungos de decomposição parda auxilia a reação de Fenton, solubilizando Fe^{3+} e transportando-o de regiões de pH mais ácido (ao redor da hifa fúngica) para regiões na madeira com o pH menos ácido, permitindo, então, a redução de Fe^{3+} por compostos fúngicos redutores de ferro e a formação de radicais hidroxila pela reação de Fenton a certa distância da hifa fúngica. Em outro exemplo, o ácido oxálico produzido por fungos de decomposição branca parece ter um papel fundamental na difusão de Mn^{3+} , proveniente da oxidação de Mn^{2+} no ciclo catalítico da MnP. Oxalato quela Mn^{3+} e o complexo estável Mn^{3+} -oxalato é capaz de oxidar subestruturas de ligninas não fenólicas distante da MnP (HOFRICHTER, 2002), ou seja, em pontos distantes da hifa (MESSNER et al., 2001). Oxalato também pode atuar como um mediador natural de MnP e LiP durante a biodegradação, uma vez que estas enzimas são capazes de decompor oxalato na presença de Mn^{3+} ou AV (Figura 4), respectivamente (ten HAVE; TEUNISSEN, 2001). A quebra do oxalato resulta na geração de CO_2 e $\text{CO}_2^{\cdot-}$, que é em seguida oxidado por O_2 para gerar CO_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$, radical também sugerido como agente oxidativo da lignina (ten HAVE; TEUNISSEN, 2001).

Por outro lado, oxalato pode ser produzido em concentrações inibitórias para a reação de Fenton (HIGHLEY; DASHEK, 1998). Schimidt et al. (1981) reportaram que a degradação de celulose pelo sistema Fenton *in vitro* é inibida por elevadas

concentrações de ácido oxálico. Entretanto, elevadas concentrações extracelulares de ácido oxálico em fungos de decomposição parda podem auxiliar no abaixamento do pH extracelular na madeira, mobilizar Fe^{3+} e prevenir a geração de radicais hidroxila pela reação de Fenton próximo à hifa fúngica, o que seria danoso para o próprio fungo (GOODELL et al. 1997).

Contudo, embora diversas funções tenham sido atribuídas ao ácido oxálico durante a biodegradação da madeira por fungos de decomposição branca e parda, ainda não se sabe ao certo como sua concentração é regulada no ambiente próximo a hifa fúngica.

2.2.5.6 Reação de Fenton mediada

2.2.5.6.1 Fundamentos da reação de Fenton

A reação de Fenton é baseada na reação entre peróxidos (normalmente H_2O_2) e ferro em meio ácido para a formação de ROS, principalmente o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$). De uma forma geral, os mecanismos da reação de Fenton podem ser representados pelas seguintes equações (Eq. 1-5):

Fe^{3+} (adicionado ou gerado a partir de Fe^{2+} na eq. 1) resulta nas seguintes etapas:

A partir das equações acima, verifica-se que o ferro cicla entre Fe^{2+} e Fe^{3+} , e duas fases reacionais podem ser distinguidas. Na primeira fase, Fe^{2+} inicia a decomposição de H_2O_2 em uma reação muito rápida ($k_1 = 63 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (KANG; LEE; YOON, 2002)) resultando na geração de $\bullet\text{OH}$ (Eq. 1). Depois que a maior parte de Fe^{2+} é oxidada a Fe^{3+} , a segunda fase torna-se predominante, envolvendo uma seqüência de reações de propagação entre Fe^{3+} e H_2O_2 (Eq. 2) ou $\text{HO}_2\bullet$ (Eq. 5), as quais formam um ciclo que se mantém pela regeneração de Fe^{2+} . Contrário à

primeira fase, a segunda fase é muito mais lenta, representada principalmente pela baixa constante de velocidade da Eq. 2 ($k_2 = 0,01 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (KANG; LEE; YOON, 2002)).

Um das características da oxidação química usando a reação de Fenton é que o pH é uma variável chave na eficiência do tratamento, sendo mais efetivo na produção de ROS em condições ácidas, mais precisamente em valores de pH entre 2 – 3, e torna-se ineficiente à medida que o pH é aumentado. Este decréscimo na eficiência é atribuído à formação e precipitação de hidróxidos ($\text{Fe}_x(\text{OH})_y$), os quais têm uma baixa atividade e não reagem com peróxido de hidrogênio (SYLVA, 1972). Dessa forma, a concentração de ferro em solução é reduzida e a eficiência da reação é diminuída devido a precipitação.

O radical hidroxila ($E^0 = 2,3 \text{ V}$) pode de forma rápida, eficiente e não seletiva oxidar uma grande variedade de compostos orgânicos através da abstração de hidrogênio de estruturas alifáticas ou pela adição como um eletrófilo a anéis aromáticos (hidroxilação), mesmo em posições substituídas promovendo reações de desmetoxilação (HAMMEL et al., 2002), desalogenação (FUKUSHIMA; TATSUMI, 2001; KRAMER et al., 2004; SCHLOSSER et al., 2000), desnitração (LI et al., 1998), desaminação (FUKUSHIMA; TATSUMI; MORIMOTO, 2000), descarboxilação (CHEN et al., 2002a; NAPPI; VASS, 1997) e desalquilação (SUN; PIGNATELLO, 1992, 1993).

2.2.5.6.2 Reação de Fenton e a biodegradação da madeira

A teoria de que fungos decompositores de madeira utilizam ROS para degradar madeira data da segunda metade do século passado (HALLIWELL, 1965; KOENINGS, 1974a). Em 1965, Halliwell (1965) observou que o radical hidroxila, ou um agente oxidante similar, gerado pela reação de Fenton era destrutivo à celulose, e foi o primeiro a propor a existência de um sistema celulolítico não enzimático envolvendo ferro e peróxido durante a biodegradação da madeira. Subseqüentemente, Koenigs (1972a,b 1974a,b, 1975) demonstrou que celulose na madeira pode ser despolimerizada pelo reagente de Fenton, que fungos de decomposição parda produzem peróxido de hidrogênio extracelular, e que a madeira contém ferro suficiente para suportar a hipótese de Halliwell. Vários outros trabalhos da época também sugeriram a participação da reação de Fenton durante a biodegradação da madeira após demonstrarem a similaridade entre a celulose

degradada pela reação de Fenton e por fungos de decomposição parda (HIGHLEY, 1977; KIRK et al., 1989, 1991). Estudos mais recentes com fungos de decomposição parda crescidos em meio líquido definido demonstram que estes fungos usam radicais hidroxila para iniciar a degradação de vários polímeros sintéticos e organopolutantes (COHEN et al., 2002; KEREM; BAO; HAMMEL, 1998; KRAMER et al., 2004; NEWCOMBE et al., 2002; SCHLOSSER et al., 2000; WETZSTEIN; SCHMEER; KARL, 1997).

O radical hidroxila pode abstrair hidrogênio de subunidades de açúcar de polissacarídeos como a celulose, com elevada constante de velocidade ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (GIERER; JANSBO, 1989). Estas reações produzem radicais centrados no carbono que reagem rapidamente com O_2 gerando espécies $\text{ROO}^\bullet$. Se o radical organoperoxila já contém um grupo hidroxila no mesmo carbono, o $^\bullet\text{OOH}$ é eliminado, entretanto se o radical não tiver grupo α -hidroxila, ele sofre uma variedade de reações de oxi-reduções, algumas das quais resultam na quebra da cadeia polissacarídica (HAMMEL et al., 2002). A Figura 7 mostra uma das muitas rotas possíveis para a oxidação da celulose por $^\bullet\text{OH}$. Nesta rota é mostrada a quebra da

Figura 7. Uma das possíveis mecanismos para a oxidação da celulose por $^\bullet\text{OH}$.
Fonte. Hammel et al. (2002).

ligação glicosídica e a geração de ácido glucônico (como a lactona), que é uma reação, também, promovida por fungos de decomposição parda (KIRK et al., 1991).

No caso da lignina, estudos com compostos modelo indicam que $\bullet\text{OH}$ ataca subunidades da lignina com elevada constante de velocidade (ao redor de $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (GIERER; JANSBO, 1989)) tanto para a abstração de hidrogênio do C_α quanto pela adição ao anel aromático. Reações típicas de $\bullet\text{OH}$ com a lignina (desmetoxilação, hidroxilação e oxidação do C_α) estão esquematizadas na Figura 8. Quando ocorre a abstração de hidrogênio, o produto é uma cetona benzílica, ao passo que a adição ao anel forma um radical ciclohexadienil hidroxilado que em condição ácida pode reagir com um próton e eliminar água, assim, gerando um radical aril que sofre quebra da ligação carbono-carbono e outras reações degradativas (GIERER, 1990). Entretanto, dados publicados indicam que é mais provável que o radical ciclohexadienil se decomponha em outros produtos, no qual o anel aromático torna-se hidroxilado (GIERER, 1990; TATSUMI; TERASIMA, 1985). Por exemplo, quando a adição de $\bullet\text{OH}$ ocorre em posição não substituída do anel, o radical é oxidado e perde um próton para introduzir um novo grupo hidroxila fenólico. Por outro lado, quando uma posição com um substituinte metoxila é atacada, metanol é eliminado e um radical fenoxila é produzido. A redução deste intermediário resulta em uma hidroxila fenólica na posição inicial do grupo metoxila, a menos que ele se polimerize (GIERER, 1990). Uma reação análoga é o ataque na posição do anel que contém uma ligação $\beta\text{-O-4}$, mas nesse caso ocorre a quebra da macromolécula (TATSUMI; TERASIMA, 1985).

Estes estudos mostram que a oxidação da lignina por $\bullet\text{OH}$ resulta em várias reações similares ao ataque de fungos de decomposição parda, que durante a biodegradação modificam a lignina principalmente através de desmetoxilação/hidroxilação (ANDER et al., 1988; ENOKI et al., 1988; FILLEY et al., 2000), o que evidencia uma possível participação de $\bullet\text{OH}$ durante a modificação oxidativa da lignina por fungos de decomposição parda.

A partir de todas essas evidências e muitas outras encontradas na literatura, a reação de Fenton parece ser uma rota plausível para a produção de ROS durante a biodegradação da madeira. Embora múltiplas teorias tenham sido propostas para explicar a geração de Fe^{2+} a partir do Fe^{3+} presente na madeira na forma de hidr(óxidos) insolúveis, e a produção de peróxido de hidrogênio extracelular, muito pouco se sabe a respeito das modificações causadas aos componentes da madeira

Figura 8. Reações típicas de $\cdot\text{OH}$ com a estrutura principal da lignina (arilglicerol- β -aril éter).
Fonte. Adaptado de Hammel et al. (2002).

pela reação de Fenton gerada *in vivo*.

As vias até agora propostas para a produção do reagente de Fenton (Fe^{2+} e H_2O_2) *in vivo* incluem a participação de CBMM com capacidade de reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} (peptídeos e compostos aromáticos) além da enzima CDH.

2.2.5.6.2.1 Peptídeos

A primeira evidência do envolvimento de metabólitos extracelulares de natureza protéica na geração de radicais hidroxila por fungos degradadores de madeira foi sugerida pelo grupo de Enoki e Tanaka (ENOKI; TANAKA; FUSE, 1989), quando observaram uma relação entre a oxidação de monômeros de lignina e celulose (papel de filtro) e do ácido 2-ceto-4-tiometilbutírico (KTBA) por frações protéicas extracelulares parcialmente purificadas de fungos de decomposição parda. Os autores observaram que a produção de etileno a partir da oxidação de KTBA pelas frações protéicas, era inibida quando a mistura reacional, contendo a proteína extracelular, foi autoclavada previamente à adição de KTBA ou quando as reações de oxidação de KTBA foram inibidas por seqüestradores de radicais hidroxilas.

Em vários trabalhos posteriores o mesmo grupo isolou os metabólitos protéicos extracelulares a partir de culturas de fungos de decomposição branca e parda cultivados em cavacos de madeira. Os compostos parcialmente purificados (foram caracterizados como glicopeptídeos de baixa massa molar (1 – 5 kDa) capazes de quelar Fe^{3+} , reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} e com elevada afinidade por Fe^{2+} . Estes metabólitos foram capazes de catalisar reações de oxi-redução entre O_2 e doadores de elétrons, como o NADH (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzido), produzindo H_2O_2 via $\text{O}_2^{\cdot-}$, que então reagiu com o Fe^{2+} para gerar radicais hidroxila (ENOKI; HIRANO, TANAKA, 1992; ENOKI; ITAKURA; TANAKA, 1997; ENOKI; TANAKA, ITAKURA, 2003; HIRANO; ENOKI; TANAKA, 2000; HIRANO; TANAKA; ENOKI, 1995; TANAKA et al., 1991, 1996; TANAKA; ITAKURA; ENOKI, 1999). Com base nestes resultados, o grupo sustenta a teoria que no estágio inicial de degradação da parede celular da madeira por fungos causadores de decomposição branca e parda, ocorre a secreção de glicopeptídeos de baixa massa molar, que reduzem Fe^{3+} presente na madeira e se complexam com o Fe^{2+} produzido. O complexo glicopeptídeo- Fe^{2+} então catalisa reações de oxi-redução entre O_2 e um doador de elétrons para produzir peróxido de hidrogênio. Posteriormente, o complexo glicopeptídeo- Fe^{2+} reduz o peróxido de hidrogênio gerando radicais hidroxila via reação de Fenton, que ataca oxidativamente os constituintes da madeira (ENOKI; HIRANO, TANAKA, 1992; HIRANO; TANAKA; ENOKI, 1995; TANAKA et al., 1996) (Figura 9). Entretanto, este modelo oxidativo ainda requer mais estudos, uma vez que até o momento não há trabalhos que reportem a

Figura 9. Mecanismo proposto para a geração do radical hidroxila pela reação de Fenton mediada por glicopeptídeos de baixa massa molar produzidos por fungos de decomposição branca e parda.

Fonte. Adaptado de Enoki, Itakura e Tanaka (1997).

produção extracelular de NADH por fungos degradadores de madeira. Além disso, se este modelo for realmente utilizado por estes fungos, é provável que algum outro composto possa atuar como doador de elétron ao invés de NADH.

Através de vários trabalhos, o grupo de Gao também propõe a participação de peptídeos de baixa massa molar na produção de radicais hidroxila via reação de Fenton, tanto em fungos de decomposição branca, quanto em fungos de decomposição parda (WANG; GAO, 2002, 2003; WANG et al., 2006; WANG; LIU; GAO, 2002; YANG et al., 2004).

Wang e Gao (2002, 2003) isolaram e purificaram um peptídeo de baixa massa molar de culturas de *G. trabeum* contendo cavacos de madeira. A composição de aminoácidos foi Asp-Thr-Ser-Glu-Gly-Ala-Cys-Val-Met-Ile-Leu-Tyr-Phe-Lys-Arg-Trp, e de acordo com a análise de aminoácido a massa molar mínima foi estimada em 4 kDa. Este metabólito teve alta termoestabilidade (somente 20% da atividade foi perdida depois de 24 h a 60°C), apresentou ponto isoelétrico (pI) 6,6, teve alta afinidade por Fe^{3+} e pode reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} . O Fe^{2+} produzido oxidou O_2 à $\text{O}_2^{\cdot-}$, formando H_2O_2 que produziu $\bullet\text{OH}$ através da reação de Fenton entre H_2O_2 e Fe^{2+} .

Quando este mesmo peptídeo e ferro foram incubados durante 30 min a 50°C com carboximetilcelulose (CMC) a viscosidade da solução diminuiu

praticamente pela metade, mas não foi detectada a formação de açúcares redutores. Quando o substrato foi o papel de filtro, a diminuição do grau de polimerização foi pequena mesmo após 3 dias de incubação, porém quando se utilizou a fibra de algodão o poder redutor aumentou gradualmente ao longo do período de 5 dias de incubação. Após incubar fibra de algodão finamente moída e sem extrativos por 3 dias, verificou-se através de análises de FT-IR que algumas das ligações de hidrogênio entre os grupos –OH da celulose foram rompidas após tratamento com o peptídeo e ferro. Análises de raio-X evidenciaram que a cristalinidade do algodão reduziu 49,8% e a microscopia eletrônica de varredura mostrou uma estrutura da celulose mais frouxa que no seu estado nativo, tornando-a mais susceptível à degradação (WANG; GAO, 2003).

Quando este mesmo peptídeo foi incubado na presença de Fe^{3+} e lignina, observou um ligeiro aumento na fração de baixa massa molar solúvel da lignina, e esse aumento foi proporcional à quantidade de peptídeo adicionada ao meio reacional (WANG et al., 2006). Os autores verificaram por espectrofotometria que a absorbância em 210 e 280 nm dos produtos solúveis aumentou, assim como ocorre nos ensaios com MnP e LiP (WANG et al., 2006). O envolvimento de radicais hidroxila foi sugerido desde que a adição de seqüestradores dos mesmos ao meio reacional promoveu uma diminuição da fração de baixa massa molar da lignina solúvel (WANG et al., 2006).

Em um outro trabalho do mesmo grupo, frações < 5 kDa foram isoladas de 57 fungos pertencentes a 34 espécies de fungos de decomposição branca, branda e parda, após extração com tampão acetato das culturas extracelulares obtidas em meio com material lignocelulósico (YANG et al., 2004). Todas as frações reagiram com o ácido tiobarbitúrico (TBA) proporcionando aumento de absorbância a 532 nm, resultado que foi interpretado como um indicativo a produção de radicais hidroxila por peptídeos presentes nestas frações < 5 kDa, o que levou os autores a sugerirem que a produção destes peptídeos de baixa massa molar capazes de catalisar reações que resultem na formação de $\bullet\text{OH}$ é universal em fungos celulolíticos, embora no trabalho não haja nenhum resultado que evidencie que os compostos presentes nas frações < 5 kDa que reagiram com TBA sejam peptídeos. É importante lembrar que o método TBA não é específico para a detecção da produção de radicais hidroxila, uma vez que diversos fatores podem afetar a intensidade da absorbância a 532 nm.

Recentemente, este mesmo grupo isolou um peptídeo de baixa massa molar (600 Da) contendo os aminoácidos Glu, Gly e Val de culturas extracelulares de *P. chrysosporium* (HU et al., 2006). Similarmente aos peptídeos previamente detectados pelo grupo (WANG; GAO, 2002, 2003; WANG et al., 2006; WANG; LIU; GAO, 2002; YANG et al., 2004) foi capaz de quelar Fe^{3+} e reduzi-lo a Fe^{2+} , porém diferenciou-se pela elevada termoestabilidade, atividade em pH levemente alcalino, pelo fato de não reagir com TBA e ser capaz de oxidar vários compostos fenólicos modelo de lignina como 2,6-dimetóxfenol, ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS) e siringaldazina, na ausência de Mn^{2+} e H_2O_2 . Um metabólito de baixa massa molar com capacidade de oxidar compostos modelo de lignina na ausência de peróxido de hidrogênio foi, também, isolado por Machuca, Aoyama e Durán (1999) de culturas extracelulares do ascomiceto *Thermoascus aurantiacus*.

2.2.5.6.2.2 Compostos aromáticos quelantes e redutores de Fe^{3+}

A produção de compostos quelantes de ferro por fungos degradadores de madeira foi primeiramente demonstrada por Fekete, Chandhoke e Jellison (1989). Em seguida, o grupo de Goodell e Jellison através de inúmeros trabalhos determinou a partir de compostos isolados de culturas extracelulares de *G. trabeum*, que estes quelantes são de baixa massa molar (CHANDHOKE et al., 1992; JELLISON et al., 1991; GOODELL et al., 1997; PASZCZYNSKI et al., 1999; XU; GOODELL, 2001) e que são principalmente compostos aromáticos como os derivados de ácido hidroxifenilacético, de ácido hidroxibenzoico e de hidroxibenzeno (GOODELL et al., 1997).

Goodell et al. (1997) utilizando uma fração de baixa massa molar (< 1 kDa) contendo uma mistura destes compostos obtidos, também, de *G. trabeum*, mostraram que esta fração foi capaz de reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} e promover maior formação de radicais hidroxila (atividade pró-oxidante) entre ferro e peróxido de hidrogênio. Com base nestes e outros resultados prévios do grupo, Goodell et al. (1997) postularam a hipótese de que estes compostos aromáticos de baixa massa molar com capacidade de quelar e reduzir íons Fe^{3+} poderiam estar envolvidos em um sistema oxidativo não enzimático durante a degradação da madeira por fungos de decomposição parda, através da mediação da reação de Fenton, para a geração de radicais hidroxila.

Resumidamente, a hipótese sugere que a hifa do fungo de decomposição parda crescendo no lúmen secreta ácido oxálico, quelantes aromáticos com atividade redutora de Fe^{3+} e peróxido de hidrogênio e estes reagentes difundem para a parede celular da madeira. O oxalato abaixa o pH ($\sim 2,5$) do ambiente de degradação e gera um gradiente de pH através da parede celular da madeira. O oxalato quebra o ferro ligado à celulose para formar complexos Fe-oxalato solúveis, que difunde na parede celular para uma região de pH mais elevado (pH 4 – 4,5) (Figura 10). Nesta região, o ferro é, então, seqüestrado deste complexo pelos quelantes aromáticos e é reduzido a Fe^{2+} . O Fe^{2+} então reage com peróxido de hidrogênio (reação de Fenton) para produzir radicais hidroxila, os quais são capazes de reagir tanto com lignina, quanto com os polissacarídeos presentes na parede celular da madeira (GOODELL et al., 1997).

Recentemente Arantes et al. (2008) mostraram evidências experimentais que corroboram a teoria proposta por Goodell et al. (1997) ao demonstrarem que ácido oxálico em elevadas concentrações é capaz de remover íons férricos presentes na madeira, e que complexos Fe-oxalato podem se difundir pela madeira, o que poderia, então, criar um gradiente de pH. Além disso, ao se difundirem, íons férricos estariam sendo transportados para uma região de pH menos ácido

Figura 10. Mecanismo proposto para a geração do radical hidroxila pela reação de Fenton mediada por compostos aromáticos com atividade redutora de Fe^{3+} produzidos por fungos de decomposição parda.

Fonte. Adaptado de Jellison, Goodell e Qian (2007).

(resultado do gradiente de pH), que então poderiam reagir com compostos redutores de ferro e promover a geração de radicais hidroxila, via reação de Fenton.

Através de vários trabalhos o grupo de Hammel tem, também, apresentado evidências de que o fungo de decomposição parda *G. trabeum* possui um sistema oxidativo extracelular representado pela reação de Fenton mediada por compostos quelantes aromáticos com atividade redutora de Fe^{3+} como um mecanismo oxidativo não enzimático de baixa massa molar utilizado para iniciar a biodegradação da madeira (COHEN et al., 2002, 2004; KEREM; BAO; HAMMEL, 1998; JENSEN et al., 2001, 2002; KEREM; JENSEN; HAMMEL, 1999; SUZUKI et al., 2006). Dois compostos do tipo quinona de baixa massa molar foram isolados de *G. trabeum*, 2,5-dimetoxi-1,4-benzoquinona e 4,5-dimetoxi-1,2-benzoquinona e suas respectivas formas reduzidas, 2,5-dimetoxi-1,4-hidroquinona e 4,5-dimetoxi-1,2-catecol. As formas reduzidas foram capazes de reduzir Fe^{3+} (JENSEN et al., 2001, 2002; KEREM; JENSEN; HAMMEL, 1999). Estas oxido-reduções envolvendo um-elétron geraram radicais semiquinona que foram posteriormente oxidados por outro íon Fe^{3+} , formando as benzoquinonas e Fe^{2+} . Nesta segunda etapa, O_2 também pode atuar como um aceptor de elétrons, sendo reduzido pelo radical semiquinona a $\text{HO}_2^\bullet/\text{O}_2^{\bullet-}$, que podem ser convertidos a H_2O_2 . Por fim, uma enzima presente no micélio reduziu estas quinonas para regenerar as hidroquinonas que são necessárias para produzir reagente de Fenton adicional (JENSEN et al., 2001; KEREM; JENSEN; HAMMEL, 1999) (Figura 11).

Uma quinona redutase dependente de NADH isolada do micélio de *G. trabeum* é a enzima responsável por reduzir quinona à hidroquinona, e usa 2,5-dimetoxi-1,4-benzoquinona e 4,5-dimetoxi-1,2-benzoquinona como aceptores de elétrons (COHEN et al., 2004; JENSEN et al., 2002; QI; JELLISON, 2004). Considerando que o fungo utilize esta enzima para regenerar hidroquinona, e conseqüentemente produzir Fe^{2+} e H_2O_2 (reagente de Fenton), os radicais hidroxila estariam sendo formados muito próximo da hifa fúngica, os quais poderiam causar danos ao próprio fungo. Dessa forma, a menos que o fungo disponha de um sistema de difusão da hidroquinona para participar de reações que gerem Fe^{2+} e H_2O_2 distante do fungo, e conseqüentemente um sistema de retorno da quinona para próximo da hifa, para que seja, então, reduzida regenerando a hidroquinona, é improvável que este sistema seja utilizado durante a biodegradação da madeira por fungos de decomposição parda.

Figura 11. Mecanismo proposto para redução extracelular de Fe^{3+} e produção de H_2O_2 pelo fungo *G. trabeum* envolvendo compostos aromáticos redutores de Fe^{3+} e uma quinona redutase micelial (DMBQ - 2,5-dimetoxi-1,4-benzoquinona e DMHQ - 2,5-dimetoxi-1,4-hidroquinona).

Fonte. Adaptado de Kerem, Jensen e Hammel (1999).

Com exceção de *Serpula lacrymans* (SHIMOKAWA et al., 2004) e algumas espécies de *Gloeophyllum* (NEWCOMBE et al., 2002), a teoria de que fungos de decomposição parda utilizam agentes quelantes aromáticos com atividade redutora de Fe^{3+} para mediar a reação de Fenton e gerar radicais hidroxila foi proposta e está até o momento baseada principalmente nos compostos isolados e caracterizados de culturas extracelulares de um único fungo de composição parda, *G. trabeum* (COHEN et al., 2002, 2004; CHANDHOKE et al., 1992; GOODELL et al., 1997; JELLISON et al., 1991; JENSEN et al., 2001, 2002; KEREM; BAO; HAMMEL, 1998; KEREM; JENSEN; HAMMEL, 1999; PASZCZYNSKI et al., 1999; XU; GOODELL, 2001; SUZUKI et al., 2006). Dessa forma, mais estudos são necessários para constatar se este sistema oxidativo de baixa massa molar envolvendo compostos redutores de ferro na geração de radicais hidroxila via reação de Fenton é comum entre os fungos de decomposição branca ou específico do gênero *Gloeophyllum*.

Recentemente, Filley et al. (2002) sugeriram que lignina desmetoxilada, produzida durante a biodegradação parda de madeira possa também funcionar como fonte de elétrons para redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} . Sendo assim, a biodegradação parda poderia ser então iniciada pela reação de Fenton mediada por compostos aromáticos fúngicos com atividade redutora de Fe^{3+} , e à medida que a degradação

parda avança, os próprios fragmentos da lignina poderiam então mediar futuras reações de Fenton (GOODELL et al., 2006).

2.2.5.6.2.3 Celobiose-desidrogenase (CDH)

CDH é uma enzima pertencente ao complexo celulolítico, produzida principalmente por fungos de decomposição branca, que oxida vários açúcares e reduz quinonas, O_2 , Fe^{3+} e Cu^{2+} . Ao reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} , o Fe^{2+} pode reagir com H_2O_2 (proveniente da redução de O_2 pela própria CDH ou por outras enzimas produtoras de peróxido), gerando radicais hidroxila via reação de Fenton, que podem atuar na despolimerização de polissacarídeos e na modificação estrutural da lignina (HENRIKSSON et al., 2000; KUHAD et al., 1997).

Hyde e Wood (1997) apresentaram um mecanismo envolvendo CDH no sistema Fenton para o fungo de decomposição parda *Coniophora putanea*. Na proposta apresentada, a secreção de CDH por *C. puteana*, fornece um mecanismo para a produção de Fe^{2+} na presença de oxalato (Figura 12). A reação requer um pH mais ácido (pH ao redor de 2,0) do que o da própria madeira. Neste valor de pH, CDH reduz Fe^{3+} a Fe^{2+} , e o Fe^{2+} é resistente à auto-oxidação e pode ter meia vida de uma hora ou mais. Durante este período, ocorreria a difusão de Fe^{2+} a certa distância da hifa fúngica, para uma região de pH menos ácido. Nesta região, o Fe^{2+} pode, então, ser auto-oxidado, através da transferência de um elétron do oxigênio molecular (Eq. 6), e o superoxiânion ($O_2^{\cdot-}$) formado é rapidamente removido pela reação com Fe^{2+} resultando na formação de H_2O_2 (Eq. 7). Assim, a parcial auto-oxidação cria a combinação Fe^{2+}/H_2O_2 permitindo que radicais hidroxila sejam gerados a certa distância da hifa.

2.3 Características e aplicações da reação de Fenton mediada por agentes redutores de Fe^{3+}

A característica principal da reação de Fenton mediada por agente redutor de ferro é sua atividade pró-oxidante, proveniente da ação do agente redutor, que atua reduzindo Fe^{3+} a Fe^{2+} , fazendo com que mais Fe^{2+} esteja prontamente

Figura 12. Modelo para produção do radical hidroxila, a certa distância da hifa envolvendo a enzima CDH e ácido oxálico.

Fonte. Adaptado de Hyde e Wood (1997).

disponível para reagir com peróxido de hidrogênio (ARANTES; BALDOCHI; MILAGRES, 2006; GOODELL et al., 1997), assim, prolongando a primeira fase da reação de Fenton (Eq. 1), que é muitas vezes mais rápida que a segunda fase (reação entre Fe^{3+} e peróxido de hidrogênio (Eq. 2)), conseqüentemente resultando na maior formação de ROS e maior oxidação do composto alvo (ARANTES; BALDOCHI; MILAGRES, 2006).

