

**MARIANA JUVENTINA MAGRINI**

**“DEGRADAÇÃO DE HPAs E PRODUÇÃO DE ENZIMAS  
LIGNINOLÍTICAS POR FUNGOS BASIDIOMICETOS  
DERIVADOS DE ESPONJAS MARINHAS”**

**CAMPINAS  
2012**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**MARIANA JUVENTINA MAGRINI**

**“DEGRADAÇÃO DE HPAs E PRODUÇÃO DE ENZIMAS  
LIGNINOLÍTICAS POR FUNGOS BASIDIOMICETOS  
DERIVADOS DE ESPONJAS MARINHAS”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
MARIANA JUVENTINA MAGRINI  
Lara Durães Sette  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Microbiologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Lara Durães Sette  
Co-Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Rafaella Costa Bonugli Santos

CAMPINAS,  
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

M276d	<p>Magrini, Mariana Juventina, 1985- Degradação de HPAs e produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos derivados de esponjas marinhas / Mariana Juventina Magrini. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientador: Lara Durães Sette. Coorientador: Rafaella Costa Bonugli Santos. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 2. Basidiomicetos. 3. Fungos derivados marinhos. 4. Enzimas ligninolíticas. I. Sette, Lara Durães. II. Santos, Rafaella Costa Bonugli. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** PAHs degradation and ligninolytic enzymes production by marine-sponge-derived basidiomycetes fungi

**Palavras-chave em Inglês:**

Polycyclic aromatic hydrocarbons

Basidiomycetes

Marine-derived fungi

Ligninolytic enzymes

**Área de concentração:** Microbiologia

**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Lara Durães Sette [Orientador]

Isis Serrano Silva

Suzan Pantaroto de Vasconcelos

**Data da defesa:** 03-08-2012

**Programa de Pós Graduação:** Genética e Biologia Molecular

Campinas, 03 de agosto de 2012.

**BANCA EXAMINADORA**

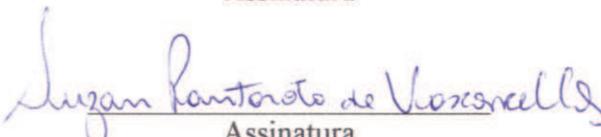
Prof(a). Dr(a). Lara Durães Sette (Orientadora)

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Isis Serrano Silva

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Suzan Pantaroto de Vasconcellos

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Valéria Maia Merzel

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Derlene Attili de Angelis

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Aos meus queridos pais,  
irmãos e amigos por todo apoio e carinho.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Lara Durães Sette agradeço pela oportunidade de ter sido sua orientanda, por sua confiança em mim e pelo respeito às minhas idéias. Agradeço também pelo crescimento proporcionado ao longo do desenvolvimento desse estudo.

À Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos pela co-orientação em todas as etapas do projeto, por tantos ensinamentos, paciência, auxílio e dedicação sempre.

À Dra. Marili V. N. Rodrigues pela parceria na quantificação da degradação dos HPAs e identificação dos metabólitos formados. Agradeço também o apoio técnico de Sinésio Boaventura Júnior e Adriana da Silva Santos e auxílio da Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder e do Dr. Adilson Sartoratto. Agradeço também pela disponibilização do laboratório de Química Orgânica e Farmacêutica para a realização destas etapas do trabalho.

À Milena Binatti Ferreira, por sanar minhas dúvidas sempre que elas ocorriam, por me auxiliar com seus conselhos e dicas ao longo do desenvolvimento de minha dissertação, e por me auxiliar nos primeiros passos dentro da microbiologia. Agradeço principalmente, por sua amizade, carinho, companheirismo e prontidão pra ajudar sempre.

Aos meus colegas e amigos da divisão de Recursos Microbianos de CPQBA/UNICAMP, agradeço pela amizade, auxílio, apoio e carinho nos momentos difíceis que enfrentei durante o desenvolvimento deste trabalho. Com certeza sua amizade tornou nossa convivência muito mais prazerosa durante a realização desse projeto.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) agradeço pelo suporte financeiro do projeto e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço aos meus pais, por todo apoio e carinho durante toda minha formação, por terem permitido que eu viesse estudar na Unicamp e continuado os meus estudos no Mestrado. À minha mãe por acreditar que sou capaz de fazer o que quiser e por ainda aceitar minhas brincadeiras inconvenientes. Obrigada por tudo!

Agradeço aos demais familiares por todo carinho apoio e presença em minha vida. Sem vocês, eu não seria o que sou hoje.

A todos os meus amigos da Unicamp por todo carinho, amizade, força, incentivo e presença constante, pois todos vocês colaboraram na formação da pessoa que sou hoje. Meninas, vocês são o melhor que eu poderia ter encontrado na graduação.

Aos amigos que fiz graças a este projeto: Sá, Maria Rapha, Bru e Mi. Vocês são pessoas especiais!

Às pessoas que convivi dia a dia e que se transformaram em verdadeiros amigos, com os quais posso contar e pra quem estarei sempre presente: Gigi, Bia, Camys, Gabi, Carol, Maria Carol, Karina, Dani, Larissa, Dai, Racreu, Pri, Tati e Cris.

