



ANGELA ELENA MACHUCA HERRERA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UM COMPOSTO DE
BAIXA MASSA MOLECULAR, COM ATIVIDADE FENOLOXIDÁSICA, DE
Thermoascus aurantiacus

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas, para a
obtenção do título de Doutor em Ciências,
área Bioquímica

Orientador
Prof. Dr. HIROSHI AOYAMA

Campinas, 1995

o exemplar corresponde à redação final
a tese defendida pelo (a) candidato (a)
Angela Elena Machuca
Herrera
e aprovada pela Comissão de Orientação

16/10/95 Hiroshi Aoyama

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

M185p

Machuca Herrera, Angela Elena

Produção e caracterização parcial de um composto de
baixa massa molecular, com atividade fenoloxidásica, de
Thermoascus aurantiacus / Angela Elena Machuca Herrera.
-- Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador: Hiroshi Aoyama.

Tese(doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. * *Thermoascus aurantiacus*. 2. Microorganismos ter-
mófilos. 3. Sideróforos. I. Aoyama, Hiroshi. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IIITítulo.

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
	T/UNICAMP
	M185P
V.	Ex.
TCMBO BC/	26484
PROC.	667/96
C	☐
	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	17/01/96
N.º CPD	

CM-00082500-8

LOCAL E DATA : Campinas, 16 de Outubro de 1995

BANCA EXAMINADORA :

TITULARES:

Prof. Dr. HIROSHI AOYAMA (Orientador)



Assinatura

Profa.Dra. LÚCIA REGINA DURRANT



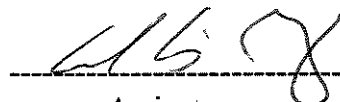
Assinatura

Profa.Dra. SATIE HATSUSHIKA OGO



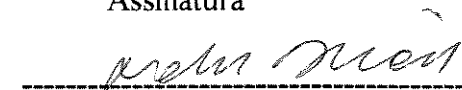
Assinatura

Prof.Dr. ANDRÉ LUIS FERRAZ



Assinatura

Prof.Dr. NELSON EDUARDO DURÁN CABALLERO



Assinatura

SUPLENTES :

Profa.Dra. HÉLIA HARUMI SATO

Assinatura

Profa.Dra. NILCE CORREA MEIRELLES

Assinatura

***A Juanito e Maria dedico, con enorme gratitud
e infinito cariño. A Uds. debo este trabajo***

***A Pedro Henrique, por entrar en mi vida
cambiando el rumbo de mis objetivos***

A toda mi tribu

A mis amigos

AGRADECIMENTOS

Esta página é, sem dúvida alguma, parte essencial de uma tese, porque as pessoas que nela são citadas foram ou continuam sendo essenciais para o bom desenvolvimento do trabalho, seja pela orientação da pesquisa, apoio técnico ou pela amizade.

- Ao Hiroshi, por me mostrar que ainda se faz pesquisa de forma honesta, séria e profissional. Eternamente obrigada por me aceitar sob sua orientação, pelo apoio amigo e pela confiança no meu trabalho.

- Ao Nelson pela orientação e valiosas discussões no decorrer deste trabalho.

- Aos membros da pré-banca Nilce, Satie e Lúcia, pelas sugestões e correções deste trabalho.

- Aos funcionários do Instituto de Química da UNICAMP, que contribuíram com um impagável apoio técnico e, quando necessário humano.

- À todos que contribuíram com a realização de partes deste trabalho.

- Aos amigos, especialmente àqueles que souberam me compreender, apoiar e incentivar a continuar este trabalho nos momentos mais difíceis. Qualquer tentativa de citá-los seria um ato de injustiça; não saberia por onde começar, nem onde acabar. Eternamente grata.

- À FAPESP e FAEP pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1.- INTRODUÇÃO	1
2.- REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1.- Madeira: Componentes Estruturais e Biodegradação	2
2.1.1.- Componentes Estruturais	2
2.1.2.- Biodegradação de Madeira	4
2.1.3.- Fisiologia da Biodegradação de Madeira	6
2.2.- Biodegradação de Lignina por Fungos	7
2.2.1.- Sistemas Enzimáticos Fúngicos Relacionados à Degradação de Lignina	7
2.2.1.1.- Enzimas Ligninolíticas	8
2.2.1.2.- Enzimas Produtoras de H ₂ O ₂	13
2.2.1.3.- Enzimas Redutoras	14
2.2.2.- Agentes Fúngicos de Baixa Massa Molecular Relacionados à Degradação de Madeira	16
2.3.- Aplicação Biotecnológica de Fungos Ligninolíticos e seus Sistemas Enzimáticos	24
2.4.- Antecedentes Bibliográficos sobre <i>Thermoascus aurantiacus</i>	25
3.- OBJETIVOS DESTE ESTUDO	27
4.- MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1.- MATERIAL	28
4.1.1.- Reagentes	28
4.1.2.- Microrganismo	28
4.1.3.- Meios de Cultura	28
4.1.4.- Substratos Polissacarídicos	28
4.2.- MÉTODOS	29
4.2.1.- Produção de Atividade FOx	29
I.- Efeito das Condições de Cultura na Produção da Atividade FOx	29
II.- Análise dos Caldos Extracelulares	30
4.2.2.- Propriedades do Extrato Bruto	33
4.2.3.- Purificação Parcial de uma Fração com Atividade FOx	35
4.2.4.- Caracterização da Fração com Atividade FOx Parcialmente Purificada	38

4.2.5.- Produção de Sideróforos por <i>T.aurantiacus</i>	40
4.2.6.- Utilização Biotecnológica dos Extratos com Atividade FOx de <i>T.aurantiacus</i>	41
i.- Tratamento de Efluentes da Indústria Papeleira	42
ii.- Tratamento de Polpa Kraft de Eucalipto	43
5.- RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
PARTE I: PRODUÇÃO DE ATIVIDADE FOx POR <i>T.aurantiacus</i>	46
I.1.- Efeito de Diferentes Substratos Lignocelulósicos	46
I.2.- Efeito da Concentração de Glicose	52
I.3.- Efeito de um Indutor Sintético	56
I.4.- Efeito do Tipo e Tamanho do Inóculo	58
I.5.- efeito da Agitação e Oxigenação das Culturas	59
I.6.- Efeito do pH do Meio de Cultura	61
PARTE II: PROPRIEDADES DO EXTRATO BRUTO COM ATIVIDADE FOx	63
II.1.- Tipo de Atividade Presente no Extrato Bruto de <i>T.aurantiacus</i>	63
II.2.- Efeito da Concentração do Extrato Bruto na Atividade FOx	64
II.3.- Efeito do pH na Atividade FOx	65
II.4.- Efeito da Temperatura na Atividade FOx	67
II.5.- Especificidade pelo Substrato	69
II.6.- Efeito da Concentração de Substrato na Atividade FOx	70
II.7.- Efeito de Diferentes Compostos na Atividade FOx	71
PARTE III: PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UMA FRAÇÃO COM ATIVIDADE FOx PRESENTE NAS CULTURAS DE <i>T.aurantiacus</i>	73
III.1.- Esquema I de Purificação	73
III.2.- Esquema II de Purificação	78
PARTE IV: PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS POR <i>T.aurantiacus</i>	83
IV.1.- Produção em Meio Sólido	83
IV.2.- Produção em Meio Líquido	83
IV.3.- Detecção de Sideróforos na Fração com Alta Atividade FOx Parcialmente Purificada	85
PARTE V: CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO COM ATIVIDADE FOx PARCIALMENTE PURIFICADA	87
V.1.- Propriedades Cinéticas da Fração Parcialmente Purificada	87
V.2.- Propriedades Físico-Químicas da Fração Parcialmente Purificada	91
V.3.- Aspectos da Reação de Oxidação de o-Dianisidina	99
PARTE VI: UTILIZAÇÃO DA ATIVIDADE FOx DE <i>T.aurantiacus</i> NO TRATAMENTO DE POLPAS E EFLUENTES INDUSTRIAIS	104
VI.1.- Tratamento de Polpas Kraft de Eucalipto	104

VI.2.- Tratamento de Efluentes Industriais	111
6.- DISCUSSÃO FINAL	114
Produção de Atividade FOx	114
Purificação de uma Fração contendo Atividade FOx	115
Produção de Sideróforos por <i>T.aurantiacus</i>	116
Caracterização da Fração com Atividade FOx Parcialmente Purificada	116
Utilização dos Extratos Ativos de <i>T.aurantiacus</i>	118
Proposta de um Mecanismo de Reação para o Composto com Atividade FOx de <i>T.aurantiacus</i>	119
7.- CONCLUSÕES	122
8.- PERSPECTIVAS	124
9.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
10.- APÊNDICES	141

ABREVIATURAS

ABTS : Ácido 2,2'azino-bis (3etil-benzotiazolina-6-sulfônico)
AAO : Aril-Álcool Oxidase
AVO : Álcool Veratrílico Oxidase
A₂₈₀ : Leitura de Absorbância em 280 nm
CAS : Reagente Chromo Azurol S
CBQ : Celobiose-quinona Oxidoreductase
CDH : Celobiose Desidrogenase
cP : Centipoises
Da : Dalton
DEAE : Dietilaminoetil
DETAPAC : Ácido dietilenotriamino pentacético
DMSO : Dimetilsulfóxido
2,6-DMF: 2,6 dimetóxfenol
EDTA : Ácido etileno diamino tetracético
FAD : Flavina adenina dinucleotídeo
FMN : Flavina mononucleotídeo
FOX : Atividade Fenoxidásica
GLOX : Glioxal Oxidase
HDTMA : Brometo de Hexadeciltrimetil-amônio
HPLC : Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HRP : Peroxidase de rabanete
ICP : Plasma Indutivamente Acoplado (Inductively Acoupled Plasma)
IV : Infravermelho
Km : Constante de Michaelis-Menten
KTBA : Ácido 2-ceto-4-tiometil Butírico
LiP : Lignina peroxidase
MnP : Peroxidase dependente de Manganês
NADH : Nicotina-adenina dinucleotídeo reduzida
NAD(P)H : Nicotina-adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
PVP : Polivinilpirrolidona
RBB-R : Remazol Brilliant Blue
RMN : Ressonância Magnética Nuclear

RESUMO

No presente trabalho estudou-se a produção de extratos com atividade fenoloxidásica (FOx) pelo fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus*. Foram determinadas as melhores condições de cultivo para produção da atividade FOx em meio líquido. A adição de substratos polissacarídicos induziu altos teores de atividade, quando comparado com cultura contendo somente glicose. Farelo de trigo foi o melhor substrato, e em concentração de 1,5% (m/v) induziu níveis entre 1 a 2 UI/mL de atividade. O tipo e tamanho do inóculo afetaram significativamente a produção de atividade, porém a agitação e a oxigenação das culturas não tiveram efeitos significativos. Um pH inicial do meio de cultura entre 6 e 8 favoreceu a produção de atividade FOx.

Quando substratos polissacarídicos foram adicionados à cultura, diversas atividades enzimáticas relacionadas à degradação de lignina, em menor ou maior grau, foram detectadas: lacase, peroxidase, manganês-peroxidase, celobiose-quinona oxidoreductase e álcool veratrílico-oxidase. Nas mesmas condições não foi detectada atividade lignina-peroxidase.

Após estabelecer as melhores condições para produção de atividade FOx pelo *T.aurantiacus*, foram produzidos extratos com alta atividade para estudos de caracterização cinética. A atividade FOx presente no extrato bruto apresentou características semelhantes às fenoloxidasas do tipo lacase. O extrato bruto oxidou uma variedade de substratos típicos de fenoloxidasas, na ausência de H_2O_2 . As maiores atividades foram alcançadas com ácido 2,2'-azino-bis-(3 etil benzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), 2,6-dimetóxfenol (2,6-DMF) e o-dianisidina. Azida sódica e ácido tioglicólico foram os mais potentes inibidores da reação de oxidação catalizada pelo extrato bruto, ambos típicos inibidores de oxidasas que contêm metal. O pH ótimo da reação de oxidação de o-dianisidina foi de 2,8, porém a estabilidade neste pH foi rapidamente perdida após 5 horas de incubação. A temperatura ótima de reação foi observada entre 70 e 80°C, e a estabilidade térmica do extrato bruto foi extremamente elevada, conservando mais de 50% da atividade após 5 horas de incubação à 100°C. Todas as características apresentadas pelo extrato bruto foram semelhantes às da maioria das fenoloxidasas de tipo lacase, exceto a elevada temperatura ótima e termoestabilidade, nunca descritas para fenoloxidasas de fungos mesófilos ou termófilos.

Na intenção de desvendar a natureza responsável pela atividade FOx, procedeu-se à purificação de uma fração contendo tal atividade, a partir das culturas de *T.aurantiacus*. O trabalho teve que ser redirecionado devido ao inesperado resultado desta etapa, uma vez que a fração com atividade FOx atravessou uma membrana de ultrafiltração de 1,0 kDa e eluiu de uma coluna de Sephadex G-10 em um volume correspondente a uma massa molecular ≤ 700 Da. Este resultado, junto com a elevada estabilidade térmica, descartou a possibilidade da existência de uma lacase ou alguma outra enzima, como responsável pela atividade FOx.

A fração com alta atividade FOx (fração FOx), parcialmente purificada por Sephadex G-10, foi caracterizada quanto às propriedades cinéticas e estruturais. As propriedades de pH e temperatura ótimos de atividade e estabilidade, foram semelhantes às do extrato bruto. A fração FOx oxidou os mesmos substratos que o extrato bruto, porém com maiores velocidades. Somente o efeito de inibidores foi diferente, observando-se uma diminuição do efeito inibitório em relação ao extrato bruto.

A suspeita da presença de um sideróforo (complexante de Fe de baixa massa molecular), responsável pela atividade FOx, presente no extrato bruto e na fração, levou à procura destes compostos nas culturas de *T.aurantiacus*, utilizando o reagente universal Chromo azurol S (CAS). Através deste método foi possível confirmar a produção de sideróforos pelo fungo, em meio sólido e líquido, sendo que em meio líquido a máxima produção de atividade FOx coincidiu com uma mínima reação CAS. Porém, apesar dos resultados positivos em meio de cultura, a fração FOx não reagiu com CAS.

A caracterização estrutural da fração FOx revelou uma estrutura tipo hidroxamato com uma massa molecular aproximada de 530 Da, aparentemente sem aminoácidos, e com alguns metais (Ca, Mg, Fe) participando desta estrutura.

Todos os resultados de caracterização estrutural sugeriram que o composto responsável pela atividade FOx, era um sideróforo pertencente à classe dos hidroxamatos. Estes resultados e outros preliminares, sugerem um mecanismo de ação para a fração FOx, onde o Fe presente na fração seria o responsável pelo potencial de oxidação de diversos substratos. Resultados preliminares indicam também que o Fe participante na reação de oxidação de o-dianisidina é Fe (II). Assim, parece que a fração FOx complexa Fe (III) e, posteriormente, quando necessário esse Fe (III) seria reduzido para Fe (II) pela própria fração.

Visando a aplicação biotecnológica dos extratos com alta atividade FOx de *T.aurantiacus*, estes foram utilizados no tratamento de uma polpa Kraft de **Eucalipto** e de um efluente, resultante do processo Kraft. Os extratos ativos mostraram-se eficientes no tratamento das polpas, obtendo-se 39% de deslignificação após 60 minutos à 50°C e pH 3,0, porém nestas condições uma redução da viscosidade foi observada. A adição de ABTS, como um mediador redox, não aumentou a eficiência de deslignificação observada na sua ausência. Os efluentes, após 72 horas de tratamento com o extrato ativo de *T.aurantiacus*, à 25°C e pH 4,0, apresentaram 60 a 70% de redução de fenóis, dependendo das condições de incubação. Sob condições estacionárias, obteve-se 67% de despolimerização e 5% de mineralização das cloroligninas de elevada massa molecular. Ao mesmo tempo, sob condições agitadas obteve-se 47% de mineralização. A redução da cor variou de 61 a 35%, sob condições agitadas ou estacionárias, respectivamente.

SUMMARY

This work involves the phenoloxidase activity (POx) production by the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. The best conditions for POx activity production in liquid culture were determined. The addition of lignocellulosic and polysaccharides substrates to culture induced high level POx activity. The best substrate was the wheat bran which induced between 1-2 UI/mL, when utilized in concentration of 1.5% (w/v). The type and size of inoculum influenced the activity production, however the agitation and oxygenation of cultures did not affect it significantly. The initial pH between 6-8 supported the higher POx activity production.

Different enzymatic activities related to lignin degradation such as laccase, peroxidase, Mn-peroxidase, cellobiose-quinone oxidoreductase and veratryl alcohol oxidase, but no lignin-peroxidase, were detected in the cultures containing polysaccharides substrates.

After the best conditions to POx activity production by *T.aurantiacus* were established, crude extracts with high POx activity were utilized in the kinetic characterization. The POx activity showed similar characteristics to phenoloxidases laccase type. The crude extracts oxidized various typical substrates of phenoloxidases, in the absence of H₂O₂. The higher activities were produced with ABTS, 2,6-DMP and o-dianisidine. Typical inhibitors of oxidases containing metal, such as sodic azide and thioglycolic acid, were the most potent inhibitors of POx activity. The optimal pH for o-dianisidine oxidation was 2.8, but in this pH the stability was rapidly lost after 5 hours of incubation. The optimal temperature was found between 70 and 80°C, and the crude extract showed an high thermostability, keeping more than 50% of activity after 5 hours of incubation at 100°C. All the characteristics of the crude extract were similar to phenoloxidases laccase type, except the high optimal temperature and thermostability, never report for phenoloxidases of mesophilic and thermophilic fungi.

To elucidate the responsible nature for POx activity, the purification of an active fraction from *T.aurantiacus* was conducted. The unexpected results of the purification stage redirected this study. Because of that fraction with POx activity crossed over a 1 kDa ultrafiltration membrane, eluted from Sephadex G-10 column in a elution volume corresponding with molecular mass of ≤ 700 Da, as well as presented high thermostability. The possibility of a laccase or some other enzyme to be responsible by POx activity was excluded.

The kinetic and structural properties of the fraction partially purified by Sephadex G-10 with high POx activity, were studied. The properties of optimum pH and temperature for activity and stability were similar to those of the crude extract. The POx fraction oxidized the same substrates than the crude extract, but with higher rates. Unlike of the crude extract a decrease of inhibition was observed with POx fraction.

The presence of a siderophore type compound (low-molecular mass Fe chelators) responsible by POx activity in the crude extracts as well in the partially purified fraction was then considered, and led to search for these compounds in the *T.aurantiacus* cultures, using the universal CAS reactive. Through this method the siderophore production by the fungus, in solid and liquid medium, was confirmed. The maximum production of POx activity in liquid medium coincided with a minimum CAS reaction. However, in spite of the positive results in culture medium, the POx fraction partially purified was not reactive with CAS.

The structural characterization of partially purified POx fraction revealed a structure hydroxamate type with approximate molecular mass of 530 Da, apparently lacking aminoacids, and some metals (Ca, Mg, Fe) present in the structure.

Thus, the existence of a siderophore hydroxamate type, responsible by POx activity, was suggested through of structural characterization. With these results an mechanism of substrate oxidation by POx fraction was proposed, in which Fe would be responsible by the oxidation of different substrates. Preliminary results showed that Fe is involved in the o-dianisidina oxidation as Fe(II). Apparently, the fraction possessed the ability to both chelate Fe(III) and reduce it to Fe(II), when necessary.

The extracts with high POx activity from *T.aurantiacus* were used in biotechnological processes such as treatment of **Eucalyptus** Kraft pulps and effluent result of Kraft process. The active extracts showed efficiency on pulp biobleaching, with a 39% deslignification after 60 minutes at 50°C and pH 3, however a viscosity reduction also was observed. The ABTS addition, as a redox mediator, it not increase the deslignification. After 72 hours of treatment with active extracts at 25°C and pH 4, the effluents showed between 60-70% phenol reduction, depending of incubation conditions. Under static conditions a 67% despolimerization and a 5% mineralization of chlorolignins high-molecular mass were observed. Under agitation conditions a 47% mineralization was observed. A colour reduction effluent of 61 or 35% was obtained under agitation or static conditions, respectively.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	PÁGINA
1 Representação Esquemática de uma Lignina de Madeira Mole	3
2 Estrutura da Parede da Célula Vegetal	4
3 Representação de uma Reação Típica Catalisada por uma Lacase	9
4 Ciclo Catalítico da Lignina Peroxidase	11
5 Ciclo Catalítico da Manganês-Peroxidase	13
6 Esquema Hipotético das Vias Integradas do Metabolismo de um Substrato Lignocelulósico como Madeira por um Fungo de Decomposição Branca	15
7 Distribuição das Enzimas Lignocelulolíticas e de Agentes de Baixa Massa Molecular na Madeira durante a Degradação da Matriz Lignocelulósica	17
8 Estrutura de Sideróforos Representativos do Grupo dos Hidroxamato	20
9 Mecanismo Proposto para a Degradação de Madeira pelo Fungo de Decomposição Parda <i>G.trabeum</i>	22
10 Mecanismo Proposto para a Formação de Espécies Radicais dentro do Lúmen da Célula Vegetal por Glicopeptídeos	23
11 Cinética de Produção de Atividade FOx por <i>T.aurantiacus</i> em Cultura contendo Serragem	48
12 Variação do pH durante a Cultivo de <i>T.aurantiacus</i>	49
13 Efeito da Quantidade de Serragem sobre a Produção de Atividade FOx por <i>T.aurantiacus</i>	50
14 Cinética de Produção de Atividade FOx por <i>T.aurantiacus</i> em Cultura contendo Farelo de Trigo	51
15 Efeito da Concentração de Farelo de Trigo na Produção de Atividade FOx por <i>T.aurantiacus</i>	52
16 Efeito da Concentração de Glicose na Produção de Atividade FOx por <i>T.aurantiacus</i>	53
17 Efeito da Concentração de Glicose como Co-Substrato na Produção de Atividade FOx	55
18 Efeito de p-anisidina na Produção de Atividade FOx por <i>T.aurantiacus</i>	57
19 Efeito da Agitação das Culturas na Produção de Atividade FOx por <i>T.aurantiacus</i>	60
20 Efeito da Oxigenação das Culturas na Produção de Atividade FOx por <i>T.aurantiacus</i>	61
21 Efeito do pH do Meio de Cultura na Produção de Atividade FOx por <i>T.aurantiacus</i>	62
22 Efeito da Concentração do Extrato Bruto de <i>T.aurantiacus</i> na Atividade FOx	65
23 Efeito do pH e do Tampão na Atividade FOx de <i>T.aurantiacus</i>	66
24 Efeito do pH na Estabilidade do Extrato com Atividade FOx de <i>T.aurantiacus</i>	67
25 Efeito da Temperatura de Reação na Atividade FOx de <i>T.aurantiacus</i>	68
26 Efeito da Temperatura na Estabilidade do Extrato com Atividade Fox de <i>T.aurantiacus</i>	69
27 Efeito da Concentração de Substrato na Velocidade de Reação	71
28 Cromatografia em Sephadex G-25 das Frações obtidas após Ultrafiltração do Caldo Extracelular de <i>T.aurantiacus</i>	76
29 Cromatografia em Sephadex G-10 da Fração IV (Filtrado obtido através da Membrana de corte 1kDa)	77

31 Cromatografia em Sephadex G-10 de Diferentes Caldos de Cultura de <i>T.aurantiacus</i>	81
32 Produção de Sideróforos e de Atividade FOx pelo <i>T.aurantiacus</i> em Cultura contendo 1,0% de Glicose	84
33 Produção de Sideróforos e de Atividade FOx pelo <i>T.aurantiacus</i> em Cultura contendo 1,5% de Farelo de Trigo	85
34 Determinação da Massa Molecular da Fração com Atividade FOx Parcialmente Purificada por Filtração em Sephadex G-10	92
35 Espectros de Absorbância UV/Vis da Fração com Atividade FOx Parcialmente Purificada	95
36 HPLC da Fração com Atividade FOx, Parcialmente Purificada por Sephadex G-10	97
37 Cinética da Reação de Oxidação de o-Dianisidina pela Fração FOx de <i>T.aurantiacus</i> em Meio Ácido	100
38 Formação do Complexo o-Fenantrolina- Fe (II), após Pré-Incubação da Fração FOx com Fe (III)	103
39 Propriedades de uma Polpa Kraft de Eucalipto tratada com o Extrato Ativo de <i>T.aurantiacus</i>	105
40 Propriedades de uma Polpa Kraft de Eucalipto tratada com o Extrato Ativo de <i>T.aurantiacus</i> , seguida de uma Extração Alcalina	106
41 Propriedades de uma Polpa Kraft de Eucalipto tratada com o Extrato Ativo de <i>T.aurantiacus</i> na Presença e Ausência de ABTS, em pH 3,0	108
42 Propriedades de uma Polpa Kraft de Eucalipto tratada com o Extrato Ativo de <i>T.aurantiacus</i> na Presença e Ausência de ABTS, em pH 5,0	109
43 Distribuição de Massa Molecular em Sephadex G-50 das Cloroligninas contidas em um Efluente do tipo E1	112
1A Espectro de Infra-Vermelho da Fração com Atividade FOx de <i>T.aurantiacus</i>	142
2A Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C da Fração com Atividade FOx	143
3A Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H da Fração com Atividade FOx	144
4A Espectro de Massas da Fração com Atividade FOx	145
5A Espectro de Emissão obtido por Espectrografia de Rede Plana da Fração com Atividade FOx	145

LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
1 Efeito de Diferentes Substratos Lignocelulósicos na Produção de Atividade Ligninolítica por <i>T.aurantiacus</i>	47
2 Efeito da Concentração de Glicose na Produção de Atividade FOx, Proteína Extracelular e Crescimento de <i>T.aurantiacus</i>	54
3 Efeito da p-Anisidina no Crescimento e na Produção de Atividade FOx por <i>T.aurantiacus</i>	56
4 Efeito do Tipo e Tamanho do Inóculo na Produção de Atividade FOx por <i>T.aurantiacus</i>	59
5 Atividade FOx tipo Lacase e/ou Peroxidase Presente no Extrato Bruto de <i>T.aurantiacus</i>	64
6 Especificidade pelo Substrato da Atividade FOx presente no Extrato Bruto de <i>T.aurantiacus</i>	70
7 Efeito de Diferentes Substâncias na Atividade FOx presente no Extrato Bruto de <i>T.aurantiacus</i>	72
8 Remoção da Cor do Extrato Bruto de <i>T.aurantiacus</i> com DEAE-celulose e PVP	74
9 Atividade FOx nas Diferentes Frações Obtidas após Concentração por Ultrafiltração com Membranas de Corte 10 e 1 kDa	75
10 Etapas na Purificação da Atividade FOx a partir do Caldo de Cultura de <i>T.aurantiacus</i>	78
11 Propriedades Cinéticas da Fração com Atividade FOx Parcialmente Purificada de <i>T.aurantiacus</i>	88
12 Especificidade pelo Substrato da Atividade FOx Presente na Fração Parcialmente Purificada e no Extrato Bruto de <i>T.aurantiacus</i>	89
13 Efeito de Diferentes Compostos sobre a Atividade FOx Presente na Fração Parcialmente Purificada e no Extrato Bruto	90
14 Dosagem de Proteína na Fração Parcialmente Purificada através de Diferentes Métodos	93
15 Atribuição de Bandas do Espectro de IV da Fração Parcialmente Purificada	96
16 Sinais Observados nos Espectros de RMN- ¹ H e ¹³ C da Fração Parcialmente Purificada	96
17 Detecção de Metais na Fração Parcialmente Purificada	99
18 Efeito de Compostos Sobre a Velocidade de Oxidação de o-Dianisidina pela Fração FOx de <i>T.aurantiacus</i>	101
19 Eficiência de Deslignificação e Seletividade após Tratamento com o Extrato Ativo de <i>T.aurantiacus</i>	106
20 Resultados do Tratamento de Polpa Kraft de Eucalipto com o Extrato Ativo de <i>T.aurantiacus</i>	107
21 Propriedades da Polpa Kraft de Eucalipto após Tratamento com o Extrato Ativo de <i>T.aurantiacus</i> em pH 5,0	107
22 Propriedades da Polpa Kraft de Eucalipto após Tratamento com o Extrato Ativo	

de <i>T.aurantiacus</i> na Presença de ABTS	109
23 Características do Efluente E1 após Tratamento com a Fração Ativa de <i>T.aurantiacus</i>	112
1A Fator f para Corrigir Diferentes Porcentagens do Consumo de Permanganato	141
2A Fator para Correção da Temperatura	141

1.- INTRODUÇÃO

O esgotamento progressivo das fontes de energia tradicionais junto com a acelerada elevação de seus custos, foram os responsáveis pelo grande interesse voltado nos últimos anos à procura de fontes alternativas de energia. Por outro lado, a crescente preocupação com os problemas de contaminação ambiental, aumentam o interesse pela utilização de fontes energéticas menos agressivas para os ecossistemas. Desta forma, a obtenção de energia a partir de materiais lignocelulósicos, constituintes principais da biomassa terrestre, parece reunir essas características. Sob este ponto de vista, o Brasil representa um dos países com maior potencial em fontes energéticas alternativas e praticamente inesgotáveis, devido à abundância de biomassa na forma de materiais lignocelulósicos (madeira e resíduos agro-industriais em geral).

Dentre os materiais lignocelulósicos, a madeira representa a mais importante fonte renovável para obtenção de energia e variados produtos de interesse industrial. A utilização e/ou conversão de madeira através de sistemas biológicos, resulta em um processo potencialmente promissor e de mínima agressividade ambiental. Porém, a eficácia dos processos biotecnológicos aplicados à utilização de madeira, depende principalmente da compreensão dos mecanismos de degradação e/ou transformação de lignina, que é um dos polímeros mais complexos dentro da matriz lignocelulósica da parede da célula vegetal. Devido a sua complexidade estrutural, a lignina é altamente recalcitrante à ação de microrganismos e seus sistemas enzimáticos, e sua presença na matriz lignocelulósica dificulta a utilização microbiana dos polissacarídeos celulose e hemicelulose. Um grupo de microrganismos de especial interesse biotecnológico é o dos fungos que degradam madeira, principalmente aqueles que atuam seletivamente sobre a lignina. Devido a sua capacidade ligninolítica, estes fungos possuem um elevado potencial para serem utilizados em processos como biopolpação de madeira, deslignificação de polpas celulósicas, tratamento de efluentes e bioremediação de solos, entre outros.

Embora grandes avanços à respeito dos mecanismos de degradação dos componentes da madeira tenham sido alcançados, inúmeras questões sobre a degradação de madeira *in vivo* ainda permanecem sem resposta. O isolamento, purificação e caracterização das enzimas fúngicas que participam da degradação e/ou transformação de ligninas sintéticas ou de compostos modelo de lignina, contribuem para a compreensão de alguns mecanismos, porém não conseguem explicar o processo de degradação como um todo. Atualmente, há uma crescente necessidade pela procura de novas espécies fúngicas ou sistemas enzimáticos ou não enzimáticos, de natureza ligninolítica, que permitam aumentar o conhecimento acumulado à respeito da degradação de madeira.

Foi dentro deste contexto que os objetivos do presente trabalho centraram-se no estudo do sistema ligninolítico do fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus*, nunca antes descrito na literatura para esta espécie fúngica. Uma fração, responsável pela alta atividade FOx observada em cultura líquida e induzida com farelo de trigo, foi parcialmente purificada e posteriormente caracterizada. Através da caracterização cinética e estrutural, algumas hipóteses mecanísticas são propostas. Além disto, o potencial biotecnológico dos extratos ativos de *T.aurantiacus* aplicados à deslignificação de polpas Kraft e ao tratamento de efluentes industriais, foi avaliado.

2.- REVISÃO DA LITERATURA

2.1.- MADEIRA : COMPONENTES ESTRUTURAIS E BIODEGRADAÇÃO

2.1.1.- Componentes Estruturais

A madeira é uma das fontes mais abundantes de fibra vegetal na superfície terrestre e constitui uma das principais fontes de matéria-prima para fabricação de pastas celulósicas e papel.

A madeira é um copolímero constituído principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, com pequenas quantidades de substâncias extratáveis e minerais. A celulose, um polímero linear formado por subunidades de glicose, representa o maior componente em massa seca da madeira, constituindo 30 a 40% da parede celular dos tecidos lenhosos. Na parede da célula vegetal, a celulose forma lâminas nas quais as microfibrilas estão paralelamente organizadas e encaixadas numa matriz de hemicelulose e lignina (BÉGUIN e AUBERT, 1994). As hemiceluloses, heteropolímeros altamente ramificados, constituem 20 a 30% da madeira, e são representadas principalmente por xilanas e glucomanas (JEFFRIES, 1990; COUGHLAN e HAZLEWOOD, 1993). A lignina, que age como um agente permanente de ligação entre as células conferindo rigidez à estrutura da parede da célula vegetal, constitui 20 a 35% da madeira. Na parede celular a lignina está associada à hemicelulose através de interações físicas e ligações covalentes formando uma matriz ou complexo polissacarídeo-lignina (FENGEL e WEGENER, 1984).

As substâncias extratáveis cumprem funções fundamentais de proteção e são as responsáveis por certas características do aspecto da madeira, como cor e cheiro, e da resistência ao ataque por microrganismos. Estas substâncias podem ser extraídas da madeira sem alterar a estrutura da parede celular (GRAY e PARHMAN, 1982; D'ALMEIDA, 1988).

O teor, a proporção e às vezes a composição química dos diferentes componentes da madeira variam segundo a espécie. As madeiras podem ser classificadas, segundo o tipo de fibra vegetal, em dois grandes grupos, as madeiras duras ou "hardwood" e as madeiras moles ou "softwood". As madeiras duras são provenientes de árvores do grupo das folhosas (eucaliptos, bétula, nogueira, etc.) e as moles de árvores do grupo das coníferas (pinus, cedro, cipreste, etc.) (FENGEL e WEGENER, 1984).

A lignina é uma macromolécula altamente complexa e ramificada, gerada através de uma polimerização desidrogenativa iniciada enzimaticamente, a partir de álcoois hidroxí-cinâmicos (p-cumarílico, coniferílico e sinapílico). A copolimerização radicalar destes álcoois produz uma macromolécula heterogênea com diferentes tipos de ligações entre as unidades que constituem a estrutura, de elevada massa molecular, opticamente inativa e altamente polidispersa. Os núcleos aromáticos ou subunidades fenilpropano que constituem a lignina, estão associados por ligações estáveis, principalmente do tipo β -O-4 aril-éter, α -O-4 aril-éter e β -5 aril-carbono. O tipo e as proporções relativas dos álcoois precursores presentes na lignina variam de acordo com a espécie de madeira (duras ou moles) (HIGUCHI, 1990 e 1993). Na Figura 1 está indicada uma representação esquemática de lignina e de seus álcoois precursores.

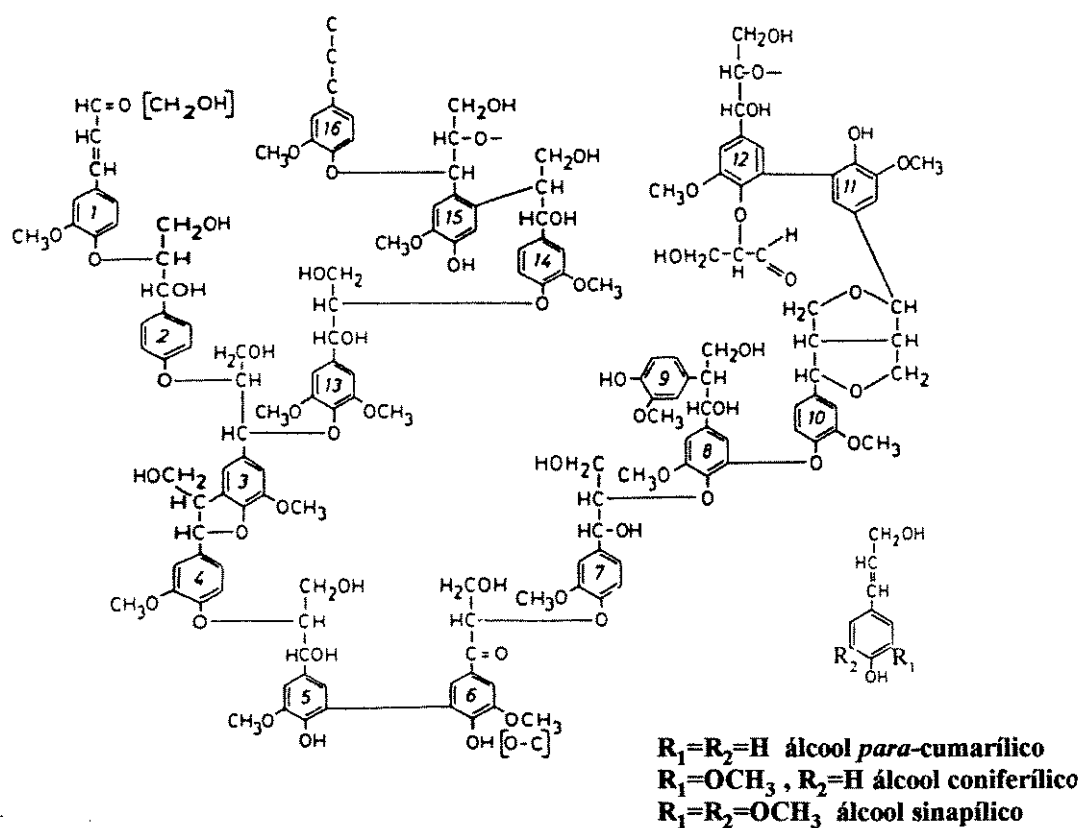


FIGURA 1: Representação Esquemática de uma Lignina de Madeira Mole ("softwood"), de acordo com ADLER (1977). Os álcoois precursoros também são representados nesta figura (direita).

Na parede da célula vegetal os componentes estruturais principais, celulose, hemicelulose e lignina, organizam-se em proporções variadas dependendo da espécie de madeira. Desde a porção mais externa da parede celular até o lúmen da célula encontram-se uma camada fina ou lamela média (LM), a parede primária (P) e a parede secundária com suas camadas S₁, S₂ e S₃ (ou T). A maior concentração de celulose é observada na camada S₂ e, organizada em microfibrilas, é rodeada de hemicelulose. A lignina distribui-se através da parede celular, porém concentra-se na lamela média (LM) (<40% lignina total), e nas diferentes camadas da parede secundária (70-80%). A hemicelulose dispõe-se em uma matriz com a lignina, através da formação de ligações covalentes do tipo éter e ester, e esta matriz cerca as microfibrilas de celulose (Figura 2) (FENGEL e WEGENER, 1984).

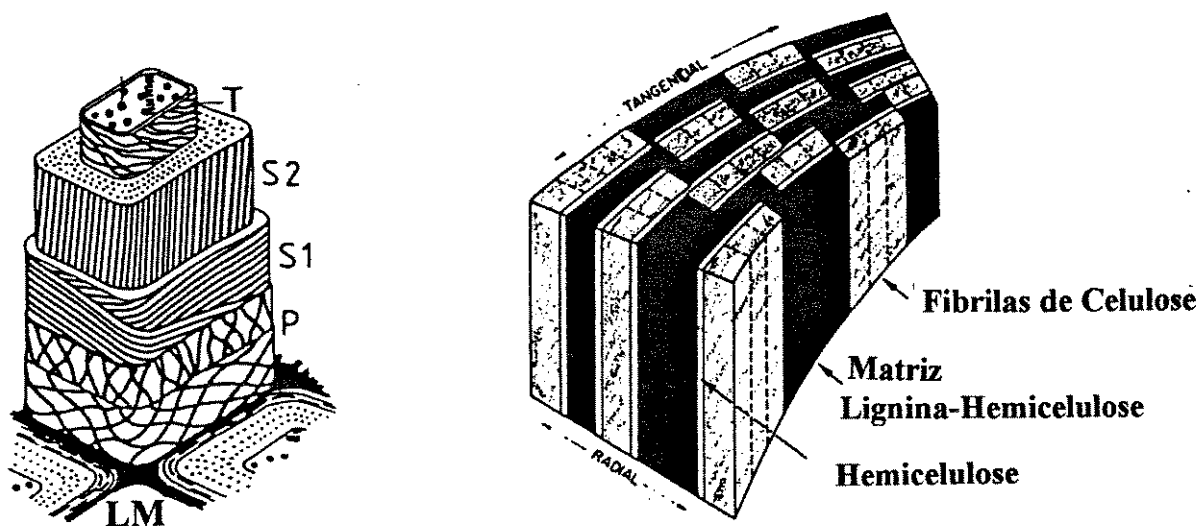


FIGURA 2: Estrutura da Parede da Célula Vegetal mostrando as diferentes camadas (esquerda) e a distribuição dos diferentes componentes dentro da parede (direita). LM: lamela média; P: parede primária; S: parede secundária com suas camadas S₁, S₂ e T.

2.1.2.- Biodegradação de Madeira

A madeira pode ser atacada na natureza por uma variedade de organismos entre os quais sobressaem-se fungos e bactérias. A degradação de madeira por bactérias é um processo limitado devido em parte à falta de movimentação destas sobre ou dentro da célula vegetal, e devido também que grande parte das enzimas produzidas por estas é intracelular, o que restringe o processo de degradação dos componentes macromoleculares da parede celular (FENGEL e WEGENER, 1984; ERIKSSON, 1990; SCHMIDT e LIESE, 1994).

Ao contrário das bactérias, os fungos possuem como principal característica a capacidade de colonização e penetração rápida e eficiente na madeira devido à organização de

suas hifas. As hifas são filamentos celulares que ao se agruparem constituem o micélio fúngico, e no caso dos fungos que degradam efetivamente a madeira, atravessam a parede celular podendo alcançar o lúmen, onde através da secreção de enzimas e/ou alguns outros compostos de baixa massa molecular começa o processo de decomposição dos componentes da parede da célula vegetal. Diferentes tipos de fungos darão origem a diferentes tipos de decomposição da madeira (ERIKSSON, 1981; FENGEL e WEGENER, 1984). De acordo com a morfologia da decomposição provocada na madeira, os fungos podem se dividir em três grandes grupos: fungos de decomposição branca ou "white rot-fungi", eficientes degradadores de lignina; fungos de decomposição parda ou "brown rot-fungi" e fungos de decomposição branda ou "soft rot-fungi", que degradam preferencialmente os polissacarídeos da madeira (ERIKSSON, 1981; BLANCHETTE, 1991).

Grande parte dos fungos de **decomposição branca** pertence à classe dos Basidiomicetos, porém existem alguns pertencentes à classe dos Ascomicetos, e são os mais eficientes degradadores de lignina, podendo mineralizar a macromolécula até CO_2 e H_2O . Dentro deste grupo devem se diferenciar os fungos que degradam polissacarídeos e lignina com igual eficiência daqueles que degradam preferencialmente lignina (BLANCHETTE, 1991; BLANCHETTE *et alii.*, 1992). O fungo mais extensivamente estudado como representante deste grupo é o basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*, produtor de altos níveis de enzimas ligninolíticas e eficiente na degradação de lignina em madeira.

Os mecanismos de colonização, invasão do lúmen das células e secreção de enzimas que degradam a lignina e os polissacarídeos da madeira, são conhecidos em parte devido a estudos por microscopia eletrônica (DANIEL *et alii.*, 1989; BARRASA *et alii.*, 1992; DANIEL, 1994; SREBOTNIK e MESSNER, 1994). A degradação fúngica da parede da célula vegetal geralmente estende-se desde o lúmen da célula, atravessando as diferentes camadas da parede até alcançar a lamela média. Os estudos de microscopia eletrônica revelaram que o processo de decomposição da parede celular pode ocorrer sem o contato direto da hifa com a célula, sugerindo a participação de sistemas enzimáticos e/ou não-enzimáticos extracelulares, embora o mecanismo através do qual isto ocorre não é ainda bem compreendido. O transporte das enzimas lignocelulolíticas até o substrato (parede celular) pode estar relacionado com a camada de glucana que rodeia a hifa fúngica e cria um microambiente favorável às enzimas e à ocorrência de diferentes reações (EVANS *et alii.*, 1991; RUEL *et alii.*, 1994). Atualmente existe muita controvérsia se, devido ao seu tamanho, as enzimas lignocelulolíticas conseguem penetrar na parede da célula vegetal para agirem diretamente sobre os diferentes componentes, ou se a decomposição é iniciada por agentes não-enzimáticos de baixa massa molecular, que podem difundir facilmente através da parede (EVANS *et alii.*, 1991, 1994; JOSELEAU *et alii.*, 1994).

Os fungos de **decomposição parda** pertencem à classe dos Basidiomicetos e atuam principalmente sobre os polissacarídeos celulose e hemicelulose, sem degradação, porém com algumas modificações na lignina. Embora sem despolimerização de lignina, as modificações na macromolécula fazem com que fique mais susceptível a posteriores tratamentos químicos ou microbianos (FENGEL e WEGENER, 1984; JIN *et alii.*, 1990).

O mecanismo de modificação de lignina por estes fungos não é bem compreendido, uma vez que não secretam enzimas ligninolíticas. Porém, há evidências que indicam a produção de pequenos agentes capazes de difundir pelas camadas S_3 e S_2 , onde são observadas inicialmente as mudanças morfológicas. Entre tais agentes não-enzimáticos destacam-se os

sideróforos (compostos complexantes de Fe) (JELLISON *et alii.*, 1991), ácido oxálico (SHIMADA *et alii.*, 1994), glicopeptídeos (TANAKA *et alii.*, 1993; HIRANO *et alii.*, 1995) e radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$) (WOOD, 1994). Os radicais $\text{OH}\cdot$, provavelmente produzidos através da reação de Fenton, seriam os responsáveis pelas modificações observadas na lignina. Devido a seu enorme poder oxidativo os radicais $\text{OH}\cdot$ são capazes de despolimerizar celulose e atacar as unidades fenólicas e não-fenólicas de lignina (BACKA *et alii.*, 1992; WOOD, 1994).

Os fungos **de decomposição branda** pertencem à classe dos Ascomicetos e Deuteromicetos ou fungos Imperfeitos, e o termo utilizado para classificá-los deve-se ao fato deles produzirem um amolecimento nas camadas superficiais da parede da célula vegetal, formando cavidades típicas na camada S₂ (KIRK e FARRELL, 1987; BLANCHETTE, 1991).

Os fungos **de decomposição branda** degradam preferencialmente os polissacarídeos da madeira, porém, também podem provocar algumas pequenas transformações na lignina. Os estudos sobre a participação de sistemas enzimáticos ou não-enzimáticos na degradação de madeira por este grupo de fungos são escassos e não existem detalhes explicando o amolecimento característico observado na madeira. A presença destes fungos é mais comum em madeiras duras do que em moles, provavelmente pela diferença estrutural de ambas as ligninas (ERIKSSON, 1981; FENGEL e WEGENER, 1984).

2.1.3.- Fisiologia da Biodegradação de Madeira

A biodegradação de madeira na natureza envolve a ação simultânea de diversos microrganismos tais como fungos, bactérias e parasitas. A sequência de colonização e o desenvolvimento do processo de decomposição dependem da estrutura e composição química das diferentes madeiras. Isto constitui um dos principais fatores ecológicos que determinam o processo de biodegradação (LEVY, 1987; BLANCHETTE, 1991).

Enquanto os processos de degradação de celulose e hemicelulose são de natureza hidrolítica e ocorrem com relativa facilidade, a degradação de lignina representa um processo oxidativo complexo, não específico e estritamente dependente das condições do meio de cultura de um microrganismo. Estudos conduzidos com *P.chrysosporium* revelaram que diversos parâmetros do meio de cultura afetaram a degradação de lignina pelo fungo (KIRK e FARRELL, 1987; LINKO, 1992).

Durante a degradação de lignina na madeira os fungos precisam de uma fonte de carbono adicional, facilmente assimilável, devido à incapacidade de utilizar lignina como substrato de crescimento. A fonte de carbono adicional é também necessária para síntese das enzimas ligninolíticas e outros efetores como álcool veratrílico e H_2O_2 . Os fungos que participam no processo de degradação de madeira, embora sejam organismos aeróbicos estão adaptados a relativamente baixas tensões de oxigênio na madeira. A necessidade de um nível apropriado de oxigênio para a degradação de lignina na madeira varia muito entre as diferentes espécies de fungos que degradam madeira (HATAKKA e UUSI-RAUVA, 1983; BLANCHETTE, 1991; RÍOS e EYZAGUIRRE, 1992). Muitas vezes a agitação das culturas além de aumentar a oxigenação do meio, promove a formação de "pellets" que permanecem submersos, afetando com isto a produção enzimática e consequentemente a capacidade degradativa (KIRK e FARRELL, 1987).

O pH do meio de cultura também afeta a degradação da lignina na madeira. Dependendo da espécie de madeira o pH varia entre 4-6, que é consistente com o pH ótimo observado para o crescimento de diversos fungos ligninolíticos e com os pHs de estabilidade e atividade catalítica ótimas das enzimas ligninolíticas. Porém, o pH ótimo para mineralização da lignina varia grandemente de uma espécie fúngica para outra (BOYLE *et alii.*, 1992).

A madeira é um substrato relativamente pobre quanto ao conteúdo de nitrogênio, assim este nutriente desempenha um papel limitante para o crescimento e metabolismo fúngicos. A adição de nitrogênio em substratos lignocelulósicos como madeira, geralmente estimula a degradação e consumo de carboidratos, afetando a seletividade da deslignificação (KEYSER *et alii.*, 1978; KIRK e FARRELL, 1987; HATAKKA *et alii.*, 1987; BECHTOLD *et alii.*, 1993).

2.2.- BIODERGRADAÇÃO DE LIGNINA POR FUNGOS

2.2.1.- Sistemas Enzimáticos Fúngicos Relacionados à Degradação de Lignina

O processo de degradação de um substrato lignocelulósico como a madeira ocorre pela ação combinada de uma variedade de sistemas enzimáticos e alguns agentes não-enzimáticos de baixa massa molecular, recentemente descritos na literatura, produzidos extracelularmente por fungos. Através destes sistemas, os fungos degradam os componentes insolúveis da madeira, transformando-os em componentes menores e solúveis, os quais podem ser incorporados no metabolismo do microrganismo (FENGEL e WEGENER, 1984; ERIKSSON, 1990).

Dois sistemas enzimáticos maiores, mecanisticamente diferentes, participam da degradação dos componentes maiores da madeira por fungos, um é do tipo hidrolítico e o outro do tipo oxidativo. Enquanto as celulasas e hemicelulasas atuam provocando quebras nos polissacarídeos, as enzimas ligninolíticas degradam e às vezes mineralizam lignina. O mecanismo de ação das glicanoidrolases ocorre a nível de complexo enzima-substrato, enquanto que para as enzimas oxidativas ocorre via mediadores não-proteicos. Outra diferença entre ambos os sistemas enzimáticos é que, enquanto as glicanoidrolases possuem uma estreita faixa de especificidade pelo substrato, as enzimas ligninolíticas apresentam uma ampla faixa de especificidade (JOSELEAU *et alii.*, 1994). Progressos recentes na identificação bioquímica das enzimas secretadas por fungos que decompõem madeira, indicam que existe alguma correlação entre a natureza das enzimas secretadas e o tipo de degradação observada na madeira (RUEL *et alii.*, 1994).

A complexidade estrutural da lignina requer a presença de um sistema altamente diversificado de enzimas ligninolíticas, enzimas produtoras de H₂O₂ e enzimas de natureza redutora. O papel de cada enzima atuando individualmente é irrelevante no processo global de degradação de lignina, portanto a biodegradação deriva de uma combinação de processos de óxido-redução.

2.2.1.1.- Enzimas Ligninolíticas

Grande parte dos estudos bioquímicos sobre a degradação de lignina *in vitro* utiliza como sistema modelo o fungo de decomposição branca *P. chrysosporium*. Porém, embora este fungo produza lignina-peroxidase e peroxidase dependente de manganês, ele não produz fenoloxidasas do tipo lacase, resultando em um modelo incompleto, o que impede esclarecer o papel desempenhado por esta última enzima no processo de ligninólise.

O conhecimento à respeito do mecanismo de degradação de lignina deriva, principalmente, da utilização de enzimas purificadas atuando sobre compostos modelo de lignina ou derivados sintéticos de lignina *in vitro*. Assim, a extrapolação dos resultados obtidos nessas condições à ação das enzimas sobre a lignina *in vivo*, é motivo de controvérsia (LEWIS e YAMAMOTO, 1990; EVANS *et alii.*, 1994).

i) Lacases (Benzenediol:oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2)

A lacase é uma polifenoloxidase produzida por diversos fungos, plantas e bactérias (GIVAUDAN *et alii.*, 1993; THURSTON, 1994; FAURE *et alii.*, 1995). A enzima é uma glicoproteína, que contém cobre no seu sítio ativo e cataliza a redução de O₂ para água, com simultânea oxidação de substratos fenólicos. Em geral, as lacases contém 4 átomos de cobre por molécula de enzima, embora existam enzimas com 2, 3 ou 6 átomos de cobre (THURSTON, 1994; AGOSTINELLI *et alii.*, 1995).

As lacases são produzidas pela maioria dos fungos basidiomicetos de decomposição branca, tais como *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pleurotus sp.*, etc., exceto pelo eficiente representante deste grupo, o *P. chrysosporium*. Diversos ascomicetos e alguns deuteromicetos, como *Trichoderma sp.*, também produzem lacases (BOLLAG e LEONOWICZ, 1984; ASSAVANIG *et alii.*, 1992).

A produção de lacases depende das condições da cultura de um microrganismo, e podem ser produzidas em forma constitutiva ou induzida, extra ou intracelularmente, sendo que as formas induzidas em geral possuem maior atividade (RIGLING e VAN ALFEN, 1993; FUKUSHIMA e KIRK, 1995; SLOMCZYNSKI *et alii.*, 1995; BUSWELL *et alii.*, 1995).

A especificidade pelos substratos, varia dependendo da origem da lacase, assim, lacases de diferentes fungos oxidam diferentes substratos, com diferentes velocidades de reação. Através da preferência pelo substrato é difícil diferenciar entre as lacases e as tirosinases (monofenol monooxigenases), pertencentes também ao grupo das fenoloxidasas cúpricas. Entre os substratos doadores de elétrons para lacases encontram-se polifenóis, fenóis metoxi-substituídos (mono e di-), diaminas e uma série de outros substratos, porém tirosina, substrato de tirosinase, não é oxidada por estas enzimas (REINHAMMAR, 1984; THURSTON, 1994).

A catálise de substratos fenólicos e compostos modelo de lignina por lacase ocorre via transferência de um elétron, e conduz à geração de radicais fenoxila (REINHAMMAR, 1984; HIGUCHI, 1990, 1993). Os radicais assim formados podem ser convertidos em quinonas através de uma segunda etapa catalizada pela enzima ou através de reações não-enzimáticas espontâneas de desproporcionamento. As quinonas e os radicais livres geram produtos amorfos insolúveis através de reações de polimerização (Figura 3) (ISHIHARA, 1980; REINHAMMAR, 1984; THURSTON, 1994). O pH ótimo da reação de oxidação por lacases varia grandemente e depende do substrato em estudo e da origem da enzima. Existem muitas

oxidativas. A lacase atua reduzindo a toxicidade através de reações de polimerização, evitando a chegada destas espécies à hifa fúngica (BOLLAG *et alii.*, 1988; BOLLAG, 1992; THURSTON, 1994).

KAWAI e colaboradores (1988 a,b) mostraram que lacases catalizam a quebra de cadeias laterais C α -C β e a abertura de anéis aromáticos de compostos modelo de lignina, confirmando com isto a capacidade de degradação e despolimerização da lignina. Em presença de ABTS a lacase é também capaz de desmetilar e deslignificar polpa Kraft de madeiras duras (BOURBONNAIS e PAICE, 1992). Embora a lacase possa degradar clorofenóis (ROY-ARCAND e ARCHIBALD, 1991; BOLLAG, 1992), geralmente produz repolimerização de ligninas macromoleculares como lignosulfonatos (LEONOWICZ *et alii.*, 1985). A lacase de *T.versicolor* é capaz de produzir Mn (III) a partir de Mn (II) e um substrato fenólico, lembrando desta forma a atividade catalítica de peroxidase dependente de manganês (ARCHIBALD e ROY, 1992).

ii) Lignina-peroxidase (LiP; EC 1.11.1.7)

Em 1983, dois grupos de pesquisadores, trabalhando em forma independente, isolaram uma peroxidase extracelular de *P.chrysosporium*, que degradava lignina de madeira até produtos de baixa massa molecular, e que oxidava álcool veratrílico para aldeído veratrílico (TIEN e KIRK, 1983; GLENN *et alii.*, 1983). Esta enzima é uma glicoproteína que contém Fe protoporfirínico IX como grupo prostético; é dependente de H₂O₂ para sua atividade e seu ciclo catalítico é o mesmo da peroxidase de raiz forte (HRP). A maioria dos estudos sobre produção, regulação a nível molecular, purificação, caracterização cinética, e mecanismos de ação de LiP tem sido feita com *P.chrysosporium*. Múltiplas isoenzimas já foram isoladas desse fungo, sendo que sua produção é regulada geneticamente em condições limitantes de nitrogênio e carbono (LINKO, 1992; REDDY e D'SOUZA, 1994). A produção de LiP por *P.chrysosporium* ocorre durante o metabolismo secundário, em resposta a ambientes pobres em nitrogênio e carbono. Sob condições de excesso destes dois nutrientes ocorre uma completa repressão na síntese de LiP e MnP (REDDY, 1993).

A LiP é produzida por grande parte dos fungos de decomposição branca tais como: *P.radiata*, *Phlebia tremellosa*, *T.versicolor* e *Bjerkandera adusta*. DEY e colaboradores (1994) relataram a presença desta enzima no fungo de decomposição parda *Polyporus ostreiformis*. A LiP também foi detectada e purificada a partir de culturas do ascomiceto *Chrysonilia sitophila* (DURÁN *et alii.*, 1987; FERRER *et alii.*, 1992). Este fungo mostrou-se bastante eficiente na degradação de madeira mole, lignosulfonatos e compostos modelos de lignina (FERRAZ *et alii.*, 1991; RODRÍGUEZ e DURÁN, 1991; NOGUEIRA *et alii.*, 1992).

Durante o ciclo catalítico o Fe contido no grupamento heme da LiP passa por 5 estados de óxido-redução. O primeiro passo compreende a oxidação do Fe (III) da enzima nativa para Fe (IV), pela ação do H₂O₂, gerando o composto I, tipo radical catiônico da LiP. Através da redução do composto I, via transferência de um elétron, é formado o composto II, que ainda contém Fe (IV). O agente redutor pode ser um substrato como o álcool veratrílico ou o H₂O₂. Finalmente, uma etapa de redução via um elétron retorna a enzima a seu estado nativo, completando o ciclo catalítico. Na ausência do substrato redutor o composto II é oxidado pelo H₂O₂ para o composto III, uma forma da LiP com limitada capacidade catalítica, que na

presença de excesso de H_2O_2 é rapidamente inativado (Figura 4) (SCHOEMAKER *et alii.*, 1994; BARR e AUST, 1994; DE JONG *et alii.*, 1994; CAI e TIEN, 1993).

A LiP na presença de H_2O_2 cataliza a oxidação, via um elétron, de uma variedade de compostos aromáticos relacionados com lignina (fenólicos e não-fenólicos), resultando na formação de radicais catiônicos arila. Posteriormente, através de uma série de reações não-enzimáticas os radicais dão origem a uma variedade de produtos finais (HIGUCHI, 1990; REDDY e D'SOUZA, 1994). Entre as reações catalisadas através deste mecanismo estão a oxidação de álcoois benzílicos, quebra da ligação $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$, oxidação do C_α hidroxílico para carbonila, abertura de anéis aromáticos, acoplamento radicalar de compostos fenólicos, etc. (HIGUCHI, 1990, 1993). VAZQUEZ-DUHALT e colaboradores (1995) demonstraram que após uma modificação química da LiP, esta é capaz de catalizar a oxidação de compostos nitrogenados, do tipo pirrolina, em solvente orgânico.