Pracht et al. (2001) investigaram a relação entre a estrutura e a reatividade de vários compostos aromáticos, como catecol, guaiacol, hidroquinona e resorcinol, com Fe^{3+} . Os autores mostraram que substratos fenólicos com dois grupos hidroxila na posição orto ou pelo menos um grupo hidroxila e um grupo metoxila podem ser oxidados a CO_2 enquanto Fe^{3+} é reduzido. Ainda concluíram que a mineralização do composto a partir de múltiplas reduções de Fe^{3+} depende da posição dos grupos hidroxilas.

O primeiro relato mostrando a oxidação de xenobióticos pela reação de Fenton catalisada por agentes redutores de ferro foi desenvolvido por Hamilton et al. (1966). Porém, somente após a descoberta de que este sistema oxidativo possa estar envolvido na biodegradação da madeira por fungos de decomposição branca e

parda, há pouco mais de uma década, é que alguns pesquisadores começaram a estudar o potencial da reação de Fenton mediada, utilizando principalmente derivados de fenóis e 1,2-benzenodiol (catecol), como um possível processo oxidativo avançado (POA).

Dentre estes trabalhos está o de Goodell et al. (1997), que utilizaram uma fração de baixa massa molar (<1 kDa) obtida da cultura de *G. trabeum*, contendo compostos do tipo catecol, com capacidade de quelar e reduzir Fe^{3+} , na degradação de pentaclorofenol (PCP) em pH 4,0 e na presença de H_2O_2 e Fe^{3+} ou Fe^{2+} . Os autores verificaram que PCP foi degradado mais rápido e significativamente na presença das frações <1 kDa, ferro (Fe^{3+} ou Fe^{2+}) e H_2O_2 , do que na presença somente do reagente de Fenton (Fe^{2+} e H_2O_2). Estes autores também observaram que quando somente Fe^{2+} e H_2O_2 estavam presentes, embora estes reagentes tenham produzido radicais hidroxila, a degradação não procedeu tão rápida como quando as frações <1 kDa de *G. trabeum* estavam presentes no meio reacional. De fato, algumas pesquisas têm mostrado que a degradação de moléculas orgânicas não polares, incluindo uma variedade de hidrocarbonetos e compostos aromáticos somente pela reação de Fenton (Fe^{2+} e H_2O_2) é limitada (CARBERRY; SANG, 1994).

Através de vários trabalhos o nosso grupo tem demonstrando a eficiência da reação de Fenton mediada em comparação com a reação de Fenton convencional na degradação de efluentes industriais (ARANTES; MILAGRES, 2007a,b), corantes sintéticos (ARANTES; BALDOCHI; MILAGRES, 2006; ARANTES; MILAGRES, 2007a) e compostos modelo de lignina (ARANTES; MILAGRES, 2007a). Estes trabalhos demonstram que a reação de Fenton na presença de uma determinada quantidade de agente redutor além de ser mais eficiente do que a reação de Fenton, amplia a faixa de pH em que a reação é eficiente (de pH 2 – 3 para pH 3 – 9).

2.4 Agentes quelantes de Fe^{3+}

O ferro é um dos micronutrientes inorgânicos mais importantes e necessários para a vida, pois participa nas mais diversas funções biológicas. Contudo, apesar de ser abundante na natureza na forma Fe^{3+} , esta forma é altamente insolúvel em pHs fisiológicos, e a concentração de íons férricos dissolvidos é relativamente baixa, insuficiente para manter o metabolismo celular de muitos microrganismos. Como resultado, vários microrganismos crescendo em

condições de baixa concentração de ferro produzem CBMM com elevada afinidade por Fe^{3+} , denominados sideróforos. A função destes compostos é seqüestrar e solubilizar Fe^{3+} para posterior assimilação (NEILANDS, 1984).

Dois mecanismos distintos têm sido reportados para a captação de ferro em fungos: no primeiro ocorre a assimilação redutiva do ferro, que depende da redução extracelular de Fe^{3+} a Fe^{2+} , e um outro denominado assimilação não redutiva do ferro, que depende da internalização do complexo Fe^{3+} -sideróforo (DE LUCA; WOOD, 2000; KOSMAN, 2003). Apesar de poucos estudos de captação de ferro em fungos, dados já reportados indicam que algumas espécies utilizam diversos mecanismos (KOSMAN, 2003).

Fungos degradadores de madeira produzem vários compostos quelantes de Fe^{3+} , como ácidos orgânicos e compostos do tipo sideróforos, com estruturas do tipo catecol e hidroxamato, porém, distinguem-se de outros fungos pela habilidade de produzir compostos do tipo catecol (ARANTES; MILAGRES, 2006a; GOODELL et al., 1997), os quais têm sido relacionados com o processo de biodegradação da madeira e não com os mecanismos de captação de ferro (GOODELL et al., 1997). Neste sentido, alguns trabalhos têm reportado que a produção de compostos quelantes de ferro por fungos degradadores de madeira é regulada pelo nível de ferro no meio extracelular (FEKETE; CHANKDHOKE; JELLISON, 1989; JELLISON; CHEN; FEKETE, 1997; JELLISON et al., 1991). Estes resultados podem ser um indicativo de que estes quelantes também estejam envolvidos com o processo de captação de ferro, considerando que estes fungos necessitam de ferro para várias funções biológicas, assim como para produção de algumas enzimas ligninolíticas. Assim, é esperado que eles também tenham um sistema específico para a captação de ferro em um ambiente deficiente neste metal, como a madeira.

2.5 *Perenniporia medulla-panis* e *Wolfiporia cocos*

Perenniporia medulla-panis (Jacq.) Donk 1967 é um fungo de decomposição branca pertencente à classe Basidiomycota, família Polyporaceae (INDEX FUNGORIUM, 2008), o qual tem sido descrito como um fungo degradador seletivo de lignina (BAILEY et al., 1992; BLANCHETTE, 1991; OTJEN; BLANCHETTE, 1985; MACHUCA; FERRAZ, 2001). Este fungo é produtor de enzimas oxidativas (MACHUCA; FERRAZ, 2001; MEDEIROS, 1999; MILAGRES; SALES, 2001; ORTH;

ROYSE; TIEN, 1993) como lacase (MACHUCA; FERRAZ, 2001; ORTH; ROYSE; TIEN, 1993) e MnP (ORTH; ROYSE; TIEN, 1993), porém não há relato da produção de LiP. Sendo assim, *P. medulla-panis* deve dispor de outro sistema oxidativo que atue juntamente com lacase e MnP para causar a degradação efetiva da lignina, uma vez que lacase e MnP atuando sozinhas podem apenas oxidar subestruturas fenólicas da lignina, que em média representa menos de 20% do total da lignina presente na madeira.

P. medulla-panis também produz enzimas hidrolíticas como xilanase, β -glucosidase (MACHUCA; FERRAZ, 2001; MILAGRES; SALES, 2001) e β -xilosidase (MILAGRES; SALES, 2001). Porém, a atividade oxidativa parece ser mais expressiva se comparada com a atividade hidrolítica (MILAGRES; SALES, 2001), o que pode ser responsável pela preferência deste fungo em degradar lignina.

Com relação aos CBMM produzidos por *P. medulla-panis* foram detectados por nosso grupo compostos quelantes de ferro, principalmente do tipo hidroxamato e ácido oxálico (MILAGRES et al., 2002). Quando uma fração extracelular de baixa massa molar (<5 kDa) produzida por este fungo, contendo ácido oxálico e quelantes do tipo hidroxamato, foi utilizada no tratamento de polpa Kraft de eucalipto, a mesma promoveu uma deslignificação seletiva e proteção de polpa. Comparado com outras frações <5 kDa de fungos de decomposição branca, os compostos de *P. medulla-panis* foram mais eficientes na degradação do corante polimérico Poly R-478, um indicador de atividade ligninolítica (MILAGRES et al., 2002).

Wolfiporia cocos (F.A. Wolf) Ryvarden & Gilb. 1984 é um fungo de decomposição parda, pertencente à classe Basidiomycota, família Fomitopsidaceae (INDEX FUNGORIUM, 2008), que durante muitos anos foi estudado por possuir elevada tolerância a cobre e preservativos de madeira à base de cobre (CLAUSEN et al., 2000; WOODWARD; DE GROOT, 1999). Este fungo produz enzimas hidrolíticas como xilanase, β -glicosidase (MACHUCA; FERRAZ, 2001; MILAGRES; SALES, 2001) e β -xilosidase (MILAGRES; SALES, 2001) e durante a biodegradação da madeira causa rápida despolimerização e remoção extensiva dos polissacarídeos (ERIKSSON et al., 1990; MACHUCA; FERRAZ, 2001). Entretanto, Machuca e Ferraz (2001) e Mendonça (1997) observaram perda substancial de lignina (lignina klason) (acima de 20% e entre 5 – 15%, respectivamente) durante a biodegradação de *Eucalyptus grandis* e, também, que esta perda era intensificada em estágios mais avançados de degradação, mesmo este fungo não produzindo enzimas oxidativas.

Utilizando meios sintéticos MEDEIROS (1999) e MILAGRES e SALES (2001) também verificaram que *W. cocos* não produz enzimas oxidativas. Estas informações sugerem que *W. cocos* deve empregar um outro sistema oxidativo que resulte nessa perda substancial de lignina.

Espejo, Agosin e Vicuña (1990) demonstraram que *W. cocos* é capaz de metabolizar compostos modelo de lignina do tipo 1,2-diariletano e verificaram que a capacidade de reduzir grupos carboxílicos parece ser predominante nesta espécie. Yang et al. (2004) detectaram substâncias reativas com TBA nas frações de < 5 kDa de duas linhagens de *W. cocos*.

Quelantes de ferro do tipo hidroxamato e catecolato e o ácido oxálico estão entre os CBMM (< 5 kDa) produzidos por *W. cocos* e detectados por nosso grupo, utilizando métodos espectrofotométricos (MACHUCA; NAPOLEÃO; MILAGRES, 2001; MILAGRES et al., 2002). Uma fração de baixa massa molar (< 5 kDa) contendo estes quelantes atuou de forma não seletiva em polpa kraft, degradando lignina residual e celulose. Foi, também, a única entre as frações < 5 kDa de fungos de decomposição parda que apresentou capacidade de descolorir o corante Poly R-478, além de apresentar maior porcentagem de compostos com capacidade quelante de ferro (MILAGRES et al., 2002).

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal produzir e purificar compostos de baixa massa molar com atividade redutora de Fe^{3+} de fungos degradadores de madeira, caracterizá-los estruturalmente e avaliar a extensão da degradação de polissacarídeos e lignina pela reação de Fenton mediada por estes compostos em condição similar ao que ocorre durante a biodegradação da madeira *in situ*.

Para atingir estes objetivos, as seguintes etapas foram realizadas:

- ✓ Produção em meio líquido de CBMM com atividade redutora de Fe^{3+} por um fungo de decomposição branca e um fungo de decomposição parda;
- ✓ Purificação e caracterização de CBMM com atividade redutora de Fe^{3+} ;
- ✓ Degradação oxidativa de polissacarídeos e lignina por reações de Fenton mediadas pelos compostos fúngicos de baixa massa molar redutores de Fe^{3+} ;
- ✓ Avaliação da ação sinérgica de CBMM com atividade redutora de Fe^{3+} e enzimas ligninolíticas de fungos de decomposição branca.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estudo da influência do ferro e da fonte de carbono no crescimento, atividade redutora de Fe^{3+} e produção de compostos de baixa massa molar

Neste grupo de experimentos estudou-se o efeito da concentração de ferro (Esquema 1) e de diferentes fontes de carbono simples com e sem suplementação com celulose (Esquema 2) nos meios de cultura dos fungos *P. medulla-panis* e *W. cocos* com relação ao crescimento, da atividade redutora de Fe^{3+} , e também na produção de compostos quelantes do tipo catecol e hidroxamato.

4.1.1 Estudo da influência do ferro

4.1.1.1 Preparo da vidraria

Para remover traços de metais (principalmente ferro), a vidraria foi mergulhada em solução de HCl 6 M durante uma noite, e então lavada várias vezes com água desionizada.

4.1.1.2 Espécies fúngicas e meio de manutenção

Os Basidiomicetos *W. cocos* ATCC 62778 (decomposição parda) e *P. medulla-panis* ATCC 42463 (decomposição branca) foram repicados em placas de Petri, conteúdo ágar batata-dextrose (PDA) (2%), e incubados durante aproximadamente 8 dias a 28°C. A partir destas placas foram obtidos os micélios para serem usados como inóculo.

4.1.1.3 Efeito do ferro em meio sólido

Para estudar o efeito da concentração de ferro no crescimento e produção de compostos quelantes de ferro em meio sólido, utilizou-se o método universal CAS-ágar modificado por MILAGRES et al. (1999) que consiste em avaliar a produção de compostos quelantes pela mudança de cor do complexo CAS-ferro de azul para rosa que ocorre após a quelação do ferro pelos compostos produzidos. Metade da placa usada para o crescimento do fungo foi preparada com o meio ágar-batata dextrose (1%) e extrato de levedura (0,3%). Este meio não contém ferro

Esquema 1
Estudo da influência do ferro em líquido

Esquema 2
Estudo da influência conte de carbono em líquido

adicionado, mas a ocorrência de 8 μM de ferro total presente como quantidade traço foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica (Pelkin-Elmer). Este meio de cultura foi denominado meio com baixa concentração de ferro (BCF). Para estabelecer meios de crescimento com concentrações diferenciadas de ferro, o meio BCF foi suplementado com solução $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ para produzir concentrações finais de ferro de 15 e 50 μM , as quais foram denominadas de meio com suficiente concentração de ferro (SFC) e elevada concentração de ferro (ECF), respectivamente.

O inóculo foi colocado na borda das placas (o mais longe possível do centro da placa) e as placas foram incubadas a 28 °C por 7 dias no escuro. Placas controle (não inoculadas) foram incubadas nas mesmas condições. Após o período de incubação, a produção de compostos quelantes de ferro foi observada visualmente pela mudança de cor da parte CAS-ágar de azul para rosa. A biomassa produzida foi coletada raspando a superfície do ágar para determinação de massa seca.

4.1.1.4 Efeito do ferro em meio líquido

Os meios de cultura líquidos com baixa concentração de ferro (BCF) continham batata dextrose (1%) e extrato de levedura (0,3%). Este meio foi suplementado com solução $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ para produzir concentrações de ferro finais de 50 e 250 μM , denominadas SCF e ECF, respectivamente. Os meios (pH final 5,6) foram autoclavados a 0,5 atm por 15 min.

Os meios de cultivo (50 mL em Erlenmeyer de 125 mL) foram inoculados com dois discos de ágar-micélio (10 mm de diâmetro) e incubados a 28°C, sob condições estacionárias por 3, 5, 7, 14 e 21 dias. Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

Considerando-se que os agentes quelantes/redutores de ferro produzidos por estes fungos são possíveis derivados de catecol, e que estes são facilmente oxidados a quinonas pela ação da luz, os cultivos e as etapas de liofilização e ultrafiltração foram conduzidas no escuro, com o objetivo de eliminar ou pelo menos minimizar esse efeito.

Após o período de incubação, a biomassa fúngica foi coletada e lavada várias vezes com água destilada gelada. Uma porção do micélio foi utilizada para o

ensaio de redução de Fe^{3+} e o restante foi utilizado para determinação de massa seca. Os sobrenadantes foram submetidos a uma etapa de ultrafiltração e as frações < 5 kDa foram analisadas quanto a atividade redutora de Fe^{3+} e presença de hidroxamatos e derivados de catecol (Esquema 1).

4.1.1.4.1 Determinação da biomassa fúngica

A biomassa úmida (B_u) obtida após a filtração dos meios de cultura ao final de cada período de cultivo foi determinada utilizando-se uma balança analítica Mettler Toledo-Micronal (modelo AB204-S). Em seguida, uma porção (10 – 15 mg) do micélio foi retirada para a realização do ensaio de redução de ferro ($B_{u\text{Fe}}$) (item 4.1.1.4.2) e o restante foi congelado à aproximadamente -70°C por 24 h. A biomassa fúngica previamente congelada foi liofilizada por aproximadamente 15 h e em seguida pesada (B_s).

O crescimento fúngico foi estimado como a produção de massa micelial e expresso em massa seca, de acordo com a seguinte equação (Eq. 8):

$$M_{sT} = B_s + (B_{u\text{Fe}} \times B_s) / (B_u - B_{u\text{Fe}}) \quad (8)$$

onde,

M_{sT} massa seca total (mg)

B_s biomassa seca (mg)

B_u biomassa úmida total (mg)

$B_{u\text{Fe}}$ biomassa úmida utilizada no ensaio de redução de ferro (mg)

4.1.1.4.2 Atividade redutora de Fe^{3+} do micélio úmido

A capacidade do micélio úmido em reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} foi determinada utilizando-se se ferrozina (3-(2-piridil)-5,6-bis(4-ácido fenil-sulfônico)-1,2,4-triazina), um composto que forma um complexo ferrozina- Fe^{2+} com o Fe^{2+} recém reduzido (STOOKEY, 1970). A mistura reacional continha 10 – 15 mg de micélio úmido em 1,55 mL de tampão acetato de sódio (50 mM, pH 4,5), 0,4 mL de solução de ferrozina (1% p/v, Sigma) e 0,05 mL de solução FeCl_3 (20 mM, recém preparada). A reação foi monitorada durante 15 min a 562 nm ($\epsilon_{562} = 27,900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (STOOKEY,

1970). A atividade de ferroredutase foi expressa pela quantidade de Fe^{2+} formado na mistura reacional por min por mg de biomassa seca.

4.1.1.4.3 Obtenção e caracterização das frações < 5 kDa

O extrato extracelular de cada período de cultivo foi liofilizado e o volume reduzido (10 vezes). O material concentrado foi ultrafiltrado utilizando-se membrana de corte 5 kDa (Millipore, Ultrafree Centrifugal Filter Device – 5 k Membrane), durante 30 min a 6000.g e a 10°C. Nesta etapa foram obtidas frações de baixa massa molar (< 5 kDa), as quais foram avaliadas quanto à atividade redutora de Fe^{3+} e caracterizadas quanto a presença de hidroxamatos e catecóis.

4.1.1.4.3.1 Identificação de derivados de catecol

O método de Arnow (ARNOW, 1937) comumente utilizado para determinar benzenos hidroxiliados, principalmente derivados de 1,2-benzenodiol (catecol) foi utilizado para detectar compostos com estruturas do tipo catecol. A reação baseia-se no fato de que estruturas do tipo catecol ao reagirem com ácido nítrico, produzem uma coloração amarela, a qual muda para vermelho-laranja quando o meio reacional torna-se fortemente alcalino.

Esta metodologia consistiu no preparo das seguintes soluções: HCl 0,5 M, 10 g de nitrato de sódio e 10 g de molibdato de sódio dissolvidos em 100 mL de água desionizada, e NaOH 1 M. Para 0,5 mL de amostra, adicionaram-se os reagentes na seguinte ordem: 0,5 mL de HCl, 0,5 mL da solução de nitrato-molibdato e 0,5 mL de NaOH.

A absorbância das soluções foi lida a 510 nm e a concentração de compostos com estrutura de catecol nas amostras foi determinada através de uma curva de calibração preparada com o ácido 2,3-dihidroxi-benzóico (Sigma).

4.1.1.4.3.2 Identificação de derivados de ácido hidroxâmico

O ensaio de Csáky foi utilizado para detecção de compostos com estrutura de hidroxamato (CSÁKY, 1948) e baseia-se na oxidação da hidroxilamina a nitrito

em meio ácido, que é então estimado pela reação de cor com ácido sulfanílico e α -naftilamina.

Para utilização deste método, as amostras foram inicialmente tratadas com carvão ativado (1% p/v), e posteriormente 0,2 mL da amostra tratada foi primeiramente hidrolisada com 0,3 mL de solução H_2SO_4 3 M em um tubo de ensaio de vidro com um tampa de rosca de polipropileno a 100°C por 6 h. Após resfriada à temperatura ambiente, foi adicionado à amostra 0,6 mL de acetato de sódio 35% (p/v) e 0,1 mL de solução de ácido sulfanílico (1 g de ácido sulfanílico dissolvido em 100 mL de uma solução aquecida de ácido acético 30% v/v), e 0,1 mL de solução de iodo (1,3 g de iodo em 100 mL de ácido acético glacial). Após 3 minutos, o excesso de iodo no meio reacional foi removido pela adição de 0,2 mL de solução de arsenito de sódio 2 % (p/v). A seguir, adicionou-se 0,2 mL de solução de α -naftilamina (3 g de α -naftilamina dissolvida em 1 L de ácido acético, 30%, p/v).

A absorbância das soluções foi lida a 526 nm e a concentração de compostos com estrutura de hidroxamato nas amostras foi determinada através de uma curva de calibração, preparada com cloreto de hidroxilamina (Sigma).

4.1.1.4.3.3 Atividade redutora de Fe^{3+}

Os ensaios foram conduzidos em cubetas de quartzo de 2 mL contendo 0,375 mL de amostra, 0,4 mL de tampão acetato e sódio 50 mM (pH 4,5), e 0,025 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM (recentemente preparado). Após 15 min, 0,2 mL de ferrozina (1% p/v) foi adicionado à mistura e a Abs a 562 nm foi lida imediatamente. Os resultados foram expressos pela quantidade de Fe^{2+} formado ($\epsilon_{562} = 27.900 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) (STOOKEY, 1970). Para o branco, substituiu-se a amostra por água desionizada. Um controle, contendo FeCl_3 e ferrozina foi realizado para descontar a quantidade de íons Fe^{2+} formados durante o equilíbrio natural de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ em água.

4.1.1.4.4 Extração, quantificação e perfil de massa molar das proteínas celulares

4.1.1.4.4.4 Extração de proteínas celulares

Proteínas celulares foram extraídas dos micélios crescidos em meio líquido com ou sem suplementação com ferro. Amostras (50 – 100 mg peso seco) foram

resuspensas em 3 mL de tampão Tris-HCl (pH 8,9) previamente resfriado. Estas suspensões foram mecanicamente rompidas em tubos de centrifuga de 15 mL com o auxílio de vortex usando 3 mL de esferas de vidro (0,5 mm de diâmetro) (proporção 1:1, v/v). As misturas foram rompidas cinco vezes por 1 min com intervalo de 30 s em banho de gelo. Os sobrenadantes foram coletados após centrifugação por 15 min a 6.000.g para remover os resíduos celulares. A fração insolúvel foi submetida a uma nova etapa de extração, desta vez conduzida por saponificação com NaOH (0,5 M) (BRAAKSMA; SCHAAP, 1996) antes de ser levada ao microondas por 20 s, a 40% de potência. Em seguida, a mistura foi neutralizada com HCl (0,5 M), e o sobrenadante recolhido por centrifugação por 15 min a 6.000.g. As frações celulares solúveis obtidas após as centrifugações foram unidas e utilizadas para determinação do teor de proteína total e submetidos à eletroforese.

4.1.1.4.4.5 Determinação de proteínas celulares totais

A determinação da concentração de proteínas totais presentes nos extratos celulares foi determinada utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976), que consistiu em adicionar 100 µL de amostra a 1 mL do reagente de Bradford, agitar e ler a absorbância a 595 nm. A concentração de proteínas nas amostras foi determinada através de uma curva de calibração, preparada com albumina de soro bovina.

O reagente de Bradford foi preparado pela dissolução de 100 mg de Azul de Comassie G-250 em uma mistura de 100 mL de ácido fosfórico 85% e 50 mL de metanol 95%. Depois de completa dissolução do corante, adicionou-se água até completar o volume para 1 L (BRADFORD, 1976).

4.1.1.4.4.6 Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As eletroforeses sob condições desnaturantes foram realizadas em gel de poliacrilamida de duas fases de diferentes porosidades e valores de pH e na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio) (ALFENAS et al., 1991). O aparelho utilizado foi um Hoefer / Mini VE Vertical Electrophoresis System (Amersham Bioscience), com placas de vidro (10 x 10 cm) onde os géis foram montados. A cuba

para eletroforese foi preenchida com tampão Tris-glicina pH 8,9, diluído 1:10 em água desionizada com 1% SDS antes do início de cada corrida.

4.1.1.4.4.6.1 Preparo dos géis SDS-PAGE

Géis de poliacrilamida foram formados por copolimerização de acrilamida e Bis-acrilamida (Bis) na presença de persulfato de amônio e tetrametiletenodiamina (TEMED). Os componentes acrílicos foram preparados segundo Laemmli (1970), em duas fases, chamada de sistema descontínuo, que consiste dos géis concentrador e separador.

Os géis concentradores e separadores foram preparados com os componentes descritos nas Tabela 2 e Tabela 3, respectivamente.

Tabela 2 – Gel concentrador

Soluções	Concentração 4,5%
Acrilamida: Bis-acrilamida (36,5:1)	2,25 mL
Tris-HCl 0,6173 M pH 6,8	1,50 mL
Água desionizada	11,15 mL
SDS 10% (p/v)	0,075 mL
Persulfato de amônio 10% (p/v)	0,05 mL
TEMED	0,01 mL

Tabela 3 – Gel separador

Soluções	Concentração 12,5%
Acrilamida: Bis-acrilamida (36,5:1)	12,50 mL
Tris-HCl 3,778 M pH 6,8	3,00 mL
Água desionizada	14,21 mL
SDS 10% (p/v)	0,15 mL
Persulfato de amônio 10% (p/v)	0,10 mL
TEMED	0,04 mL

4.1.1.4.4.6.2 Preparo das amostras e do tampão da amostra

As amostras para as corridas eletroforéticas foram preparadas colocando dentro de tubos “Eppendorf” 30 µg de proteínas celulares de *W. cocos* ou 50 µg de

proteína de *P. medulla-panis* e volume de tampão da amostra suficiente para que o volume final fosse 40 µL. Os tubos foram fervidos por 5 min, e as proteínas desnaturadas foram injetadas no gel de eletroforese. Após as corridas, as bandas de proteínas foram reveladas pela técnica de coloração com nitrato de prata (ALFENAS et al., 1991).

O tampão da amostra foi composto de 2 mL Tris-HCl 1 M (pH 6,8), 4 mL SDS 10% (p/v), 2 mL β-mercaptoetanol, 5 mL glicerol, e 0,01 g de azul de bromofenol.

4.1.1.4.4.6.3 Revelação com nitrato de prata e determinação das massas molares das proteínas celulares

Após a corrida eletroforética, as bandas protéicas presentes no gel foram reveladas por impregnação com nitrato de prata da seguinte forma: o gel foi incubado por 30 min em uma solução contendo 100 mL de etanol (99,8%), 25 mL de ácido acético glacial (99,7%) e água destilada em quantidade suficiente para completar 250 mL de solução. Em seguida o gel foi transferido e mantido por mais 30 min em uma solução contendo 75 mL de etanol (99,8%), 1,25 mL de glutaraldeído (25%), 10 mL de tiosulfato de sódio (5%), 17 g de acetato de sódio e água destilada em quantidade suficiente para completar 250 mL de solução. O gel foi então lavado com água destilada por 3 vezes e deixado por 15 min nesta solução. Após as lavagens o gel foi incubado em outra solução contendo 25 mL de nitrato de prata (2,5%), 0,1 mL de formaldeído (37%) e água destilada completando o volume da solução para 250 mL. Nesta solução, o gel permaneceu ao abrigo da luz por 20 min. Novamente, o gel foi lavado com água destilada e em seguida adicionado a uma solução contendo 6,25 g de carbonato de sódio anidro, 0,05 mL de formaldeído (37%) e água destilada em quantidade suficiente para 250 mL de solução, onde permaneceu até o aparecimento das bandas de proteínas impregnadas por nitrato de prata. A reação foi então interrompida por uma solução contendo 3,65 g de EDTA em 250 mL de água destilada. Todas as soluções foram preparadas no momento do uso.

As massas molares das proteínas presentes nos géis foram estimadas utilizando-se do gráfico dos logaritmos das massas molares (log MM) das proteínas padrões pelas suas respectivas mobilidades eletroforética (cm). Foram utilizados os

padrões descritos na Tabela 4. Os marcadores foram dissolvidos em 100 µL de tampão da amostra, fervidos por 5 min e armazenados no congelador. Para cada gel aplicou-se em uma canaleta um volume de 7,0 µL desta solução padrão.

Tabela 4 - Proteínas padrões

Proteínas	Massa Molar (kDa)
Soroalbumina bovina	66
Ovoalbumina	45
Anidrase carbônica	29
α-Lactoalbumina	14,3

4.1.2 Estudo da influência de diferentes fontes de carbono na produção de CBMM

4.1.2.1 Cultivo dos fungos em diferentes fontes de carbono

Frascos Erlenmeyers de 250 mL foram preparados com 100 mL de meio de cultivo, contendo sais de Vogel 2% (v/v) (VOGEL, 1956) (macroelementos em g/L: 2,5 citrato de sódio·2H₂O, 5,0 KH₂PO₄·5H₂O, 2,0 NH₄NO₃, 0,2 MgSO₄·7H₂O, 0,1 CaCl₂·2H₂O; microelementos em mg/L: 2,5 ácido cítrico, 2,5 ZnSO₄·7H₂O, 0,125 CuSO₄·5H₂O, 0,5 Fe(NH₄)₂(SO₄)·5H₂O, 0,025 MnSO₄·2H₂O, 0,025 H₃BO₃ e 0,025 Na₂MoO₄·2H₂O). À solução de sais adicionou-se 0,2% de glicose, 0,2% de ácido succínico ou 0,2% de cloridrato de L-ornitina, com ou sem adição de celulose microcristalina (1,0%). A concentração de ferro total presente foi de aproximadamente 10 µM (determinada por espectrometria de absorção atômica). O pH do meio de cultivo foi ajustado para 4,5 antes de ser autoclavado a 0,5 atm por 15 min.