Às demais pessoas que cruzaram minha vida nesses últimos anos e que sem dúvida me ajudaram a alcançar meus objetivos de alguma forma.

A todas as coisas boas que estão por vir!

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. FUNGOS DERIVADOS MARINHOS.....	3
2.2. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs).....	4
2.3. METABOLISMO DE HPAs.....	7
2.4. BIODEGRADAÇÃO DE HPAs.....	9
2.5. ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS.....	12
2.6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	14
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. OBJETIVO GERAL.....	17
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. MICRO-ORGANISMOS.....	19
4.2. SELEÇÃO DO ISOLADO MAIS EFICIENTE.....	20
4.2.1. CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	20
4.2.2. ANÁLISE QUANTITATIVA DA DEGRADAÇÃO DOS HPAs POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM).....	20
4.2.3. AVALIAÇÃO DA ADSORÇÃO DOS HPAs AO MICÉLIO.....	21
4.2.4. PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS.....	22
4.2.5. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL.....	24
4.3. ISOLADO SELECIONADO: <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062.....	24
4.3.1. DEGRADAÇÃO DOS HPAs AO LONGO DE 7 DIAS.....	24
4.3.2. CRESCIMENTO, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E DEGRADAÇÃO DOS HPAs EM MEIO MINERAL.....	24
4.3.3. IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS POR CG-EM.....	25
4.3.4. INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SOBRE A DEGRADAÇÃO.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1. SELEÇÃO DO ISOLADO MAIS EFICIENTE.....	31
5.1.1. DEGRADAÇÃO DOS HPAs PIRENO E BaP PELOS BASIDIOMICETOS DERIVADOS MARINHOS.....	31
5.1.2. ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM PRESENÇA DE HPAs.....	34
5.1.3. BIOMASSA.....	41
5.1.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA ANTES DA ADIÇÃO DOS HPAs.....	43
5.1.5. DEGRADAÇÃO DE HPAs, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E BIOMASSA.....	46
5.2. ISOLADO SELECIONADO.....	48
5.2.1. DEGRADAÇÃO AO LONGO DE 7 DIAS.....	48
5.2.2. CONSUMO DE PIRENO E BaP EM MEIO MINERAL.....	49
5.2.3. IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS FORMADOS DURANTE A DEGRADAÇÃO DOS HPAs.....	52
5.2.4. INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SOBRE A DEGRADAÇÃO.....	59

6. CONCLUSÕES.....	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
APÊNDICE A. Valores de degradação de pireno e BaP obtidos e calculados para os três basidiomicetos estudados durante a etapa de seleção do isolado mais eficiente.....	83
APÊNDICE B. Atividade das enzimas LiP, MnP e Lacase pelo basidiomiceto <i>Tinctoporellus</i> sp. CBMAI 1061 durante a etapa de seleção do isolado mais eficiente.....	84
APÊNDICE C. Atividade das enzimas LiP, MnP e Lacase pelo basidiomiceto <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062 durante a etapa de seleção do isolado mais eficiente.....	85
APÊNDICE D. Atividade das enzimas LiP, MnP e Lacase pelo basidiomiceto <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063 durante a etapa de seleção do isolado mais eficiente.....	86
APÊNDICE E. Coeficientes de regressão do DCCR para a degradação do BaP por <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062.....	87
ANEXO A. Espectro de massas do metabólito I representando o íon molecular de $m/z$ 218 e o principal íon fragmento de $m/z$ 189 (modo SIM).....	88
ANEXO B. Espectro de massas dos metabólitos II e III representando o íon molecular de $m/z$ 236 e pico base de $m/z$ 218 (modo SIM).....	89
ANEXO C. Espectro de massas do metabólito IV representando o íon molecular de $m/z$ 234 e os principais íons fragmentos de $m/z$ 205 e 176 (modo SIM).....	90
ANEXO D. Espectro de massas do metabólito V representando o íon molecular de $m/z$ 268 e os principais íons fragmentos de $m/z$ 239 e 119 (modo <i>Full Scan</i> )..	91