Diferentemente de outras peroxidases (MnP e HRP) e lacases, LiP é a única enzima com capacidade de oxidar compostos não-fenólicos metoxilados de alto potencial redox ($E_{1/2} \geq 1,5$ V), mostrando com isto que a forma cataliticamente ativa da enzima possui um potencial redox extremamente alto (KERSTEN *et alii.*, 1990; CAI e TIEN, 1993). A LiP catalisa reações oxidativas em meios fortemente ácidos (pH 2-3), sem variações muito grandes entre as enzimas de diferentes fungos (CAI e TIEN, 1993).

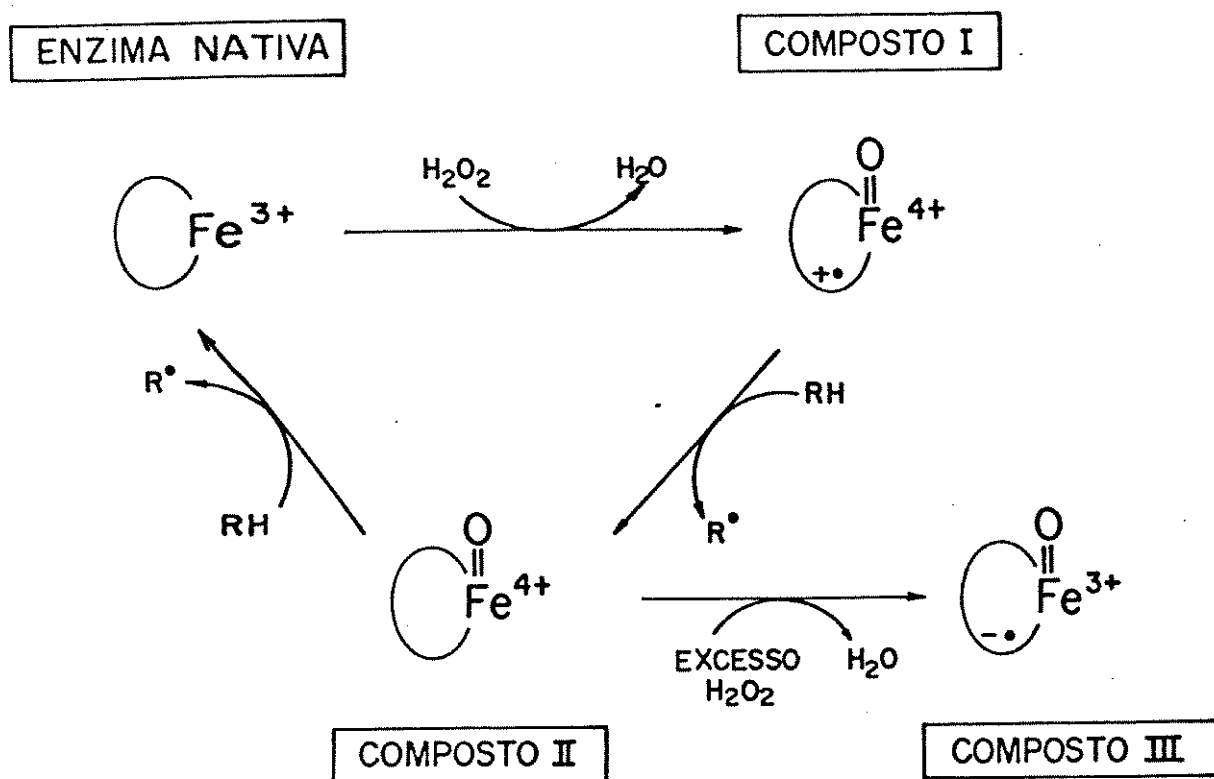


FIGURA 4: Ciclo catalítico da Lignina-peroxidase. RH representa o substrato enzimático na sua forma reduzida e $\text{R}^\bullet$ representa a forma radicalar oxidada (GOLD *et alii.*, 1989).

O álcool veratrílico, um metabólito produzido por *P.chrysosporium* e por outros fungos de decomposição branca sob condições ligninolíticas, desempenha um papel importante no ciclo catalítico da LiP. Este, atua como redutor da enzima e aparentemente a protege da inativação por excesso de H_2O_2 (TIEN e KIRK, 1983; WARIISHI e GOLD, 1990). A oxidação de álcool veratrílico para aldeído veratrílico pela LiP, na presença de H_2O_2 , é a reação mais utilizada como método de determinação da atividade catalítica da enzima (TIEN e KIRK, 1983; KIRK *et alii.*, 1986).

Apesar do elevado potencial redox da LiP, estudos *in vitro* mostraram que uma polimerização da lignina acontece pela ação da enzima, colocando em dúvida o seu exato desempenho *in vivo* (HAEMMERLI *et alii.*, 1986). Porém, diversos fatos apontam a importância da LiP na degradação de lignina e xenobióticos por fungos de decomposição branca. LiP pode despolimerizar lignina quando presente em soluções diluídas (HAMMEL e MOEN, 1991), oxidar e despolimerizar diversos dímeros e oligômeros relacionados com lignina *in vitro* (HIGUCHI, 1993), e catalizar a produção de espécies ativas de oxigênio (BARR *et alii.*, 1992).

iii) Peroxidase Dependente de Manganês (MnP, EC 1.11.1.7)

Esta enzima foi isolada pela primeira vez de culturas extracelulares de *P.chrysosporium* (KUWAHARA *et alii.*, 1984). A maioria das propriedades estruturais da MnP é semelhante às de LiP. A MnP é uma glicoproteína com Fe protoporfirínico IX como grupo prostético, dependente de H_2O_2 para sua atividade e com um ciclo catalítico semelhante ao de LiP (GLENN e GOLD, 1985; PASZCZYNSKI *et alii.*, 1985). A enzima é produzida em forma simultânea com LiP, durante o metabolismo secundário e é regulada pelas concentrações de carbono e nitrogênio no meio de cultura (BUSWELL e ODIER, 1987). Estudos recentes mostram que a concentração de íons Mn (II) também pode regular a produção das duas peroxidases de *P.chrysosporium* (BONNARME e JEFFRIES, 1990).

As MnP são produzidas por uma série de fungos de decomposição branca como *T.versicolor*, *P.radiata*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Panus tigrinus*, entre outros.

MnP é cataliticamente dependente de H_2O_2 e íons Mn(II), e α -cetoácidos que estabilizam sua atividade oxidativa. O ciclo catalítico da MnP é semelhante de LiP e HRP, com formação dos compostos I, II e III. Um excesso de H_2O_2 dá origem ao composto III, porém a concentração requerida é maior que aquela que conduz ao composto III de LiP. Diferentemente ao ciclo catalítico da LiP, o Mn (II) atua como doador de elétrons para gerar o composto II da MnP. Alguns compostos fenólicos e ferricianeto também podem atuar como doadores. O mesmo Mn (II) participa da conversão do composto II na enzima nativa. Os íons Mn(III) gerados são estabilizados via quelação com ácidos orgânicos tais como lactato, citrato ou malonato. O Mn (III) quelado atua como mediador redox difusível para catalizar a oxidação via um elétron de compostos fenólicos, gerando radicais fenoxila. Posteriormente, algumas reações não-enzimáticas, semelhantes àquelas geradas pelo sistema lacase/ O_2 , são observadas (Figura 5) (WARIISHI *et alii.*, 1989, 1992; AITKEN e IRVINE, 1990; DE JONG *et alii.*, 1994).

As MnP participam de reações de despolimerização de ligninas sintéticas (WARIISHI *et alii.*, 1991) e degradação de cloroligninas de alta massa molecular (LACKNER *et alii.*, 1991), desmetilação e deslignificação de polpa Kraft (PAICE *et alii.*, 1993),

descoloração de efluentes do tipo Kraft (MICHEL *et alii.*, 1991), e como um mediador na etapa inicial da degradação de ligninas de alta massa molecular (PEREZ e JEFFRIES, 1992).

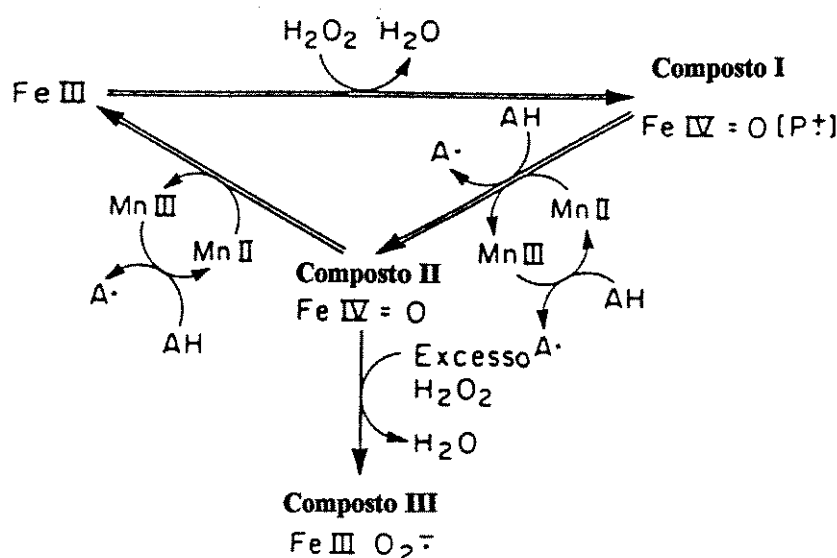


FIGURA 5: Ciclo catalítico da Manganês-Peroxidase. AH representa o substrato enzimático na sua forma reduzida e $\text{A}^\bullet$ representa a forma radicalar oxidada (GOLD *et alii.*, 1989).

2.2.1.2.- Enzimas Produtoras de H_2O_2

Os fungos de decomposição branca produzem H_2O_2 quando crescem em madeira, às vezes extracelularmente. Dentre os mecanismos de produção de H_2O_2 destacam-se a participação de uma série de enzimas oxidativas. Por sua vez, o H_2O_2 produzido é utilizado por uma série de peroxidases fúngicas extracelulares.

As primeiras enzimas produtoras de H_2O_2 a serem caracterizadas em culturas de *P. chrysosporium* foram a Glicose-1-Oxidase e a Glicose-2-Oxidase, que utilizam glicose como doador de elétrons na redução de O_2 para H_2O_2 . Estas enzimas são intracelulares e possuem diferentes especificidades pelo substrato (KELLEY e REDDY, 1986; ERIKSSON *et alii.*, 1986). Uma vez que os açúcares oxidados são abundantes na madeira, postula-se que as glicose oxidases participam do metabolismo dos fungos que degradam madeira (EVANS *et alii.*, 1991). Além das glicose oxidases outras enzimas intracelulares tais como Piranose-2-Oxidase, Metanol Oxidase e Acil-CoA Oxidase, podem participar na geração de H_2O_2 (DE JONG *et alii.*, 1994).

Outra enzima produtora de H_2O_2 isolada de *P.chrysosporium* é a Glioxal Oxidase (GLOX). Esta enzima é produzida extracelularmente durante o metabolismo secundário do fungo. A atividade catalítica da GLOX é dependente de Cu (II) e os substratos podem ser metabólitos fúngicos secundários como glioxal e metilglioxal (KERSTEN e KIRK, 1987) ou produtos de atividade ligninolítica como formaldeído (ANDER e ERIKSSON, 1985). GLOX é produzida simultaneamente com LiP em culturas de *P.chrysosporium*, sob condições ligninolíticas, principalmente sob alta tensão de oxigênio (KERSTEN e KIRK, 1987).

A Aril-álcool Oxidase (AAO) é outra enzima extracelular pertencente ao grupo das produtoras de H_2O_2 , produzida por diversos fungos de decomposição branca tais como *B.adusta*, *P.sajor-caju*, *P.ostreatus*, *P.eryngii*, *T.versicolor*, e outros (DE JONG *et alii.*, 1994). AAO oxida álcoois aromáticos para aldeídos e reduz O_2 para H_2O_2 . O álcool veratrílico é um substrato típico desta enzima. Aldeídos aromáticos são também oxidados pela enzima para seus correspondentes ácidos, porém de forma muito lenta (DE JONG *et alii.*, 1994; GUILLÉN *et alii.*, 1994; MARZULLO *et alii.*, 1995). MnP, descrita anteriormente, também pode ser incluída neste grupo de enzimas, devido ao fato de que ela gera H_2O_2 quando catalisa a oxidação de NAD(P)H (ASADA *et alii.*, 1986).

2.2.1.3.- Enzimas Redutoras

Os fungos de decomposição branca utilizam diversas enzimas hidrolíticas na degradação de celulose e enzimas de natureza oxidativa na degradação de lignina. Porém, existem enzimas capazes de atuar na degradação de ambos os componentes da madeira, interligando as vias metabólicas. Entre estas enzimas encontram-se celobiose-quinona oxidoreductase (CBQ) e celobiose desidrogenase (CDH) (ANDER, 1994). Estas enzimas oxidam celobiose, celodextrinas e alguns outros sacarídeos, porém não oxidam glicose, e reduzem diversos aceptores de elétrons incluindo quinonas, radicais catiônicos e fenoxila, Fe (III) complexado, citocromo c, composto II de LiP, MnP e HRP e oxigênio (ANDER *et alii.*, 1993; HENRIKSSON *et alii.*, 1993, 1995).

A CBQ, descoberta em culturas de *T.versicolor* e *P.chrysosporium*, contém FAD como grupo prostético e é induzida por produtos de degradação de celulose. Esta enzima catalisa a redução de o- e p-quinonas com simultânea oxidação de celobiose para celobiono- δ -lactona. A CBQ inibe a polimerização de guaiacol em reações catalizadas por lacase (WESTERMARK e ERIKSSON, 1974a,b).

A CBQ não participa diretamente na degradação de lignina, porém previne a polimerização de fenóis e o acúmulo de quinonas tóxicas resultantes da ação das fenoloxidasas (lacases e peroxidases), desta forma facilita a degradação de lignina por redução do potencial inibitório das quinonas (WESTERMARK e ERIKSSON, 1974a; ANDER, 1994). Recentemente, ANDER e colaboradores (1990) mostraram que a enzima é capaz de impedir a repolimerização de lignina Kraft gerada por LiP, e pode interagir com lacase, MnP, HRP e LiP para regular sua atividade catalítica. Estes autores observaram também que a CBQ é capaz de inibir a oxidação do álcool veratrílico por LiP (ANDER e ERIKSSON, 1977, ANDER, 1994).

A CDH foi isolada de culturas de *P.chrysosporium* (AYERS *et alii.*, 1978), porém também é produzida por diversos fungos celulolíticos e por um fungo de decomposição parda (ANDER, 1994). A enzima contém FAD e Heme como grupos prostéticos. Esta enzima pode

2.2.2.- Agentes Fúngicos de Baixa Massa Molecular Relacionados à Degradação de Madeira

Diversos estudos bioquímicos utilizando compostos modelo de lignina ou ligninas modificadas e sistemas enzimáticos isolados, têm falhado ao tentar explicar os mecanismos do processo de degradação de lignina na madeira *in vivo*. Apesar dos avanços na purificação, caracterização e estudos mecanísticos das principais enzimas relacionadas à degradação de lignina, o papel exato que as lacases, LiPs e MnPs desempenham na ligninólise não foi ainda completamente esclarecido. Existem fungos capazes de degradar efetivamente os componentes da madeira, porém incapazes de produzir uma ou todas as três enzimas mencionadas, como os fungos de degradação parda, por exemplo. Da mesma forma, existem outros fungos que mesmo produzindo estas enzimas são incapazes de provocar qualquer mudança na estrutura da madeira, após um período de tratamento. Por outro lado, ainda não foi possível relacionar a perda dos componentes da madeira, durante o ataque fúngico, com a bateria de enzimas produzidas por um determinado fungo no decorrer do processo, sugerindo que outros sistemas não enzimáticos devem estar envolvidos na degradação (DANIEL *et alii.*, 1989; EVANS *et alii.*, 1991, 1994; JOSELEAU *et alii.*, 1994; HAMMEL *et alii.*, 1995).

Dentro deste contexto, a microscopia eletrônica representa uma ferramenta muito útil no estudo dos aspectos estruturais da biodegradação de madeira *in situ*. Diversas técnicas de microscopia tem permitido observar a localização das enzimas lignocelulolíticas durante os diferentes estágios da degradação fúngica da madeira (DANIEL *et alii.*, 1989, 1990; EVANS *et alii.*, 1991; DANIEL, 1994).

A estrutura altamente organizada da matriz lignocelulósica na parede da célula vegetal, constitui uma barreira impermeável a diversos microrganismos e seus sistemas enzimáticos, enquanto que resulta facilmente permeável a água e outros pequenos agentes, de baixa massa molecular (COWLING, 1975). Com base nestas informações, um crescente interesse voltou-se para a teoria dos mediadores de baixa massa molecular, os quais poderiam penetrar nos poros da parede celular e iniciar a degradação de lignina ou celulose longe da hifa fúngica (HARVEY *et alii.*, 1986). Posteriormente, após os componentes lignocelulósicos da parede ficarem mais expostos, o processo de degradação seria continuado pela ação enzimática de celulasas, hemicelulasas e fenoloxidasas.

EVANS e colaboradores (1991, 1994), utilizaram técnicas de imunocitoquímica para mostrar por microscopia eletrônica a localização das enzimas que degradam os componentes da madeira, durante os diferentes estágios de evolução do processo. Os resultados do estudo mostraram que LiP e lacase não estabelecem contato com a parede da célula a menos que o processo de decomposição já esteja relativamente avançado. Da mesma forma, endoglucanases e celobioidrolase somente se ligam às fibrilas de celulose se suas extremidades estão expostas. Com estes resultados os autores postularam a hipótese de que nenhuma das enzimas, celulasas, lacases ou LiP, iniciariam o processo de degradação da madeira, uma vez que estas não foram localizadas na parede celular nos estágios iniciais da decomposição. Os iniciadores do processo provavelmente são moléculas pequenas que podem difundir desde a hifa e penetrar através dos poros da matriz lignocelulósica. Assim, é proposto que os radicais livres de H_2O_2 iniciariam a quebra de celulose, e o radical catiônico do álcool veratrílico seria o responsável pelo início da degradação da lignina (Figura 7).

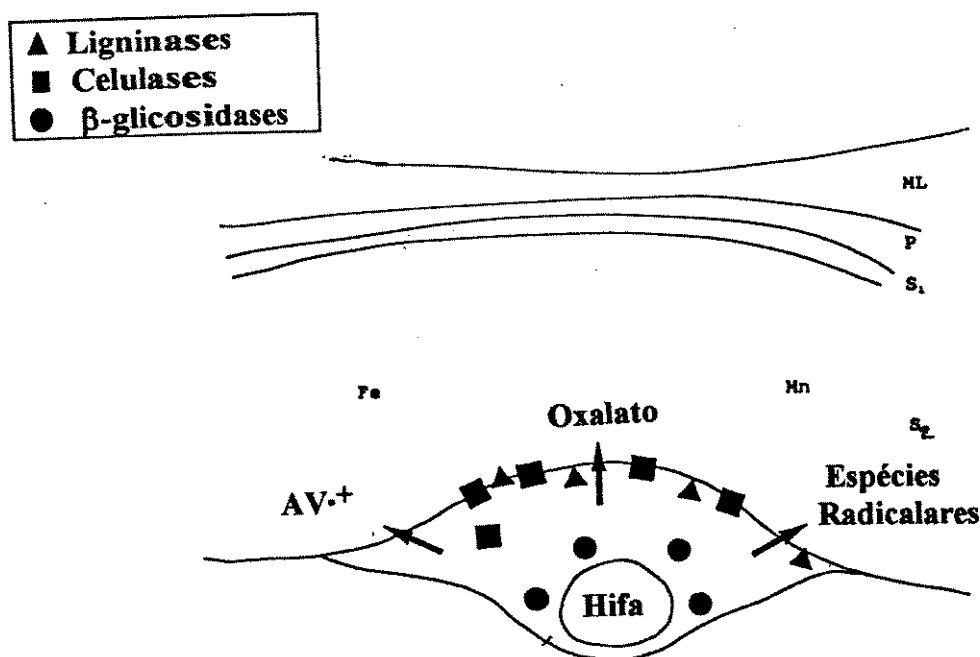


FIGURA 7: Distribuição das enzimas lignocelulolíticas e dos potenciais agentes de baixa massa molecular durante a degradação da matriz lignocelulósica da madeira por um fungo de decomposição branca. Os agentes de baixa massa molecular, oxalato, radical catiônico do álcool veratrílico (AV•⁺) e outras espécies radicais, são secretados pela hifa fúngica, localizada no lumen da célula vegetal, e difundem através da parede celular (EVANS *et alii.*, 1994).

Através de técnicas de exclusão de solutos e microscopia eletrônica foi possível provar a incapacidade de grandes moléculas, tais como enzimas, penetrarem nos poros da matriz lignocelulósica da madeira no início da degradação por fungos de decomposição parda. Durante o decorrer do processo os poros da matriz vão aumentando lentamente de tamanho. Porém, mesmo assim o tamanho destes, tanto em madeira intata quanto degradada, não supera os 3,8 nm de diâmetro, o qual permite a entrada de moléculas com uma massa molecular menor de 6.000 Da (FLUORNOY *et alii.*, 1991; SREBOTNIK e MESSNER, 1991).

Todos estes antecedentes, e muitos outros existentes na literatura, reforçam a hipótese de que a degradação da matriz lignocelulósica da madeira não é resultado somente da atividade enzimática, principalmente nos estágios iniciais, mas também o resultado da ação de diversos agentes não-enzimáticos, de baixa massa molecular. A degradação não enzimática é provavelmente de maior significância para os fungos de decomposição parda, uma vez que estes provocam uma despolimerização muito rápida e eficiente da matriz lignocelulósica, que em um estágio inicial atinge a camada S₂ da parede, degradando-a extensamente, enquanto a camada S₃, adjacente à hifa fúngica permanece intata. Embora a degradação por estes fungos

seja extensa, não é acompanhada de uma perda de peso significativa da madeira (KIM *et alii.*, 1991).

Entre os agentes de baixa massa molecular até agora identificados e relacionados à degradação dos componentes da parede celular na madeira, por fungos de decomposição branca e parda, estão : o oxalato, o álcool veratrílico, o manganês, o sistema Fe (II)/H₂O₂ (reação de Fenton), os sideróforos e os glicopeptídeos.

i) Oxalato

O oxalato é produzido extracelularmente e em grandes quantidades, por fungos de decomposição parda, porém não é encontrado em culturas extracelulares de fungos de decomposição branca. A ausência de oxalato nas culturas destes últimos fungos está relacionada com a presença da oxalato-decarboxilase, uma enzima intracelular, que degrada o oxalato (SCHMIDT *et alii.*, 1981; EVANS *et alii.*, 1994; SHIMADA *et alii.*, 1994).

Diversas funções desempenhadas pelo oxalato podem estar relacionadas com a degradação de celulose e lignina na madeira, por fungos de decomposição parda. O oxalato atua como complexante de cations tais como Ca (II), Fe (II) e NH₄⁺ presentes no ambiente, constituindo um mecanismo de detoxificação. A remoção do Ca (II) da parede da célula vegetal pode provocar um aumento no tamanho dos poros da parede, facilitando com isto a entrada de grandes moléculas tais como enzimas. Porém, acredita-se que o papel principal do oxalato seja a redução de Fe (III), presente na madeira, para Fe (II), o qual pode participar da reação de despolimerização de celulose através do sistema Fe (II)/H₂O₂, via reação de Fenton. Uma quebra hidrolítica por catálise ácida de celulose e hemicelulose também pode ocorrer, após a queda do pH do meio, devida a produção de oxalato durante a decomposição fúngica da madeira (SCHMIDT *et alii.*, 1981; EVANS *et alii.*, 1994; SHIMADA *et alii.*, 1994).

Os sistemas ligninolíticos LiP e MnP, porém não lacase, na presença de álcool veratrílico e Mn, participam na decomposição de oxalato. Ao mesmo tempo, o oxalato é capaz de inibir, não-competitivamente, tanto LiP quanto MnP (SHIMADA *et alii.*, 1994; GOODWIN *et alii.*, 1994).

A produção de oxalato no fungo de decomposição parda, *Tyromyces palustris*, e nos fungos de decomposição branca, *P.chrysosporium* e *C.versicolor*, é controlada pelas enzimas oxaloacetolase e glioxilato oxidase (AKAMATSU *et alii.*, 1992, 1993; SHIMADA *et alii.*, 1994; AKAMATSU e SHIMADA, 1995). A produção de oxalato e H₂O₂ parecem ser dois eventos interligados, no fungo de decomposição parda *Poria placenta* (RITSCHKOFF *et alii.*, 1995).

ii) Álcool Veratrílico

O álcool veratrílico pode estar envolvido em reações de despolimerização de lignina, como um mediador de transferência de carga, através de seu radical catiônico (AV^{•+}) (HARVEY *et alii.*, 1986). Porém, este papel têm sido bastante questionado (SHIMADA *et alii.*, 1994; DE JONG *et alii.*, 1994). O álcool veratrílico pode participar também na redução de oxigênio, gerando diversas espécies ativadas, que participam na degradação dos componentes da madeira (DE JONG *et alii.*, 1994).

O álcool veratrílico, sob a forma de radical catiônico, pode difundir através da hifa fúngica e alcançar a parede da célula vegetal, onde devido a seu tamanho difundiria com

facilidade até a matriz lignocelulósica. Porém, acredita-se que devido à curta meia vida deste e de outras espécies radiculares, o papel desempenhado não seria relevante (EVANS *et alii.*, 1994).

iii) Manganês

A capacidade oxidativa e difusível do Mn (III), fazem dele um ótimo sistema para participar no ataque inicial da parede da célula vegetal. Através de microscopia eletrônica foi possível demonstrar as significativas modificações produzidas em polpas e madeira pelos complexos Mn (III)-ácidos orgânicos. Porém, parece que os complexos de Mn (III) possuem uma atividade oxidativa específica e restrita à lignina e seus produtos de degradação, sendo incapazes de atuar diretamente sobre os polissacarídeos (ARCHIBALD e ROY, 1992; WARIISHI *et alii.*, 1992; JOSELEAU *et alii.*, 1994).

iv) Sistema Fe (II)/H₂O₂

Quando o Fe (II) reage com H₂O₂, há formação de radicais hidroxila (OH•) via reação de Fenton:



Os radicais hidroxila são os mais potentes agentes oxidantes dos sistemas biológicos. O papel do sistema Fe (II)/H₂O₂ sobre a quebra de celulose foi demonstrado há muitos anos (HALLIWELL, 1965), e desde então numerosos estudos em relação ao papel deste sistema na degradação biológica de substratos lignocelulósicos foram conduzidos (KOENIGS, 1974; MURMANIS *et alii.*, 1988).

A produção de radicais hidroxila, através de Fenton, é um evento muito importante em fungos de decomposição parda; em fungos de decomposição branca estes radicais podem ser formados através de reações secundárias durante a degradação de lignina (BACKA *et alii.*, 1992, 1993; WOOD, 1994). As vias de formação do sistema Fenton por fungos de decomposição branca incluem a decomposição do complexo Fe (III)-oxalato, originando Fe (II), a geração de superóxido pela ação indireta de LiP, e por ação de CDH (WOOD, 1994).

v) Sideróforos

O íon Fe, um elemento essencial no crescimento da maioria dos microrganismos, existe na natureza predominantemente como Fe (III), insolúvel e não disponível para sua assimilação por parte dos microrganismos. Para solubilizar e retirar o Fe (III) e outros metais de transição, alguns fungos e bactérias sintetizam e secretam compostos quelantes extracelulares, com uma alta afinidade pelo metal e de baixa massa molecular (300-1.000 Da), denominados sideróforos. Além de produzir os sideróforos, os microrganismos devem desenvolver sistemas que permitam o transporte destes compostos complexados com Fe (III); com este objetivo os microrganismos sintetizam receptores proteicos específicos localizados na membrana celular (NEILANDS, 1984, 1993; HIDER, 1984; WINKELMANN, 1992).

Estruturalmente, é possível diferenciar dois grandes grupos de sideróforos, os do tipo catecolato e os do tipo hidroxamato. As estruturas dos sideróforos produzidos por diferentes microrganismos são muito variadas, podendo apresentar, além do grupo funcional característico, um ou mais aminoácidos, ou às vezes algum cromóforo. Nesta estrutura, o Fe (III) é complexado principalmente através dos átomos de oxigênio, formando um complexo de

coordenação termodinamicamente estável. Outros tipos de estruturas encontradas em sideróforos são hidroxamato-catecolato, α -hidroxicarboxilatos (derivados de citrato) e oxazolininas (NEILANDS, 1984; HIDER, 1984; WINKELMANN, 1986, 1992). Na Figura 8, aparecem as estruturas dos sideróforos mais representativos do grupo dos hidroxamatos (ferricromo) e dos catecolatos (enteroquelina). Na figura também é mostrada a estrutura do sideróforo tipo hidroxamato, desferrioxamina B, produzido comercialmente sob o nome de Desferal.

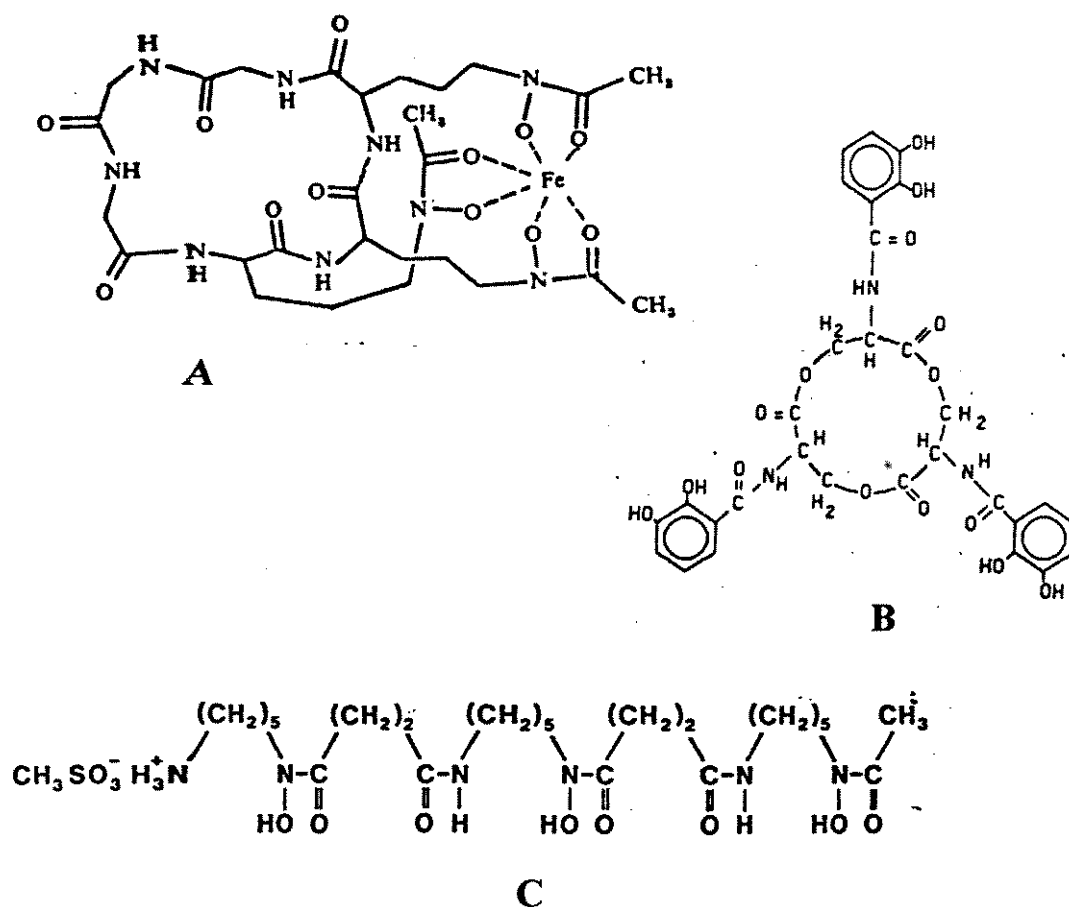


FIGURA 8: Estrutura de sideróforos representativos do grupo dos hidroxamatos (ferricromo) (A), do grupo dos catecolatos (enteroquelina) (B), e o sideróforo comercial do tipo hidroxamato, desferrioxamina B ou Desferal (C)

Grande parte dos estudos com sideróforos está relacionada à mecanismos de captação de Fe, transporte até o interior da célula microbiana, regulação molecular da produção, etc., principalmente em bactérias e fungos patógenos de plantas e animais, onde estes sideróforos representam o agente de patogenicidade ou fator de virulência (PAYNE, 1988; MARTÍNEZ *et alii.*, 1990; WOOLDRIDGE e WILLIAMS, 1993).

A condição essencial que regula a biossíntese dos sideróforos por microrganismos é um ambiente pobre em Fe. Muitos microrganismos somente secretam os complexantes quando a concentração de Fe no ambiente é $\leq 1,0 \mu\text{M}$. Porém, o mecanismo de regulação da biossíntese não é ainda completamente conhecido (BAGG e NEILANDS, 1987).

A degradação da matriz lignocelulósica da madeira é um processo dependente da geração de espécies radicalares. Dentro deste processo o Fe desempenha um papel muito importante, tanto na degradação por fungos de decomposição branca quanto parda. O Fe forma parte das peroxidases produzidas por fungos de decomposição branca, que estão envolvidas na degradação da madeira, e em fungos de decomposição parda participa do sistema que gera radicais hidroxila via reação de Fenton. Portanto, ambos os grupos de fungos devem manter um controle rigoroso de seus níveis de Fe, através da produção de compostos complexantes de tipo sideróforos (FEKETE *et alii.*, 1989a). Os sideróforos possuem capacidade de catalisar reações de óxido-redução, dependendo do pH, devido à presença de metal na molécula (HIDER, 1984). Assim, através da formação de complexos com Mn ou Fe podem participar de reações de despolimerização da matriz lignocelulósica, permitindo o aumento do tamanho dos poros.

Até o presente momento, poucos estudos relacionam a produção destes complexantes com o processo de degradação de madeira ou de outros substratos lignocelulósicos. As teorias surgidas recentemente sobre a participação de agentes de baixa massa molecular na degradação de madeira, apenas sugerem a participação dos sideróforos no processo (DANIEL, 1994). Porém, EVANS e colaboradores (1991, 1994), que propõem um esquema para participação dos agentes de baixa massa molecular (Figura 7), não incluem os sideróforos nos modelos por eles propostos.

FEKETE e colaboradores (1989a), estudaram a produção de sideróforos por alguns fungos de decomposição branca e parda. Os autores utilizaram duas técnicas rápidas e simples de detecção, como o ensaio com o reagente universal para sideróforos CAS e eletroforese em papel. As 10 cepas estudadas reagiram positivamente com CAS em meio sólido e líquido, e 9 das 10 produziram compostos fluorescentes (tipo catecolato) na eletroforese. A adição de concentrações muito altas de Fe reprimiu a produção de sideróforos. Estes resultados são os primeiros na literatura que mostram a produção de sideróforos pelos conhecidos e eficientes fungos ligninolíticos, *P.chrysosporium* e *C.versicolor*.

JELLISON e colaboradores (1990), isolaram um sideróforo produzido pelo fungo de decomposição parda *G.trabeum*, quando crescia em meio líquido e em cavacos de madeira. O sideróforo pareceu ser de tipo catecolato, e era extraído com solventes orgânicos do meio de cultura. Os autores utilizaram uma fração parcialmente purificada do sideróforo no tratamento de polpa não branqueada, e observaram que após 30 minutos de incubação era possível apreciar (visualmente) uma descoloração da polpa.

Posteriormente, os sideróforos produzidos por *G.trabeum* foram detectados em madeira infestada pelo fungo, através de técnicas de imunocitoquímica e microscopia eletrônica. Os resultados revelaram a presença dos complexantes na camada de glucana que reveste externamente à hifa fúngica. Nos estágios iniciais da degradação, os sideróforos apareceram em maior quantidade nas regiões próximas da hifa, onde a degradação da parede celular é evidente, porém não foram observados na lamela média (JELLISON *et alii.*, 1991). Segundo os autores, este é o primeiro estudo que mostra a localização *in situ* de sideróforos sobre a madeira infestada por um fungo de decomposição parda.

O sideróforo tipo catecolato de *G.trabeum* é capaz de catalizar a reação de oxidação de ácido 2-ceto-4-tiometil butírico (KTBA). A reação de oxidação ocorre via transferência de um elétron, depende da concentração do sideróforo, ocorre com maior velocidade em meio ácido (pH 3,0), e é estimulada pela adição de Fe (II) e Mn (II), sendo o efeito de Fe (III) muito maior que o de Mn (II) (CHANDHOKE *et alii.*, 1992).

Recentemente, GOODELL e colaboradores (1995) isolaram 15 compostos de tipo catecolato da cultura de *G.trabeum*. Estes compostos mostraram capacidade de complexar Fe (III), produzir radicais hidroxila em presença de H_2O_2 , e catalizar as reações de oxidação via transferência de um elétron, da mesma forma como acontece com as enzimas ligninolíticas. Alguns dos 15 compostos mostraram capacidade de reduzir o Fe (III) para Fe (II), adsorvê-lo e desta forma estabilizá-lo. A reação de redução era mais rápida em pH 2,0 do que em meios mais básicos, sendo que acima de pH 7,0 não havia redução. Os autores postularam uma hipótese para o ciclo redox dos compostos, que se inicia com a liberação do complexante pela hifa fúngica dentro do lumen da célula vegetal, onde o meio é fortemente ácido. O sideróforo, a seguir, complexa o Fe (III) presente na madeira, e o reduz para Fe (II). Em meio ácido, o Fe sob a forma de Fe (II) é altamente estável, e assim é transportado pelo sideróforo até as camadas da parede celular. Dentro da parede o pH mais alto pode propiciar um ambiente onde o Fe (II) complexado é facilmente disponível para reagir com o H_2O_2 presente, gerando radicais $OH^\bullet$, que iniciam as reações de despolimerização (Figura 9).

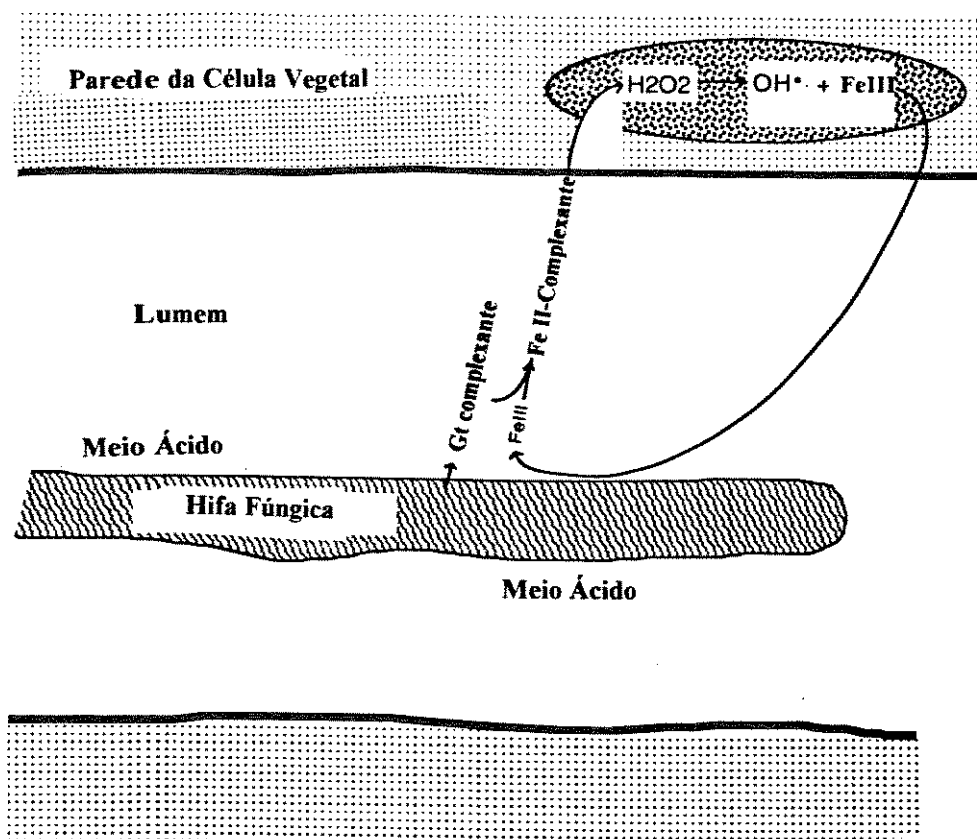


FIGURA 9: Mecanismo proposto para a degradação de madeira pelo fungo de decomposição parda *G.trabeum*, através da produção de radicais livres ($OH^\bullet$), gerados pelo sistema sideróforo-Fe(II), na parede da célula vegetal (GOODELL *et alii.*, 1995).

vi) Glicopeptídeos

Em 1989, ENOKI e colaboradores tentaram relacionar a degradação de madeira com a produção de oxidases que catalizam reações de oxidação via transferência de um elétron, em fungos de decomposição parda. Relacionaram também a produção de etileno a partir de KTBA, com a degradação de lignina, celulose e madeira. Uma fração parcialmente purificada, que os autores denominaram de proteína extracelular, obtida dos diferentes fungos em estudo, oxidava KTBA na presença de H_2O_2 . A fração oxidou também NADH, com produção de H_2O_2 , via radicais superoxianion ($O_2^{\cdot-}$) em presença de O_2 . A fração mostrou pouca atividade fenoxidásica, nas condições onde a máxima oxidação de KTBA era observada. Em *G.trabeum*, um dos fungos em estudo, a atividade de oxidação era induzida por glucose, celulose e madeira, porém não por lignina.

Em um trabalho posterior, os autores isolaram as proteínas extracelulares mencionadas anteriormente, a partir de culturas de *G.trabeum* e *T.palustris* (ENOKI *et alii.*, 1990). Os compostos parcialmente purificados foram caracterizados como glicopeptídeos, de baixa massa molecular (1.600-2.000 Da), que contém Fe (II). Os glicopeptídeos oxidam KTBA, via transferência de um elétron na presença de H_2O_2 . O Fe (II) presente no glicopeptídeo pode ser oxidado para Fe (III) por H_2O_2 . Os autores postulam uma hipótese para degradação de madeira por estes compostos. No estágio inicial da degradação de madeira por fungos de decomposição parda, a hifa presente no lumen da célula vegetal excreta os glicopeptídeos que se combinam com o Fe (II) presente na madeira. Na camada S₂ os glicopeptídeos catalizam a oxidação de doadores de elétrons produzindo as espécies $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , em presença de O_2 . O H_2O_2 é reduzido para $OH^{\cdot}$ pelo Fe (II) do glicopeptídeo, que se oxida para Fe (III). As espécies $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $OH^{\cdot}$ geradas, podem iniciar a degradação de celulose e lignina na matriz lignocelulósica da madeira (Figura 10).

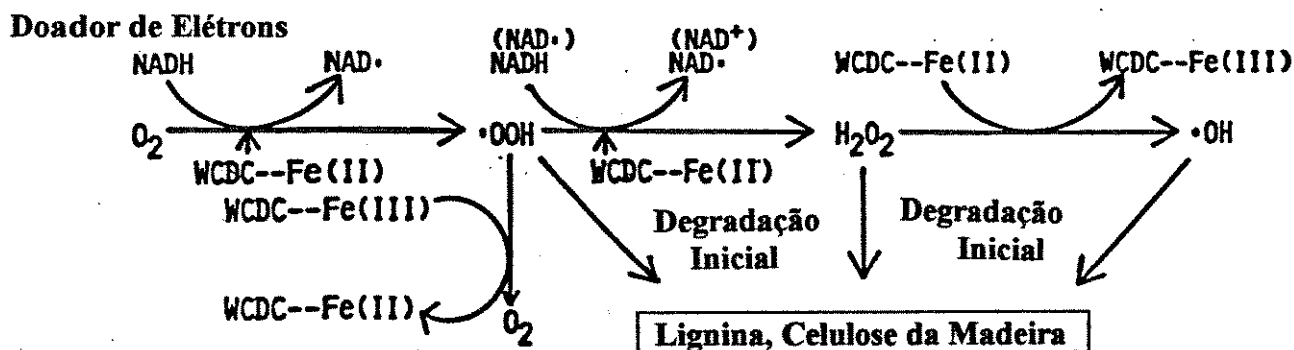


FIGURA 10: Mecanismo proposto para a formação de espécies radiculares dentro do lumen da célula vegetal, pelos glicopeptídeos (WCDC) produzidos durante a degradação de madeira por um fungo de decomposição parda (ENOKI *et alii.*, 1990).

Os mesmos glicopeptídeos, apresentando idênticas propriedades, foram isolados do fungo de decomposição branca *Irpex lacteus* (TANAKA *et alii.*, 1991, 1993) e do fungo de decomposição parda *T.palustris* (HIRANO *et alii.*, 1995). O glicopeptídeo de *I.lacteus* foi mais abundante extracelularmente em culturas contendo madeira do que em culturas com

glicose como fonte de carbono. A atividade de oxidação de KTBA foi correlacionada à atividade de degradação de madeira, porém não com a atividade fenoxidásica observada nas culturas do fungo (TANAKA *et alii.*, 1993). O glicopeptídeo de *T. palustris* contém 0,12% de Fe (II), 13% de proteína e 22% de carboidratos, e possui uma massa molecular estimada entre 1.500-5.000 Da. O mecanismo de catálise de KTBA é idêntico ao dos outros glicopeptídeos. Este composto também mostrou capacidade de reduzir Fe (III) para Fe (II) e adsorver fortemente o Fe (II) (HIRANO *et alii.*, 1995).

Curiosamente, embora trabalhando com a mesma cepa do fungo *G. trabeum* os grupos de ENOKI e GOODELL, descrevem compostos com mecanismos redox semelhantes, com idênticas propriedades redutoras de Fe (III), porém estruturalmente diferentes. Enquanto GOODELL e colaboradores descrevem os compostos como sideróforos do tipo catecolato, com uma massa molecular de aproximadamente 1.000 Da e que reagem fortemente com CAS, ENOKI e colaboradores, afirmam que o composto é um glicopeptídeo com uma massa molecular pouco maior e não mencionam se estes reagem com CAS. A caracterização dos compostos feita por GOODELL e colaboradores é muito mais precisa, uma vez que estes utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para separar os diferentes sideróforos. Diferentemente, ENOKI e colaboradores, somente utilizaram coluna de Sephadex G-50 e G-25 para separar uma fração que oxida KTBA, e que pode estar constituída de mais de um composto de baixa massa molecular.

2.3.- APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE FUNGOS LIGNINOLÍTICOS E SEUS SISTEMAS ENZIMÁTICOS

O grande potencial de aplicação biotecnológica dos fungos ligninolíticos, deriva das propriedades de seus sistemas enzimáticos, e a indústria de celulose e papel representa atualmente o principal alvo desta aplicação.

O processo de obtenção de pastas celulósicas e fabricação de papel, é um dos responsáveis pela maior carga poluente que atinge os ecossistemas, na forma de efluentes ou resíduos sólidos, altamente tóxicos, e muitas vezes mutagênicos, persistentes e/ou bioacumulativos (ERIKSSON, 1990; MEHTA e GUPTA, 1991; ONYSKO, 1993).

A utilização de fungos ligninolíticos ou seus sistemas enzimáticos, objetiva reduzir os requerimentos energéticos e o consumo de reagentes químicos, durante os diferentes estágios desde a obtenção das pastas celulósicas a partir da madeira, até a obtenção da polpa branqueada. Assim, os fungos ligninolíticos podem ser principalmente aplicados na biopolpação das madeiras, branqueamento das polpas, modificação da superfície da fibra de polpas mecânicas, descoloração de efluentes, bioremediação de solos contaminados e bioconversão de lignina para subprodutos químicos. A eficiência destes processos está diretamente relacionada com a capacidade do fungo degradar lignina (MEHTA e GUPTA, 1991; ONYSKO, 1993).

Como discutido anteriormente, o processo de degradação de madeira ou lignina é o resultado da ação combinada de sistemas enzimáticos e não enzimáticos por parte dos fungos. Desta forma a utilização dos fungos ou seus extratos enzimáticos ligninolíticos, deve ser mais eficiente do que as enzimas atuando isoladamente. Ao mesmo tempo, a primeira alternativa,

utilizando o sistema biológico completo, resulta economicamente mais atraente que utilizar enzimas purificadas (ZIMMERMANN, 1989; ERIKSSON, 1990).

Existem ainda outras possibilidades de aplicação biotecnológica dos fungos ligninolíticos, tais como deslignificação parcial para aumentar a digestibilidade de substratos lignocelulósicos e a deslignificação parcial como pré-tratamento para sacarificação enzimática (HATAKKA *et alii.*, 1989; ERIKSSON, 1990).

O primeiro estágio na obtenção de pastas celulósicas é a remoção da lignina da madeira para obter as fibras de celulose. Durante o processo denominado de polpação (Kraft ou sulfito), as fibras de celulose são separadas dos outros componentes da madeira por solubilização química. O tratamento de cavacos de madeira com fungos ligninolíticos (biopolpação) prévio à polpação química ou ao tratamento termomecânico, pode reduzir significativamente as demandas energéticas e a utilização de reagentes químicos, ao mesmo tempo que polpas de melhor qualidade são obtidas (ZIMMERMANN, 1989; ERIKSSON, 1990; MEHTA e GUPTA, 1991; AKHTU *et alii.*, 1992).

Posterior à polpação, um processo de branqueamento é necessário para remover a lignina residual condensada sobre as polpas, responsável pela cor marrom das mesmas. No branqueamento das polpas, grandes quantidades de cloro são utilizados, resultando na liberação de compostos organoclorados (cloroligninas), altamente tóxicos. A utilização de fungos tais como *P.chrysosporium* e *T.versicolor*, e outros eficientes fungos de decomposição branca, ou seus sistemas enzimáticos ligninolíticos, na remoção da lignina residual das polpas não branqueadas (biobranqueamento), contribui para a redução da utilização de cloro, e conseqüentemente para a formação de compostos organoclorados (MEHTA e GUPTA, 1991; ONYSKO, 1993).

O processo global de fabricação de papel libera grandes quantidades de compostos contaminantes sob a forma de efluentes, altamente tóxicos e coloridos. A cor dos efluentes é devida à lignina e seus derivados, que também são responsáveis pelo cheiro desagradável destes. Os efluentes contêm, além de lignina e derivados, fenóis clorados, cloro e hidrocarbonetos clorados responsáveis pelo caráter tóxico e mutagênico destes efluentes. Os fungos de decomposição branca podem eliminar eficientemente, por degradação, as ligninas modificadas (cloroligninas) e seus derivados diminuindo com isto a toxicidade. Efluentes Kraft são descolorados por fungos de decomposição branca como *P.chrysosporium* e *T.versicolor*, ou seus sistemas enzimáticos. A imobilização dos fungos ou suas enzimas aumenta significativamente a eficiência de descoloração por estes fungos (ERIKSSON, 1990; MEHTA e GUPTA, 1991; BAJPAI *et alii.*, 1993; BAJPAI e BAJPAI, 1994).

2.4.- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS SOBRE *T.aurantiacus*

Os fungos e bactérias termófilas, representam um grupo de microrganismos de grande importância em processos industriais devido à alta estabilidade térmica de seus sistemas enzimáticos. Ao mesmo tempo, os fungos termófilos apresentam maiores velocidades de crescimento do que fungos mesófilos, e devido às altas temperaturas de crescimento os problemas de contaminação das culturas são limitados (ZAMOST *et alii.*, 1991; ZENTGRAF, 1992).

A principal aplicação de enzimas obtidas de microrganismos termófilos é na indústria de alimentos e detergentes, porém novas áreas de aplicação destas enzimas têm surgido. Uma delas é a aplicação na indústria de polpa e papel, onde as xilanases produzidas por fungos ou bactérias termófilas são utilizadas no branqueamento de polpas (ZAMOST *et alii.*, 1991).

O fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus*, pertence à classe dos ascomicetos, é um conhecido produtor de enzimas amilolíticas (ADAMS, 1992), proteolíticas (MARCY *et alii.*, 1984), celulolíticas (FELDMAN *et alii.*, 1988) e xilanolíticas (ALAM *et alii.*, 1994) de elevada termoestabilidade. Porém, recentemente o interesse voltou-se principalmente à produção de xilanases por este fungo. O estudo dos parâmetros da cultura que regulam a produção da xilanase, a purificação e caracterização parcial desta, e até a cristalização e análise por difração de raios-X da enzima, já foram descritas (GOMES *et alii.*, 1994; VISWAMITRA *et alii.*, 1993).

Apesar da grande informação à respeito da produção de enzimas hidrolíticas pelo *T.aurantiacus*, pouco se conhece à respeito da produção de sistemas enzimáticos de natureza oxidativa pelo fungo.

A cepa brasileira de *T.aurantiacus*, utilizada neste estudo, apresentou características bem diferentes às observadas com as cepas descritas na literatura, principalmente pela sua capacidade de degradação de madeira. A cepa brasileira foi isolada de pilhas de cavacos de **Eucalipto sp.**, numa indústria de polpa e papel (AUER, 1986). Após o tratamento de cavacos de **Eucalipto**, com esta cepa fúngica, foi possível observar uma redução no teor das substâncias extratáveis da madeira, dos açúcares e das substâncias fenólicas. Cortes histológicos da madeira tratada mostraram crescimento micelial e formação de pontuações escuras dentro dos vasos e células do raio da madeira (AUER *et alii.*, 1987, 1988). Como resultado da atividade do fungo sobre as madeiras de **Eucalipto** pré-tratadas, foi observado um maior rendimento em celulose e menor consumo de produtos químicos durante o processo de cozimento industrial (BARRICHELO, 1987).

A cepa brasileira de *T.aurantiacus* apresentou baixos níveis de atividades celulolíticas e hemicelulolíticas em relação à maioria das cepas descritas na literatura, quando cultivado em substratos indutores para essas enzimas. Porém, quando foi cultivado em meio líquido contendo serragem de **Eucaliptos grandis** como substrato, uma atividade fenoloxidásica extracelular foi detectada (MACHUCA, 1991). Ao mesmo tempo, após 21 dias de tratamento a análise química da madeira de **E.grandis** revelou uma perda de peso de 6,7%, junto com uma redução de 15% e 64,5%, nos teores de lignina e substâncias extratáveis em solventes orgânicos, respectivamente (MACHUCA e DURAN, 1993).

Estes resultados sugerem que a cepa brasileira do *T.aurantiacus* possui características diferentes da maioria das cepas do mesmo fungo, principalmente pela sua atividade degradadora de madeira. A degradação de madeira revela que ele pode atuar moderadamente sobre lignina e eficientemente sobre as substâncias extratáveis, e esta capacidade deve estar relacionada à produção de atividade fenoloxidásica pelo fungo. Portanto, esta cepa mostra-se promissora para utilização em processos biotecnológicos relacionados à indústria de polpa e papel.

3.- OBJETIVOS DESTE ESTUDO

Até o presente momento, diversas questões de tipo fisiológico, bioquímico e mecanístico do processo de degradação fúngica dos componentes da madeira, principalmente quanto à degradação de lignina, permanecem sem resposta. O processo se mostra muito controvertido e não completamente compreendido à respeito do papel desempenhado pelo sistema enzimático ligninolítico *in vivo*. Durante muitos anos grande parte dos estudos sobre a degradação de lignina *in vitro* utilizou como sistema modelo o basidiomiceto de decomposição branca *P.chrysosporium* e suas enzimas ligninolíticas, porém, este modelo não conseguiu responder a muitas das questões mencionadas anteriormente. Por outra parte, é cada vez mais sustentada a teoria da participação de agentes de baixa massa molecular, nos estágios iniciais da degradação de madeira, os quais permitiriam a posterior invasão da parede celular por moléculas de alta massa molecular como as enzimas lignocelulolíticas. Desta forma poderia ser explicado o papel desempenhado na natureza por fungos incapazes de produzir as típicas enzimas ligninolíticas, porém com capacidade de produzir agentes de baixa massa molecular. Justifica-se assim o crescente interesse na procura de novas espécies fúngicas, pertencentes às classes dos basidiomicetos ou ascomicetos, que participem no processo de degradação de madeira através de seus sistemas enzimáticos ou através da produção de agentes não enzimáticos, de baixa massa molecular.

Uma vez que a cepa brasileira do ascomiceto termófilo *T.aurantiacus* demonstrou possuir características diferentes às cepas do mesmo fungo descritas na literatura, principalmente quanto a sua capacidade de degradação de madeira de *E.grandis* e a produção de uma atividade fenoloxidásica do tipo lacase (MACHUCA e DURÁN, 1993), o principal objetivo deste trabalho centrou-se no estudo da atividade fenoloxidásica (FOx) produzida extracelularmente por este fungo.

Os objetivos específicos deste estudo, desenvolvidos em ordem cronológica, foram:

- Estudar a produção de atividade FOx por *T.aurantiacus* em cultura líquida, e selecionar os diferentes parâmetros físico-químicos que conduzem à maior produção desta atividade. Determinar os efeitos do tipo e concentração de substrato, utilização de um indutor sintético, pH da cultura, tipo e quantidade de inóculo e agitação e oxigenação da cultura, sobre a produção da atividade FOx pelo fungo.
- Caracterização de algumas propriedades cinéticas do extrato bruto obtido nas melhores condições para produção de atividade FOx. As propriedades cinéticas do extrato ativo a serem estudadas incluem a determinação do efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade, especificidade pelo substrato, efeito de inibidores e determinação das constantes cinéticas K_m e $V_{máx}$.
- Purificação da fração contendo a atividade FOx a partir do extrato bruto de *T.aurantiacus*. A fração parcialmente purificada será posteriormente caracterizada cinética e estruturalmente, na tentativa de desvendar a natureza da fração responsável pela alta atividade FOx presente nas culturas de *T.aurantiacus*.
- Avaliar o potencial biotecnológico dos extratos com alta atividade FOx de *T.aurantiacus*, aplicados em processos de descontaminação. Será estudado o efeito do extrato com atividade FOx no tratamento de uma polpa Kraft de **Eucalipto** e no tratamento de um efluente do tipo E₁, proveniente do primeiro estágio de extração alcalina de uma polpa Kraft.

4.- MATERIAL E MÉTODOS

4.1.- MATERIAL

4.1.1.- Reagentes

Todos os reagentes utilizados na preparação dos meios de cultura, determinação de atividades enzimáticas e purificação, quando não especificado, foram de grau analítico.

4.1.2.- Microrganismo

A cepa brasileira do fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus*, pertencente à classe dos Ascomicetos, foi isolada de pilhas de cavacos de *Eucaliptus sp.*, na indústria Champion Papel e Celulose, Ltda. (Mogi Guaçu, SP), pelo professor C.G.Auer (AUER., 1986).

4.1.3.- Meios de Cultura

i) Meios de Manutenção

O fungo foi mantido e replicado semanalmente em placas de Petri contendo os meios agar-Czapek modificado (MACHUCA, 1991) e batata-dextrose (BDA) (DIFCO, 1978). A incubação foi feita a 48°C durante 3-4 dias, ou até a máxima esporulação. Uma cultura estoque do fungo foi conservada em tubo contendo BDA, cuberta por óleo mineral.

ii) Meio Básico para Produção Enzimática

O meio básico utilizado nos diferentes experimentos de produção enzimática foi o caldo Czapek modificado (MACHUCA, 1991). Dependendo do experimento, o meio de cultura foi adicionado de concentrações variadas de glicose ou de diferentes substratos lignocelulósicos, e o pH foi ajustado, com ácido ou base, antes de autoclavar durante 15 minutos a 121°C.

4.1.4.- Substratos Polissacarídicos

A composição dos resíduos lignocelulósicos utilizados como indutores de atividade FOx, de acordo com a literatura, foi a seguinte:

Bagaço de cana (IMRIE e TILBURY, 1972): 19,9% de lignina, 46,0% de celulose, 24,5% de hemicelulose, 3,0% de extrativos.

Casca de arroz (DURÁN *et alii.*, 1988): 29,4% de lignina, 38,4% de celulose, 23,7% hemicelulose, 2,0% de extrativos.