Os meios de cultivo foram inoculados com três discos de ágar-micélio (10 mm de diâmetro) e incubados a 28°C, sob condições estacionárias e no escuro por 30 dias. Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

Após o período de incubação a biomassa fúngica foi coletada por filtração para determinação de massa seca e os sobrenadantes para determinação do pH antes de serem ultrafiltrados para obtenção de frações < 5 kDa (4.1.1.4.3), as quais foram caracterizadas quanto a atividade redutora (item 4.1.1.4.3.3) e quelante de

Fe^{3+} , presença de derivados de ácido hidroxâmico (4.1.1.4.3.2), de catecol (4.1.1.4.3.1) e peptídeos.

4.1.2.2 Método CAS para detecção de atividade quelante de Fe^{3+}

Para a detecção da presença de compostos com atividade quelante de Fe^{3+} , empregou-se o método universal CAS (Cromo Azurol S) (SCHWYN; NEILANDS, 1987). Esse método consistiu no preparo de um complexo indicador ternário contendo: 6 mL de uma solução de brometo de hexa-deciltrimetilamônio (HDTMA) 10 mM, 1,5 mL de solução de cloreto férrico (1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 10 mM HCl) e 7,5 mL de solução CAS (Cromo Azurol S) 2 mM. A essa solução foram adicionada 4,307 g de piperazina anidra dissolvida em água e o pH foi ajustado para 5,6 pela adição de 6,25 mL de HCl concentrado, e finalmente, avolumado para 100 mL. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água desionizada. O reagente CAS complexado com Fe^{3+} na solução possui uma intensa cor azul com uma absorvidade de $\xi = 100.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 630 nm e pH 5,6.

O ensaio consistiu na adição de 0,5 mL da solução de reagente CAS e 0,5 mL da amostra. O branco foi constituído de 0,5 mL da solução de reagente CAS e 0,5 mL de água desionizada, e para zerar o aparelho, utilizou-se água desionizada.

As leituras da absorbância (630 nm) foram determinadas após 1 h de reação e os resultados foram expressos como porcentagem de compostos quelantes presentes na amostra capazes de complexar Fe^{3+} em relação ao branco. As unidades percentuais de compostos quelantes de ferro foram definidas pela seguinte equação (Eq. 9) (PAYNE, 1994):

$$\text{Unidade \%} = (A_b - A_a) \times 100 / A_b \quad (9)$$

onde: A_b = Absorbância do branco; A_a = Absorbância da amostra

4.1.2.3 Isolamento determinação de peptídeos de baixa massa molar

As frações < 5 kDa que promoveram a maior atividade redutora de Fe^{3+} foram submetidas a uma etapa de precipitação com o ácido tricloroacético, objetivando precipitar possíveis peptídeos presentes nestas frações. A uma alíquota de 3 mL de cada uma das frações, adicionou-se ácido tricloroacético 100% para uma concentração final de 30%. Essa mistura foi mantida em banho de gelo por uma hora

e centrifugada a 6708.g por 15 min a 4°C. Os sobrenadantes foram desprezados, e o resíduo lavado em acetona a -20 °C e centrifugado a 6000.g por 15 min a 4°C. O resíduo foi redissolvido em 0,2 mL de NaOH 0,1M, dos quais 0,1 mL foi utilizado para a determinação de peptídeos e 0,1 mL foi avaliado quando a capacidade de redução de Fe^{3+} .

4.1.2.3.1 Determinação de peptídeos de baixa massa molar

A determinação de peptídeos de baixa massa molar foi realizada utilizando o método de Lowry que se baseia na redução do reagente de Folin-Ciocalteu pelo complexo formado entre cobre e ligações peptídicas (LOWRY et al. 1951).

O ensaio consistiu em adicionar 0,1 mL da amostra à 1,05 mL de uma solução preparada a partir de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1% p/v em água), tartarato de sódio e potássio $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1% p/v em água) e Na_2CO_3 (2% p/v em NaOH 0,1 M) na proporção 1:1:98 (v/v). Após 10 min, adicionou-se a essa mistura 0,1 mL do reagente de Folin (diluído 1:1). Após repouso de 30 min, foi feita a leitura de absorbância da solução a 750 nm (LOWE; THOMAS, 1996).

4.1.3 Análises estatísticas

Para verificar a existência ou não de diferença significativa entre as fontes de carbono nas atividades quelante e redutora de Fe^{3+} , e também na produção de compostos do tipo catecol e hidroxamato pelos fungos, os dados foram submetidos à análise estatística, através da análise de variância simples “LSD de Fisher” ao nível de 95% de confiança, utilizando o programa estatístico STATISTICA, versão 6.0.

4.1.4 Detecção de compostos regulados por ferro através de análises de eletroforese capilar

Uma vez definido a melhor fonte de carbono para a produção de CBMM com atividade redutora de Fe^{3+} por *P. medulla-panis* e *W. cocos*, os fungos foram novamente cultivados neste meio como descrito no item 4.1.2.1. Os fungos também foram inoculados no mesmo meio, porém deficiente em ferro, obtido pela eliminação de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ da solução mineral de Vogel.

Após o período de incubação, os caldos de cultura foram filtrados e os sobrenadantes foram submetidos a uma etapa de extração com a resina XAD-2.

4.1.4.1 Extração em fase sólida com a resina XAD-2

O sobrenadante do cultivo dos fungos foi submetido a uma extração sólido-líquido em resina não iônica Amberlite XAD-2 (Aldrich), um copolímero de estireno-divinilbenzeno, largamente utilizada para separação de compostos hidrofóbicos de baixa massa molar, como ácidos carboxílicos aromáticos, fenóis e também para separação de compostos quelantes de ferro de meios biológicos (SIMIONATO et al. 2006).

A resina foi previamente tratada com metanol, com o dobro do seu volume, e agitada por aproximadamente 10 min a 540 rpm. Esta etapa foi repetida duas vezes e a resina foi então lavada com o dobro do seu volume de água desionizada antes de ser acondicionada em cartuchos de 25 mL e o sobrenadante do cultivo de cada fungo foi passado pela coluna a fim de que os compostos quelantes de ferro ficassem adsorvidos à resina. Em seguida, a resina foi lavada com três volumes de 30 mL de metanol para a extração dos compostos adsorvidos à resina, e o filtrado de cada amostra foi coletado e concentrado em roto-evaporador. O material obtido dos sobrenadantes de *P. medulla-panis* e *W. cocos* foram denominadas PMP e WC, respectivamente, e ressuspendido em 1,5 mL de metanol para análise por eletroforese capilar.

4.1.4.2 Eletroforese capilar

A eletroforese capilar é uma técnica de separação que utiliza uma instrumentação relativamente simples e tem sido bastante utilizada na análise de biomoléculas por requerer pouca quantidade de amostra, bem como simples preparação da mesma. A separação em eletroforese capilar é baseada nas diferentes velocidades apresentadas pelos solutos, de acordo com o meio eletrolítico, quando submetidos a um campo elétrico. Dessa forma, quanto maior o campo elétrico aplicado mais rápido será a separação. Assim, solutos que possuem maior mobilidade apresentarão menor tempo de migração uma vez que alcançarão o detector antes que os outros (SIMIONATO, 2000).

A eletroforese capilar de zona em solução livre é o modo mais utilizado devido à simplicidade do equipamento e maior facilidade na otimização das condições experimentais. É empregada na análise de solutos iônicos que diferem em suas razões carga/raio. Neste modo de separação, solutos catiônicos serão primeiramente detectados, seguidos pelos aniônicos. Uma fonte de alta tensão é usada para fornecer o campo elétrico. A detecção é geralmente feita *on-column* pela incidência de radiação UV, por exemplo, sobre uma janela de detecção aberta pela remoção do polímero de revestimento do capilar. Quando o modo de separação CZE é usado, solutos neutros não são separados por migrarem juntamente com o fluxo eletroosmótico.

As amostras resultantes da etapa de extração com a resina XAD-2 foram analisadas em um equipamento de eletroforese capilar HP3DCE (Hewlett Packard), utilizando um capilar de sílica fundida (OD: 360 μm , ID: 50 μm , L_t : 59 cm, L_{ef} : 51 cm) previamente acondicionado pela passagem de NaOH 1 M (5 min), água desionizada (5 min) e tampão de corrida (fosfato de sódio) (15 min). Entre as corridas, passou-se tampão pelo capilar (2 min). O tempo de injeção das amostras foi de 5 segundos e o tempo de injeção do marcador de fluxo eletro-osmótico (acetona) foi de 3 segundos. A tensão de separação aplicada foi de 20 kV. Os comprimentos de onda analisados para a amostra e para o marcador de fluxo eletroosmótico foram, respectivamente, 214 e 254 nm.

Inicialmente foram avaliados os principais parâmetros que afetam a separação, sendo eles o pH, a concentração do eletrólito (tampão fosfato), e a presença de surfactante (SDS).

4.2 Produção, isolamento e caracterização de CBMM com atividade redutora de Fe^{3+}

Nesse grupo de experimentos foram produzidos extratos extracelulares de *P. medulla-panis* e *W. cocos* dos quais foram isolados CBMM com atividade redutora de Fe^{3+} . Estes compostos foram então caracterizados estruturalmente por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-MS) e utilizados nos ensaios posteriores (Esquema 3).

Esquema 3
Produção, isolamento e caracterização de CBMM com atividade redutora de Fe^{3+}

4.2.1 Cultivo dos fungos

W. cocos foi inoculado em 30 frascos Erlenmeyers de 250 ml com 100 ml de meio Vogel 2% v/v acrescido de 0,2% de glicose e 1% de celulose microcristalina (Avicel, Fluka). Para o cultivo de *P. medulla-panis* substituiu-se a glicose por 0,2% de cloridrato de L-ornitina (Sigma). O pH dos meios de cultivo foi ajustado para 4,5 antes de serem autoclavados a 0,5 atm por 15 min.

Os meios de cultivo foram inoculados com três discos de ágar-micélio (10 mm de diâmetro) e incubados a 28 °C, sob condições estacionárias e no escuro por 30 dias.

Após o final do período de cultivo, os caldos dos cultivos de cada fungo foram filtrados, reunidos e caracterizados quanto as atividades enzimáticas e redutora de Fe^{3+} e quanto a presença de ácido oxálico. Nas frações < 5 kDa (item 4.1.1.4.3) foram analisados a presença de catecóis (4.1.1.4.3.1), hidroxamatos (4.1.1.4.3.2), peptídeos (4.1.2.3) e quanto a capacidade de reduzir Fe^{3+} (4.1.1.4.3.3). CBMM extraídos das frações < 5 kDa de *P. medulla-panis* e *W. cocos* com a resina XAD (item 4.1.4.1) e denominados Pmp e Wc, respectivamente, foram identificados por CG-MS, analisados quanto a capacidade de reduzir Fe^{3+} e utilizados nos ensaios posteriores.

4.2.2 Atividades enzimáticas

4.2.3 β -D-xilanase e endo-1,4- β -glucanase

As atividades de xilanase e endo-1,4- β -glucanase foram determinadas de acordo com o método de BAILEY et al. (1992) e TANAKA et al. (1981), seguido da quantificação de açúcares redutores liberados a partir de xilana e carboximetilcelulose (CMC), respectivamente, pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico - DNS (MILLER, 1959).

Um volume de 0,9 mL de xilana de bétula (1% p/v Sigma, em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0) ou CMC (0,44% p/v carboximetilcelulose Sigma – média viscosidade, em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0) foi colocado em três tubos de ensaio e incubados em banho-maria a 50°C. A seguir foram adicionados 0,1 mL da amostra em cada tubo e a reação foi conduzida por 5, 15 e 30 min para

xilanase e 30, 60 e 90 min para β -glucanase. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS seguido por fervura em banho-maria por 5 minutos, para que ocorresse a reação do açúcar redutor com o DNS. Em seguida, as amostras foram resfriadas e a absorbância foi lida a 540 nm. Para calibração do aparelho foi feito um controle onde se substituiu o volume da amostra por tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0.

Controles foram feitos para cada amostra, adicionando-se o reagente de DNS antes da amostra. Nessas condições a enzima não apresenta atividade catalítica, mas é possível dosar compostos redutores que não são provenientes da reação enzimática.

Os valores de absorbância lidos a 540 nm foram transformados em μ moles de xilose ou glicose por comparação à curva de calibração de xilose (Merck) e glicose (Merck). Uma unidade de atividade de xilanase ou endo-1,4- β -glucanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μ mol de açúcar redutor por min por mL, expresso como xilose ou glicose, respectivamente.

O reagente de DNS foi preparado dissolvendo-se 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 19,8 g de hidróxido de sódio, 306 g de tartarato de sódio e potássio e 8,3 g de bissulfito de sódio em 1 L de água destilada. Após a agitação para total dissolução dos reagentes, foram adicionados 7,6 mL de fenol, e o volume completado para 1,4 L com água destilada (MILLER, 1959).

4.2.4 β -D-xilosidase e β -D-glicosidase

As atividades de β -xilosidase e β -D-glicosidase foram determinadas segundo TAN et al. (1987), através da estimativa de p-nitrofenol (pNP) liberado a partir do reagente p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX) e p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG), respectivamente.

A amostra (0,2 mL) foi adicionada a 0,8 mL de solução de pNPX ou pNPG (0,1% p/v pNPX ou pNPG – Sigma, em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0) e as reações foram conduzidas durante 15, 30 e 60 min a 50 °C. Após incubação, as reações foram interrompidas pela adição de 2 mL de solução de bicarbonato de sódio (10% p/v em água destilada) e a absorbância lida a 410 nm. Foram feitos controles para cada amostra, adicionando-se a solução de bicarbonato de sódio 10%

antes da amostra. Para a calibração do aparelho foi feito um controle onde se substituiu o volume da amostra pelo tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0.

Os valores de absorbância lidos a 410 nm foram transformados em μ moles de pNP por comparação à curva de calibração de pNP (Sigma). Uma unidade de atividade de β -xilosidase ou β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μ mol de pNP por min por mL.

4.2.5 Exo-1,4- β -glucanase

À solução de avicel (0,9 mL de celulose microcristalina Fluka 1,0% p/v, preparada em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0) foi adicionada 0,1 mL da amostra e a reação foi conduzida por 60, 90 e 120 min. Após cada período de reação, a mistura reacional foi centrifugada a 3.000.g durante 10 min e o sobrenadante foi utilizado para determinação de açúcares redutores. As absorbâncias foram determinadas a 540 nm e transformadas em μ moles de glicose por comparação à curva de calibração de glicose (Merk).

Os valores de absorbância lidos a 540 nm foram transformados em μ moles de glicose por comparação à curva de calibração de glicose (Merck). Uma unidade de atividade de exo-glucanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μ mol de açúcar redutor por min por mL, expresso como glicose.

4.2.6 Celobiose-desidrogenase - CDH

Para determinação da atividade de CDH utilizou-se como substrato a lactose (BAMIGER et al., 1999). A reação foi conduzida em cubetas de 2 mL contendo 1 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4,0), 0,4 mL de amostra, 0,2 mL de NaF 40 mM, 0,2 mL de lactose 300 mM e 0,2 mL de 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) 3 mM. Para o branco, substituiu o DCPIP por água destilada. A redução de DCPIP foi acompanhada por 5 min em 520 nm ($\epsilon_{520} = 6800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (BAMIGER et al., 1999).

4.2.7 Lacase

A atividade de fenoloxidase, tipo lacase, foi determinada utilizando uma solução etanólica de siringaldazina (Sigma) 1,0 mM ($\epsilon_{525} = 65 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) como substrato (SZKLARZ et al., 1989). A mistura reacional continha 0,1 mL do substrato, 0,3 mL de tampão citrato-fosfato (75 mM, pH 5,0), 0,1 mL de água destilada e 0,5 mL de amostra. O aumento da absorbância, ocasionado pela oxidação do substrato, foi acompanhado durante 10 min (SZKLARZ et al., 1989).

4.2.8 Manganês Peroxidase – MnP

A atividade de MnP foi determinada utilizando uma solução de vermelho de fenol 0,1% como substrato ($\epsilon_{610} = 22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (KUWAHARA et al., 1984). A reação de oxidação foi acompanhada por até 10 minutos através da leitura de absorbância a 610 nm. A mistura reacional continha 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 M, 0,2 mL de albumina bovina 0,5%, 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%, 0,05 mL de MnSO_4 (2 mM) e 0,5 mL de amostra. A reação foi iniciada com a adição de 50 μL de H_2O_2 e cessada com a adição de 50 μL de NaOH 2 M.

4.2.9 Lignina Peroxidase – LiP

A atividade de LiP foi realizada utilizando Azure B de acordo com o método proposto por ARCHIBALD (1992) ($\epsilon_{651} = 48,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A mistura reacional consistiu de 0,1 mL de azure B (0,32 mM), 0,5 mL da amostra em meio tamponado com 0,3 mL de solução tartarato de sódio (50 mM, pH 4,5). A reação foi iniciada com 0,1 mL de H_2O_2 (1 mM) e a variação de absorbância foi acompanhada por até 10 min.

4.2.10 Determinação de ácido oxálico por CLAE

A determinação de ácido oxálico nas frações extracelulares foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se uma coluna HPX 87H, mantida a 45°C, eluente H_2SO_4 8 mM, fluxo de 0,6 mL/min e volume de 20 μL , a 210 nm.

4.2.11 Identificação dos CBMM por ^{13}C -TMAH/CG-MS

Os CBMM produzidos por *P. medulla-panis* e *W. cocos* obtidos após a extração com a resina XAD-2 e denominados Pmp e Wc, respectivamente foram analisados em um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massa (CG-MS). Uma vez que compostos aromáticos hidroxilados e/ou metoxilados possivelmente estão presentes nas amostras, as mesmas foram metiladas *in-line* utilizando-se hidróxido de tetrametilamônio (TMAH), o qual em condições básicas, metila grupos hidroxilas, gerando OCH_3 . Para que fosse possível diferenciar o grupo metoxila já presente nos compostos do que foi gerado pela metilação com TMAH, análises foram, também, realizadas com as mesmas amostras metiladas com ^{13}C -TMAH, permitindo assim determinar precisamente o número de hidroxilas em cada composto, por comparação dos m/z do íon molecular dos espectros de massa obtidos com TMAH e ^{13}C -TMAH (FILLEY et al., 1999).

Todo o procedimento de análise foi realizado de acordo com a metodologia recentemente adaptada de Filley et al. (1999) por Neirop e Filley (2007), que consistiu em pesar aproximadamente 150 – 200 μg de amostra em um capilar (3 mm x 3 mm) de platina, contendo 200 ng de eicosano ($\text{C}_{20}\text{H}_{42}$) como padrão interno, ao qual foi posteriormente adicionado 3 μL de solução 25% TMAH ou ^{13}C -TMAH em água (^{13}C -TMAH preparado de acordo com Filley et al. 1999).

As análises foram conduzidas em um cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC 17A) acoplado a um espectrômetro de massa do tipo quadrupolo (Shimadzu QP505 A), na faixa de varredura de m/z de 40 – 550. A separação foi realizada utilizando-se uma coluna cromatográfica de sílica fundida Restek RT x-5, 30 m x 0,25 mm. O forno foi mantido a 60 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min e depois aquecido a uma taxa de 7 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 300 $^{\circ}\text{C}$. A temperatura final foi mantida por 15 min.

As análises foram realizadas em triplicata e a estrutura de cada composto identificado foi proposta a partir dos padrões de fragmentos com base em comparação de espectros nas bibliotecas NIST107 e NIST21, assim como análises detalhadas dos espectros individuais.

4.2.12 Determinação da atividade redutora de Fe^{3+}

As amostras contendo CBMM obtidas após a extração com a resina XAD-2 (Pmp e Wc) foram avaliadas quanto a atividade redutora de Fe^{3+} , utilizando ferrozina (STOOKEY, 1970).

Em tubos de ensaio foram adicionados 432 μg de Wc (ou 594 μg Pmp), tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5) e 25 μL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM (recentemente preparado). Após períodos definidos de reação, foram adicionados 70 μL de NaF 10%, 100 μL de ferrozina 1% a absorbância da mistura foi medida imediatamente. Os resultados foram expressos pela quantidade de Fe^{2+} formado ($\epsilon_{562} = 27.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (STOOKEY, 1970). Para o branco, substituiu-se a amostra por água desionizada. Um controle, contendo FeCl_3 e posteriormente ferrozina foi realizado para descontar a quantidade de íons Fe^{2+} formados durante o equilíbrio natural de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ em água.

Um segundo experimento foi realizado da mesma forma como descrito acima, porém, variando-se a quantidade de amostra de *P. medulla-panis* (ou *W. cocos*) para obtenção de uma relação entre a quantidade de amostra (Pmp e Wc) e a atividade redutora. Neste ensaio, o tempo de reação foi de 30 min.

4.2.13 Efeito do ácido oxálico e do pH na redução de Fe^{3+}

O efeito de ácido oxálico e do pH na redução de Fe^{3+} pelos CBMM de *W. cocos* e *P. medulla-panis*, foram avaliados utilizando-se o método Ferrozina (STOOKEY, 1970).

A quantidade de compostos produzidos por fungos (PmP e Wc) utilizada no ensaio foi a equivalente à redução de ferro obtida com 100 μM do ácido 2,3-dihidroxi-benzóico (DHBA). A amostra usada no ensaio foi determinada com base na relação entre a massa de amostra e o ferro reduzido, previamente determinada.

Os ensaios foram conduzidos na presença de 2,4 mg de amostra de Wc (ou 2,9 mg de Pmp), 50 – 100 μM Fe^{3+} (como $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ recém preparado) e ácido oxálico na faixa de 0 – 10 mM. Os ensaios foram realizados a pH 2,0 (solução KCl-NaCl 100 mM como agente tamponante) e 4,5 (tampão acetato de sódio 100 mM). Inicialmente, ácido oxálico e ferro foram preparados em tampão e deixados reagir por 18 h. Em seguida, os compostos redutores (PmP ou Wc) foram adicionados à

mistura, e após reagirem por aproximadamente 5 h, ferrozina foi adicionada à mistura reacional imediatamente antes da leitura a 562 nm. Todo o procedimento foi realizado na ausência de luz.

Os resultados experimentais da redução de Fe^{3+} em função da concentração de ácido oxálico foram plotados contra os dados da especiação de Fe^{3+} e ácido oxálico, também em função da concentração de ácido oxálico, a pH 2,0 e 4,5, obtidos pelos cálculos da especiação química de complexos Fe-oxalato utilizando o software Visual MINTEQ (versão 2.53) (<http://www.lwr.kth.se/English/OurSoftware/vminteq/>).

4.3 Degradação oxidativa de polissacarídeos e lignina pela reação de Fenton mediada por CBMM

Os ensaios de degradação de polissacarídeos foram conduzidos como descrito por Arantes e Milagres (2006b) e a quantidade de CBMM isolados com a resina XAD-2 das frações < 5 kDa de *W. cocos* (Wc) e de *P. medulla-panis* (Pmp) foi equivalente a atividade redutora de Fe^{3+} causada por 100 μM de DHBA. A massa de Wc e Pmp foi determinada utilizando a equação obtida no item (4.2.12) que relaciona a atividade redutora com a massa de Pmp ou Wc.

4.3.1 Xilana

A reação foi conduzida em tubos de ensaio de contendo 0,8 mL de xilana de bétula (Sigma, 1% p/v) em tampão acetato de sódio pH 5,0 (50 mM), 2,4 mg de Wc (ou 2,9 mg de Pmp), 50 μL de H_2O_2 40 mM e 50 μL de FeCl_3 4 mM (recém preparado), em um volume final de 1 mL. Fe^{3+} foi adicionado por último para iniciar a reação. Os tubos foram mantidas em banho-maria à 50 °C, por 1, 3, 6, 24 e 48 h e a reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL do reagente DNS. Os tubos foram fervidos por 5 min e após resfriamento foi feita a leitura a 540 nm (MILLER, 1959).

Para avaliar a ação somente de Wc (ou Pmp) na xilana, substituiu-se a solução de Fe^{3+} e H_2O_2 por tampão acetato de sódio pH 5,0 (50 mM), e para avaliar a ação do sistema $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$, substituiu-se a amostra, também, pelo mesmo tampão. Para o branco substituíram-se os reagentes por tampão acetato, sem adição de xilana. Todas as condições descritas acima foram conduzidas em duplicada.

4.3.2 Avicel

A degradação de Avicel (Fluka, 1% p/v) em tampão acetato de sódio pH 5,0 (50 mM) foi conduzida nas mesmas condições descritas para xilana (4.3.1), exceto que após cada período de incubação, a mistura reacional foi centrifugada a 3.000.g durante 10 min. O sobrenadante foi utilizado para determinação de açúcares redutores pela adição de 1,5 mL de DNS e então fervido em banho-maria por 5 minutos. Em seguida as amostras foram resfriadas e a absorbância foi lida a 540 nm. O resíduo lavado com água destilada e seco a 60 °C até peso constante foi adicionado à 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e submetido a análise de açúcares redutores usando o reagente de DNS. Todas as condições descritas acima foram conduzidas em duplicada.

Açúcares redutores foram expressos pelo aumento de absorbância a 540 nm (MILLER, 1959).

4.3.3 Carboximetilcelulose (CMC)

A reação foi conduzida em tubos de ensaio contendo 8 mL de CMC (Sigma, 1% p/v, viscosidade média) em tampão acetato de sódio pH 5,0 (50 mM), 240 mg de Wc (ou 290 mg de Pmp), 500 µL de H₂O₂ 40 mM e 500 µL de FeCl₃ 4 mM (recém preparado), em um volume final de 10 mL. Fe³⁺ foi adicionado por último para iniciar a reação. Os tubos foram mantidos em banho-maria à 50 °C, por 1, 3, 6, 24 e 48 h. Após cada período de incubação, foi coletado 1 mL e a reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL do reagente DNS (MILLER, 1959). O volume restante (9 mL) foi transferido para um viscosímetro (200 Fenske-Oswald), previamente acoplado a um banho-maria (25 °C) e esperou-se 5 min para que a solução adquirisse a temperatura do banho. A viscosidade das soluções foi determinada pela mudança no tempo que a solução fluiu através do viscosímetro, o qual foi expresso em viscosidade específica recíproca (KALOGERIS et al., 1998) (Eq. 10):

$$1/n_{sp} = t_0/(t-t_0) \quad (10)$$

onde

t representa o tempo de escoamento da solução

t₀ representa o tempo de escoamento do solvente (solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0).

Como controles, determinou-se a ação somente de Wc (ou Pmp), substituindo o Fe^{3+} e H_2O_2 por tampão acetato de sódio pH 5,0 (50 mM), e para avaliar a ação do sistema $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$, substituiu-se a amostra, também, pelo mesmo tampão. Para o branco, substituíram-se os reagentes por tampão acetato, sem adição CMC. O branco do substrato consistiu na substituição da amostra, Fe^{3+} e H_2O_2 por tampão. Todas as condições descritas acima foram conduzidas em duplicada.

4.3.4 pNPX e pNPG

A ação de Wc e Pmp na presença e na ausência de $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ nos substratos simples, pNPX e pNPG foi avaliada pela determinação de *p*-nitrofenol liberado no meio reacional. A reação foi conduzida em tubos de ensaio de 10 mL, contendo 0,4 mL de pNPX ou pNPG (Sigma, 0,1% p/v) em tampão acetato de sódio pH 5,0 (50 mM), 1,2 mg de Wc (ou 1,5 mg de Pmp), 25 μL de H_2O_2 40 mM e 25 μL de FeCl_3 4 mM (recém preparado), em um volume final de 0,5 mL. Os tubos foram mantidos em banho-maria à 50 °C, por 1, 3, 6, 24 e 48 h. Após cada período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de bicarbonato de sódio 10% (TAN et al., 1987), e *p*-nitrofenóis liberados no meio reacional foram expressos pelo aumento de absorbância a 410 nm.

Para a determinação da ação isolada de Wc (ou Pmp) foi usado tampão acetato de sódio pH 5,0 (50 mM) no lugar de Fe^{3+} e H_2O_2 . Para avaliar a ação do sistema $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$, substituiu-se a amostra, também, pelo mesmo tampão. Para o branco, substituíram-se os reagentes por tampão acetato, sem adição de pNPX ou pNPG. O branco do substrato consistiu na substituição da amostra, Fe^{3+} e H_2O_2 por tampão. Todas as condições descritas acima foram conduzidas em duplicada.

4.3.5 Tratamento de madeira com reações de Fenton mediada

A ação de Wc e Pmp na presença e ausência de $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ em lignina foi avaliada através do tratamento de madeira de *Picea rubens* (conífera) moída (40 mesh) em pH 5,0 e posterior análise dos fragmentos de lignina liberados após ^{13}C -TMAH termoquimólise.

O ensaio consistiu em tratar 50 mg de madeira moída com 2,4 mg de amostra de *W. cocos* (ou 2,9 de *P. medulla-panis*), 0,4 mM Fe^{3+} (como $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ recém preparado) e 4 mM H_2O_2 , em meio tamponado com tampão acetato de sódio 50 mM. Após 40 horas de reação, a mistura reacional foi centrifugada a 5.000.g por 5 min, o sobrenadante descartado e o resíduo coletado e seco ao ar na ausência de luz. Dois controles foram conduzidos da mesma forma, um deles na ausência da amostra fúngica e contendo somente madeira e tampão. Todos os experimentos foram realizados em triplicada e todas as etapas foram conduzidas na ausência de luz.