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Propriedades físico-químicas dos HPAs mais comumente estudados.....	6
<b>Tabela 2.</b> Identificação dos basidiomicetos derivados marinhos e informações sobre coleta, isolamento e número de acesso.....	19
<b>Tabela 3.</b> Ions monitorados na detecção dos metabólitos dos HPAs pireno e BaP.....	26
<b>Tabela 4.</b> Níveis das variáveis estudadas no delineamento de Plackett-Burman.....	28
<b>Tabela 5.</b> Níveis das variáveis estudadas no delineamento fatorial fracionado $2^{4-1}$ .....	29
<b>Tabela 6.</b> Valores codificados e reais das variáveis usadas no DCCR.....	29
<b>Tabela 7.</b> Recuperação dos HPAs pireno e BaP acrescidos ao micélio morto.....	34
<b>Tabela 8.</b> Identificação dos metabólitos da degradação de pireno pelo basidiomiceto <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062: tempo de retenção e características da espectrometria de massas.....	52
<b>Tabela 9.</b> Planejamento experimental do tipo Plackett-Burman para avaliação da influência de 8 fatores sobre o processo de degradação e crescimento do isolado <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062 após 7 dias de cultivo.....	61
<b>Tabela 10.</b> Níveis das variáveis e análise estatística do delineamento de Plackett-Burman sobre o processo de degradação do pireno.....	62
<b>Tabela 11.</b> Níveis das variáveis e análise estatística do delineamento de Plackett-Burman sobre o processo de degradação do BaP.....	63
<b>Tabela 12.</b> Planejamento fatorial fracionado $2^{4-1}$ para avaliação de 4 fatores sobre o processo de degradação e crescimento do isolado <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062 após 4 dias de cultivo.....	66

<b>Tabela 13.</b> Níveis das variáveis e análise estatística do delineamento fatorial fracionado $2^{4-1}$ sobre o processo de degradação do pireno.....	67
<b>Tabela 14.</b> Níveis das variáveis e análise estatística do delineamento fatorial fracionado $2^{4-1}$ sobre o processo de degradação do BaP.....	67
<b>Tabela 15.</b> Planejamento DCCR para avaliação de 2 fatores sobre o processo de degradação e crescimento do isolado <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062 após 48 h de cultivo.....	68
<b>Tabela 16.</b> ANOVA do modelo quadrático para a degradação de BaP após 48 h de cultivo.....	70
<b>Tabela 17.</b> Degradação observada e predita pelo modelo e erros absoluto e relativo para cada ensaio.....	72

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura dos HPAs mais comumente estudados.....	4
<b>Figura 2.</b> Relação entre metabolismo, ativação, detoxificação e toxicidade de um determinado composto químico (xenobiótico). Traduzido de Hodgson & Rose (2010).....	8
<b>Figura 3.</b> As duas principais vias de degradação de HPAs por fungos. Adaptado de Bamforth & Singleton (2005).....	11
<b>Figura 4.</b> Degradação dos HPAs pireno (A) e BaP (B) pelos três basidiomicetos estudados. Os valores são médias de triplicatas e as barras verticais demonstram o erro padrão.....	32
<b>Figura 5.</b> Atividade ligninolítica de <i>Tinctoporellus</i> sp. CBMAI 1061 ao longo de 7, 14 e 21 dias em diferentes meios de cultivo. Os valores são médias de triplicatas e as barras verticais demonstram o erro padrão.....	37
<b>Figura 6.</b> Atividade ligninolítica de <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062 ao longo de 7, 14 e 21 dias em diferentes meios de cultivo. Os valores são médias de triplicatas e as barras verticais demonstram o erro padrão.....	38
<b>Figura 7.</b> Atividade ligninolítica de <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063 ao longo de 7, 14 e 21 dias em diferentes meios de cultivo. Os valores são médias de triplicatas e as barras verticais demonstram o erro padrão.....	39
<b>Figura 8.</b> Crescimento micelial de <i>Tinctoporellus</i> sp. CBMAI 1061, <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062 e <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063 durante a formação da biomassa inicial. Os valores são médias de triplicatas e as barras verticais demonstram o erro padrão.....	42

<b>Figura 9.</b> Crescimento micelial de (A) <i>Tinctoporellus</i> sp. CBMAI 1061, (B) <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062 e (C) <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063 após 7, 14 e 21 dias em diferentes meios de cultivo. Os valores são médias de triplicatas e as barras verticais demonstram o erro padrão.....	43
<b>Figura 10.</b> Produção de LiP, MnP e Lacase pelos basidiomicetos (A) <i>Tinctoporellus</i> sp. CBMAI 1061, (B) <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062 e (C) <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063 durante a formação da biomassa inicial. Os valores são médias de triplicatas e as barras verticais demonstram o erro padrão.....	44
<b>Figura 11.</b> Degradação dos HPAs pireno e BaP por <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062 ao longo de 7 dias. Os valores são médias de triplicatas e as barras verticais demonstram o erro padrão.....	48
<b>Figura 12.</b> Massa micelial obtida em meio mineral sem fonte de carbono adicional, na presença de pireno e BaP e em meio MB após 7 dias de cultivo. Os valores são médias de triplicatas e as barras verticais demonstram o erro padrão. Letras diferentes apresentam diferenças significativas ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Tukey).....	50
<b>Figura 13.</b> Produção de enzimas ligninolíticas em meio mineral sem fonte de carbono adicional, na presença de pireno e BaP e em meio MB após 7 dias de cultivo. Os valores são médias de triplicatas, exceto o valor (*) em que apenas uma réplica foi considerada. As barras verticais demonstram o erro padrão. Letras diferentes apresentam diferenças significativas ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Tukey).....	51
<b>Figura 14.</b> Perfil cromatográfico do pireno restante e dos metabólitos resultantes de sua degradação por <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062 após 5 dias de cultivo (modo SIM). Os (*) indicam picos que não puderam ser identificados.....	53