Farelo de trigo (BUSHUK, 1986): 70,0% de carboidratos, igualmente divididos entre celulose e hemicelulose, 17,0% de proteína, 7,0% de substâncias minerais, 5,0% de ácidos graxos e outros constituintes menores.

Serragem de *Eucaliptus grandis* (7 anos) (MACHUCA, 1991): 28,0 % de lignina, 53,0% de celulose, 19,0% de hemicelulose, 5,8% de extrativos.

Os substratos polissacarídicos foram esterilizados separadamente do caldo Czapek, durante 30 minutos a 121°C. Posteriormente, foram misturados com o caldo e deixados em repouso durante uma noite.

4.2.- MÉTODOS

4.2.1.- PRODUÇÃO DE ATIVIDADE FOx

Na etapa de produção de atividade FOx por *T.aurantiacus* foram conduzidos diversos experimentos como a determinação das condições da cultura que afetam a produção da atividade e análise dos caldos de cultura após crescimento fúngico.

I.- Efeito das Condições de Cultura na Produção de Atividade FOx

Para o estudo do efeito das condições da cultura na produção da atividade fenoloxidásica por *T.aurantiacus* em meio líquido, o caldo Czapek foi preparado de acordo com o experimento. Quando não especificado, o pH dos caldos foi ajustado para 6,0 (por adição de HCl 0,1 N) antes de esterilizar. Posteriormente, foram distribuídos em Erlenmeyers de 250 mL (100 mL/Erlenmeyer) e incubados durante 15 a 20 dias, sob condições estáticas e aeróbicas, a 48°C.

Os respectivos controles de cada experimento foram preparados em idênticas condições, somente não foram inoculados com o fungo. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

I.1.- Efeito de Diferentes Substratos

Foi estudado o efeito da adição de diferentes substratos na produção de atividade FOx.

Serragem de *E.grandis* e farelo de trigo foram adicionados ao caldo Czapek, na presença e na ausência de glicose como co-substrato. Foi estudado o efeito da adição de diferentes quantidades dos substratos numa faixa de 0,1% a 2,0% (m/v). Os outros substratos lignocelulósicos foram estudados numa concentração fixa de 1,5% (m/v) na presença de 0,5% de glicose como co-substrato.

A glicose foi utilizada no meio de cultura como única fonte de carbono e como co-substrato, junto com os substratos lignocelulósicos. Quando utilizada como única fonte de carbono a glicose foi adicionada ao caldo Czapek numa faixa de concentração de 0% a 1,5% (15 g/l). Quando utilizada como co-substrato, foi adicionada ao meio de cultura, que continha 1,5% do substrato lignocelulósico, numa faixa de concentração de 0% a 1,0% (10 g/l).

I.2.- Efeito da Adição de um Indutor Sintético

O efeito de um indutor sintético no crescimento fúngico e na produção de atividade FOx foi estudado utilizando-se o composto aromático *p*-anisidina (*p*-metoxi anilina).

Soluções estoque de *p*-anisidina foram preparadas em etanol (95%) e adicionadas às culturas em pequenos volumes para dar uma concentração final de: 1,0, 3,0 e 5,0 mM. A

adição de *p*-anisidina na cultura foi feita após o quinto dia de crescimento do fungo em meio Czapek modificado, contendo 0,5% de glicose como substrato. Os respectivos controles continham 0,5% de glicose, na ausência da *p*-anisidina.

I.3.- Efeito do Inóculo

O inóculo utilizado em todos os experimentos foi obtido a partir de placas de Petri contendo ágar-Czapek, meio no qual o *T.aurantiacus* apresentou maior velocidade de crescimento. A idade da cultura utilizada para os inóculos foi de 3-4 dias, quando os numerosos ascomas que cobriam a superfície do ágar tornavam-se marrom escuro.

O efeito do inóculo na produção da atividade FOx foi estudado em culturas que continham 1,5% de serragem e 0,5% de glicose como substratos.

Uma forma de inoculação consistiu na preparação de uma suspensão de esporos por transferência de uma alçada (alça de 5,0 mm de diâmetro) de esporos da placa de Petri para um Erlenmeyer contendo 100 mL de água destilada e esterilizada. A suspensão foi agitada até dispersão total e posteriormente utilizada como inóculo. Cada 100 mL de caldo de cultura foram inoculados com 2, 4 e 6 mL da suspensão.

A outra forma de inoculação dos caldos consistiu na transferência direta de um disco de ágar (6,0 mm de diâmetro) com micélio e esporos do fungo, da placa de Petri para o caldo. Os discos de ágar foram cortados utilizando-se tubos de vidro ocos, esterilizados, cujo diâmetro interno era de 6,0 mm. Foi estudado o efeito da adição de um a três discos por Erlenmeyer.

I.4.- Efeito da Agitação e Oxigenação das Culturas

As culturas contendo 0,5% de glicose ou 0,5% de glicose mais 1,5% de serragem, foram incubadas em agitador rotatório à temperatura de 48°C e agitação de 100 rpm.

As culturas fúngicas contendo 1,5% de serragem e 0,5% de glicose como substratos, foram oxigenadas a cada dois dias durante o período de incubação. Sob condições estéreis, cada Erlenmeyer foi borbulhado com oxigênio durante 10 minutos.

I.5.- Efeito do pH

O efeito do pH na produção da atividade FOx foi estudado numa cultura contendo 1,5% de serragem e 0,5% de glicose como substratos. Os experimentos foram conduzidos numa faixa de pH de 4,0 a 9,0. O pH foi ajustado com HCl e/ou NaOH (0,1 N), antes da esterilização dos caldos de cultura. Uma cultura sem prévio ajuste de pH (pH 7,3 do caldo Czapek antes de esterilizar) foi utilizada para efeitos de comparação.

II.- Análise dos Caldos Extracelulares

As culturas inoculadas e os controles foram incubados durante 15 a 20 dias, nas condições especificadas para cada experimento. Em intervalos apropriados de tempo, alíquotas de aproximadamente 5,0 mL foram retiradas sob condições estéreis de cada Erlenmeyer contendo 100 mL de caldo. As alíquotas foram posteriormente filtradas através de uma membrana Millipore (0,45µm), e os filtrados foram analisados quanto à pH, concentração de açúcares, concentração de proteína e atividades enzimáticas.

II.1.- Determinação da Variação do pH das Culturas

A variação do pH do meio em relação ao pH ajustado antes da esterilização foi monitorado durante o período de incubação das culturas.

II.2.- Determinação de Açúcares

Os açúcares presentes no caldo de cultura foram determinados como açúcares redutores pelo método de MILLER (1959) que utiliza o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) como reagente.

Para dosagem dos açúcares, 3,0 ml do reagente DNS foram adicionados a 1,5 ml de caldo de cultura filtrado. A mistura foi incubada em banho de água a 100°C durante 5 minutos, após o qual a reação foi detida por esfriamento da mistura até temperatura ambiente. A absorbância foi lida a 540 nm (espectrofotômetro Beckman DU-70) e os açúcares redutores expressos como mg/mL de glicose, utilizada como padrão.

II.3.- Determinação de Proteína Extracelular

O teor de proteína solúvel ou extracelular produzido pelo fungo em culturas líquidas foi determinado pelo método de BRADFORD (1976). A dosagem foi feita pela adição de 5,0 mL de Azul de Coomassie brilhante G-250 para 0,1 mL de caldo filtrado. A mistura foi incubada à temperatura ambiente e após 5 minutos a absorbância foi lida a 595 nm (albumina bovina foi utilizada como padrão).

II.4.- Determinação das Atividades Enzimáticas

Diferentes atividades enzimáticas relacionadas com a degradação de lignina foram determinadas nos caldos de cultura inoculados. As culturas não inoculadas (controles) que continham os substratos lignocelulósicos, foram utilizadas como controles enzimáticos para descartar possíveis interferências com os métodos de determinação das atividades. Todas as atividades foram determinadas espectrofotometricamente. Quando não especificado, as atividades foram expressas como μ moles de substrato oxidado durante um minuto, por mL de caldo filtrado (UI/mL). Os resultados são informados como a média de três determinações. O desvio padrão do valor médio variou entre 1-3%, dependendo do experimento.

II.4.1.- Fenoloxidases

A atividade FOx foi determinada sob duas formas: na ausência de H₂O₂ exógeno no meio de reação, tipo lacase, e após adição de H₂O₂, tipo peroxidase. Para descartar a possível interferência de peroxidase na determinação de lacase, o caldo foi previamente tratado com catalase (1,0 U/mL) para degradar qualquer H₂O₂ que pudesse estar presente nos caldos extracelulares.

i) Lacase (SZKLARZ *et alii.*, 1989, modificado)

A atividade lacase foi determinada utilizando o-dianisidina e siringaldazine como substratos enzimáticos. A oxidação de o-dianisidina ($\epsilon_{460}=29.400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) foi conduzida numa mistura de reação que continha 0,6 mL do caldo filtrado, 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05M (pH 3,0) e 0,1 mL de o-dianisidina 1,0 mM, num volume final de 1,0 mL. A reação iniciou-se pela adição da o-dianisidina e a velocidade de oxidação desta foi acompanhada durante 10 minutos a 460 nm.

A oxidação de siringaldazine até sua forma quinona foi acompanhada durante 10 minutos a 525 nm ($\epsilon_{525} = 65.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A mistura de reação foi preparada da mesma forma como para o-dianisidina, exceto que a solução de 1,0 mM de siringaldazine foi preparada em etanol.

Uma unidade de atividade FOx tipo lacase foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de substrato (o-dianisidina ou siringaldazine) por minuto e por mL de caldo de cultivo.

ii) Peroxidase (SZKLARZ *et alii.*, 1989)

A mistura de reação para determinação da atividade peroxidase foi preparada nas mesmas condições como para lacase, utilizando-se os mesmos substratos enzimáticos, porém na presença de 0,1 mL de H_2O_2 2,0 mM. A atividade de peroxidase foi expressa em UI/mL.

II.4.2.- Lignina-Peroxidase (TIEN e KIRK, 1984)

A atividade de lignina peroxidase (LiP) foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico ($\epsilon_{310} = 9.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A mistura de reação (1,0 mL) continha 0,6 mL de caldo filtrado, 0,2 mL de H_2O_2 2,0 mM e 0,2 mL de uma solução de álcool veratrílico 2,0 mM em tampão tartarato de sódio 0,4 M (pH 3,0). A reação foi iniciada pela adição do H_2O_2 e o aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado lendo-se a absorbância a 310 nm. A atividade de LiP foi expressa em UI/mL.

II.4.3.- Álcool Veratrílico Oxidase (AVO)

A atividade AVO foi determinada na mesma forma que LiP exceto que o H_2O_2 foi omitido do meio de reação. A atividade AVO foi expressa em UI/mL.

II.4.4.- Manganês-Peroxidase (KUWAHARA *et alii.*, 1984)

A atividade de peroxidase dependente de Mn(II) (MnP) foi determinada pela oxidação de vermelho de fenol. A mistura de reação (1,0 mL) continha 0,5 mL de caldo filtrado, 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 M, 0,2 mL albumina bovina 0,5%, 0,05 mL de MnSO_4 2,0 mM, 0,05 mL de uma solução de H_2O_2 2,0 mM preparada em tampão succinato de sódio 0,2 M (pH 4,5) e 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%. A mistura foi incubada a 30°C durante 5 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 40 μL de NaOH 2,0 N. A absorbância foi lida a 610 nm e a atividade de MnP foi expressa como $\Delta\text{Abs}/\text{mLmin}$.

II.4.5.- Celobiose-quinona oxidoreductase (WESTERMARK e ERIKSSON, 1974; modificado)

A atividade de CBQ foi determinada por uma modificação do método de WESTERMARK e ERIKSSON (1974b), através da redução da 1,4-benzoquinona, com concomitante oxidação de celobiose. A mistura de reação (3,0 mL) continha 0,6 mL de caldo filtrado, 1,5 mL de tampão acetato 0,1 M (pH 4,5), 0,5 mL de uma solução etanólica de 1,4-benzoquinona 20 mM e 0,4 mL de celobiose 50 mM.

A diminuição da absorbância devida à redução da 1,4-benzoquinona foi acompanhada durante 10 minutos a 290 nm. Uma unidade de atividade CBQ foi definida como a quantidade de enzima que reduz 1,0 μmol de quinona por mL de caldo e por minuto.

II.5.- Determinação de H₂O₂ Extracelular

Os caldos extracelulares de *T.aurantiacus* foram analisados quanto à produção de H₂O₂. Aliquotas do caldo foram retiradas das culturas em diferentes tempos durante o período de incubação e analisadas após filtração por membrana Millipore (0,45 µm).

A dosagem do H₂O₂ foi feita segundo PICK e KEISARI (1980), utilizando-se uma solução de peroxidase de rabanete (HRP Tipo VI) e vermelho de fenol. A solução de peroxidase e vermelho de fenol (A) foi preparada no momento do ensaio pela mistura de 0,14 M de NaCl, 0,01M de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 5,5 mM de glicose, 0,28 mM de vermelho de fenol e 8,5 U/mL (50 µg/mL) de peroxidase.

O método de quantificação do H₂O₂ consistiu na incubação de 10 µL de caldo filtrado com 1,0 mL da solução A, durante 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a reação foi interrompida pela adição de 10 µL de NaOH 1,0 N e a absorbância lida a 610 nm, contra um branco contendo 1,0 mL da solução A, 10 µL de caldo de cultura não inoculado e 10 µL de NaOH 1,0 N. Os valores de absorbância foram expressos como µmoles de H₂O₂ utilizando-se uma curva padrão construída com diferentes concentrações de H₂O₂ entre 0,1 e 100 µM.

II.6.- Determinação do Peso Seco

No final do período de incubação, o crescimento fúngico foi determinado como a produção de massa micelial e expresso como peso seco em mg. Para separação dos micélios fúngicos, os caldos de cultura foram filtrados através de papel de filtro previamente pesado. Quando foram utilizados substratos lignocelulósicos, o micélio foi separado cuidadosamente do substrato e lavado várias vezes com água destilada. O micélio foi seco em estufa a 100°C durante 12 horas e posteriormente pesado.

4.2.2.- PROPRIEDADES DO EXTRATO BRUTO

A partir de caldos de cultura induzidos com farelo de trigo, incubados nas melhores condições para produção de atividade FOx, foram obtidos os extratos brutos utilizados neste estudo. Os caldos utilizados apresentaram valores de atividade FOx entre 0,8 e 1,5 UI/mL. Os caldos de cultura foram coletados, filtrados por membrana Millipore (0,45 µm) e armazenados a -20°C. Nestes caldos foi analisada uma série de propriedades.

i) Efeito do pH na Atividade FOx

O estudo da influência do pH e da natureza do tampão na oxidação de o-dianisidina pelo extrato bruto foi conduzido utilizando-se os seguintes tampões em concentração de 50 mM: Citrato-fosfato (pH 2,6-7,0), Citrato de sódio (pH 3,0-6,0), Acetato de sódio (pH 3,6-5,5), Tartarato de sódio (pH 2,5-4,0), Fosfato de sódio (pH 6,5-8,0).

A atividade FOx tipo lacase foi ensaiada numa aliquota do extrato bruto, incubada nos diferentes tampões e pHs com 1,0 mM de o-dianisidina, à temperatura ambiente (25°C), como descrito anteriormente (item II.4.i).

A estabilidade do extrato bruto em função do pH foi determinada pela atividade FOx residual, após pré-incubação do extrato em tampão citrato-fosfato 50 mM (pH 2,6-6,0), durante diferentes intervalos de tempo, à temperatura de 25°C. Posteriormente, as aliquotas

retiradas nos diferentes tempos foram ensaiadas no pH ótimo da reação com 1,0 mM de o-dianisidina.

ii) Efeito da Temperatura na Atividade FOx

A influência da temperatura na atividade FOx do extrato bruto foi verificada utilizando-se um espectrofotômetro Beckman DU-70, com um controlador de temperatura acoplado. A reação de oxidação de 1,0 mM de o-dianisidina foi conduzida numa faixa de temperatura de 10- 80°C, em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 2,8.

A termoestabilidade do extrato bruto foi determinada por pré-incubação do extrato num banho de água nas temperaturas de 50, 80 e 100°C, durante diferentes períodos de tempo. Uma alíquota do caldo foi retirada nos diferentes tempos de pré-incubação, esfriada até temperatura ambiente, e a atividade residual de oxidação de 1,0 mM de o-dianisidina foi determinada em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 2,8.

iii) Efeito da Diluição do Extrato Bruto na Atividade FOx

A partir do extrato bruto original foram preparadas diferentes diluições, utilizando-se volumes entre 10 e 100 µL do extrato. Com estas diluições foi ensaiada a oxidação de 1,0mM de o-dianisidina em tampão citrato-fosfato 50mM, pH 2,8, à 25°C.

iv) Efeito da Concentração de Substrato na Atividade FOx

Foi avaliado o efeito da concentração de substrato na atividade FOx do extrato bruto. Para tal, a atividade do extrato foi ensaiada com concentrações variadas de o-dianisidina em uma faixa de 0,1 a 4,0 mM (concentração final no meio de reação), em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 2,8, à 25°C.

A constante de Michaelis (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) foram calculadas mediante distribuição dos dados no gráfico dos duplos recíprocos de velocidade de reação *versus* concentração de substrato, de acordo com o método de LINEWEAVER e BURK (1934).

v) Especificidade pelo Substrato

Uma série de compostos foram estudados como possíveis substratos para a atividade FOx presente no extrato bruto. O ensaio foi conduzido a 25°C, utilizando-se o extrato bruto em diluição apropriada, tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 2,8, e 1,0 mM de cada substrato. Nestas condições foi determinada a velocidade de reação pelo aumento ou pela diminuição da absorbância no comprimento de onda correspondente para cada composto. A atividade foi expressa como $\Delta Abs. mL^{-1} min^{-1}$. A atividade relativa foi calculada utilizando como referência a velocidade de oxidação de o-dianisidina (100%).

Os substratos utilizados foram: o-dianisidina (utilizada como referência), 2,2'- Azino-bis (3 etil- benzotiazolina- 6 ácido sulfônico) (ABTS), siringaldazine, Remazol Brilliant Blue (RBB-R), 5-hidroxindol, tirosina, guaiacol, 2,6-dimetoxifenol (DMF), álcool veratrílico, o-nitroanilina, p-nitroanilina, resorcinol, orcinol, pirogalol e floroglucinol. O espectro de absorbância de cada substrato foi registrado entre 220 a 700 nm, em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 2,8 e 25°C, com o objetivo de determinar o comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{m\acute{a}x}$) de cada composto nas condições do ensaio enzimático.

vi) Efeito de Diferentes Compostos na Atividade FOx

Foi estudado o efeito de diferentes substâncias como inibidores da atividade FOx do extrato bruto. Para tal, foram utilizados: azida sódica (NaN_3), ácido etilenodiamino-tetracético (EDTA-Na), ácido dietilenotriamino-pentacético (DETAPAC), ácido tioglicólico e p-hidroximercuribenzoato. O efeito do inibidor sobre a atividade FOx foi estudado por pré-incubação de um volume do caldo filtrado com 1,0 mM do composto durante 6 minutos a 25°C. A atividade FOx foi ensaiada com 1,0 mM de o-dianisidina, em tampão citrato-fosfato 50 mM (pH 2,8) e 25°C.

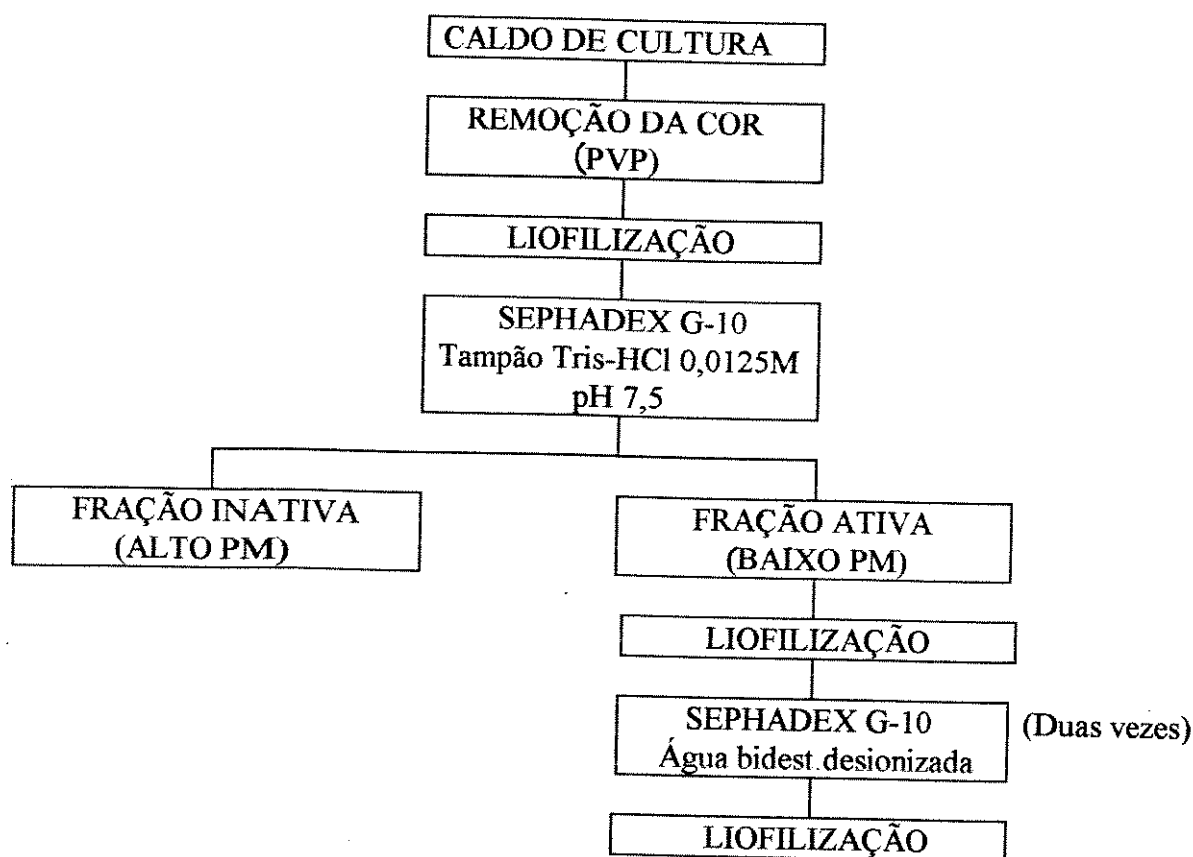
4.2.3.- PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UMA FRAÇÃO COM ATIVIDADE FOx

Os caldos de cultura obtidos após crescimento de *T.aurantiacus* em meio contendo farelo de trigo (1,5%), foram utilizados nesta etapa uma vez que este substrato induziu as maiores atividades FOx. Os caldos que apresentaram alta atividade foram coletados, filtrados e congelados até sua utilização no processo de purificação. Em cada etapa do processo de purificação a atividade FOx foi determinada como descrito no item II.4.i, com 1,0 mM de o-dianisidina em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 2,8. Diferentes metodologias foram conduzidas na purificação da atividade fenoloxidásica. A primeira foi a metodologia de GEIGER e colaboradores (1986), para purificação de fenoloxidasas do tipo lacase. O procedimento, com pequenas modificações, é mostrado a seguir (Esquema I).



ESQUEMA I

A segunda metodologia foi uma modificação da primeira, onde se eliminou a etapa de concentração por ultrafiltração (Esquema II).



ESQUEMA II

i) Tratamento para Remoção da Cor dos Caldos de Cultura

Devido à presença de farelo de trigo ou serragem de *E. grandis* como substratos indutores de atividade FOx e, devido à produção de um pigmento marrom por *T. aurantiacus*, os caldos de cultura apresentaram uma intensa cor escura.

A cor dos caldos, que interfere no processo de purificação foi removida por dois tratamentos alternativos. Um deles utiliza a resina de troca aniônica DEAE-celulose, onde a cor dos caldos e a atividade FOx são adsorvidos (GEIGER *et alii.*, 1986; LEATHAM *et alii.*, 1991) e o outro utiliza o polímero insolúvel polivinilpirrolidona (PVP), onde principalmente a cor dos caldos é adsorvida (ALFENAS *et alii.*, 1991)

O tratamento dos caldos com DEAE-celulose consistiu na adição direta de uma pequena quantidade da resina ao caldo de cultura. Após 1 h, sob agitação constante à temperatura de 25°C, filtrou-se à vacuo através de um tecido em funil Buchner. O processo foi controlado através da determinação da atividade FOx no filtrado e repetido até máxima adsorção da atividade e da cor. Após a segunda adição de resina praticamente toda a cor e atividade FOx do caldo foram retidas na DEAE-celulose. As frações de DEAE-celulose foram juntadas e a atividade foi eluída com tampão fosfato de sódio 0,0125 M, pH 6,0, contendo 0,5 M de NaCl. A eluição foi repetida até recuperação da maior parte da atividade. Os eluatos ativos, quase completamente clarificados, foram juntados e concentrados por ultrafiltração. A resina, que reteve a cor escura dos caldos, foi descartada.

O tratamento com PVP consistiu na adição de uma pequena quantidade do polímero no caldo de cultura. Após 1 h, sob agitação à temperatura de 25°C, a mistura foi deixada em repouso durante 1 h e finalmente o polímero foi recuperado por filtração, da mesma forma já descrita com DEAE. Com PVP somente a cor dos caldos foi adsorvida, enquanto praticamente toda a atividade FOx permaneceu no caldo. O tratamento com PVP foi repetido pela adição de mais polímero no caldo já tratado. Geralmente, a primeira adição do polímero era suficiente para reter grande parte da cor do caldo.

A cor dos caldos foi monitorada espectrofotometricamente pela leitura da absorbância em 400 nm. A atividade FOx foi determinada antes e depois do tratamento com DEAE-celulose e PVP.

ii) Concentração dos Caldos

O caldo obtido após tratamento com DEAE-celulose ou PVP foi submetido a duas etapas de concentração por ultrafiltração. A primeira concentração foi conduzida utilizando um conjunto de membranas com capacidade de retenção de substâncias com uma massa molecular acima de 10 kDa (corte 10 kDa), num aparelho Minitan (Millipore). O caldo foi concentrado cerca de 10 vezes. O concentrado (Fração I) e o filtrado (Fração II) obtidos nesta etapa apresentaram atividade FOx. O concentrado foi imediatamente liofilizado para posterior análise e o filtrado submetido a uma nova concentração. O filtrado (Fração II) foi concentrado cerca de 10 vezes, utilizando desta vez uma membrana de corte 1 kDa, que permite a passagem de substâncias com uma massa molecular menor de 1 kDa, num aparelho Amicon.

O filtrado (Fração IV) obtido através da membrana de corte 1 kDa, que apresentou a maior atividade FOx, foi liofilizado até obtenção de um pó de leve coloração amarela. O concentrado obtido nesta etapa (Fração III), que também apresentou atividade FOx, foi liofilizado.

As diferentes frações de alta e baixa massa molecular, concentradas por ultrafiltração (Frações I, III e IV) e posteriormente liofilizadas, foram armazenadas a -20°C até o momento de sua utilização.

iii) Purificação por Colunas de Filtração

As amostras liofilizadas, obtidas após os procedimentos i e ii foram purificadas por filtração em colunas de Sephadex G-25 e G-10. As cromatografias foram conduzidas à temperatura de 25°C. Amostras (1,0 mL) obtidas a partir do esquema I de purificação foram aplicadas a uma coluna de Sephadex G-25 (1 x 10 cm), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 7,5. A coluna foi eluída com o mesmo tampão e frações de 1,0 mL

foram coletadas com um fluxo de 0,3 mL/min. O volume de vazio (V_0) desta coluna, determinado com azul de dextrano (PM 2.000 kDa), foi de 6,0 mL.

Uma segunda coluna de Sephadex G-10 (1,5 x 50 cm) foi preparada, onde amostras de 2,0 mL foram aplicadas. A coluna foi equilibrada e eluída com água bidestilada e desionizada e frações de 2,5 mL foram coletadas com um fluxo de 0,21 mL/min. O V_0 desta coluna foi de 37,5 mL. Dependendo do experimento a coluna foi equilibrada e eluída com tampão.

Esta coluna foi utilizada também no estudo dos perfis de eluição de diferentes culturas em meio Czapek (pH 6,0) contendo: a) 1,5% de glicose, b) 1,0% de serragem, acrescentado de 0,5% glicose e c) 1,5% de farelo de trigo controle (não inoculado). Os caldos foram filtrados por membrana Millipore (0,45 μ m) e tratados segundo o Esquema II de purificação. O tampão de equilíbrio da coluna e de eluição das frações foi Tris-HCl 0,025 M, pH 7,5, e as condições de eluição foram as mesmas descritas para a coluna de Sephadex G-10.

Nas frações eluídas das colunas o teor de proteína foi estabelecido através da leitura direta da absorbância em 280 nm (LAYNE, 1957) e a atividade FOx foi determinada pela oxidação de 1,0 mM de o-dianisidina. As frações contendo a atividade FOx foram reunidas, liofilizadas e armazenadas a -20°C para posterior análise.

4.2.4.- CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO COM ATIVIDADE FOx PARCIALMENTE PURIFICADA

i) Propriedades Cinéticas

As propriedades cinéticas da fração parcialmente purificada (fração obtida da coluna de Sephadex G-10) foram determinadas da mesma forma como descrito para o extrato bruto (item III). Para o estudo da caracterização foi utilizada uma solução de liofilizado da fração ativa ressuspensa em água bidestilada e desionizada.

ii) Caracterização Físico-Química

a) Determinação de Proteína

A proteína presente na fração ativa parcialmente purificada e liofilizada foi quantificada através de dois métodos diferentes. Utilizou-se o método de BRADFORD (1976), com Azul Brilhante de Coomassie como descrito anteriormente (item II.3), e o método de Lowry (HARTREE, 1972). Em ambos casos utilizou-se albumina bovina como padrão.

b) Análise de Aminoácidos

A fração ativa parcialmente purificada foi submetida a uma hidrólise com HCl 6,0 N a 104°C, durante 24 horas em atmosfera de nitrogênio. Após lavagem da amostra com água bidestilada e desionizada, esta foi liofilizada, ressuspensa em tampão citrato de sódio pH 2,2 e aplicada num analisador de aminoácidos (AMINOCHROM OE-914).

c) Determinação da Massa Molecular da Fração Ativa

Para determinação da massa molecular da fração semi-purificada, uma coluna de Sephadex G-10 (1,5 x 50 cm) foi calibrada com os seguintes marcadores de baixa massa molecular (em Da): Glutathiona oxidada (610,0), Flavina mononucleotídeo (455,4) e Riboflavina (376,4). O volume de vazio (V_0) da coluna foi determinado com Azul de

Dextrano (2.000 kDa). A coluna foi eluída com um fluxo de 0,21 mL/min. A massa molecular aparente da fração ativa foi determinada a partir do gráfico " $K_{av} \times \log PM$ ".

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

onde :

V_e = volume de eluição da amostra

V_o = volume morto da coluna = 37,5 mL

V_t = volume total da coluna = 107,0 mL

d) Caracterização da Fração Ativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Uma amostra da fração parcialmente purificada foi aplicada em uma coluna de fase reversa, ODS-II (25cmx10mm; WATERS) e analisada por HPLC (WATERS 600E/MILLIPORE). Uma solução de Metanol/Água em diferentes proporções foi utilizada como fase móvel. A coluna foi eluída com um fluxo de 2,0 mL/min, sob uma pressão de 400 psi. As frações eluídas foram monitoradas pela leitura da absorbância em 220 nm.

e) Caracterização Estrutural

Espectroscopia UV/Vis

Os espectros de absorbância UV/Vis (200 a 700 nm) da fração ativa parcialmente purificada (liofilizado ressuspenso em água bidestilada e desionizada) foram registrados num espectrofotômetro BECKMAN modelo DU-70, à temperatura aproximada de 25°C.

Ressonância Magnética Nuclear de Proton (1H) e de Carbono (^{13}C)

As amostras para RMN de 1H e ^{13}C foram preparadas por dissolução do liofilizado da fração ativa em dimetilsulfóxido (DMSO). Os espectros foram registrados a 300 MHz em espectrômetro VARIAN GEMINI, utilizando tetracloreto de carbono (CCl_4) e tetrametilsilano (TMS) como referência interna do aparelho.

Infravermelho

O espectro de infravermelho da fração ativa liofilizada foi registrado entre 4.000 e 500 cm^{-1} utilizando pastilha de KBr, num aparelho PERKIN ELMER 1430.

Espectrometria de Massas

O espectro de massas da fração ativa liofilizada foi registrado a 70 eV em um espectrômetro de massas VARIAN MAT 311A, através da técnica de ionização por impacto de elétrons (EI). O ponto de fusão da amostra previamente determinado foi de aproximadamente 114°C.

Espectrografia de Rede Plana

A fração ativa foi analisada quanto à presença de metais por espectrografia de rede plana. Para tal, a amostra foi misturada com grafite e o espectro de emissão foi registrado.

f) Quantificação de Ferro

O ferro presente na fração ativa purificada foi quantificado através de reação colorimétrica com o-fenantrolina e através de absorção atômica.

Determinação Colorimétrica com o-fenantrolina:

O ferro presente na fração ativa, previamente hidrolisada como descrito antes (6,0N HCl/104°C), foi determinado com o-fenantrolina pela formação de um complexo cromogênico com Fe (II), que absorve em 510 nm.

O Fe total presente na amostra foi determinado por tratamento prévio do material com hidroxilamina, que reduz todo o Fe presente para Fe(II). A determinação como Fe(II) foi feita na ausência de hidroxilamina, e o Fe(III) foi obtido pela diferença dos resultados anteriores. A concentração de ferro foi obtida de uma curva padrão preparada com FeSO₄ em uma faixa de concentração de 0,2- 4,0 ppm (LUNDBORG, 1988).

Absorção Atômica:

Uma quantidade de amostra da fração ativa foi dissolvida em HNO₃ 0,2%, e o ferro presente foi quantificado por absorção atômica em chama de ar/acetileno. Foram utilizadas como padrões soluções de ferro metálico preparadas em HNO₃ 0,2%, numa faixa de concentração de 0,1- 2,0 ppm.

4.2.5.- PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS POR *T.aurantiacus*

i) Detecção de Sideróforos em Meio Líquido

O método universal de SCHWYN e NEILANDS (1987) para a determinação de sideróforos foi utilizado para detectar a presença destes em culturas líquidas de *T.aurantiacus*, utilizando-se glicose (1,0%) ou farelo de trigo (1,5%) como substratos. Quando um agente quelante, como um sideróforo, retira o Fe(III) do complexo indicador universal de sideróforos CAS, a cor muda completamente do azul para o laranja, acompanhado de uma diminuição na absorbância em 630 nm.

A solução do complexo indicador ternário continha: 0,15 mM do reagente chromo azurol S, 0,015 mM de uma solução de FeCl₃ em HCl, 0,6 mM do detergente brometo de hexadeciltrimetil- amônio (HDTMA) em solução tampão de piperazina/HCl pH 5,6. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água bidestilada e desionizada. O reagente CAS complexado com Fe (III) na solução possui uma intensa cor azul com um $\epsilon = 100.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 630 nm e pH 5,6.

O ensaio consistiu na adição de 0,5 mL da solução reagente CAS para 0,5 mL de caldo de cultura ou solução contendo o sideróforo. A mistura foi incubada durante 12-24 horas à temperatura ambiente, e a absorbância foi lida em 630 nm.

Um controle deve ser preparado utilizando-se uma alíquota de meio de cultura sem inocular, isto porque alguns compostos com afinidade por Fe(III), como citrato e fosfato, quando presentes em altas concentrações (> 0,1 M) podem dar reação positiva com CAS.

As unidades percentuais de sideróforo foram definidas pela seguinte fórmula (COX, 1994):

$$\% \text{ Unidades} = \frac{(Ab - Aa)}{Ab} \times 100$$

onde:

Ab = Absorbância do controle

Aa = Absorbância da amostra

ii) Detecção de Sideróforos em Meio Sólido

Para a determinação da produção de sideróforos em meio sólido por *T.aurantiacus*, o reagente CAS foi incorporado no meio de cultura Czapek modificado.

O meio Czapek foi preparado com NaNO_3 (2,0 g/L), MgSO_4 (0,5 g/L), KCl (0,5 g/L), CaCl_2 (0,3 g/L), 3% de glicose e 1,5% de agar, e tamponado para pH 6,8 com tampão PIPES. O fosfato e o Fe dos elementos traços foram omitidos do meio. Uma solução contendo CAS (0,1 mM), Fe(III) (0,01 mM) e HDTMA (0,2 mM) foi preparada separadamente e após esterilização a 121°C por 15 minutos e, quando o meio Czapek e o CAS alcançaram uma temperatura de aproximadamente 50°C, estes foram misturados. Finalmente o meio (de cor azul claro) foi distribuído em placas de Petri (35 mL/ placa).

O fungo foi inoculado nestas placas e incubado a 48°C. A reação positiva verificou-se pelo aparecimento de um halo alaranjado ao redor da colônia do fungo.

iii) Preparação de Sideróforos Livres de Fe (III)

Uma preparação de sideróforo livre de Fe(III) ("desferrisideróforos") pode ser obtida após tratamento com 8-hidroxiquinoleína, segundo metodologia de JALAL e colaboradores (1985).

Uma amostra do provável sideróforo de aproximadamente 40 mg, parcialmente purificado, foi dissolvida em 5,0 mL de água bidestilada e desionizada, e tratada com um excesso de 8-hidroxiquinoleína (0,5 g). A mistura foi incubada durante uma noite à 40°C e então a 8-hidroxiquinoleína que não reagiu e o seu complexo férrico foram retirados da mistura por extração com clorofórmio (3 extrações com pequenos volumes do solvente). A solução aquosa, que deveria conter o sideróforo livre de Fe (III), foi finalmente liofilizada.

4.2.6.- UTILIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DOS EXTRATOS COM ATIVIDADE FOx DE *T.aurantiacus*

Uma fração com alta atividade FOx, obtida após ultrafiltração em membrana de 1kDa, foi utilizada no tratamento dos efluentes da indústria papeleira. Um extrato com alta atividade FOx, tratado com PVP e concentrado por liofilização, foi utilizado no tratamento de polpa Kraft de Eucalipto.

i) Tratamento de Efluentes da Indústria Papeleira

Efluente

O efluente utilizado neste estudo foi obtido após o primeiro estágio de extração alcalina (E₁) de uma polpa de madeira de *Eucaliptus* branqueada pelo processo Kraft, apresentando um pH entre 9,5 e 13,0. O efluente foi fornecido pela RIPASA S.A. - Celulose e Papel, Limeira, S.P.

Condições de Tratamento do Efluente

Antes de iniciar o tratamento, o efluente foi filtrado por membrana Millipore (0,45 µm) para remover todas as partículas em suspensão; posteriormente o pH foi ajustado para 4,0 com H₂SO₄ 2,0 N, e finalmente o efluente foi autoclavado a 121°C durante 10 minutos. Após esta etapa o efluente foi novamente filtrado e o pH ajustado para 4,0. Aliquotas de 5,0 mL do efluente foram adicionadas a 200 mg do liofilizado (250 U/L de atividade FOx), e posteriormente incubadas a 25°C sob condições estáticas e de agitação (125 rpm), durante 72 horas. Amostras controle (contendo somente o efluente) foram incubadas nas mesmas condições das amostras inoculadas. O experimento foi realizado em triplicata.

Determinação da Cor dos Efluentes

A cor do efluente foi determinada sempre após filtração do efluente por membrana Millipore (0,45 µm), e depois de ajustar o pH para 7,6 com tampão fosfato 0,1 M. Para ajuste do pH, efluente e tampão foram misturados numa proporção de 1:2. Nestas condições a absorbância dos efluentes controles e inoculados, a tempo zero e depois de 72 h, foi lida em 465 nm, contra um branco de água destilada e tampão (ATLOW *et alii.*, 1984).

Determinação dos Fenóis Totais

O conteúdo de fenóis totais nos efluentes controles e inoculados, previamente filtrados, foi determinado pelo método padrão descrito pela APHA (1989) com o reagente de Folin-Ciocalteu. A mistura de reação foi preparada pela adição de 250 µL de uma solução de carbonato-tartarato e 25 µL de uma solução do reagente de Folin-Ciocalteu, para 1,0 mL de efluente. A mistura foi incubada durante 30 min a 20°C, após o qual a absorbância foi lida a 700 nm contra um branco que continha água no lugar do efluente. Os valores de absorbância foram expressos como mg/L de fenóis totais utilizando-se fenol puro como padrão.

A solução de carbonato-tartarato foi preparada por dissolução de 200 g de carbonato de sódio e 12 g de tartarato de sódio em 1,0 L de água destilada.

Distribuição de Massa Molecular das Cloroligninas contidas nos Efluentes

As mudanças na distribuição da massa molecular das cloroligninas contidas nos efluentes foram estudadas por filtração em gel em coluna de Sephadex G-50 (1,5x60 cm). O V₀ desta coluna foi de 44,5 mL. A coluna foi equilibrada e eluída com uma solução de NaOH- LiCl 0,1 N. Um mL de efluente, tratado e controle, previamente filtrado, foi aplicado à coluna e eluído com um fluxo de 0,7 mL/min. Os cromatogramas foram obtidos por contínuo monitoramento da absorbância das cloroligninas em 280 nm (BERGBAUER *et alii.*, 1992; WANG *et alii.*, 1992).

ii) Tratamento de Polpa Kraft de Eucalipto

Polpa

Utilizou-se uma polpa obtida de madeira de **Eucalipto** através do processo Kraft, produzida na indústria de Papel e Celulose São Simão, Jacareí, S.P.. O número Kappa inicial da polpa lavada foi de 16,5, a viscosidade de 42,3 cp e a consistência de 30% (30 g de polpa/100 mL água). A polpa foi utilizada como recebida, somente que o pH foi acertado com H_2SO_4 0,1N, de acordo com cada experimento.

Condições de Tratamento da Polpa

Os diferentes tratamentos com o extrato ativo de *T.aurantiacus*, foram feitos utilizando-se 3,0 unidades de atividade FOx por grama de massa seca de polpa e 1,5 g de polpa (massa seca). A consistência inicial da polpa foi de 30% e após adicionar o volume desejado de extrato na polpa, acrescentou-se água até alcançar uma consistência de 10%. Como mencionado anteriormente, o pH da polpa foi ajustado dependendo do experimento, trabalhando-se assim com a polpa em pH 3,0 e 5,0.

As misturas de polpa e extrato ativo foram colocadas dentro de sacos de polietileno e incubadas em um banho a 50°C durante 30, 60 e 90 minutos. Posteriormente, as polpas foram lavadas exaustivamente com água destilada e secas sob luz infra-vermelha até massa constante. Finalmente, nas polpas tratadas e nas polpas controles foram determinados alguns parâmetros de controle do processo de branqueamento como número Kappa e viscosidade, seguindo as normas TAPPI (1988). As polpas controles não foram tratadas com o extrato ativo, porém foram submetidas ao mesmo processo de incubação.

Tratamento da Polpa na presença de ABTS

O efeito da adição do composto ABTS no branqueamento da polpa Kraft de **Eucalipto** foi estudado nas mesmas condições de tratamento anteriores. O ABTS, em concentração de 1,0 mM, foi adicionado diretamente sobre a mistura do extrato ativo e a polpa, a pH de 3,0 e 5,0. A incubação da mistura foi conduzida como descrito, a 50°C durante 90 minutos.

Extração Alcalina das Polpas Tratadas

Após o tratamento das polpas com o extrato contendo a atividade FOx, estas foram submetidas a uma extração alcalina com 4,0% de NaOH, a 70°C durante 60 minutos. As polpas controles também foram submetidas à extração alcalina. Após a extração alcalina, nas polpas tratadas e controles foram determinados o número Kappa e a viscosidade.

Determinação do Número Kappa

O número Kappa representa a branqueabilidade ou grau de deslignificação de uma polpa de celulose e é definido como o número de mL de uma solução de KMnO_4 0,1N consumido por 1,0 grama de polpa seca. Os resultados são corrigidos para dar um consumo de 50% de KMnO_4 em contato com a amostra (TAPPI T-236 os-76).

Cada amostra de polpa destinada à determinação do número Kappa, pesando entre 0,5 e 1,0g massa seca, foi cuidadosamente desintegrada, até ficar livre de grumos e feixes de fibras não dispersas. As amostras foram transferidas para um Erlenmeyer de 300 mL, realizando-se numerosas lavagens com 140 mL de água destilada. A temperatura do sistema foi ajustada em

25°C. Posteriormente, o Erlenmeyer contendo a polpa foi colocado num banho de temperatura constante, assegurando uma temperatura de $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ durante toda a reação. A suspensão foi agitada continuamente com auxílio de uma barra magnética, devendo ser controlada para não introduzir ar na mistura.

Para polpas de celulose com baixos teores de lignina, com um Kappa entre 2,5 e 35, pipetaram-se 25 mL de KMnO_4 $0,1000 \pm 0,0005$ N num Erlenmeyer de 125 mL e adicionaram-se 25 mL de H_2SO_4 4,0 N. Esta solução foi adicionada ao Erlenmeyer contendo a polpa e simultaneamente o tempo de incubação foi cronometrado durante 10 minutos. Lavou-se então com 50 mL de água destilada, que foram adicionados à mistura de reação. A reação foi interrompida depois dos 10 minutos, por adição de 5,0 mL de KI 1,0 M.

O iodo livre presente na suspensão foi titulado com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) $0,1000 \pm 0,0005$ N imediatamente após a mistura, mas sem filtrar as fibras, e até a solução ficar com uma tonalidade amarelo claro. Em seguida, foram adicionadas duas gotas de solução de amido e a titulação foi conduzida até a viragem da cor azul para branca.

Um branco foi preparado utilizando o mesmo procedimento, porém sem a polpa de celulose. Neste caso a mistura foi titulada com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ imediatamente.

Finalmente, o valor do número Kappa foi calculado através das seguintes equações:

$$K = \frac{P \times f(P) \times f(T)}{w}$$

$$P = \frac{(b - a) N}{0,1}$$

onde:

$f(P)$ = Fator de correção do consumo de KMnO_4 a 50%; dependendo do valor de p. Ver Tabela 1A (Apêndice I)

$f(T)$ = Fator de correção da temperatura. Ver Tabela 2A (Apêndice I)

w = Peso (em gramas) da polpa seca

P = Volume (mL) de KMnO_4 0,1 N consumido pela amostra de polpa

b = Volume (mL) de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumido pelo branco

a = Volume (mL) de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumido pela amostra de polpa

N = Normalidade do $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Determinação da Viscosidade

Para determinação da viscosidade da polpa de celulose foi utilizado o método do Tubo Capilar (TAPPI T-230 su-63).

A amostra de polpa seca, pesando exatamente 0,125 g, foi colocada em um frasco pequeno e com tampa, e em seguida foram adicionados 25 mL de uma solução de etilenodiamina cúprica 0,5 M. A mistura foi agitada durante 10 minutos com uma barra magnética e transferida para a

pipeta de viscosidade Fenske-Oswald, previamente aferida com óleo padrão e usada dentro dos limites de viscosidade apropriados. O tempo de escoamento foi cronometrado. Finalmente, a viscosidade da polpa de celulose foi calculada em centipoises, de acordo com a seguinte equação :

$$V \text{ (cp)} = K \times t \times d$$

onde:

V = Viscosidade da celulose em centipoises

K = Constante da pipeta

t = Tempo de escoamento em segundos

d = Densidade da solução de celulose (1,052)

Cálculo da Eficiência de Deslignificação e Seletividade

A eficiência de deslignificação e a seletividade do processo de branqueamento foram determinadas através das seguintes relações:

$$\% \text{ Eficiência de Deslignificação} = \frac{\text{Nº Kappa inicial} - \text{Nº Kappa final}}{\text{Nº Kappa inicial}} \times 100$$

$$\text{Seletividade} = \frac{\% \text{ Eficiência de Deslignificação}}{\% \text{ Redução da Viscosidade}}$$

5.- RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE I

PRODUÇÃO DE ATIVIDADE FENOLOXIDÁSICA POR *T.aurantiacus*

A produção de enzimas ligninolíticas extracelulares por fungos que decompõem madeira está diretamente relacionada com a composição do meio de cultura e as condições físico-químicas de incubação (FAISON e KIRK, 1985; NIKU-PAAVOLA *et alii.*, 1990; MOYSON e VERACHTERT, 1993). Em relação à composição do meio, a escolha de um substrato apropriado será determinante na produção das enzimas ligninolíticas. Dependendo da espécie fúngica, muitas vezes é necessária a adição de um substrato indutor no meio de cultura para estas enzimas serem produzidas.

A cepa brasileira do fungo termófilo *T.aurantiacus* mostrou capacidade para produzir atividade FOx e degradar alguns dos componentes da madeira, quando cultivado em meio contendo serragem ou cavacos de *E.grandis* (MACHUCA e DURÁN, 1993). Visando otimizar a produção de atividade FOx por *T.aurantiacus*, diversos parâmetros do meio de cultura foram estudados.

1.1.- EFEITO DE DIFERENTES SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

É sabido que a utilização de substratos lignocelulósicos, tais como serragem de madeira, casca de arroz, bagaço de cana de açúcar, polpa químio-termomecânica, farelo ou palha de trigo, etc., estimula a produção de fenoloxidasas em muitos fungos (KOFUJITA *et alii.*, 1991; LEONTEVSKII *et alii.*, 1992; MASAPHY e LEVANON, 1992; GOLOVLEVA *et alii.*, 1993). Sendo assim, o fungo *T.aurantiacus* foi cultivado, sob condições estacionárias, em meio líquido contendo diferentes substratos polissacarídicos de natureza lignocelulósica, exceto o farelo de trigo, que é constituído principalmente de carboidratos e proteína (v. Material e Métodos).

Diversas atividades ligninolíticas foram produzidas por *T.aurantiacus* quando cultivado em meio líquido contendo diferentes fontes polissacarídicas, durante 10 dias a 48°C. A adição de um substrato polissacarídico à cultura claramente induziu as atividades ligninolíticas em relação à cultura contendo 0,5% de glicose e sem substrato polissacarídico (Tabela 1). Altas atividades FOx tipo lacase (determinada pela oxidação de o-dianisidina) foram obtidas com as diferentes fontes polissacarídicas, exceto com cavacos. Quando o fungo foi cultivado em cavacos de *E.grandis* o crescimento foi demorado e com pouca produção de massa micelial, podendo ser um dos motivos das baixas atividades ligninolíticas observadas (Tabela 1). A formação de massa fúngica foi estimada somente em forma visual, uma vez que a sua quantificação não foi possível devido à dificuldade em separar a massa micelial do substrato.

TABELA 1: Efeito de Diferentes Substratos Lignocelulósicos na Produção de Atividade Ligninolítica por *T.aurantiacus*

Substrato (1,5%) ^a	Lacase (UI/L)	Peroxidase (UI/L)	MnP (U/L)	AVO (UI/L)	CBQ (U/L)
Controle ^b	1,30	0,0	1,1	0,0	2,07
Serragem ^c	707,6	0,0	15,0	0,0	15,9
Cavacos ^c	78,9	0,0	0,0	0,0	n.d. ^d
Bagaço de cana	630,2	130,5	115,0	3,20	9,8
Casca de arroz	609,0	210,2	130,2	0,0	8,5
Farelo de trigo	793,0	0,0	25,7	4,60	n.d.

a: A cultura contém 1,5%(m/v) do substrato mais 0,5% de glicose

b: O controle contém somente 0,5% de glicose

c: Serragem e cavacos de madeira de *E.grandis*

d: Atividade não determinada

O desvio padrão dos valores de atividade variou entre 1-3%

Bagaço de cana de açúcar e casca de arroz, diferentemente dos outros substratos, induziram atividade FOx do tipo lacase e peroxidase. Já a manganês-peroxidase (MnP), foi induzida, em maior ou menor grau, por todos os substratos estudados, exceto por cavacos de madeira de *E.grandis*. Celobiose-quinona oxidoreductase (CBQ), uma enzima que participa do metabolismo fúngico de carboidratos e lignina (ANDER, 1994), também esteve presente nas diferentes culturas. A atividade de álcool-veratrílico oxidase (AVO), determinada pela oxidação do álcool veratrílico, em ausência de H₂O₂, somente esteve presente nas culturas contendo bagaço de cana e farelo de trigo. Quando o H₂O₂ foi adicionado ao meio de reação com álcool veratrílico (determinação tipo LiP) as atividades foram iguais que na sua ausência, indicando que a enzima presente na cultura é do tipo oxidase (AVO) e não peroxidase (LiP).

A produção de atividade FOx, principalmente do tipo lacase, por *T.aurantiacus* mostra-se economicamente atraente, uma vez que todos os substratos utilizados como indutores são de baixo custo e facilmente disponíveis, alguns deles como resíduos lignocelulósicos. Perspectivas futuras também podem incluir a utilização de *T.aurantiacus* e estes substratos na produção de proteína unicelular ("single cell protein") ou no enriquecimento de resíduos para ração animal, visto que, a exceção dos cavacos, todos estimularam a produção de grandes quantidades de massa micelial.

Uma vez que serragem de *E.grandis* e farelo de trigo induziram as máximas atividades FOx do tipo lacase, diferentes experimentos foram conduzidos com estes substratos com o objetivo de otimizar sua produção por *T.aurantiacus*.

A cinética de produção extracelular da atividade FOx durante o crescimento de *T.aurantiacus* em cultura líquida contendo 1,5% (m/v) de serragem de *E.grandis* como substrato e 0,5% de glicose como co-substrato é mostrada na Figura 11. Resultados prévios indicaram que nestas condições foi obtida a melhor degradação de madeira de *E.grandis* por *T.aurantiacus* (MACHUCA e DURÁN, 1993).

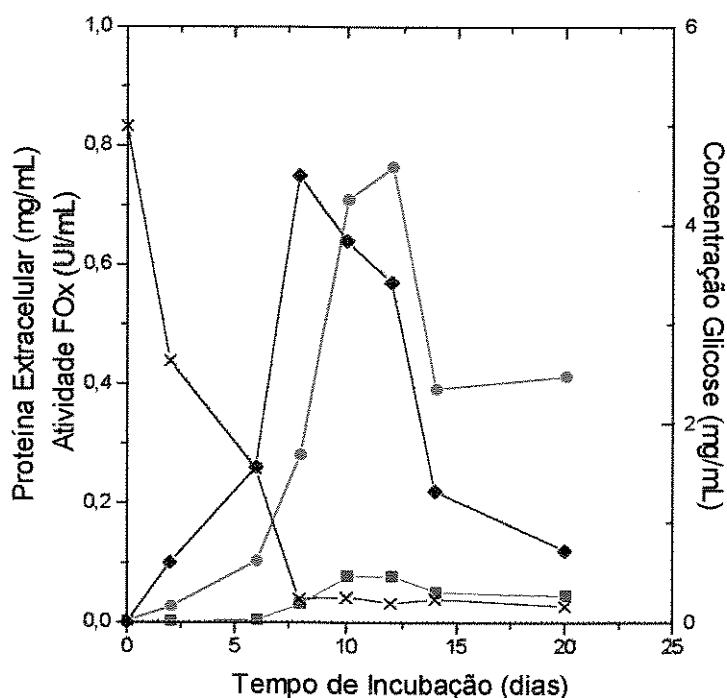


FIGURA 11: Cinética de Produção de Atividade FOx por *T.aurantiacus*. Crescimento em meio de cultura contendo 1,5% de serragem mais 0,5% de glicose, pH inicial de 6,0, 48°C, sob condições estacionárias. Atividade FOx determinada com 1mM de o-dianisidina (●) e de siríngaldazine (■). Consumo de glicose (x) e produção de proteína extracelular (◆) durante o crescimento do fungo.

A atividade FOx tipo lacase foi determinada pela oxidação de o-dianisidina e siríngaldazine, na ausência de H_2O_2 . A produção de proteína extracelular e o consumo de glicose durante a incubação também aparecem incluídos na Figura 11. Um aumento na produção de atividade FOx foi observado após o quinto dia de crescimento, quando a concentração inicial de 5,0 g/L de glicose do meio de cultura cai para aproximadamente 0,5 g/L. A atividade FOx apresentou um pico máximo no décimo segundo dia de incubação, sendo que o mesmo perfil de produção foi observado quando o-dianisidina e siríngaldazine foram utilizadas para determinar a atividade, indicando a existência de uma mesma enzima responsável pela oxidação de ambos substratos. A produção de proteína extracelular aumentou da mesma forma que a atividade FOx, após o quinto dia de crescimento, porém, o pico de máxima produção proteica não coincidiu com o da atividade FOx.

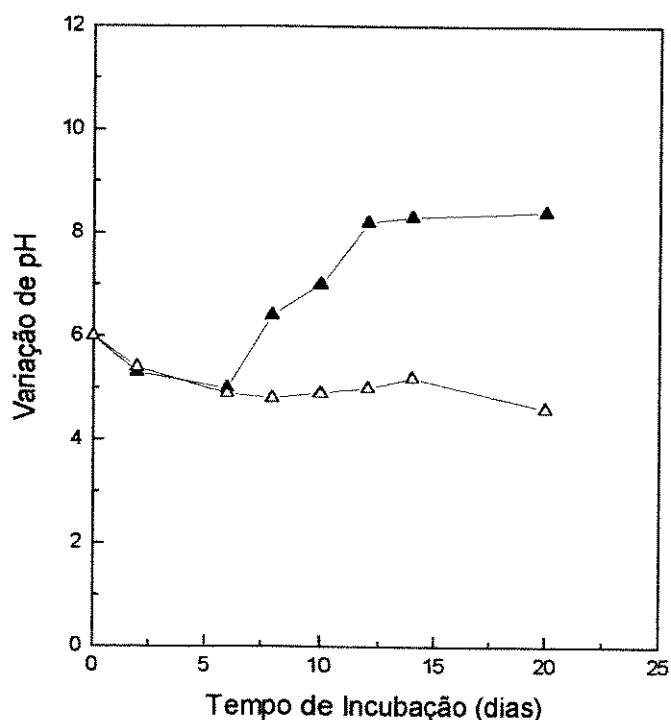


FIGURA 12: Variação do pH durante o cultivo de *T.aurantiacus*. O meio de cultura contém 1,5% de serragem mais 0,5% de glicose, pH inicial de 6,0 (meio não-tamponado), incubado à 48°C. Variação do pH em uma cultura inoculada (▲) e em uma cultura controle (△).

A variação do pH do meio de cultura no decorrer da incubação com 1,5% de serragem, mostrou comportamentos diferentes para a cultura não inoculada (controle contendo somente o substrato lignocelulósico) e a cultura inoculada (Figura 12). Enquanto no controle o pH que inicialmente era de 6,0 tende à acidificação, nas culturas inoculadas aumenta até valores acima de 8,0. Este comportamento foi mais acentuado nas culturas contendo substratos lignocelulósicos do que naquelas contendo glicose como único substrato, onde o pH geralmente não excedeu o valor de 6,5. Assim, a mudança de pH nas culturas inoculadas parece estar relacionada com a produção de atividade FOx pelo fungo, uma vez que em culturas com baixa ou nenhuma atividade o pH manteve-se numa faixa de 6,0 a 6,7 (resultados não mostrados).

Diferentes quantidades de serragem foram adicionadas à cultura com o objetivo de escolher a melhor concentração para a indução da atividade FOx (Figura 13). A atividade FOx foi determinada no décimo dia de crescimento fúngico pela oxidação de o-dianisidina e siringaldazine, na ausência de H_2O_2 . A melhor atividade foi obtida entre 1,0 e 2,0% (m/v) de serragem, com uma ótima produção em 1,5% e uma queda acima de 2,0%. Novamente o

comportamento da indução da atividade FOx determinada pela oxidação de o-dianisidina e de siringaldazine foi semelhante.