4.3.6 ^{13}C -TMAH/termoquimólise

Amostras de madeira (*Picea rubens*, conífera) tratada e controle foram inicialmente moídas (15 – 20 s) em um moinho de bolas de bancada até que um pó fosse obtido. Aproximadamente 100 – 150 μg de madeira moída foi pesada em um capilar (3 mm x 3 mm) de platina, contendo 200 ng de eicosano ($\text{C}_{20}\text{H}_{42}$) como padrão interno, ao qual foi posteriormente adicionado 3 μL de solução 25% TMAH ou ^{13}C -TMAH preparado em água de acordo com Filley et al. 1999. O capilar foi então colocado em um pequeno suporte metálico, o qual foi afixado no topo da unidade de pirólise, mantendo o capilar à temperatura ambiente e sob a passagem de hélio. Após 15 min, o capilar foi automaticamente solto dentro da zona de aquecimento mantida isotermicamente a 300 °C. A base de injeção da unidade pirólise foi mantida a 300 °C e com uma divisão de fluxo de 25/1. Nesta etapa ocorre a clivagem da lignina e metilação *in situ* gerando um grande número de produtos que podem ser separados e analisados por CG-MS. As análises cromatográficas e espectrométricas de massa foram conduzidas em um cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC 17A) acoplado a um espectrômetro de massa do tipo quadrupolo (Shimadzu QP5050 A), na faixa de varreruda de m/z de 40 – 550. A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se uma coluna cromatográfica de sílica fundida Restek RT x-5, 30 m x 0,25 mm. O forno foi mantido a 60 °C por 1 min e depois aquecido a uma taxa de 7 °C/min até 300 °C. A temperatura final foi mantida por 15 min.

A identificação de vários dos monômeros metilados liberados da lignina após ^{13}C -TMAH termoquimólise foi realizada com base na comparação com padrões

autênticos. A quantificação dos monômeros foi realizada como descrita por Filley et al. (1999) em relação ao padrão interno, e expressa em ng de monômero por µg de amostra analisada.

O número de ^{13}C de cada monômero individual foi determinado de acordo com Filley et al. (2000), e o aumento do número de ^{13}C (% ^{13}C) dos monômeros individuais provenientes da madeira tratada comparada com a madeira não tratada, foi utilizado como indicativo do grau de desmetoxilação do carbono metoxilado na posição 3 do anel aromático.

4.4 Estudo da interação dos CBMM redutores de Fe^{3+} com enzimas ligninolíticas

Esta etapa do trabalho reporta a cinética de produção de enzimas ligninolíticas e atividade redutora de Fe^{3+} de *Lentinula edodes*, *P. medulla-panis* e *Trametes versicolor*, e o estudo da ação conjunta de CBMM redutores de Fe^{3+} parcialmente isolados de cada fungo com as FMM contendo MnP ou lacase na oxidação do corante Azure B.

4.5 Fungos, condições de cultivo e determinação das atividades oxidativas e de redução de Fe^{3+}

Os fungos de decomposição branca *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler 1976 (CCB 554), *P. medulla-panis* e *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (1921) (INDEX FUNGORUM, 2008) (obtido da coleção de cultura do Departamento de Biotecnologia da USP Lorena, Lorena-SP) foram mantidos em placas de Petri como descrito no item 4.1.1.2 e repicado em meio de cultura líquido BCF (item 4.1.1.4).

Após cada período de incubação (5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias) os sobrenadantes foram filtrados e utilizados para determinação de atividades de lacase (item 4.2.7), LiP (item 4.2.9), MnP (item 4.2.8), CDH (item 4.2.6) e redutora de Fe^{3+} (4.2.12). A participação enzimática na atividade redutora foi também investigada através da fervura das amostras por 5 min antes da realização do ensaio de redução de ferro.

A biomassa fúngica foi coletada e lavada várias vezes com água destilada gelada para determinação da massa seca

4.6 Isolamento parcial de MnP, lacase e CBMM redutores de Fe^{3+}

CBMM redutores de Fe^{3+} foram isolados do caldo extracelular contendo a maior atividade redutora de cada fungo. Estes extratos foram ultrafiltrados como descrito no item 4.1.1.4.3 e as frações < 5 kDa contendo CBMM redutores de Fe^{3+} obtidas foram posteriormente concentradas aproximadamente 5 vezes por liofilização e denominadas FBMM_{Fe}. As FBMM_{Fe} foram analisadas quanto a presença de derivados de catecol (item 4.1.1.4.3.1).

MnP e lacase foram parcialmente isoladas do caldo extracelular contendo a maior atividade de MnP e lacase de cada fungo, também por ultrafiltração (item 4.1.1.4.3), e as frações de alta massa molar (FAMM, >5 kDa) contendo lacase ou MnP foram coletadas e denominadas FAMM_{Lac} e FAMM_{MnP}, respectivamente.

4.7 Oxidação de Azure B

A oxidação do corante Azure B foi conduzida numa mistura reacional contendo azure B (0,1 mM), H_2O_2 (1 mM), Fe^{3+} (0,1 mM, como $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ recém preparado) e 0,25 mL de FBMM_{Fe} (FAMM_{MnP}, ou FAMM_{Lac}) em tampão acetato de sódio (50 mM, pH 4.5) num volume final de 1 mL. MnSO_4 (0,1 mM) foi adicionado ao ensaio utilizando FAMM_{MnP}.

Num segundo experimento, FAMM_{MnP} ou FAMM_{Lac} foram adicionadas à uma mistura reacional contendo Azure B, H_2O_2 , Fe^{3+} e FBMM_{Fe} nas mesmas condições descritas acima, após terem reagido previamente por 5 min.

A degradação de azure B foi expressa pela porcentagem do decréscimo da absorbância a 651 nm após 10 de reação menos o decréscimo da absorbância obtida com o tratamento somente com Fe^{3+} e H_2O_2 .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo da influência do ferro e da fonte de carbono no crescimento e produção de compostos quelantes/redutores de ferro

5.1.1 Crescimento e produção de compostos quelantes de ferro em meio sólido

O efeito de diferentes concentrações de ferro no crescimento e produção de compostos quelantes de ferro foram avaliadas em meio sólido através da mudança de cor do reagente CAS (MILAGRES et al., 1999).

W. cocos cresceu rapidamente no meio sólido com diferentes concentrações de ferro e não se observou efeito de estímulo ou repressão do crescimento fúngico (Figura 13). Para *P. medulla-panis* a produção de biomassa foi bem superior às determinadas para *W. cocos*, e a suplementação do meio com ferro estimulou o crescimento, porém entre os meios suplementados não se observou diferença significativa na produção de biomassa (Figura 13).

Figura 13. Efeito da concentração de ferro no crescimento de *P. medulla-panis* (□) e *W. cocos* (■) em meio sólido. BCF (baixa concentração de ferro); SCF (suficiente concentração de ferro); ECF (elevada concentração de ferro).

O crescimento radial de *P. medulla-panis* foi claramente diferenciado, como pode ser visto na Figura 14. O aumento da concentração de ferro no meio de cultura aumentou a densidade do micélio, já que a quantidade de biomassa formada foi a mesma, porém o diâmetro final da colônia diminuiu significativamente, especialmente quando *P. medulla-panis* foi inoculado em meio contendo elevada concentração de ferro (ECF).

Figura 14. Ensaio de detecção de compostos quelantes de ferro produzidos por *P. medulla-panis* cultivado em meio sólido por 7 dias em diferentes concentrações de ferro: A – BCF; B – SCF; e C – ECF.

A produção de compostos quelantes em meio sólido foi avaliada visualmente com base na mudança de cor do complexo CAS-ferro de azul para rosa, que ocorre após a quelação do ferro pelos compostos produzidos (SCHWYN; NEILANDS, 1987).

P. medulla-panis não produziu compostos quelantes uma vez que não foi observada mudança de cor do CAS no ágar de azul para rosa (Figura 14). A reação negativa com o ensaio de CAS para *P. medulla-panis* pode indicar que a produção dos quelantes foi completamente reprimida mesmo na mais baixa concentração de ferro testada.

Depois de sete dias de incubação, observou-se claramente nas placas inoculadas com *W. cocos* a mudança de cor da metade da placa com o meio CAS (Figura 15), indicando a produção de compostos quelantes, independente das concentrações de ferro empregadas. Isso pode ser um indicativo que estes compostos não sejam regulados por ferro ou que mesmo 50 μM ainda não cause repressão. Ao contrário, dois outros trabalhos, também baseados no método CAS, reportaram a máxima produção de compostos quelantes (em meio líquido) pelos fungos degradadores de madeira *Coriolus versicolor* e *G. trabeum* em concentrações < 30 μM e < 50 μM , respectivamente (FEKETE; CHANDHOKE; JELLISON, 1989; JELLISON; CHEN; FEKETE, 1997).

5.1.2 Crescimento em meio líquido

Com o objetivo de melhor entender o efeito do ferro em culturas de *P. medulla-panis* e *W. cocos*, ambos os fungos foram cultivados em meio líquido e as

Figura 15. Ensaio de detecção de compostos quelantes de ferro produzidos por *W. cocos* cultivado em meio sólido por 7 dias em diferentes concentrações de ferro: A – BCF; B – SCF; e C – ECF.

concentrações de ferro testadas foram 8 μM (BCF), 50 μM (SCF) e 250 μM (ECF).

Três fases de crescimento para cada concentração de ferro puderam ser distinguidas (Figuras 16 e 17). Na primeira fase (0 – 5 dias), a produção de biomassa não foi muito expressiva, especialmente para *W. cocos*. Depois deste período inicial, a taxa de crescimento foi consideravelmente maior (segunda fase, 5 – 14 dias), especialmente quando *W. cocos* foi cultivado em SCF e *P. medulla-panis* em condições de suplementação (SCF e ECF). Durante a terceira fase (14 – 21 dias) não se observou aumento significativo de biomassa.

A partir destes resultados, pode-se dizer que ambos os fungos cresceram lentamente em condições de deficiência de ferro e, embora a suplementação de ferro tenha estimulado o crescimento, especialmente de *P. medulla-panis*, o aumento da concentração de ferro não favoreceu o crescimento proporcionalmente e no caso de *W. cocos* teve até um efeito inibitório.

Figura 16. Efeito de diferentes concentrações de ferro no crescimento de *W. cocos*. BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).

Figura 17. Efeito de diferentes concentrações de ferro no crescimento de *P. medulla-panis*. BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).

Após cada período de cultivo, o pH das culturas foi determinado, e os resultados utilizados como indicativo da produção de ácidos orgânicos. Nos caldos de cultura de *P. medulla-panis* praticamente não houve variação significativa do pH durante os diferentes períodos de cultivo, exceto por um leve aumento dos valores de pH no final do cultivo, provavelmente devido à autólise (Figura 18). Este resultado é um indicativo da baixa produção de ácidos orgânicos por *P. medulla-panis* nas condições de cultivo utilizadas.

Nos extratos de *W. cocos* o pH inicial (5,6) foi significativamente reduzido durante o cultivo para valores entre 1,8 – 2,1 (Figura 19). Ao final do período de cultivo (21 dias) não houve diferença significativa entre os valores de pH, independente da concentração de ferro no meio de cultivo. Entretanto, dois comportamentos distintos para o decréscimo do pH ao longo do cultivo foram observados. Nos meios de cultura suplementados com ferro (SCF e ECF), o pH do meio diminuiu gradativamente ao longo do cultivo, ao passo que no meio não suplementado (BCF), ou seja, no meio de cultivo com a menor concentração de ferro, o pH diminuiu significativamente durante a fase inicial de crescimento (até 7 dias), e foi diminuindo mais lentamente durante o restante do período cultivo.

Vários ácidos orgânicos produzidos por microrganismos podem atuar como compostos quelantes de ferro, dentre estes, o ácido oxálico e o ácido cítrico. *W. cocos* é conhecido como sendo um bom produtor de ácido oxálico (MILAGRES et al., 2002).

Figura 18. Efeito de diferentes concentrações de ferro no pH dos extratos obtidos do cultivo de *P. medulla-panis*. BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).

Figura 19. Efeito de diferentes concentrações de ferro no pH dos extratos obtidos do cultivo de *W. cocos*. BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).

É sugerido que durante a biodegradação da madeira por fungos de decomposição parada o ácido oxálico produzido atue solubilizando Fe^{3+} e, também, prevenindo, através da quelação do metal, a geração de ROS pela reação de Fenton próximo a hifa fúngica (GOODELL et al., 1997; ARANTES et al. 2008). Por outro lado, o rápido decréscimo do pH na fase inicial de crescimento, em condições de deficiência de ferro no meio de cultura, pode ser um mecanismo (acidificação do meio para posterior assimilação do ferro via redução) que o fungo emprega para superar o problema de baixas concentrações de ferro no meio.

5.1.2.1 Efeito do ferro na produção de compostos quelantes de Fe^{3+}

Quelantes específicos de Fe^{3+} foram produzidos por ambos os fungos tanto

no meio com restrição de ferro quanto nos meios suplementados. A produção de derivados de catecol foi muito superior a produção de hidroxamatos, e *W. cocos* produziu as maiores concentrações destes compostos (Figuras 20 – 23).

A suplementação com Fe^{3+} reprimiu a produção de compostos do tipo catecol e ácidos hidroxâmicos. A repressão de hidroxamatos foi menos acentuada que dos catecóis para *W. cocos*. Entretanto, para *P. medulla-panis*, o inverso foi observado, ou seja, a repressão de hidroxamatos foi mais significativa do que a repressão da produção de catecóis.

Estes resultados mostram que mais quelantes (hidroxamatos e catecolatos) foram produzidos quando os fungos cresceram mais lentamente (condições de restrição de ferro) do que quando eles cresceram rapidamente (condições de suplementação com ferro). Este fato, o qual não pode ser observado nos experimentos em meio sólido, está de acordo com a afirmação feita por Neilands (1984), de que elevada concentração de ferro no meio de cultivo geralmente resulta em excelente crescimento do microrganismo, mas somente modesta produção de quelantes específicos de Fe^{3+} (sideróforos). Além disso, estes resultados sugerem que a produção de catecóis e hidroxamatos em fungos de decomposição branca e parda é diferentemente regulada por ferro.

Figura 20. Efeito de diferentes concentrações de ferro na produção de compostos quelantes do tipo hidroxamato por *P. medulla-panis*. BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).

Figura 21. Efeito de diferentes concentrações de ferro na produção de compostos quelantes do tipo hidroxamato por *W. cocos*. BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).

Figura 22. Efeito de diferentes concentrações de ferro na produção de compostos quelantes do tipo catecolato por *P. medulla-panis*. BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).

5.1.2.2 Efeito do ferro na atividade redutora de Fe^{3+}

5.1.2.2.1 Atividade extracelular redutora de Fe^{3+}

Todas as frações de baixa massa molar (< 5k Da) de *W. cocos* e *P. medulla-panis* cultivados com ou sem suplementação de ferro apresentaram atividade redutora de Fe^{3+} , a qual foi crescente durante o cultivo e regulada pela disponibilidade de ferro no meio de cultura (Figura 24 e 25).

Figura 23. Efeito de diferentes concentrações de ferro na produção de compostos quelantes do tipo catecolato por *W. cocos*. BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).

Os níveis de atividade entre ambos os fungos não foram muito diferentes, porém para *P. medulla-panis*, a suplementação com ferro inibiu a atividade independente da concentração de ferro testada (Figura 24), ao passo que para *W. cocos*, a suplementação com a menor concentração de ferro (50 µM) resultou na maior atividade redutora, mas a atividade foi inibida com 250 µM de ferro, obtendo-se valores inferiores aos obtidos em culturas não suplementadas com ferro (Figura 25).

Figura 24. Efeito de diferentes concentrações de ferro na atividade redutora de Fe^{3+} presente nas frações de baixa massa molar (< 5 kDa) de *P. medulla-panis*. BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).

Figura 25. Efeito de diferentes concentrações de ferro na atividade redutora de Fe^{3+} presente nas frações de baixa massa molar (< 5 kDa) de *W. cocos*. BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).

5.1.2.2.2 Atividade micelial redutora de Fe^{3+} (Ferrorredutase)

A presença de ferrorredutase na superfície celular foi avaliada pela habilidade do micélio úmido em reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} . Atividade redutora micelial de *P. medulla-panis* e *W. cocos* foram detectadas durante todo o período de cultivo e os resultados mostram que esta atividade redutora micelial também é regulada pela disponibilidade de ferro no meio de cultura (Figura 26 e Figura 27).

A suplementação com ferro significativamente reprimiu a atividade de ferrorredutase. Entretanto, a suplementação diferencial não resultou em diferentes níveis de repressão, uma vez que a atividade redutora não apresentou diferenças significativas para ambos os níveis de suplementação.

Os maiores níveis de atividade foram obtidos com os micélios de *W. cocos*, e tanto para *W. cocos* quanto para *P. medulla-panis* as maiores atividades foram detectadas no início do cultivo e com os micélios cultivados sob restrição de ferro (BCF). Para ambos os fungos, esta atividade foi decrescente, estabilizando-se praticamente aos 14 dias para *P. medulla-panis* e aos 7 dias para *W. cocos*.

Figura 26. Efeito de diferentes concentrações de ferro na atividade micelial redutora de Fe^{3+} de *P. medulla-panis*. BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).

Figura 27. Efeito de diferentes concentrações de ferro na atividade micelial redutora de Fe^{3+} de *W. cocos*. BCF (■), SCF (●) e ECF (▲).

A repressão de ferroxidase presente na superfície celular por ferro tem sido reportada para outros microrganismos, como por exemplo, *Candida albicans* (MORRISSEY; WILLIAMS; CASHMORE, 1996), *Cryptococcus neoformans* (NYHUS; WILBORN; JACOBSON, 1997), *Saccharomyces cerevisiae* (LESUISSE; CASTERAS-SIMON; LABBE, 1996) e *Histoplasma capsulatum* (TIMMERMAN; WOODS, 1999), e a indução de ferroxidase sob condições de restrição de ferro é frequentemente associada com mecanismos específicos de aquisição de ferro (TIMMERMAN; WOODS, 1999). Sendo assim, as atividades de ferroxidases detectadas nos micélios de *P. medulla-panis* e *W. cocos* podem estar envolvidas no mecanismo de aquisição de ferro, pela redução do Fe^{3+} ligado a quelantes (ácidos orgânicos, sideróforos), seguido pela subsequente internalização do Fe^{2+} produzido. Esta observação é consistente com a evidência de maior produção de ácidos

orgânicos por *W. cocos* e dos derivados de catecol e ácidos hidroxâmicos por ambos os fungos em condições de carência de ferro.

5.1.2.3 Expressão de proteínas celulares reguladas por ferro

A análise de proteínas dos micélios crescidos em meio líquido para ambos os fungos nos meios diferenciais, com e sem suplementação de ferro, foi efetuada a partir dos géis de acrilamida em condições desnaturantes.

A expressão de proteínas foi similar nos micélios crescidos por 7, 14 e 21 dias, tanto para *P. medulla-panis* quanto para *W. cocos*, com bandas mais evidentes para os micélios com 7 dias, os quais são mostrados nas Figuras 28 e 29.

Para *W. cocos* foram detectadas proteínas celulares que variaram entre 10 – 77 kDa (Figura 28). A intensidade das bandas foi maior em condição de deficiência de ferro, especialmente para proteínas de baixa massa molar (10 – 30 kDa). Quando *W. cocos* foi crescido em ECF, o número de proteínas expressas foi menor, resultado da repressão de algumas proteínas, especialmente de baixa massa molar (10 – 30 kDa). Contrariamente, um aumento na intensidade de bandas correspondendo a proteínas de massas molares > 30 kDa e a indução das proteínas de massas molares aparente 77 e 86 kDa foram observadas em meios suplementados com ferro (ECF).

Figura 28. Efeito da concentração de ferro na expressão de proteínas celulares de *W. cocos*. 1 – marcadores de massa molar; BCF – baixa concentração de ferro; SCF – suficiente concentração de ferro; ECF – elevada concentração de ferro.

Para *P. medulla-panis*, o tamanho das proteínas variou entre 10 – 70 kDa, (Figura 29). Verificou-se que com o aumento da concentração de ferro no meio de cultura a expressão de algumas proteínas diminuiu significativamente, como mostrado pelo decréscimo do número de bandas corresponde a proteínas com massas molares superiores a 46 kDa e inferiores a 30 kDa.

Figura 29. Efeito da concentração de ferro na expressão de proteínas celulares de *P. medulla-panis*. 1 – marcadores de massa molar; BCF – baixa concentração de ferro; SCF – suficiente concentração de ferro; ECF – elevada concentração de ferro.

Dentre as proteínas de ambos os fungos, várias de baixa massa molar (10 – 30 kDa) foram negativamente reguladas por ferro. Similarmente, algumas proteínas < 30 kDa mostram ser reprimidas em micélio dos fungos de decomposição branca *P. chrysosporium* e *L. edodes* quando crescidos em meio com condições suficiente em ferro (90 μ M) (HERNÁNDEZ-MACEDO et al., 2002). Além disso, em condições de restrição de ferro, o fungo patogênico *Madurella mycetomatis* expressou várias proteínas de baixa massa molar (MEZENEC; BOIRON, 1995). Contudo, uma comparação entre os perfis de proteínas celulares é difícil, desde que estes fungos são de diferentes espécies, porém, as similaridades destacadas aqui podem indicar que um mecanismo molecular comum seja provavelmente ativado nos fungos sob restrição de ferro.

Embora a função exata destas proteínas diferencialmente reguladas por ferro em *P. medulla-panis* e *W. cocos* seja ainda desconhecida, sabe-se que a composição e permeabilidade da parede celular muda drasticamente sob diferentes condições de crescimento, e a partir dos resultados de produção de agentes

quelantes de metais, e atividade redutora, as seguintes associações podem indicar que uma ou mais destas proteínas:

i) atue como receptores na superfície celular que participa na translocação de complexos ferro-sideróforos através da membrana externa ou esteja envolvida nos mecanismos de biossíntese de sideróforos, já que a maior produção de catecóis e hidroxamatos coincidiu com a maior expressão de proteínas celulares. Nesse contexto, a expressão de proteínas com massa molar ao redor de 60 kDa pode estar associada com proteínas envolvidas na biossíntese de sideróforos do tipo hidroxamato, como por exemplo, a L-Ornitina N⁵-oxigenase fúngica, de massa molar estima em 62 kDa, inicia a biossíntese de sideróforos em *Ustilago maydis* (MEI; BUDDE; LEONG, 1993). Principalmente para *W. cocos* a expressão de proteínas com massa molar ao redor de 60 kDa, não foi significativamente afetada sob diferentes condições de disponibilidade de ferro, similar ao efeito observado para a produção de hidroxamatos pelo mesmo fungo;

ii) seja uma ferroredutase, a qual reduz Fe³⁺ de complexos ferro-quelantes, antes da internalização do ferro, já que *W. cocos* aparentemente produziu mais ácidos em condição de restrição de Fe³⁺ e que complexos quelante-Fe³⁺ de baixa estabilidade como ácidos orgânicos-Fe³⁺ são substratos de ferroredutase (HASS, 2003).

É provável que *W. cocos* tenha mais de um mecanismo de aquisição de ferro: i) um mecanismo consistiria na produção de ácidos orgânicos; ii) uma segunda rota seria a produção de compostos quelantes de baixa massa molar do tipo catecolato e hidroxamato; iii) uma terceira estratégia que depende da atividade extracelular redutora de Fe³⁺, expressada por CBMM ou ferroredutase micelial.

Embora estes possíveis mecanismos tenham sido mais expressivos em condições de restrição de ferro, algumas evidências da regulação diferencial foram mostradas, fato que seria consistente com diferentes funções dos metabólitos envolvidos nestes processos. Na fase inicial de crescimento é muito provável que o mecanismo envolvendo acidificação do meio, e quelação do Fe³⁺ para posterior redução seja conduzido por ferroredutase, uma vez que a produção de quelantes específicos neste período não foi significativa.

Para *P. medulla-panis*, os mecanismos de aquisição de ferro parecem ser similares aos de *W. cocos*, com exceção do mecanismo envolvendo acidificação do meio.

5.1.3 Estudo da influência de diferentes fontes de carbono na produção de CBMM

A produção de CBMM (peptídeos e quelantes do tipo hidroxamato e catecolato) e da atividade redutora de Fe^{3+} por *W. cocos* e *P. medulla-panis* foi avaliada em diferentes meios de cultivo. As fontes de carbono avaliadas foram ácido succínico, glicose e L-ornitina, na presença ou ausência de celulose microcristalina. Ácido succínico foi escolhido, uma vez que os melhores substratos indutores da produção de agentes quelantes de ferro (sideróforos) são aqueles metabolizados unicamente por vias aeróbias, como por exemplo, succinato e o citrato (NEILANDS, 1984). Por outro lado, L-ornitina foi também avaliada devido ao fato que a maioria dos quelantes fúngicos até hoje identificados e caracterizados provém do metabolismo da L-ornitina (WINKELMANN, 2002). Celulose microcristalina foi adicionada ao meio, com o objetivo de fornecer uma fonte de carbono não prontamente disponível, como no caso de madeira, e pelo fato de ter sido utilizada nos cultivos de *G. trabeum* para a produção e isolamento de compostos com capacidade de quelar e reduzir Fe^{3+} (GOODELL et al., 1997).

5.1.3.1 Crescimento fúngico e pH das culturas

W. cocos e *P. medulla-panis* cresceram de forma diferenciada nos diferentes meios de cultivo (Figura 30). Observou-se que *P. medulla-panis* apresentou melhor crescimento (como previamente observado em meio líquido e sólido no estudo da influência do ferro), destacando-se o meio à base de ornitina. *W. cocos* cresceu melhor no meio com ácido succínico, seguido pelo meio contendo glicose, e mais lentamente no meio contendo ornitina.

A formação de micélio nos meios de cultivo suplementado com celulose microcristalina foi maior do que nos meios sem suplementação. Contudo, nestes meios a biomassa produzida foi estimada somente em forma visual, uma vez que a sua quantificação direta não foi possível devido à dificuldade em separar a massa micelial do substrato.

Ao final do período de cultivo, o pH das culturas foi determinado. Nos caldos de cultura de *W. cocos*, o pH decresceu de 4,5 para $4,1 \pm 0,2$, com exceção de quando o fungo foi cultivado em glicose-celulose, quando o pH reduziu para $2,9 \pm$

Figura 30. Efeito do ácido succínico, ornitina e glicose como fonte de carbono no crescimento de *W. cocos* e *P. medulla-panis*.

0,2 (Figura 31). Para *P. medulla-panis*, o menor valor de pH ($3,1 \pm 0,3$), foi obtido quando crescido em meio à base de ornitina e celulose, ao passo que quando este fungo foi crescido em meio apenas com ornitina o pH subiu para $6,7 \pm 0,5$ (Figura 32).

Novamente o decréscimo de pH nos extratos de *W. cocos* pode ser utilizado como um indicativo da produção de ácidos orgânicos, como já observado durante o estudo da influencia do ferro em meio líquido. Neste conjunto de experimentos, sob determinadas condições *P. medulla-panis* também abaixou o pH do meio de cultura, o que não foi observado no conjunto de experimentos anterior, indicando que a produção de ácidos orgânicos por este fungo é fortemente afetada pela composição do meio de cultura.

Figura 31. pH final dos caldos das culturas de *W. cocos* cultivado em diferentes fontes de carbono.

Figura 32. pH final dos caldos das culturas de *P. medulla-panis* cultivado em diferentes fontes de carbono.

5.1.3.2 Detecção das atividades quelante e redutora de Fe^{3+} nas frações <5 kDa

A presença de CBMM com capacidade de quelar Fe^{3+} nas frações < 5 kDa dos caldos de cultivo de *P. medulla-panis* e *W. cocos* foi determinada utilizando o método CAS (Tabela 5). Todas as frações < 5 kDa, inclusive o meio não inoculado, promoveram reação CAS positiva, este último provavelmente pelas substâncias presentes em baixas concentrações no meio de cultivo (citrato, succinato, entre outras), que interferem com o método CAS. Porém, após os 30 dias de cultivo, provavelmente estes compostos já tivessem sido metabolizados e os compostos quelantes detectados sejam aqueles produzidos durante o cultivo.

De uma forma geral, pouca diferença foi observada com ou sem suplementação com celulose microcristalina. Contudo, a máxima atividade quelante para os dois fungos foram similares, mas detectadas em meios de cultura diferentes.

A capacidade das frações < 5 kDa em reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} foi significativamente diferente entre os vários meios de cultivo testados (Tabela 5).

As frações < 5 kDa de *W. cocos* obtidas a partir do cultivo em ácido succínico-celulose resultaram em baixos níveis de atividade redutora e nenhuma atividade foi detectada nos cultivos contendo ornitina ou ácido succínico. Uma alta atividade redutora foi detectada com as frações obtidas dos cultivos contendo ornitina-celulose, glicose e glicose-celulose.

Tabela 5 – Detecção das atividades quelante e redutora de íons Fe^{3+} pelas frações < 5 kDa obtidas a partir do cultivo de *W. cocos* e *P. medulla-panis* em diferentes fontes de carbono.

Meio de cultivo	Ativ. Quelante- Fe^{3+} (%)		Ativ. Redutora- Fe^{3+} ($\mu\text{M Fe}^{2+}$)	
	<i>W. cocos</i>	<i>P. medulla-panis</i>	<i>W. cocos</i>	<i>P. medulla-panis</i>
Ornitina	79,3 $\pm$ 8,3 b	72,0 $\pm$ 6,3 a	0,0 a	0,50 $\pm$ 0,06 a
Ornitina-Celulose	81,7 $\pm$ 7,3 b	65,2 $\pm$ 9,4 a	19,4 $\pm$ 2,3 b	46,0 $\pm$ 4,3 d
Ác. Succínico	84,6 $\pm$ 8,3 b	60,7 $\pm$ 7,8 a	0,0 a	0,67 $\pm$ 0,09 a
Ác. Succínico-celulose	59,3 $\pm$ 9,4 a	85,8 $\pm$ 6,5 b	0,35 $\pm$ 0,04 a	17,47 $\pm$ 2,5 c
Glicose	63,7 $\pm$ 5,7 a	69,3 $\pm$ 8,4 a	30,2 $\pm$ 2,4 c	23,0 $\pm$ 0,7 c
Glicose-celulose	89,4 $\pm$ 7,6 b	67,6 $\pm$ 6,9 a	40,5 $\pm$ 4,5 d	9,2 $\pm$ 1,5 b

Valores seguidos pelas mesmas letras (na mesma coluna) não diferem significativamente ao nível de confiança de 95%.