<b>Figura 15.</b> Perfil cromatográfico dos metabólitos formados pela degradação do pireno por <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062 após 5 (A) e 15 (B) dias de cultivo (modo SIM). Os (*) indicam picos que não puderam ser identificados.....	53
<b>Figura 16.</b> Vias propostas para o metabolismo inicial de pireno por duas linhagens do basidiomiceto <i>Crinipelis stipitaria</i> . Adaptado de Lange <i>et al.</i> (1994).....	55
<b>Figura 17.</b> Superfície de resposta para a degradação do BaP pelo isolado <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062 em função das concentrações de glicose e peptona.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\epsilon$	coeficiente de extinção
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
$\mu$	micro
$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{L}$	microlitro
%	por cento
$\Delta A$	diferença entre a absorbância final e a inicial
<b>ABTS</b>	<i>2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)</i>
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of Variance</i>
<b>atm</b>	atmosfera
<b>BaP</b>	benzo[a]pireno
<b>CBMAI</b>	Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria
<b>CG-EM</b>	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
<b>cm</b>	centímetro
<b>CPQBA</b>	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas
<b>CYP</b>	Citocromo P450
<b>D1</b>	<i>domain 1</i>
<b>D2</b>	<i>domain 2</i>
<b>DCCR</b>	Delineamento Composto Central Rotacional
<b>DDT</b>	diclorodifeniltricloroetano
<b>g</b>	grama ou força da gravidade
<b>h</b>	hora
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peróxido de hidrogênio
<b>HPA</b>	hidrocarboneto policíclico aromático
<b>ITS</b>	<i>internal transcribed spacer</i>
<b>L</b>	litro
<b>LiP</b>	Lignina peroxidase

<b>M</b>	molar
<b>MA2</b>	ágar extrato de malte a 2%
<b>MB2</b>	caldo extrato de malte a 2%
<b>mg</b>	miligramas
<b>min</b>	minuto
<b>mL</b>	mililitros
<b>mM</b>	milimolar
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	íon manganês bivalente
<b>Mn<sup>3+</sup></b>	íon manganês trivalente
<b>MnP</b>	Manganês peroxidase
<b>m/z</b>	relação massa carga
<b>nm</b>	nanômetro
<b>PCB</b>	bifenil policlorinado
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>ppm</b>	partes por mil
<b>R</b>	quantidade de caldo enzimático
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>SIM</b>	<i>single ion monitoring</i>
<b>t</b>	tempo de reação
<b>TNT</b>	trinitrotolueno
<b>U</b>	<i>enzyme activity unit</i>
<b>V</b>	volume da reação

## RESUMO

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são poluentes ambientais oriundos de fontes naturais e antropogênicas, caracterizados por suas propriedades mutagênicas e carcinogênicas e persistência no ambiente. Fungos basidiomicetos de degradação branca têm sido extensivamente estudados devido à sua habilidade em degradar uma ampla variedade de compostos xenobióticos por meio do sistema ligninolítico, composto por enzimas de baixa especificidade ao substrato, como as Lacases, Manganês peroxidases (MnP) e Lignina peroxidases (LiP). Considerando que os estudos relacionados à degradação de poluentes por fungos marinhos ainda são escassos, o presente trabalho visou à avaliação da degradação dos HPAs pireno e BaP e da atividade ligninolítica de três basidiomicetos isolados de esponjas marinhas. Durante a etapa de seleção do fungo mais eficiente, os três basidiomicetos foram capazes de degradar os HPAs (0,02 e 0,04 mg mL<sup>-1</sup> de BaP e pireno, respectivamente) após 7, 14 e 21 dias de incubação, apresentando atividade ligninolítica, sobretudo de Lacase, que possui uma ampla aplicação tecnológica. O fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 degradou mais de 90% da quantidade inicial de ambos os HPAs após 7 dias de incubação. O crescimento dos basidiomicetos não foi influenciado pelos HPAs, com exceção do *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, que apresentou maior crescimento micelial em presença dos mesmos. A atividade ligninolítica não apresentou correlação com a degradação nem com o crescimento micelial, para todos os basidiomicetos estudados. Entretanto, os resultados sugerem que na presença dos HPAs pode ter havido indução da produção das enzimas Lacase e MnP. O fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 foi selecionado para as etapas posteriores devido a sua produção enzimática, crescimento em presença dos HPAs e altas porcentagens de degradação. Após 7 dias de cultivo em presença dos HPAs em meio mineral, este fungo apresentou atividade das enzimas LiP, MnP e Lacase, elevadas taxas de degradação (79,9% de pireno e 95,2% de BaP) e aumento de biomassa, o que sugere o consumo, ao menos em parte, dos HPAs e/ou de seus produtos de degradação como fontes de carbono e energia. Nos experimentos de análise qualitativa de metabólitos formados, foram identificados quatro metabólitos: 1-hidroxipireno, pireno dihidrodiol e dihidroxipireno, derivados da degradação do pireno, e hidroxibenzo[a]pireno, derivado da degradação do BaP. Tais compostos sugerem a degradação dos HPAs via sistema enzimático CYP e epóxido hidrolases. Elevadas porcentagens de degradação foram obtidas em meio com 35 ppm (3,5%) de salinidade e pH 9,0. Contudo, nestas condições, a atividade ligninolítica de Lacase, LiP e MnP foi ausente. O aumento da concentração dos HPAs não diminuiu as