A adição de H_2O_2 ao meio de reação contendo o-dianisidina (determinação de atividade tipo peroxidase), sob as mesmas condições de determinação de lacase, não aumentou a velocidade de oxidação do substrato. Ou seja, a reação demonstrou ser independente da adição de H_2O_2 , e portanto a atividade FOx presente no caldo extracelular de *T.aurantiacus* induzido com diferentes concentrações de serragem, apresentou características de lacase e não de peroxidase. Isto é válido desde que o H_2O_2 não esteja presente no caldo extracelular do fungo como resultado da ação de outras enzimas tais como glioxal oxidase, glicose oxidase ou aril-álcool oxidase (GUILLÉN *et alii.*, 1992 e 1994).

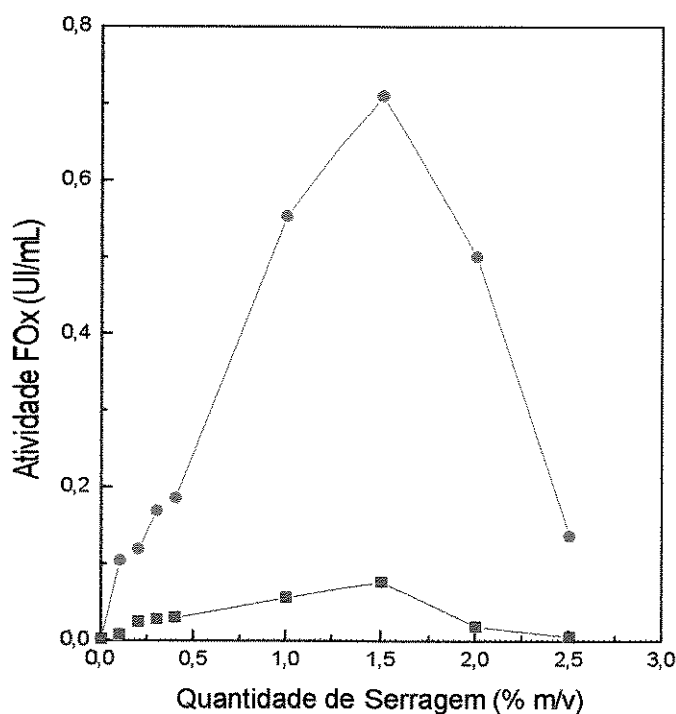


FIGURA 13: Efeito da quantidade de serragem sobre a produção de Atividade FOx por *T.aurantiacus*. Atividade foi determinada com 1mM de o-dianisidina (●) e siringaldazine (■) no décimo dia de crescimento com 0,5% de glicose como co-substrato, à 48°C, sob condições estacionárias.

A produção de atividade FOx em culturas induzidas com 1,5% de farelo de trigo é mostrada na Figura 14. A atividade tipo lacase, determinada pela oxidação de o-dianisidina, foi rapidamente produzida alcançando um máximo de 1,4 (UI/mL) no décimo dia de crescimento. A adição de 0,5% de glicose à cultura contendo 1,5% de farelo de trigo não aumentou a produção da atividade, pelo contrário, a presença de glicose pareceu reprimir e retardar o

aparecimento da atividade FOx. O pH do meio, inicialmente ajustado em 6,0, apresentou o mesmo comportamento que na cultura com serragem. Quando a máxima atividade FOx foi atingida, o pH do meio encontrava-se entre 7,5 e 8,3, mantendo-se elevado até o final da cultura (20 dias). A proteína extracelular não foi dosada nas culturas contendo farelo de trigo, visto que foram observadas interferências com os métodos de determinação (Biureto, Bradford e Lowry), provavelmente devido ao alto conteúdo proteico do substrato.

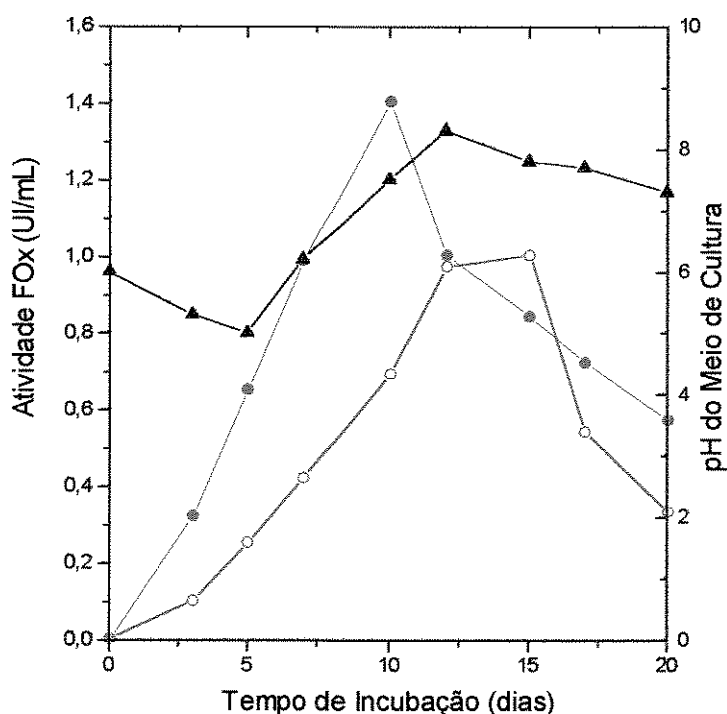


FIGURA 14: Cinética de produção de Atividade FOx por *T.aurantiacus*. Produção de atividade FOx durante o crescimento em meio de cultura contendo 1,5% de farelo de trigo com (○) e sem (●) glicose, pH 6,0, à 48°C, sob condições estacionárias. Variação do pH do meio de cultura (▲) durante o crescimento fúngico.

O efeito de concentrações de farelo de trigo menores que 1,5%, na indução da atividade FOx, foi semelhante ao efeito observado com iguais concentrações de serragem, porém acima de 1,5% a atividade manteve-se elevada e praticamente constante (Figura 15).

Assim, apesar do farelo de trigo e da serragem induzirem uma alta atividade FOx, o substrato polissacarídico demonstrou diversas vantagens frente ao substrato lignocelulósico. Quando farelo de trigo foi utilizado, a máxima atividade FOx foi produzida mais rapidamente (variando entre 8 a 13 dias em diferentes culturas). Devido ao alto conteúdo em carboidratos do substrato não houve necessidade da adição de um co-substrato como glicose, e finalmente,

os níveis de atividade alcançados com farelo de trigo foram muito superiores aos alcançados com serragem.

Resultados semelhantes foram obtidos por KOFUJITA e colaboradores (1991), com o fungo *L.edodes* cultivado em meio contendo madeira e farelo de trigo. Os autores observaram uma maior indução de lacase nas culturas contendo farelo de trigo, justificando o fato pelo alto conteúdo em carbono e nitrogênio, além de alguns fatores de crescimento presentes nesse substrato.

O farelo de trigo já foi muito utilizado como substrato em fermentações sólidas e líquidas, para produção de uma variedade de enzimas lignocelulolíticas por fungos. Devido a sua composição química, principalmente o alto conteúdo proteico, o farelo de trigo é capaz de sustentar um bom crescimento fúngico, além da indução de altos teores enzimáticos (LIN *et alii.*, 1993; ORTH *et alii.*, 1993).

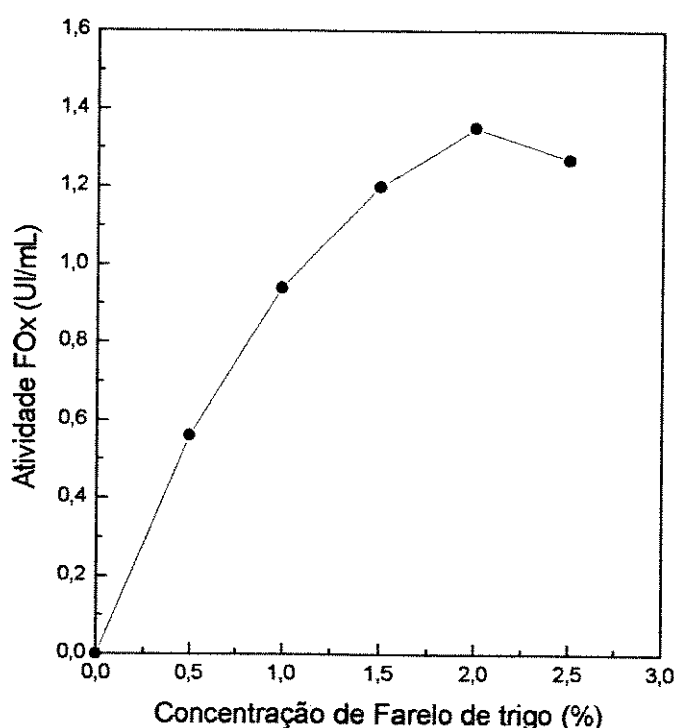


FIGURA 15: Efeito da Concentração de Farelo de Trigo na Produção de Atividade FOx por *T.aurantiacus*. A atividade FOx foi determinada no oitavo dia de crescimento à 48°C, pH 6,0 e sob condições estacionárias, utilizando-se 1mM de o-dianisidina.

1.2.- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE

A presença de um co-substrato numa cultura contendo lignina ou algum material lignocelulósico é essencial para o crescimento e degradação de lignina por fungos (KIRK *et*

alii., 1976; HATAKKA e UUSIRAUVA, 1983; LEATHAM, 1986). O co-substrato deve ser uma fonte de carbono facilmente metabolizável (geralmente glicose) para sustentar o crescimento do microrganismo na fase inicial da cultura (metabolismo primário). A concentração deste deve ser controlada, uma vez que um excesso pode estimular uma boa produção de massa celular, mas também pode inibir a produção enzimática.

O fungo *T.aurantiacus* é capaz de metabolizar glicose e alcançar uma velocidade de crescimento maior que quando outras fontes de carbono são utilizadas no meio de cultura, porém, a produção de atividade FOx em meio contendo somente glicose como substrato foi muito baixa (MACHUCA, 1991).

Diferentes concentrações de glicose foram adicionadas à cultura de *T.aurantiacus* e o efeito sobre a produção de atividade FOx foi estudado. Nas concentrações de 0,2 e 0,5% de glicose foram produzidas as maiores atividades, porém concentrações acima de 1,0% inibiram quase que completamente a produção da atividade (Figura 16).

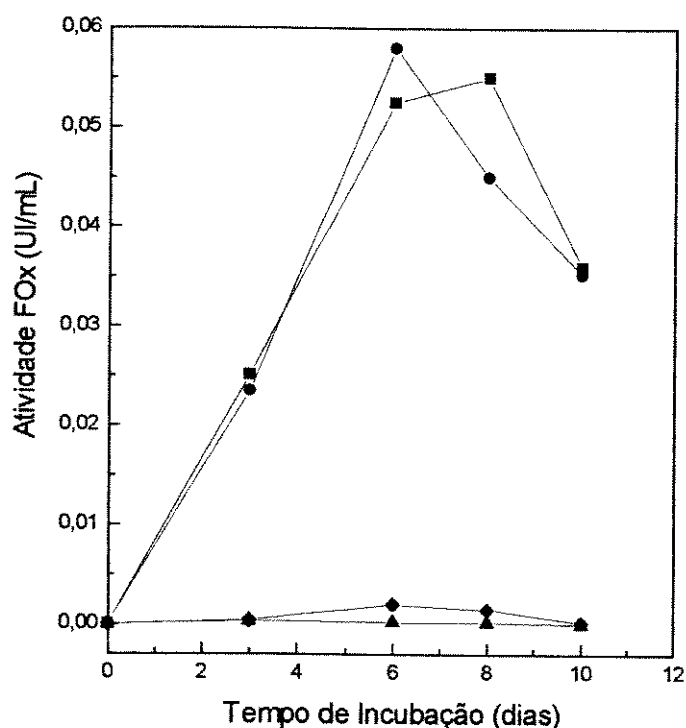


FIGURA 16: Efeito da Concentração de Glicose na Produção de Atividade FOx por *T.aurantiacus*. A cultura, incubada à 48°C, sob condições estacionárias, contém 0,2 (●), 0,5 (■), 1,0 (◆) e 1,5% (▲) de glicose, pH 6,0. A atividade foi determinada utilizando-se 1mM de o-dianisidina.

O aumento na concentração de glicose conduziu a um aumento na produção de proteína extracelular e no crescimento ou produção de massa fúngica, determinada como peso seco. O aumento excessivo de formação de massa fúngica nas concentrações de 1,0 e 1,5% de glicose, pode dificultar a troca gasosa na cultura, conduzindo à inibição da atividade (Tabela 2). O aumento da proteína extracelular que acompanha o aumento da concentração de glicose, deve estar relacionado à produção de outras atividades enzimáticas, diferentes da atividade FOx.

TABELA 2: Efeito da Concentração de Glicose na Produção de Atividade FOx, Proteína Extracelular e Crescimento de *T.aurantiacus*

Concentração de Glicose(%)	Atividade FOx (UI/mL) ^a	Proteína (mg/mL) ^a	Peso Seco (mg) ^b
0,0	0,000	0,00	2,30
0,2	0,058	0,04	24,3
0,5	0,053	0,12	57,7
1,0	0,0006	0,19	102,4
1,5	0,0002	0,23	193,5

a: A atividade FOx (oxidação de o-dianisidina) e a proteína extracelular foram determinadas no sexto dia de incubação

b: O peso seco foi determinado no final da cultura (10 dias)

Quando as mesmas concentrações anteriores de glicose foram testadas na presença de 1,5% de serragem de *E.grandis*, foram obtidos diferentes níveis de atividade FOx que dependeram da concentração do co-substrato (Figura 17). A melhor produção de atividade FOx foi observada com 0,2 e 0,5% de glicose como co-substrato. A máxima atividade obtida com 0,5% de glicose, na presença de 1,5% de serragem (15 dias) foi cerca de 8 vezes maior que a máxima atividade obtida nas mesmas condições, porém na ausência do substrato indutor (8 dias, Figura 16). A atividade FOx na presença de serragem e diferentes concentrações de glicose, em geral foi produzida após o décimo dia de incubação e manteve-se elevada durante um tempo maior do que na cultura contendo somente glicose (Figura 16).

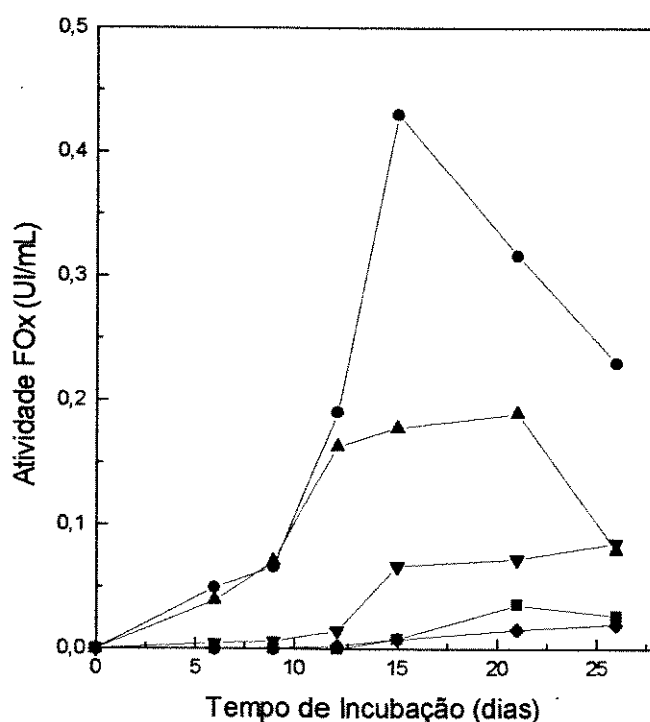


FIGURA 17: Efeito da Concentração de Glicose como co-Substrato na Produção de Atividade FOx por *T.aurantiacus*. A cultura, incubada à 48°C sob condições estacionárias, contém 1,5% de serragem como substrato indutor mais 0,0 (■), 0,2(▲), 0,5(●), 1,0(▼) e 1,5%(◆) de glicose, pH 6,0. A atividade foi determinada utilizando-se 1mM de o-dianisidina.

Os resultados obtidos sugerem que a produção da atividade FOx em meio contendo glicose é constitutiva e que concentrações acima de 1,0 %, ainda que na presença de um substrato indutor, reprimem a produção da atividade. A ausência completa de glicose como co-substrato em culturas contendo serragem foi desfavorável para o crescimento fúngico, conseqüentemente para a produção de atividade FOx pelo fungo (Figura 17). Resultados prévios mostraram que a presença de glicose como co-substrato era essencial para a degradação de madeira de *E.grandis* por *T.aurantiacus* (MACHUCA e DURÁN, 1993). Da mesma forma, a presença de glicose, em baixas concentrações, mostrou ser essencial para uma ótima produção de atividade FOx por *T.aurantiacus*, em culturas contendo um substrato lignocelulósico como serragem de *E.grandis*.

1.3.- EFEITO DE UM INDUTOR SINTÉTICO

A produção de fenoloxidasas fúngicas é dependente da composição do meio de crescimento, e muitas vezes da presença de um composto aromático que atue como indutor (LUNDELL *et alii.*, 1990; ROGALSKI *et alii.*, 1991; LEONTIEVSKII *et alii.*, 1992). Existem estudos mostrando que compostos aromáticos como anilinas substituídas de caráter tóxico não só induzem a produção de atividade lacase em fungos, como também podem ser substratos destas enzimas (BOLLAG e LEONOWICZ, 1984; HOFF *et alii.*, 1985; SHUTTLEWORTH *et alii.*, 1986), como é o caso da *p*-anisidina ou *p*-metoxianilina.

Com o objetivo de comparar o grau de indução provocada por um composto aromático, pequeno e solúvel, com a indução provocada por um substrato lignocelulósico insolúvel, estudou-se o efeito de *p*-anisidina tanto no crescimento fúngico quanto na produção de atividade FOx por *T. aurantiacus*. Por outro lado, a utilização de um indutor sintético no lugar de um substrato lignocelulósico, teria a vantagem de proporcionar um meio de cultura homogêneo e livre dos interferentes da determinação de proteína extracelular e às vezes da própria determinação enzimática, além de permitir determinar o crescimento fúngico através da quantificação da massa micelial produzida.

As culturas foram preparadas com 0,5% de glicose (pH 6,0) e diferentes concentrações do indutor *p*-anisidina foram adicionadas à cultura 5 dias após iniciada a incubação. A cultura contendo somente 0,5% de glicose como substrato foi utilizada como controle.

Até o quinto dia de crescimento, quando foi adicionado o indutor, o fungo tinha formado uma abundante massa micelial acompanhada de baixos níveis de atividade FOx (Figura 18). A adição de diferentes concentrações de indutor aparentemente não afetou o crescimento fúngico determinado como peso seco no final do período de incubação (Tabela 3). Concentrações de 1,0 e 3,0 mM de *p*-anisidina provocaram um aumento significativo de massa micelial quando comparada com o controle.

Os teores de proteína extracelular produzida por *T.aurantiacus* foram maiores nas culturas contendo 1,0 e 3,0 mM de *p*-anisidina do que no controle. Com 5,0 mM do indutor o teor de proteína diminuiu, porém a produção de massa micelial não foi significativamente afetada (Tabela 3).

TABELA 3: Efeito da *p*-Anisidina no Crescimento e na Produção de Atividade FOx por *T.Aurantiacus*

Cultura	Atividade FOx(UI/mL) ^a	Proteína (mg/mL)	Peso seco (mg) ^b
0,5% glicose +			
0 mM indutor	0,031 (9)	0,09	77,90
1 mM indutor	0,071 (24)	0,16	110,30
3 mM indutor	0,306 (24)	0,19	119,1
5 mM indutor	0,032 (24)	0,06	98,5

a: Atividade determinada pela oxidação de o-dianisidina

b: Peso seco determinado no final da cultura (24 dias)

Entre parênteses está indicado o dia em que foram determinadas a atividade FOx e a concentração de proteína

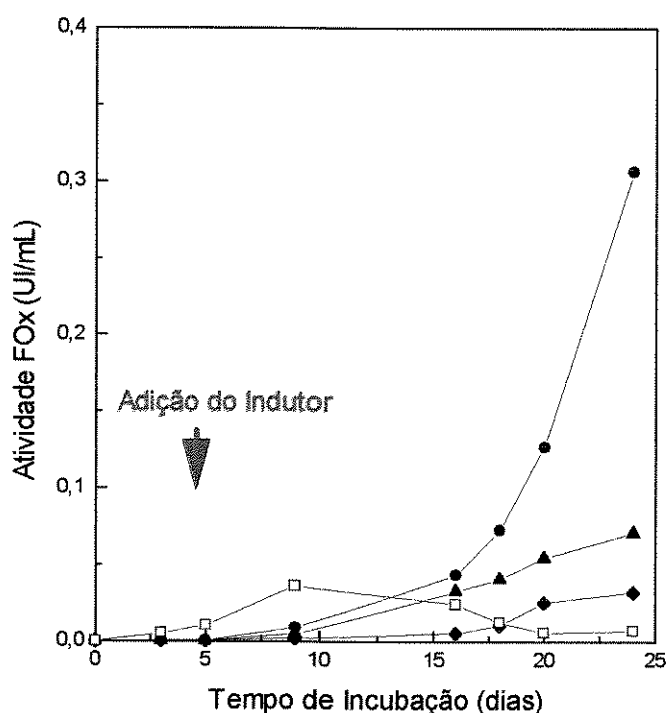


FIGURA 18: Efeito de *p*-Anisidina na Produção de Atividade FOx por *T.aurantiacus*. A cultura contém 0,5% de glicose e 0,0 (□), 1,0(▲), 3,0(●) e 5,0 mM(◆) de *p*-anisidina, pH 6,0. O indutor foi adicionado no quinto dia de incubação (indicado pela seta), à 48°C, sob condições estacionárias. A atividade foi determinada com 1mM de *o*-dianisidina.

Concentrações de 1,0 e 3,0 mM do indutor estimularam a produção de atividade FOx em *T.aurantiacus*, sendo que 3,0 mM aumentou em 10 vezes a atividade em relação ao controle (Figura 18, Tabela 3). Portanto, da mesma forma como foi observado para indutores lignocelulósicos, existe uma relação ótima entre a concentração do indutor e a produção de atividade FOx pelo fungo.

Estudos conduzidos com o fungo deuteromiceto de solos *Rhizoctonia praticola*, mostraram que de uma série de anilinas substituídas, *p*-anisidina foi o mais efetivo indutor de lacase, e que o grau de indução dependia da concentração do indutor, do tempo da adição do indutor na cultura e da temperatura de incubação. A mudança na cor do caldo de cultura indicou que a *p*-anisidina, além de atuar como indutor, foi oxidada pela lacase do fungo (SHUTTLEWORTH *et alii.*, 1986). As culturas inoculadas com *T.aurantiacus*, contendo o indutor em diferentes concentrações, também mudaram de cor quando comparadas com um controle preparado em forma semelhante, porém não inoculado. O controle permaneceu cor de rosa (cor da *p*-anisidina em solução) durante toda a incubação, enquanto que na cultura

inoculada a cor mudou do rosa para o amarelo claro, provavelmente devido alguma modificação no composto provocada pela atividade FOx de *T.aurantiacus*.

Resultados prévios mostraram a capacidade do *T.aurantiacus* para crescer em meio sólido contendo uma variedade de compostos aromáticos de tipo fenólico e não-fenólico relacionados com lignina, os quais muitas vezes podem atuar como fortes inibidores do crescimento de algumas espécies fúngicas (MACHUCA e DURÁN, 1995). Em meio líquido a presença de um composto aromático como *p*-anisidina não somente permitiu um bom crescimento fúngico como também induziu a atividade FOx, porém a magnitude da indução foi muito menor e o tempo de incubação até a máxima produção foi maior do que nas culturas induzidas com substratos lignocelulósicos insolúveis nas condições utilizadas.

1.4.- EFEITO DO TIPO E TAMANHO DO INÓCULO

Os caldos de cultura contendo serragem (1,5%) mais glicose (0,5%) e farelo de trigo (1,5%) foram inoculados com *T.aurantiacus*, através de dois métodos diferentes (v.Material e Métodos).

Um método consistiu na inoculação de 100 mL de caldo de cultura com diferentes volumes de uma suspensão de micélio. Quando as culturas contendo serragem foram inoculadas desta forma, o crescimento fúngico foi demorado, com pouca formação de massa micelial, e o aparecimento da atividade FOx foi retardado. Ao aumentar o tamanho do inóculo para 6,0 mL, a atividade com serragem aumentou, porém os valores alcançados foram muito baixos. Com farelo de trigo o comportamento da atividade FOx foi semelhante, aumentando a produção com o aumento do tamanho do inóculo, porém os valores alcançados com farelo de trigo foram muito maiores que com serragem, e o aparecimento da atividade foi mais rápido (Tabela 4).

Um segundo método de inoculação foi utilizado com o objetivo de tentar acelerar o crescimento fúngico e a produção de atividade FOx. Este consistiu na inoculação direta dos caldos com um a três discos de ágar-micélio (6,0 mm de diâmetro) em 100 mL de caldo de cultura. Nas culturas induzidas com serragem observou-se um efeito positivo em relação ao método de inoculação anterior. O crescimento fúngico foi mais rápido, com maior produção de massa micelial, e as atividades FOx foram maiores que as obtidas pelo outro método de inoculação. O tamanho do inóculo, quando utilizados os discos de ágar, foi crítico na produção da atividade FOx, uma vez que a adição de mais de um disco diminuiu significativamente a atividade. Em relação ao método de inoculação anterior, nas culturas contendo farelo de trigo a inoculação com discos de ágar-micélio não acelerou o crescimento e um aumento da atividade FOx foi observado. Semelhante ao observado com serragem, o aumento do tamanho do inóculo sólido para 3 discos provocou uma diminuição da atividade FOx (Tabela 4).

A adição de 3 discos de ágar-micélio estimulou a produção de abundante massa micelial que cobriu a superfície das culturas contendo serragem e farelo de trigo, provavelmente dificultando a oxigenação ou a troca gasosa com a cultura, que por sua vez poderia ser responsável pela queda na atividade FOx observada nestas condições.

TABELA 4: Efeito do Tipo e Tamanho do Inóculo na Produção de Atividade FOx por *T.aurantiacus*

Tipo	Tamanho	Atividade FOx(UI/mL) ^a	
		Serragem	Farelo de trigo
Suspensão (mL)	2,0	0,031 (17)	0,350 (12)
	4,0	0,046 (20)	0,574 (10)
	6,0	0,062 (15)	0,782 (10)
Discos de água-micélio	1	0,652 (12)	0,905 (9)
	2	0,120 (10)	0,875 (12)
	3	0,051 (13)	0,536 (13)

a: A atividade foi determinada pela oxidação de o-dianisidina

Entre parênteses está indicado o dia em que foi determinada a atividade FOx

De acordo com os resultados, a inoculação do *T.aurantiacus* na forma de discos de água-micélio, favoreceu a produção de atividade FOx, tanto nas culturas com serragem quanto com farelo de trigo. A melhor relação de inóculo-cultura para a produção da atividade FOx foi de um disco de água-micélio para cada 100 mL de caldo de cultura.

1.5.- EFEITO DA AGITAÇÃO E OXIGENAÇÃO DAS CULTURAS

O efeito da agitação das culturas na produção de atividade FOx por *T.aurantiacus* foi estudado utilizando-se um incubador rotatório numa velocidade de 100 rpm. Nestas condições o fungo cresceu rapidamente e, a diferença do observado sob condições estacionárias onde as hifas se estenderam na superfície do caldo de cultura formando uma massa micelial, estas deram origem a um micélio compacto na forma de esferas ou "pellets" que permaneceram em suspensão. A produção de atividade FOx foi acelerada, apresentando um máximo no quinto dia de incubação, porém, os valores alcançados foram menores que sob condições estacionárias (Figura 19).

Embora a agitação seja comumente utilizada para aumentar a pressão parcial de oxigênio e a homogeneização em culturas submersas, dependendo da espécie fúngica, muitas vezes é possível observar uma inibição do sistema enzimático ligninolítico (LiP e lacases, principalmente), como no caso de diversos fungos que decompõem madeira (KIRK *et alii.*, 1978; NIKU-PAAVOLA *et alii.*, 1990; MOYSON e VERACHTERT, 1993; LEONTIEVSKY *et alii.*, 1994). Da mesma forma, no caso de *T.aurantiacus* a agitação das culturas, ainda que na presença de serragem como indutor, provocou uma diminuição da atividade FOx.

Quando as culturas contendo serragem (1,5%) e glicose (0,5%), sob condições estacionárias foram oxigenadas, um leve aumento na produção de atividade FOx foi observado. Diferentemente da cultura sem oxigenação, a queda na atividade FOx foi mais demorada após o décimo segundo dia de incubação (Figura 20).

O nível de oxigênio dissolvido numa cultura é um fator determinante na degradação de lignina por diversos fungos ligninolíticos. Assim, altas tensões de oxigênio estimulam a

produção de LiP, e por conseguinte, a degradação de lignina em culturas submersas de *P.chrysosporium* (KIRK *et alii.*, 1978; FAISON e KIRK, 1985). Porém, a dependência de diferentes níveis de oxigênio do sistema enzimático ligninolítico varia grandemente com a espécie fúngica.

No caso de *T.aurantiacus*, a agitação e oxigenação não afetaram significativamente a produção de atividade FOx em culturas submersas contendo serragem. Assim, condições estacionárias e sem oxigenação, porém aeróbicas, foram preferidas para produção da atividade FOx por *T.aurantiacus* em cultura submersa contendo algum substrato lignocelulósico.

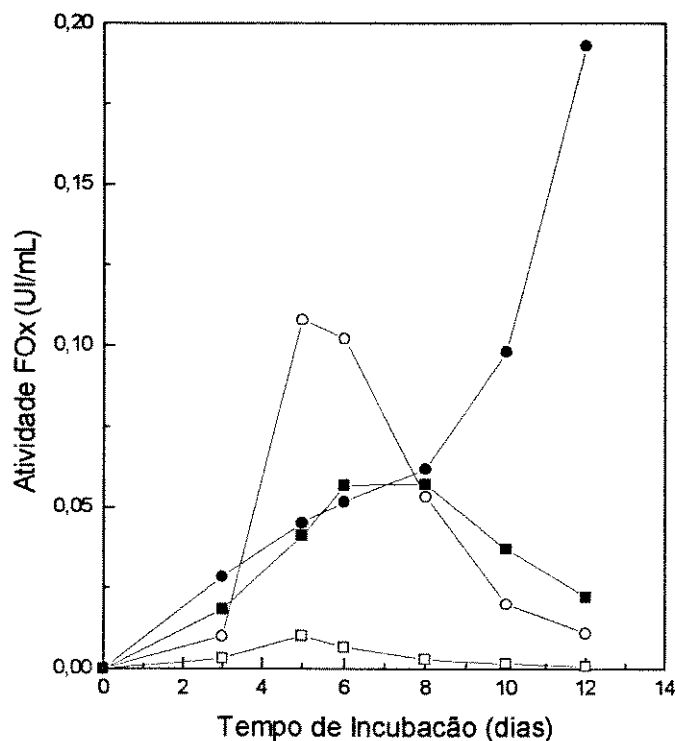


FIGURA 19: Efeito da Agitação das Culturas na Produção de Atividade FOx por *T.aurantiacus*. As culturas em condições agitadas e estacionárias contém 0,5% de glicose sem (□) e com (○) 1,5% de serragem à pH 6,0. Os símbolos cheios representam as culturas sob condições estacionárias e os vazios as culturas sob agitação.

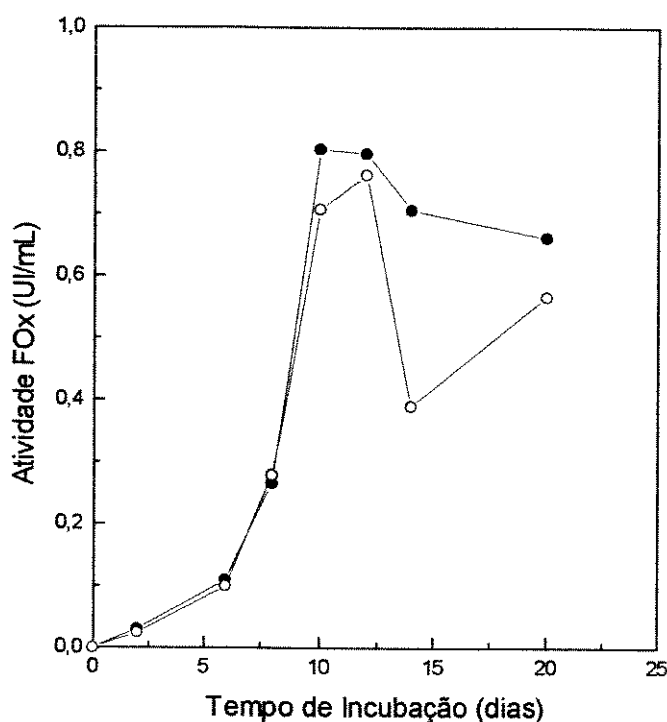


FIGURA 20: Efeito da Oxigenação das Culturas na Produção de Atividade FOx por *T. aurantiacus*. O meio de cultura contém 1,5% de serragem mais 0,5% de glicose, pH 6,0. Produção de atividade com (●) e sem (○) oxigenação, à 48°C.

L6.- EFEITO DO pH DO MEIO DE CULTURA

O efeito do pH na produção de atividade FOx foi estudado em culturas contendo 1,5% de serragem e 0,5% de glicose. Os meios de cultura não foram tamponados, assim o pH inicial do meio foi ajustado com HCl ou NaOH entre 4,0 e 9,0, antes da esterilização. Utilizou-se também uma cultura sem ajuste de pH, ou seja pH do caldo Czapek após preparação e antes de esterilizar (pH 7,3).

Nos meios mais ácidos ou mais alcalinos (pH 4,0, 5,0 e 9,0) a atividade FOx não foi produzida. Altas atividades foram observadas nos pHs 6,0 e 8,0, com um pico de produção no oitavo dia de crescimento. Em pH 7,3, a produção da atividade foi mais demorada que nas culturas em pH 6,0 e 8,0, atingindo um máximo após 12 dias de crescimento (Figura 21). Assim, pHs mais perto da neutralidade favoreceram a produção da atividade FOx.

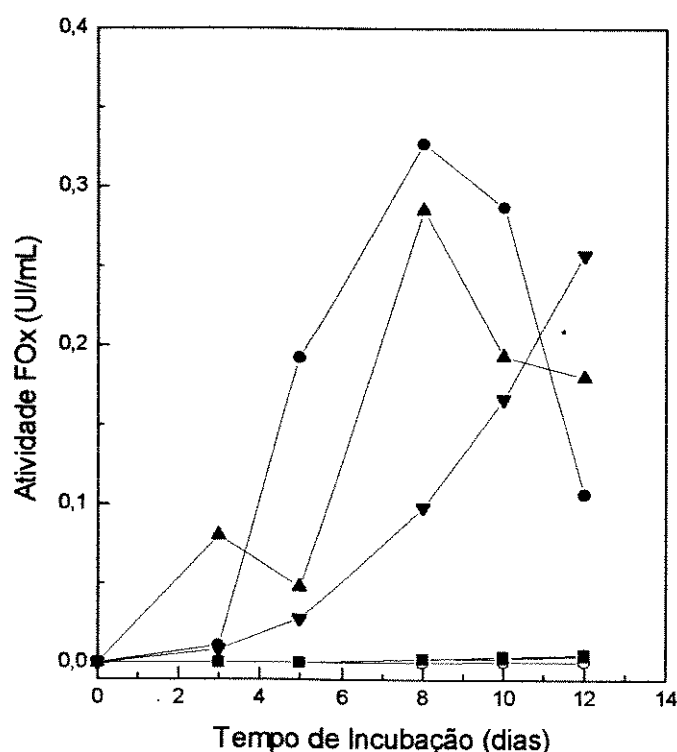


FIGURA 21: Efeito do pH do Meio de Cultura na Produção de Atividade FOx por *T.aurantiacus*. As culturas contém 1,5% de serragem mais 0,5% de glicose e o pH inicial ajustado para 4 (○), 5 (□), 6 (●), 8 (▲) e 9 (■). Caldo sem ajuste de pH (▼) (pH 7,3).

Anteriormente foi observado que quando *T.aurantiacus* cresceu em cultura contendo um substrato lignocelulósico a tendência do pH foi aumentar (Figura 12), ao mesmo tempo que um aumento da produção de atividade FOx foi observado. Ao estudar o efeito do pH inicial da cultura confirmou-se o fato de que pHs numa faixa de 6,0 a 8,0 favoreceram a produção da atividade FOx por *T.aurantiacus*. O comportamento do *T.aurantiacus* em relação ao pH do meio foi diferente do observado com *P.radiata*, *P.chrysosporium*, *L.edodes* e outros conhecidos fungos ligninolíticos, onde um pH de 4,5 favorece a degradação de lignina e portanto a produção das enzimas ligninolíticas (HATAKKA e UUSI-RAUVA, 1983; BOYLE *et alii.*, 1992). O pH escolhido para produção de atividade FOx por *T.aurantiacus* em cultura submersa foi de 6,0, uma vez que este também foi o melhor pH determinado anteriormente para o crescimento do fungo (MACHUCA, 1991).

As condições físico-químicas da incubação em meio líquido afetaram significativamente a produção de atividade FOx por *T.aurantiacus*. A presença de um substrato indutor de natureza lignocelulósica, mais do que um indutor sintético, foi essencial para o aparecimento de altos teores da atividade. O efeito do tipo e tamanho de inóculo foi muito significativo na

produção de atividade FOx. A agitação e a oxigenação das culturas não melhorou a produção da atividade FOx, porém o pH inicial do meio de cultura exerceu um efeito significativo, devendo ser controlado entre 6,0 e 8,0. Desta forma, uma cultura, inoculada com discos de ágar-micélio, incubada em condições estacionárias, aeróbicas e à 48°C, contendo 1,5% de farelo de trigo como substrato indutor, foi escolhida para produção de altos níveis de atividade FOx por *T.aurantiacus*.

PARTE II

PROPRIEDADES DO EXTRATO BRUTO COM ATIVIDADE FENOLOXIDÁSICA

Com o extrato bruto foram feitos alguns estudos visando-se a aplicação da atividade FOx de *T.aurantiacus* em processos como o tratamento de efluentes industriais e/ou branqueamento de polpas. Quando se objetiva a aplicação de um sistema fúngico e/ou enzimático em processos industriais deve-se considerar a viabilidade econômica do sistema. Assim, a atividade FOx de *T.aurantiacus* foi inicialmente caracterizada no extrato bruto e posteriormente, após sua purificação, as mesmas propriedades foram estudadas e os resultados comparados com os anteriores.

O extrato bruto, produzido em meio líquido contendo farelo de trigo como substrato indutor, foi analisado quanto a pH e temperatura ótimos, estabilidade, especificidade pelo substrato e efeito de inibidores. O extrato, obtido após filtração por membrana Millipore (0,45 µm), foi mantido a -20°C durante 4 meses sem perda da atividade FOx.

II.1.- Tipo de Atividade FOx Presente no Extrato Bruto de *T.aurantiacus*

Com o objetivo de conhecer o tipo de atividade FOx (lacase, peroxidase ou tirosinase) produzida extracelularmente por *T.aurantiacus*, diferentes experimentos foram conduzidos com o extrato bruto. A reação de oxidação de o-dianisidina pelo extrato ativo do fungo foi conduzida na presença e na ausência de H₂O₂ para diferenciar entre atividade FOx tipo peroxidase ou lacase. Visto que a adição de H₂O₂ não aumentou a velocidade de oxidação de o-dianisidina, pelo contrário foi observada uma pequena diminuição da mesma, a reação parece ocorrer independentemente da presença de H₂O₂ (Tabela 5).

Muitas vezes o H₂O₂ é produzido pelo próprio fungo como um importante metabólito destinado a servir como co-factor de múltiplas enzimas intra e extracelulares. Desta forma para confirmar a ausência da participação do H₂O₂ na oxidação de o-dianisidina pelo extrato ativo do *T.aurantiacus*, este foi previamente tratado com catalase (1 U/mL) para eliminar o possível H₂O₂ presente na cultura extracelular, e posteriormente a velocidade de oxidação de o-dianisidina foi determinada. A atividade FOx não foi afetada após o pré-tratamento durante 15 minutos com catalase, indicando desta forma que a oxidação de o-dianisidina não é dependente da presença de H₂O₂ (Tabela 5).

Os caldos extracelulares do *T.aurantiacus* foram analisados, em diferentes tempos de crescimento, quanto à presença de H₂O₂ pelo método de PICK e KEISARI (1980). Embora o

método seja bastante sensível (1-60 nmol/mL), não foi possível detectar H_2O_2 nos caldos induzidos com farelo de trigo ou serragem. É difícil pensar que este não seja produzido por *T.aurantiacus*, visto que a maioria dos fungos que degrada madeira ou outros materiais lignocelulósicos produz H_2O_2 extracelular. Porém, pode estar acontecendo do H_2O_2 estar sendo produzido e ao mesmo tempo estar sendo rapidamente utilizado por outros sistemas enzimáticos ou não enzimáticos do fungo, necessários para a degradação de substratos lignocelulósicos. O rápido equilíbrio entre a produção e a decomposição do H_2O_2 já foi observado com conhecidos fungos degradadores de lignina, onde a produção é resultado da ação de enzimas como glioxal oxidase, glicose oxidase ou aril-álcool oxidase e a decomposição por enzimas como LiP e MnP, que o requerem para sua atividade catalítica. A ação conjunta destas enzimas mantém o H_2O_2 em níveis muito baixos e constantes o que dificulta sua determinação em caldos extracelulares (GUILLÉN *et alii.*, 1994; EVANS *et alii.*, 1994).

TABELA 5: Atividade FOx tipo Lacase e/ou Peroxidase Presente no Extrato Bruto de *T.aurantiacus*

Condição da Reação	Atividade FOx (UI/mL)
Controle ^a	0,79
Com H_2O_2 ^a	0,54
Pré-Incubação com Catalase ^a	0,80
Tirosina ^b	0,00

a: Ativ. FOx determinada pela oxidação de o-dianisidina
b: Ativ. FOx determinada usando tirosina no lugar de o-dianisidina

De acordo com os resultados da Tabela 5 pode-se afirmar que a atividade FOx presente no extrato bruto de *T.aurantiacus* é independente da presença de H_2O_2 , ou seja, não é do tipo peroxidase e, uma vez que não há oxidação de tirosina, pode-se afirmar que também não é do tipo tirosinase. Portanto, a atividade FOx produzida por *T.aurantiacus*, apresenta características de fenoloxidase do tipo lacase.

II.2.- Efeito da Concentração do Extrato na Atividade FOx

Foram preparadas diferentes diluições do extrato com atividade FOx e com elas foi ensaiada a oxidação de o-dianisidina a pH 2,8, na ausência de H_2O_2 , a 25°C. Na Figura 22 é possível observar que até um volume de 30 μ L existe uma relação linear com a velocidade de oxidação de o-dianisidina. Desta forma, para todos os ensaios de caracterização, o volume de extrato mais apropriado deverá ser escolhido da porção linear.

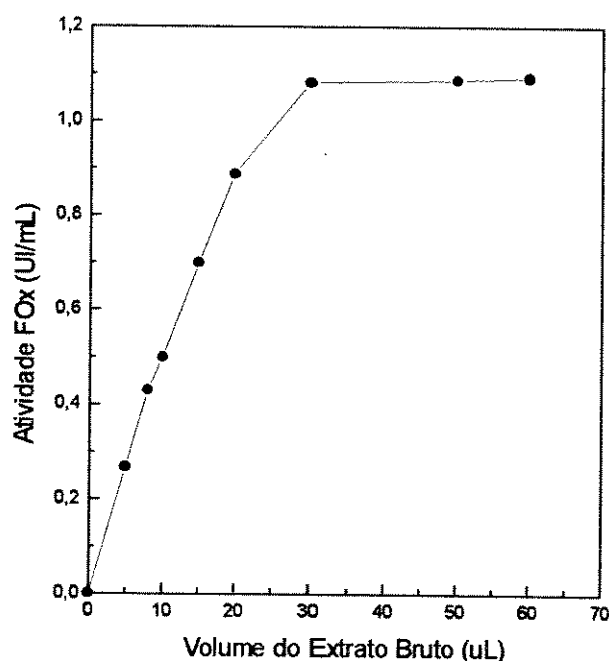


FIGURA 22: Efeito da Concentração do Extrato Bruto de *T.aurantiacus* na Atividade FOx. Diferentes aliquotas do extrato bruto foram utilizadas na determinação da atividade FOx através da oxidação de 1 mM de o-dianisidina à pH 2,8 e 25°C

II.3.- Efeito do pH na Atividade FOx

No extrato do *T.aurantiacus* foram estudados os efeitos do pH e da natureza do tampão na atividade FOx. Quanto à natureza do tampão, utilizado em concentração de 50 mM, pode-se dizer que não houve diferenças apreciáveis entre a utilização de citrato, citrato-fosfato e tartarato (Figura 23). Utilizando-se o tampão tartarato observou-se que o produto colorido resultante da oxidação de o-dianisidina era muito instável (rápido desaparecimento da cor após sua formação). Desta forma, o tampão citrato-fosfato foi escolhido para ser utilizado nos estudos posteriores de determinação de atividade FOx com o-dianisidina.

Quanto ao efeito do pH na atividade FOx pode-se observar que baixos valores de pH favoreceram maiores atividades (Figura 23). Em tampão citrato-fosfato a atividade FOx apresentou uma estreita faixa de pH (2,6- 3,0), com um ótimo em pH 2,8, para oxidação de o-dianisidina. Em pHs acima de 3,5 observou-se uma rápida queda na atividade, e acima de 5,0, a atividade foi totalmente anulada. O pH ótimo para a maioria das fenoloxidasas descritas na literatura encontra-se em uma faixa de 5,0 a 6,0. Porém, existem microrganismos produtores de fenoloxidasas com pHs ótimos abaixo de 4,0, e alguns produtores de fenoloxidasas com pHs acima de 7,0 (BOLLAG e LEONOWICZ, 1984; REHMAN e THURSTON, 1992; THAKKER *et alii.*, 1992).

Estudos conduzidos com fenoloxidasas do tipo lacase revelam que o pH ótimo para a atividade catalítica destas enzimas depende diretamente da fonte de isolamento da enzima, e do substrato utilizado na determinação da atividade (MAYER e HAREL, 1979; HOFF *et alii.*, 1985; BEKKER *et alii.*, 1991; PALMIERI *et alii.*, 1993).

No caso do extrato bruto com atividade FOx de *T.aurantiacus*, o pH ótimo para oxidação de o-dianisidina foi de 2,8. O mesmo pH ótimo foi obtido utilizando-se guaiacol como substrato; a oxidação de siringaldazine apresentou um pH ótimo entre 2,6 e 2,8, e com ABTS o pH ótimo foi abaixo de 2,5.

A estabilidade ao pH do extrato com atividade FOx mostrou um perfil bem diferente ao da atividade. A estabilidade foi estudada utilizando-se tampão citrato-fosfato 50 mM, em diferentes pH, à temperatura de 25°C. A determinação da atividade FOx foi feita com o-dianisidina em pH 2,8. A atividade FOx mostrou a melhor estabilidade nos pH de 5,0 e 6,0, sendo que nos pH 2,6 e 2,8, o extrato bruto era completamente inativado, após 7 horas de incubação (Figura 24).

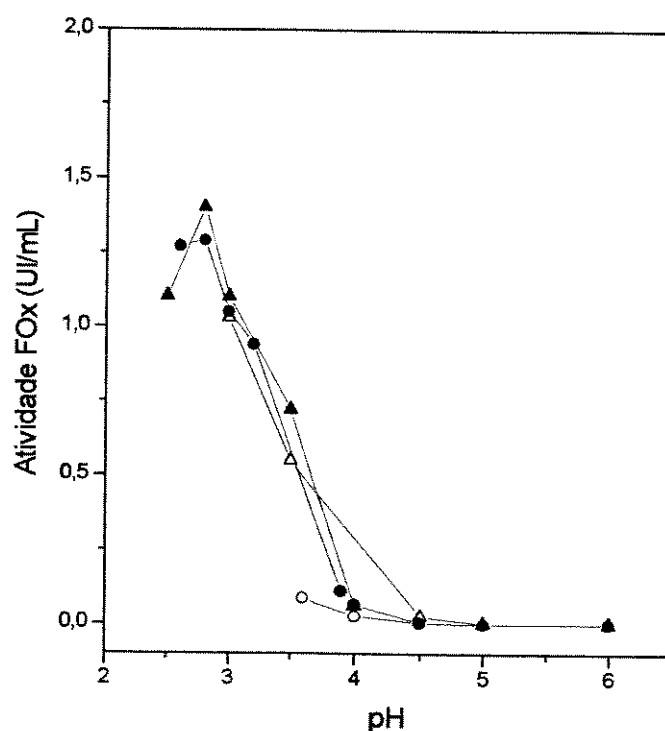


FIGURA 23: Efeito do pH e do Tampão na Atividade FOx de *T.aurantiacus*. A atividade FOx foi determinada pela oxidação de 1 mM de o-dianisidina à 25°C, na presença de 50 mM dos seguintes tampões: acetato (O), citrato (Δ), citrato-fosfato (●) e tartarato (▲)

Desta forma, no caso de *T.aurantiacus*, o pH deve ser cuidadosamente ajustado e controlado, no que se refere ao crescimento do fungo, produção da atividade FOx, a própria

atividade e estabilidade da fração com atividade FOx. Como mostrado anteriormente um pH de 6,0 foi ótimo para a produção da atividade, e para o crescimento fúngico. Neste valor de pH a atividade FOx produzida pelo fungo foi completamente anulada, apresentando um ótimo numa faixa de 2,0-3,0, porém, nestes pH a fração era muito instável.

Os dados da literatura mostram que grande parte das fenoloxidasas que atua eficientemente em meio ácido é altamente instável nestes pH (PALMIERI *et alii.*, 1993; GOSHADZE e ÉLISASHVILI, 1994). ÉLISASHVILI e colaboradores (1993) estudando as propriedades de uma lacase do fungo basidiomiceto *Cerrena unicolor*, observaram que o pH ótimo, dependendo do substrato, variava entre 4,5-6,0, e que uma rápida inativação da enzima era observada após uma hora de incubação em pH 3,0.

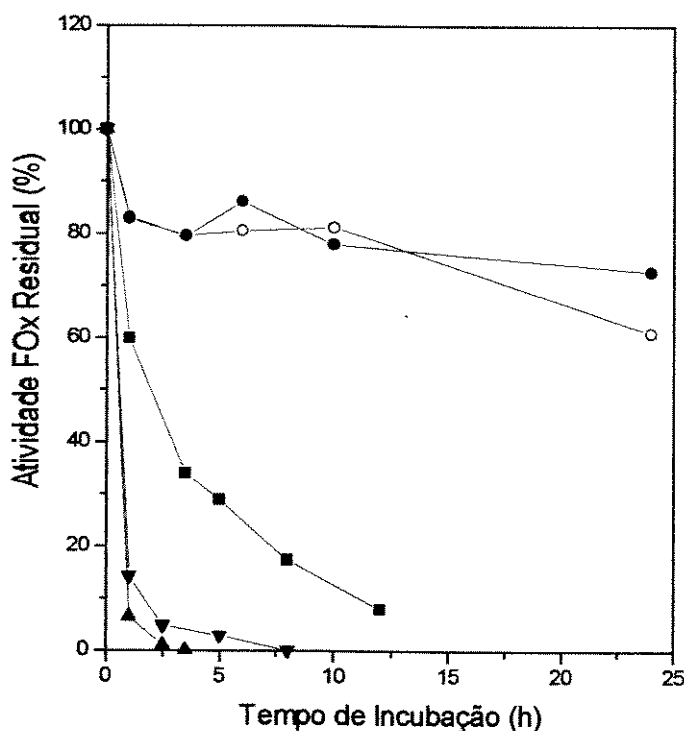


FIGURA 24: Efeito do pH na Estabilidade da Atividade FOx de *T.aurantiacus*. O extrato do fungo foi pré-incubado a 25°C, nos tempos indicados, em presença de 50 mM de tampão citrato-fosfato, nos pHs 2,6 (▲), 2,8 (▼), 3,5 (■), 5,0 (○) e 6,0 (●). Em seguida, a atividade residual foi determinada em presença de o-dianisidina como descrito em Material e Métodos.

II.4.- Efeito da Temperatura na Atividade FOx

O extrato bruto de *T.aurantiacus* apresentou a maior atividade FOx entre 70 e 80°C (Figura 25). Visto que o limite de temperatura para o funcionamento do aparelho era de 80°C não foi possível testar temperaturas maiores para verificar o comportamento da atividade.

A Figura 26 mostra um estudo da estabilidade térmica do extrato bruto com atividade FOx, após incubação em diferentes temperaturas. A 50 e 80°C a estabilidade da atividade FOx foi mantida por mais de 8 horas, e após 5 horas de incubação a 100°C o extrato perdeu aproximadamente menos de 50% da atividade.

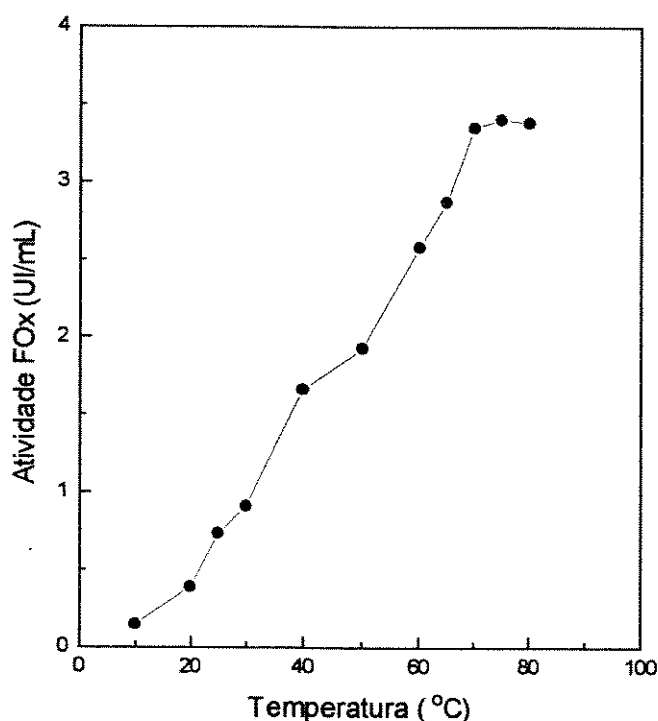


FIGURA 25: Efeito da Temperatura de Reação na Atividade FOx de *T.aurantiacus*. A atividade foi determinada pela oxidação de 1 mM de o-dianisidina à pH 2,8, nas diferentes temperaturas

Existe pouca informação na literatura sobre a produção de fenoloxidasas por microrganismos termófilos. A purificação de uma polifenoloxidase a partir do fungo termófilo *Chaetomium thermophile* foi relatada por ISHIGAMI e YAMADA (1986). A temperatura ótima desta polifenoloxidase é de 55°C. A enzima foi estável a 60°C durante 30 minutos e completamente inativada a 70°C. O actinomiceto termófilo *Thermomonospora fusca* produz uma peroxidase cuja temperatura ótima é de 60°C, com uma meia vida de 70 minutos nesta temperatura e de 40 minutos em 70°C (TRIGO e BALL, 1994). Assim, a atividade FOx do *T.aurantiacus* mostrou uma elevada termoestabilidade, superior à dos microrganismos termófilos *C.thermophile* e *T.fusca*.

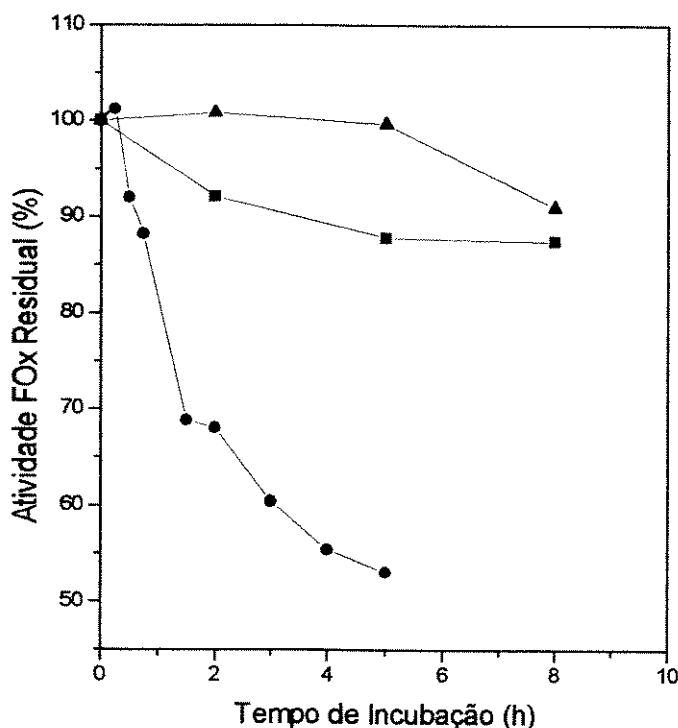


FIGURA 26: Efeito da Temperatura na Estabilidade do Extrato com Atividade FOx de *T.aurantiacus*. O extrato bruto foi incubado em pH 2,8 nos tempos indicados, à 50°C(▲), 80°C(■) e 100°C (●). A seguir, a atividade foi determinada utilizando-se 1 mM de o-dianisidina.

II.5.- Especificidade pelo Substrato

Diversos compostos foram testados como substratos da atividade FOx produzida por *T.aurantiacus*. O extrato bruto oxidou uma ampla variedade de substratos aromáticos típicos de fenoloxidasas, na ausência de H_2O_2 , com diferentes velocidades de reação (Tabela 6).

A maior velocidade de oxidação foi observada com os substratos não-fenólicos ABTS e o-dianisidina e o substrato fenólico 2,6-DMF. A oxidação de ABTS pelo extrato bruto foi 4 vezes maior que a de o-dianisidina. Outros conhecidos substratos de fenoloxidasas tais como floroglucinol, pirogalol, guaiacol e siringaldazine também foram oxidados, porém com baixas velocidades. Já os substratos orcinol, resorcinol e álcool veratrílico não foram oxidados.

O corante fenólico RBB-R, utilizado para medir atividade ligninolítica total em culturas de muitos fungos degradadores de madeira, também foi oxidado pelo extrato bruto de *T.aurantiacus*, o qual foi verificado pela perda da cor azul do reagente (Tabela 6).

A especificidade pelo substrato das fenoloxidasas relatadas na literatura varia grandemente dependendo da espécie fúngica, porém os substratos mais eficientemente

oxidados por estas enzimas (ABTS, o-dianisidina, 2,6 DMF) corresponderam aos melhores substratos da atividade FOx produzida por *T.aurantiacus* (ISHIGAMI *et alii.*, 1988; KOFUJITA *et alii.*, 1991; REHMAN e THURSTON, 1992; THAKKER *et alii.*, 1992; GOSHADZE e ÉLISASHVILI, 1994).

Embora o ABTS tenha-se mostrado um melhor substrato que o-dianisidina para a atividade FOx de *T.aurantiacus*, continuou-se a utilizar o-dianisidina, uma vez que com ABTS a reação de oxidação era difícil de controlar devido a rapidez com que ocorria (muitas vezes em menos de 1 minuto), o que obrigava à utilização de amostras muito diluídas e, além disto, às vezes era observada a formação de um precipitado azul dentro da cela de reação.

TABELA 6: Especificidade pelo Substrato da Atividade FOx presente no Extrato Bruto de *T.aurantiacus*. Os diferentes compostos, em concentração final de 1,0 mM, foram incubados com o extrato a pH 2,8 e 25°C, e o aumento ou diminuição da absorbância foi registrado em cada caso.

Substrato (1,0 mM)	Atividade Relativa (%)	Cor da Reação
o-dianisidina	100,0	vermelha
ABTS	424,9	azul
2,6-DMF	101,3	vermelha
floroglucinol	22,0	amarela
p-nitroanilina	11,0	-----
pírogallol	8,60	vermelha
o-nitroanilina	5,80	-----
guaiacol	4,40	vermelha
sirigaldazine	3,20	purpura
RBB-R	3,20	-----
álcool veratrílico	0,0	-----
orcinol	0,0	-----
resorcinol	0,0	-----

II.6.- Efeito da Concentração de Substrato na Atividade FOx

O efeito da concentração de substrato na atividade FOx foi estudado utilizando-se o-dianisidina em concentrações variadas de 0,01 a 1,0 mM. Na Figura 27 pode-se observar uma curva típica de Michaelis-Menten de velocidade de reação em função da concentração do substrato.