Todas as frações < 5 kDa de *P. medulla-panis* apresentaram atividade redutora de Fe^{3+} . Como para *W. cocos*, os níveis mais baixos foram, também, obtidos nos meios com ornitina ou ácido succínico, na ausência de celulose. Os maiores níveis de atividade redutora foram obtidos em ornitina-celulose, seguido por glicose e ácido succínico-celulose.

Similar ao que foi observado para a detecção da atividade quelante, a maior atividade redutora foi semelhante para ambos os fungos, porém, obtida em meios de cultivo diferentes. Para *W. cocos* a maior atividade redutora foi detectada no meio de cultivo com glicose suplementado com celulose cristalina, ao passo que para *P. medulla-panis* ocorreu no meio contendo ornitina suplementado com celulose.

5.1.3.3 Caracterização química das frações < 5 kDa

A fim de identificar quimicamente os compostos presentes nas frações < 5 kDa responsáveis pelas atividades quelante e redutora de íons Fe^{3+} , foi analisado a presença de derivados de catecol e hidroxamato (Tabela 6) e de peptídeos em algumas dessas frações (Tabela 7).

A presença de compostos com estruturas de catecol foi detectada em todas as frações < 5 kDa e diferentemente afetada pela mudança da fonte de carbono no

meio de cultivo. Contudo, as maiores concentrações destes compostos foram detectadas nos meios suplementados com celulose, à excessão do meio com ácido succínico, no qual a adição de celulose resultou em menores concentrações de catecóis para ambos os fungos.

A maior quantidade de catecóis produzida por *W.cocos* foi no meio com glicose-celulose ($24,1 \pm 1,8 \mu\text{M}$), enquanto que uma produção semelhante ($21,1 \pm 1,5 \mu\text{M}$) foi obtida para *P. medulla-panis* no meio ornitina-celulose.

A produção de compostos do tipo hidroxamato foi também diferentemente afetada pela fonte de carbono no meio de cultivo. De uma forma geral, estes compostos foram produzidos principalmente por *W. cocos*. A maior produção de hidroxamatos por *P. medulla-panis* foi detectada no meio contendo ornitina como única fonte de carbono, ao passo que nestas condições *W. cocos* praticamente não produziu hidroxamatos. Este fato pode estar associado ao crescimento lento de *W. cocos* neste meio de cultivo (Figura 30). Por outro lado, a maior produção de hidroxamatos por *W. cocos* foi detectada nos meios com ornitina-celulose ou ácido succínico.

Tabela 6 – Detecção de compostos quelantes do tipo catecol e ácido hidroxâmico nas frações < 5 kDa obtidas a partir do cultivo de *W. cocos* e *P. medulla-panis* em diferentes fontes de carbono.

Médio de Cultivo	Catecóis (μM)		Hidroxamatos (μM)	
	<i>W. cocos</i>	<i>P.medulla-panis</i>	<i>W. cocos</i>	<i>P.medulla-panis</i>
Ornitina	$4,5 \pm 0,3$ b	$3,1 \pm 0,5$ a	$0,2 \pm 0,1$ a	$9,0 \pm 1,1$ d
Ornitina-Celulose	$5,6 \pm 0,8$ b	$21,1 \pm 1,5$ e	$24,1 \pm 1,6$ c	$0,2 \pm 0,1$ a
Ác. Succínico	$4,4 \pm 0,6$ b	$6,3 \pm 1,5$ cd	$22,5 \pm 2,8$ c	$0,3 \pm 0,2$ a
Ác. Succínico-Celulose	$0,3 \pm 0,1$ a	$4,4 \pm 0,4$ bc	$0,3 \pm 0,2$ a	$0,3 \pm 0,2$ a
Glicose	$12,9 \pm 2,0$ c	$4,5 \pm 0,7$ bc	$4,7 \pm 0,4$ b	$2,7 \pm 0,6$ b
Glicose-Celulose	$24,1 \pm 1,8$ d	$8,0 \pm 1,4$ d	$5,4 \pm 0,3$ b	$5,2 \pm 0,4$ c

Valores seguidos pelas mesmas letras (na mesma coluna) não diferem significativamente ao nível de confiança de 95%.

As diferenças observadas para a produção de quelantes do tipo hidroxamato indicam que ornitina e ácido succínico estimulam diferentemente a produção de

compostos hidroxâmicos. Os caminhos biossintéticos destes compostos são fortemente conectados ao metabolismo aeróbio pelo uso de ácidos originados da oxidação do ciclo do ácido cítrico (tal como citrato, succinato e acetato), e os quelantes fúngicos do tipo hidroxamato são principalmente sintetizados a partir de ornitina (WINKELMANN, 2002).

Peptídeos presentes nas frações < 5 kDa de alguns dos cultivos de *P. medulla-panis* e *W. cocos* foram precipitados com ácido tricloroacético e posteriormente determinados pelo método de Lowry (LOWRY, 1951). Os resultados indicam que ambos os fungos produzem peptídeos de baixa massa molar com capacidade de reduzir Fe^{3+} (Tabela 7). Embora a quantidade de peptídeos produzidas não tenha sido quantificada, a partir dos valores de absorbância verifica-se que *W. cocos* produziu mais peptídeos do que *P. medulla-panis*.

Tabela 7 – Detecção de peptídeos e atividade redutora nas amostras obtidas da precipitação com ácido tricloroacético das frações < 5 kDa.

Fungo/Meio de cultivo	Peptídeo ^a	Ativ. Redutora- Fe^{3+} ($\mu\text{M Fe}^{2+}$) ^b
<i>W. cocos</i> /glicose-celulose	0,333	4,4
<i>W. cocos</i> /glicose	0,617	9,6
<i>P. medulla-panis</i> /ornitina-celulose	0,211	1,5
<i>P. medulla-panis</i> /glicose	0,117	3,8

^a Peptídeos detectado pelo método de Lowry e expresso pelo aumento da absorbância a 750 nm em relação ao branco.

^b Atividade redutora detectada após solubilização dos peptídeos precipitados e expressa com relação a fração < 5 kDa.

A maior atividade redutora de Fe^{3+} determinada nas frações < 5 kDa de ambos os fungos antes da precipitação dos peptídeos foi observada no mesmo meio no qual foi detectada a maior produção de derivados de catecol, que para *P. medulla-panis* foi ornitina/celulose e para *W. cocos* glicose/celulose (Tabelas 5 e 6). Mesmo peptídeos com atividade redutora tendo sido detectados nestes meios (Tabela 7) estes não foram os principais agentes redutores produzidos, já que a atividade proporcionada por estes peptídeos foi muito inferior aos níveis detectados com as frações < 5 kDa antes da precipitação destes peptídeos. Isto sugere que outros compostos, possivelmente os derivados de catecol, sejam os principais

responsáveis por esta atividade, uma vez que catecóis possuem capacidade redutiva e podem, também, reduzir metais de transição (AHMAD, 1995).

É interessante notar que, embora a concentração de catecolatos presentes nas frações de *P. medulla-panis* quando cultivados em glicose-celulose sejam maiores do que em glicose, a atividade redutora de Fe^{3+} foi maior no meio apenas com glicose. Quando *W. cocos* foi cultivado em ornitina-celulose e em ácido succínico, praticamente a mesma concentração de catecolatos foi produzida, entretanto, a atividade redutora foi detectada na fração < 5 kDa obtida no meio com ornitina-celulose mas não no meio com ácido succínico. Resultados similares foram obtidos quando *P. medulla-panis* foi cultivado em ácido succínico e em ácido succínico-celulose, quando a maior atividade redutora foi detectada com fração < 5 kDa que apresentaram as menores concentrações de catecolatos. Estas observações sugerem que existem diferenças em estrutura entre os quelantes do tipo catecolato produzidos por fungos de decomposição branca e parda, uma vez que estes compostos parecem ser os principais responsáveis pela atividade redutora de Fe^{3+} detectada nas frações < 5 kDa.

5.1.3.4 Detecção de compostos regulados por ferro utilizando eletroforese capilar

P. medulla-panis e *W. cocos* foram cultivados na presença e ausência de ferro, e os compostos extraídos do meio de cultura com a resina XAD-2, foram analisados pela técnica de eletroforese capilar de zona (CZE). Uma vez que este é um estudo inicial, algumas das variáveis na análise de CZE que afetam a resposta (separação) foram estudadas. Sendo elas: pH e concentração do eletrólito de separação.

5.1.3.4.1 Variação do pH

A partir dos resultados das análises dos compostos extraídos dos caldos de cultivos de *P. medulla-panis* (PMP) e *W. cocos* (WC) na ausência de ferro por CZE em diferentes pHs, observou-se que o aumento do pH do eletrólito aumentou a velocidade de migração da amostra. Isso ocorreu porque o aumento do pH provoca o aumento da ionização dos grupos silanóis da parede interna do capilar,

aumentando assim a velocidade do fluxo eletroosmótico. O aumento do pH prejudicou a separação dos picos, uma vez que em velocidades maiores, não há tempo para que os picos fiquem bem separados. Dessa forma, através da análise dos eletroferogramas (Figuras 33 e 34), verifica-se que a melhor separação, combinada com um tempo razoável de migração ocorreu no pH 8,1, tanto para PMP quanto para WC.

Figura 33. Eletroferogramas de WC em diferentes pHs (tampão fosfato 50 mM).

Figura 34. Eletroferogramas de PMP em diferentes pHs (tampão fosfato 50 mM).

Uma vez que o pH de separação foi otimizado, as amostras PMP e WC foram comparadas com os eletroferogramas de PMP-Fe e WC-Fe, que contém compostos extraídos dos caldos de cultivo de *P. medulla-panis* e *W. cocos* na presença de ferro, respectivamente (Figuras 35 e 36).

Figura 35. Eletroferogramas de WC e WC-Fe (tampão fosfato 50 mM, pH 8,1).

Figura 36. Eletroferogramas de PMP e PMP-Fe (tampão fosfato 50 mM, pH 8,1).

Nenhuma diferença significativa foi observada entre WC e WC-Fe, indicando a ausência de um possível composto regulado por ferro, que deveria aparecer no eletroferograma da amostra WC (Figura 35). Devido à possível existência de um composto neutro nas amostras de *W. cocos*, as mesmas foram, então, analisadas por cromatografia micelar eletrocinética capilar MEKC. Por outro lado, pela comparação dos eletroferogramas de PMP e PMP-Fe, observou-se um pico na amostra Pmp que não foi observado na amostra Pmp-Fe (Figura 36), indicando a produção de um composto (ou compostos) regulado (s) por ferro pelo fungo *P. medulla-panis*, com característica aniônica em pH básico uma vez que a migração ocorreu depois do marcador de fluxo eletroosmótico (acetona).

5.1.3.4.2 Variação da concentração de eletrólito de separação

Para melhorar a separação das amostras de *P. medulla-panis*, o efeito da concentração de eletrólito de separação foi avaliado, e observou-se que o aumento da concentração implicou na diminuição da velocidade de migração (Figura 37). Isso ocorre porque o aumento da concentração de eletrólito causa um achatamento da dupla camada difusa da parede interna do capilar (composta por uma camada fixa e outra móvel ou difusa de íons), o que retarda a migração da amostra.

Figura 37. Eletroferogramas de PMP em diferentes concentrações de eletrólito (tampão fosfato) no pH 8,1.

Através dos eletroferogramas obtidos (Figura 37), verifica-se que a melhor concentração de eletrólito para o estudo da amostra PMP é 60 mM, já que, nesta concentração, os picos eletroforéticos apresentaram um tempo razoável de migração e boa separação.

Comparando as amostras PMP e PMP-Fe, na concentração de eletrólito otimizada (Figura 38), observou-se o mesmo pico já observado anteriormente na otimização do pH, que é (são) o (os) provável (eis) composto (s) regulado (s) por ferro.

Figura 38. Eletroferogramas de PMP e PMP-Fe na concentração de eletrólito otimizada (tampão fosfato 60 mM, pH 8,1).

5.1.3.4.3 Cromatografia micelar eletrocinética capilar (MEKC)

Uma vez que com a CZE não é possível a separação de diferentes compostos neutros, pois estes migram na mesma velocidade, já que não estão sob a influência do campo elétrico, uma alternativa bastante usada nesse caso é o modo de separação por MEKC.

Na MEKC, agentes tensoativos iônicos, em condições apropriadas à formação de micelas, são adicionados ao eletrólito de corrida, proporcionando assim um sistema eletroforético de duas fases. O eletrólito representa a fase primária, a

qual é transportada eletroosmoticamente sob ação do campo elétrico, enquanto que as micelas representam a fase secundária, ou pseudo-estacionária, a qual é transportada por uma combinação de eletroforese e eletroosmose. A partição diferenciada dos solutos neutros entre as duas fases é responsável pela seletividade da separação. Embora a MEKC seja ideal para a separação de solutos neutros, pode também auxiliar a separação de compostos iônicos e tem sido extensivamente utilizada para tal fim (TAVARES, 1997).

5.1.3.4.3.1 Variação da concentração de surfactante

Através dos eletroferogramas da amostra de *W. cocos* em diferentes concentrações de surfactante (Figura 39), observou-se que os picos coincidem com o marcador de fluxo (acetona). Com o aumento da concentração de surfactante, verificou-se a diminuição da velocidade do fluxo eletroosmótico, devido ao aumento da concentração de sais no eletrólito. Esperava-se que com a adição de surfactante os picos fossem melhor separados, de acordo com suas diferentes hidrofobicidades, porém isso não foi observado. Na análise dos picos dos eletroferogramas, verificou-se que a melhor separação, combinada com um tempo razoável de migração ocorreu em 40 mM de SDS.

Através da análise das amostras WC e WC-Fe na concentração otimizada de surfactante, não foi observado diferença muito significativa entre os dois eletroferogramas (Figura 40). Dessa forma, mesmo com a análise por MEKC não foi observado claramente um provável pico indicando que *W. cocos* produz compostos que são regulados por ferro, porém verificam-se alguns picos ao redor da região de compostos hidrofílicos que não aparecem quando o fungo foi cultivado na presença de ferro.

Apesar do pico do (s) provável (eis) composto (s) regulado (s) por ferro na amostra PMP ter sido observado na análise por CZE, foi feita a separação por MEKC para analisar os outros picos que estavam migrando junto com o marcador de fluxo, sendo, portanto, neutros no pH do eletrólito de corrida. Os resultados obtidos (Figura 41) não apresentaram grandes diferenças quando comparados com os resultados obtidos por CZE (Figura 36). O tempo de corrida analisado também não foi suficiente para a análise completa da amostra.

Figura 39. Eletroferogramas de WC em diferentes concentrações de SDS, no pH 8,1.

Ao analisar os picos dos eletroferogramas obtidos com PMP (Figura 41), verificou-se que a concentração otimizada de surfactante, que resultou na melhor separação combinada com um tempo razoável de migração ocorreu em 40 mM de SDS.

Figura 40. Eletroferogramas de WC e WC-Fe utilizando 40 mM SDS, pH 8,1.

Na análise dos eletroferogramas das amostras PMP e PMP-Fe na concentração de SDS otimizada (Figura 42), novamente verificou-se o pico do (s) provável (eis) composto (s) regulado (s) por ferro.

Embora os resultados das análises de eletroforese capilar sejam preliminares, os mesmos apresentam fortes evidências de que compostos regulados por ferro são produzidos principalmente por *P. medulla-panis*. Em relação à *W.*

Figura 41. Eletroferogramas de PMP em diferentes concentrações de SDS, no pH 8,1.

Figura 42. Eletroferogramas de PMP e PMP-Fe utilizando 40 mM de SDS.

cocos, mais estudos devem ser feitos para identificar e caracterizar seus possíveis compostos, como por exemplo, avaliar outras concentrações de ferro no cultivo, sendo que as condições utilizadas podem não ter sido suficiente para se observar claramente a produção de compostos regulados por ferro. Uma vez definidas as melhores condições de separação, as análises poderão, então, serem feitas

utilizando um espectrômetro de massa, acoplado à eletroforese capilar, para obter informações estruturais dos compostos que estão sendo regulados por ferro.

5.2 Purificação dos CBMM

5.2.1 Caracterização do extrato inicial

Neste grupo de experimentos, os meios de cultura foram preparados à base de celulose microcristalina (Avicel), a qual promoveu a melhor indução da produção de compostos não enzimáticos de baixa massa molar com atividade redutora de Fe^{3+} (5.1.3.2).

Nos extratos extracelulares de *W. cocos* e *P. medulla-panis* foram analisadas as enzimas do complexo celulolítico, hemicelulolítico e ligninolítico, a atividade redutora de Fe^{3+} e ácido oxálico (Tabela 6). Nas frações < 5 kDa foram investigadas a presença de derivados de catecol e ácido hidroxâmico, peptídeos e também a atividade redutora de íons Fe^{3+} (Tabela 8).

Tabela 8 – Caracterização dos extratos iniciais das frações < 5 kDa de *P. medulla-panis* e *W. cocos*.

	<i>W. cocos</i>	<i>P. medulla-panis</i>
Endo-1,4- β -glucanase ⁽¹⁾	0,20	0,04
Exo-1,4- β -glucanase ⁽¹⁾	ND	ND
1,4- β -glicosidade ⁽¹⁾	0,05	0,27
β -D-xilanase ⁽¹⁾	1,53	0,89
β -D-xilosidase ⁽¹⁾	0,08	0,02
CDH	ND	ND
Lacase ⁽²⁾	ND	1,50
LiP	ND	ND
MnP	ND	ND
Redução de Fe^{3+} ⁽³⁾	21,60	16,20
Redução de Fe^{3+} ^(3,4)	20,30	15,20
Catecóis ⁽⁴⁾	7,00	5,95
Hidroxamatos ⁽⁴⁾	2,63	2,48
Ácido oxálico ⁽⁵⁾	0,39	0,10
Peptídeos ⁽⁶⁾	0,537	0,211
pH	2,10	3,20

⁽¹⁾ Atividade enzimática em U/mL

⁽²⁾ Atividade enzimática em U/L

⁽³⁾ Concentração de Fe^{2+} em μM

⁽⁴⁾ Detectados nas frações < 5 kDa e expressos em relação ao extrato inicial (μM)

⁽⁵⁾ Concentração em mM

⁽⁶⁾ Detectados nas frações < 5 kDa e expressos como o aumento de $\text{Abs}_{750\text{nm}}$

ND – não detectado

Os fungos produziram endo-1,4- β -glucanase e 1,4- β -glicosidade, mas não foram detectadas as atividades de exo-1,4- β -glucanase ou CDH. β -D-xilanase e β -D-xilosidase foram detectadas nos extratos de *W. cocos* e *P. medulla-panis* e entre as enzimas investigadas, a atividade de xilanase foi a mais alta. Dentre as enzimas oxidativas avaliadas, lacase foi a única detectada e somente no extrato de *P. medulla-panis*.

A atividade redutora de Fe^{3+} de *W. cocos* foi um pouco superior a detectada nos extratos de *P. medulla-panis*. Uma vez que CDH, que possui atividade redutora de Fe^{3+} não foi detectada nos extratos dos fungos e que a atividade redutora detectada na fração de baixa massa molar foi praticamente igual a detectada no extrato inicial, é evidente que toda a atividade redutora detectada no extrato inicial é devido à ação de CBMM.

W. cocos produziu quatro vezes mais ácido oxálico do que *P. medulla-panis* e reduziu o pH do meio de cultura drasticamente.

Nas frações < 5 kDa foram detectados tanto compostos do tipo catecol quanto hidroxamato, porém *W. cocos* produziu maiores concentrações destes quelantes que *P. medulla-panis*, como observado previamente. Ambos os fungos também produziram peptídeos de baixa massa molar, sendo que a maior produção foi observada, novamente, para *W. cocos*.

5.2.1.1 Identificação dos CBMM por CG-MS

Os CBMM produzidos por *W. cocos* e *P. medulla-panis* e extraídos das frações < 5 kDa com a resina XAD-2 foram analisados por GC-MS. Os cromatogramas obtidos indicaram a produção de vários compostos para ambos os fungos. Embora a elucidação exata das estruturas de todos estes compostos não tenha sido efetuada, algumas prováveis estruturas foram identificadas com base em comparação de espectros contidos nas bibliotecas NIST, e também, com base nas informações do número de hidroxilas presentes em cada composto, obtidos a partir da comparação dos espectros de massa das amostras derivatizadas com TMAH e ^{13}C -TMAH. Dentre os compostos produzidos por *W. cocos*, encontram-se benzenos hidroxilados, os ácidos benzóico, cinâmico e fenilacético e suas respectivas formas hidroxiladas na posição *para*, além do ácido ftálico, de um derivado de hidróxifenona, um ácido amino-benzóico e ácidos graxos saturados de cadeia longa (Tabela 9).

Tabela 9 – CBMM produzidos por *W. cocos*

Pico	TR ^a	AR ^{b,c}	Composto	Estrutura
1	6,164	1,308	ácido benzóico
2	7,405	0,440	ácido fenilacético
3	8,296	0,126	1,2-dihidroxi-3-metil-benzeno
4	10,249	0,217	1,2,3-trihidroxi-benzeno (pirogallol)
5	10,375	1,886	ácido 4-hidroxi-benzóico
6	10,514	0,530	ácido 3-fenil-2-propenóico (ácido cinâmico)
7	11,299	1,520	ácido 4-hidroxi-fenilacético
8	11,659	0,634	ácido benzeno-1,2-dicarboxílico (ácido ftálico)
9	13,645	0,186	ácido amino-benzóico
10	14,142	0,292	derivado de hidroxi-fenona
11	15,361	0,173	ácido 4-hidroxi-cinâmico
12	19,587	0,845	ácido hexadecanóico (ácido palmítico)
13	22,818	0,851	ácido octadecanóico (ácido esteárico)

^a Tempo de retenção (min)^b Altura relativa dos picos em relação ao padrão interno^c Variação menor que 2%

Dentre os compostos produzidos por *P. medulla-panis*, foram identificados benzenos hidroxilados, os ácidos cinâmico e ftálico, álcool veratrílico, além de compostos aromáticos clorados e ácidos graxos saturados de cadeia longa (Tabela 10).

A capacidade redutora de benzenos hidroxilados é bem conhecida, ao passo que a atividade redutora do ácido 4-hidroxi-cinâmico foi recentemente demonstra por Aguiar e Ferraz (2006) e a do ácido 4-hidroxi-fenilacético foi confirmada através do ensaio de redução de Fe^{3+} com padrão autêntico. Dessa forma, os benzenos di- e tri-hidroxilados, metil-catecol e pirogalol, respectivamente, assim como os ácidos 4-hidroxi-cinâmico e 4-hidroxi-fenilacético são, entre os CBMM produzidos por *W. cocos* e identificados, os principais responsáveis pela atividade redutora de Fe^{3+} previamente detectada (Figura 43 e Figura 44). Dependendo da posição do grupo amino do ácido amino-benzóico produzido por *W. cocos*, é possível que ele também reduza Fe^{3+} , como o ácido antranílico (ácido 2-amino-benzóico) (KAMNEV e KUZMANN, 1997). A partir das áreas relativas (AR) dos C identificados da cultura de *W. cocos* (Tabela 9), o ácido 4-hidroxi-fenilacético é o principal metabólito de baixa massa molar com atividade redutora de Fe^{3+} produzido por este fungo.

Para *P. medulla-panis*, os benzenos hidroxilados (catecol e pirogalol) e o ácido benzóico di-metoxilado (álcool veratrílico) são, entre outros CBMM identificados, os principais responsáveis pela redução de ferro previamente detectada (Figura 43 e Figura 44).

As diferenças estruturais dos CBMM produzidos por *P. medulla-panis* e *W. cocos* confirmam as suspeitas iniciais destacadas no item 5.1.3.3, quando não se observou uma relação entre a quantidade de compostos do tipo catecol produzida e a atividade redutora de Fe^{3+} detectada, mesmo estes compostos sendo os principais responsáveis por essa atividade, tanto para *P. medulla-panis* quanto para *W. cocos*. Isso se deve a resposta diferenciada dos diferentes compostos produzidos por ambos os fungos com o método de Arnou (ARNOW, 1937), utilizado para a detecção de compostos do tipo catecol. Os compostos redutores de Fe^{3+} produzidos por *P. medulla-panis* foram compostos aromáticos di e tri-hidroxilados, ao passo para *W. cocos* foram principalmente compostos aromáticos mono-hidroxilados, além de di e tri-hidroxilados, entretanto compostos contendo um único OH fenólico reagem fracamente ou até mesmo não reagem com o método de Arnou, enquanto compostos com dois ou três OH fenólicos reagem fortemente.

Tabela 10 – CBMM produzidos por *P. medulla-panis*

Pico	TR ^a	AR ^{b,c}	Composto	Estrutura
1	6,884	0,416	1,2-dihidroxi-benzeno (catecol)
2	10,269	0,386	1,2,3-trihidroxi-benzeno (pirogallol)
3	10,505	0,883	ácido 3-fenil-2-propenóico (ácido cinâmico)
4	11,686	2,380	ácido benzeno-1,2-dicarboxílico (ácido ftálico)
5	13,519	0,238	ácido 5-cloro-2-hidroxi-benzóico
6	13,914	0,336	ácido 3,4-dimetoxi-benzóico (álcool veratrílico)
7	13,994	0,547	ácido 3,5-di-cloro-4-hidroxi-benzóico
8	17,566	0,319	ácido cloro-hidroxi-metil cloro fenilacético
9	19,566	0,611	ácido hexadecanóico (ácido palmítico)
10	22,793	0,613	ácido octadecanóico (ácido esteárico)

^a Tempo de retenção (min)^b Altura relativa dos picos em relação ao padrão interno^c Variação menor que 2%

Estes CBMM com atividade redutora de Fe^{3+} identificados das culturas de *P. medulla-panis* e *W. cocos* poderiam então mediar a reação entre Fe^{3+} presente na madeira e peróxido de hidrogênio, através da redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} . Esse mecanismo é proposto para o fungo de decomposição parda *G. trabeum*, como sendo a via oxidativa não enzimática de baixa massa molar empregada para a degradação dos polissacarídeos e modificação da lignina, principalmente nos estágios iniciais de biodegradação (GOODELL et al., 1997; KEREM et al., 1998, 1999; PASZCZYNSKI et al., 1999; XU; GOODELL, 2001). Dessa forma, a identificação destes compostos fornece evidências de que além de *G. trabeum*, outros fungos de decomposição parda, como o *W. cocos*, ou fungos de decomposição branca, neste caso *P. medulla-panis*, dispõem de mecanismos para reduzir Fe^{3+} presente na madeira (assumindo que estes compostos também sejam produzidos durante a biodegradação da madeira) e conseqüentemente promoverem a geração de radicais hidroxila via reação de Fenton, como proposto para *G. trabeum*.

Estes compostos redutores de ferro podem também estar auxiliando reações de peroxidação de ácidos graxos durante a biodegradação. Isso poderia acontecer pela redução do Fe^{3+} presente na madeira, e o Fe^{2+} gerado então iniciar a reação de peroxidação. Este Fe^{2+} também poderia reagir com peróxido de hidrogênio (reação de Fenton mediada), e o radical hidroxila gerado então iniciar a peroxidação. Para que isto ocorra, é necessária que uma fonte de ácidos graxos insaturados seja estabelecida. Neste sentido, seria possível que este sistema esteja presente em fungos de decomposição branca e parda, uma vez ácidos graxos são encontrados naturalmente nos extrativos de madeira, e no caso de fungos de decomposição branca, alguns trabalhos do grupo de ENOKI (ENOKI et al., 1999; 2000) demonstram a produção de ácidos graxos insaturados pelo fungo de decomposição branca seletiva *C. subvermispora*, porém, até o momento, não havia sido identificado compostos redutores de ferro produzidos por fungos de decomposição branca que poderiam então sugerir o envolvimento dos mesmos indiretamente na peroxidação de ácidos graxos. Considerando que estes sistemas possam estar presentes tanto em fungo de decomposição branca quanto parda, a presença de lacase e/ou MnP em fungos de decomposição branca atuando de forma complementar ou em associação com este sistema, poderia ser responsável pela extensiva degradação da lignina comumente observada durante a decomposição branca mas não em

decomposição parda.

P. medulla-panis é um fungo aparentemente deficiente em LiP e a peroxidação de ácidos graxos iniciada indiretamente por estes compostos redutores de ferro, seja pelo Fe^{2+} reduzido ou pelo radical hidroxila gerado pela reação de Fenton mediada, pode ser um modelo adequado, para explicar a degradação da lignina na ausência de LiP e, também, a ação do fungo na madeira de forma não erosiva, já que estes sistemas degradativos são de baixa massa molar e poderiam se difundir na parede celular vegetal e causar a degradação da lignina em regiões distantes da hifa fúngica.

Dentre os vários compostos organo-clorados produzidos por *P. medulla-panis*, estão o ácido 5-cloro-2-hidroxi-benzóico, ácido 3,5-di-cloro-4-hidroxi-benzóico e o ácido cloro-hidroxi-metil cloro fenilacético (Tabela 10), além de outros organo-clorados que não foram estruturalmente identificados. Similarmente, Swarts et al. (1996) também detectaram a produção de vários derivados de ácido benzóico clorados em culturas de *Bjerkandera* sp. BOS55, dentre eles, o ácido 3-cloro-4-hidroxi-benzóico, ácido 3,5-di-cloro-4-hidroxi-benzóico e metil 3,5-di-cloro-4-hidroxi-benzoato. De fato, uma grande variedade de compostos organo halogenados são produzidos por fungos de decomposição branca, dentre os quais, os organo-clorados são os mais comuns (ten HAVE; TEUNISSEN, 2001).

Estudos têm mostrado que alguns compostos organo-clorados produzidos por fungos de decomposição branca poderiam desenvolver uma função fisiológica importante na degradação da lignina, servindo como um substrato para a aril álcool oxidase, envolvida na produção extracelular de peróxido de hidrogênio, que é requerido, por exemplo, para a ação das ligninases MnP e LiP (ten HAVE; TEUNISSEN, 2001), na reação de Fenton. Além disso, estes compostos podem atuar como mediadores de baixa massa molar da LiP (TEUNISSEN et al., 1998).