taxas de degradação nem o crescimento micelial. De modo geral, as maiores porcentagens de degradação foram alcançadas sob elevada concentração de nutrientes. Através dos experimentos de degradação de BaP, foi possível propor um modelo matemático derivado da regressão múltipla do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para dois fatores. Os resultados do presente trabalho evidenciam o potencial do fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 para remediação de ambientes salinos e/ou alcalinos bem como para a aplicação biotecnológica de suas enzimas ligninolíticas.

**Palavras-chave:** Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, basidiomicetos, fungos derivados marinhos, enzimas ligninolíticas.

## ABSTRACT

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are environmental pollutants from natural and anthropogenic sources, characterized by their mutagenic and carcinogenic properties and persistence in the environment. White-rot basidiomycetes have been extensively studied due to the ability to degrade a wide variety of xenobiotic compounds using their ligninolytic system, constituted by enzymes with low substrate specificity, such as Laccases, Manganese peroxidase (MnP) and Lignin peroxidases (LiP). Since the studies related to the degradation of pollutants by marine-derived fungi are scarce, the present study aimed to evaluate the degradation of PAHs pyrene and BaP and the ligninolytic activity of three basidiomycetes isolated from marine sponges. During the selection of the most efficient fungus, the three basidiomycetes were able to degrade PAHs (0.02 to 0.04 mg mL<sup>-1</sup> BaP and pyrene, respectively) after 7, 14 and 21 days of incubation, presenting ligninolytic activity, especially Laccase, which has a wide technological application. The fungus *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 degraded more than 90% of the initial amount of both PAHs after 7 days of incubation. The growth of basidiomycetes was not affected by PAHs, except *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, which showed the highest mycelial growth in their presence. The ligninolytic activity was not correlated with the degradation nor with the mycelial growth, for all basidiomycetes studied. However, the results suggest that the presence of PAHs may have induced the Laccase and MnP production. *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 was selected for the subsequent assays due to its enzyme production, growth in the presence of PAHs and high degradation rates. After 7 days of growth in the presence of PAHs in mineral medium, this fungus showed activity of LiP, MnP and Laccase, high degradation rates (79.9% of pyrene and 95.2% of BaP) and increased biomass, suggesting consumption, at least in part, of PAHs and/or their degradation products as carbon and energy sources. In qualitative analysis of the metabolites produced, four metabolites were identified: 1-hydroxypyrene, pyrene dihydrodiol and dihydroxypyrene, derived from the pyrene degradation, and hydroxybenzo[a]pyrene derived from BaP degradation. Such compounds suggest PAHs degradation via CYP enzyme system and epoxide hydrolases. High degradation percentages were obtained in medium with 35 ppt salinity (3.5%) and pH 9.0. However, under these conditions, the activity of ligninolytic Laccase, LiP and MnP was absent. Increasing the concentration of PAHs has not decreased rates of degradation or mycelial growth. In general, the major degradation percentages were achieved at higher nutrient concentration. Through the degradation of BaP assays, was possible to propose a mathematical model derived from

multiple regression Central Composite Rotatable Design (CCRD) with two factors. The results of this study highlight the potential of fungus *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 for remediation of saline and/or alkali environments as well as for biotechnological application of their ligninolytic enzymes.

**Keywords:** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, basidiomycetes, marine-derived fungi, ligninolytic enzymes.



## 1. INTRODUÇÃO

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são formados pela fusão de dois ou mais anéis de benzeno. Estes componentes naturais do petróleo podem ser lançados no ambiente pela combustão incompleta de combustíveis fósseis, durante as atividades corriqueiras da indústria petrolífera, como o transporte de óleo, ou através de seu derramamento acidental no ambiente marinho, causando sérios danos ambientais, sociais e econômicos (HARITASH & KAUSHIK 2009). Também originados de fontes naturais, como erupções vulcânicas, os HPAs são caracterizados por suas propriedades teratogênicas, mutagênicas e carcinogênicas, e sua persistência no ambiente está relacionada principalmente à sua baixa solubilidade em água (BLUMER 1976, WILD & JONES 1995). A Agência de Proteção ao Meio Ambiente dos Estados Unidos (US EPA) assinalou 16 HPAs para serem monitorados em ecossistemas aquáticos e terrestres, dentre eles os HPAs pireno e benzo[a]pireno (BaP) (VERDIN *et al.* 2004).