A obtenção dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} , utilizando o-dianisidina, foi feita através da representação gráfica dos duplos recíprocos de LINEWEAVER-BURK. A curva dos duplos recíprocos aparece incluída na Figura 27. O valor de K_m para o-dianisidina em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 2,8 e 25°C, foi de $4,76 \times 10^{-5} M$, com uma V_{max} de 1,64 mmol/min. Nas mesmas condições, quando ABTS foi utilizado como substrato, obteve-se uma K_m igual a $2,30 \times 10^{-5} M$, menor que para o-dianisidina, e uma V_{max} de 3,40 mmol/min.

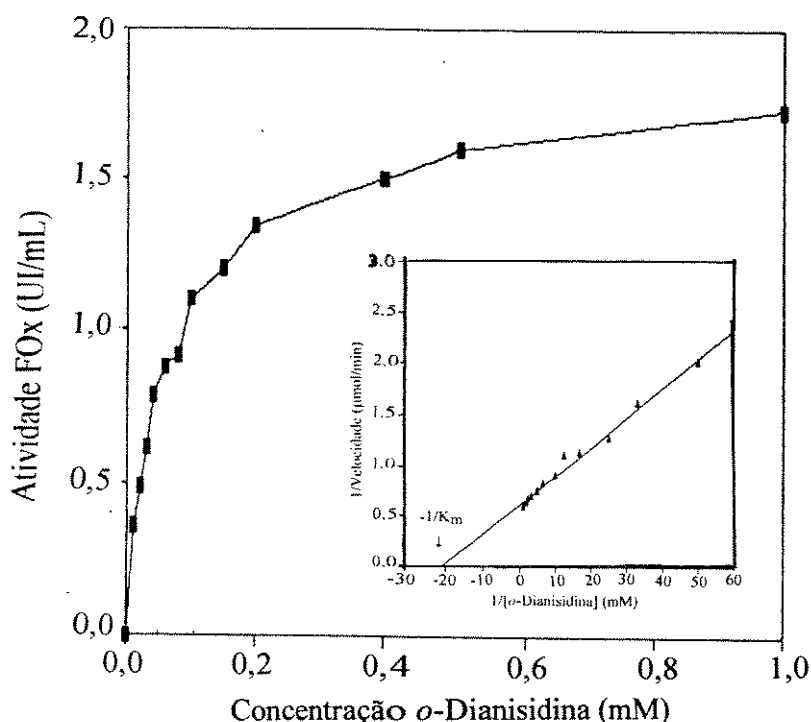


FIGURA 27: Efeito da Concentração de Substrato na Velocidade de Reação. No meio de reação, o extrato bruto foi incubado com diferentes concentrações de o-dianisidina à pH 2,8 e 25°C, e a atividade FOx foi determinada.

II.7.- Efeito de Diferentes Compostos na Atividade FOx

A reação de oxidação de o-dianisidina pelo extrato bruto de *T.aurantiacus* foi conduzida após pré-incubação com diferentes substâncias, com o objetivo de avaliar os seus efeitos inibitórios na atividade FOx do fungo (Tabela 7).

O ácido tioglicólico e a azida sódica provocaram os maiores efeitos inibitórios sobre a atividade FOx presente no extrato bruto. Estes dois reagentes são inibidores típicos de oxidases que contêm metal e já foram relatados como potentes inibidores de atividade FOx do tipo lacase, após combinação com o cobre destas enzimas (BOLLAG e LEONOWICZ, 1984; ISHIGAMI *et alii.*, 1988; KOFUJITA *et alii.*, 1991; THAKKER *et alii.*, 1992).

Os agentes quelantes EDTA e DETAPAC não afetaram a atividade FOx, confirmando os dados da literatura que mostram que estes compostos são inibidores muito fracos de fenoloxidasas (BOLLAG e LEONOWICZ, 1984; ISHIGAMI *et alii.*, 1988). O agente modificante de grupamentos sulfidrílicos (-SH), p-hidroximercuribenzoato, não afetou a atividade, sugerindo a não-participação destes na reação de oxidação de o-dianisidina pelo extrato bruto de *T.aurantiacus*.

TABELA 7: Efeito de Diferentes Substâncias na Atividade FOx presente no Extrato Bruto de *T.aurantiacus*

Substância (1,0 mM)	Atividade FOx Residual (%)
Controle ^a	100,0
NaN ₃	8,9
Ácido Tioglicólico	0,0
EDTA	100,0
DETAPAC	100,0
p-Hidroximercuribenzoato	100,0

a: Oxidação de o-dianisidina determinada na ausência de qualquer composto, em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 2,8

As propriedades da atividade presente no extrato bruto de *T.aurantiacus*, quanto à pH ótimo, estabilidade ao pH, especificidade pelo substrato e efeito de alguns inibidores, apresentaram muitas semelhanças com as propriedades de grande parte das fenoloxidasas do tipo lacase descritas na literatura. A falta de atividade com o substrato tirosina e o fato das reações de oxidação ocorrerem na ausência de H₂O₂ descartam a possibilidade da atividade FOx ser do tipo tirosinase ou peroxidase, respectivamente. Porém, a alta temperatura ótima para a reação de oxidação de o-dianisidina e a alta estabilidade térmica distanciam a atividade FOx de *T.aurantiacus* de uma típica fenoloxidase e colocam em questionamento a natureza proteica de tal atividade.

Desta forma, visando esclarecer a natureza da atividade FOx presente nas culturas de *T.aurantiacus* dar-se-à continuidade à purificação da fração que contém alta atividade FOx, a partir dos caldos induzidos com farelo de trigo.

PARTE III

PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UMA FRAÇÃO COM ATIVIDADE FENOLOXIDÁSICA PRESENTE NAS CULTURAS DE *T.aurantiacus*

Quando a máxima atividade FOx foi alcançada, os caldos extracelulares induzidos com farelo de trigo foram coletados, filtrados e utilizados na etapa de purificação. Dois procedimentos para a purificação de uma fração com atividade FOx foram conduzidos, com base em metodologias da literatura para purificação de fenoloxidasas.

III.1.- Esquema I de Purificação

Esta metodologia corresponde à utilizada por GEIGER e colaboradores (1986) na purificação de fenoloxidasas do tipo lacase, e consistiu na remoção da cor dos caldos, concentração por ultrafiltração e cromatografia em colunas de Sephadex.

Remoção da Cor dos Caldos de Cultura

Um problema comum a todas as culturas contendo materiais lignocelulósicos é a forte coloração marrom dos caldos devido à presença de polifenóis oxidados, que podem prejudicar um processo de purificação e muitas vezes podem-se ligar às proteínas fazendo com que estas percam atividade (ALFENAS *et alii.*, 1991; LEATHAM *et alii.*, 1991).

Uma forma de eliminar os fenóis oxidados é através da precipitação das proteínas com sulfato de amônio ou solventes orgânicos, com posterior eliminação dos fenóis que permanecem em solução. A adsorção dos fenóis em resinas de troca iônica como a DEAE-celulose ou em polímeros insolúveis como PVP, são tratamentos também muito utilizados para clarificar caldos de cultura (GEIGER *et alii.*, 1986; LEATHAM *et alii.*, 1991; ALFENAS *et alii.*, 1991; LEONTIEVSKII *et alii.*, 1991).

Inicialmente, os caldos de cultura induzidos com farelo de trigo foram tratados com um gradiente de sulfato de amônio (30 a 90%), porém a quantidade de precipitado obtido foi insignificante e com baixa atividade FOx. A maior parte da atividade FOx permaneceu no sobrenadante de 90% de saturação. Quando as diferentes frações obtidas após precipitação com sulfato de amônio foram dialisadas observou-se uma perda da atividade FOx através da membrana de diálise. Assim, devido a ineficácia na clarificação dos caldos de cultura por precipitação com sulfato de amônio o método foi descartado do processo de purificação.

A clarificação dos caldos por precipitação foi substituída pela adsorção dos polifenóis oxidados em DEAE-celulose ou PVP, após adição direta destes nos caldos de cultura. Os resultados de ambos tratamentos, quanto à remoção de cor e recuperação da atividade FOx foram comparados (Tabela 8). O método com DEAE-celulose foi mais eficiente na remoção da cor do que aquele com PVP, porém a atividade FOx recuperada após tratamento com PVP foi maior do que com DEAE-celulose.

O tratamento com PVP é muito mais simples e rápido do que aquele com DEAE-celulose, uma vez que com a resina de troca iônica ocorre adsorção dos polifenóis e da atividade FOx, a qual deve ser posteriormente eluída com tampão. Diferentemente, com PVP somente os polifenóis são adsorvidos e a atividade FOx que permanece em solução pode ser

recuperada através de filtração ou centrifugação. A impossibilidade de recuperar toda a atividade após o tratamento para remoção da cor talvez seja consequência da adsorção de uma pequena parte das proteínas que permanecem ligadas aos polifenóis retidos na DEAE ou no PVP.

REHMAN e THURSTON (1992) observaram que no processo de purificação de lacase do fungo *Armillaria mellea* perdia-se uma parte da atividade após cromatografia em DEAE-Sephadex A-50, devido a adsorção da proteína no material polifenólico pigmentado produzido pelo fungo, que fica retido na resina. A recuperação da atividade FOx da resina pode ser melhorada por otimização das condições de eluição (natureza e concentração do tampão, pH, concentração de NaCl, tempo de eluição, etc.).

No presente esquema de purificação foi utilizada DEAE-celulose para a remoção da cor do extrato bruto de *T.aurantiacus*.

TABELA 8: Remoção da Cor do Extrato Bruto de *T.aurantiacus* com DEAE-celulose e com PVP

Tratamento	DEAE-celulose		PVP	
	Ativ.(U/mL)	Cor ^a	Ativ.(U/mL)	Cor ^a
Extrato Bruto	0,960	0,97	0,960	0,97
Após Tratamento	0,350 ^b	0,10	0,550 ^c	0,43

a: Valores expressos como absorbância em 400 nm

b: Atividade FOx recuperada da DEAE por eluição com tampão fosfato 0,0125M, pH 6/0,5 M NaCl

c: Atividade FOx recuperada da PVP após filtração

Concentração da Atividade FOx Presente nos Caldos de Cultura

As frações eluídas da DEAE-celulose, após tratamento para remoção da cor, foram juntadas e concentradas 9 vezes por ultrafiltração através de uma membrana que retém substâncias que possuem uma massa molecular acima de 10 kDa. A atividade FOx foi determinada na fração concentrada (F-I) e na filtrada (F-II) observando-se uma distribuição da atividade em ambas frações (Tabela 9). A fração concentrada F-I foi armazenada a -20°C e o filtrado ativo F-II foi submetido a uma nova concentração por ultrafiltração, desta vez, utilizando-se uma membrana que retém substâncias que possuem uma massa molecular acima de 1 kDa.

A fração F-II foi concentrada 10 vezes e a atividade FOx foi determinada no concentrado e no filtrado. Surpreendentemente, a atividade FOx foi detectada no concentrado (F-III) e no filtrado (F-IV) (Tabela 9). A fração F-IV, que contém componentes com massa molecular abaixo de 1 kDa, foi concentrada por liofilização e armazenada a -20°C para posteriores estudos.

TABELA 9: Atividade FOx nas Diferentes Frações Obtidas após Concentração por Ultrafiltração com Membranas de Corte 10 e 1 kDa

Fração	Volume Final (mL)	Atividade FOx (UI/mL) após Ultrafiltração
I (Concentrado) ^a	50	0,144
II (Filtrado) ^a	340	0,213
III (Concentrado) ^b	35	0,065
IV (Filtrado) ^b	337	0,195

a: Frações resultantes da concentração por membrana de corte 10kDa

b: Frações resultantes da concentração por membrana de corte 1kDa

Os resultados da Tabela 9 mostram que houve uma distribuição da atividade FOx nas diferentes frações após ultrafiltração. Após os dois procedimentos de concentração, os filtrados apresentaram uma atividade FOx maior que os concentrados. É difícil explicar o aparecimento de atividade FOx nas frações de alta e baixa massa molecular e, ao mesmo tempo, poder afirmar que a proteína ou enzima responsável por tais atividades seja a mesma.

O resultado da ultrafiltração foi inesperado, já que estudos anteriores (Partes I e II) sugeriram a presença de uma enzima com atividade FOx do tipo lacase nas culturas do fungo *T.aurantiacus*. Porém, estas enzimas possuem uma massa molecular que varia entre 50 e 140 kDa, o suficientemente alto para ficarem completamente retidas numa membrana de corte 10 kDa (THURSTON, 1994).

As frações resultantes da ultrafiltração foram submetidas à cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-25), para purificação parcial da fração com atividade FOx presente nas diferentes frações.

Cromatografia em Sephadex G-25

O perfil cromatográfico das diferentes frações obtidas por ultrafiltração, que apresentaram atividade FOx, foi estudado após filtração em coluna de Sephadex G-25 (Figuras 28 A,B,C).

A fração I apresentou um pico de absorbância em 280 nm (A_{280}) próximo do volume morto (V_0) da coluna e um ombro depois de um volume de eluição de 10 mL. Em ambas as frações detectou-se atividade FOx, sendo que o pico principal coincidiu com o ombro de proteínas (Figura 28A).

O cromatograma da fração III mostrou um perfil de eluição semelhante àquele da fração I (Figura 28B), porém a atividade FOx que desta vez aumentou, eluiu como um único pico. O perfil de eluição da fração IV foi diferente dos anteriores (Figura 28c), apresentando um único pico de A_{280} coincidente com o de atividade FOx.

Os resultados da cromatografia sugeriram que após a ultrafiltração por membranas de corte 10 e 1kDa, foi possível separar duas frações principais, uma de alta massa molecular (fração I) que apresentou uma atividade FOx pouco significativa, e outra de baixa massa molecular (fração IV) com alta atividade FOx.

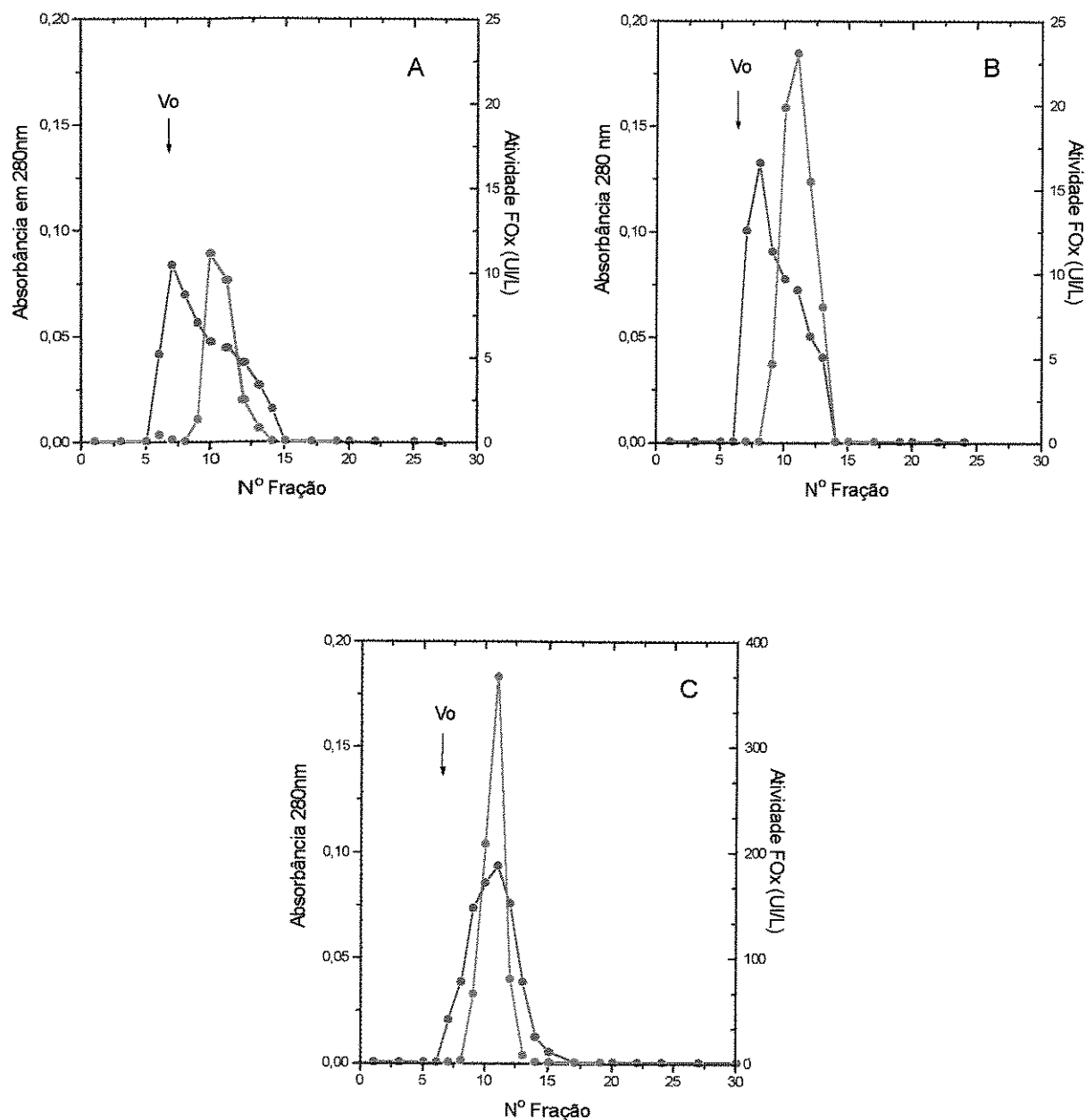


FIGURA 28: Cromatografia em Sephadex G-25 das Frações Obtidas após Ultrafiltração do Caldo Extracelular de *T.aurantiacus*. Foram aplicadas à coluna de Sephadex G-25(1x10 cm) as frações I, concentrado por membrana de corte 10kDa (A), III, concentrado por membrana de corte 1kDa (B) e IV, filtrado resultante da membrana 1kDa (C). A coluna foi eluída com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, com um fluxo de 0,3 mL/min. Frações de 1,0 mL foram coletadas, determinando-se a proteína por leitura de A_{280} (●) e a atividade FOx pela oxidação de 1mM de o-dianisidina(●)

Fica descartada a possibilidade de uma fenoloxidase do tipo lacase ser a responsável pela alta atividade FOx presente nos caldos de cultura de *T.aurantiacus*, uma vez que o Sephadex G-25 permite a separação de moléculas com uma massa molecular que varia entre 1 a 5 kDa (limite de exclusão do gel) e nesta coluna o pico principal de atividade FOx eluiu após o V_0 .

Quando o teor de proteína das frações eluídas da coluna foi determinado pelo método de BRADFORD (1976) os resultados foram inconsistentes, principalmente no caso do pico com alta atividade FOx, onde o desenvolvimento da cor característica desta metodologia não foi observado.

Cromatografia em Sephadex G-10

Quando a fração IV foi aplicada a uma coluna de Sephadex G-10 diversos picos de A_{280} foram obtidos; a atividade FOx eluiu da coluna junto com o último pico (Figura 29). Desta forma, a utilização de uma coluna com um limite de exclusão menor e de dimensões maiores melhorou consideravelmente a resolução da separação.

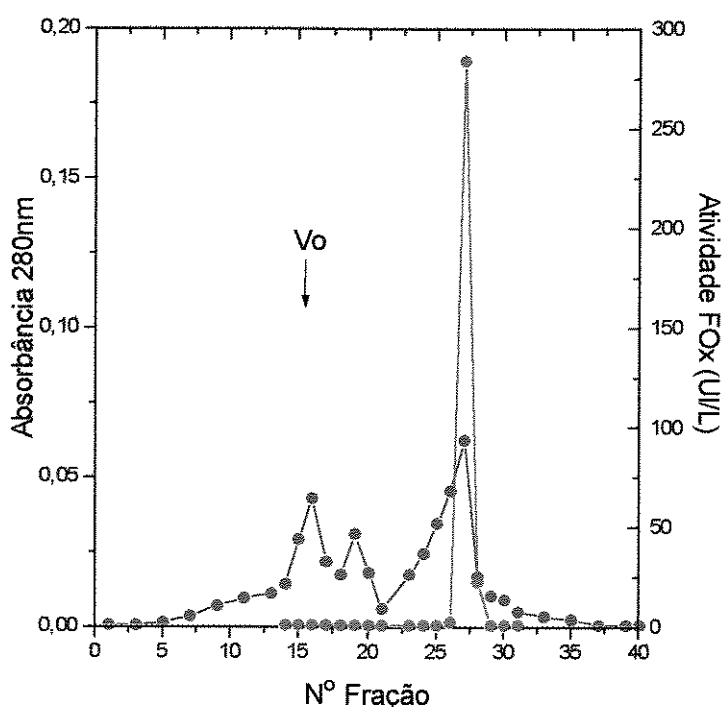


FIGURA 29: Cromatografia em Sephadex G-10 da Fração IV. A Fração IV (filtrado obtido após concentração pela membrana de corte 1kDa) foi submetida a uma coluna de Sephadex G-10 (1,5x50cm). A coluna foi eluída com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, com um fluxo de 0,28 mL/min e frações de 2,5 mL foram coletadas, determinando-se a leitura de A_{280} (●) e a atividade FOx (○).

As frações contendo a atividade FOx foram coletadas da coluna de Sephadex G-10, juntadas, liofilizadas e utilizadas em estudos posteriores. Um resumo das diferentes etapas da purificação parcial da fração com atividade FOx através do esquema I, é mostrado na Tabela 10.

TABELA 10: Etapas na Purificação da Atividade FOx a partir do Caldo de Cultura de *T.aurantiacus*

Etapas	Proteína (mg/mL) ^b	Ativ.FOx (UI/mL)	Ativ.Esp. (U/mg)	Purificação (vezes)
Extrato Bruto	----	0,96	----	----
DEAE-celulose	0,65	0,35	0,53	1
UF PM-1000 ^a	0,34	0,20	0,59	1,1
Sephadex G-25	0,09	0,38	4,20	7,9
Sephadex G-10	0,06	0,35	5,83	11,0

a: Fração IV obtida através de ultrafiltração por membrana de corte 1 kDa

b: Teor de proteína determinado pela leitura da A₂₈₀

Devido às dificuldades na determinação da concentração de proteínas por métodos colorimétricos, esta somente foi expressa em termos de unidades de A₂₈₀ a partir da etapa de clarificação dos caldos com DEAE-celulose. Consequentemente, o grau de purificação do processo foi calculado somente a partir dessa etapa. A atividade específica aumentou bastante após a cromatografia em Sephadex, obtendo-se finalmente uma fração com uma atividade específica de 5,83 U/mg, e uma purificação de 11 vezes (Tabela 10).

III.2.- Esquema II de Purificação

Os resultados obtidos através do esquema I de purificação indicaram a presença de uma fração de baixa massa molecular, que atravessava as membranas de ultrafiltração (corte 1kDa), responsável pela alta atividade FOx nas culturas de *T.aurantiacus*.

Considerando a baixa massa molecular da fração com atividade FOx o esquema I foi modificado por eliminação da etapa de ultrafiltração. Para remoção da cor dos caldos foi preferido o método com PVP, pela sua simplicidade e principalmente porque não há necessidade de introduzir altas concentrações de sais para recuperação da atividade, como no caso da utilização de DEAE-celulose. Quando possível a utilização de tampões foi evitada, visto que devido à baixa massa molecular da fração ativa não havia métodos apropriados para posterior dessalinização.

Após a remoção da cor, os caldos foram concentrados por liofilização e aplicados diretamente sobre a coluna de Sephadex G-10, equilibrada e eluída com tampão. Diversos picos de A₂₈₀ foram observados, sendo que o último apresentou uma alta atividade FOx. Uma pequena atividade foi observada no primeiro pico que elui no Vo da coluna (Figura 30A). O pico com a maior atividade FOx foi coletado, liofilizado e aplicado novamente na coluna de Sephadex G-10, porém desta vez eluído com água bidestilada e desionizada na tentativa de

dessalinização da fração ativa (Figura 30B). O procedimento foi repetido até obtenção de uma quantidade suficiente de material semi-purificado para posteriores estudos de caracterização.

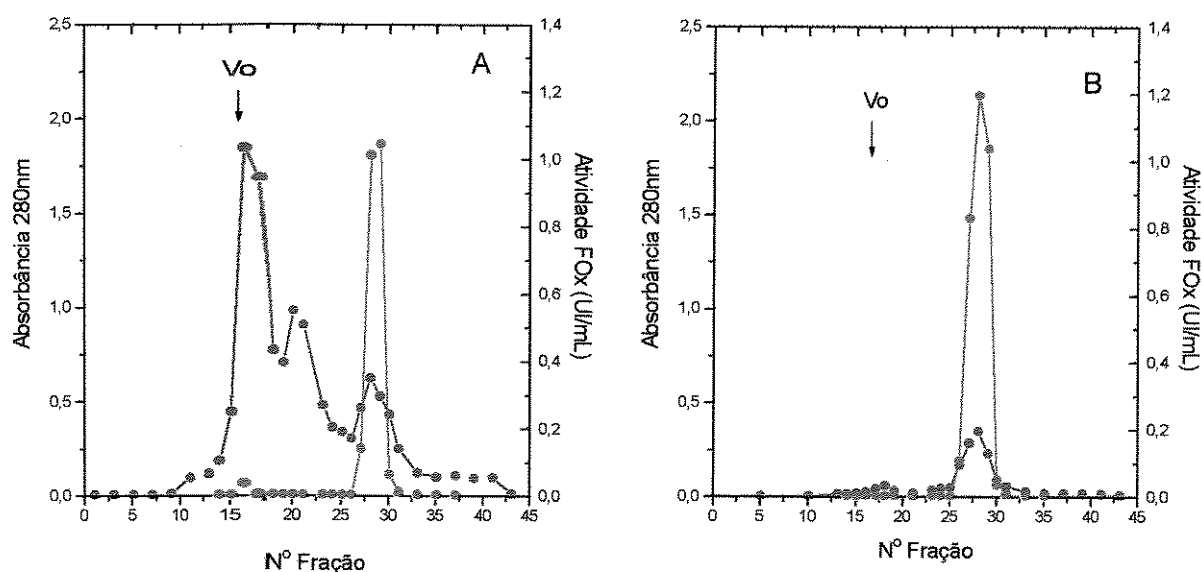


FIGURA 30: Cromatografia em Sephadex G-10 do Caldo de Cultura de *T.aurantiacus* Induzido com 1,5% de Farelo de Trigo. O caldo foi aplicado diretamente na coluna e eluído com tampão TRis-HCl 25 mM, pH 7,5 (A). As frações contendo a atividade FOx (frações 27-30) foram reunidas e após liofilização aplicou-se novamente na coluna de Sephadex G-10 (B), e eluiu-se com água bidestilada e desionizada. Foram coletadas frações de 2,5 mL com um fluxo de 0,28 mL/min, determinando-se a leitura de A₂₈₀ (●) e a atividade FOx (●).

Após a segunda cromatografia em Sephadex G-10 obteve-se uma fração com uma atividade específica de 5,20 U/mg e uma purificação de 10 vezes. Através dos dois esquemas de purificação obteve-se a mesma fração de baixa massa molecular, com alta atividade FOx, parcialmente purificada. Tanto a atividade específica quanto o grau de purificação das frações ativas obtidas através de ambos os esquemas foram semelhantes, porém o esquema II mostrou-se mais simples e rápido que o primeiro.

A coluna de Sephadex G-10 também foi utilizada no estudo dos perfis cromatográficos de um caldo de cultura contendo 1,5% de glicose, onde o fungo apresentou uma atividade FOx muito baixa (0,015 UI/mL), um caldo de cultura contendo 1,5% de serragem (0,46 UI/mL) e um caldo controle contendo somente 1,5% de farelo de trigo (sem atividade FOx). As amostras foram aplicadas na coluna após filtração, clarificação com PVP e liofilização, obtendo-se os cromatogramas da Figura 31.

Todos os cromatogramas apresentaram semelhanças com um pico principal de A₂₈₀ que eluiu no Vo da coluna. A forte cor amarela presente em todos os caldos de cultura, inclusive no controle, eluiu junto com este pico. O perfil de eluição dos caldos de cultura contendo serragem (Figura 31A) ou farelo de trigo (Figura 30A) como indutores foi semelhante,

apresentando um pico com alta atividade FOx no mesmo volume de eluição (tubos 25 e 26). Isto demonstra a semelhança na natureza da atividade FOx presente nos caldos induzidos com estes substratos e que corresponde à mesma fração de baixa massa molecular. O perfil de eluição da cultura contendo 1,5% de glicose como substrato apresentou uma baixa A₂₈₀, e nenhuma atividade FOx foi detectada além daquela muito baixa observada no pico que eluiu no V₀ (Figura 31B).

O caldo controle contendo farelo de trigo (Figura 31C), apresentou um perfil de eluição diferente das outras culturas. Nenhum pico de A₂₈₀ foi observado entre as frações 20 e 28 e nenhuma atividade FOx foi detectada. Fica assim descartada a possibilidade que a alta atividade FOx observada nos caldos induzidos com farelo de trigo, seja devida à presença de algum contaminante proveniente do substrato.

A purificação da enzima responsável pela alta atividade FOx observada nas culturas do *T. aurantiacus* rendeu a mesma fração com alta atividade e de baixa massa molecular (< 1kDa), através da utilização de dois procedimentos diferentes. Esta fração ativa foi purificada de caldos induzidos com farelo de trigo e com serragem, porém não foi encontrada nos caldos contendo somente glicose como substrato ou no caldo controle contendo farelo de trigo.

Diversas dificuldades surgiram nesta etapa do trabalho como consequência da baixa massa molecular da fração com atividade FOx. Procedimentos normalmente utilizados na concentração de proteínas tais como precipitação com sulfato de amônio ou ultrafiltração, não mostraram resultados satisfatórios. A dessalinização da fração ativa através de diálise também se mostrou ineficaz, devido à baixa massa molecular da fração. Apesar da absorbância em 280nm, a natureza proteica ou peptídica da fração com atividade FOx parcialmente purificada é questionada devido à falta de reação com o reagente para proteína, Azul de Coomassie (método de Bradford). A alta estabilidade térmica anteriormente observada com o extrato bruto (Parte II) também justificam este questionamento.

Uma eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), sob condições não desnaturantes, foi conduzida com o objetivo de determinar o grau de purificação da fração obtida da coluna de Sephadex G-10. Após a revelação dos géis com Azul de Coomassie observou-se o aparecimento de diversas bandas somente no lugar onde uma amostra do extrato bruto foi aplicada, enquanto que a fração obtida da coluna de Sephadex G-10 mostrou ausência total de bandas. A ausência de bandas pode ser justificada pelos problemas observados anteriormente com o reagente de coloração ou a problemas com as condições de migração eletroforética devido à própria natureza da fração com atividade FOx, principalmente sua baixa massa molecular.

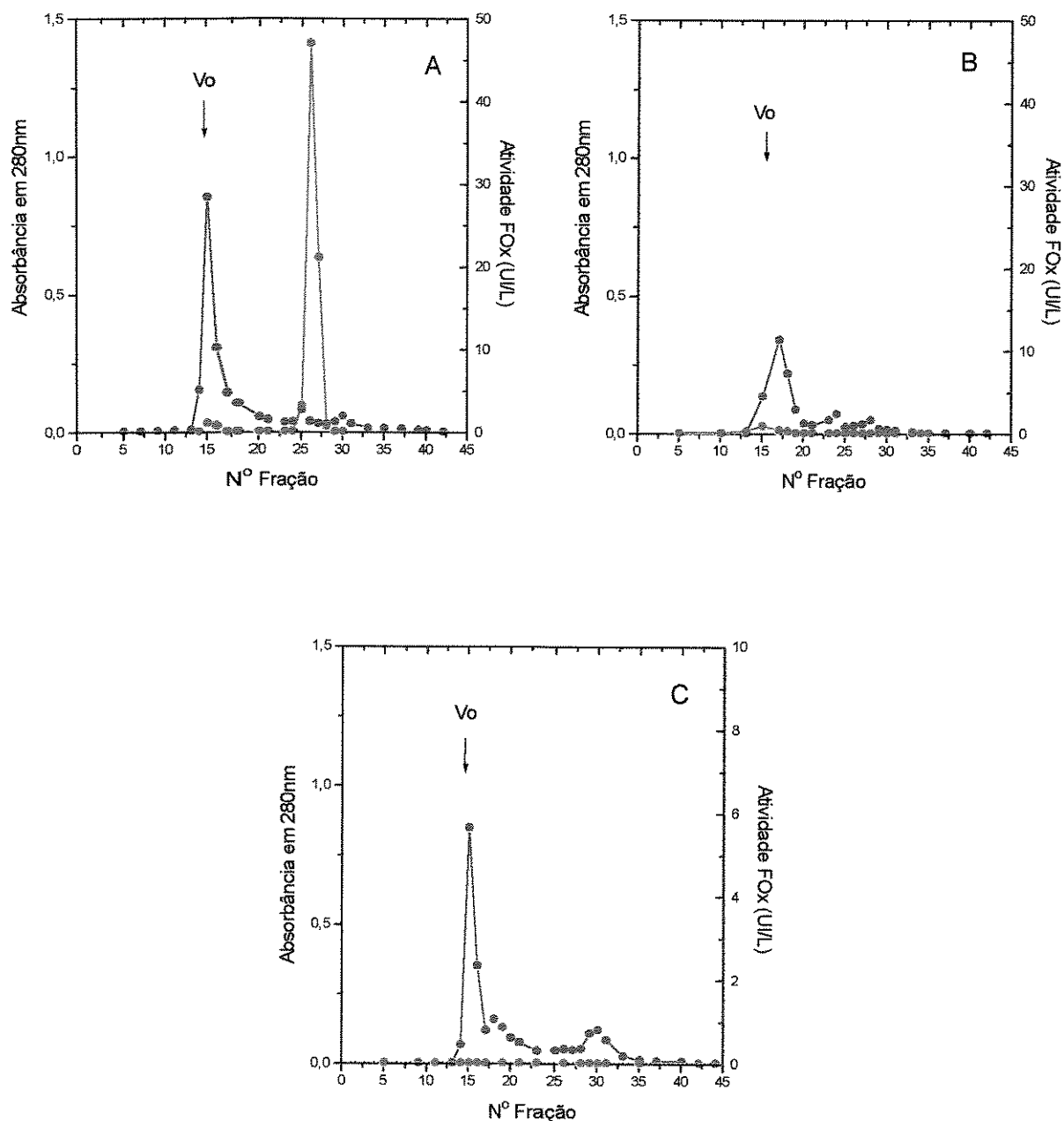


FIGURA 31: Cromatografia em Sephadex G-10 de Diferentes Caldos Cultura de *T.aurantiacus*. Os diferentes caldos foram aplicados diretamente na coluna e eluídos com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, com um fluxo de 0,3 mL/min. Cultura contendo 1,5% Serragem +0,5% Glicose (A), 1,5% Glicose (B) e 1,5% Farelo de Trigo sem inocular, cultura Controle (C). Frações de 2,5 mL foram coletadas, determinando-se a leitura de A_{280} (●) e a atividade FOx (●).

Os resultados desta etapa descartam a possibilidade que a alta atividade FOx observada nos caldos de *T.aurantiacus* seja produzida por fenoloxidasas do tipo lacase, como tinha sido sugerido pelos resultados da caracterização do extrato bruto, ou por algum outro tipo de proteína de alta massa molecular.

As características apresentadas pela fração parcialmente purificada poderiam corresponder a um peptídeo, porém, não se encontra informação na literatura de peptídeos que reúnem as características da atividade produzida por *T.aurantiacus*: catalisar a oxidação de uma ampla variedade de substratos típicos de fenoloxidasas do tipo lacase, em ausência de H₂O₂, e alta estabilidade térmica. Considerando estes resultados e aqueles anteriormente obtidos que mostraram a participação do *T.aurantiacus* na degradação de madeira de *E.grandis* (MACHUCA e DURÁN, 1993), procurou-se informação na literatura à respeito de outros sistemas fúngicos, que não os enzimáticos, implicados no processo de degradação dos componentes da madeira.

Recentemente, os resultados de estudos estruturais da madeira através de microscopia eletrônica questionam a participação das enzimas lignocelulolíticas nos estágios iniciais da degradação dos componentes da madeira. Tal questionamento é justificado com o fato das enzimas possuírem um tamanho muito grande para penetrar nos poros da madeira no início da decomposição. Assim, é postulada a existência de componentes fúngicos extracelulares, não-enzimáticos e de baixa massa molecular, capazes de iniciar o processo de degradação, aumentando o tamanho dos poros na parede da célula vegetal e preparando desta forma a superfície da madeira para a entrada de moléculas de alta massa molecular, tais como as enzimas lignocelulolíticas. Posteriormente, cada uma das enzimas do complexo lignocelulolítico difundiria através dos poros alcançando as diferentes camadas da célula vegetal onde exerceriam sua função, conduzindo à decomposição parcial ou completa dos diferentes componentes da madeira (DANIEL, 1994; EVANS *et alii.*, 1994; JOSELEAU *et alii.*, 1994).

Dentre os componentes não-enzimáticos, especial interesse despertaram os compostos quelantes de Fe de baixa massa molecular (300-1.500 Da), ou "Sideróforos", produzidos por muitos fungos e bactérias. Estes compostos já foram detectados e isolados a a partir de muitos fungos que degradam a madeira, porém a função específica desempenhada por eles na degradação ainda não foi esclarecida (FEKETE *et alii.*, 1989a; JELLISON *et alii.*, 1991; EVANS *et alii.*, 1994; GOODELL *et alii.*, 1995).

Algumas das propriedades da fração com atividade FOx, parcialmente purificada de *T.auranticus*, foram semelhantes àquelas de sideróforos, principalmente a baixa massa molecular (< 1kDa). Assim, a próxima etapa terá como objetivo desvendar a natureza da fração com alta atividade FOx, e para isto será estudada a produção de sideróforos pelo fungo quando cultivado em meio sólido e líquido, e tentar-se-a relacionar a produção destes compostos com a produção da atividade FOx nas culturas do *T.aurantiacus*.

PARTE IV

PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS POR *T.aurantiacus*

A produção de sideróforos por *T.aurantiacus* foi estudada em meio sólido e em meio líquido Czapek através da utilização do reagente universal para detecção de sideróforos CAS, preparado na forma de complexo férrico (v.Material e Métodos) (SCHWYN e NEILANDS, 1987). Junto com a detecção de sideróforos, a atividade FOx também foi determinada durante o período de incubação do fungo, na tentativa de relacionar ambas as cinéticas de produção.

IV.1.- Produção em Meio Sólido

Para estudar a produção de sideróforos em meio sólido o reagente CAS foi incorporado ao meio Czapek modificado, resultando em placas de ágar de cor azul claro. Nestas placas o crescimento do fungo foi muito pobre, com pouca esporulação, devido provavelmente à presença do detergente HDTMA utilizado na preparação do CAS, que é um conhecido inibidor do crescimento de muitos fungos e bactérias (SCHWYN e NEILANDS, 1987; NEILANDS, 1993; RAASKA *et alii.*, 1993).

Apesar do pobre crescimento fúngico, após as primeiras 24 horas de incubação observou-se a formação de um halo cor laranja ao redor da colônia do fungo. A formação do halo é uma evidência da produção de sideróforos extracelulares pelo fungo que atuam retirando o Fe (III) do reagente CAS, provocando desta forma a mudança de cor (SCHWYN e NEILANDS, 1987).

IV.2.- Produção em Meio Líquido

O reagente CAS foi utilizado para estudar a produção de sideróforos pelo *T.aurantiacus* em culturas líquidas contendo glicose ou farelo de trigo como substratos. Aliquotas das culturas foram coletadas em diferentes tempos e utilizadas na determinação de atividade FOx pela oxidação de o-dianisidina e de sideróforos pela reação com CAS.

Na Figura 32 observa-se uma baixa produção de atividade FOx quando o fungo cresceu em um meio contendo 1,0% de glicose como substrato. Bem no início da cultura, quando a formação de massa micelial ainda não era significativa, detectaram-se os maiores valores para a reação com CAS, o que reflete uma alta quantidade de sideróforos disponível para reagir com o CAS. Após uma diminuição brusca, a produção de sideróforos novamente começa a aumentar. Uma correlação negativa foi observada entre a reação com CAS e a produção de atividade FOx. A atividade FOx começou a aumentar após o oitavo dia da incubação, quando a reação com CAS alcançou os menores valores.

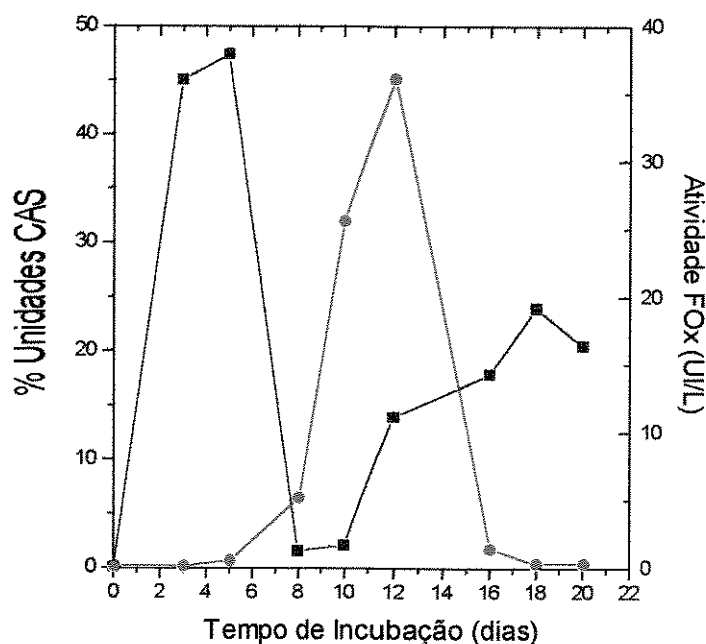


FIGURA 32: Produção de Sideróforos e de Atividade FOX pelo *T.aurantiacus* em Cultura contendo 1,0% de Glicose. A cultura, em pH 6,0, foi incubada à 48°C, sob condições estacionárias. A produção de sideróforos foi estudada pela reação com CAS (■) e a atividade FOX foi determinada com o-dianisidina (●).

O reagente CAS não mede a concentração total de sideróforos numa cultura, e sim a quantidade de sideróforos não-complexados presentes em um determinado momento. A condição para uma reação positiva com o reagente CAS é o sideróforo estar não-complexado, caso contrário, o sideróforo não tem capacidade para retirar o Fe do CAS. Assim, é possível explicar porque no início da cultura com glicose (Figura 32) há uma alta produção de sideróforos, com uma queda posterior. Provavelmente, os sideróforos inicialmente produzidos são gradativamente quelados com o Fe presente no meio de cultura. Após o consumo de todo o Fe disponível e, uma vez que não existe adição posterior de Fe à cultura, os sideróforos que continuam sendo produzidos podem agora reagir com o CAS.

No caso da cultura com farelo de trigo (Figura 33) o perfil de produção de sideróforos é diferente do anterior. Há uma produção inicial de sideróforos disponíveis para reagir com o CAS até o décimo dia da incubação, após o qual a reação deixa de ocorrer. Torna-se difícil poder afirmar se após o décimo dia da incubação não há mais produção de sideróforos ou se estes estão completamente quelados, desde que devido a utilização de farelo de trigo, nestas culturas a concentração aproximada de Fe deve ser bem maior que aquelas contendo glicose.

Porém, da mesma forma que aparece na Figura 32, o pico de atividade FOx coincidia com uma região onde não ocorria reação com CAS.

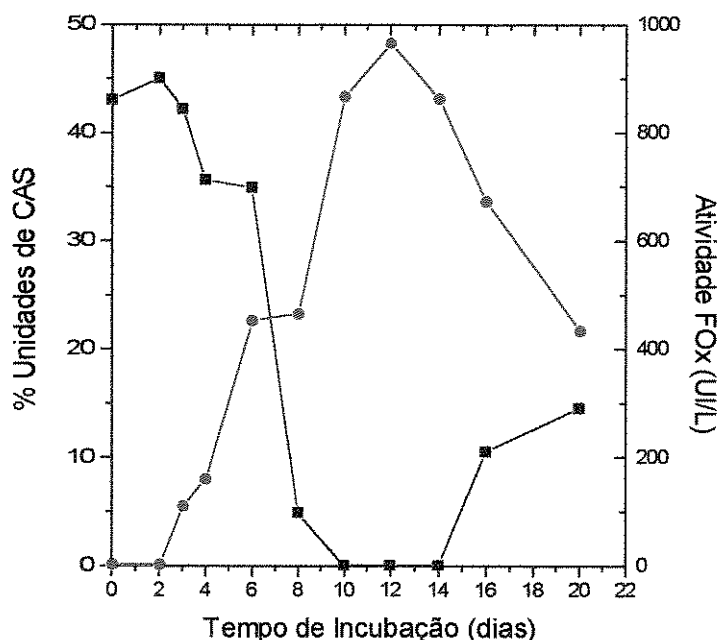


FIGURA 33: Produção de Sideróforos e de Atividade FOx pelo *T.aurantiacus* em Cultura contendo 1,5% de Farelo de Trigo. A cultura, em pH 6,0, foi incubada à 48°C, sob condições estacionárias. A produção de sideróforos foi estudada pela reação com CAS (■) e a atividade FOx foi determinada com o-dianisidina (●)

IV.3.- Detecção de Sideróforos na Fração com Alta Atividade FOx Parcialmente Purificada

Um resultado surpreendente foi obtido após fazer o ensaio de CAS com a fração com alta atividade FOx, parcialmente purificada por coluna de Sephadex G-10. Nenhuma reação foi observada após 24 h de incubação com o reagente. Isto nos leva a propor que o nosso composto parcialmente purificado, com características de sideróforo, deva conter Fe quelado e portanto encontra-se incapacitado de retirar o Fe do reagente CAS. Por outro lado, se a atividade FOx presente na fração parcialmente purificada da cultura de *T.aurantiacus* for produzida por algum tipo de composto quelante, como um sideróforo, a condição necessária para a oxidação dos diferentes substratos ocorrer deverá ser a presença do metal no composto. Portanto, se o composto estiver quelado será capaz de catalizar reações de tipo redox, porém

não será capaz de reagir com o CAS, e contrariamente, se estiver não-complexado não terá capacidade de catalizar tais reações, mas terá capacidade para retirar o Fe do reagente CAS.

Desta forma os resultados obtidos com a fração parcialmente purificada seriam justificados, assim como aqueles obtidos das culturas com glicose e farelo de trigo (Figuras 32 e 33), onde a máxima atividade FOx coincidia com uma baixa reação CAS para sideróforos.

Com o objetivo de comprovar que a fração com atividade FOx, parcialmente purificada, deve conter necessariamente Fe complexado para apresentar atividade, utilizou-se o complexante, insolúvel em água, 8-hidroxiquinoleína para retirar o Fe da fração ativa (JALAL *et alii.*, 1985). A 8-hidroxiquinoleína é muito utilizada na preparação de meios de cultura ou sideróforos livres de Fe e de alguns outros ions metálicos pelos quais tem grande afinidade. Após o tratamento com 8-hidroxiquinoleína durante um longo período de tempo a fração parcialmente purificada continuou apresentar alta atividade FOx e reação negativa com CAS, sugerindo que o Fe continuava presente no composto mesmo depois do tratamento.

Na maioria dos microrganismos a produção de sideróforos é regulada pela quantidade de Fe disponível no ambiente. Geralmente, altas concentrações do metal reprimem a produção destes compostos, enquanto que concentrações bem menores que $1,0 \mu\text{M}$ a induzem (WINKELMANN, 1992; NEILANDS, 1993). O meio líquido Czapek utilizado para o cultivo do *T.aurantiacus* contém $0,72 \mu\text{M}$ de Fe, adicionado na forma de traços, porém essa concentração pode ser maior se considerarmos o Fe que pode existir como contaminante dos substratos ou da água utilizada na preparação do meio.

Nestas condições de cultivo ($[\text{Fe}] \geq 0,72 \mu\text{M}$), *T.aurantiacus* produziu sideróforos e a intensidade da reação com CAS mudou em função do tempo de incubação. Foi possível estabelecer uma correlação entre a máxima produção de atividade FOx e a mínima reação CAS para sideróforos, sugerindo que quando os sideróforos contém Fe quelado são capazes de catalizar a oxidação de o-dianisidina, porém não são capazes de reagir com o CAS. O ensaio com o reagente CAS pode detectar a presença de sideróforos do tipo catecolato ou hidroxamato (os dois grupos principais produzidos pela maioria dos microrganismos), ou seja, a reação ocorre independentemente do tipo de estrutura. Porém, foi demonstrado que a velocidade com que ocorre a transferência de Fe (III) desde o corante até o sideróforo é estritamente dependente da estrutura deste último. Assim, os sideróforos tipo catecolato podem retirar o Fe do CAS em alguns minutos e desta forma a mudança de cor do azul para o laranja é quase instantânea. Já os sideróforos tipo hidroxamato proporcionam uma reação lenta que pode demorar desde algumas horas até dias (SCHWYN e NEILANDS, 1987). No caso das culturas de *T.aurantiacus*, a reação com o reagente CAS não foi instantânea, demorando cerca de seis horas ou mais para começar, e até umas 20 horas para se completar a mudança da cor. Com esta informação pode-se sugerir que os sideróforos produzidos pelo fungo pertencem à classe dos hidroxamatos.

Apesar de ficar demonstrada a produção de sideróforos por *T.aurantiacus*, através da reação com CAS, o mesmo método não serviu para demonstrar que a fração de baixa massa molecular com atividade FOx e parcialmente purificada por coluna de Sephadex G-10, fosse um sideróforo. A explicação seria que a fração FOx é purificada em sua forma complexada com Fe(III), apresentando como consequência uma alta atividade FOx e nenhuma reação com CAS.

O método utilizado para retirar o Fe da fração ativa foi ineficaz, revelando uma afinidade da fração FOx pelo metal muito maior que a da 8-hidroxiquinoleína. Os sideróforos, tipo hidroxamato ou catecolato, quelam o Fe formando complexos de alta afinidade com constantes de associação que variam entre 10^{23} e 10^{52} . A estabilidade dos complexos

sideróforo-Fe(III) é muitas vezes maior a dos complexos de Fe(III) com agentes quelantes do tipo EDTA, citrato, oxalato ou fosfato (NEILANDS, 1981; POWELL *et alii.*, 1982; WINKELMANN, 1992).

Depois de confirmar a presença de sideróforos nas culturas extracelulares de *T.aurantiacus*, e da possibilidade desses sideróforos serem os responsáveis pela alta atividade FOx, uma nova metodologia de purificação foi conduzida. A metodologia mais utilizada na purificação de sideróforos, a extração com solventes orgânicos, foi conduzida com os caldos extracelulares de *T.aurantiacus*. Aos caldos foi adicionado NaCl e posteriormente foram feitas diversas extrações com pequenos volumes de álcool benzílico, de acordo com metodologias da literatura (NEILANDS, 1984; CARSON *et alii.*, 1994). As metodologias mostraram-se ineficazes, uma vez que a atividade FOx, determinada após cada passo da extração, permaneceu na fase aquosa. Outros sistemas de solventes foram posteriormente testados, porém com nenhum deles conseguiu-se extrair a alta atividade FOx dos caldos de cultura. Estes resultados revelaram o alto caráter hidrofílico dos prováveis sideróforos, responsáveis pela atividade FOx de *T.aurantiacus*.

PARTE V: CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO COM ATIVIDADE FOx PARCIALMENTE PURIFICADA

A baixa massa molecular (<1kDa) revelada pela fração com atividade FOx, após sua purificação parcial, fez suspeitar da presença de compostos quelantes tipo sideróforos. A utilização do reagente CAS mostrou a produção de sideróforos por *T.aurantiacus* em meios sólido e líquido, porém não houve reação com a fração ativa parcialmente purificada. Assim, para confirmar a suspeita da natureza tipo sideróforo da atividade FOx presente no extrato bruto de *T.aurantiacus*, procedeu-se a caracterização das propriedades cinéticas e físico-químicas da fração com atividade FOx parcialmente purificada (fração FOx).

V.1.- PROPRIEDADES CINÉTICAS DA FRAÇÃO PARCIALMENTE PURIFICADA

As propriedades cinéticas da fração de baixa massa molecular com alta atividade FOx foram estudadas da mesma forma como descrito para o extrato bruto, e os resultados foram posteriormente comparados (Tabela 11).

O comportamento da fração parcialmente purificada frente ao pH foi idêntico àquele observado com o extrato bruto. A máxima atividade FOx foi obtida em meio ácido, com um ótimo em pH 2,8, em tampão citrato-fosfato e pH 2,6, em tampão tartarato. Em pHs acima de 5,0 nenhuma atividade foi detectada. Da mesma forma, a maior estabilidade da fração parcialmente purificada foi observada em meio neutro e levemente alcalino, porém após 9 horas de incubação em pH 3,0 a fração perdeu completamente a atividade FOx.

Quando os efeitos da temperatura sobre a atividade e estabilidade da fração parcialmente purificada foram estudados, novamente observou-se um comportamento idêntico com o extrato bruto. Os melhores resultados de oxidação de o-dianisidina foram obtidos nas temperaturas acima de 50°C, com um ótimo cerca de 80°C. A fração ativa apresentou uma alta estabilidade térmica em altas temperaturas (50-100°C). Quando a fração foi incubada nas temperaturas de 50 e 80°C, a estabilidade permaneceu inalterada por mais de 5 horas, e a 100°C a fração perdeu 50% da atividade somente após 4 horas de incubação.

A fração de baixa massa molecular responsável pela alta atividade FOx, mostrou-se muito mais sensível à mudanças de pHs do que à altas temperaturas. A presença do substrato (o-dianisidina), protegeu a fração FOx em meio ácido, onde foram observadas as maiores velocidades de reação. Ao mesmo tempo, a fração FOx mostrou-se altamente resistente à elevadas temperaturas na presença ou ausência do substrato.

O estudo de especificidade pelo substrato da fração parcialmente purificada foi conduzido utilizando-se substratos típicos de fenoloxidasas do tipo lacase, exceto tirosina e álcool veratrílico, substratos de tirosinase e lignina-peroxidase respectivamente. A fração FOx oxidou em ausência de H₂O₂, em maior ou menor grau, todos os substratos testados, exceto tirosina e álcool veratrílico, mostrando por tanto possuir um potencial de óxido-redução semelhante ao de lacases (Tabela 12).

TABELA 11: Propriedades Cinéticas da Fração com Atividade FOx Parcialmente Purificada de *T.aurantiacus*

Propriedades	Fração FOx	Extrato Bruto ^f
pH ótimo ^a	2,8	2,8
Estabilidade ao pH (% Ativ.residual) ^b		
a) 10 h pH 5-6	a) 80-100%	a) 80-100%
b) 5 h pH 2,6-3,5	b) 0-35%	b) 0-30%
Temperatura ótima ^c	80°C	80°C
Estabilidade térmica (% Ativ. residual) ^d		
a) 5h a 50 e 80°C	a) 85-100%	a) 90-100%
b) 4h a 100°C	b) 50%	b) 60%
Km o-dianisidina ^e	2,85x10 ⁻⁵ M	4,76x10 ⁻⁵ M
ABTS	0,87x10 ⁻⁵ M	2,30x10 ⁻⁵ M

a: Atividade de oxidação de o-dianisidina 1mM em tampão citrato-fosfato 50 mM, 25°C

b: Estabilidade determinada em tampão citrato-fosfato e atividade determinada pela oxidação de o-dianisidina em pH 2,8, 25°C

c: Atividade de oxidação de o-dianisidina 1mM, pH 2,8, tampão citrato-fosfato 50mM

d: Idem c, porém à 25°C

e: Parâmetros cinéticos determinados nas condições ótimas anteriormente definidas

f: Os parâmetros do Extrato Bruto foram obtidos na Parte II

Além da o-dianisidina, a fração FOx apresentou altas atividades com substratos como ABTS e 2,6-DMF, sendo que após ocorrer a reação observou-se a formação de um precipitado dentro da cela de reação, sugerindo a polimerização do(s) produto(s) de oxidação. Guaiacol e siringaldazine foram lentamente oxidados em relação a o-dianisidina, obtendo-se valores ainda menores de aqueles observados com o extrato bruto.

Um novo tipo de substrato foi testado com a fração parcialmente purificada, o 5-hidroindol, descoberto recentemente como substrato de diversas lacases de origem vegetal e fúngica (CAI *et alii.*, 1993). Os autores propõem que este substrato permite distinguir entre as atividades das enzimas lacases e catecol oxidases, uma vez que as últimas não oxidam derivados de hidroindol. A fração parcialmente purificada revelou uma atividade de oxidação de 5-hidroindol maior que a atividade com siringaldazine ou guaiacol, nas mesmas condições de reação.

A especificidade da fração FOx pelos substratos ABTS e o-dianisidina foi comparada através da determinação da Km para ambos substratos. A afinidade pelos dois substratos aumentou após a purificação parcial, como demonstrado pelos respectivos valores de Km (Tabela 11). A fração parcialmente purificada e o extrato bruto apresentaram maior afinidade pelo ABTS do que pela o-dianisidina.

A especificidade por ABTS do extrato bruto e da fração parcialmente purificada foi comparável e às vezes maior que a especificidade de muitas fenoloxidasas descritas na literatura. A especificidade por ABTS das fenoloxidasas do fungo degradador de lignina *P.tigrinus*, determinada pelo valor de Km foi de $5,26 \times 10^{-3} \text{M}$ para MnP e de $5,40 \times 10^{-5} \text{M}$ para uma oxidase (LEONTIEVSKII *et alii.*, 1991). Os fungos degradadores de madeira *P. ostreatus* e *Ceriporiopsis subvermispora* apresentaram um valor de Km com ABTS de $2,8 \times 10^{-4} \text{M}$ e $3,0 \times 10^{-5} \text{M}$, respectivamente (PALMIERI *et alii.*, 1993; FUKUSHIMA e KIRK, 1995).

TABELA 12: Especificidade pelo Substrato da Atividade FOx Presente na Fração Parcialmente Purificada e no Extrato Bruto de *T.aurantiacus*

Substrato(1mM) ^a	Atividade FOx $\Delta \text{Abs} \times \text{mL}^{-1} \times \text{min}^{-1}$	Ativ.Relativa (%) Fração FOx	Ativ.Relativa (%) Extrato Bruto ^b
o-Dianisidina	3,10	100,0	100,0
ABTS	17,40	561,3	424,9
2,6-DMF	5,27	170,0	101,3
5-OH Indol	1,80	58,1	n.d. ^c
Siringaldazine	0,09	2,9	3,2
Guaiacol	0,07	2,0	4,4
Álcool Veratílico	0,0	0,0	0,0
Tirosina	0,0	0,0	0,0

a: A oxidação de cada substrato foi ensaiada em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 2,8, 25°C

b: Valores tirados da Tabela 6

c: Atividade não determinada

Diversos compostos, conhecidos inibidores de oxidases que contém metal no seu sítio ativo, foram utilizados no estudo de inibição da velocidade de oxidação de o-dianisidina pela fração parcialmente purificada. Os resultados obtidos com a fração FOx foram comparados com aqueles obtidos com o extrato bruto (Tabela 13).

Somente os compostos azida sódica e ácido tioglicólico provocaram um efeito de inibição na atividade da fração parcialmente purificada, que foram os mesmos inibidores da atividade FOx presente no extrato bruto. Porém, surpreendentemente, o grau de inibição da fração FOx foi muito menor que aquele observado com o extrato bruto. Talvez, no caso do extrato bruto o efeito de inibição possa estar sendo mascarado pela presença de outras enzimas, fenoloxidasas típicas, que também oxidam o-dianisidina e que podem ser inibidas por estes compostos.