A princípio, a função de mediador de LiP não pode ser atribuída a esses organo-clorados produzidos por *P. medulla-panis*, uma vez que nas condições de cultivo utilizadas neste trabalho a produção de LiP não foi detectada (Tabela 8). De fato, até o presente momento não há relato da produção de LiP por este fungo. Porém, ainda não é possível afirmar que *P. medulla-panis* é deficiente em LiP. Recentemente, Silva, Martins e Milagres (2008) reportaram que extratos extracelulares do fungo de decomposição branca *Lentinula edodes* cultivado em meio lignocelulolítico contém compostos que inibem a atividade de LiP, o que

poderia levar a um resultado falso negativo da produção desta enzima.

P. medulla-panis também produziu AV (Tabela 10), que segundo a literatura é o mediador natural de LiP, porém, assumindo que LiP não é produzida por este fungo, AV deve ter uma outra função que não seja mediador de LiP, assim como os organo-clorados. No caso específico do AV, é possível que este atue como agente redutor de ferro (como previamente mencionado) para gerar Fe^{2+} e promover a reação de Fenton, ao passo que os aromáticos clorados atuem como substratos da aril álcool oxidase, para a produção de peróxido de hidrogênio, necessário para a atuação de MnP e lacase, enzimas produzidas por *P. medulla-panis*, e também para a geração de radicais hidroxila a partir da reação de Fenton.

Os ácidos graxos saturados de cadeia longa produzidos por *W. cocos* e *P. medulla-panis* e identificados foram o ácido palmítico e o ácido esteárico (Tabela 9 e Tabela 10). A produção de ácidos graxos é reportada para fungos de decomposição branca, principalmente para o de decomposição branca seletivo para lignina, *C. subvermispora*, o qual, também, produz os ácidos esteárico, palmítico entre outros (ENOKI et al., 1999; GUTIÉRREZ et al., 2002).

Durante a biodegradação, estes ácidos graxos poderiam, por exemplo, atuar como surfactantes, facilitando a difusão dos metabólitos fúngicos de baixa polaridade pelas regiões mais internas da parede celular. Por outro lado, estes ácidos graxos podem a partir de reações de condensação formar ácidos alquilítacônicos (GUTIÉRREZ et al., 2002) e inibir reações de Fenton (ENOKI et al., 2002; OHASHI et al., 2007; WATANABE et al., 2002).

Ohashi et al. (2007) demonstraram detalhadamente que a ação inibitória da reação de Fenton por ácidos alquilítacônicos ocorre pela supressão da redução de Fe^{3+} , através da quelação de Fe^{3+} pelos dois grupos carboxílicos dos ácidos alquilítacônicos. Contudo, analisando-se as condições experimentais empregadas por Ohashi et al. (2007), para que a inibição ocorra, seria necessário uma quantidade de derivados itaconatos muito superior a do agente redutor (60:1) e de ferro (30:1). Considerando que derivados itaconatos, embora não detectados, fossem produzidos por *W. cocos* e *P. medulla-panis* através de reações de condensação dos ácidos palmítico e esteárico, talvez este efeito inibitório não fosse muito significativo, uma vez que a produção dos ácidos graxos pouco superior a dos agentes redutores, condição em que estes compostos poderiam competir favoravelmente pelo ferro. Além disso, uma comparação estrutural dos metabólitos

produzidos pelos fungos com os agentes redutores sintéticos (cisteína e hidroquinona) empregados por Ohashi et al. (2007), sugerem que os compostos redutores de ferro produzidos por *P. medulla-panis* e *W. cocos* seriam mais eficientes na quelação e redução de Fe^{3+} .

No caso de *P. medulla-panis*, é provável, também, que se formados, ácidos itacônicos atuem evitando a repolimerização de fenóis derivados de lignina, oxidados por ação enzimática (ENOKI et al., 2002; WATANABE et al., 2002).

5.2.2 Redução de Fe^{3+} por CBMM

Os CBMM produzidos por *W. cocos* e *P. medulla-panis* e isolados das frações < 5 kDa com a resina XAD-2 e denominados Wc e Pmp, respectivamente, apresentaram atividade redutora de Fe^{3+} , que foi crescente com o aumento do tempo de reação até atingir 30 min, tanto com a amostra de *P. medulla-panis* quanto de *W. cocos* (Figura 43). Embora as concentrações dos compostos capazes de reduzir ferro presentes nas amostras de *P. medulla-panis* e *W. cocos* não sejam conhecidas, observou-se que mais Fe^{3+} foi reduzido por massa de Wc do que de Pmp.

Uma relação direta entre a atividade redutora e a da massa de amostra de Pmp e Wc foi obtida e pode ser expressa pelas equações 11 e 12, respectivamente, (Figura 44).

$$y = 0,0437x + 2,4776 \quad (R^2 = 0,9943) \quad (11)$$

$$y = 0,0525x + 3,4093 \quad (R^2 = 0,9969) \quad (12)$$

onde y representa a quantidade de Fe^{2+} (μM) formado e x a quantidade de amostra (Pmp ou Wc, em μg).

5.2.2.1 Efeito de ácido oxálico e pH na atividade redutora de Fe^{3+} dos CBMM

O ácido oxálico parece funcionar não somente no controle de pH do ambiente fúngico, especialmente no caso dos fungos de decomposição parda, mas também como agente quelante de metais de transição, como por exemplo, Fe^{3+} . (GOODELL et al., 1997; ARANTES et al. 2008). Contudo, sabe-se que o pH afeta a quelação/especiação do ferro por ácidos orgânicos, como o ácido oxálico, e conseqüentemente a sua reatividade (HYDE; WOOD, 1997).

Figura 43. Redução de Fe^{3+} por compostos fungos de baixa massa molar em função do tempo.

Figura 44. Redução de Fe^{3+} por compostos fungos de baixa massa molar em função da massa de CBMM de *P. medulla-panis* e *W. cocos*

A secreção de elevadas quantidades de ácido oxálico, principalmente por *W. cocos* (Tabela 8) poderia quelar e indisponibilizar Fe^{3+} para as reações de redução de Fe^{3+} e conseqüentemente inibir a reação de Fenton, desta forma procurou-se avaliar o efeito de ácido oxálico e do pH na atividade redutora de Fe^{3+} dos CBMM produzidos por *P. medulla-panis* e *W. cocos*.

Inicialmente utilizou-se o software Visual MINTEQ para se ter conhecimento das espécies e suas concentrações presentes em soluções contendo íons Fe^{3+} e ácido oxálico. De acordo com os dados de especiação dos complexos Fe-oxalato a pH 2,0, a medida que a concentração de ácido oxálico aumenta, a formação dos complexos Fe-oxalato ocorre na seguinte ordem: $\text{Fe}-(\text{oxalato})^+ > \text{Fe}-(\text{oxalato})_2^- > \text{Fe}-(\text{oxalato})_3^{3-}$ (Figura 45). Quando os resultados da atividade redutora de Fe^{3+} dos

CBMM produzidos por *P. medulla-panis* (Pmp) e *W. cocos* (Wc) foram plotados no mesmo gráfico de especiação em função da concentração de ácido oxálico, verificou-se que a medida que os complexos $\text{Fe}-(\text{Oxalato})_2^-$ e $\text{Fe}-(\text{Oxalato})_3^{3-}$ são formados, a redução de Fe^{3+} por Pmp e Wc diminui significativamente. A redução de ferro por Pmp e Wc foi observada somente quanto a concentração de ácido oxálico não foi superior a vinte vezes a concentração de Fe^{3+} (ácido oxálico 1 mM e Fe^{3+} 0,05 mM), quando as espécies $\text{Fe}-(\text{Oxalato})^+$, $\text{Fe}-(\text{Oxalato})_2^-$ e $\text{Fe}-(\text{Oxalato})_3^{3-}$ estavam presentes. Quando a concentração de ácido oxálico foi superior a 1 mM, somente as espécies $\text{Fe}-(\text{Oxalato})_2^-$ e $\text{Fe}-(\text{Oxalato})_3^{3-}$ estavam presentes e não se detectou redução de ferro, indicando que os compostos fúngicos de baixa massa molar reduzem Fe^{3+} a Fe^{2+} no pH 2,0, se ferro estiver livre ou complexado somente a um ácido oxálico ($\text{Fe}-(\text{Oxalato})^+$), mas não a dois ou três ácidos ($\text{Fe}-(\text{Oxalato})_2^-$ e $\text{Fe}-(\text{Oxalato})_3^{3-}$, respectivamente).

Quando os mesmos ensaios de redução foram conduzidos no pH 4,5, e os resultados foram também plotados no mesmo gráfico de especiação em função da concentração de ácido oxálico em pH 4,5, verificou-se que o Fe^{3+} foi reduzido pelos CBMM somente quando a concentração de ácido oxálico não foi superior a dez vezes a concentração de Fe^{3+} (ácido oxálico 0,5 mM e Fe^{3+} 0,05 mM) (Figura 46). Novamente, a redução somente foi observada quando $\text{Fe}-(\text{Oxalato})^+$ ou Fe^{3+} (livre ou na forma de hidróxidos) estavam presentes. Acima de 0,5 mM de ácido oxálico e na presença somente de $\text{Fe}-(\text{Oxalato})_2^-$ e $\text{Fe}-(\text{Oxalato})_3^{3-}$ não se observou atividade redutora.

Resultados semelhantes de inibição da redução de ferro por ácido oxálico foram obtidos por Arantes et al. (2008), quando conduziram experimentos similares em pH 2,0 e 4,5, porém, com o composto mimético DHBA.

Se elevadas concentrações de ácido são produzidos durante a biodegradação da madeira, abaixando o pH próximo à hifa fúngica, normalmente para próximo de 2,0 – 2,5 e solubilizando Fe^{3+} presente na madeira, $\text{Fe}(\text{Oxalato})_2^-$ e $\text{Fe}(\text{Oxalato})_3^{3-}$ seriam as espécies predominantes, as quais estariam então prevenindo a redução de Fe^{3+} pelos compostos fúngicos redutores de ferro. Este pode ser um mecanismo de auto-proteção do próprio fungo, para inibir a redução de ferro e, conseqüentemente a geração de radicais hidroxilas (via reação de Fenton) próximo à hifa, o que seria danoso para o fungo. Entretanto, se estes complexos se difundirem pela parede celular da madeira, criando um gradiente de pH como

Figura 45. Redução de Fe^{3+} pelos CBMM de *P. medulla-panis* e *W. cocos* (expresso em Fe^{2+}) e a especiação de Fe-oxalato (Fe^{3+} , $\text{Fe}(\text{Oxalato})^+$, $\text{Fe}(\text{Oxalato})_2^-$ e $\text{Fe}(\text{Oxalato})_3^{3-}$) em função da concentração de ácido oxálico a pH 2,0.

Figura 46. Redução de Fe^{3+} pelos CBMM de *P. medulla-panis* e *W. cocos* (expresso em Fe^{2+}) e a especiação de Fe-oxalato (Fe^{3+} , $\text{Fe}(\text{Oxalato})^+$, $\text{Fe}(\text{Oxalato})_2^-$ e $\text{Fe}(\text{Oxalato})_3^{3-}$) em função da concentração de ácido oxálico a pH 4,5.

proposto por Goodell et al. (1997) e recentemente apoiada a partir de dados experimentais (ARANTES et al., 2008), um pH menos ácido (pH 4 – 5) seria

esperado em regiões mais distantes do fungo, devido a menor concentração de ácido oxálico e também ao elevado poder tamponante da parede celular. Nestas condições, espera-se que $\text{Fe}(\text{Oxalato})^+$ esteja presente, a qual poderia então ser reduzido pelos compostos fúngicos redutores de ferro, gerando Fe^{2+} para reagir com peróxido de hidrogênio, e assim, gerar radicais hidroxila a uma distância da hifa fúngica e promover a degradação da madeira.

5.3 Degradação oxidativa de polissacarídeos e lignina pela reação de Fenton mediada por CBMM

Os CBMM produzidos por *W. cocos* e *P. medulla-panis* e isolados das frações < 5 kDa com a resina XAD-2 e denominados Wc e Pmp, respectivamente, foram avaliados na ausência e presença de ferro e peróxido de hidrogênio (reação de Fenton mediada) quanto a capacidade de degradar vários substratos celulósicos e hemicelulósicos, comumente utilizados para determinar atividades de celulases e hemicelulases, e também de oxidar a lignina presente em *Picea rubens* (conífera).

5.3.1 Degradação oxidativa de polissacarídeos

Os ensaios com os substratos celulósicos avicel, CMC, pNPG e hemicelulósicos xilana e pNPX foram conduzidos a pH 5,0, uma vez que este possa ser o pH encontrado a certa distância da hifa fúngica (na parede celular) (GOODELL et al., 1997), onde se acredita que a biodegradação da parede celular vegetal é iniciada pelos compostos com atividade redutora de Fe^{3+} , ferro e peróxido de hidrogênio através da geração de radicais hidroxila a partir da reação de Fenton mediada (GOODELL et al., 1997; XU; GOODELL, 2001).

Com exceção de avicel, todos os demais substratos foram degradados quando tratados com Wc ou Pmp na presença de $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Wc- $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ e Pmp- $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$) ou na presença somente de Fe^{3+} (Wc- Fe^{3+} e Pmp- Fe^{3+}) (Figura 47). Os substratos não foram degradados quando as frações de Wc ou Pmp estavam presentes isoladamente no meio reacional.

A degradação de xilana ocorreu nas primeiras 24 h, não apresentando aumento expressivo na liberação de açúcares redutores após este tempo. pNPG e

Figura 47. Liberação de *p*-nitrofenol a partir de pNPG (A) e pNPX (B) e de açúcares redutores a partir de xilana (C) após tratamento com Wc-Fe³⁺/H₂O₂ (■), Pmp-Fe³⁺/H₂O₂ (□), Wc-Fe³⁺ (●), Pmp-Fe³⁺ (○) e Fe³⁺/H₂O₂ (Δ).

pNPX, que são substratos de menor massa molar, foram extensivamente degradados nas primeiras horas de reação.

Os maiores níveis de degradação foram obtidos com os sistemas Wc-Fe³⁺/H₂O₂ seguido por Pmp-Fe³⁺/H₂O₂ e Fe³⁺/H₂O₂, mostrando que as reações de Fenton mediadas por Pmp e Wc intensificaram a degradação oxidativa de substratos celulósicos e hemicelulósicos se comparada com o sistema Fe³⁺/H₂O₂. Este efeito pró-oxidante deve-se muito provavelmente à presença de compostos com atividade redutora de Fe³⁺ nas amostras Pmp e Wc (Tabela 9 e Tabela 10), já que estes compostos são capazes de promover um ciclo de atividade redox do ferro, reduzindo Fe³⁺ a Fe²⁺, e mantendo um nível maior de Fe²⁺ no meio reacional. Isto levaria a um aumento na geração de radicais hidroxila na reação ferro/peróxido de hidrogênio, já que a reação entre Fe²⁺ e peróxido é muito mais rápida ($k \approx 63 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) do que a reação entre Fe³⁺ e peróxido de hidrogênio ($k \approx 0,01 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (KANG; LEE; YOON, 2002).

Com relação aos sistemas Wc-Fe³⁺ e Pmp-Fe³⁺, os quais promoveram pouca degradação dos substratos celulósicos e hemicelulósicos, a degradação pode ser explicada também a partir do ataque de radicais hidroxila, formados a partir da reação entre peróxido de hidrogênio gerado no próprio meio reacional e Fe²⁺, proveniente da redução de Fe³⁺ por Wc e PmP. No valor de pH destes experimentos, parte do Fe²⁺ produzido pode ter se auto-oxidado através da transferência de um elétron do oxigênio molecular (Eq. 6), levando a formação de peróxido de hidrogênio a partir do radical superoxiânion formado (Eq. 7 e 12). Alternativamente, a presença de dihidroxi-benzenos como catecol e metil-catecol nas amostras de *P. medulla-panis* e *W. cocos*, respectivamente, pode, também, indiretamente proporcionar a geração de peróxido de hidrogênio. O radical semiquinona formado a partir da redução de Fe³⁺ por estes dihidroxi-benzenos pode oxidar-se a custa da redução de oxigênio molecular a radical superoxiânion e assim gerar peróxido de hidrogênio (XU; JORDAN, 1988; KEREM et al., 1999). Este radical semiquinona pode, também, oxidar oxigênio molecular através de oxidação de um elétrons à O₂^{•-}, que forma H₂O₂, como descrito a seguir (Eq. 12):

A degradação oxidativa de CMC foi acompanhada pela liberação de açúcares redutores e também pelo grau de despolimerização de CMC através do monitoramento da fluidez específica da solução ($1/n_{sp}$), visto que uma quebra aleatória no interior da cadeia de celulose pode causar uma grande diminuição na viscosidade enquanto o poder redutor da solução não seria significativamente afetado (ALÉN, 2002; WOOD; BHAT, 1988).

Todos os sistemas que proporcionaram degradação de CMC (Wc-Fe³⁺/H₂O₂, Pmp-Fe³⁺/H₂O₂, Wc-Fe³⁺, Pmp-Fe³⁺ e Fe³⁺/H₂O₂) apresentaram um perfil degradativo semelhante (Figura 48). Isto é, a relação entre a fluidez específica e açúcares redutores liberados durante a degradação de CMC mostram rápida e expressiva diminuição da viscosidade da solução de CMC com pequenas quantidades de açúcares redutores liberados no início do tratamento. Significativa liberação de açúcares redutores em solução foi somente observada após uma maior

Figura 48. Liberação de açúcares redutores a partir de CMC em função da fluidez específico ($1/n_{sp}$) após tratamento com $Wc-Fe^{3+}/H_2O_2$ (■), $Pmp-Fe^{3+}/H_2O_2$ (□), $Wc-Fe^{3+}$ (▲), $Pmp-Fe^{3+}$ (Δ) e Fe^{3+}/H_2O_2 (●).

diminuição da viscosidade. Estes resultados indicam que as reações de Fenton mediadas por Wc ou Pmp promovem um ataque aleatório na cadeia polimérica de CMC, antes que uma oxidação expressiva do polissacarídeo ocorra.

Os maiores níveis de degradação da CMC foram obtidos pelas reações de Fenton mediada por Wc ($Wc-Fe^{3+}/H_2O_2$) seguida por Pmp ($Pmp-Fe^{3+}/H_2O_2$). $Wc-Fe^{3+}$ e $Pmp-Fe^{3+}$ (ausência de peróxido de hidrogênio) também causaram uma redução expressiva na viscosidade (despolimerização da cadeia polimérica da celulose), mas não proporcionaram liberação significativa de açúcares redutores. Isso se deve provavelmente ao fato que neste meio reacional peróxido de hidrogênio tem que ser inicialmente gerado para posteriormente reagir com ferro e produzir radicais hidroxila, o que justificaria a oxidação mais lenta da celulose neste sistema (sem adição de peróxido de hidrogênio) em comparação ao que se adicionou peróxido.

Com relação à degradação de celulose microcristalina (avicel) a liberação de açúcares redutores no meio reacional não foi observada em nenhuma das condições de tratamento utilizada, mesmo após 5 dias de incubação. Contudo, quando avicel foi tratado com os sistemas $Pmp-Fe^{3+}/H_2O_2$ e $Wc-Fe^{3+}/H_2O_2$ verificou-se um aumento gradual no número de pontas redutoras no resíduo de avicel, principalmente quando tratado com o sistema $Wc-Fe^{3+}/H_2O_2$ (Figura 49).

Wang e Chao (2002) utilizando um peptídeo de baixa massa molar parcialmente purificado e Fe^{3+} para gerar $\bullet OH$ e atacar fibras de cóton, também não

Figura 49. Formação de pontas redutoras nos resíduos de celulose microcristalina (Avicel) após tratamento com Wc-Fe³⁺/H₂O₂ (■) e Pmp-Fe³⁺/H₂O₂ (□).

detectaram a liberação de açúcares redutores, porém, observaram o rompimento das ligações de hidrogênio e diminuição da cristalinidade da celulose, e sugeriram que o rompimento das ligações de hidrogênio na celulose cristalina parece envolver somente mudanças na estrutura tridimensional, e não quebra da ligação glicosídica. Sendo assim, é possível que inicialmente as ROS geradas nos tratamentos com a reação de Fenton mediada por Pmp e Wc tenham destruído algumas das ligações de hidrogênio inter e/ou intra-cadeia da celulose, ocasionando um afrouxamento da cadeia polimérica, o que pode, então, ter favorecido o acesso às ligações glicosídicas, causando a quebra das mesmas, o que poderia justificar o aumento do poder redutor observado no resíduo de avicel após o tratamento pelas reações mediadas. Esta redução inicial da cristalinidade pode ser um passo importante na biodegradação da celulose, principalmente no caso de fungos de decomposição parda, os quais degradam significativamente a celulose durante a biodegradação da madeira mas são descritos como deficientes em exo-1,4-β-glucanase.

A partir destes resultados, verifica-se que as reações de Fenton mediadas com CBMM redutores de Fe³⁺ isolados de *P. medulla-panis* e *W. cocos* foram, com exceção de celulose cristalina, eficientes na degradação de substratos celulósicos e hemicelulósicos em condição similar a da biodegradação da madeira, onde Fe³⁺ seria reduzido *in situ* e o pH próximo de 4,0 – 5,0. Resultados similares foram previamente obtidos quando um composto sintético do tipo catecol foi utilizado para mediar reações de Fenton na oxidação destes substratos celulósicos e hemicelulósicos (ARANTES; MILAGRES, 2006b). De uma forma geral, o perfil

degradativo tanto das reações mediadas com CBMM de *P. medulla-panis* quanto de *W. cocos* foram muito semelhantes, diferenciando apenas pelo fato de que as reações mediadas com CBMM de *W. cocos* serem pouco mais eficientes, indicando que tanto em fungo de decomposição parda quanto branca a reação de Fenton poderia iniciar oxidativamente a degradação dos polissacarídeos durante o processo de biodegradação da madeira. Considerando que este sistema não enzimático de baixa massa molar esteja atuando durante a biodegradação da madeira, a extensiva degradação de polissacarídeos por fungos de decomposição parda e a relativa baixa degradação dos mesmos por fungos de decomposição branca seletivos poderia estar mais associados a ação de enzimas hidrolíticas, as quais são diferencialmente produzidas por estes fungos.

5.3.2 Oxidação da lignina em madeira com reações de Fenton mediada por CBMM

Os principais tipos de modificações químicas ocorridas na lignina pela ação de fungos degradadores de madeira incluem oxidação da cadeia lateral, desmetilação/desmetoxilação e quebra do anel aromático (FILLEEY et al., 2000). Para identificar as modificações químicas da lignina de madeira submetida à degradação *in vitro* pela reação de Fenton mediada por CBMM redutores de Fe^{3+} isolados de *P. medulla-panis* (Pmp) e *W. cocos* (Wc), utilizou-se a técnica de termoquimólise com hidróxido de tetrametilamônio com carbono marcado (^{13}C -TMAH). Esta técnica difere de outras, como por exemplo, TMAH termoquimólise e oxidação alcalina com CuO , uma vez que ela permite determinar a quantidade de hidroxilas aromáticas no resíduo de lignina oxidada através de uma despolimerização seletiva da lignina e posterior reação de metilação com carbono marcado (FILLEEY et al., 2000).

Dentre os principais monômeros (metilados) liberados da lignina do tipo guaiacil presente em madeira moída de *Picea rubens* após ^{13}C -TMAH termoquimólise (Figura 50), oito deles (Figura 51) foram investigados com relação ao conteúdo original de hidroxilas aromáticas pela análise do número de grupos ^{13}C -metílicos adicionados durante a termoquimólise.

A Figura 52 mostra que as reações de Fenton mediada por Pmp e Wc são capazes de desmetoxilar e/ou desmetilar lignina, modificações que serão referidas unicamente como desmetoxilação. G8 e G6 seguido por G18 foram os monômeros

Figura 50. Cromatograma parcial de madeira (*Picea rubens*) não tratada após ^{13}C -TMAH termoquimólise

Figura 51. Principais produtos de degradação da lignina de coníferas após TMAH termoquimólise. G4 – 3,4-di-metoxi-benzaldeído, G6 – ácido 3,4-di-metoxi-benzóico, G7 e G8 – cis e trans-1-(3,4-di-metoxi-fenil)-2-metoxi-etileno, G14 e G15 treó/eritro 1-(3,4-di-metoxi-fenil) 1,2,3-tri-metoxi-propano (NIEROP; FILLEY, 2007).

Figura 52. Grau de desmetoxilação dos principais monômeros de lignina liberados após ^{13}C -TMAH termoquimólise de madeira de *Picea rubens* tratada com reações de Fenton mediada com CBMM produzidos por *W. cocos* e *P. medulla-panis*, em relação à madeira não tratada.

mais desmetoxilados, tanto com as reações mediadas com CBMM isolados de *W. cocos* quanto de *P. medulla-panis*. Verifica-se, também, que não há uma relação clara entre estrutura/grupo funcional e a extensão de desmetoxilação. Por exemplo, G7 e G8, que diferem somente pelo fato de um ser cis e outro trans-1-(3,4-di-metoxifenil)-2-metoxi-etileno, foram desmetoxilados em diferentes níveis (desmetoxilação de aproximadamente 0,5% para G7 e 3,5 – 7,5% para G8). Similarmente, Filley et al. (2002) estudando a biodegradação de madeira por fungos de decomposição parda, também pela técnica ^{13}C -TMAH termoquimólise, não observaram uma relação clara entre estrutura/grupo funcional dos monômeros por eles analisados e a extensão da desmetoxilação.

Os dados de desmetoxilação *in vitro* da lignina em madeira obtidos com a mistura de CBMM produzidos por *W. cocos* são condizentes com os estudos de biodegradação da madeira por fungos de decomposição parda, que mostram significativa desmetoxilação da lignina (FILLEY et al., 2002). Sendo assim, pela primeira vez, há evidências claras que o sistema não enzimático de baixa massa molar constituído por íons férricos, peróxido de hidrogênio e um agente redutor de ferro de baixa massa molar (reação de Fenton mediada) é capaz de desmetoxilar lignina em madeira. Esta é uma via plausível proposta há pouco mais de uma década (GOODELL et al., 1997), porém com limitada evidência da sua eficácia.

Como mostrado na Figura 52, CBMM isolados do cultivo fungo de *P. medulla-panis*, juntamente com íons férricos e peróxido de hidrogênio (reação de Fenton mediada), parecem, também, ser uma rota adequada pela qual fungos de decomposição branca introduzem grupos OH em subunidades da lignina. Neste sentido, embora não tenha sido claramente mostrado que unidades não fenólicas foram convertidas a unidades fenólicas, estes resultados fornecem evidências que este mecanismo não enzimático de baixa massa molar pode introduzir grupos OH às unidades de lignina, como esperado para unidades não fenólicas, gerando, assim, unidades de lignina fenólicas que poderiam então ser degradadas por MnP e lacase. Considerando que *P. medulla-panis* aparentemente é deficiente em LiP, este sinergismo (reação de Fenton mediada para geração de porções fenólicas de lignina que seriam, então, posteriormente degradadas por lacase e/ou MnP) apresenta-se como um modelo adequado, também, para explicar a degradação de lignina na ausência de LiP (ARANTES; MILAGRES, 2007).

O monômero altamente oxidado G6 (ácido 3,4-di-metoxi-benzóico) pode ser derivado da metilação de ácido vanílico livre, quebra de uma ligação éter do resíduo de ácido vanílico ou quebra de uma subunidade da lignina no estado intermediário de oxidação (FILLEY *et al.*, 2000), e seu aumento em relação à madeira não degradada é interpretado como oxidação da lignina (HATCHER; MINARD, 1996; FILLEY *et al.*, 2000; 2002; VANE *et al.*, 2001). Assim, a oxidação da lignina em madeira pela reação de Fenton mediada por Pmp e Wc, pode, também, ser evidenciada pelas diferenças estatisticamente significativas observadas com relação ao rendimento de G6 após ^{13}C -TMAH termoquimólise em relação à madeira não tratada. Isto pode ser notado, principalmente quando CBMM de *W. cocos* foram utilizados, com os quais se observou a maior concentração de G6 (aproximadamente o dobro) (Tabela 11).

Tabela 11 – Concentração (ng/μg amostra) de G6 e G6/G4 liberados após ^{13}C -TMAH termoquimólise de madeira não tratada e tratada com CBMM de *P. medulla-panis* e *W. cocos* na presença de ferro e peróxido de hidrogênio.

	G6	G6/G4
Controle	2,48 ± 0,15 ^a	0,28 ± 0,04 ^a
<i>P. medulla-panis</i>	2,92 ± 0,25 ^b	0,32 ± 0,04 ^a
<i>W. cocos</i>	4,72 ± 0,81 ^c	0,38 ± 0,06 ^b

Valores seguidos pelas mesmas letras (na mesma coluna) não diferem significativamente ao nível de confiança de 95%.

A relação G6/G4 (ácido/aldeído) também é geralmente mostrada em TMAH termoquimólise como um indicador do estado de degradação da lignina onde um aumento na relação G6/G4 em relação às amostras não degradadas sugere um aumento no grau de degradação da lignina (FILLEEY et al., 2000, 2002; HATCHER et al., 1995; HATCHER; MINARD, 1995; VANE et al., 2001). Um aumento da relação G6/G4 foi somente observado quando a madeira foi tratada com a reação de Fenton mediada com os CBMM de *W. cocos* (da ordem de 1,3 vezes) (Tabela 11), indicando que estes compostos foram mais eficientes na mediação da reação de Fenton para oxidar lignina do que os compostos de *P. medulla-panis*, provavelmente devido a maior capacidade de redução de ferro por μg de amostra de *W. cocos* em relação a amostra de *P. medulla-panis*, resultando em mais Fe^{2+} prontamente disponível para reagir com peróxido de hidrogênio e, conseqüentemente, gerar mais radicais hidroxila do que nas reações mediadas com CBMM de *P. medulla-panis*.