A degradação por micro-organismos é um dos principais processos envolvidos na eliminação de HPAs em ambientes contaminados (WILSON & JONES 1993). Dentre os micro-organismos capazes de degradar ou biotransformar os HPAs, os fungos basidiomicetos de degradação branca (*white-rot fungi*) são os mais relevantes e têm demonstrado grande capacidade em degradar diversos poluentes ambientais (NOVOTNÝ *et al.* 2004, TORTELLA *et al.* 2005, SVOBODOVÁ *et al.* 2006, PATEL *et al.* 2009). Estes fungos produzem enzimas ligninolíticas extracelulares que apresentam baixa especificidade ao substrato e elevado potencial de redução. Tais fatores combinados à sua expressão em condição de limitação de nutrientes e capacidade de oxidação de substratos com baixa solubilidade em água fazem destas enzimas e de seus produtores ótimos candidatos aos processos de biorremediação de uma ampla variedade de xenobióticos recalcitrantes, incluindo os HPAs (REDDY 1995). O sistema ligninolítico é constituído por duas classes principais de enzimas: as fenol-oxidases cúpricas,

conhecidas como Lacases (EC 1.10.3.2), e as heme-peroxidases, que incluem a Lignina peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14) e a Manganês peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13). Diversos trabalhos reportados em literatura relacionam a biodegradação de HPAs à produção destas enzimas extracelulares (EIBES *et al.* 2006, CAJTHAML *et al.* 2008, LI *et al.* 2010), as quais são capazes de catalizar a oxidação dos HPAs produzindo metabólitos mais polares e solúveis (HARITASH & KAUSHIK 2009). Maiores polaridade e solubilidade em água são importantes fatores que contribuem para a biodisponibilidade desses metabólitos à mineralização por micro-organismos nativos presentes no ambiente contaminado.

A biodegradação de poluentes por fungos basidiomicetos terrestres ou por suas enzimas ligninolíticas (LiP, MnP e Lacases) tem sido amplamente descrita na literatura (NOVOTNÝ *et al.* 2004, CAJTHAML *et al.* 2008, ANASTASI *et al.* 2009, PATEL *et al.* 2009). Comparativamente, são escassos os estudos que relacionam fungos derivados marinhos a processos de degradação de poluentes ambientais. O uso de fungos derivados marinhos na biorremediação de ambientes salinos contaminados pode ser facilitado devido a sua tolerância às condições salinas.

Nesse contexto, o presente trabalho visa o estudo da biodegradação de HPAs por basidiomicetos derivados marinhos e de sua atividade ligninolítica associada. Os resultados obtidos poderão resultar na aplicação destes fungos em processos que requerem tolerância a concentrações elevadas de sais, como a do ambiente marinho e de efluentes industriais, bem como poderão abrir novas fronteiras e ampliar o conhecimento sobre os fungos recuperados de ambiente marinho.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. FUNGOS DERIVADOS MARINHOS

O ecossistema marinho representa um nicho pouco explorado no que diz respeito aos recursos genéticos microbianos que poderiam ser aplicados em processos biotecnológicos. Fungos marinhos formam um grupo ecológico, não taxonômico (HYDE *et al.* 2000), que inclui fungos obrigatoriamente marinhos, que crescem e esporulam exclusivamente na água do mar, e aqueles conhecidos como facultativos, da água doce ou do meio terrestre, mas que possuem adaptações fisiológicas para o crescimento e reprodução no ambiente marinho (KOHLMEYER & KOHLMEYER 1979). De acordo com Hyde *et al.* (2000) aproximadamente 800 espécies de fungos marinhos obrigatórios foram encontrados. Porém, como estes micro-organismos necessitam de um amplo estudo de sua morfologia, fisiologia e ecologia para sua classificação, um grande número de fungos isolados de amostras marinhas não foram comprovadamente classificados como micro-organismos marinhos obrigatórios ou facultativos. Assim, foi criada a expressão “fungos derivados de ambiente marinho” (*marine-derived fungi*) visando uma classificação mais geral para estes organismos (OSTERHAGE 2001).

No ambiente marinho, os fungos são organismos heterotróficos, com papel principal na decomposição do tecido vegetal e animal (celulose, lignina, queratina, entre outros) e na reciclagem de nutrientes (BUGNI & IRELAND 2004). Diversos fungos têm sido isolados do ambiente marinho e são descritos como produtores de novos metabólitos secundários e enzimas, não encontrados em fungos terrestres (RAGHUKUMAR 2008). Temperatura, pH, salinidade e concentração de íons sódio são fatores físicos com propriedades exclusivas no ambiente marinho e que afetam o metabolismo destes micro-organismos. A água do mar possui em média uma salinidade de 33-35 ppm (3,3-3,5%), enquanto que a água doce possui menos de 0,5 ppm de sais. O sódio, mesmo em baixas concentrações, é tóxico para a célula da maioria dos organismos terrestres e de água

doce. A presença de altos níveis de íons sódio confere características únicas às células dos fungos marinhos, os quais são capazes de reduzir sua toxicidade. Estes microorganismos também são capazes de crescer e produzir diversas enzimas extracelulares em pH 7,0-8,0, enquanto que fungos terrestres geralmente têm crescimento ótimo em pH 4,5-6,0 (RAGHUKUMAR *et al.* 2004, DAMARE *et al.* 2006).