Os agentes complexantes de íons metálicos EDTA e DETAPAC não tiveram efeito inibitório sobre a atividade FOx. O efeito dos íons metálicos Fe (III), Fe (II), Cu (II) e Mn(II) não inibiram a atividade FOx, ao contrário provocaram um aumento desta, sendo o Mn responsável pelo maior aumento da atividade (Tabela 13).

O efeito de inibidores sobre a atividade FOx da fração parcialmente purificada e do extrato bruto foi semelhante ao efeito observado com fenoloxidasas do tipo lacase. Azida sódica e ácido tioglicólico provocam uma inibição de 100% em grande parte das lacases. Já os complexantes tipo EDTA e DETAPAC, não costumam ser inibidores destas enzimas. Diferentemente do observado com a atividade FOx de *T.aurantiacus* os íons metálicos Fe (II) e Cu (II) comportam-se como inibidores de lacases de outros microrganismos (LEONTIEVSKII *et alii.*, 1991; KOFUJITA *et alii.*, 1991; FUKUSHIMA e KIRK, 1995).

TABELA 13: Efeito de Diferentes Compostos sobre a Atividade FOx Presente na Fração Parcialmente Purificada e no Extrato Bruto

Composto	Atividade FOx Fração (UI/mL) ^a	% Inibição Fração FOx	% Inibição Extrato Bruto ^b
Controle ^c	0,120	0,0	0,0
Azida sódica	0,096	20,0	91,0
Ac. tioglicólico	0,054	55,0	100,0
EDTA	0,124	0,0	0,0
DETAPAC	0,128	0,0	0,0
FeCl ₃	0,139	0,0	n.d. ^d
FeSO ₄	0,140	0,0	n.d.
CuCl ₂	0,135	0,0	n.d.
MnSO ₄	0,147	0,0	n.d.

a: Atividade determinada pela oxidação de o-dianisidina em tampão citrato-fosfato 50mM, pH 2,8, 25°C, após pré-incubação com 1,0 mM de cada composto

b: Valores tirados da Tabela 7

c: Atividade determinada na ausência de qualquer um dos compostos

d: Atividade não determinada

As propriedades cinéticas da atividade FOx presente no extrato bruto e na fração parcialmente purificada foram idênticas quanto à pH e temperatura ótimos, estabilidade e especificidade pelo substrato. Estes resultados demonstram, que a natureza da atividade FOx presente no extrato bruto é a mesma presente na fração purificada, devido à semelhança das propriedades. Somente o efeito de inibidores mudou e, após a purificação parcial, a fração com atividade FOx sofreu um efeito de inibição muito menor aos compostos que quando comparado com o extrato bruto.

Da mesma forma como observado para grande parte das lacases, MnP e LiP produzidas por fungos degradadores de madeira, a fração parcialmente purificada de *T.aurantiacus* apresentou uma ótima atividade em meio ácido. O substrato natural dos fungos produtores de enzimas ligninolíticas, a madeira, geralmente apresenta baixos valores de pH, que diminuem mais ainda quando os fungos iniciam o processo de degradação. Assim, do ponto de vista fisiológico, é possível explicar a importância de enzimas ou compostos de baixa massa molecular capazes de catalizar reações em uma faixa de pHs de 2,0 a 4,0. Por outro lado, a formação de radicais catiônicos, mecanismo essencial para a degradação de lignina, é favorecida em meio ácido.

CHANDHOKE e colaboradores (1992) mostraram que a oxidação de KTBA pelo composto de baixa massa molecular do fungo *G.trabeum*, via transferência de um elétron, ocorre mais eficientemente em meio ácido. GOODELL e colaboradores (1995), isolaram uma série de sideróforos do tipo fenolato de *G.trabeum* com capacidade de complexar e posteriormente reduzir o Fe (III) complexado para Fe (II), e observaram que a redução era acelerada à pH 2,0, sendo que nenhuma redução era observada em pHs acima de 7,0.

Assim, quanto às propriedades de pH, a fração com atividade FOx de *T.aurantiacus* apresentou características muito semelhantes com muitas fenoloxidasas verdadeiras e com alguns compostos de baixa massa molecular, tipo sideróforos, produzidos por fungos que degradam madeira. Quanto às altas temperaturas de atividade e estabilidade observadas com a fração FOx, não foram encontrados resultados semelhantes na literatura nem com fenoloxidasas, nem com compostos do tipo sideróforos.

V.2.-PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA FRAÇÃO PARCIALMENTE PURIFICADA

Determinação da Massa Molecular Aparente da Fração FOx

A principal dificuldade na determinação da massa molecular da fração ativa através de filtração em coluna de Sephadex foi a falta de padrões de baixa massa molecular. A massa molecular aparente da fração parcialmente purificada ativa foi de 530,0 Da, determinada através da curva de calibração da Figura 34.

A baixa massa molecular da fração FOx é comparável com a de sideróforos de muitos fungos e bactérias. A massa molecular destes quelantes varia entre 500-1000 Da, sendo que existem alguns que possuem uma massa molecular menor de 400 Da. TRICK e KERRY (1992), isolaram uma série de sideróforos de culturas de cianobactérias, com uma massa molecular compreendida entre 300 e 500 Da, determinada por cromatografia em coluna de Biogel P2.

A fração FOx foi também analisada por espectrometria de massas, na tentativa de uma determinação mais precisa da massa molecular. Porém, a técnica de ionização por impacto de elétrons (IE) utilizada resultou na formação de diversos fragmentos muito pequenos com perda do íon molecular (v.Fig. 1A, Apêndice II).

Embora a cromatografia em gel seja bastante utilizada na determinação da massa molecular de sideróforos, a metodologia recomendada para este tipo de compostos é a técnica FAB ("fast atom bombardment" ou bombardeamento com átomos rápidos) de espectrometria de massas, uma vez que a utilização de cromatografia geralmente conduz a valores subestimados (CARSON *et alii.*, 1994). Devido à natureza dos sideróforos, muitas vezes podem ocorrer fortes interações com a matriz da coluna de filtração, o qual retardaria a eluição, resultando na subestimação da massa molecular (TRICK e KERRY, 1992).

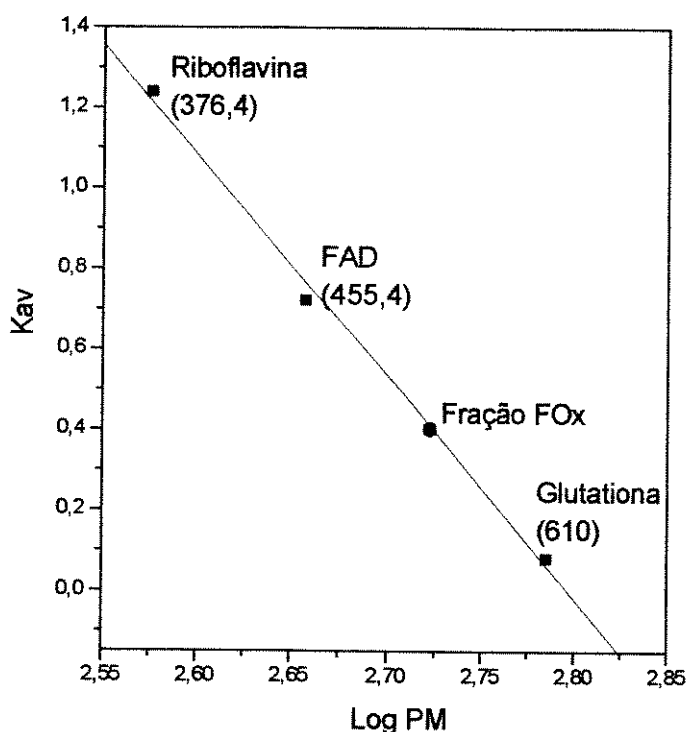


FIGURA 34: Determinação da Massa Molecular da Fração com Atividade FOx Parcialmente Purificada por Filtração em Sephadex G-10. A massa molecular foi determinada por regressão linear simples. Entre parenteses estão indicadas as massas moleculares das substâncias padrões.

Determinação de Proteína e Análise de Aminoácidos da Fração FOx

Diversos estudos foram realizados utilizando-se a fração parcialmente purificada por Sephadex G-10. Na Tabela 14 aparecem os resultados da determinação de proteína na fração purificada pelos métodos de Lowry, Bradford e pela leitura da absorbância em 280 nm.

A determinação de proteína com o corante Azul Brilhante de Coomassie (Método de Bradford) não deu a mudança de cor característica para proteína, devido à natureza não-proteica da fração parcialmente purificada. A leitura da absorbância em 280nm deu valores maiores aos obtidos pelo método de Lowry. A base do método de Lowry é o desenvolvimento de cor devido à ligação peptídica e à presença dos aminoácidos tirosina e triptofano numa proteína, porém o mesmo método já foi utilizado na determinação da concentração de sideróforos do tipo hidroxamato produzidos por alguns fungos (MANULIS *et alii.*, 1987; BARASH *et alii.*, 1988).

SUBRAMANIAN e colaboradores (1965), que desenvolveram o método de determinação da concentração de sideróforos, afirmam que a interação do ácido hidroxâmico com o reagente de Folin resulta na formação de um complexo azul, sob condições alcalinas. A validade do método foi confirmada pela utilização do sideróforo comercial Desferrioxamina (Desferal), constituído principalmente de hidroxamato. Como observado na Tabela 14, uma concentração de desferrioxamina (não-complexado com Fe (III)) de 10 µg/mL resulta em uma absorbância de 0,053 em 660 nm, após reação com o reagente de Folin. A desferrioxamina não reage com Azul Brilhante de Coomassie e não apresenta nenhuma absorbância em 280 nm. Desta forma, é possível afirmar que, embora um composto não possua natureza proteica ou peptídica, ou não apresente aminoácidos na sua estrutura, ele será capaz de reagir através do método de Lowry se apresentar ácidos hidroxâmicos.

De acordo com os resultados obtidos com desferrioxamina, pode-se sugerir que a reação positiva através do método de Lowry possa ser resultado da presença de ácidos hidroxâmicos na fração FOx, o que confirmaria a natureza de sideróforo tipo hidroxamato, porém não se pode descartar ainda que a reação seja devida à presença de algum aminoácido na fração parcialmente purificada.

TABELA 14: Dosagem de Proteína na Fração Parcialmente Purificada^a através de Diferentes Métodos

Método	Proteína (µg/ml)	Desferrioxamina (µg/mL)
Leitura da A ₂₈₀	256,4	0,0
Lowry	50,0 ^b (0,056) ^c	10,0 (0,053) ^c
Bradford	n.r. ^d	n.r.

a: Utilizou-se uma concentração da fração liofilizada de 25 mg/mL

b: Determinada através de curva padrão com BSA

c: Leitura da absorbância em 660 nm

d: Não há reação

A fração com atividade FOx parcialmente purificada foi submetida a hidrólise ácida durante 24 horas (v. Material e Métodos), e posteriormente analisada por cromatografia de troca iônica em um analisador automático de aminoácidos. Após hidrólise, a fração FOx perdeu completamente a atividade de oxidação de o-dianisidina e o resultado da análise revelou uma ausência de aminoácidos. Nas condições de hidrólise da fração ativa (6N HCl/104°C) perde-se o aminoácido triptofano, portanto, não é possível afirmar uma ausência total de aminoácidos na fração com atividade FOx de *T.aurantiacus*.

Caracterização Estrutural da Fração FOx

Na Figura 35A é mostrado o espectro de absorção UV/vis da fração purificada por Sephadex G-10, liofilizada e ressuspensa em água bidestilada e desionizada (pH 7,6). O espectro apresenta uma banda de absorção forte abaixo de 230 nm, um ombro entre 280-290 nm e outro mais definido em 350nm. Estas bandas de absorção foram características da fração FOx, e foram reprodutíveis através das diferentes metodologias de purificação. O espectro sofreu uma grande modificação em meio fortemente ácido (pH 1,5) na região de 350nm (Figura 35B). Em meio alcalino (pH 12) um aumento da intensidade das bandas foi observado, aparentemente sem deslocamento dos máximos (Figura 35C).

Após a hidrólise ácida (6N HCl/104°C, durante 24h) a fração FOx perdeu completamente a atividade e no espectro de absorbância observou-se o desaparecimento do ombro em 350 nm, permanecendo somente a banda de absorção abaixo de 230nm (Figura 35D). Assim, é possível afirmar que a banda de absorção em 350nm esteja relacionada com a atividade FOx da fração parcialmente purificada.

Uma análise por espectroscopia no infravermelho da fração parcialmente purificada foi também conduzida. O espectro obtido foi analisado e as bandas atribuídas com base na literatura (SILVERSTEIN *et alii.*, 1981) (Tabela 15). ATKIN e NEILANDS (1968) atribuíram a banda em 1.594 cm^{-1} observada no espectro de IV do sideróforo ácido rodotorúlico à carbonila de ácido hidroxâmico (estiramento C=O), apesar desta banda estar em uma região abaixo da observada para os ácido acetohidroxâmico e desferri-ferricromo, normalmente encontrados entre $1.630\text{-}1.660\text{ cm}^{-1}$.

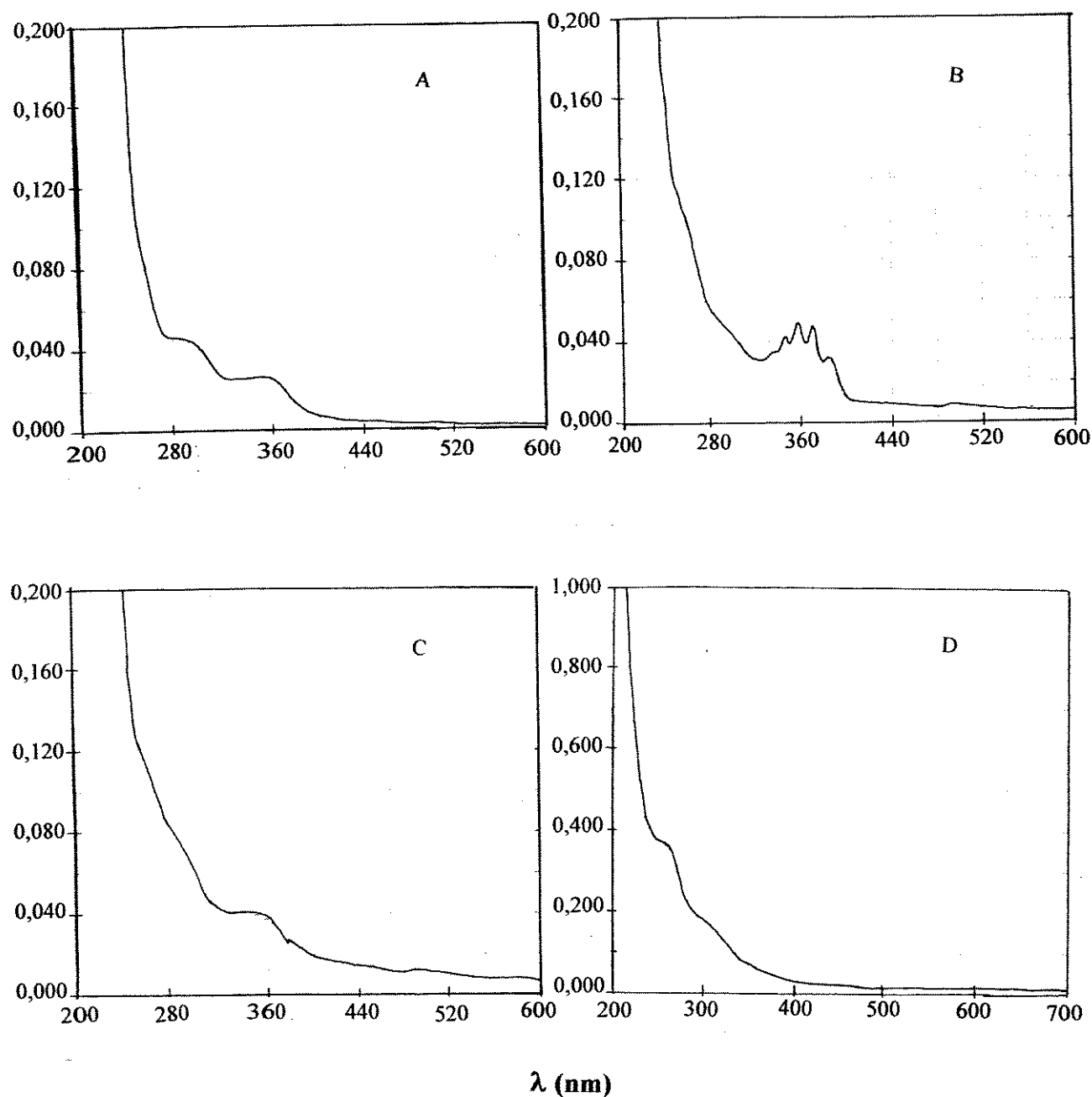


FIGURA 35: Espectros de Absorbância UV/Vis da Fração com Atividade FOx Parcialmente Purificada. Uma amostra da fração FOx foi ressuspensa em água bidestilada e desionizada (pH 7,6) e o espectro UV/Vis foi registrado à 25°C (A). Amostra após acidificação da solução para pH 1,5 por adição de HCl (B); amostra após alcalinização da solução para pH 12,0 por adição de NaOH (C); amostra após hidrólise ácida durante 24h à 104°C (D).

TABELA 15: Atribuição de Bandas do Espectro de IV da Fração Parcialmente Purificada

Banda (cm ⁻¹)	Atribuição
3.433	estiramento O-H ou N-H
3.226	estiramento N-H
2.942	estiramento C-H
1.632	estiramento C=O (referente à carbonila de amida)
1.550	estiramento C=O (referente à carbonila de ác. carboxílico)
1.038	estiramento C=O

O espectro de IV da fração FOx foi registrado entre 4.000 e 500 cm⁻¹, em pastilha de KBr (v Fig. 1A, Apêndice II).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ¹H e de ¹³C da fração parcialmente purificada dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) foram registrados a 300 MHz, e os sinais observados junto com suas atribuições são mostradas na Tabela 16.

TABELA 16: Sinais Observados nos Espectros de RMN-¹H e ¹³C da Fração Parcialmente Purificada

	Deslocamento químico (ppm)	Atribuição
¹ H	3.40 (singlete)	-CH ₂ O ou -CH ₂ N
	8.35 (singlete)	-COOH ou NOH
¹³ C	Dois sinais em 59 e 60	-CH ₂ N ou CH ₂ O

O experimento de DEPT ("Distortion-less enhancement by polarization transfer") indicou apenas a presença de carbonos do tipo CH₂ e C_O (quaternário), descartando a possibilidade da presença de grupos CH e CH₃ na estrutura da molécula.

Provavelmente devido à presença do Fe na fração FOx o espectro de RMN foi bastante simples, apresentando poucos sinais (v. Fig.2 e 3A, Apêndice II). É sabido que o paramagnetismo do Fe(III) elimina dos espectros grande parte dos sinais característicos dos sideróforos do tipo catecolato ou hidroxamato, e é portanto recomendada a remoção completa deste metal antes de qualquer análise espectroscópica (NEILANDS, 1984). O método comumente utilizado é o tratamento com o complexante 8-hidroxiquinoleína, porém como mostrado anteriormente, no caso da fração FOx o tratamento com 8-hidroxiquinoleína resultou ineficaz, sugerindo uma alta estabilidade do complexo sideróforo-Fe (v. Parte IV).

Os dados espectroscópicos de ressonância magnética nuclear (¹H e ¹³C) e de IV, descartaram a presença de grupamentos aromáticos na estrutura da fração parcialmente purificada com características de sideróforo, permitindo descartar desta forma a possibilidade de sideróforo do tipo catecolato. Ao mesmo tempo, os dados sugerem uma estrutura de tipo hidroxamato, reforçando as observações anteriores (tipo de reação CAS e reação com Folin) que já sugeriam a presença de um siderófo do tipo hidroxamato.

Caracterização da Fração FOx por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A análise da fração FOx, eluída como um pico só da coluna de Sephadex G-10, foi conduzida em uma coluna de fase reversa por HPLC, onde foi obtido mais de um pico de absorbância em 280 nm. Com 95% de metanol/água como fase móvel, a fração FOx foi ressolvida em três picos principais com diferentes tempos de retenção (Figura 36A). Quando a polaridade da fase móvel foi aumentada até 85%, a resolução dos picos aumentou (resultados não apresentados).

Quando uma amostra da fração FOx hidrolisada (6,0 N HCl/104°C) foi aplicada na coluna de fase reversa, somente um pico foi observado (Figura 36B). O tempo de retenção do pico presente no hidrolisado corresponde ao tempo de retenção do último pico que elue da coluna no caso da fração íntegra.

A obtenção de três picos com diferentes tempos de retenção no cromatograma, pode corresponder a diferentes formas de um mesmo composto do tipo hidroxamato, complexado com Fe. Dados da literatura indicam que o sideróforo de tipo hidroxamato Rhizobactina 1021, quando complexado com Fe, pode existir sob diferentes formas. Assim, a análise por HPLC deste sideróforo revelou o aparecimento de múltiplos picos, com diferentes polaridades e portanto com diferentes tempos de retenção na coluna de HPLC (PERSMARK *et alii.*, 1993). Resultados semelhantes foram obtidos com o sideróforo Rhizoferrina, o qual era separado junto com sua forma desidratada, dando origem a picos com diferentes tempos de retenção (THIEKEN e WINKELMANN, 1992).

Devido a suas características estruturais, grande parte dos sideróforos é altamente resistente à hidrólise ácida, sendo que existem alguns que após 24 horas de hidrólise ácida à 104°C ainda apresentam uma parte da estrutura intacta (DEMANGE *et alii.*, 1988; KONETSCHNY-RAPP *et alii.*, 1990). No caso da fração FOx de *T.aurantiacus*, após a hidrólise ácida ainda é possível observar a presença de um pico de absorbância em 280 nm no cromatograma da Figura 26B, que pode corresponder a uma parte da fração resistente à hidrólise.

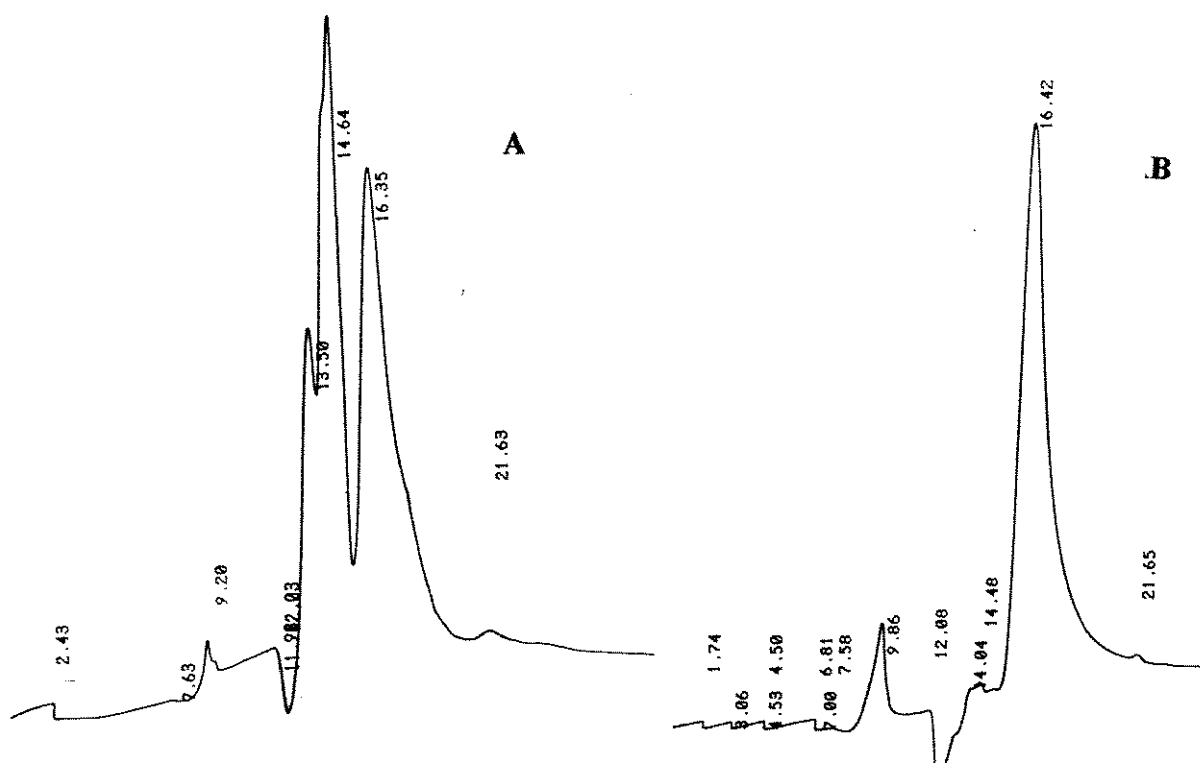


FIGURA 36: HPLC da fração com atividade FOx, parcialmente purificada por Sephadex G-10 (A) e após hidrólise ácida (6 N HCl/104°C, 24 horas) (B). A fase móvel utilizada foi metanol/água 95%, e o fluxo da coluna foi de 2,0 mL/min. Coluna de ODS-II (C18), fase reversa

Determinação da Presença de Metal na Fração FOx

Quando a fração FOx foi analisada pela presença de metais através de diferentes técnicas, foram encontrados principalmente Fe, Ca, Mg e Na (Tabela 17, v.Apêndice). As técnicas de Espectrografia de Rede Plana e Raios X-Fluorescência foram utilizadas apenas em forma qualitativa.

O Fe apareceu em baixa concentração quando determinado por Absorção Atômica (AA), porém a determinação colorimétrica com o-fenantrolina resultou em uma maior concentração. A elevada quantidade de Na presente na fração FOx, revelada pela coloração da chama durante análise por AA, pode estar interferindo na determinação do Fe, resultando no baixo valor observado. A quantificação de Fe na fração FOx utilizando o complexante o-fenantrolina, revelou a presença das formas Fe(II) e Fe(III) na fração.

De todos os metais detectados na fração FOx, somente o Fe, embora presente em baixa concentração, pode estar participando na reação de oxidação de o-dianisidina e outros substratos típicos de fenoloxidasas.

As altas concentrações de Ca e Mg presentes na fração FOx acredita-se podem ser provenientes do farelo de trigo utilizado como substrato no meio de cultura do *T.aurantiacus*.

Estes dois metais divalentes já foram observados formando parte de sideróforos do tipo hidroxamato, complexados juntamente com Fe (ATKIN e NEILANDS, 1968; HIDER, 1984).

TABELA 17: Detecção de Metais na Fração Parcialmente Purificada

Metal	Quantificação	Técnica
Fe	0,70 ppm (Colorim.) 0,041 ppm (AA)	Espectrografia Rede Plana ^a RaiosX-Fluorescência Colorimétrica ^b Absorção Atômica ^c
Ca	115 ppm (ICP)	Espectrografia Rede Plana Raios X-Fluorescência ICP ^e
Mg	118 ppm	ICP
Na ^d	-----	Absorção Atômica RaiosX-Fluorescência

a: A amostra liofilizada foi misturada com grafite

b: A amostra liofilizada foi dissolvida em água bidestilada e desionizada

c: Amostra liofilizada foi dissolvida em HNO₃

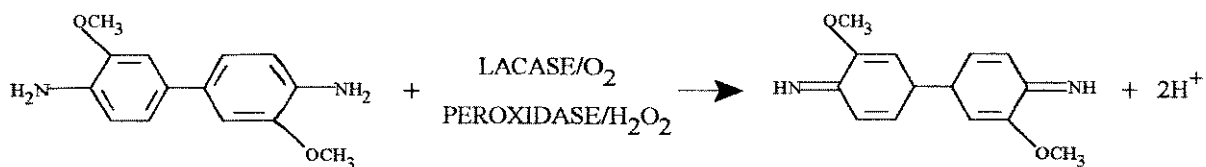
d: Determinado só qualitativamente

e: Plasma Indutivamente Acoplado (Inductively Acoupled Plasma)

V.3.- Aspectos da Reação de Oxidação de o-Dianisidina

Foram estudados alguns aspectos da reação de oxidação da o-dianisidina pela fração FOx parcialmente purificada, com características de sideróforo. A o-dianisidina ou 3,3'-dimetoxibenzidina é oxidada por fenoloxidasas do tipo peroxidase, em presença de H₂O₂, e do tipo lacase, em presença de oxigênio. A reação dá origem a diversos complexos intermediários de transferência de carga, e posteriormente a um produto colorido estável tipo quinona com um máximo de absorbância aproximadamente em 460 nm, após reação de oxidação por um mecanismo de transferência de dois elétrons (Esquema III) (CLAIBORNE e FRIDOVICH, 1979).

O espectro de absorbância UV/Vis da reação de oxidação da o-dianisidina catalizada pela fração parcialmente purificada (Figura 37), mostrou algumas semelhanças com o espectro da mesma reação catalizada por HRP, à pH 3,7 (CLAIBORNE e FRIDOVICH, 1979). Recentemente YOSHIDA e colaboradores (1995) demonstraram que LiP é capaz de oxidar o-dianisidina em solvente orgânico e em solução aquosa, dando origem em ambos os casos ao mesmo produto final, com um máximo de absorbância em 444 nm. A reação de oxidação acontece em duas etapas sucessivas de transferência de um elétron. Em solução aquosa dois picos são inicialmente observados, em 372 e 700 nm, os quais depois de atingir um máximo começam a diminuir, sendo substituídos por um pico em 444nm.



$$\begin{array}{l} \lambda_{\text{máx}} = 440-470 \text{ nm} \\ \epsilon_{460} = 29.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \end{array}$$

ESQUEMA III

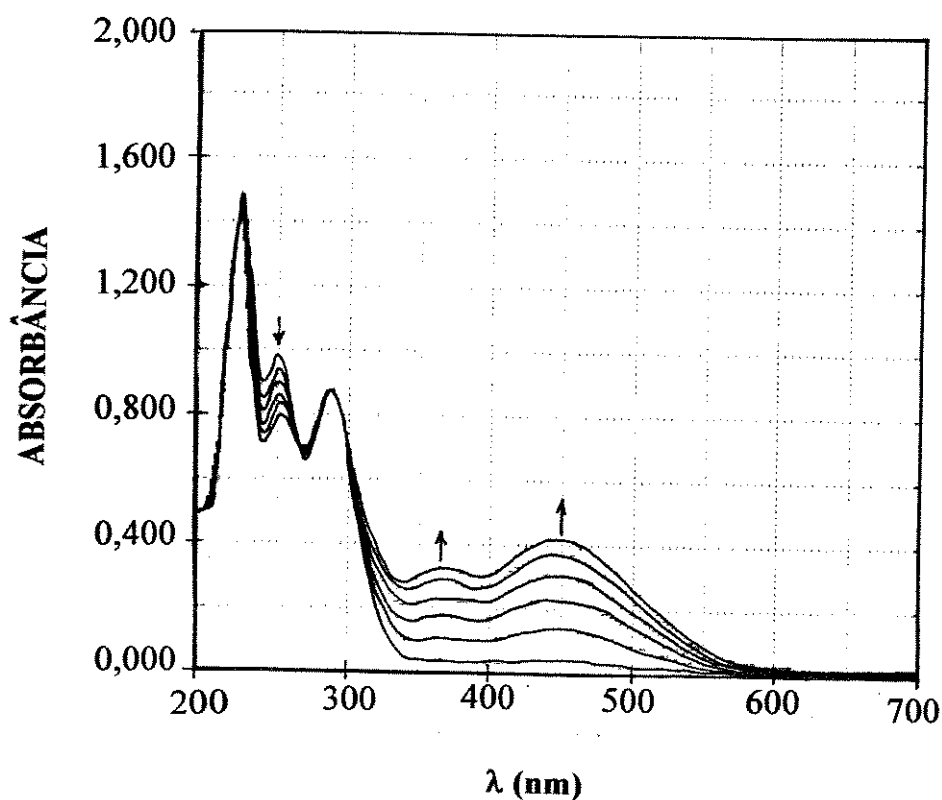


FIGURA 37: Cinética da Reação de Oxidação de o-Dianisidina pela Fração FOx de *T.aurantiacus* em Meio Ácido. A reação foi acompanhada na região UV/Vis, e os espectros foram registrados a cada 5 minutos. A reação foi conduzida à pH 3,0 e 25°C.

A fração FOx de *T.aurantiacus* mostrou características bem diferentes da maioria dos compostos de baixa massa molecular, tipo sideróforo, quanto à capacidade de catalisar reações de óxido-redução. Estudos conduzidos com esse tipo de composto indicaram uma dependência estrita da presença de H_2O_2 no meio de reação para oxidar KTBA. Os compostos catalizaram muito lentamente a oxidação de outros substratos como guaiacol, na presença ou ausência do H_2O_2 , e portanto apresentaram baixa ou nenhuma atividade FOx (ENOKI *et alii.*, 1990; TANAKA *et alii.*, 1991, 1993). Porém, não há informação na literatura à respeito da oxidação de outros substratos típicos de fenoloxidasas tais como o-dianisidina, ABTS, 2,6-DMF, na ausência de H_2O_2 , por esses compostos, como já foi observado com a fração FOx.

Alguns estudos foram conduzidos com a fração parcialmente purificada no sentido de comprovar a participação do Fe (II) ou Fe (III) na reação de oxidação de o-dianisidina, e o papel desempenhado pelo H_2O_2 nesta reação.

TABELA 18: Efeito de Compostos Sobre a Velocidade de Oxidação de o-Dianisidina pela Fração FOx de *T.aurantiacus*

Composto	Atividade FOx (UI/mL)
Controle ^a	0,165
Hidroxilamina (1,0 mM) ^b	0,160
Ditionito (1,0 mM)	0,036
Ditionito (0,1 mM)	0,083
Ditionito (0,1 mM) + O_2 ^c	0,154
H_2O_2 (1,0 mM)	0,256
H_2O_2 (5,0 mM)	0,506

a: Oxidação de o-dianisidina em ausência de qualquer composto

b: A fração parcialmente purificada foi pré-incubada durante 10 min com os compostos nas concentrações indicadas

c: O_2 foi borbulhado no meio de reação após a pré-incubação com ditionito

A adição do agente redutor, hidroxilamina, no meio de reação não teve efeito na velocidade da reação, como era esperado, uma vez que o Fe deve estar na sua forma reduzida para poder oxidar o substrato. Quando o ditionito, um agente fortemente redutor, foi utilizado em concentração final de 1,0 mM um alto grau de inibição foi observado (78% inibição). Este resultado pareceu contraditório com o primeiro, uma vez que se o Fe (II) estivesse participando da oxidação, como indicado pelo efeito da hidroxilamina, não deveria ser observado um efeito inibitório. Após diminuir a concentração de ditionito para 0,1mM, o efeito inibitório não desapareceu, somente caiu para 50%. Por ser um potente redutor, o ditionito pode estar acabando com o oxigênio do meio de reação e desta forma estar inibindo a oxidação de o-dianisidina. Para comprovar isto, após a pré-incubação da fração ativa com ditionito, oxigênio foi borbulhado no meio de reação durante alguns minutos. Posteriormente, a atividade FOx foi determinada observando-se uma completa recuperação da inibição provocada pelo ditionito. O H_2O_2 provocou um aumento da velocidade de oxidação de o-

dianisidina pela fração ativa. A atividade aumentou cerca de três vezes com o aumento da concentração de H_2O_2 . Este efeito de ativação foi diferente daquele observado com o extrato bruto, onde o H_2O_2 diminuiu levemente a atividade, provavelmente devido ao fato que ao ser adicionado ao extrato bruto este H_2O_2 pode estar sendo utilizado ou até degradado por algum(s) outro(s) sistema(s) enzimático(s) do fungo.

É sabido que os sideróforos de tipo hidroxamato apresentam uma afinidade pelo Fe (III) muitas vezes maior do que pelo Fe (II), tanto que este é um dos mecanismos pelos quais o Fe pode ser espontaneamente ou em forma induzida, liberado do sideróforo (NEILANDS, 1984; HIDER, 1984). Uma vez que a fração parcialmente purificada com alta atividade FOx, apresentou fortes evidências de pertencer ao grupo dos sideróforos tipo hidroxamato, é provável que inicialmente ela complexe Fe sob a forma de Fe (III), e que este seja posteriormente reduzido para Fe (II) por algum sistema enzimático especializado do fungo ou pelo próprio composto, para poder participar de reações de óxido-redução.

GOODELL e colaboradores (1995), isolaram 15 compostos com características de sideróforos do tipo catecolato a partir de culturas do fungo *G.trabeum*, e observaram que grande parte destes compostos além de complexar Fe (III) tinha capacidade de reduzi-lo até Fe (II) e desta forma estabilizá-lo. HIRANO e colaboradores (1995), isolaram um composto de baixa massa molecular (1.500-5.000 Da) a partir do fungo *T. palustris* com capacidade de reduzir oxigênio molecular para radicais hidroxila ($OH\cdot$) e Fe (III) para Fe (II).

Para verificar se a fração FOx de *T.aurantiacus* mostrava semelhanças com os compostos anteriores quanto à capacidade de reduzir o Fe (III), foi conduzido o mesmo experimento que os autores desenvolveram para comprovar a capacidade de redução de Fe (III). O experimento consistiu na incubação da fração FOx com Fe (III) durante 24 horas em pH 4,5. Posteriormente, o-fenantrolina foi adicionada na mistura de reação e os espectros UV/Vis da reação foram registrados em intervalos de tempo. Os resultados obtidos indicaram que a fração parcialmente purificada apresentou capacidade de reduzir Fe (III) para Fe (II), embora muito lentamente, o que foi verificado pela formação do complexo vermelho característico de o-fenantrolina com o Fe (II) ($\lambda_{m\acute{a}x} = 510$ nm) (Figura 38). Quando o mesmo experimento foi conduzido com desferrioxamina (Desferal), sideróforo tipo hidroxamato, os resultados foram semelhantes, ou seja, houve redução de Fe (III) para Fe (II) e posterior formação do complexo o-fenantrolina-Fe (II), somente que a reação foi extremamente rápida quando comparada com a reação da fração FOx (resultados não mostrados). Portanto, pode-se sugerir que os sideróforos tipo hidroxamato possuem capacidade para reduzir Fe (III) para Fe(II), da mesma forma como observado para sideróforos do tipo catecolato e para os compostos de baixa massa molecular tipo glicopeptídeo.

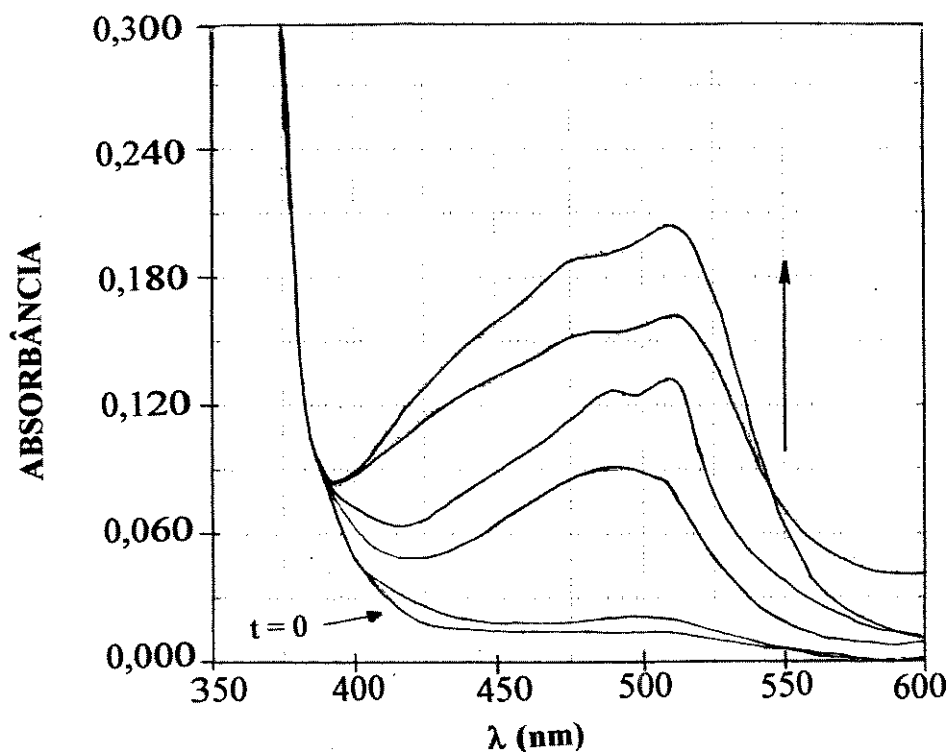


FIGURA 38: Formação de Complexo o-Fenantrolina-Fe (II), após pré-incubação da fração FOx com 4 ppm de Fe (III) durante 24h, à pH 4,5 e 25°C. Os espectros UV/vis foram registrados após 15, 30, 48, 72 e 96 horas de adicionada a o-fenantrolina em uma concentração de 1,0%..

O estudo de caracterização revelou que a fração parcialmente purificada possui uma estrutura tipo hidroxamato, com metais como Ca, Mg e Fe formando parte desta estrutura. O tipo de reação catalizada pela fração FOx indica que, dos metais presentes na fração o Fe, embora em baixa concentração como revelado pelas análises quantitativas, deve estar participando na reação de oxidação de o-dianisidina. A fração FOx parece catalizar a oxidação de o-dianisidina de forma semelhante às fenoloxidasas verdadeiras, como indicado pelo espectro de absorbância da reação de oxidação. Para catalizar a reação de oxidação o Fe presente na fração FOx deve encontrar-se na forma de Fe (II), como sugerido pelo efeito produzido por hidroxilamina e ditionito/O₂. Os resultados obtidos após adição de Fe (III)/o-fenantrolina, indicam que a fração FOx possui capacidade de reduzir Fe (III) para Fe (II). O efeito do H₂O₂ na velocidade de oxidação de o-dianisidina pela fração FOx, indicam que ele deve ter uma participação diferente daquela observada com peroxidases, uma vez que ele estimula a velocidade de reação, porém não é essencial para a reação. A sugestão de um mecanismo via formação de radicais livres para a fração FOx, justificaria o efeito observado após adição de H₂O₂, uma vez que através de reação de Fenton, o H₂O₂ na presença do Fe (II) da fração FOx induziria à formação de espécies radicalares, que participariam de reações de despolimerização.

PARTE VI

UTILIZAÇÃO DOS EXTRATOS ATIVOS DE *T.aurantiacus* NO TRATAMENTO DE POLPAS E EFLUENTES INDUSTRIAIS

Nos últimos anos o interesse crescente pelos problemas de contaminação ambiental tem conduzido ao desenvolvimento de processos industriais alternativos que surgem da combinação de processos químicos com tratamentos biológicos. Um dos processos industriais responsáveis pela maior carga contaminante no ambiente é a fabricação de polpa e papel. O alto conteúdo de reagentes químicos utilizados na deslignificação das madeiras e posterior branqueamento das polpas de celulose, origina grandes cargas poluentes que chegam ao ambiente na forma de efluentes fenólicos, fortemente coloridos e altamente tóxicos.

Uma das estratégias mais comumente seguidas é a utilização de fungos degradadores de madeira, seus caldos extracelulares ou seus sistemas enzimáticos. A utilização direta do fungo ou seus caldos extracelulares no branqueamento de polpas e no tratamento de efluentes, resultam em processos economicamente mais atraentes do que a utilização de enzimas purificadas (ERIKSSON, 1990; ONYSKO, 1993; GRANT, 1994; REID e PAICE, 1994; DURÁN *et alii.*, 1995).

O fungo *T.aurantiacus* reúne propriedades que fazem dele um microrganismo promissor para sua utilização em processos biotecnológicos. Estudos prévios mostraram a capacidade do fungo degradar madeira de *E.grandis* (MACHUCA e DURÁN, 1993), e os atuais resultados mostram os altos níveis de atividade FOx, com propriedades catalíticas semelhantes às de uma lacase, presentes nos caldos extracelulares do fungo. Por estas razões foi de grande interesse avaliar a capacidade do fungo para ser utilizado no branqueamento de polpas de celulose e no tratamento de efluentes da indústria de polpa e papel. Visto que a natureza da atividade FOx não é enzimática, e sim parece ser produto de um composto com características de sideróforo, o interesse na aplicação biotecnológica do fungo torna-se mais importante devido à falta de informação na literatura a respeito da utilização de sideróforos nos processos mencionados anteriormente.

VL1.- TRATAMENTO DE POLPAS KRAFT DE EUCALIPTO

Os numerosos compostos organoclorados resultantes da etapa de branqueamento das polpas celulósicas são os responsáveis pela alta toxicidade da contaminação causada pelas indústrias de polpa e papel. Os organoclorados são o resultado da reação entre a lignina residual presente nas fibras de celulose, responsável pela cor escura das polpas não-branqueadas, e o cloro utilizado no processo químico de branqueamento. Alguns organoclorados contaminam os ecossistemas através do ar após sofrerem evaporação, enquanto outros contaminam ambientes aquáticos após serem despejados sob a forma de efluentes. Portanto, o objetivo da aplicação de procedimentos biotecnológicos alternativos é a redução da utilização de cloro e/ou compostos clorados na etapa de branqueamento das polpas (ONYSKO, 1993; VIIKARI *et alii.*, 1994).

Tratamento da Polpa com o Extrato Ativo de *T.aurantiacus*

O extrato com alta atividade FOx, obtido a partir de *T.aurantiacus*, foi utilizado no tratamento de uma polpa não branqueada obtida através do processo Kraft (sulfeto/NaOH) a partir de madeira de **Eucalipto**. A polpa utilizada nos diferentes experimentos apresentou um número Kappa inicial de 16,5 e uma viscosidade de 42,3 cP.

A maior redução do número Kappa, parâmetro que reflete a quantidade de lignina residual das polpas, foi obtido após 60 e 90 minutos de tratamento em pH 3,0. Nestas condições a viscosidade, um indicador da integridade da celulose na polpa, foi bastante afetada, observando-se um aumento da redução com o tempo de incubação (Figura 39).

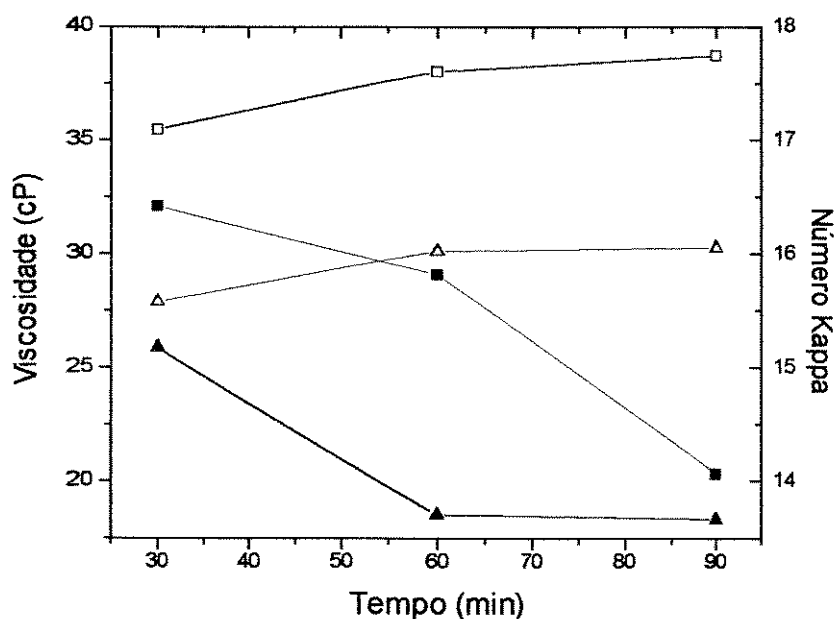


FIGURA 39: Propriedades de uma Polpa Kraft de **Eucalipto** Tratada com o Extrato Ativo de *T.aurantiacus*. As polpas foram incubadas em pH 3,0 e à 50°C, e a viscosidade (□) e o número Kappa (Δ) foram determinados, na polpa tratada com o extrato ativo do fungo (símbolos cheios) e na polpa controle (símbolos vazios).

A eficiência de deslignificação e a seletividade após o tratamento da polpa com o extrato ativo, aparecem na Tabela 19. As maiores eficiências de deslignificação foram obtidas após 60 e 90 minutos de tratamento, porém com 60 minutos de tratamento a melhor seletividade foi observada. Ao aumentar o tempo de tratamento de 60 para 90 minutos, não foi possível remover mais lignina residual, refletido pelos valores muito próximos de número Kappa, porém, nestas condições a qualidade da celulose foi afetada, conduzindo a uma diminuição da viscosidade.

TABELA 19: Eficiência de Deslignificação e Seletividade após Tratamento com o Extrato Ativo de *T.aurantiacus*

Ensaio	Tempo do Tratamento (min)	Eficiência de Deslignificação	Seletividade ^c
1 C ^a E ^b	30	5,64	0,35
		8,06	0,33
2 C E	60	2,91	0,29
		16,97	0,54
3 C E	90	2,73	0,32
		17,21	0,33

a: Polpa controle

b: Polpa tratada com o extrato ativo, em pH 3,0 e à 50°C

c: Seletividade = %deslignificação/redução viscosidade

Após uma etapa de extração alcalina, onde todas as substâncias solúveis em 4,0% NaOH são retiradas da polpa previamente tratada com o extrato ativo de *T.aurantiacus*, a maior perda de lignina foi observada aos 60 minutos de tratamento. Com o aumento do tempo de tratamento para 90 minutos o número Kappa manteve-se praticamente igual, porém a viscosidade da polpa foi bastante afetada (Figura 40). Assim, as melhores eficiência de deslignificação e seletividade do processo foram obtidas após um tratamento de 60 minutos com o extrato ativo do *T.aurantiacus*, em pH 3,0 e à 50°C (Tabela 20).

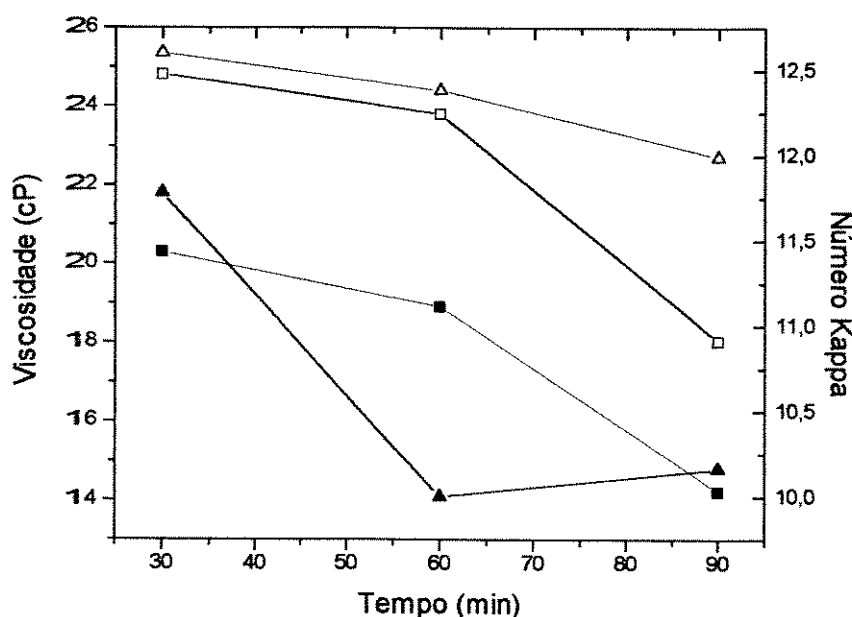


FIGURA 40: Propriedades de uma Polpa Kraft de *Eucalipto* Tratada com o Extrato Ativo do *T.aurantiacus*, seguida de uma Extração Alcalina. As polpas foram tratadas à pH 3,0 e 50°C, e a viscosidade (□) e o número Kappa (△) foram determinados na polpa tratada com o extrato fúngico (símbolos cheios) e na polpa controle (símbolos vazios).

TABELA 20: Resultados do Tratamento de Polpa Kraft de **Eucalipto** com o Extrato Ativo de *T.aurantiacus* Seguida de Extração Alcalina

Ensaio	Tempo do Tratamento (min)	Eficiência de Deslignificação	Seletividade ^c
1 C ^a E ^b	30	23,64 28,61	0,57 0,55
2 C E	60	24,97 39,40	0,57 0,71
3 C E	90	27,33 38,42	0,48 0,58

a: Polpa controle

b: Polpa tratada com extrato ativo após extração alcalina com 4,0% NaOH

c: Idem Tabela 19

Quando o extrato ativo de *T.aurantiacus*, foi utilizado no tratamento da polpa Kraft em pH 5,0, uma leve diminuição do número Kappa foi observada, com mínima diminuição da viscosidade. Embora, tenha sido observado um aumento na eficiência de deslignificação, em relação à polpa controle, o processo não teve seletividade. Após a extração alcalina, não houve aumento nem da deslignificação nem da seletividade (Tabela 21).

TABELA 21: Propriedades da Polpa Kraft de **Eucalipto** após Tratamento com o Extrato Ativo de *T.aurantiacus* em pH 5,0

Ensaio	Número Kappa	Viscosidade (cP)	Eficiência de Deslignificação	Seletividade
C ^a E ^b	14,92 14,51	39,70 37,74	9,57 12,06	1,56 1,12
Após Extração Alcalina				
C E	10,76 10,85	19,04 19,32	34,79 34,24	0,63 0,64

a: Polpa controle

b: Polpa tratada com o extrato ativo em pH 5,0 à 50°C, durante 90 minutos

Tratamento da Polpa com o Extrato Ativo de *T.aurantiacus* na Presença de ABTS

A eficiência da utilização de enzimas do tipo oxidativo no branqueamento de polpas implica na utilização de co-fatores tais como Mn (III) ou H₂O₂, no caso de MnP ou de

mediadores redox como o ABTS, no caso de lacase (BOURBONNAIS e PAICE, 1992; PAICE *et alii.*, 1994; KONDO *et alii.*, 1994). Assim, o efeito da presença de um mediador no tratamento de polpa Kraft de **Eucalipto** pelo extrato com atividade FOx de *T.aurantiacus* foi estudado utilizando-se ABTS.

Em pH 3,0 a deslignificação das polpas, determinada como o número Kappa, foi levemente maior na presença de ABTS do que na sua ausência, porém quanto à diminuição da viscosidade da polpa não houve diferenças significativas. Após a extração alcalina os resultados quanto à deslignificação da polpa foram melhores na presença de ABTS, o qual se reflete no valor de eficiência de deslignificação (Figura 41). Quanto à seletividade do processo na presença do mediador, nenhuma diferença foi observada com os mesmos resultados obtidos na sua ausência (Tabela 22).

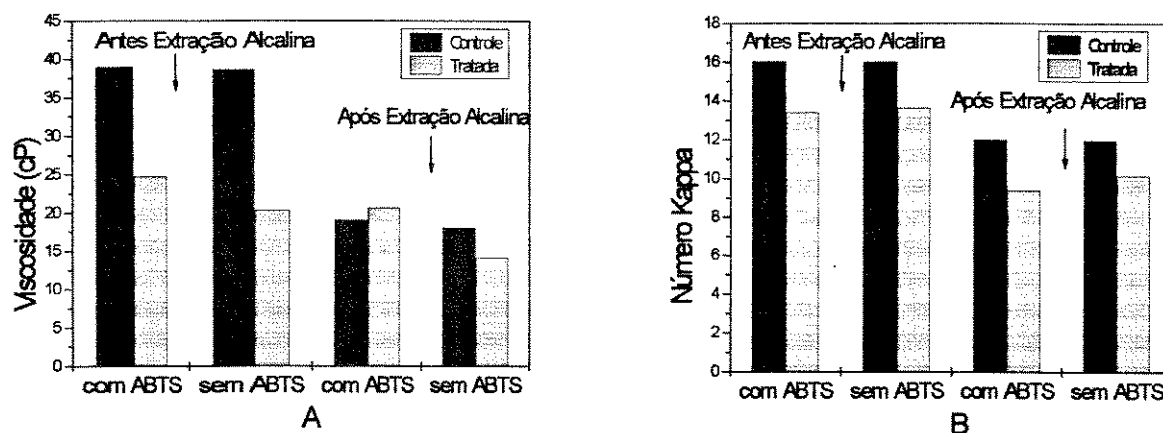


FIGURA 41: Propriedades de uma Polpa Kraft de **Eucalipto** Tratada com o Extrato Ativo de *T.aurantiacus* na Presença e na Ausência de ABTS em pH 3,0. A viscosidade (A) e o número Kappa (B) foram determinados na polpa controle e na polpa tratada com o extrato ativo, antes e depois da extração alcalina com 4,0% de NaOH.

Diferentemente dos resultados obtidos em pH 5,0 em ausência de mediador, na presença de ABTS obteve-se uma maior deslignificação e a viscosidade da polpa praticamente não foi afetada (Figura 42). Após a extração alcalina foram obtidos melhores resultados de eficiência de deslignificação e seletividade do que àqueles no mesmo pH e na ausência de ABTS (Tabela 22).

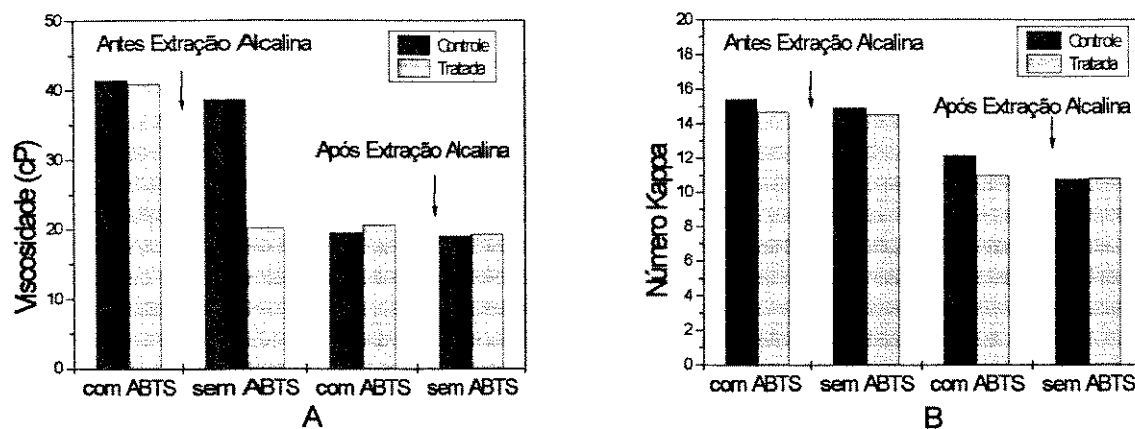


FIGURA 42: Propriedades de uma Polpa Kraft de *Eucalipto* Tratada com o Extrato Ativo do *T.aurantiacus* na Presença e na Ausência de ABTS em pH 5,0. A viscosidade (A) e o número Kappa (B) foram determinados na polpa tratada e na polpa controle, antes e depois da extração alcalina com 4% de NaOH.

TABELA 22: Propriedades da Polpa Kraft de *Eucalipto* após Tratamento com o Extrato Ativo de *T.aurantiacus* na Presença de ABTS

Ensaio	pH	Eficiência Deslignificação	Seletividade e
1 Ca	3,0	2,73	0,35
E ^b		18,79	0,45
2 C	5,0	6,42	2,47
E		11,09	3,28
Após Extração Alcalina			
1 C	3,0	27,09	0,65
E		43,09	0,73
2 C	5,0	26,61	0,49
E		33,33	0,65

a: Polpa controle + 1,0 mM de ABTS

b: Polpa tratada com o extrato ativo e 1,0 mM de ABTS,
à 50°C durante 90 minutos.

Os resultados obtidos indicam que a presença de ABTS foi importante, porém não essencial, na obtenção de efeitos significativos na deslignificação das polpas pelo extrato ativo de *T.aurantiacus*. Em pH 5,0, a presença de ABTS conduziu à obtenção de resultados significativamente melhores do que na sua ausência, quanto à deslignificação e seletividade do processo. Mesmo assim, os resultados obtidos em pH 5,0 com ABTS, não foram melhores que aqueles obtidos em pH 3,0 sem ABTS.