Quando a madeira moída foi tratada somente com CBMM ou somente com ferro e peróxido de hidrogênio, nenhuma modificação significativa em relação a madeira não tratada foi observada.

5.4 Estudo da ação conjunta de CBMM e enzimas ligninolíticas

O envolvimento da reação de Fenton durante a biodegradação da madeira por fungos de decomposição branca e parda já foi sugerida há vários anos, porém estudos mais detalhados com relação à atuação atividade redutora de Fe^{3+} - $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ em associação com as enzimas ligninolíticas produzidas por fungos de decomposição branca permanece praticamente inexplorada. Dentro deste contexto, esta etapa do trabalho reporta a cinética de produção de enzimas ligninolíticas e atividade redutora de Fe^{3+} pelos fungos de decomposição branca *L. edodes*, *P. medulla-panis* e *T. versicolor*, e também o estudo da ação sinérgica entre CBMM com atividade redutora e frações de alta massa molar (FAMM) com atividade de MnP ou lacase na oxidação do corante Azure B, que não é diretamente oxidado por MnP e nem por lacase.

Azure B é um composto que é utilizado para o ensaio seletivo de detecção de LiP, a enzima ligninolítica com o maior potencial de oxidação produzida por fungos de decomposição branca (ARCHIBALD, 1992), e única com potencial de

suficiente para oxidar subestruturas não fenólicas da lignina, que representam em média 80 – 90% da linha presente em madeira.

5.4.1 Produção de atividade redutora de Fe^{3+} e enzimas ligninolíticas

Meios com indutores de enzimas ligninolíticas são normalmente utilizados no cultivo de fungos de decomposição branca. Quando se utiliza substratos lignocelulósicos, estes meios contêm elevada concentração de compostos fenólicos que interferem na análise de algumas enzimas e na determinação da atividade redutora de Fe^{3+} . Entretanto, a escolha do meio de cultivo batata-dextrose-extrato de levedura proporcionou bom crescimento dos fungos e produção das enzimas desejadas (Figura 53).

Entre as enzimas ligninolíticas, MnP foi a principal enzima produzida pelos três fungos avaliados, principalmente por *T. versicolor* que produziu os maiores níveis de atividade. Nos extratos de *L. edodes* e *T. versicolor* MnP foi detectada no décimo dia de cultivo, diminuindo significativamente ao longo do período de cultivo. A atividade de MnP nos caldos de cultivo de *P. medulla-panis* foi detectada aos 20 dias.

Lacase também foi produzida pelos três fungos. *T. versicolor* produziu lacase no período de 10 a 25 dias, *P. medulla-panis* somente no final do período de cultivo, e *L. edodes* a partir do décimo dia de incubação.

L. edodes foi o único fungo que produziu LiP (15 – 30 dias), embora estes níveis tenham sido muito baixos.

Para *P. medulla-panis* e *T. versicolor* a atividade redutora de Fe^{3+} apareceu no início do cultivo, antes ou juntamente com a produção de MnP e/ou lacase. *P. medulla-panis* foi o único fungo que produziu esta atividade praticamente durante todo o tempo de cultivo e, também, em maiores níveis, sendo o pico máximo detectado aos 15 dias. A atividade redutora também foi avaliada após a fervura das amostras provenientes dos extratos com maiores níveis de atividade redutora, considerando que se alguma enzima estive contribuindo com a atividade redutora de Fe^{3+} , esta atividade desapareceria. Praticamente não houve perda de atividade redutora após a fervura dos extratos, sugerindo que a redução de Fe^{3+} produzida pelos extratos dos fungos não é devido à ação enzimática.

Figura 53. Cinética de produção de MnP (▲), lacase (□), LiP (△) e atividade redutora de Fe³⁺ (FeRA) (■) por *L. edodes*, *P. medulla-panis* e *T. versicolor*.

O meio de cultivo utilizado neste grupo de experimentos continha vários açúcares redutores que poderiam interferir com o método de detecção da atividade redutora de Fe^{3+} , contudo, a presença de açúcares redutores foi mínima nos extratos de 10 dias de cultivo de *P. medulla-panis* e *T. versicolor*, os quais já não foram mais detectados a partir do 15º dia de cultivo. Nos extratos de *L. edodes* a presença de açúcares redutores foi alta até 20 dias de cultivo, e decresceu para níveis mínimos até o final do período de cultivo. Ou seja, os níveis de atividade redutora detectada são realmente provenientes de metabólitos fúngicos e não de açúcares presentes no meio de cultivo.

Para *P. medulla-panis* e *T. versicolor* que não produziram LiP, a atividade redutora de Fe^{3+} foi produzida antes ou simultaneamente com lacase e/ou MnP. Contrariamente, *L. edodes*, que produziu as três enzimas ligninolíticas, incluindo LiP, a atividade redutora foi detectada somente no final do período de cultivo, isto é, somente após a produção de lacase e MnP. Estes dois perfis distintos podem estar indicando uma possível ação sinérgica entre lacase/MnP e a atividade redutora de ferro, como uma rota (oxidativa) alternativa na ausência de LiP. Na ausência de LiP, compostos redutores de ferro poderiam estar sendo produzidos inicialmente para promover a reação de Fenton (reação de Fenton mediada) e produzir $\bullet\text{OH}$ e causar a hidroxilação de substratos inicialmente não susceptível à oxidação por lacase e MnP.

Os extratos extracelulares contendo a máxima atividade redutora de Fe^{3+} de cada fungo foram separados em frações de alta (> 5 kDa) (FAMM) e baixa (< 5 kDa) massa molar (FBMM). Praticamente toda a atividade redutora ($> 90\%$) detectada no extrato inicial, após separação em FBMM e FAMM, permaneceu na FBMM (Figura 54), ou seja, os compostos redutores de ferro produzidos por estes fungos de decomposição branca são de baixa massa molar. Estas frações < 5 kDa com atividade redutora de Fe^{3+} reagiram positivamente com o ensaio de Arnow, indicando que *L. edodes*, *P. medulla-panis* e *T. versicolor* produzem CBMM com atividade redutora de Fe^{3+} e que estes são provavelmente do tipo benzenos hidroxilados.

Na tentativa de obter evidências e um melhor conhecimento de um possível sinergismo entre a atividade redutora de Fe^{3+} e as enzimas lacase e MnP, vários experimentos de oxidação do corante Azure B foram conduzidos utilizando

Figura 54. Detecção da atividade redutora de Fe^{3+} nos extratos produzidos por *L. edodes*, *P. medulla-panis* e *T. versicolor*. Os extratos avaliados foram os extratos iniciais (com a maior atividade redutora de Fe^{3+}), após serem fervidos, e após a separação dos extratos iniciais, depois de fervidos e nas frações < 5 kDa (FBMM) e > 5 kDa (FAMM).

CBMM redutores de ferro, MnP e lacase de *L. edodes*, *P. medulla-panis* e *T. versicolor*.

FAMM com atividade de MnP (FAMM_{MnP}) ou Lacase (FAMM_{Lac}) ou FBMM com atividade redutora de ferro (FAMM_{Fe}) não oxidaram o Azure B, já que não se observou descoloração do corante, resultado este esperando, uma vez que Azure B é altamente recalcitrante e oxidado somente por LiP.

A oxidação de Azure B começou a ser observada somente quando estes mesmos ensaios foram conduzidos na presença de Fe^{3+} e H_2O_2 (Figura 55). As descolorações obtidas com $\text{FAMM}_{\text{MnP}}\text{-Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ e $\text{FAMM}_{\text{Lac}}\text{-Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ foram inferiores a 5%, ao passo que com $\text{FBMM}_{\text{Fe}}\text{-Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ variaram entre 15 – 30%. Neste último caso, é provável que os compostos redutores de ferro presentes nas FBMM_{Fe} tenham reduzido Fe^{3+} a Fe^{2+} , o qual reagiu com o peróxido de hidrogênio para produzir ROS que posteriormente atacaram o corante, promovendo então a descoloração do mesmo.

Descoloração significativa ($> 35\%$) de Azure B foi observada quando o corante foi inicialmente tratado com $\text{FBMM}_{\text{Fe}}\text{-Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$, seguido pelo tratamento com FAMM_{MnP} ou FAMM_{Lac} (Figura 55). Quando estes ensaios foram conduzidos na

Figura 55. Descoloração de Azure B pelas frações FAMM_{Lac} (Lac), FAMM_{MnP} (MnP) e FBMM_{Fe} (FeRA) na presença de Fe³⁺ e H₂O₂.

presença de etanol (10% v/v) como agente sequestrante de radicais hidroxila, os níveis de descoloração diminuíram significativamente para valores < 7%, indicando a produção e participação de radicais hidroxila na oxidação do Azure B, por estes sistemas (reação de Fenton mediada e enzimas ligninolíticas).

Como as enzimas lacase e MnP, detectadas na FAMM_{MnP} e FAMM_{Lac}, respectivamente, não foram purificadas, é possível que uma pequena atividade de MnP possa existir na FAMM_{Lac}, e por outro lado, lacase pode estar presente na FAMM_{MnP}. Entretanto, a ação de MnP na FAMM_{Lac} foi restringida pela adição de catalase e ausência de MnSO₄ na mistura reacional. É esperado que a ação de lacase presente na FAMM_{MnP} de *T. versicolor* seja mínima, uma vez que aos 10 dias de cultivo, a atividade de MnP foi aproximadamente 180 vezes maior do que a atividade de lacase e, assim, a quantidade de lacase presente na mistura reacional contendo FAMM_{MnP} de *T. versicolor* (MnP 1,1 U/mL) seja inferior a 0,0062 U/mL.

Além disso, embora baixos níveis de LiP possam estar presentes nas FAMM_{Lac} e FAMM_{MnP} de *L. edodes*, é improvável que o aumento na eficiência da descoloração do Azure B após a adição destas frações ao meio reacional contendo o corante previamente tratado com FBMM_{Fe}-Fe³⁺/H₂O₂ ou somente Fe³⁺/H₂O₂ seja devido a ação da LiP, uma vez que nenhuma descoloração foi observada quando somente FAMM_{Lac} ou FAMM_{MnP} foi utilizada.

A oxidação significativa de Azure B obtida com FBMM_{Fe}-Fe³⁺/H₂O₂ seguido pelo tratamento com FAMM_{MnP} ou FAMM_{Lac} e indicada pelos elevados níveis de descoloração detectados, sugere que o sistema composto pela atividade redutora de Fe⁺³ e o reagente de Fenton promoveram modificações na estrutura do corante, que levaram à formação de um composto intermediário substrato para MnP e lacase, já que significativa oxidação do corante foi observada com a adição das FAMM contendo MnP ou lacase após o tratamento prévio com FBMM_{Fe}-Fe³⁺/H₂O₂.

Dois pontos de ataque na estrutura do corante podem ser possíveis: um é o ataque ao grupo cromóforo e o outro ao grupo aromático. A partir das análises de UV-Vis (190 – 700 nm) das amostras com Azure B após os tratamentos, observou-se uma diminuição significativa a 647 nm (correspondente ao grupo cromóforo) e uma redução, também, do pico em 290 nm (associado com o grupo aromático). Recentemente, Arantes, Baldochi e Milagres (2006) utilizando o corante polimérico Poly R-478 (corante altamente resistente à biodegradação) demonstraram que a reação de Fenton mediada por um composto sintético do tipo catecol, não só foi capaz de descolorir completamente o corante, mas também degradar a estrutura de anéis aromáticos fundidos do corante.

Para melhor entender a degradação de Azure B pela atividade redutora-Fe³⁺/H₂O₂ junto com as enzimas lacase e/ou MnP mais estudos são necessários, especialmente com relação à análise estrutural do (s) composto (s) intermediário (s) formado (s). Contudo, os resultados apresentados fornecem evidências claras de que um composto que inicialmente não era substrato para lacase e MnP foi extensivamente oxidado por ambas as enzimas, quando o mesmo foi previamente tratado com CBMM redutores de ferro-Fe³⁺/H₂O₂.

Os resultados experimentais mostrados aqui sugerem uma rota degradativa para fungos de decomposição deficientes em LiP, que envolve CBMM com atividade redutora de Fe³⁺, para mediar reações de Fenton. Este mecanismo é mais aceito para fungos de decomposição parda, porém não claramente descrito para fungos de

decomposição branca, especialmente com relação a forma de interação entre a atividade redutora e as enzimas ligninolíticas. Além disso, pode ser esperado que este sistema desempenhe um papel importante durante a biodegradação da madeira na ausência de LiP.

Inicialmente, a ação sinérgica entre lacase/MnP e os CBMM redutores de ferro poderia ser considerada como um dos mecanismos oxidativos envolvidos no ataque inicial da lingocelulose, quando enzimas ligninolíticas ou até mesmo as hidrolíticas não podem penetrar a parede celular vegetal. O aparecimento da atividade redutora nos cultivos dos fungos em tempos mais curtos que a MnP e lacase parece ser um modo (na ausência de LiP) pelo qual unidades não fenólicas da lignina poderiam ser biodegradadas por fungos de decomposição branca. Isto é, o Fe^{3+} presente na madeira seria reduzido a Fe^{2+} pelos CBMM, que na presença de H_2O_2 gerariam espécies ROS via reação de Fenton. A seguir, os radicais formados *in situ* poderiam resultar em diversas reações com a lignina, convertendo unidades não fenólicas a unidades fenólicas e assim permitindo a ação de MnP e lacase. Neste sentido, foi demonstrado anteriormente (Figura 52) que o teor de frações fenólicas de lignina é aumentado após o tratamento da madeira pela reação de Fenton mediadas com CBMM de *P. medulla-panis*.

O sinergismo entre a atividade redutora e as enzimas ligninolíticas parece importante para acessar o potencial completo do sistema oxidativo de fungos de decomposição branca com relação aos compostos altamente resistentes à biodegradação, como por exemplo, a lignina. É sabido que os resultados obtidos com Azure B não representam diretamente as modificações na lignina, devido a sua maior complexibilidade na matriz sólida da madeira, mas de uma forma simples e rápida fornecem informações que contribuem para o melhor entender os mecanismos degradativos utilizados por estes fungos durante o processo de biodegradação.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados nesta tese pode-se concluir que:

- ✓ *P. medulla-panis* e *W. cocos* produzem compostos de baixa massa molar que são regulados pela disponibilidade de ferro presente no meio de cultivo, e estes fungos provavelmente empregam mais de um mecanismo de captação de ferro. Certamente tais mecanismos envolvem ácidos orgânicos, principalmente em *W. cocos* e quelantes com alta afinidade de ferro, como compostos do tipo catecol e hidroxamato.
- ✓ As atividades redutoras de Fe^{3+} detectadas nestes fungos foram causadas por compostos de baixa massa molar e por ferroredutases presentes na superfície celular, as quais foram reguladas por ferro e estimuladas na presença de celulose microcristalina.
- | ✓ Dentre os compostos de baixa massa molar com atividade redutora de Fe^{3+} produzidos pelos fungos estão peptídeos e compostos aromáticos mono, di e tri-hidroxilados. A capacidade destes compostos de baixa massa molar de reduzir Fe^{3+} e mediar a reação de Fenton fornece evidências experimentais de que este mecanismo pode estar presente em fungos de decomposição parda e branca.
- ✓ A reação de Fenton mediada pelos compostos de baixa massa molar redutores de Fe^{3+} produzidos tanto por *P. medulla-panis* quanto *W. cocos* mostrou-se eficiente na oxidação celulose, hemicelulose e lignina em condição similar ao que ocorre durante a biodegradação da madeira *in situ*. A degradação da celulose por este sistema não enzimático de baixa massa molar foi caracterizada por uma rápida despolimerização da cadeia polimérica seguida de extensiva oxidação da celulose, e a principal mudança na estrutura da lignina foi a desmetoxilação.
- ✓ A eficiência em oxidar os constituintes da madeira, evidencia que este sistema possa ser o responsável pela desmetoxilação característica produzida por fungos de decomposição parda. Por outro lado, esse mecanismo pode estar envolvido também em fungos de decomposição branca, promovendo o aumento de frações

fenólicas da lignina para posterior degradação por MnP e/ou lacase, evidenciando um possível sinergismo entre a reação de Fenton mediada por compostos redutores de ferro e as enzimas, que poderia então explicar a degradação da lignina na ausência de LiP.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S. **Oxidative stress and antioxidant defenses in Biology**. New York: Chapman and Hall, 1995. p. 457.
- ALÉN, R. Basic chemistry of wood delignification. In: Stenius P. (Ed). **Forest Products Chemistry**. Helsinki: Helsinki University of Technology, 2002. p. 58–102.
- ALFENAS, A. C.; PETUS, I.; BRUNE, W.; PASSADOS, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991, 242 p.
- ANDER, P.; STOYTSCHEV, I.; ERIKSSON, K. E. Cleavage and metabolism of methoxyl groups from vanillic and ferulic acids by brown-rot and soft-rot fungi. **Cellulose Chemical Technology**, v. 22, p. 255–266, 1988.
- ARANTES, V.; BALDOCHI, C.; MILAGRES, A. M. F. Degradation and decolorization of a biodegradable-resistant polymeric dye by chelator-mediated Fenton reactions. **Chemosphere**, v. 63, p. 1764–1772, 2006.
- ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Evaluation of different carbon sources for production of iron-reducing compounds by *Wolfiporia cocos* and *Perenniporia medulla-panis*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 887–891, 2006a.
- ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Degradation of cellulosic and hemicellulosic substrates using a chelator-mediated Fenton reaction. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 413–419, 2006b.
- ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. The effect of a catecholate chelator as a redox agent in Fenton-based reactions on degradation of lignin model substrates and on COD removal from effluent of an ECF kraft pulp mill. **Journal of Hazardous Materials**, v. 141, p. 273–279, 2007a.
- ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Application of statistical experimental design to the treatment of bleaching kraft mill effluent using a mediated free radical system. **Water Science and Technology**, v. 55, p. 1–7, 2007b.

ARANTES, V.; QIAN, Y.; MILAGRES, A. M. F.; JELLISON, J.; GOODELL, B. Effect of pH and oxalic acid on the reduction of Fe^{3+} by a biomimetic chelator and on Fe^{3+} desorption/adsorption onto wood: Implications for brown rot decay. **International Biodeterioration and Biodegradation**. 2008. submetido.

ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. The synergistic action of ligninolytic enzymes (MnP and Laccase) and Fe^{3+} -reducing activity from white-rot fungi for degradation of Azure B. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 17–22, 2007.

ARCHIBALD, F. S. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3110–3116, 1992.

ARNOW, L. E. Colorimetric Determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. **Journal of Biological Chemistry**, v. 118, p. 531–537, 1937.

AUST, S. D. Mechanisms of degradation by white rot fungi. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 59-61, 1995.

BACIOCCHI, E.; BIETTI, M.; GERINI, M. F.; LANZALUNGA, O. The mediation of veratryl alcohol in oxidations promoted by lignin peroxidase: the lifetime of veratryl alcohol radical cation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 293, p. 832–835, 2002.

BACIOCCHI, E.; BIETTI, M.; STEENKEN, S. Lifetime, reduction potential and base-induced fragmentation of the veratryl alcohol radical cation in aqueous solution. Pulse radiolysis studies on a ligninases mediator. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 102, p. 7337–7342, 1998.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Inter-laboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257–270, 1992.

BAMIGER, U., NIDETZKY, B., KULBE, K.D., HALTRICH, D. A simple assay for measuring cellobiose dehydrogenase activity in the presence of laccase. **Journal of Microbiological Methods**, v. 35, p. 253–259, 1999.

BANCI, L.; CIOFI-BAFFONI, S.; TIEN, M. Lignin and Mn peroxidase-catalyzed oxidation of phenolic lignin oligomers. **Biochemistry**, v. 38, p. 3205–3210, 1999.

BÉGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Review**, v.13, p. 25–58, 1994.

BERMEK, H.; LI, K.; ERIKSSON, K-EL. Laccase-less mutants of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* cannot delignify kraft pulp. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 117–124, 1998.

BLANCHETTE, R. A. 1991. Delignification by wood-decay fungi. **Annual Review Phytopathol**, v. 29, p. 381–398, 1991.

BLANCHETTE, R. A. A guide to wood deterioration caused by microorganisms and insects. In: Dardes, K.; Rothe, A. (Eds). **The structural conservation of panel paintings**: proceedings of a symposium at the J. Paul Getty Museum. Los Angeles. Getty Conservation Institute. 1998. p. 55–68.

BLANCHETTE, R. A. A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 46, p. 189–204, 2000.

BLANCHETTE, R. A.; KRUEGER, E. W.; HAIGHT, J. E.; AKHTAR, M.; AKIN, D. E. Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal of Biotechnology**, v. 53, 203–213, 1997.

BLANCHETTE, R. A.; OBST, J. R.; TIMELL, T. E. Biodegradation of Compression Wood and Tension Wood by White and Brown Rot Fungi. **Holzforschung**, v. 48, p. 34–42, 1994.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Demethylation and delignification on kraft pulp by *Trametes versicolor* in presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, 823–827, 1992.

BRAAKSMA, A.; SCHAAP, D. J. Protein analysis of the common mushroom *Agaricus bisporus*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 7, p. 119–127, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248–254, 1976.

BRAUGHLER, J. M.; DUNCAN, L. A.; CHASE, R. L. The involvement of iron in lipid peroxidation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 10282–10289, 1986.

CAMARERO, S.; IBARRA, D.; MARTÍNEZ, A. T.; ROMERO, J.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RÍO, J. C. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1264–1271, 2007.

CAMMERON, M. D.; AUST, S. D. Degradation of chemicals by reactive radicals produced by cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 367, p. 115–121.

CANDEIAS, L. P.; HARVEY, P. J. Lifetime and reactivity of the veratryl alcohol radical cation. Implications for lignin peroxidase catalysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 16745–16748, 1995.

CANTARELLA, G.; GALLI, G.; GENTILI, C. Free radical versus electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems, Catalytic or Stoichiometric procedures. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, 135–144, 2003.

CARBERRY, J. B.; SANG, H. L. Enhancement of pentachlorophenol biodegradation by Fenton's reagent partial oxidation. In: Tedder, D. W.; Pohland, F. G. (Eds.). **Emerging Technologies in Hazardous Waste Management IV**. Washington: American Chemical Society, 1994. p. 197–223. ACS Symp. Ser. 554.

CHANDHOKE, V.; GOODELL, B.; JELLISON, J.; FEKETE, F. A. Oxidation of 2-keto-4-thiomethylbutyric acid (KTBA) by iron-binding compounds produced by the wood-decaying fungus *Gloeophyllum trabeum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 90, p. 263–266, 1992.

CHEN, F.; MA, W. H.; HE, J. J.; ZHAO, J. C. Fenton degradation of malachite green catalyzed by aromatic additives. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 106, p. 9485–9490, 2002a.

CLAUSEN, C. A.; GREEN III, F.; WOODWARD, B. M.; EVANS, J. W.; DEGROOT, R. C. Correlation between oxalic acid production and copper tolerance in *Wolfiporia cocos*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 46, p. 69-76, 2000.

COHEN, R.; JENSEN, K. A.; HOUTMAN, C. J.; HAMMEL, K. E. Significant levels of extracellular reactive oxygen species produced by brown rot basidiomycetes on cellulose. **FEBS Letters**, v. 531, p. 483–488, 2002.

COHEN, R.; SUZUKI, M. R.; HAMMEL, K. E. Differential stress-induced regulation of two quinone reductases in the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 324–331, 2004.

CSÁKY, T. Z. On the estimation of bound hydroxylamine in biological materials. **Acta Chemica Scandinavica**, 2:450–454, 1948.

CULLEN, D.; Kersten, P. J. Enzymology and molecular biology of lignin degradation. In: Brambl, R.; Marzulf, G. A. (Eds). **The Mycota III Biochemistry and Molecular Biology**. Berlin: Springer-Verlag. 2004. p. 249–273.

D'SOUZA, T. M.; BOOMINATHAN, K.; REDDY, C. A. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3739–3744, 1996.

DANIEL, G. Microview of wood under degradation by bacteria and fungi. In: Goodell, B.; Nicholas, D. D.; Schultz, T. P. (Eds). **Wood Deterioration and Preservation – Advances in our Changing World**. Washington: American Chemical Society, 2003, p. 34–72. ACS Symp. Ser 845.

de JONG, E.; FIELD, J. Sulfur tuft and turkey tail: Biosynthesis and Biodegradation of Organohalogenes by Basidiomycetes. **Annual Review of Microbiology**, v. 51, p. 375–414, 1997.

De Luca, N. G.; Wood, P. M. 2000. Iron uptake by Fungi: Contrasted mechanisms with internal or external reduction. In: Poople, R. K (Ed). **Advances in Microbial Physiology**. Sheffield-UK, 2000, p. 39–74.

DEY, S.; MAITI, T. K.; BHATTACHARYYA, B. C. Lignin peroxidase production by a brown-rot fungus *Polyporus ostreiformis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 72, p. 402–404, 1991.

DEY, S.; MAITI, T. K.; BHATTACHARYYA, B. C. Production of some extracellular enzymes by a lignin peroxidase-producing brown rot fungus, *Polyporus ostreiformis*, and its comparative abilities for lignin degradation and dye decolorization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 4216–4218, 1994.

DIOUF, P. N.; DELBARRE, N.; PERRIN, D.; GERARDIN, P.; RAPIN, C.; JACQUOT, J. P.; GELHAYE, E. Influence of tropolone on *Poria placenta* wood degradation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4377–4382, 2002.

EGGERT, C.; TEMP, U.; DEAN, J. F.; ERIKSSON, K. -E. L. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures, and synthetic lignin by laccase. **FEBS Letters**, v. 391, p. 144–148, 1996.

EK, M.; GIERER, J.; JANSBO, K. Study on the selectivity of bleaching with oxygen-containing species. **Holzforschung**, v. 43, p. 391–396, 1989.

ENOKI, A.; HIRANO, T.; TANAKA, H. Extracellular substance from the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum* that produces and reduces hydrogen peroxide. **Material und Organismen**, v. 27, p. 247–261, 1992.

ENOKI, A.; ITAJURA, S.; TANAKA, H. The involvement of extracellular substances for reducing molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric ion to ferrous iron in wood degradation by wood decay fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 265–272, 1997.

ENOKI, A.; TANAKA, H.; FUSE, G. Degradation of lignin-related compounds, pure cellulose, and wood components by white-rot and brown-rot fungi. **Holzforchung**, v. 42, p. 85–93, 1988.

ENOKI, A.; TANAKA, H.; FUSE, G. Relationship between degradation of wood and production of H₂O₂-producing or one-electron oxidases by brown-rot fungi. **Wood Science and Technology**, v. 23, p. 1–12, 1989.

ENOKI, A.; TANAKA, H.; ITAKURA, S. Physical and chemical characteristics of glycopeptide from wood decay fungi. In: Goodell, B.; Nicholas, D. D.; Schultz, T. P. **Wood Deterioration and Preservation – Advances in our Changing World**. Washington: American Chemical Society, 2003, p. 140–153. ACS Symp. Ser 845.

ERIKSSON, K. E. L.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. Biodegradation of lignin. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Berlin, Springer-Verlag. 1990.

ESPEJO, E.; AGOSIN, E.; VICUÑA, R. Catabolism of 1,2-diarylethane lignin model compounds by two brown-rot fungi. **Archives of Microbiology**, v. 154, p. 370–374, 1990.

FEKETE, F. A.; CHANDHOKE, V.; JELLISON, J. Iron-binding compounds produced by wood-decaying basidiomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 2720–2722, 1989.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin, Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FILLEY, T. R.; CODY, G. D.; GOODELL, B.; JELLISON, J.; NOSER, C.; OSTROFSKY, A. Lignin demethylation and polysaccharide decomposition in spruce sapwood degraded by brown rot fungi. **Organic Geochemistry**, v. 33, p. 111–124, 2002.

FILLEY, T. R.; HATCHER, P. G.; SHORTLE, W. C.; PRASEUTH, R. T. The application of ¹³C-labeled tetramethylammonium hydroxide (¹³C-TMAH) thermochemolysis to the study of fungal degradation of wood. **Organic Geochemistry**, v. 31, p. 181–198, 2000.

FILLEY, T. R.; HATCHER, P. G.; SHORTLE, W. C.; PRASEUTH, R. T. The application of ¹³C-labeled tetramethylammonium hydroxide (¹³C-TMAH)

thermochemolysis to the study of fungal degradation of wood. **Organic Geochemistry**, v. 31, p. 181–198, 2000.

FILLEY, T. R.; MINARD, R. D.; HATCHER, P. G. Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis: proposed mechanisms based upon the application of ^{13}C -labeled TMAH to a synthetic model lignin dimer. **Organic Geochemistry**, v. 30, 607–621, 1999.

FUKUSHIMA, M.; TATSUMI, K. Degradation pathways of pentachlorophenol by photo-Fenton systems in the presence of iron (III), humic acid, and hydrogen peroxide. **Environmental Science and Technology**, v. 35, p. 1771–1778, 2001.

FUKUSHIMA, M.; TATSUMI, K.; MORIMOTO, K. The fate of aniline after a photo-Fenton reaction in an aqueous system containing iron(III), humic acid, and hydrogen peroxide. **Environmental Science and Technology**, v. 34, p. 2006–2013, 2000.

GARDNER, H. W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 7, 65–86, 1989.

GIERER, J. Basic principles of bleaching. Part 1. Cationic and radical processes. **Holzforschung**, v. 44, p. 387–394, 1990.

GILARDI, G.; HARVEY, P. J.; CASS, A. E. G.; PALMER, J. M. Radical intermediates in veratryl alcohol oxidation by ligninase. NMR evidence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1041, p. 129–132, 1990.

GILBERTSON, R. L. Wood-rotting fungi of north America. **Mycologia**, v. 72, p. 1–49, 1980.

GOODELL, B.; DANIEL, G.; JELLISON, J.; QIAN, Y. Iron-reducing capacity of low-molecular weight compounds produced in wood by fungi. **Holzforschung**, v. 60, p. 630–636, 2006.