## 2.2. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs)

Os HPAs são hidrocarbonetos, ou seja, são compostos que apresentam apenas átomos de carbono e hidrogênio em suas moléculas. Nas moléculas de HPAs, os átomos estão arranjados sob a estrutura de anéis aromáticos fundidos ou condensados. Estes anéis aromáticos (ou benzênicos) são estruturas de seis carbonos, arranjados em forma hexagonal, com ligações duplas alternadas entre si (Figura 1) (CERNIGLIA & SUTHERLAND 2010).

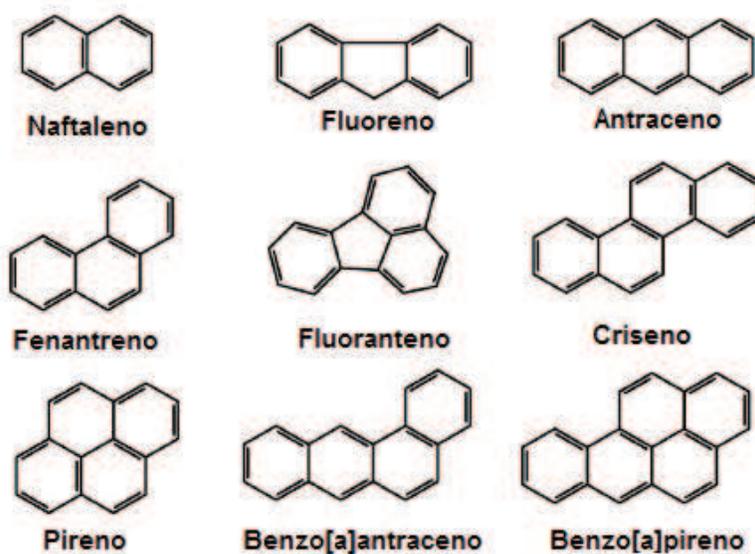


Figura 1. Estrutura dos HPAs mais comumente estudados.

Os HPAs são emitidos e formados principalmente durante a combustão incompleta (fonte pirogênica) de matéria orgânica a partir de diferentes fontes, tais como motores de combustão, aquecimento, atividades industriais e queimadas (HEEMKEN *et al.* 2000). A incineração de lixo municipal e a produção de coque, carvão negro, de alcatrão de hulha e asfalto foram identificados como importantes fontes antropogênicas de HPAs (COUNTWAY *et al.* 2003). Estes compostos possuem baixa solubilidade em água e elevados pontos de fusão e ebulição. As características físicas e químicas dos HPAs variam de acordo com a massa molecular (Tabela 1). A solubilidade em água e a pressão de vapor diminuem com o aumento da massa molecular, enquanto que os pontos de fusão e ebulição aumentam (ASGHER *et al.* 2008, ANASTASI *et al.* 2009). A elevada hidrofobicidade permite sua fácil adsorção à matéria orgânica de partículas sólidas, formando micropoluentes persistentes no meio ambiente. Ar, solo, água e vegetação atuam como reservatórios de HPAs na natureza (GAN *et al.* 2009). O ecossistema aquático é um dos maiores locais de acúmulo de HPAs (TAO *et al.* 2003) e tem recebido atenção devido à característica lipofílica deste ambiente e o efeito de bioconcentração (HAITZER *et al.* 1998). Os HPAs podem entrar no ambiente aquático por meio da deposição atmosférica, industrial e residencial, descarga de águas residuais, ou urbanas e de enxurradas, além da poluição causada pelos navios petroleiros (HEEMKEN *et al.* 2000).

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas dos HPAs mais comumente estudados.

<b>Composto</b>	<b>Massa molar (g mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Solubilidade em água (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ponto de Fusão (°C)</b>	<b>Ponto de Ebulição (°C)</b>	<b>Carcinogenicidade</b>
<b>Naftaleno</b>	128	3,17 x 10	81,0	217,9	3
<b>Fluoreno</b>	166	1,98	115,0-116,0	295,0	3
<b>Antraceno</b>	178	0,73 x 10 <sup>-1</sup>	216,4	342,0	3
<b>Fenantreno</b>	178	1,29	100,5	340,0	3
<b>Fluoranteno</b>	202	0,26	108,8	375,0	3
<b>Criseno</b>	228	0,02 x 10 <sup>-1</sup>	253,8	448,0	3
<b>Pireno</b>	202	0,13	150,4	393,0	3
<b>Benzo[a]antraceno</b>	228	0,14 x 10 <sup>-1</sup>	160,7	400,0	2A
<b>Benzo[a]pireno</b>	252	0,38 x 10 <sup>-2</sup>	178,1	496,0	2A

2A: provável carcinogênico para humanos – limitada evidência em humanos e suficiente em animais.

3: não é classificado como carcinogênico para humanos.

Fontes: Nikolaou *et al.* (2009), Chen *et al.* (2010).