A utilização direta de fungos no branqueamento de polpas é um processo muito demorado, que requer um cuidadoso controle das condições de incubação e finalmente algumas interferências na determinação dos parâmetros de qualidade da polpa tem sido observados devido à massa fúngica (ONYSKO, 1993; KATAGIRI *et alii.*, 1995). Estudos conduzidos com *T.versicolor*, indicaram a produção de lacases e MnP, mas não LiP, durante o tratamento de polpas. MnP e lacase, na presença de um co-fator enzimático, podem desmetilar e solubilizar parcialmente lignina em polpas (BOURBONNAIS e PAICE, 1992; ARCHIBALD, 1992; PAICE *et alii.*, 1993). O co-substrato utilizado por lacase é o ABTS, que atua como um mediador redox na oxidação de sub-unidades não fenólicas de lignina e na oxidação de álcool veratrílico, substrato enzimático de LiP (BOURBONNAIS e PAICE, 1990 e 1992).

Os resultados preliminares obtidos com o extrato ativo de *T.aurantiacus*, em um sistema ainda não otimizado, demonstram vantagens sobre os sistemas anteriormente citados, uma vez que a presença de um co-fator (ABTS) não foi essencial na deslignificação.

Quando a polpa foi tratada com o extrato ativo durante 60 minutos à 50°C e pH 3,0, obteve-se uma redução do número Kappa de 39%, cerca de 6 unidades de diminuição em relação à polpa não tratada, após uma etapa de extração alcalina. Porém, a seletividade do processo não foi eficiente, uma vez que a viscosidade das polpas foi reduzida em aproximadamente 50%. Quando a lacase de *T.versicolor* foi utilizada no tratamento de polpa Kraft durante 5 dias a redução de número Kappa foi insignificante. Já com o extrato enzimático uma redução de 16,5% foi obtida, porém quando foi utilizado o sistema lacase/ABTS a redução foi de 24%, sem redução significativa da viscosidade (BOURBONNAIS e PAICE, 1992; PAICE *et alii.*, 1994). Quando LiP de *C.sitophila* foi utilizada no branqueamento de polpa Kraft e organosolv de *E.grandis*, na presença de H₂O₂, obteve-se 8,0% de redução do número Kappa, após extração alcalina (MILAGRES *et alii.*, 1991).

Recentemente, CALL e MUCKE (1994, 1995) descreveram um sistema lacase/mediador (1-hidroxi-1H-benzotriazol) com o qual uma redução de entre 50 e 66% no número Kappa é obtido em um período de 1 a 4 horas. Porém, nenhuma informação sobre a qualidade da polpa em relação à viscosidade é relatada. Por outra parte, a viabilidade econômica do processo é duvidosa uma vez que o mediador é utilizado em concentração de 0,25 a 2 Kg/tonelada de polpa.

Assim, o extrato ativo de *T.aurantiacus* mostrou-se bastante promissor no branqueamento de polpas Kraft de *Eucalipto*, uma vez que não precisou de um mediador para deslignificar a polpa num curto período de tempo (60 minutos) e alta temperatura (50°C).

VI.2.- TRATAMENTO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS

A carga poluente resultante das indústrias de celulose e papel, que chega ao ambiente na forma de efluentes fenólicos fortemente coloridos e altamente tóxicos, é o resultado do primeiro estágio de extração alcalina (E₁) do processo de branqueamento químico de polpas Kraft. A cor escura destes efluentes deve-se ao elevado conteúdo de diversos cromóforos e fragmentos poliméricos clorados e altamente oxidados de lignina (cloroligninas), que possuem uma fração de alta massa molecular recalcitrante aos processos convencionais de descontaminação utilizados na indústria de papel (ERIKSSON, 1990; DURÁN e ESPOSITO, 1993; BAJPAI e BAJPAI, 1994).

Quando a fração com alta atividade FOx de *T.aurantiacus* foi utilizada no tratamento de um efluente do tipo E₁, sob condições estáticas e agitadas, observou-se uma eficiente redução na cor dos efluentes e na concentração dos fenóis totais quando comparados com os efluentes controles (Tabela 23).

Após 24 horas de tratamento em condições agitadas ou estáticas foi observada uma pequena descoloração dos efluentes, acompanhada de uma redução na concentração dos fenóis totais entre 20 e 36%. Quando a duração do tratamento foi aumentada para 72 horas a cor e a concentração de fenóis diminuíram. A agitação do sistema favoreceu a descoloração dos efluentes, enquanto que a redução de fenóis foi semelhante em condições estáticas ou agitadas (Tabela 23).

Quanto à cor dos efluentes a melhor condição de tratamento com a fração ativa foi sob agitação, obtendo-se 61% de descoloração em 72 horas. Quanto à concentração de fenóis totais presentes nos efluentes, observou-se que não existiram diferenças significativas entre os tratamentos sob condições estáticas ou agitadas, obtendo-se entre 60 a 70% de redução de fenóis em 72 horas.

Os resultados obtidos com a fração ativa de *T.aurantiacus*, foram comparáveis àqueles da literatura que utilizam eficientes fungos degradadores de madeira ou seus sistemas enzimáticos no tratamento de efluentes da indústria de polpa e papel. O tratamento de um efluente fenólico com lacase imobilizada resultou em uma descoloração de 48% em três dias, porém na presença do fungo que produz esta enzima, *T.versicolor*, obteve-se uma descoloração de 70 a 80%, após 8 dias de incubação (DAVIS e BURNS, 1990). *T.versicolor*, produtor de lacase, provocou 92% de descoloração em 7 dias de tratamento, enquanto que o conhecido produtor de LiP, *P.chrysosporium* provocou uma descoloração de 64% em 6 dias (MEHNA *et alii*, 1995). Em relação à concentração de fenóis totais, após o tratamento com a fração ativa de *T.aurantiacus*, observou-se uma significativa redução (60-70%), comparável à causada por *C.versicolor* de 71% em 28 horas (DAVIS e BURNS, 1990).

As mudanças na distribuição da massa molecular das cloroligninas contidas nos efluentes foram estudadas por cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-50. As frações eluídas das colunas foram monitoradas pela leitura da absorbância em 280 nm, que reflete a quantidade de compostos aromáticos derivados de lignina contidos nos efluentes (BERGBAUER e EGGERT, 1992; BERGBAUER *et alii*, 1992; WANG *et alii*, 1992). Os perfis cromatográficos do efluente controle e das amostras tratadas, sob condições estacionárias e agitadas, aparecem na Figura 43.

TABELA 23: Características do Efluente E1 após Tratamento com a Fração Ativa de *T.aurantiacus*

Efluente	Tempo (h)	Cor (A ₄₆₅)	Redução Cor (%)	Fenóis (mg/L)	Redução Fenóis(%)
Controle ^a	0	0,77	-----	19,1	-----
Agitação	24	0,63	18,2	18,2	35,6
	72	0,30	61,0	5,8	70,0
Estacionário	24	0,67	13,0	13,0	23,0
	72	0,50	35,1	6,8	64,4

a: Efluente controle, autoclavado e filtrado

Efluentes incubados à 25°C, sob condições agitadas (125 rpm) e estacionárias

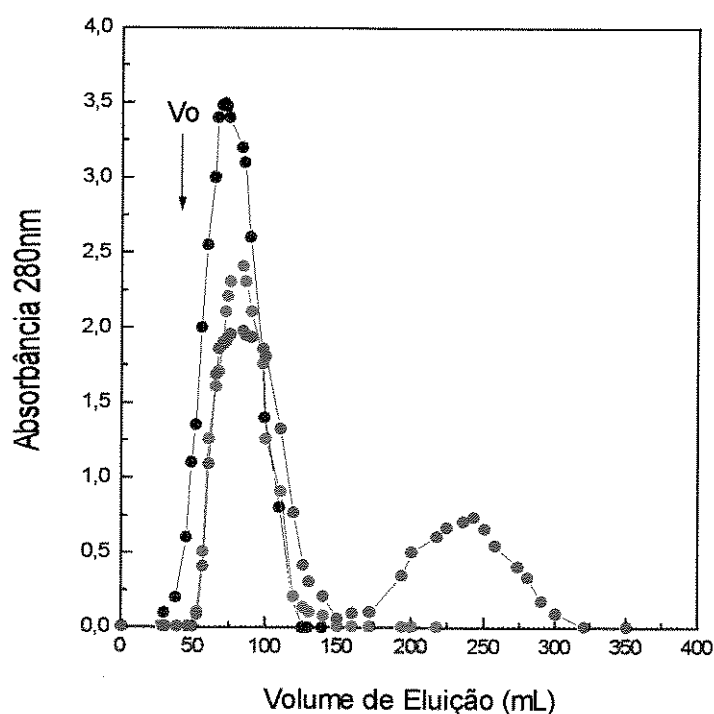


FIGURA 43: Distribuição de Massa Molecular em Sephadex G-50 (1,5x60cm) das Cloroligninas contidas em um Efluente do tipo E₁. Efluente Controle (●) e efluentes tratados com a Fração Ativa de *T.aurantiacus*, em condições agitadas (◐) e estacionárias (○), durante 72 horas à 25°C. A coluna foi eluída com NaOH-LiCl 0,1N, com um fluxo de 0,7 mL/min.

Após o tratamento do efluente com a fração ativa de *T.aurantiacus*, durante 72 horas sob condições estacionárias ou agitadas, foi possível observar mudanças na fração de

cloroligninas de alta massa molecular em relação ao controle. Em ambos os casos, houve uma diminuição na intensidade da absorbância em 280 nm, o qual sugere degradação do material aromático contido nos efluentes. Sob condições agitadas 47,0% de mineralização das cloroligninas foi observada. Na região de baixa massa molecular do cromatograma do efluente tratado em condições estacionárias, pode-se observar o aparecimento de um novo pico de absorbância em 280 nm, completamente ausente no caso do tratamento sob agitação. Nestas condições, obteve-se 5,0% de mineralização, acompanhado de 67,0% de despolimerização das cloroligninas de alta massa molecular.

Resultados da literatura discutem sobre o papel controverso das lacases na despolimerização e/ou polimerização dos compostos aromáticos contidos nos efluentes ou nos lignosulfonatos (LS). LEONOWICZ e colaboradores (1985) observaram que quando um LS de baixa massa molecular era tratado com lacase de *T.versicolor*, a enzima promovia uma reação de polimerização, e contrariamente quando um LS de alta massa molecular era tratado, ocorria despolimerização. Quando diferentes efluentes de branqueamento foram tratados diretamente com o fungo *T.versicolor*, era observada uma reação de degradação dos compostos aromáticos e dependendo do efluente, também ocorria despolimerização (BERGBAUER e EGGERT, 1992).

O comportamento da fração ativa de *T.aurantiacus*, parece ser semelhante à de lacases, uma vez que dependendo das condições de incubação com o efluente houve degradação, com maior ou menor grau de mineralização, e/ou despolimerização das cloroligninas de alta massa molecular.

A fração com alta atividade FOx produzida por *T.aurantiacus* demonstrou ter um grande potencial de aplicação biotecnológica no branqueamento de polpas Kraft de **Eucalipto** e no tratamento de efluentes industriais do tipo E₁. Apesar da natureza não-enzimática da atividade FOx, os resultados obtidos foram comparáveis, e algumas vezes melhores, aos efeitos observados com enzimas do tipo oxidativo como lacase, MnP ou LiP produzidas por eficientes fungos degradadores de madeira.

Os resultados de caracterização da fração com atividade FOx sugerem uma natureza de sideróforo do tipo hidroxamato. A informação na literatura a respeito da utilização de sideróforos em processos biotecnológicos é escassa, praticamente nula. JELLISON e colaboradores (1990) relataram a utilização de uma fração semipurificada de culturas do fungo *G.trabeum*, contendo sideróforos do tipo catecolato, no tratamento de uma polpa não-branqueada. Os autores observaram um efeito de descoloração da polpa após 30 minutos de incubação, porém os resultados são informados somente em termos qualitativos.

Embora os resultados de branqueamento de polpas e tratamento de efluentes com a fração com atividade FOx de *T.aurantiacus* sejam preliminares, mostraram-se promissores e inéditos do ponto de vista da utilização de sideróforos em processos biotecnológicos.

6.- DISCUSSÃO FINAL

A escolha da cepa brasileira do fungo *T.aurantiacus* para realização do nosso trabalho, foi baseada no fato desta apresentar atividade FOx e capacidade de degradar madeira de *E.grandis* (MACHUCA e DURÁN, 1993), diferentemente das cepas encontradas na literatura, as quais eram essencialmente produtoras de enzimas hidrolíticas.

Inicialmente, os objetivos deste estudo centraram-se nos fatores que influenciam na produção da atividade FOx. Diversos parâmetros físico-químicos do meio de cultura foram estudados, parâmetros conhecidos por exercerem efeito estimulante ou indutivo na produção de fenoloxidasas por fungos degradadores de madeira. Após a purificação parcial de uma fração contendo a atividade FOx, o nosso estudo foi redirecionado em função dos resultados inesperados, descritos em ordem cronológica, a seguir:

PRODUÇÃO DE ATIVIDADE FOx

A produção da atividade FOx por *T.aurantiacus* foi muito semelhante à maioria das fenoloxidasas produzidas por conhecidos fungos ligninolíticos, quanto à dependência dos diferentes parâmetros do meio de cultura (natureza e concentração de substrato, agitação, oxigenação, pH da cultura, etc.). Dos parâmetros estudados, o efeito mais significativo na produção de atividade FOx foi provocado pela utilização de diferentes substratos. Em meio líquido, a presença de um substrato lignocelulósico ou polissacarídico como fonte de carbono, induziu a produção de altos níveis de atividade FOx (1-2 UI/mL). Contrariamente, quando somente glicose foi utilizada como fonte de carbono, os níveis de atividade alcançados foram muito baixos (0,05-0,1 UI/mL). O melhor substrato foi farelo de trigo, provavelmente devido a seu alto conteúdo em proteínas, fatores de crescimento e vitaminas. O nível de indução observado com farelo de trigo foi maior àquele obtido com o indutor sintético p-anisidina. Outros pesquisadores já haviam observado o efeito indutivo do farelo de trigo na produção de enzimas ligninolíticas; FUKUSHIMA e KIRK (1995) relataram que a produção de lacase por *C.subvermispora* era várias vezes maior quando o fungo era cultivado em um meio contendo farelo de trigo do que em um meio quimicamente definido, contendo 2,5-xilidina como indutor.

A atividade FOx de *T.aurantiacus* foi produzida nas mesmas condições que favoreceram a produção de fenoloxidasas em conhecidos fungos ligninolíticos. Isto sugeriu que a função desempenhada pela atividade FOx, dentro do metabolismo do *T.aurantiacus*, era equivalente àquela das fenoloxidasas dos fungos de decomposição de madeira: participação em reações de decomposição, modificação e/ou degradação de substratos lignocelulósicos insolúveis, para sua transformação em pequenas substâncias solúveis e facilmente metabolizáveis pelo microrganismo.

Posteriormente, a caracterização cinética do extrato bruto de *T.aurantiacus* revelou novamente uma semelhança com fenoloxidasas. De acordo com o tipo de substrato oxidado, pH ótimo para oxidação e efeito de alguns inibidores típicos de oxidases que contém metal, a atividade FOx do extrato bruto pareceu ser do tipo lacase. Porém, a elevada temperatura de reação (70-80°C) e a alta estabilidade térmica ($t_{1/2}$ de 5 horas à 100°C), foram os primeiros

fatos que colocaram em questionamento a natureza proteica da atividade FOx produzida por *T.aurantiacus*. Mesmo tratando-se de um microrganismo termófilo, as temperaturas, principalmente de estabilidade, eram extremamente altas quando comparadas com fenoloxidasas descritas na literatura.

PURIFICAÇÃO DE UMA FRAÇÃO CONTENDO ATIVIDADE FOx

Com o objetivo de desvendar a natureza da atividade FOx, a purificação da fração responsável por tal atividade foi conduzida a partir de caldos induzidos com farelo de trigo e serragem. A metodologia utilizada na purificação foi a mesma utilizada por GEIGER e colaboradores (1986), na purificação de lacases a partir de fungos de degradação de madeira. A presença de substratos lignocelulósicos nas culturas dificulta a purificação, uma vez que os polifenóis provenientes dos substratos geralmente ligam-se às proteínas, fazendo com que estas percam atividade ou fiquem fortemente retidas nas colunas de purificação, através dos fenóis. Este tipo de substrato dificulta também a determinação de proteína pela maioria dos métodos mais comumente utilizados (Bradford, Lowry, Biureto), impedindo a determinação dos parâmetros de controle da purificação como rendimento e grau de purificação em relação ao extrato bruto. A primeira etapa na purificação da fração com atividade FOx foi a utilização da resina DEAE-celulose para retenção da cor dos caldos, produto dos polifenóis. Na etapa seguinte, a concentração dos caldos foi conduzida em um sistema de ultrafiltração, utilizando-se uma membrana que permitia a passagem de substâncias com uma massa molecular abaixo de 10 kDa. Uma vez que a massa molecular das lacases encontra-se numa faixa de 50-140 kDa, esperávamos que grande parte da atividade FOx ficasse retida no concentrado, e um mínimo da atividade fosse encontrada no filtrado. Porém, diferentemente do esperado, grande parte da atividade FOx foi detectada no filtrado. O resultado foi reproduzido após concentração utilizando-se uma membrana que permitia a passagem de substâncias abaixo de 1 kDa. Devido à baixa massa molecular, descartou-se a possibilidade que a atividade FOx presente nas culturas de *T.aurantiacus* fosse produzida por alguma fenoloxidase, do tipo lacase, ou por qualquer outro tipo de enzima.

Diversas dificuldades surgiram durante a purificação, principalmente devido à baixa massa molecular do componente com atividade FOx. O procedimento de purificação utilizado mostrou-se demorado e laborioso, uma vez que a melhor forma de dessalinizar a fração com atividade FOx foi através da coluna de Sephadex G-10, onde amostras de caldo eram aplicadas diversas vezes em pequenos volumes e eluídas com água bidestilada e desionizada. Finalmente, através dessa coluna obteve-se uma fração com alta atividade FOx e uma massa molecular aproximada menor que 700 Da. A cromatografia nesta coluna revelou a presença de um pico, de alta massa molecular, que também apresentou atividade FOx, porém insignificante quando comparada à atividade da fração de baixa massa molecular. Provavelmente, a atividade FOx presente no primeiro pico seja devida a existência de fenoloxidasas verdadeiras no caldo de cultura de *T.aurantiacus*. A fração com alta atividade FOx e de baixa massa molecular foi posteriormente caracterizada, cinética e estruturalmente, com o objetivo de desvendar sua natureza que, devido às características até aqui apresentadas, não podia ser enzimática.

PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS POR *T.aurantiacus*

Tendo em vista os resultados obtidos, foram procurados outros sistemas fúngicos, que não os enzimáticos, participantes do processo de degradação de substratos lignocelulósicos descritos na literatura. Dois tipos de compostos extracelulares foram encontrados, relacionados só recentemente à degradação de substratos lignocelulósicos como madeira. Um grupo desses compostos está representado pelos complexantes de Fe denominados de sideróforos, produzidos por fungos de decomposição branca e parda, de baixa massa molecular (500-1.000 Da) e que catalisam a reação de oxidação, via transferência de um elétron do KTBA na presença de H_2O_2 . Através deste tipo de reação, os sideróforos de tipo catecolato, produzem uma série de espécies radicalares que, podem estar envolvidas na iniciação do processo de decomposição de madeira *in vivo* (JELLISON *et alii.*, 1990; LU *et alii.*, 1994; GOODELL *et alii.*, 1995). Outro grupo de compostos de baixa massa molecular descrito na literatura são os glicopeptídeos que contém Fe, e catalizam a reação de oxidação de KTBA, através de um mecanismo semelhante aos sideróforos de tipo catecol (ENOKI *et alii.*, 1990; HIRANO *et alii.*, 1995).

Dentro deste contexto, o estudo da produção de sideróforos por *T.aurantiacus* foi conduzido em meio líquido e sólido. Através da utilização do reagente universal CAS, para detecção de sideróforos, foi possível confirmar a produção destes compostos em ambos os meios de cultura. Em meio líquido, a máxima produção de atividade FOx, após 10-12 dias, relacionou-se com uma mínima reação CAS. Apesar dos resultados positivos no meio de cultura, as diferentes frações coletadas da coluna de Sephadex G-10, incluindo àquela que apresentou a maior atividade FOx, não reagiram com CAS. A nossa explicação é que, quando purificada, a fração com atividade FOx esteja completamente complexada com metal, provavelmente Fe, e devido a isto seja capaz de oxidar o-dianisidina, porém incapaz de retirar o Fe do CAS, para dar a reação positiva característica. Entretanto, no meio de cultura, os compostos tipo siderófo, devem ser produzidos e gradativamente complexados com o metal, dando tempo para a reação com CAS ocorrer durante o período de incubação. A cinética da reação com CAS em meio de cultura, sugere uma natureza de tipo hidroxamato para o possível sideróforo de *T.aurantiacus*.

CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO COM ATIVIDADE FOx PARCIALMENTE PURIFICADA

Uma caracterização cinética e estrutural foi conduzida com a fração com atividade FOx, parcialmente purificada ("fração FOx"). As propriedades cinéticas da fração FOx foram semelhantes às do extrato bruto, quanto a pH e temperatura ótimos de atividade e estabilidade, porém o efeito dos inibidores foi diferente. A fração FOx pareceu ser menos inibida pelos mesmos compostos que em idênticas condições de reação produziram uma forte inibição do extrato bruto. Isto sugere que no extrato bruto, além da inibição da atividade produzida pela fração de baixa massa molecular, estejam sendo inibidos outros sistemas que também oxidam o-dianisidina, provavelmente fenoloxidasas verdadeiras, cuja existência foi sugerida pelos resultados da separação cromatográfica. As propriedades de alta estabilidade térmica foram mantidas após a purificação. Desta forma, pode-se afirmar que a atividade FOx presente no extrato bruto de *T.aurantiacus* é resultado da fração de baixa massa molecular e que grande

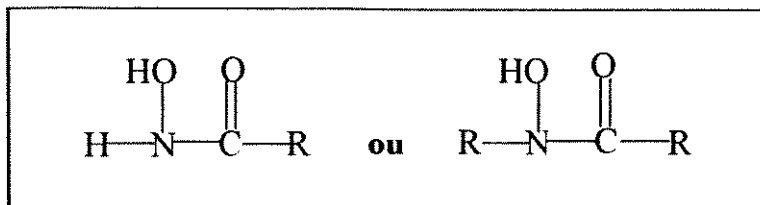
parte das propriedades da fração FOx não foi afetada pela purificação. Do ponto de vista da aplicação de sistemas biológicos em processos industriais, resulta economicamente mais atraente a utilização de um extrato fúngico do que um sistema purificado. Sendo assim, o fungo *T. aurantiacus* mostra-se promissor para sua utilização em processos deste tipo, uma vez que a atividade FOx, demonstrou as mesmas propriedades quando presente no extrato bruto e na fração parcialmente purificada.

A fração FOx não reagiu com Azul de Coomassie para determinação de proteína (método Bradford), porém apresentou absorbância em 280 nm, e reagiu positivamente com o reagente de Folin (método Lowry). O reagente de Folin, utilizado na determinação de ácidos hidroxâmicos (SUBRAMANIAN *et alii.*, 1965), dá uma reação positiva com o sideróforo comercial de tipo hidroxamato, desferrioxamina-B (Desferal). A análise da fração FOx após hidrólise ácida (6N HCl/104°C, durante 24 h), revelou a ausência de aminoácidos na sua estrutura, porém nas condições de hidrólise utilizadas perde-se o triptofano. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C) e de IV, revelaram a ausência de grupamentos aromáticos na fração FOx. Com estes resultados pode-se sugerir que a reação positiva com o reagente de Folin seja devida à presença de ácidos hidroxâmicos na fração e não à presença de uma estrutura peptídica, constituída por aminoácidos.

O espectro de absorbância UV/vis da fração FOx não mostrou a banda característica para hidroxamatos complexados com Fe (III), normalmente observada entre 410-450 nm (NEILANDS, 1984), e apresentou duas bandas características em 290 e 350 nm. Em meio fortemente ácido (pH 1,5) observou-se uma deformação da banda em 350 nm, com formação de múltiplos picos, porém em meio alcalino (pH 12), somente foi observado um aumento nas intensidade das bandas. Estes efeitos podem estar relacionados com a atividade e estabilidade da fração FOx. A atividade catalítica ótima da fração encontra-se em meio ácido (pH 2-3), enquanto que a estabilidade nesses pH é rapidamente perdida após 5 horas de incubação.

A massa molecular da fração FOx estimada por cromatografia em Sephadex G-10 foi de 530 Da, e corresponde à massa molecular da maioria dos sideróforos. A técnica mais recomendada para este tipo de compostos é a de FAB, por espectroscopia de massas, porém através de cromatografia em colunas de exclusão molecular é possível obter uma boa aproximação, embora muitas vezes os valores sejam subestimados.

Previamente à caracterização estrutural de um composto de tipo sideróforo, é recomendada a retirada do Fe da molécula, uma vez que o paramagnetismo deste interfere com as técnicas de RMN, de IV e de espectrometria de massas, eliminando muitos sinais característicos (NEILANDS, 1984). Quando a fração FOx foi tratada com o complexante 8-hidroxiquinoleína, nas condições mais drásticas descritas na literatura, não foi possível retirar o metal da fração, indicando uma alta estabilidade do complexo fração-FOx-metal. Nestas condições, a caracterização estrutural da fração FOx através de RMN, de IV e de espectrografia de rede plana, revelou a presença de uma estrutura de tipo hidroxamato e a presença de diferentes metais, dos quais somente o Fe, embora presente em baixa concentração, pode ser o responsável pela reação de oxidação de o-dianisidina. Desta forma a cinética de reação com CAS no meio de cultura fúngico, a reação positiva com o reagente de Folin e finalmente os resultados dos espectros de RMN e de IV, revelaram uma estrutura de tipo hidroxamato :



As metodologias típicas para purificação de sideróforos descritas na literatura compreendem extração com solventes orgânicos, o qual facilita a dessalinização das frações que contém o(s) sideróforo(s) (GARIBALDI e NEILANDS, 1955; NEILANDS, 1984; PAYNE, 1994). Com o objetivo de fazer mais eficiente e rápida a purificação da fração FOx de *T.aurantiacus* a partir dos caldos de cultura, foi conduzida uma extração com diferentes sistemas de solventes orgânicos. Porém, este procedimento resultou ineficaz, uma vez que praticamente toda a atividade FOx permaneceu nos caldos após inúmeras tentativas. Isto sugeriu um alto caráter hidrofílico do componente, com atividade FOx de *T.aurantiacus*. Assim, o possível sideróforo de tipo hidroxamato de *T.aurantiacus*, apresentou algumas propriedades atípicas para esses compostos, principalmente pelo seu caráter hidrofílico e pela ausência da banda característica do complexo hidroxamato-Fe(III) no espectro de UV/Vis, porém existem alguns microrganismos descritos na literatura produtores de sideróforos de tipo hidroxamato com iguais características às do composto de *T.aurantiacus*, considerados atípicos dentro deste grupo (PAGE, 1987; FEKETE *et alii.*, 1989b). Outras técnicas utilizadas no estudo da caracterização estrutural, tais como análise elementar, quantificação de Fe por absorção atômica e espectroscopia de massas (técnica de ionização por impacto de elétrons), falharam, provavelmente devido à presença de diferentes metais na fração FOx.

UTILIZAÇÃO DOS EXTRATOS ATIVOS DE *T.aurantiacus*

Os resultados preliminares da utilização dos extratos com atividade FOx de *T.aurantiacus*, em processos como branqueamento de polpas Kraft de **Eucalipto** e tratamento de efluentes, mostraram-se promissores. O tratamento das polpas Kraft em condições ainda não otimizadas, revelou uma deslignificação de 39%, após 60 minutos à 50°C e pH 3,0. A presença de um mediador redox como o ABTS, não foi essencial para a obtenção de uma eficiente deslignificação, diferentemente das lacases descritas na literatura, cujo efeito sobre as polpas é insignificante na ausência de ABTS (BOURBONNAIS e PAICE, 1992). Nestas condições, a seletividade do processo não foi satisfatório, como revelado pela redução da viscosidade das polpas. Assim, se faz necessário o estudo de outras condições de tratamento no sentido de aumentar a seletividade do branqueamento com os extratos ativos de *T.aurantiacus*.

O tratamento dos efluentes de tipo E₁ (extração alcalina), com o extrato ativo de *T.aurantiacus* provocou 61% de redução da cor, 70% de redução dos fenóis totais e 47% de mineralização das cloroligninas de alta massa molecular, após 72 horas de incubação sob condições agitadas, à 25°C e pH 4,0. Em condições estacionárias os resultados também foram satisfatórios, observando-se um 35% de redução da cor, 64,4% de redução dos fenóis totais e 5% de mineralização, porém diferentemente do observado em condições agitadas, obteve-se 67% de despolimerização das cloroligninas.

Mesmo em condições não otimizadas, os resultados obtidos com *T.aurantiacus* foram comparáveis àqueles obtidos com os conhecidos fungos ligninolíticos *P.chrysosporium* e

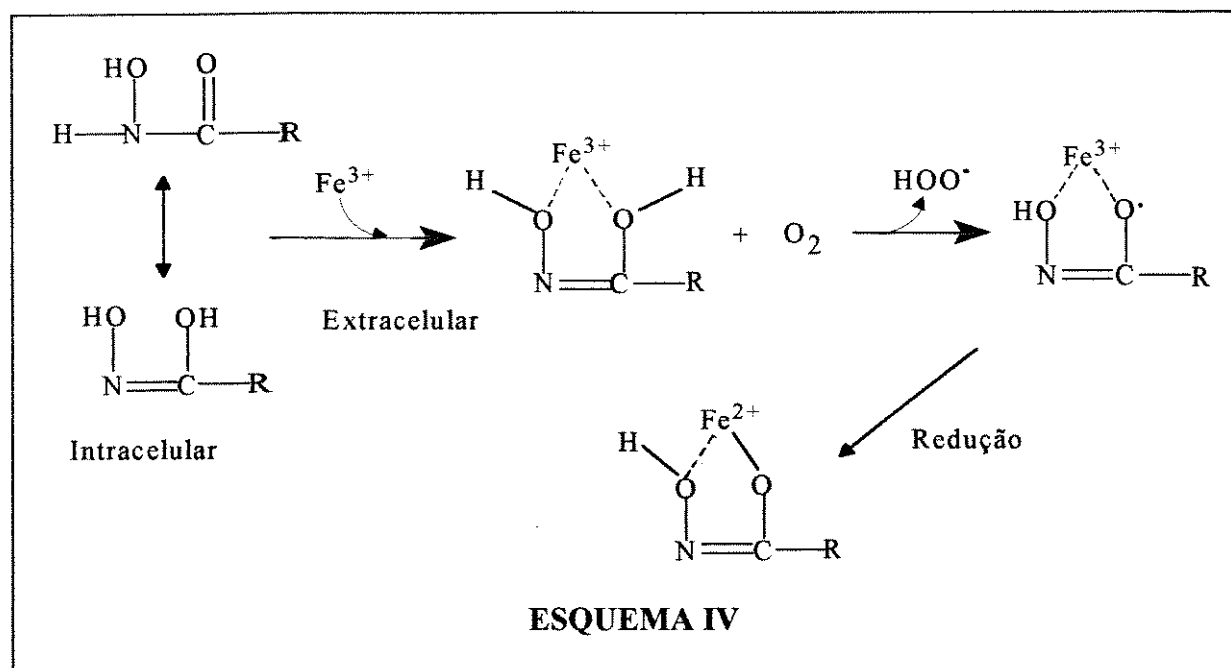
T.versicolor, ou com seus sistemas enzimáticos isolados (BOURBONNAIS e PAICE, 1992; PAICE *et alii.*, 1994; MEHNA *et alii.*, 1995). Apesar do conhecimento à respeito do potencial de óxido-redução e dos mecanismos de oxidação dos compostos de tipo sideróforo, nenhum estudo foi conduzido sobre a aplicação destes sistemas em processos biotecnológicos tais como tratamento de polpas ou de efluentes industriais, confirmando a originalidade dos nossos resultados.

PROPOSTA DE UM MECANISMO DE REAÇÃO PARA O COMPOSTO COM ATIVIDADE FOx DE *T.aurantiacus*

De acordo com os resultados que revelaram uma estrutura de tipo hidroxamato para o composto com atividade FOx de *T.aurantiacus*, foi elaborada uma proposta de mecanismo para a reação de oxidação de substratos *in vitro*. Nossa proposta inclui a formação do composto ativo em meio líquido, até sua liberação ao meio extracelular, onde exerce sua ação.

- Biossíntese

O composto com atividade FOx é produzido em resposta a uma mudança no meio extracelular, no início da cultura, como revelado pela reação com CAS (v. Parte IV). Esta mudança pode ser a concentração de Fe disponível, como foi descrito para a maioria dos sideróforos (NEILANDS, 1984; HIDER, 1984). Os compostos são liberados em forma não complexada, e no meio de cultura vão complexando gradativamente o Fe, para serem posteriormente utilizados pelo fungo. Em um determinado momento do período de incubação, existem somente formas complexadas do composto no meio extracelular, evidenciado pela reação negativa com CAS e pela máxima atividade FOx observada (v. Parte IV). A existência de ácidos hidroxâmicos em alguns cereais como o trigo (NIEMEYER, 1988), pode ser o motivo pelo qual uma alta indução de atividade FOx seja observada quando farelo de trigo é adicionado à cultura de *T.aurantiacus* (v. Parte I). A formação e complexação do composto pode acontecer como proposto no Esquema IV.



- Mecanismo de Oxidação de o-dianisidina

O composto na sua forma complexada participa de reações de oxidação de uma série de substratos típicos de fenoloxidasas, na ausência de H_2O_2 , em pH 3,0. Porém, para o composto exercer sua atividade oxidativa o Fe presente deve estar como Fe (II) e não como Fe (III), como foi sugerido pelos experimentos de inibição (v. Parte V). Portanto, deve existir um mecanismo através do qual esta redução possa acontecer. Em muitos fungos ligninolíticos o oxalato e a celobiose-desidrogenase (CDH) podem participar desta redução (EVANS *et alii.*, 1994; ANDER, 1994). Porém, existem outros sistemas onde o próprio composto complexante apresenta capacidade para reduzir o Fe (III) para Fe (II) (GOODELL *et alii.*, 1995; HIRANO *et alii.*, 1995). O composto com atividade FOx também apresentou capacidade de reduzir o Fe (III) para Fe (II), como revelado pelo experimento conduzido com o-fenantrolina em pH 4,5 (v. Parte V). Portanto, o mecanismo proposto para o composto de *T.aurantiacus* é semelhante ao mecanismo de oxidação de substratos proposto pelo grupo de GOODELL e colaboradores (1995), com o sideróforo de tipo catecolato, e pelo grupo de ENOKI e colaboradores (1990), com o glicopeptídeo, ambos produzidos pelo fungo *G.trabeum*. Embora com mecanismos semelhantes, a diferença fundamental entre os compostos descritos por esses autores e o de *T.aurantiacus*, reside no papel desempenhado pelo H_2O_2 . Nos compostos produzidos pelo *G.trabeum* (sideróforos e glicopeptídeos) a reação de oxidação ocorre através da formação de radicais $OH\cdot$, gerados da interação do composto-Fe(II) com o H_2O_2 , via Fenton. Os radicais assim formados participam posteriormente da oxidação, via transferência de um elétron, de KTBA. Estes compostos não apresentaram atividade FOx com substratos como guaiacol. Contrariamente, o composto produzido por *T.aurantiacus* apresenta uma alta atividade FOx, independente de H_2O_2 , provavelmente devido à diferenças nos potenciais de óxido-redução entre este composto e os anteriores.

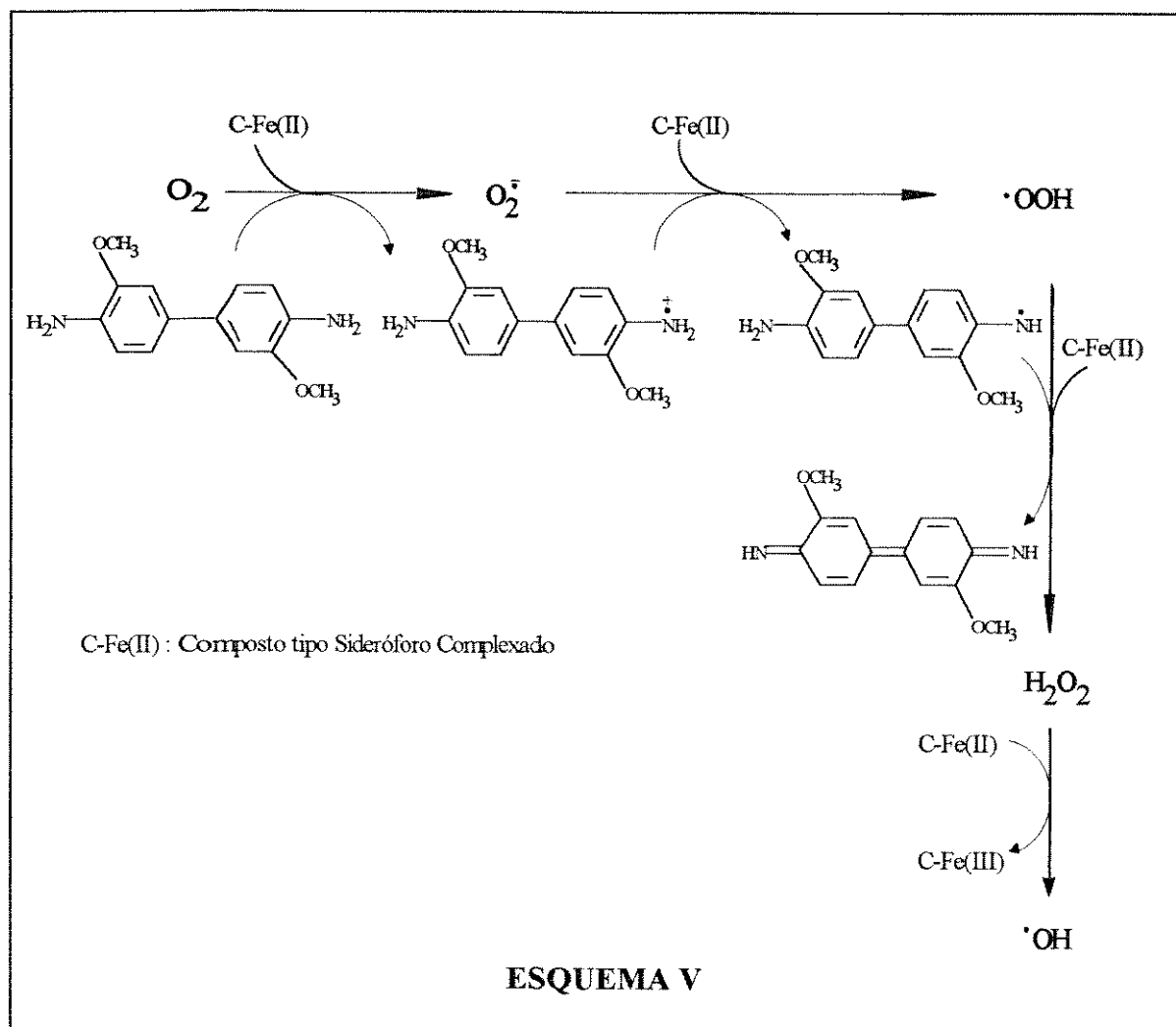
A reação de oxidação de o-dianisidina pelo composto com atividade FOx deve ocorrer como proposto no Esquema V. O composto complexado com Fe(II) cataliza a oxidação de o-dianisidina na presença de oxigênio, via transferência de elétrons, como descrito por YOSHIDA e colaboradores (1995) para a oxidação catalizada pelo sistema lignina peroxidase/ H_2O_2 . Na primeira etapa da reação é formado o radical catiônico da o-dianisidina, enquanto que o oxigênio forma o radical superóxido anion ($O_2^{\cdot-}$). Posteriormente, é formado o intermediário radicalar da o-dianisidina, com simultânea formação de radical hidropéroxido ($OOH\cdot$). Finalmente é formada a quinona-diimina, produto final da reação de oxidação de o-dianisidina, com um $\lambda_{m\acute{a}x}$ em 460 nm. Nesta última etapa há formação de H_2O_2 que pode ser reduzido para radicais hidroxila ($OH\cdot$) pelo composto-Fe(II).

Dentro deste esquema hipotético, pode-se explicar o aumento na atividade FOx observada quando H_2O_2 foi adicionado ao meio de reação (v. Parte V). A adição de H_2O_2 aceleraria a produção de radicais $OH\cdot$ pelo composto-Fe(II), via reação de Fenton, e estes radicais poderiam contribuir com o aumento da velocidade da reação de oxidação de o-dianisidina.

O mecanismo proposto para oxidação de substratos *in vitro*, corresponde também ao mecanismo proposto para degradação de madeira *in vivo* por *T.aurantiacus*, onde a o-dianisidina deve ser substituída por algum doador de elétrons presente na madeira, e as espécies radicalares geradas durante as diferentes etapas seriam as responsáveis pela degradação dos componentes da parede da célula vegetal.

Estudos preliminares por quimiluminescência, utilizando luminol, revelaram a produção de espécies radicalares, provavelmente do tipo $OH\cdot$, produzidas como resultado da atividade

oxidativa do composto com atividade FOx de *T.aurantiacus*. Porém, somente estudos mecanísticos detalhados e cuidadosos poderão confirmar os diferentes passos propostos nos Esquemas IV e V.



7.- CONCLUSÕES

- A produção de atividade FOx em meio líquido por *T.aurantiacus*, é regulada por diversos parâmetros do meio de cultura, principalmente natureza e concentração de substrato, tipo de inóculo, pH da cultura e agitação. Substratos lignocelulósicos ou polissacarídicos induziram altos níveis de atividade FOx, maiores que os observados com um indutor sintético. Em culturas contendo somente glicose como fonte de carbono, a atividade foi fortemente reprimida.
- O extrato ativo de *T.aurantiacus* oxidou diversos substratos típicos de fenoloxidasas do tipo lacase em ausência de H₂O₂. A ótima atividade FOx do extrato foi observada em meios ácidos (pH 2-3), porém a estabilidade nestes pH foi rapidamente perdida após algumas horas de incubação. O extrato ativo apresentou uma elevada temperatura ótima de reação (70-80°C) e uma alta estabilidade térmica. Alguns compostos inibidores típicos de oxidasas que contém metal, foram inibidores da atividade FOx (como ácido tioglicólico e azida sódica), sugerindo que tal atividade presente no extrato bruto de *T.aurantiacus*, apresentava propriedades de fenoloxidase do tipo lacase, exceto pelas altas temperaturas de atividade e estabilidade.
- Após a purificação dos extratos ativos através de diferentes etapas, que incluem cromatografia final em Sephadex G-10, foi possível obter uma fração de baixa massa molecular responsável pela alta atividade FOx. Com isto descartou-se a possibilidade de que fenoloxidasas ou alguma outra enzima oxidativa fosse a responsável pela atividade FOx de *T.aurantiacus*.
- A produção de sideróforos, compostos complexantes de Fe de baixa massa molecular, foi estudada pela utilização do reagente CAS. O *T.aurantiacus* produziu sideróforos em meio sólido e líquido e, pelo tipo de cinética da reação com CAS os sideróforos deste fungo seriam do tipo hidroxamato. A mínima reação com CAS foi observada quando a máxima produção de atividade FOx era detectada.
- A caracterização cinética da fração com atividade FOx, parcialmente purificada, revelou as mesmas propriedades já observadas para o extrato bruto. Foi mantida a capacidade de oxidar uma variedade de substratos de fenoloxidasas, porém a afinidade pelos substratos aumentou. Os pH e temperaturas para atividade e estabilidade foram idênticos aos observados com o extrato bruto. Porém, o efeito de compostos inibidores com a fração parcialmente purificada foi diferente ao observado com o extrato bruto. Ácido tioglicólico e azida sódica inibiram a fração ativa, porém em menor grau do observado com o extrato bruto.
- A caracterização estrutural da fração com atividade FOx, parcialmente purificada revelou a presença de uma estrutura de tipo hidroxamato, contendo metais como Fe. A ausência de aminoácidos na estrutura foi revelada após hidrólise ácida da fração. A massa molecular estimada da fração com atividade FOx foi de 530 Da.

- Alguns estudos preliminares sobre a reação de oxidação de o-dianisidina pela fração com atividade FOx, revelaram a participação do Fe(II) e oxigênio nesta reação, que pode ser triplicada pela adição de H₂O₂. Ao mesmo tempo, a fração FOx parece ter capacidade de reduzir o Fe (III) para Fe (II).

- O extrato ativo revelou-se bastante eficiente na deslignificação de polpas Kraft, na ausência de qualquer mediador redox, porém a seletividade do branqueamento deve ser melhorada. O extrato ativo também foi capaz de descorar efluentes de tipo E₁, porém o efeito mais significativo foi sobre fenóis provocando uma redução de 60 a 70%. Dependendo das condições da incubação com o efluente, pode-se observar mineralização com despolimerização das cloroligninas de alta massa molecular sob condições estacionárias, e apenas uma mineralização em condições agitadas.

8.- PERSPECTIVAS

Devido ao fato dos objetivos iniciais terem sido redirecionados em função dos resultados obtidos no decorrer da primeira parte deste trabalho, e devido ao fato do tema dos compostos de baixa massa molecular ter sido só recentemente descrito com algum detalhe na literatura, diversas perspectivas surgiram para completar, esclarecer ou confirmar alguns dos resultados preliminares obtidos neste trabalho. Entre as perspectivas estão:

- Otimização do processo de purificação, através de algum método rápido e eficiente, que permita a total dessalinização dos compostos. A purificação final do composto com atividade FOx deverá ser conduzida por HPLC, uma vez que esta técnica permitiu obter mais de um pico após aplicar a fração parcialmente purificada por Sephadex G-10.
- Purificação de material em quantidade suficiente que permita completar o estudo de caracterização estrutural. As análises de RMN, IV e análise elementar deverão ser repetidas após retirada do Fe ou outros metais da fração com atividade FOx. Determinar a massa molecular pela técnica FAB de espectroscopia de massas.
- Estudar de forma detalhada os mecanismos de produção e complexação do composto com atividade FOx, e o mecanismo de oxidação de substratos *in vitro*, confirmando a participação ou não de espécies radicalares, sugeridas neste trabalho.
- Otimizar os processos de tratamento de efluentes e branqueamento de polpas. Aumentar a seletividade do branqueamento, procurando condições que protejam a celulose para evitar perda da viscosidade, tentando manter as altas eficiências de deslignificação.

9.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, P.R. (1992) Growth and Amylase Production of *Thermoascus aurantiacus* Miede. Biotechnol. Appl. Biochem., 15: 311-313
- ADLER, E. (1977) Lignin Chemistry-Past, Present and Future. Wood Sci. Technol., 11: 169-218
- AGOSTINELLI, E.; CERVONI, L.; GIARTOSIO, A.; MORPURGO, L. (1995) Stability of Japanese-lacquer-tree (*Rhus vernicifera*) Laccase to Thermal and Chemical Denaturation: Comparison with Ascorbate Oxidase. Biochem. J., 306: 697-702
- AITKEN, M.D.; IRVINE, R.L. (1990) Characterization of Reactions Catalyzed by Manganese-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys., 276: 405-414
- AKAMATSU, Y.; TAKAHASHI, M.; SHIMADA, M. (1992) Cell-Free Extraction and Assay of Oxaloacetolase from the Brown-Rot Fungus *Tyromyces palustris*. Mokuzai Gakkaishi, 38: 495-500
- AKAMATSU, Y.; TAKAHASHI, M.; SHIMADA, M. (1993) Influences of Various Factors on Oxaloacetolase Activity of the Brown-Rot Fungus *Tyromyces palustris*. Mokuzai Gakkaishi, 39: 352-356
- AKAMATSU, Y.; SHIMADA, M. (1995) Some Characteristics of the Glyoxylate Oxidase System of the Brown-Rot Fungus *Tyromyces palustris* and the Occurrence of the Enzyme System in Wood-Rotting Fungi. Mokuzai Gakkaishi, 41: 242-245
- AKHTAR, M.; ATTRIDGE, M.C.; MYERS, G.C.; BLANCHETTE, R.A. (1993) Biomechanical Pulping of Loblolly Pine Chips with Selected White-Rot Fungi. Holzforschung, 47: 36-40
- ALAM, M.; GOMES, I.; MOHIUDDIN, G.; HOQ, M.M. (1994) Production and Characterization Thermostable Xylanases by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* Grown on Lignocelluloses. Enzyme Microbiol. Biotechnol., 16: 298-302
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADA, G.C. (1991) Eletroforese de Proteínas e Isoenzimas de Fungos e Essências Florestais. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, M.G
- ANDER, P. (1994) The Cellobiose-oxidizing Enzymes CBQ and CbO as Related to Lignin and Cellulose Degradation- A Review. FEMS Microbiol. Rev., 13: 297-311
- ANDER, P.; ERIKSSON, K.-E. (1977) Selective Degradation of Wood Components by White-rot Fungi. Physiol. Plant., 41: 239-248
- ANDER, P.; ERIKSSON, K.-E. (1985) Methanol Formation During Lignin Degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 21: 96-102
- ANDER, P.; SENA-MARTINS, G.; DUARTE, J.C. (1993) Influence of Cellobiose Oxidase on Peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. J., 293: 431-435
- ANDER, P.; MISHRA, C.; FARRELL, R.; ERIKSSON, K.-E. (1990) Redox Reactions in Lignin Degradation: Interactions Between Laccase, Different Peroxidases and Cellobiose:Quinone Oxidoreductase. J. Biotechnol., 13: 189-198
- APHA (1989) Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater. 17 Ed. American Publ. Health Ass., N.Y., N°5550 B, p.568

- ARCHIBALD, F.S. (1992) Lignin-peroxidase Is Not Important in the Biological Bleaching and Delignification of Kraft Brownstock by *Trametes versicolor*. Appl.Environ.Microbiol., 58: 3101-3109
- ARCHIBALD, F.S.; ROY, B. (1992) Production of Manganic Chelates by Laccase from the Lignin Degrading Fungus *Trametes (Coriolus) versicolor*. Appl.Environ.Microbiol., 58: 1496-1499
- ASADA, Y.; MIYABE, M.; KIKKAWA, M.; KUWAHARA, M. (1986) Oxidation of NADH by a Peroxidase of a Lignin-degrading Basidiomycete, *Phanerochate chrysosporium*, and its Involvement in the Degradation of a Lignin Model Compound. Agric.Biol.Chem., 50: 525-529
- ASSAVANIG, A.; AMORNKITTICHAROEN, B.; EKPAISAL, N.; MEEVOOTISOM, V.; FLEGEL, T.W. (1992) Isolation, Characterization and Function of Laccase from *Trichoderma* sp.. Appl.Microbiol.Biotechnol., 38: 198-202
- ATKIN, C.L.; NEILANDS, J.B. (1968) Rhodotorulic Acid, a Diketopiperazine Dihydroxamic Acid with Growth-Factor Activity.I. Isolation and Characterization. Biochem., 7: 3734-3739
- ATLOW, S.C.; BONADONA-APARO, L.; KLIBANOV, A.M. (1984) Dephenolization of Industrial Wastewaters Catalyzed by Polyphenol Oxidase. Biotechnol. Bioeng., 26: 599-603
- AUER, C.G. (1986) Levantamento de Fungos Termófilos Associados a Pilhas de Cavacos de *Eucaliptus* spp. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP., Brasil, 87 p.
- AUER, C.G.; KRUGNER, T.L.; BARRICHELO, L.E.G. (1988) Fungos Termófilos em Pilhas de Cavacos de *Eucaliptus* spp. com Auto-Aquecimento. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), 38: 28-32
- AUER, C.G.; FERRARI, M.P.; TOMAZELLO-FILHO, M.; BARRICHELO, L.E.G. (1987) Estrutura Anômica e Composição Química de Cavacos de Madeira de *Eucalipto* Inoculados com o Fungo *Thermoascus aurantiacus*. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), 37: 45-50
- AYERS, A.R.; AYERS, S.B.; ERIKSSON, K.-E.L. (1978) Cellobiose oxidase, Purification and Partial Characterization of a Hemoprotein from *Sporotrichum pulverulentum*. Eur.J Biochem., 90: 171-181
- BACKA, S.; GIERER, J.; REITBERGER, T. ; NILSSON, T. (1992) Hydroxyl Radical Activity in Brown-rot Fungi Studied by a New Chemiluminescence Method. Holzforschung, 46: 61-67
- BACKA, S.; GIERER, J.; REITBERGER, T.; NILSSON, T. (1993) Hydroxyl Radical Activity Associated with the Growth of White-Rot Fungi. Holzforschung, 47: 181-187
- BAGG, A.; NEILANDS, J.B. (1987) Molecular Mechanism of Regulation of Siderophore-Mediated Iron Assimilation. Microbiol.Rev., 51: 509-518
- BAJPAI, P.; BAJPAI, P.K. (1994) Biological Colour Removal of Pulp and Paper Mill Wastewaters. J.Biotechnol., 33: 211-220
- BAJPAI, P.; MEHNA, A.; BAJPAI, P.K. (1993) Decolourization of Kraft Bleach Effluent with White Rot Fungus *Trametes versicolor*. Process Biochem., 46: 274-276

- BARASH, I.; ZION, R.; KRIKUN, J.; NACHMIAS, A. (1988) Effect of Iron Status on *Verticillium* Wilt Disease and on *In Vitro* Production of Siderophores by *Verticillium dahliae*. J.Plant Nutr., 11: 893-905
- BARR, D.P.; SHAH, M.; GROVER, T.; AUST, S. (1992) Production of Hydroxyl radical by Lignin Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Arch.Biochem.Biophys., 298: 480-485
- BARR, D.P.; AUST, S.D. (1994) Conversion of Lignin Peroxidase Compound III to Active Enzyme by Cation Radicals. Arch.Biochem.Biophys., 312: 511-515
- BARRASA, J.M.; GONZÁLEZ, A.E.; MARTÍNEZ, A.T. (1992) Ultrastructural Aspects of Fungal Delignification of Chilean Woods by *Ganoderma australe* and *Phlebia chrysocrea*. Holzforschung, 46: 1-8
- BARRICHELO, L.E.G. (1987) Fungos Termófilos na Biopolpação de Madeira. Biotecnologia, (ESALQ-USP), 8: 2
- BECHTOLD, R.; GONZÁLEZ, A.E.; ALMENDROS, G.; MARTÍNEZ, M.J.; MARTÍNEZ, A.T. (1993) Lignin Alteration by *Ganoderma australe* and Other White-rot Fungi After Solid-state Fermentation of Beech Wood. Holzforschung, 47: 91-96
- BÉGUIN, P.; AUBERT, J.-P. (1994) The Biological Degradation of Cellulose. FEMS Microbiol.Rev., 13: 25-58
- BEKKER, E.G.; PETROVA, S.D.; ERMOLOVA, O.V.; ÉLISASHVILI, V.I.; SINITSYN, A.P. (1991) Isolation, Purification, and Certain Properties of Laccase from *Cerrena unicolor*. Biochem.(Biokhimiya), 55: 1506-1510
- BERGBAUER, M.; EGGERT, C. (1992) Differences in the Persistence of Various Bleachery Effluent Lignins against Attack by White-Rot Fungi. Biotechnol.Lett., 14:869-874
- BERGBAUER, M.; EGGERT, C.; KALNOWSKI, G. (1992) Biotreatment of Pulp Mill Bleachery Effluents with the Coelomycetous Fungus *Stagonospora gigaspora*. Biotechnol. Lett., 14: 317-322
- BLANCHETTE, R.A. (1991) Delignification by Wood-Decay Fungi. Annu.Rev.Phytopathol., 29: 381-398
- BLANCHETTE, R.A.; BURNES, T.A.; EERDMANS, M.M.; AKHTAR, M. (1992) Evaluating Isolates of *Phanerochaete chrysosporium* and *Ceriporiopsis subvermispora* for Use in Biological Pulping Processes. Holzforschung, 46: 109-115
- BOLLAG, J.-M. (1992) Decontaminating Soil with Enzymes. Environ.Sci.Technol., 26: 1876-1881
- BOLLAG, J.-M.; LEONOWICZ, A. (1984) Comparative Studies of Extracellular Fungal Laccases. Appl.Environ.Microbiol., 48: 849-854
- BOLLAG, J.-M.; SHUTTLEWORTH, K.L.; ANDERSON, D.H. (1988) Laccase-mediated Detoxification of Phenolic Compounds. Appl.Environ.Microbiol., 54: 3086-3091
- BONNARME, P.; JEFFRIES, T.W. (1990) Mn(II) Regulation of Lignin peroxidases and Manganese-dependent Peroxidases from Lignin-degrading White-rot Fungi. Appl.Environ Microbiol., 56: 210-217
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G. (1990) Oxidation of Non-Phenolic Substrates: An Expanded Role for Laccase in Lignin Biodegradation. FEBS Lett., 267: 99-102
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G. (1992) Demethylation and Delignification of Kraft Pulp by *Trametes versicolor* Laccase in the Presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). Appl. Microbiol. Biotechnol., 36: 823-827

- BOYLE, C.D.; KROPP, B.R.; REID, I.D. (1992) Solubilization and Mineralization of Lignin by White-rot Fungi. Appl. Environ. Microbiol., 58: 3217-3224
- BRADFORD, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem., 72: 248-254
- BUSHUK, W. (1986) Wheat Chemistry and Uses. Cereals Foods World, 31: 218-226
- BUSWELL, J.A.; ODIER, E. (1987) Lignin Biodegradation. CRC Crit. Rev. Biotechnol., 6: 1-60
- BUSWELL, J.A.; CAI, Y.; CHANG, S. (1995) Effect of Nutrient Nitrogen and Manganese on Manganese Peroxidase and Laccase Production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. FEMS Microbiol. Lett., 128: 81-88
- CAI, D.; TIEN, M. (1993) Lignin-Degrading Peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biotechnol., 30: 70-90
- CAI, W.; MARTIN, R.; LEMAURE, B.; LEUBA, J.-L.; PÉTIARD, V. (1993) Hydroxyindoles: A New Class of Laccase Substrates. Plant Physiol. Biochem., 31: 441-445
- CALL, H.P.; MUCKE, I. (1994) Enzymatic Breakthrough. World Paper, 23-26
- CALL, H.P.; MUCKE, I. (1995) The Laccase- Mediator System (LMS)- A New Concept- Sixth Int. Conference Biotechnol. Pulp and Paper Ind., Viena, Austria. O-F3-234, 38
- CARSON, K.C.; GLENN, A.R.; DILWORTH, M.J. (1994) Specificity of Siderophore-Mediated Transport of Iron in Rhizobia. Arch. Microbiol., 161: 333-339
- CHANDHOKE, V.; GOODELL, B.; JELLISON, J.; FEKETE, F.A. (1992) Oxidation of 2-keto-4-thiomethylbutyric acid (KTBA) by Iron-Binding Compounds Produced by the Wood-Decaying Fungus *Gloeophyllum trabeum*. FEMS Microbiol. Lett., 90: 263-266
- CLAIBORNE, A.; FRIDOVICH, I. (1979) Chemical and Enzymatic Intermediates in the Peroxidation of o-Dianisidine by Horseradish Peroxidase. I. Spectral Properties of the Products of o-Dianisidine Oxidation. Biochem., 18: 2324-2329
- COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. (1993) β -1,4-D-Xylan-degrading Enzyme Systems: Biochemistry, Molecular Biology and Applications. Biotechnol. Appl. Biochem., 17, 259-289
- COWLING, E.B. (1975) Physical and Chemical Constraints in the Hydrolysis of Cellulose and Lignocellulosic Materials. Biotechnol. Bioeng. Symp., 5: 163-181
- COX, C.D. (1994) Deferration of Laboratory Media and Assays for Ferric and Ferrous Ions. Em: Iron Assays and Deferration of Media. Methods Enzymol., 235: 315-372
- D'ALMEIDA, M.L.O. (1988) Composição Química dos Materiais Lignocelulósicos. Em: Celulose e Papel (Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica), IPT, SP., 1: 15-44
- DANIEL, G. (1994) Use of Electron Microscopy for Aiding our Understanding of Wood Biodegradation. FEMS Microbiol. Rev., 13: 199-234
- DANIEL, G.; NILSSON, T.; PETTERSON, B. (1989) Intra and Extracellular Localization of Lignin peroxidases During the Degradation of Solid Wood and Wood Fragments by *Phanerochaete chrysosporium* by Using Transmission Electron Microscopy and Immunogold Labeling. Appl. Environ. Microbiol., 55: 871-881
- DANIEL, G.; PETTERSSON, B.; NILSSON, T.; VOLC, J. (1990) Use of Immunogold Cytochemistry to Detect Mn(II)-dependent and Lignin Peroxidase in Wood Degraded by the White Rot Fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*. Can. J. Bot., 68: 920-933