GOODELL, B.; JELLISON, J.; LIU, J.; DANIEL, G.; PASZCZYNSKI, A.; FEKETE, F.; KRISHNAMURTHY, S.; JUN, L.; XU, G. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. **Journal of Biotechnology**, v. 53, 133–162, 1997.

GUTIÉRREZ, A.; del RIO, J. C.; MARTINEZ-INIGO, M. J.L MARTINEZ, M. J.; MARTINEZ, A. T. Production of new unsaturated lipids during wood decay by ligninolytic basidiomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, 1344–1350, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3.ed. New York: Oxford University, 1999. 936 p.

HALLIWELL, G. Catalytic decomposition of cellulose under biological conditions. **Biochemical Journal**, v. 95, 35–40, 1965.

HAMILTON, G. A.; HANAFIN, J. W.; FRIEDMAN, J. Hydroxylation of aromatic compounds by hydrogen peroxide in the presence of catalytic amounts of ferric ion and catechol. Product studies mechanism and relation to some enzymatic reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 88, p. 5269–5272, 1966.

HAMMEL, K. E.; KAPICH, A. N.; JENSEN JR., K. A.; RYAN, Z. C. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 445–453, 2002.

HARVEY, P. J., SCHOEMAKER, H. E., PALMER, J. M. Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cation in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 195, p. 242–246, 1986.

HASS, H. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p.316–330, 2003.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, p. 125–35, 1994.

HATCHER, P. G.; NANNY, M. A.; MINARD, R. D.; DIBLE, S. D.; CARSON, D. M. Comparison of two thermochemolytic methods for the analysis of lignin in decomposing gymnosperm wood: the CuO oxidation method and the method of thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). **Organic Geochemistry**, v. 23, p. 881–888, 1995.

HATCHER, P. G.; MINARD, R. D. Comment on the origin of benzenecarboxylic acids in pyrolysis methylation studies. **Organic Geochemistry**, v. 23, p. 991–994, 1995.

HATCHER, P. G.; MINARD, R. D. Comparison of dehydrogenase polymer (DHP) lignin with native lignin from gymnosperm wood by thermochemolysis using tetramethylammonium hydroxide (TMAH). **Organic Geochemistry**, v. 24, p. 593–600, 1996.

HAVE, R.; TEUNISSEN, P. J. M. Oxidative Mechanisms Involved in Lignin Degradation by White-Rot Fungi. **Chemical Review**, v. 101, p. 3397–3413, 2001.

HENRIKSSON, G.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. A critical review of cellobiose dehydrogenases. **Journal of Biotechnology**, v. 78, p. 93–113, 2000.

HERNÁNDEZ-MACEDO, M. L.; FERRAZ, A.; RODRÍGUEZ, J.; OTTOBONI, L. M. M.; DE MELLO, M. P. Iron-regulated proteins in *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*: Differential analysis by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis profiles. **Electrophoresis**, v. 23, p. 655–661, 2002.

HIGHLEY, T. L. Requirements for cellulose degradation by a brown-rot fungus. **Material und Organismen**, v. 12, p. 25–36, 1977.

HIGHLEY, T. L.; DASHEK, W. V. Biotechnology in the study of brown- and white-rot decay. In: Bruce, A.; Palfreyman, J. W. (Eds). **Forest products biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1998. p. 15–36.

HIGHLEY, T. L.; MURMANIS, L. L.; PALMER, J. G. Micromorphology of degradation in western hemlock and sweetgum by the brown rot fungus *Poria placenta*. **Holzforschung**, v. 39, p. 73–78, 1985.

HIRANO, T., ENOKI, A., TANAKA, H. Immunogold labeling of an extracellular substance producing hydroxyl radicals in wood degraded by brown-rot fungus *Tyromyces palustris*. **Journal of Wood Science**, v. 46, p. 45–51, 2000.

HIRANO, T., TANAKA, H., ENOKI, A. Extracellular substance from the brown-rot basidiomycete *Tyromyces palustris* that reduces molecular oxygen to hydroxyl radicals and ferric ion to ferrous iron. **Mokuzai Gakkaishi**, v. 41, p. 334–341, 1995.

HOFRICHTER, M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 454–466, 2002.

HOFRICHTER, M.; VARES, T.; KALSI, M.; GALKIN, S.; SCHEIBNER, K.; FRITSCH, W.; HATAKKA, A. Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ^{14}C -labelled lignin (^{14}C -DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1864–1870, 1999.

HU, G.; ZHANG, W.; LU, X.; GAO, P. Purification and characterization of a low-molecular weight peptides possessing oxidative capacity for phenol from *Phanerochaete chrysosporium*. **Science in China: Series C Life Sciences**, v. 49, p. 1–8, 2006.

HYDE, S. M.; WOOD, P. M. A mechanism for production of hydroxyl radicals by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*: Fe(III) reduction by cellobiose dehydrogenase and Fe(II) oxidation at a distance from the hyphae. **Microbiology**, v. 143, p. 259–266, 1997.

INDEX FUNGORIUM. Disponível em <<http://www.indexfungorum.org/>>. Acesso em: 24 jun. 2008.

JELLISON, J.; CHANDHOKE, V.; GOODELL, B.; FEKETE, F. A. The isolation and immunolocalization of iron-binding compounds produced by *Gloeophyllum trabeum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 805–809, 1991.

JELLISON, J.; CHEN, Y.; FEKETE, F. A. Hyphal sheath and iron-binding compound formation in liquid cultures of wood decay fungi *Gloeophyllum trabeum* and *Postia placenta*. **Holzforschung**, v. 51, p. 503–510, 1997.

JELLISON, J.; CONNOLLY, J.; GOODELL, B.; DOYLE, B.; ILLMAN, B.; FEKETE, F.; OSTROFSKY, A. The role of cations in the biodegradation of wood by the brown rot fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 39, p. 165–179, 1997.

JELLISON, J.; GOODELL, B.; QIAN, Y. Methods useful in assessing biological and chemical activity of low-molecular-weight brown rot fungal metabolites. In: Hurst, C. J.; Crawford, R. L.; Garland, J. L.; Lipson, D. A.; Mills, A. L.; Stetzenbach, L. D. (Eds). **Manual of Environmental Microbiology**, 3rd. Washington: ASM Press, 2007.

JENSEN JR. K. A.; BAO, W.; KAWAI, S.; SREBOTNIK, E.; HAMMEL, K. E. Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3679–3686, 1996.

JENSEN JR., K. A.; RYAN, Z. C.; WYMELENBERG, A. V.; CULLEN, D.; HAMMEL, K. E. An NADH:quinone oxidoreductase active during biodegradation by the brown-Rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2699–2703, 2002.

JENSEN, K. A.; HOUTMAN, C. J.; RYAN, Z. C.; HAMMEL, K. E. Pathways for extracellular Fenton chemistry in the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 2705–2711, 2001.

JONG, E.; FIELD, J. A.; BONT, J. A. M. Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. **FEMS Microbiology Review**, v. 13, p. 153–187, 1994.

KAMNEV, A. A.; KUZMANN, E. Mossbauer spectroscopic evidence for the reduction of iron(III) by anthranilic acid in aqueous solution. **Polyhedron**, v. 16, p. 3353–3356, 1997.

KANG, N.; LEE, D. S.; YOON, J. Kinetic modeling of Fenton oxidation of phenol and monochlorophenols. **Chemosphere**, v. 47, p. 915–924, 2002.

KAPICH, A. N.; JENSEN, K. A.; HAMMEL, K. E. Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. **FEBS Letters**, v. 461, p. 115–119, 1999.

KAPICH, A. N.; GALKIN, S.; HATAKKA, A. Effect of phenolic acids on manganese peroxidase-dependent peroxidation of linoleic acid and degradation of a non-phenolic lignin model compound. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, p. 350–358, 2007.

KEREM, Z.; BAO, W.; HAMMEL, K. E. Rapid polyether cleavage via extracellular one-electron oxidation by a brown-rot basidiomycete. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 95, p. 10373–10377, 1998.

KEREM, Z.; JENSEN, K. A.; HAMMEL, K. E. Biodegradative mechanism of the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-driven Fenton reaction. **FEBS Letters**, v. 446, p. 49–54, 1999.

KERSTEN, P. J.; KIRK, T. K. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. **The Journal Bacteriology**, v. 169, p. 2195–2201, 1987.

KHINDARIA, A.; GROVER, T. A.; AUST, S. D. Evidence for formation of the veratryl alcohol cation radical by lignin peroxidase. **Biochemistry**, v. 34, p. 6020–6025, 1995a.

KHINDARIA, A.; GROVER, T.; AUST, S. Oxalate-dependent activity of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 314, p. 301–306, 1994.

KHINDARIA, A.; YAMAZAKI, I.; AUST, S. D. Stabilization of the veratryl alcohol cation radical by lignin peroxidase. **Biochemistry**, v. 35, p. 6418–6424, 1996.

KHINDARIA, A.; YAMAZAKI, I.; AUST, S. D. Veratryl alcohol oxidation by lignin peroxidase **Biochemistry**, v. 34, p. 16860–16869, 1995b.

KIRK, T. K., CULLEN, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: Young, R.; Akhtar, M. **Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry**. New York: John Wiley, 1998, p. 273–308.

KIRK, T. K.; HIGHLEY, T. L.; IBACH, R.; MOZUCH, M.D. Identification of terminal structures in cellulose degraded by the brown-rot fungus *Postia placenta*. In:

International Research Group on Wood Preservation. Lappeenranta, Finland. 1989. Document no. IRG/WP/1389, 89-05-22/26

KIRK, T. K.; IBACH, M. D.; MOZUCH, A. H. C.; HIGHLEY, T. L. Characteristics of cotton cellulose depolymerized by a brown-rot fungus, by acid, or by chemical oxidants. **Holzforschung**, v. 45, 239–244, 1991.

KOENIGS, J. W. Hydrogen peroxide and iron: A microbial cellulolytic system? **Biotechnology Bioengineering Symposium**, v, 5, p. 151–159, 1975.

KOENIGS, J. W. Hydrogen peroxide and iron: a proposed system for decomposition of wood by brown rot basidiomycetes. **Wood and Fibre**, v. 6, p. 66–79, 1974a.

KOENIGS, J. W. KOENIGS, Effects of hydrogen peroxide on cellulose and on its susceptibility to cellulose. **Material und Organismen**, v. 7, p. 133–147, 1972a.

KOENIGS, J. W. Koenigs, Production of extracellular hydrogen peroxide by wood-rotting fungi. **Phytopathology**, v. 62, p. 100–110, 1972b.

KOENIGS, J. W. Production of hydrogen peroxide by woodrotting fungi in wood and its correlation with weight loss, depolymerization, and pH changes. **Archives of Microbiology**, v. 99, p. 129–145, 1974b.

KOSMAN, D. J. MicroReview: Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. **Molecular Microbiology**, v. 47, p. 1185–1197, 2003.

KRAMER, C.; KREISEL, G.; FAHR, K.; KASSBOHRER, J.; SCHLOSSER, D. Degradation of 2-fluorophenol by the brown-rot fungus *Gloeophyllum striatum*: evidence for the involvement of extracellular Fenton chemistry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 387–395, 2004.

KUHAD, R. C.; SINGH, A. W.; ERIKSSON, K. E. L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant cell walls. In. Ed. Eriksson, K. E. L. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. New York: Springer-Verlag Heidelberg, 1997. v. 57, p. 45–125..

KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H_2O_2 -dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, p. 247–250, 1984.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p. 680–685, 1970.

LEQUART, C.; KUREK, B.; DEBEIRE, P.; MONTIES, B. MnO_2 and oxalate: an abiotic route for the oxidation of aromatic components in wheat straw. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 3868–3874, 1998.

LESUISSE, E.; CASTERAS-SIMON, M.; LABBE, P. Evidence for the *Saccharomyces cerevisiae* ferrireductase system being a multicomponent electron transport chain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p.13578–13583, 1996.

LI, K.; HORANYI, P.; COLLINS, R.; PHILLIPS, R. S.; ERIKSSON, K.-E.L. Investigation of the role of 3-hydroxyanthranilic acid in the degradation of lignin by white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. **Enzyme Microbial Technology**, v. 28, p. 301–307, 2001.

LI, Z. M.; SHEA, P. J.; COMFORT, S. D. Nitrotoluene destruction by UV-catalyzed Fenton reaction. **Chemosphere**, v. 36, p. 1849–1865, 1998.

LIESE W, Ultrastructural aspects of woody tissues disintegration. **Annual Review of Phytopathology**, v. 8, 231–258, 1970.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, p. 293–303, 2001.

LOWE, C. R; THOMAS, J. A. Purification and analysis of enzyme preparations. In: ENGEL, P. C. (Ed). **Enzymology LabFax**. San Diego, CA: Academic Press. 1996. p. 9–75.

MACHUCA, A.; AOYAMA, H.; DURÁN, N. Isolation and partial characterization of an extracellular low-molecular mass component with high phenoloxidase activity from

Thermoascus aurantiacus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 256, p. 20–26, 1999.

MACHUCA, A.; NAPOLEÃO, D.; MILAGRES, A. M. F. Detecton of metal-chelating compounds from wood-rotting fungi *Trametes versicolor* and *Wolfiporia cocos*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 687–690, 2001.

MACHUCA, M.; FERRAZ, A. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 386–391, 2001

MARTÍNEZ, A. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 425–444, 2002.

MEDEIROS, C. L. **Tratamento de polpas com compostos quelantes de baixa massa molar, produzidos por fungos e compostos modelo de sideróforos**. 1999. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 1999.

MEI, B.; BUDDE, A. D.; LEONG, S. A. Sid1, a gene initiating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*: molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 903–907, 1993.

MENDONÇA, R. M. T. **A biodegradação de *Eucalyptus grandis* pelos fungos *Punctularia artropurpurascens* e *Wolfiporia cocos* como um pré-tratamento para o processo de deslignificação organosolv-MASAT**. 1997. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 1997.

MESSNER, K. FACKLER, K. LAMAIPIS, P. GINDL, W. SREBOTNIK, E. WATANABLE, T. Delignification by coordinated cooper/peroxide – a reaction proposed for selective white rot. In: 7th Brazilian symposium on the chemistry of lignins and other wood componentes. Proceedings, 2001. Belo Horizonte-Brazil. September 2-5, 367-377.

MESSNER, K., SREBOTNIK, E. Biopulping: An overview of developments in an environmentally safe paper-making technology. **FEMS Microbiology Review**, v, 13, p. 351–364, 1994.

MEYER-PINSON, V.; RUEL, K.; GAUDARD, F.; VALTAT, G.; PETIT-CONIL, M.; KUREK, B. Oxalic acid: a microbial metabolite of interest for the pulping industry. **Comptes Rendus Biologies**, v. 327, p. 917–925, 2004.

MEZENEC, M. I. B.; BOIRON, P. Studies on siderophore production and effect of iron deprivation on the outer membrane proteins of *Mycobacterium mycetomatis*. **Current Microbiology**, v. 31, p. 220–223, 1995.

MILAGRES, A. M. F.; ARANTES, V.; MEDEIROS, C. L.; MACHUCA, A. Production of metal chelating compounds by white and brown-rot fungi and their comparative abilities for pulp bleaching. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 562–565, 2002.

MILAGRES, A. M. F.; MACHUCA, A.; NAPOLEÃO, D. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) Ágar plate assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 37, 1 – 6, 1999.

MILAGRES, A. M. F.; SALES, R. M. Evaluating the basidiomycetes *Poria medullipanis* and *Wolfiporia cocos* for xylanase production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 522–526, 2001.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31, p. 426–428, 1959.

MORRISSEY, J. A.; WILLIAMS, P. H.; CASHMORE, A. M. *Candida albicans* has a cell-associated ferric-reductase activity which is regulated in response to levels of iron and copper. **Microbiology**, 142:485–492, 1996.

NAPPI, A. J.; VASS, E. Comparative studies of enhanced iron-mediated production of hydroxyl radical by glutathione, cysteine, ascorbic acid, and selected catechols. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1336, p. 295–302, 1997.

NEILANDS, J. B. Methodology of siderophores. Siderophores from microorganisms and plants. **Structure and Bonding**, v. 58, p. 1–24, 1984.

NEWCOMBE, D.; PASZCZYNSKI, A.; GAJEWSKA, W.; KROGER, M.; FEIS, G.; CRAWFORD, R. Production of small molecular weight catalysts and the mechanism of trinitrotoluene degradation by several *Gloeophyllum* species. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 506–517, 2002.

NIEROP, K. G. J.; FILLEY, T. R. Assessment of lignin and (poly-)phenol transformations in oak (*Quercus robur*) dominated soils by ^{13}C -TMAH thermochemolysis. **Organic Geochemistry**, v. 38, p. 551–565, 2007.

NYHUS, K. J.; WILBORN, A. T.; JACOBSON, E. S. Ferric iron reduction by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 434–438, 1997.

OHASHI, Y.; KAN, Y.; WATANABE, T.; HONDA, Y.; WATANABE, T. Redox silecing of the Fenton reaction system by an alkylitaconic acid, ceriporic acid B produced by a selective lignin-degrading fungus, *Cereporiopsis subvermispota*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, p. 840–847, 2007.

ORTH, A. B.; ROYSE, D. J.; TIEN, M. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading Fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 4017–4023, 1993.

OTJEN, L.; BLANCHETTE, R. A. Selective delignification of aspen wood blocks in vitro by three white rot Basidiomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 568–572, 1985.

PASZCZYNSKI, A.; CRAWFORD, R.; FUNK, D.; GOODELL, B. De Novo synthesis of 4,5-dimethoxycatechol and 2,5-dimethoxyhydroquinone by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 674–679, 1999.

PAYNE, S. M. Detection, isolation and characterization of siderophores. In: Iron assays and deferration of media. **Methods in Enzymology**, v. 235, p. 329–344, 1994.

POPP, J. L.; KALYANARAMAN, B.; KIRK, T. K. Lignin peroxidase oxidation of Mn^{2+} in the presence of veratryl alcohol, malonic or oxalic acid, and oxygen. **Biochemistry**, v. 29, p. 10475–10480, 1990.

POTTHAST, A.; ROSENAU, T.; CHEN, C.L.; GRATZL, J.S. J. Selective enzymatic oxidation of aromatic methyl groups to aldehydes. **Organic Chemistry**, v. 60, p. 4320–4321, 1995,

POULOS, T. L.; EDWARDS, S. L.; WARIISHI, H.; GOLD, M. H. Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 4429–4440, 1993.

PRACHT, J.; BOENIGK, J.; ISENBECK-SCHROTER, M.; KEPPLER, F.; SCHOLER, H. F. Abiotic Fe(III) induced mineralization of phenolic substances. **Chemosphere**, v. 44, p. 613–619, 2001.

QI, W.; JELLISON, J. 2004. Induction and catalytic properties of an intracellular NADH-dependent 1,4-benzoquinone reductase from the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 54, p. 53–60, 2004.

QIAN, Y.; GOODELL, B.; FELIX, C. C. The effect of low molecular weight chelators on iron chelation and free radical generation as studied by ESR measurement. **Chemosphere**, v. 48, p. 21–28, 2002.

RAYNER, A. D. M.; BODDY, L. **Fungal Decomposition of Wood: its Biology and Ecology**. Chichester, UK: John Wiley, 1988.

RODRIGUEZ, J.; CONTRERAS, D.; PARRA, C.; FREERM H.; BAEZA, J.; DURAN, N. Pulp Mill effluent treatment by Fenton-type reactions catalyzed by iron complexes. **Water Science and Technology**, v. 40, p. 351–355, 1999.

SCHLOSSER, D.; FAHR, K.; KARL, W.; WETZSTEIN, H. Hydroxylated metabolites of 2,4-dichlorophenol imply a Fenton-type reaction in *Gloeophyllum striatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2479–2483, 2000.

SCHLOSSER, D.; HÖFER, C. 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**, v. 68, p. 3514–3521, 2002.

SCHMIDT, C. J.; WHITTEN, B. K.; NICHOLAS, D. D. A proposed role for oxalic acid in non-enzymatic wood decay by brown-rot fungi. **American Wood Preservers Association**, v. 77, p.157–164, 1981.

SCHWARZE, F. W. M. R. Review: Wood decay under the microscope. **Fungal Biology Review**, v. 21, p. 133–170, 2007.

SCHWARZE, F. W. M. R.; FINK, S.; DEFLORIO, G. Resistance of parenchyma cells in wood degraded by brown rot fungi. **Mycological Progress**, v. 2, p. 267–274, 2003.

SCHWARZE, F. W. M. R.; MATTHECK, C.; ENGELS, J. **Fungal strategies of wood decay in trees**. Heidelberg: Springer, 2004.

SCHWYN, B.; J. B. NEILANDS. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, p. 47–56, 1987.

SHIMADA, M.; FUMIAKIN, M.; KIRK, T. K.; HIGUCHI, T. Biosynthesis of the secondary metabolite veratryl alcohol in relation to lignin degradation in *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Microbiology**, v. 129, p. 321–324, 1981.

SHIMOKAWA, T.; NAKAMURA, M.; HAYASHI, N.; ISHIHARA, M. Production of 2,5-dimethoxyhydroquinone by the brown-rot fungus *Serpula lacrymans* to drive extracellular Fenton reaction. **Holzforschung**, v. 58, p. 305–310, 2004.

SILVA, E. M.; MARTINS, S. F.; MILAGRES, A. M. F. Extraction of manganese peroxidase produced by *Lentinula edodes*. **Bioresource Technology**, v. 99, 2471–2475, 2008.

SIMIONATO, A. V. C. **Determinação de vitaminas hidrossolúveis por cromatografia micelar eletrocínética capilar em fármacos**. 2000. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

SIMIONATO, A. V. C.; SIMÓ, C.; CIFUENTES, A.; LACAVA, P. T.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; CARRILHO, E. Capillary electrophoresis-mass spectrometry of citrus endophytic bacteria siderophores. **Electrophoresis**, v. 27, p. 2567–2574, 2006.

SOUTHORN, P. A.; GARTH, P. Free Radicals in Medicine. 1. Chemical nature of biological reactions. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 63, p. 381–398, 1988.

SREBOTNIK, E.; MESSNER, K.; FOISNER, R. 1988. Penetrability of white-rot degraded pine wood by the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 2608–2614.

SREBOTNIKI, E.; JENSEN JR., K. E.; KAWAI, S.; HAMMEL, K. E. Evidence That *Ceriporiopsis subvermispore* degrades nonphenolic lignin structures by a one-electron-oxidation mechanism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4435–4440, 1997.

SREBOTNIKI, E.; BOISSON, J.-N. Peroxidation of linoleic acid during the oxidation of phenols by fungal lacase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 785–789, 2005.

STOOKEY, L. Ferrozine – a new spectrophotometric reagent for iron. **Analytical Chemistry**, v. 42, p. 781–783, 1970.

SUN, Y.; PIGNATELLO, J. Activation of hydrogen peroxide by iron (III) chelates for abiotic degradation of herbicides and insecticides in water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 308–312, 1993.

SUN, Y.; PIGNATELLO, J. Chemical treatment of pesticide wastes. Evaluation of Fe(III) chelates for catalytic hydrogen peroxide oxidation of 2,4-D at circumneutral pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 322–327, 1992.

SUZUKI, M. R.; HUNT, C. G.; HOUTMAN, C. J.; DALEBROUX, Z. D.; HAMMEL, K. E. Fungal hydroquinones contribute to brown rot of wood. **Environmental Microbiology**, v. 8, p. 2214–2223, 2006.

SWARTS, H. J.; VERHAGEN, F. J. M.; FIELD, J. A.; WIJNBERG, J. B. P. A. Novel chlorometabolites produced by *Bjerkandera* species. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1699–1701, 1996.

SYLVA, R. N. The hydrolysis of iron(III). **Review of Pure and Applied Chemistry**, v. 22, p.115–130, 1972.

SZKLARZ, G. D.; ANTIBUS, R. K.; SINSA BAUGH, R. L.; LINKINS, A. E. Production of phenoloxidas and peroxidas by wood-rotting fungi. **Mycologia**, v. 81, p. 234-240, 1989.

TAN, L. U. L.; MAYERS, P.; SADDLER, J. N. 1987. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canada Journal Microbiology**, v. 33, p. 689–692, 1987.

TANAKA, H.; FUSE, G.; ENOKI, A. 1991. An extracellular H₂O₂-producing and H₂O₂-reducing glycopeptide preparation from the lignin-degrading white-rot fungus, *Irpex lacteus*. **Mokuzai Gakkaishi**, v. 37, p. 986–988, 1991.

TANAKA, H.; ITAKURA, S.; ENOKI, A. Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. **Journal of Biotechnology**, v. 75, 57–70. 1999.

TANAKA, H.; ITAKURA, S.; HIRANO, T.; ENOKI, A. Na extracellular substance from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* for reducing molecular oxygen and ferri iron. **Holzforschung**, v. 50, p. 541–548, 1996.

TANAKA, M.; TANIGUCHI, M. A.; MATSUMO, R.; KAMIKUBO, T. Purification and properties of celulas from *Eupenicillium javanicum*. **Journal Fermentation Technology**, v. 59, p.177–183, 1981.

TATSUMI, K.; TERASHIMA, N. Oxidative degradation of lignin VII. Cleavage of the β-O-4 linkage of guaiacylglycerol-β-guaiacyl ether by hydroxyl radicals. **Mokuzai Gakkaishi**, v. 31, p. 31, 316–317, 1985.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, p. 493-510, 1997.

ten HAVE, R.; TEUNISSEN, P. J. M. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. **Chemical Reviews**, v. 101, p. 3397–3413, 2001.

TEUNISSEN, P. J. M.; FIELD, J. A. 2-Chloro-1,4-dimethoxybenzene as a novel catalytic cofactor for oxidation of anisyl alcohol by lignin peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 830–835, 1998.

TEUNISSEN, P. J.; SHENG, D.; REDDY, G. V.; MOENNE-LOCCOZ, P.; FIELD, J. A.; GOLD, M. H. 2-Chloro-1,4-dimethoxybenzene cation radical: formation and role in the lignin peroxidase oxidation of anisyl alcohol. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 360, p. 233–238, 1998.

TIMMERMAN, M. M.; WOODS, J. P. Ferric reduction is a potential iron acquisition mechanism for *Histoplasma capsulatum*. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 6403–6408, 1999.

URZÚA, U.; KERSTEN, P. L.; VICUNA, R. Manganese peroxidase-dependent oxidation of glyoxilic and oxalic acids synthesized by *Ceriporiopsis subvermispora* produces extracellular hydrogen peroxide. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 68–73, 1998.

VANE, C. H.; MARTIN, S. C.; SNAPE, C. E.; ABBOTT, G. D. Degradation of lignin in wheat straw during growth of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* using off-line thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide and solidstate C-13 NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2709–2716, 2001.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (Medium N). **Microbial Genetics Bull**, v. 13, p. 42–43, 1956.

VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 497–522, 2001

- WANG, W.; GAO, P. A peptide-mediated and hydroxyl radical HO•-involved oxidative degradation of cellulose by brown-rot fungi. **Biodegradation**, v. 13, p. 383–394, 2002.
- WANG, W.; GAO, P. J. Function and mechanism of a low-molecular-weight peptide produced by *Gleophyllum trabeum* in biodegradation of cellulose. **Journal of Biotechnology**, v. 101, p. 119–130, 2003.
- WANG, W.; HUAGN, F.; LU, X. M.; GAO, P. J. Lignin degradation by a novel peptide, Gt factor, from brown rot fungus *Gleophyllum trabeum*. **Biotechnology Journal**, v. 1, p. 447–453, 2006.
- WANG, W.; LIU, J. C.; GAO, P. J. A peptide-mediated Fenton reaction in wood-degrading fungi. **Chinese Chemical Letters**, v. 13, p. 773–776, 2002.
- WATANABE, T.; KATAYAMA, S.; ENOKI, M.; HONDA, Y. H.; KUWAHARA, M. Formation of acyl radical in lipid peroxidation of linoleic acid by manganese-dependent peroxidase from *Ceriporiopsis subvermispota* and *Bjerkandera adusta*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p.4222–4231, 2000.
- WATLING, R. Taxonomic status and ecological identity in the basidiomycetes. In: Frankland, J. C.; Hedger, J. N.; Swift, M. J. (Eds). **Decomposers Basidiomycetes: Their Biology and Ecology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1982. p. 1–32.
- WETZSTEIN, H. -G.; SCHMEER, N.; KARL, W. Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by the brown rot fungus *Gleophyllum striatum*: identification of metabolites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p.4272–4281, 1997.
- WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulose activities. In: Wood, W. A.; Kellog, S. T. (Eds). **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press Inc, 1988. p. 87–112, v. 160.
- WOODWARD, B. M.; DE GROOT, R. C. Tolerance of *Wolfiporia cocos* isolates to copper in ágar media. **Forest Products Journal**, v. 49, p. 87–94, 1999.
- WORRALL, J. J.; ANAGNOST, S. E.; ZABEL, R. A. Comparison of wood decay among diverse lignicolous fungi. **Mycologia**, v. 89, p. 199–219, 1997.

XU, G.; GOODELL, B. Mechanism of wood degradation by brown-rot fungi: chelator-mediated cellulose degradation and binding of iron by cellulose. **Journal of Biotechnology**, v. 27, 43–57, 2001.

XU, J.; JORDAN, R. B. Kinetics and mechanism of the oxidation of 2,3-dihydroxybenzoic acid by iron(III). **Inorganic Chemistry**, v. 27, p. 453–456, 1988.

YANG, W.; LIU, J.; WANG, W.; ZHANG, Y.; GAO, P. Function of a low molecular peptide generated by cellulolytic fungi on the degradation of native cellulose. **Biotechnology letters**, v. 26, p. 1799–1802, 2004.

ZAPANTA, L. S.; TIEN, M. The roles of veratryl alcohol and oxalate in fungal lignin biodegradation. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 93–102, 1997.