- DAVIS, S. ; BURNS, R.G. (1990) Decolorization of Phenolic Effluents by Soluble and Immobilized Phenol Oxidases. Appl. Microbiol. Biotechnol., 32: 721-726
- DE JONG, E.; FIELD, J.A. ; DE BONT, J.A.M. (1994) Aryl Alcohols in the Physiology of Ligninolytic Fungi. FEMS Microbiol.Rev., 13: 153-188
- DEMANGE, P.; BATEMAN, A.; DELL, A.; ABDALLAH, M.A. (1988) Structure of Azobactin D, a Siderophore of *Azotobacter vinelandii* Strain D (CCM 289). Biochem., 27: 2745-2752
- DEY, S.; MAITI, T.K.; BHATTACHARYYA, B.C. (1994) 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. Appl. Environ.Microbiol., 60: 4216-4218
- DIFCO Manual (1978) DIFCO Lab. Inc., Michigan, USA, 245 p.
- DURÁN, N.; FERRER, I.; RODRÍGUEZ, J. (1987) Ligninases from *Chrysonilia sitophila* (TFB- 27441 Strain). Appl.Biochem.Biotechnol., 16: 157-167
- DURÁN, N.; REYES, J.L.; BAEZA, J.; CAMPOS, V. (1988) Biomass Photochemistry: XII. Chemical and Photochemical Pretreatment of Rice Hull and Its Fungal Degradation. Biotechnol. Bioeng., 32: 564-568
- DURÁN, N. ; ESPOSITO, E. (1993) Nuevas Técnicas para la Reducción del Impacto Ambiental de la Industria de Celulosa. Química Ind. (Chile), 2: 17-23
- DURÁN, N.; ESPOSITO, E.; ARAÚJO-NETO, J.S. (1995) Enzimas de Importância na Indústria de Polpa e Papel. O papel (Brasil), no prelo
- ÉLISASHVILII, V.I.; GOSHADZE, M.K.; TSIOMENKO, A.B.; GINDILIS, A.L.; KVESITADZE, G.I. (1993) Purification and Properties of Laccase from the Basidial Fungus *Cerrena unicolor*. Biochem.(Biokhimiya), 28: 512-516
- ENOKI, A.; TANAKA, H.; FUSE, G. (1989) Relationship between Degradation of Wood and Production of H₂O₂-Producing One-Electron Oxidase by Brown Rot Fungi. Wood Sci. Technol., 23: 1-12
- ENOKI, A.; YOSHIOKA, S.; TANAKA, H.; FUSE, G. (1990) Extracellular H₂O₂-Producing and One-Electron Oxidation System of Brown-Rot Fungi. Int.Res.Group on Wood Preservation. Documento N° IRG/WP/1445, 1-13
- ERIKSSON, K.-E. (1981) Fungal Degradation of Wood Components. Pure Appl.Chem., 53: 33-43
- ERIKSSON, K-E. (1990) Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Wood Sci. Technol., 24: 79-101
- ERIKSSON, K.-E.; PETTERSSON, B.; VOLC, J.; MUSILEK, V. (1986) Formation and Partial Characterization of Glucose-2-oxidase, a H₂O₂ Producing Enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. Appl.Microbiol.Biotechnol., 23: 257-262
- EVANS, C.S.; GALLAGHER, I.M.; ATKEY, P.T. ; WOOD, D.A. (1991) Localization of Degradative Enzymes in White-rot Decay of Lignocellulose. Biodegradation, 2: 93-106
- EVANS, C.S.; DUTTON, M.V.; GUILLÉN, F.; VENESS, R.G. (1994) Enzymes and Small Molecular Mass Agents Involved with Lignocellulose Degradation. FEMS Microbiol.Rev., 13: 235-239
- FAISON, B.D.; KIRK, T.K. (1985) Factors Involved in the Regulation of a Ligninase Activity in *Phanerochaete chrysosporium*. Appl.Environ. Microbiol., 49: 299-304

- FAURE, D.; BOUILLANT, M.-L.; BALLY, R. (1995) Comparative Study of Substrates and Inhibitors of *Azospirillum lipoferum* and *Pyricularia oryzae* Laccases. Appl. Environ. Microbiol., 61: 1144-1146
- FEKETE, F.A.; CHANDHOKE, V.; JELLISON, J. (1989a) Iron-Binding Compounds Produced by Wood-Decaying Basidiomycetes. Appl. Environ. Microbiol., 55: 2720-2722
- FEKETE, F.; LANZI, R.A.; BEAULIEU, J.B.; LONGCOPE, D.C.; SULYA, A.W.; HAYES, R.N.; MABBOTT, G.A. (1989b) Isolation and Preliminary Characterization of Hydroxamic Acids Formed by Nitrogen-Fixing *Azotobacter chroococcum* B-8. Appl. Environ. Microbiol., 55: 298-305
- FELDMAN, K.; LOVETT, J.S.; TSAO, G.T. (1988) Isolation of the Cellulase Enzymes from the Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus* and Regulation of Enzyme Production. Enzyme Microb. Technol., 10: 262-272
- FENGEL, D.; WEGENER, G. (1984) Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions. W. de Gruyter (ed.), New York, NY, 613 p.
- FERRAZ, A.; BAEZA, J.; DURÁN, N. (1991) Softwood Biodegradation by an Ascomycete *Chrysonilia sitophila* (TFB 27441 Strain). Lett. Appl. Microbiol., 13: 82-86
- FERRER, I.; ESPOSITO, E.; DURÁN, N. (1992) Lignin peroxidase from *Chrysonilia sitophila*: Heat-denaturation Kinetics and pH stability. Enzyme Microb. Technol., 14: 402-406
- FLUORNOY, D.S.; KIRK, T.K.; HIGHLEY, T.L. (1991) Wood Decay by Brown-rot Fungi: Changes in Pore Structure and Cell Wall Volume. Holzforschung, 45: 383-388
- FUKUSHIMA, Y.; KIRK, T. (1995) Laccase Component of the *Ceriporiopsis subvermispora* Lignin-degrading System. Appl. Environ. Microbiol., 61: 872-876
- GARIBALDI, J.A.; NEILADS, J.B. (1955) Isolation and Properties of Ferrichrome A. J. Am. Chem. Soc., 77: 2429-2430
- GEIGER, J.P.; RIO, B.; NANDRIS, D.; NICOLE, M. (1986) Laccases of *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*. I. Purification and Some Physicochemical Properties. Appl. Biochem. Biotechnol., 12: 121-133
- GIVAUDAN, A.; EFFOSSE, A.; FAURE, D.; POTIER, P.; BOUILLANT, M.-L.; BALLY, R. (1993) Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* Isolated from Rice Rhizosphere: Evidence for Laccase Activity in Non-motile Strains of *Azospirillum lipoferum*. FEMS Microbiol. Lett., 108: 205-210
- GLENN, J.K.; GOLD, M.H. (1985) Purification and Characterization of an Extracellular Mn(II)-dependent Peroxidase from the Lignin-degrading Basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys., 242: 329-341
- GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; MAYFIELD, M.B.; KUWAHARA, M.; GOLD, M.H. (1983) An Extracellular H₂O₂-requiring Enzyme Preparation Involved in Lignin Degradation by the White-rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 114: 1077-1083
- GOLD, M.H.; WARIISHI, H.; VALLI, K. (1989) Extracellular Peroxidases Involved in Lignin Degradation by the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Em: Biocatalysis in Agricultural Biotechnology. J.R. Whitaker, P.E. Sonnet (eds.). ACS Symp. Series, Am. Chem. Soc., Washington, DC., 389: 127-140

- GOLOVLEVA, L.A.; LEONTIEVSKY, A.A.; MALTSEVA, O.V.; MYASOEDOVA, N.M. (1993) Ligninolytic Enzymes of the Fungus *Panus tigrinus* 8/18: Biosynthesis, Purification and Properties. J.Biotechnol., 30: 71-77
- GOMES, D.J.; GOMES, J.; STEINER, W. (1994) Production of Highly Thermostable Xylanase by a Wild Strain of Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus* and Partial Characterization of the Enzyme. J.Biotechnol., 37: 11-22
- GOODELL, B.; LIU, J.; JELLISON, J.; LU, J.; PASZCZYNSKI, A.; FEKETE, F.A. (1995) Chelation Activity and Hydroxyl Radical Production Mediated by Low Molecular Weight Phenolate Compounds Isolated from *Gloeophyllum trabeum*. Sixth Int. Conference Biotechnol. Pulp and Paper Ind., Viena, Austria, PK-89, 258
- GOODWIN, D.C.; BARR, D.P.; AUST, S.D.; GROVER, T.A. (1994) The Role of Oxalate in Lignin Peroxidase-Catalyzed Reduction from Compound III Accumulation. Arch.Biochem. Biophys., 315: 267-272
- GOSHADZE, M.K.; ÉLISASHVILI, V.I. (1994) Biosynthesis and Some Properties of Laccase from *Lentinus tigrinus* IBR-101. Biochem.(Biokhimiya), 58: 1448-1452
- GRANT, R. (1994) Enzymes'Future Looks Bright as Range Improves and Expands. Biotechnol., 7: 20-21
- GRAY, R.L.; PARHMAN, R.A. (1982) A Good Look at Wood's Structure. CHEMTECH, Abril, 232-241
- GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, A.T.; MARTÍNEZ, M.J. (1992) Substrate Specificity and Properties of the Aryl-Alcohol Oxidase from the Ligninolytic Fungus *Pleurotus eringii*. Eur.J.Biochem., 209: 603-611
- GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, A.T.; MARTÍNEZ, M.J.; EVANS, C.S. (1994) Hydrogen-peroxide-producing System of *Pleurotus eryngii* Involving the Extracellular Enzyme Aryl-alcohol Oxidase. Appl.Microbiol.Biotechnol., 41: 465-470
- HABU, N.; SAMEJIMA, M.; DEAN, J.F.D.; ERIKSSON, K.-E. (1993) Release of the FAD Domain from Cellobiose Oxidase by Proteases from Cellulolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett., 327: 161-164
- HAEMMERLI, S.D.; LEISOLA, M.S.A.; FIECHTER, A. (1986) Polymerization of Lignins by Ligninases from *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiol.Lett., 35: 33-36
- HALLIWELL, G. (1965) Catalytic decomposition of Cellulose under Biological Conditions. Biochem.J., 95: 35-40
- HAMMEL, K.E.; MOEN, M.A. (1991) Depolymerization of a Synthetic Lignin *in vitro* by Lignin Peroxidase. Enzyme Microbiol.Technol., 13: 15-18
- HAMMEL, K.E.; KAWAI, S.; JENSEN Jr., K.A.; BAO, W.; SREBOTNIK, E. (1995) Can Fungi Degrade Lignin Without Lignin Peroxidase?. Sixth Int. Conference Biotechnol. Pulp and Paper Ind., Viena, Austria, O-F1-233, 45
- HARTREE, E.F. (1972) Determinations of Proteins: a Modification of the Lowry Method that Give a Linear Photometric Response. Anal. Biochem., 48: 422-427
- HARVEY, P.J.; SCHOEMAKER, H.E.; PALMER, J.M. (1986) Veratryl alcohol as a Mediator and the Role of Radical Cation in Lignin Biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett., 195: 242-246
- HATAKKA, A.I.; UUSI-RAUVA, A.K. (1983) Degradation of ¹⁴C-labelled Poplar Wood Lignin by Selected White-rot Fungi. Eur.J.Appl.Microbiol. Biotechnol., 17: 235-242

- HATAKKA, A.; KANTELINEN, A.; TERVILÄ-WILO, A.; VIIKARI, L. (1987) Production of Ligninases by *Phlebia radiata* in Agitated Cultures. Em: Lignin Enzymic and Microbial Degradation. Les Colloques de l'INRA, 40: 185-189
- HATAKKA, A.; MOHAMMADI, O.K.; LUNDELL, T.K. (1989) The Potential of White-Rot Fungi and their Enzymes in the Treatment of Lignocellulosic Feed. Food Biotechnol., 3:45-58
- HENRIKSSON, G.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. (1993) Is Cellobiose Oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* a one-electron Reductase?. Biochim.Biophys.Acta, 1144: 184-190
- HENRIKSSON, G.; ANDER, P.; PETTERSSON, B.; PETTERSSON, G. (1995) Cellobiose Dehydrogenase (Cellobiose Oxidase) from *Phanerochaete chrysosporium* as a Wood-Degrading Enzyme. Studies on Cellulose, Xylan and Synthetic Lignin. Appl. Microbiol. Biotechnol., 42: 790-796
- HIDER, R.C. (1984) Siderophore Mediated Absorption of Iron. Struct.Bonding, 58: 25-87
- HIGUCHI, T. (1990) Lignin Biochemistry: Biosynthesis and Biodegradation. Wood Sci.Technol., 24: 23-63
- HIGUCHI, T. (1993) Biodegradation Mechanism of Lignin by White-rot Basidiomycetes. J.Biotechnol., 30: 1-8
- HIRANO, T.; TANAKA, H.; ENOKI, A. (1995) Extracellular Substance from the Brown-Rot Basidiomycete *Tyromyces palustris* that Reduces Molecular Oxygen to Hydroxyl Radicals and Ferric to Ferrous Iron. Mokuzai Gakkaishi, 41: 334-341
- HOFF, T.; LIU, S-Y.; BOLLAG, J-M. (1985) Transformation of Halogen-, Alkyl-, and Alkoxy-Substituted Anilines by a Laccase of *Trametes versicolor*. Appl. Environ. Microbiol., 49: 1040-1045
- HYDE, S.M.; WOOD, P.M. (1995) Cellobiose Dehydrogenase- An Fe(III) Reductase Involved in Lignocellulose Degradation by the Brown Rot Fungus *Coniophora puteana*. Sixth Int. Conference Biotechnol. Pulp and Paper Ind., Viena, Austria, PK-242, 262
- IMRIE, F.K.E.; TILBURY, R.H. (1972) Polyssacharides in Sugar Cane and Its Products. Sugar Technol. Rev., 1: 291-361
- ISHIGAMI, T.; YAMADA, Y. (1986) Purification and Properties of Polyphenol oxidase from *Chaetomium thermophile*, a Thermophilic Fungus. J.Gen. Appl. Microbiol., 32: 293-301
- ISHIGAMI, T.; HIROSE, Y.; YAMADA, Y. (1988) Characterization of Polyphenol oxidase from *Chaetomium thermophile*, a Thermophilic Fungus. J. Gen. Appl. Microbiol., 34: 401-407
- ISHIHARA, T. (1980) The Role of Laccase in Lignin Biodegradation. Em: Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry, and Potential Applications, T.K.Kirk, T.Higuchi, and H.M.Chang (eds.), Boca Raton, CRC Press, 2: 17-32
- JALAL, M.A.F.; GALLES, J.L.; VAN DER HELM, D.(1985) Structure of Des(diserylglycyl) ferrirhodin, DDF, a Novel Siderophore from *Aspergillus ochraceous*. J.Org.Chem., 50: 5642-5645
- JEFFRIES, T.W. (1990) Biodegradation of Lignin-Carbohydrate Complexes. Biodegradation, 1: 163-176
- JELLISON, J.; GOODELL, B.; FEKETE, F.A.; CHANDHOKE, V.(1990) Fungal Siderophores and their Role in Wood Biodegradation. Int.Res.Group Wood Preservation. Documento N° IRG/WP/1442, 1-16

- JELLISON, J.; CHANDHOKE, V.; GOODELL, B.; FEKETE, F.A. (1991) The Isolation and Immunolocalization of Iron-Binding Compounds Produced by *Gloeophyllum trabeum*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 35: 805-809
- JIN, L.; SELLERS Jr., T.; SCHULTZ, T.P.; NICHOLAS, D.D. (1990) Utilization of Lignin Modified by Brown Rot Fungi. Holzforschung, 44: 133-138
- JOSELEAU, J.-P.; GHARIBIAN, S.; COMTAT, J.; LEFEBVRE, A.; RUEL, K. (1994) Indirect Involvement of Ligninolytic Enzyme Systems in Cell Wall Degradation. FEMS Microbiol. Rev., 13: 255-264
- KATAGIRI, N.; TSUTSUMI, Y.; NISHIDA, T. (1995) Correlation of Brightening with Cumulative Enzyme Activity Related to Lignin Biodegradation during Biobleaching of Kraft Pulp by White Rot Fungi in the Solid-State Fermentation System. Appl. Environ. Microbiol., 61: 617-622
- KAWAI, S.; UMEZAWA, T.; HIGUCHI, T. (1988a) Degradation Mechanisms of Phenolic β -1 Lignin Substructure Model Compounds by Laccase of *Coriolus versicolor*. Arch. Biochem. Biophys., 262: 99-110
- KAWAI, S.; UMEZAWA, T.; SHIMADA, M.; HIGUCHI, T. (1988b) Aromatic Ring Cleavage of 4,6-di(tert-butyl)guaiacol, a Phenolic Lignin Model Compound, by Laccase of *Coriolus versicolor*. FEBS Lett., 236: 309-311
- KELLEY, R.L.; REDDY, C.A. (1986) Purification and Characterization of Glucose Oxidase from Ligninolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol., 166: 269-274
- KERSTEN, P.J.; KIRK, T.K. (1987) Involvement of a New Enzyme, Glyoxal Oxidase, in Extracellular H₂O₂ Production by *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol., 169: 2195-2201
- KERSTEN, P.J.; KALYANARAMAN, B.; HAMMEL, K.E.; REINHAMMAR, B.; KIRK, T.K. (1990) Comparison of Lignin peroxidase, Horse Radish peroxidase and Laccase in the Oxidation of Methoxybenzenes. Biochem. J., 268: 475-480
- KEYSER, P.; KIRK, T.K.; ZEIKUS, J.G. (1978) Ligninolytic Enzyme System of *Phanerochaete chrysosporium*: Synthesized in the Absence of Lignin in Response to Nitrogen Starvation. J. Bacteriol., 135: 790-797
- KIM, Y.S.; GOODELL, B.; JELLISON, J. (1991) Immuno-Electron Microscopic Localization of Extracellular Metabolites in Spruce Wood Decayed by Brown-rot Fungus *Postia placenta*. Holzforschung, 45: 389-393
- KIRK, T.K.; FARRELL, R.L. (1987) Enzymatic Combustion: The Microbial Degradation of Lignin. Annu. Rev. Microbiol., 41: 465-505
- KIRK, T.K.; CONNORS, W.J.; ZEIKUS, J.G. (1976) Requirement for a Growth Substrate During Lignin Decomposition by Two Wood-rotting Fungi. Appl. Environ. Microbiol., 32: 192-194
- KIRK, T.K.; TIEN, M.; JOHNSRUD, S.C.; ERIKSSON, K.-E. (1986) Lignin Degrading Activity of *Phanerochaete chrysosporium* Burds: Comparison of Cellulase-negative and Other Strains. Enzyme Microb. Technol., 8: 75-80
- KIRK, T.K.; SCHULTZ, E.; CONNORS, W.J.; LORENZ, L.F.; ZEIKUS, J.G. (1978) Influence of Culture Parameters on Lignin Metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol., 117: 277-285
- KOENIGS, J.W. (1974) Hydrogen Peroxide and Iron: A Proposed System for Decomposition of Wood by Brown-rot Basidiomycetes. Wood and Fiber, 6: 66-80

- KOFUJITA, H.; OHTA, T.; ASADA, Y.; KUWAHARA, M. (1991) Purification and Characterization of Laccase from *Lentinus edodes*. Mokuzai Gakkaishi, 37: 562-569
- KONDO, R.; HARAZONO, K.; SAKAI, K. (1994) Bleaching of Hardwood Kraft Pulp with Manganese Peroxidase Secreted from *Phanerochaete sordida* YK-624. Appl. Environ. Microbiol., 60: 4359-4363
- KONETSCHNY-RAPP, S.; JUNG, G.; MEIWES, J.; ZAHNER, H. (1990) Staphyloferrin A: A Structurally New Siderophore from *Staphylococci*. Eur. J. Biochem., 191: 65-74
- KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. (1984) Separation and Characterization of Two Extracellular H₂O₂ Dependent Oxidases from Ligninolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett., 169: 247-250
- LACKNER, R.; SREBOTNIK, E.; MESSNER, K. (1991) Oxidative Degradation of High Molecular Weight Chlorolignin by Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 178: 1092-1098
- LAYNE, E. (1957) Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. Methods Enzymol., 3: 447-454
- LEATHAM, G.F. (1986) The Ligninolytic Activities of *Lentinus edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24: 51-58
- LEATHAM, G.F.; FORRESTER, I.T.; MISHRA, C. (1991) Enzymes from Solid Substrates. Recovering Extracellular Degradative Enzymes from *Lentinula edodes* Cultures Grown on Commercial Wood Medium. Em: Enzymes in Biomass Conversion, ACS Symp. Series 460, 95-110
- LEONOWICZ, A.; SZKLARZ, G.; WOJTAS-WASILEWSKA, M. (1985) The Effect of Fungal Laccase on Fractionated Lignosulphonates (Peritan Na). Phytochem., 24, 393-396
- LEONTIEVSKII, A.A.; MYASOEDOVA, N.M.; GOLOVLEVA, L.A. (1994) Production of Ligninolytic Enzymes of the White Rot Fungus *Panus tigrinus*. J. Biotechnol., 32: 299-307
- LEONTIEVSKII, A.A.; MYASOEDOVA, N.M.; KOLOMIETS, E.I.; GOLOVLEVA, L.A. (1992) Induction of Ligninolytic Enzymes of White Rot Fungus *Panus tigrinus* 8/18. Biochem. (Biokhimiya), 56: 1173-1180
- LEONTIEVSKII, L.A.; MYASOEDOVA, N.M.; MALTSEVA, O.V.; TERMKHITAROVA, N.G.; KRUPYANKO, V.I.; GOLOVLEVA, L.A. (1991) Mn-Dependent Peroxidase and Oxidase of *Panus tigrinus* 8/18: Purification and Properties. Biochem. (Biokhimiya), 55: 1375-1380
- LEVY, J.F. (1987) The Natural History of the Degradation of Wood. Phil. Trans. R. Soc. Lond., A321: 423-433
- LEWIS, N.G.; YAMAMOTO, E. (1990) Lignin: Occurrence, Biogenesis and Biodegradation. Ann. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol., 41: 455-496
- LIN, S-F.; HU, H-M.; INUKA, T.; TSAI, Y-C. (1993) Production of Novel Oligosaccharide Oxidase by Wheat Bran Solid-State Fermentation. Biotech. Adv., 11: 417-427
- LINKO, S. (1992) Production of *Phanerochaete chrysosporium* Lignin Peroxidase. Biotechnol. Adv., 10: 191-236
- LINEWEAVER, H.; BURK, D. (1934) The Determination of Enzyme Dissociation Constants. J. Am. Chem. Soc., 56: 658-666
- LU, J.; GOODELL, B.; LIU, J.; ENOKI, A.; JELLISON, J.; TANAKA, H.; FEKETE, F. (1994) The Role of Oxygen and Oxygen Radicals in the One-Electron Oxidative Reactions

- Mediated by Low-Molecular Weight Chelators Isolated from *Gloeophyllum trabeum*. Int. Res. Group Wood Preservation, Documento NºIRG/WP, 1-17
- LUNDBORG, A. (1988) Deformation of Agar by Wood Decaying Fungi- A Possible Indication of the Occurrence of Radicals. Mat. Organismen, 23: 259-269
- LUNDELL, T.; LEONOWICZ, A.; ROGALSKI, J.; HATAKKA, A. (1990) Formation and Action of Lignin-modifying Enzymes in Cultures of *Phlebia radiata* Supplemented with Veratric Acid. Appl. Environ. Microbiol., 56: 2623-2629
- MACHUCA, A. (1991) *Thermoascus aurantiacus* (cepa brasileira): Aspectos do Crescimento, Produção Enzimática e Utilização no Tratamento de Materiais Lignocelulósicos. Dissertação de Mestrado, I.B., UNICAMP, Campinas, S.P.
- MACHUCA, A.; DURÁN, N. (1995) Optimization *Thermoascus aurantiacus* Growth: A Thermophilic Fungus Growing on Lignin-Related Compounds. J. Ind. Microbiol., submetido
- MACHUCA, A.; DURÁN, N. (1993) Phenol Oxidases Production and Wood Degradation by a Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. Appl. Biochem. Biotechnol., 43: 37-44
- MANULIS, S.; KASHMAN, Y.; BARASH, I. (1987) Identification of Siderophore and Siderophore-Mediated Uptake of Iron in *Stemphylium botryosum*. Phytochem., 26: 1317-1320
- MARCY, R.M.; ENGELHARDT, T.C.; UPADHYAY, J.M. (1984) Isolation, Partial Purification, and Some Properties of Protease I from a Thermophilic Mold *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus*. Mycopathol., 87: 57-65
- MARTÍNEZ, J.L.; DELGADO-IRRIBARREN, A.; BAQUERO, F. (1990) Mechanisms of Iron Acquisition and Bacterial Virulence. FEMS Microbiol. Rev., 75: 45-56
- MARZULLO, L.; CANNIO, R.; GIARDINA, P.; SANTINI, M.T.; SANNIA, G. (1995) Veratryl Alcohol Oxidase from *Pleurotus ostreatus* Participates in Lignin Biodegradation and Prevents Polymerization of Laccase-oxidized Substrates. J. Biol. Chem., 270: 3823-3827
- MASAPHY, S.; LEVANON, D. (1992) The Effect of Lignocellulose on Lignocellulolytic Activity of *Pleurotus pulmonarius* in Submerged Culture. Appl. Microbiol. Biotechnol., 36: 828-832
- MAYER, A.M.; HAREL, E. (1979) Polyphenol oxidases in Plants. Phytochem., 18: 193-215
- MEHNA, A.; BAJPAI, P.; BAJPAI, P.K. (1995) Studies on the Decolourization of Effluent from a Small Pulp Mill Utilizing Agriresidues with *Trametes versicolor*. Enzyme Microbiol. Technol., 17: 18-22
- MEHTA, V.; GUPTA, J.K. (1991) Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Research Ind., 36: 161-167
- MICHEL, F.C.Jr.; DASS, S.B.; GRULKE, E.A.; REDDY, C.A. (1991) Role of Manganese Peroxidases and Lignin Peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the Decolourization of Kraft Bleach Plant Effluent. Appl. Environ. Microbiol., 57: 2368-2375
- MILAGRES, A.M.F.; ERISMANN, N. de M.; DURÁN, N. (1991) Xylanase-Ligninase Bleaching Sequency on Kraft and Organosolv (Formic Acid) Pulps. Proc. Second Braz. Symp. Chem. Lignin and the other Wood Comp., 3: 372-376
- MILLER, G.L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Reagent for the Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem., 31: 426-428

- MILSTEIN, O.; HÜTTERMANN, A.; FRÜND, R.; LÜDEMANN, H.-D. (1994) Enzymatic Co-Polymerization of Lignin with Low-Molecular Mass Compounds. Appl. Microbiol. Biotechnol., 40: 760-767
- MOYSON, E.; VERACHTERT, H. (1993) Factors Influencing the Lignin Peroxidase-producing Ability of *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 39: 391-394
- MUHEIM, A.; FIECHTER, A.; HARVEY, P.J.; SCHOEMAKER, H.E. (1992) On the Mechanism of Oxidation of Non-phenolic Lignin Model Compounds by the Laccase-ABTS Couple. Holzforschung, 46: 121-126
- MURMANIS, L.; HIGHLEY, T.L.; PALMER, J.G. (1988) The Action of Isolated Brown Rot Cell-Free Culture Filtrate, H_2O_2 - Fe^{++} , and the Combination of Both on Wood. Wood Sci. Technol., 22: 59-66
- NEILANDS, J.B. (1981) Microbial Iron Compounds. Ann. Rev. Biochem., 50: 715-731
- NEILANDS, J.B. (1984) Methodology of Siderophores. Struct. Bonding, 58: 1-24
- NEILANDS, J.B. (1993) Perspectives in Biochemistry and Biophysics. Siderophores. Arch. Biochem. Biophys., 302: 1-3
- NIEMEYER, H.M. (1988) Hydroxamic Acids (4-Hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-ones), Defence Chemicals in the Gramineae. Phytochem., 27: 3349-3358
- NIKU-PAAVOLA, M.-L.; KARHUNEN, E.; KANTELINEN, A.; VIKARI, L.; LUNDELL, T.; HATAKKA, A. (1990) The Effect of Culture Conditions on the Production of Lignin Modifying Enzymes by the White-rot Fungus *Phlebia radiata*. J. Biotechnol., 13: 211-221
- NOGUEIRA, R.F.P.; PILLI, R.A.; DURÁN, N. (1992) Degradation of β -O-4 Lignin Model and Related Compounds by the Ascomycete *Chrysonilia sitophila* (TFB 27441 Strain). Appl. Biochem. Biotechnol., 33: 169-176
- ONYSKO, K.A. (1993) Biological Bleaching of Chemical Pulps: A Review. Biotechnol. Adv., 11: 179-198
- ORTH, A.B.; ROYSE, D.J.; TIEN, M. (1993) Ubiquity of Lignin-Degrading Peroxidases Among Various Wood-Degrading Fungi. Appl. Environ. Microbiol., 59: 4017-4023
- PAGE, W.J. (1987) Iron-Dependent Production of Hydroxamate by Sodium-Dependent *Azotobacter chroococcum*. Appl. Environ. Microbiol., 53: 1418-1424
- PAICE, M.G.; REID, I.D.; BOURBONNAIS, R.; ARCHIBALD, F.S.; JURASEK, L. (1993) Manganese Peroxidase, Produced by *Trametes versicolor* During Pulp Bleaching, Demethylates and Delignifies Kraft Pulp. Appl. Environ. Microbiol., 59: 260-300
- PAICE, M.G.; BOURBONNAIS, R.; REID, I.D.; ARCHIBALD, F.S.; JURASEK, L. (1994) Oxidative Bleaching Enzymes. The Next Generation? Intl. Pulp Bleaching Conf. Papers, 211-215
- PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; MARZULLO, L.; DESIDERIO, B.; NITTI, G.; CANNIO, R.; SANNIA, G. (1993) Stability and Activity of a Phenol oxidase from the Ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 39: 632-636
- PASZCZYNSKI, A.; HUYNH, V.-B.; CRAWFORD, R. (1985) Enzymatic Activities of an Extracellular, Manganese-dependent Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiol. Lett., 29: 37-41
- PAYNE, S.M. (1988) Iron and Virulence in the Family Enterobacteriaceae. CRC Critical Rev. Microbiol., 16: 81-111

- PAYNE, S.M. (1994) Detection, Isolation, and Characterization of Siderophores. Em: Iron Assays and Deferration of Media. Methods Enzymol., 235: 329-344
- PEREZ, J.; JEFFRIES, T.W. (1992) Roles of Manganese and Organic Acid Chelators in Regulating Lignin Degradation and Biosynthesis of Peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol., 58: 2402-2409
- PERSMARK, M.; PITTMAN, P.; BUUYER, J.S.; SCHWYN, B.; GILL, P.R.; NEILANDS, J.B. (1993) Isolation and Structure of Rhizobactin 1021, a Siderophore from the Alfalfa Symbiont *Rhizobium meliloti* 1021. J. Am. Chem. Soc., 115: 3950-3956
- PICK, E.; KEISARI, Y. (1980) A Simple Colorimetric Method for the Measurement of Hydrogen Peroxide Produced by Cells in Culture. J. Immunol. Methods, 38: 161-170
- POWELL, P.E.; SZANISZLO, P.J.; CLINE, G.R.; REDI, C.P.P. (1982) Hydroxamate Siderophores in the Iron Nutrition of Plants. J. Plant. Nutr., 51: 653-673
- RAASKA, L.; VIIKARI, L.; MATTILA-SANDHOLM, T. (1993) Detection of Siderophore in Growing Cultures of *Pseudomonas* spp.. J. Ind. Microbiol., 11: 181-186
- REDDY, C.A. (1993) An Overview of the Recent Advances on the Physiology and Molecular Biology of Lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biotechnol., 30: 91-107
- REDDY, C.A.; D'SOUZA, T.M. (1994) Physiology and Molecular Biology of the Lignin Peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiol. Rev., 13: 137-152
- REHMAN, A.U.; THURSTON, C.F. (1992) Purification of Laccase I from *Armillaria mellea*. J. Gen. Microbiol., 138: 1251-1257
- REID, I.D.; PAICE, M.G. (1994) Biological Bleaching of Kraft Pulps by White-Rot Fungi and their Enzymes. FEMS Microbiol. Rev., 13: 369-376
- REINHAMMAR, B. (1984) Laccase. Em: Copper Proteins and Copper Enzymes., R. Lontie (ed.), Boca Raton, CRC Press, 3: 2-35
- RIGLING, D.; VAN ALFEN, N.K. (1993) Extra- and Intracellular Laccases of the Chestnut Blight Fungus, *Cryphonectria parasitica*. Appl. Environ. Microbiol., 59: 3634-3639
- RÍOS, S.; EYZAGUIRRE, J. (1992) Conditions for Selective Degradation of Lignin by the Fungus *Ganoderma australis*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 37: 667-669
- RITSCHKOFF, A.-C.; RÄTTÖ, M.; BUCHERT, J.; VIIKARI, L. (1995) Effect of Carbon Source on the Production of Oxalic Acid and Hydrogen Peroxide by Brown Rot Fungus *Poria placenta*. Sixth Int. Conference Biotechnol. Pulp and Paper Ind., Viena, Austria, PK-105, 259
- RODRÍGUEZ, J.; DURÁN, N. (1991) Lignosulphonate Biodegradation by *Chrysomilia sitophila*. Appl. Biochem. Biotechnol., 30: 185-191
- ROGALSKI, J.; LUNDELL, T.K.; LEONOWICZ, A.; HATAKKA, A. (1991) Influence of Aromatic Compounds on the Production of Ligninolytic Enzymes by *Phlebia radiata*. Phytochem., 30: 2869-2872
- ROY-ARCAND, L.; ARCHIBALD, F.S. (1991) Direct Dechlorination of Chlorophenolic Compounds by Laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*. Enzyme Microb. Technol., 13: 194-203
- RUEL, K.; AMBERT, K.; JOSELEAU, J.-P. (1994) Influence of Enzyme Equipment of White-rot Fungi on the Patterns of Wood Degradation. FEMS Microbiol. Rev., 13: 241-254

- SCHOEMAKER, H.E.; LUNDELL, T.; HATAKKA, A.; PIONTEK, K. (1994) The Oxidation of Veratryl Alcohol, Dimeric Lignins Models and Lignin by Lignin Peroxidase: The Redox Cycle Revisited. FEMS Microbiol.Rev., 13: 321-332
- SCHMIDT, O.; LIESE, W. (1994) Occurrence and Significance of Bacteria in Wood. Holzforschung, 48: 271-277
- SCHMIDT, O.; WHITTEN, B.K.; NICHOLAS, D.D. (1981) A proposed Role for Oxalic Acid in Non-Enzymatic Wood Decay by Brown Rot Fungi. Proc.Am.Wood Preservers'Assoc., 77: 157-164
- SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. (1987) Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. Anal.Biochem., 160: 47-56
- SHIMADA, M.; MA, D.-B.; AKAMATSU, Y.; HATTORI, T. (1994) A Proposed Role of Oxalic Acid in Wood Decay Systems of Wood-rotting Basidiomycetes. FEMS Microbiol.Rev., 13: 285-296
- SHUTTLEWORTH, K.L.; POSTIE, L.; BOLLAG, J.-M. (1986) Production of Induced Laccase by the Fungus *Rhizoctonia praticola*. Can.J.Microbiol., 32: 867-870
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. (1981) Spectrometric Identification of Organic Compounds. John Wiley & Sons, U.S.A., 442 p.
- SLOMCZYNSKI, D.; NAKAS, J.P.; TANENBAUM, S.W. (1995) Production and Characterization of Laccase from *Botrytis cinerea* 61-34. Appl.Environ.Microbiol., 61: 907-912
- SREBOTNIK, E.; MESSNER, K. (1991) Immunoelectron Microscopical Study of the Porosity of Brown-rot Degraded Pine Wood. Holzforschung, 45: 95-101
- SREBOTNIK, E.; MESSNER, K. (1994) A Simple Method that Uses Differential Staining and Light Microscopy to Assess the Selectivity of Wood Delignification by White Rot Fungi. Appl.Environ.Microbiol., 60: 1383-1386
- SUBRAMANIAN, K.N.; PADMANABAN, G.; SARMA, P.S. (1965) Folin-Ciocalteu Reagent for the Estimation of Siderochromes. Anal.Biochem., 12: 106-112
- SZKLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. (1989) Production of Phenoloxidases and Peroxidases by Wood-rotting Fungi. Mycol., 81: 234-240
- 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, 37: 986-988
- TANAKA, H.; HIRANO, T.; ENOKI, A. (1993) Extracellular Substance from the White-Rot Basidiomycete *Irpex lacteus* for Production and Reduction of H₂O₂ During Wood Degradation. Mokuzai Gakkaishi, 39: 493-499
- TAPPI (1988) Test Methods, Atlanta, Tappi Press, pag. irreg.
- THAKKER, G.D.; EVANS, C.S.; RAO, K.K. (1992) Purification and Characterization of Laccase from *Monocillium indicum* Saxena. Appl.Microbiol.Biotechnol., 37: 321-323
- THIEKEN, A.; WINKELMANN, G. (1992) Rhizoferrin: A Complexone type Siderophore of the Mucorales and Entomophthorales (Zygomycetes). FEMS Microbiol.Lett., 94: 37-42
- THURSTON, C.F. (1994) The Structure and Function of Fungal Laccases. Microbiol.(UK), 140: 19-26
- TIEN, M.; KIRK, K. (1983) Lignin-degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. Science, 221: 661-663

- TIEN, M.; KIRK, T.K. (1984) Lignin-degrading Enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, Characterization, and Catalytic Properties of a Unique H₂O₂-requiring Oxygenase. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 81: 2280-2284
- TRICK, C.G.; KERRY, A. (1992) Isolation and Purification of Siderophores Produced by Cyanobacteria, *Synechococcus* sp. PCC 7942 and *Anabaena variabilis* ATCC 29413. Current Microbiol., 24: 241-245
- TRIGO, C.; BALL, A.S. (1994) Production of a Extracellular Enzymes During the Solubilization of Straw by *Thermomonospora fusca* BD25. Appl.Microbiol.Biotechnol., 41: 366-372
- VAZQUEZ-DUHALT, R.; WESTLAKE, D.W.S.; FEDORAK, P.M. (1995) Kinetics of Chemically Modified Lignin Peroxidase and Enzymatic Oxidation of Aromatic Nitrogen-Containing Compounds. Appl.Microbiol.Biotechnol., 42: 675-681
- VIIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. (1994) Xylanases in Bleaching: From an idea to the Industry. FEMS Microbiol.Rev., 13: 335-350
- VISWAMITRA, M.A.; BHANUMOORTHY, P.; RAMAKUMAR, S.; MANJULA, M.V.; VITHAYATHIL, P.J.; MURTHY, S.K.; NAREN, A.P. (1993) Crystallization and Preliminary X-ray Diffraction Analysis of Crystals of *Thermoascus aurantiacus* Xylanase. J.Mol.Biol., 232: 987-988
- WANG, S-H.; FERGUSON, J.F.; MCCARTHY, J.L. (1992) The Decolorization and Dechlorination of Kraft Bleach Plant Effluent Solutes by Use of Three Fungi: *Ganoderma lacidum*, *Coriolus versicolor* and *Hericium erinaceum*. Holzforshung, 46: 219-223
- WARIISHI, H.; DUNFORD, H.B.; MAC DONALD, I.D.; GOLD, M.H. (1989) Manganese Peroxidase from the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Transient State Kinetics and Reaction Mechanism. J.Biol.Chem., 264: 3335-3340
- WARIISHI, H.; GOLD, M.H. (1990) Lignin peroxidase Compound III. Mechanism of Formation and Decomposition. J.Biol.Chem., 265: 2070-2077
- WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M.H. (1991) *In vitro* Depolymerization of Lignin by Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem.Biophys.Res. Comm., 176: 269-275
- WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M.H. (1992) Manganese(II) Oxidation by Manganese Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. J.Biol. Chem., 267: 23688-23695
- WESTERMARK, U.; ERIKSSON, K-E. (1974a) Carbohydrate-dependent Enzymic Quinone Reduction During Lignin Degradation. Acta Chem.Scand., B28: 204-208
- WESTERMARK, U.; ERIKSSON, K.-E. (1974b) Cellobiose:Quinone Oxidoreductase, a New Wood-Degrading Enzyme from White Rot Fungi. Acta Chem.Scand., B28: 209-214
- WINKELMANN, G. (1986) Iron Complex Products (Siderophores). Em: Microbial Products II. Biotechnology, H.-J.Rehm, G.Reed (eds.), Weinheim (Alemanha), 4: 216-243
- WINKELMANN, G. (1992) Structures and Functions of Fungal Siderophores Containing Hydroxamate and Complexone Type Iron Binding Ligands. Mycol. Res., 96: 529-534
- WOOD, J.D.; WOOD, P.M. (1992) Evidence that Cellobiose: Quinone Oxidoreductase from *Phanerochaete chrysosporium* Is a Breakdown Product of Cellobiose Oxidase. Biochem Biophys. Acta, 119: 90-96
- WOOD, P.M. (1994) Pathways for Production of Fenton's Reagent by Wood rotting Fungi. FEMS Microbiol.Rev., 13: 313-320

- WOOLDRIDGE, K.G.; WILLIAMS, P.H. (1993) Iron Uptake Mechanisms of Pathogenic Bacteria. FEMS Microbiol.Rev., 12: 325-348
- YOSHIDA, S.; WATANABE, T.; HONDA, Y.; KUWAHARA, M. (1995) Reaction of Lignin Peroxidase in Organic Solvents. Sixth Int.Conference Biotechnol. Pulp and Paper Ind., Viena, Austria, P-F1, 124
- ZAMOST, B.L.; NIELSEN, H.K.; STARNES, R.L. (1991) Thermostable Enzymes for Industrial Applications. J.Ind.Microbiol., 8: 71-82
- ZENTGRAF, B. (1992) Enzymes from Thermophiles. Acta Biotechnol., 12: 377-382
- ZIMMERMANN, W. (1987) The Lignin Biopolymer Products and Potential Applications of Lignin Biodegrading Systems. CHIMIA, 43: 396-403

10.- APÊNDICES

APÊNDICE I

Tabela 1A: Fator f para Corrigir Diferentes Porcentagens do Consumo de Permanganato

P	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
30	0,958	0,960	0,961	0,964	0,966	0,968	0,970	0,973	0,975	0,977
40	0,979	0,981	0,983	0,985	0,987	0,989	0,991	0,994	0,996	0,998
50	1,000	1,002	1,004	1,006	1,009	1,011	1,013	1,015	1,017	1,019
60	1,022	1,024	1,026	1,028	1,030	1,033	1,035	1,037	1,039	1,042
70	1,044									

Tabela 2A: Fator para Correção da Temperatura

T (°C)	f(T)	T (°C)	f(T)
18	1,0910	23	1,025
18,5	1,0845	23,5	1,0195
19	1,0720	24	1,0130
19,5	1,0715	24,5	1,0055
20	1,0650	25	1,0000
20,5	1,0585	25,5	0,9935
21	1,0520	26	0,9870
21,5	1,0455	26,5	0,9805
22	1,0390	27	0,9740
22,5	1,0325	27,5	0,9575

APÊNDICE II

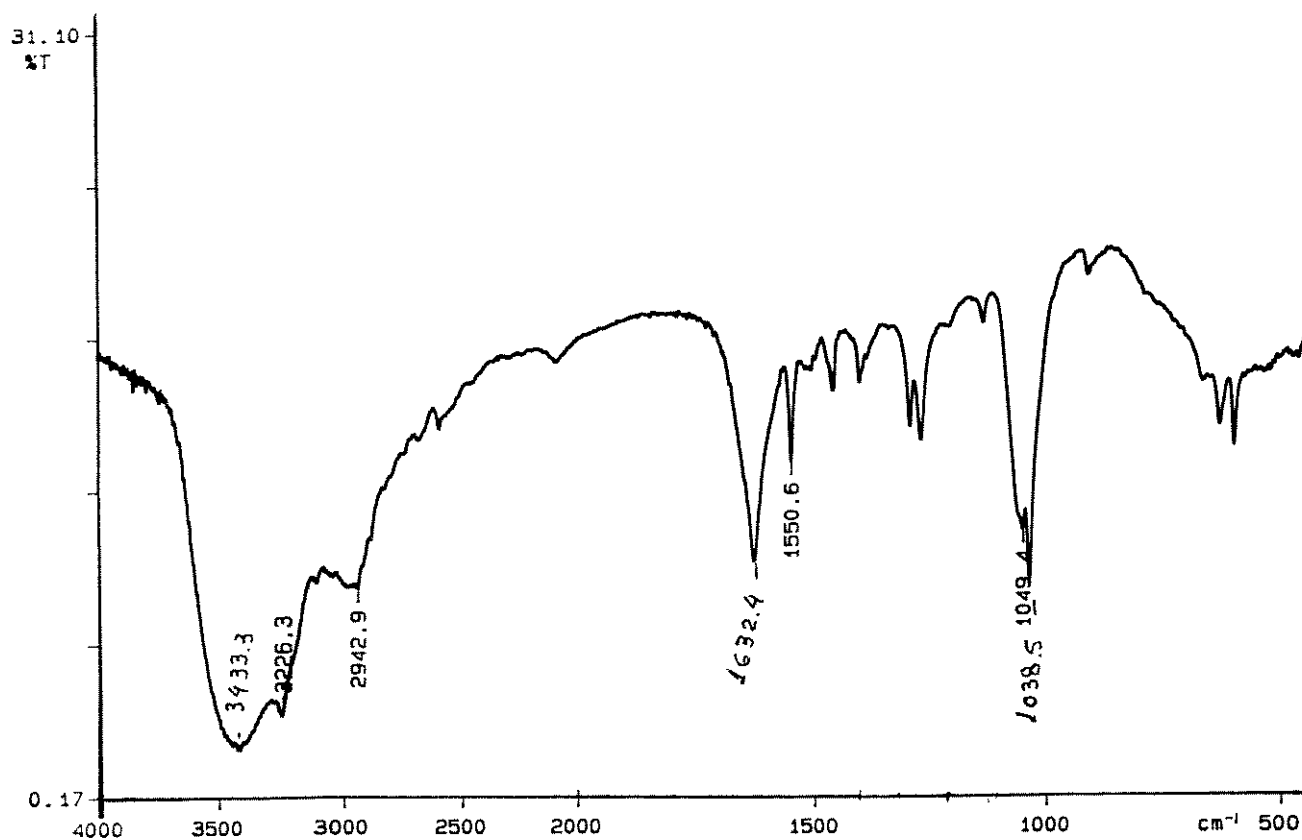


Figura 1A: Espectro de Infra-Vermelho da Fração com Atividade FOx de *T.aurantiacus*. Uma amostra da fração, parcialmente purificada por Sephadex G-10, foi preparada como pastilha de KBr

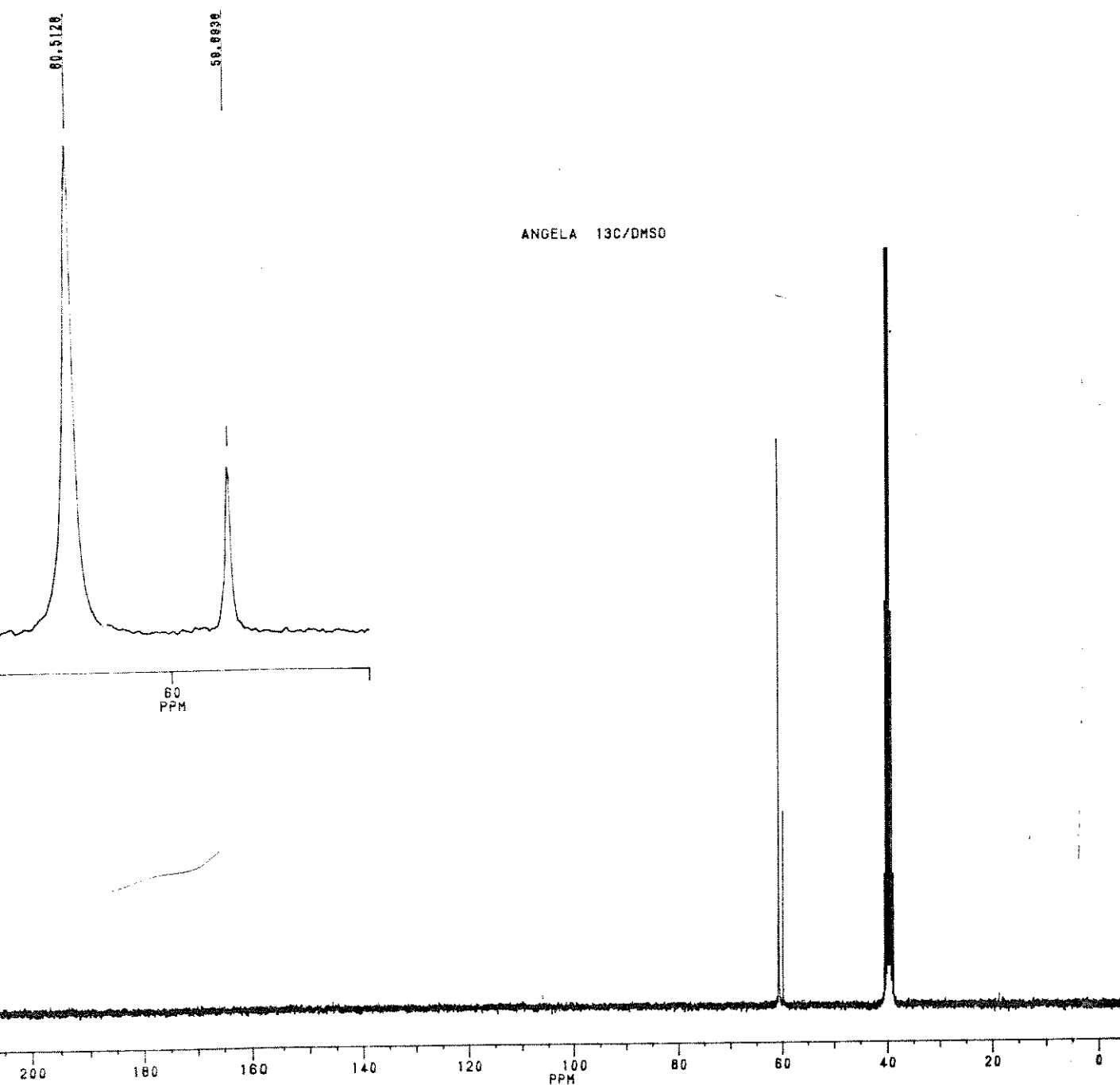


Figura 2A: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C da Fração com Atividade FOx de *T.aurantiacus*. Uma amostra da fração, parcialmente purificada, foi preparada em DMSO e o espectro foi registrado em 300 MHz

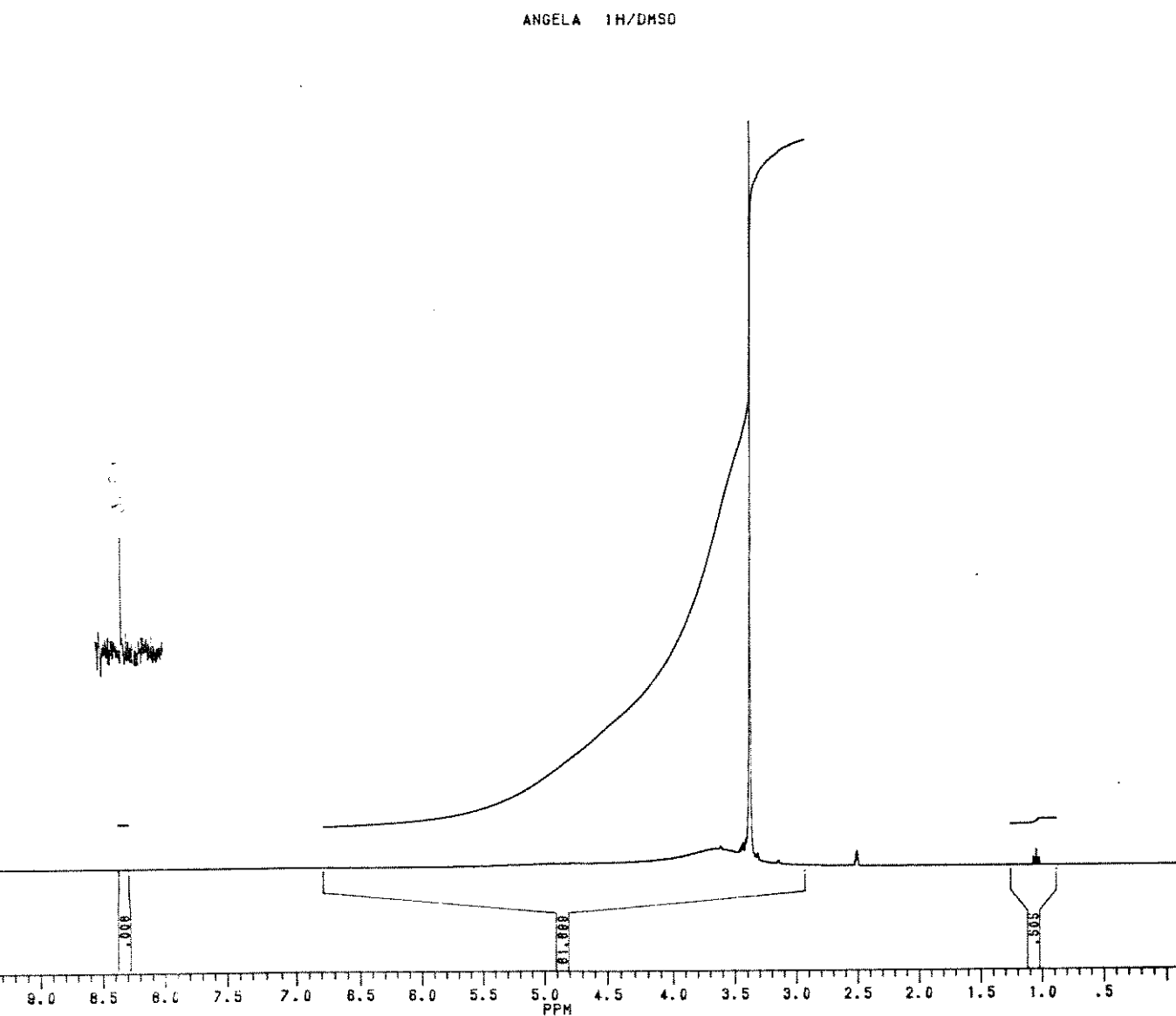


Figura 3A: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H da Fração com Atividade FOx de *T.aurantiacus*. Preparação da amostra idem Figura 2A.

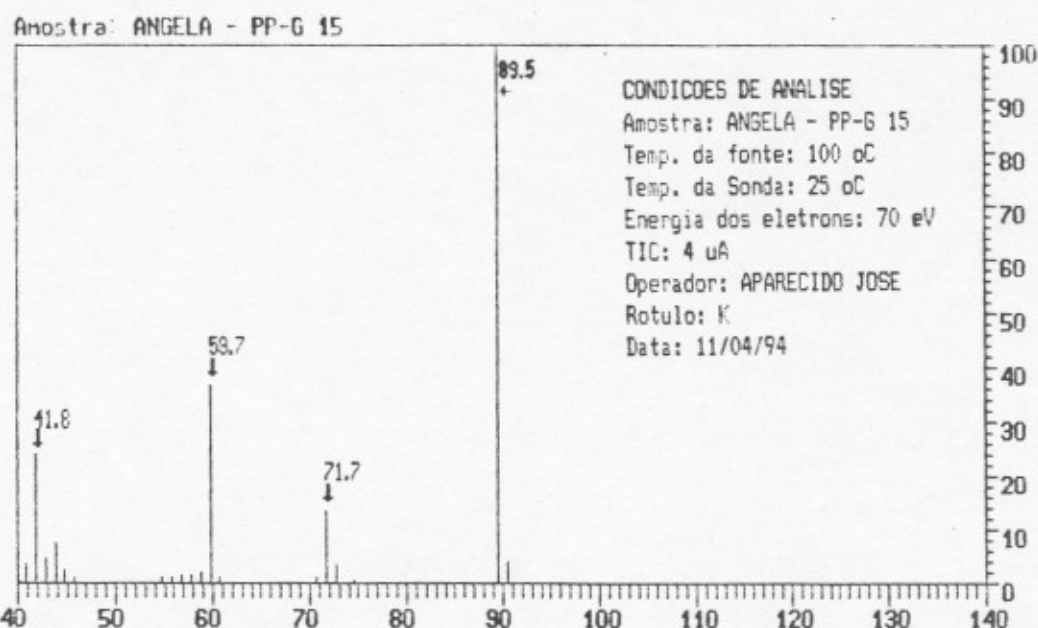


Figura 4A: Espectro de Massas da Fração com Atividade FOx de *T.aurantiacus*. O espectro foi obtido após tratamento da amostra pela técnica de impacto de eletrons

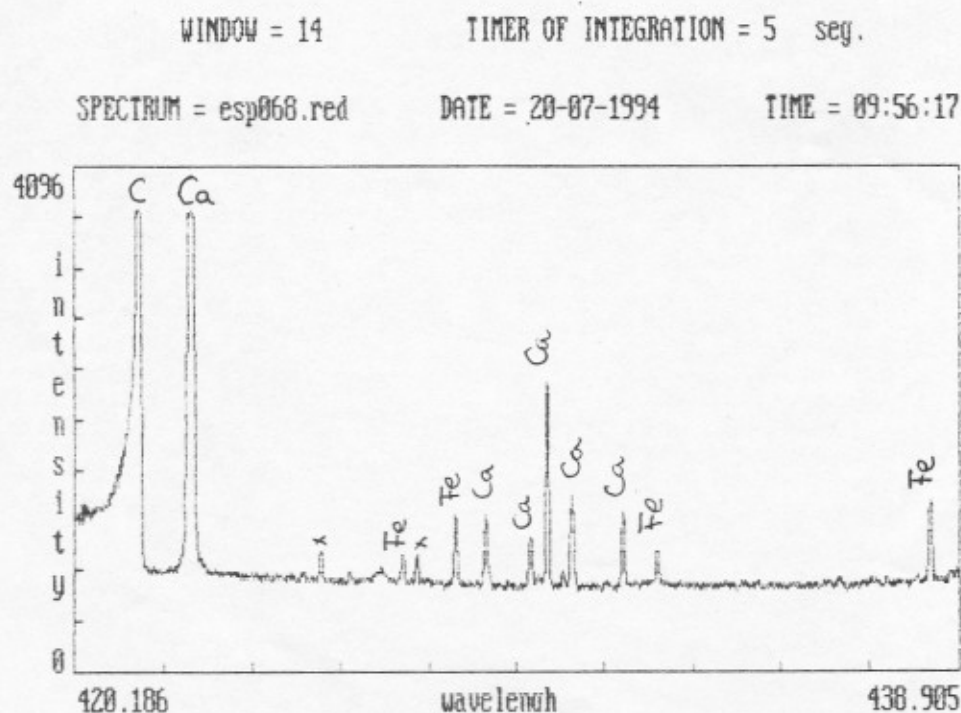


Figura 5A: Espectro de Emissão obtido por Espectrografia de Rede Plana da Fração com Atividade FOx de *T.aurantiacus*.