Os HPAs e alguns de seus metabólitos constituem uma classe importante de poluentes ambientais de elevado potencial toxicológico, mutagênico e carcinogênico (HARITASH & KAUSHIK 2009). Em geral, compostos de baixa massa molecular (com dois a três anéis aromáticos) têm uma toxicidade aguda significativa e apresentam maior concentração na solução, estando mais biodisponíveis (ONUSKA 1989). Os HPAs de maior massa molecular (com quatro ou mais anéis aromáticos), por sua vez, podem apresentar efeito carcinogênico. Esses compostos geralmente estão em baixas concentrações na solução (menor biodisponibilidade), apresentando menor toxicidade aguda e efeitos mais significativos para os organismos através da exposição crônica (KENNISH 1992). Os diferentes compostos podem ter potencial carcinogênico diferenciado, pois há relação entre a estrutura molecular dos HPAs e o mecanismo de carcinogênese (JACOB 2008). As estruturas químicas dos HPAs mais comumente estudados estão apresentadas na Figura 1. Dentre eles, pireno e BaP são considerados HPAs de elevada massa molecular com um longo período de meia-vida no solo, variando

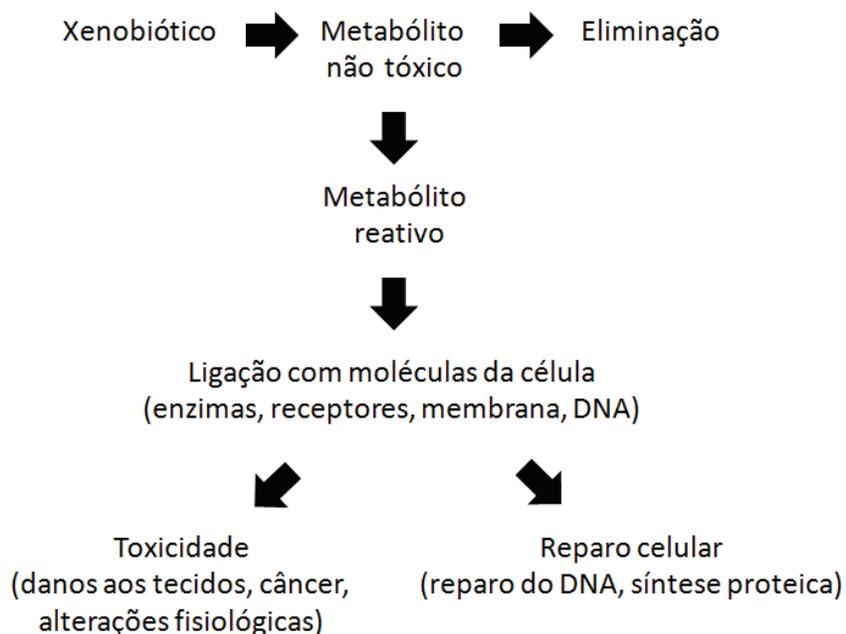
de 270 dias a 5,2 anos e 269 dias a 8,2 anos, respectivamente (JUHASZ & NAIDU 2000). Ambos tornaram-se foco de grande atenção devido a sua presença em todos os tipos de ambiente, resistência à biodegradação, potencial bioacumulativo e mutagenicidade.

Os riscos associados aos HPAs presentes no ambiente podem ser amenizados através da utilização de métodos convencionais que envolvem a remoção, alteração, ou o isolamento do poluente (HENNER *et al.* 1997). Outros métodos como extração por solvente, oxidação química, tecnologias térmicas, remediação eletrocinética também podem ser usados (GAN *et al.* 2009). Contudo, estas tecnologias são caras e em muitos casos resumem-se na transferência do poluente. Por outro lado, a biorremediação é uma ferramenta capaz de transformar os compostos poluentes a derivados menos tóxicos, economizando produtos químicos, energia e tempo. Embora os HPAs possam sofrer adsorção, volatilização, fotólise e/ou degradação química, a degradação microbiana é o processo de degradação principal (HARITASH & KAUSHIK 2009).

### **2.3. METABOLISMO DE HPAs**

Compostos xenobióticos que são relativamente inertes podem ser metabolizados a compostos intermediários altamente reativos, os quais podem interagir com constituintes celulares por numerosas vias, como a ligação covalente a macromoléculas, ou podem ser detoxificados e seus produtos excretados (HODGSON & ROSE 2010). A biotransformação dos químicos relativamente inertes a compostos altamente reativos é chamada de ativação metabólica ou bioativação e é frequentemente o evento inicial das toxicidades induzidas quimicamente (DECKER *et al.* 2009). Metabólitos reativos são capazes de ligar-se a proteínas e ácidos nucleicos devido ao seu caráter eletrofílico, sendo esta etapa essencial ao processo carcinogênico. O esquema geral do metabolismo de xenobióticos potencialmente tóxicos está disposto na Figura 2. Eles constituem radicais livres ou atuam como geradores de radicais que interagem com o oxigênio para

produzir espécies reativas de oxigênio capazes de causar dano a membranas, DNA e outras macromoléculas. Entretanto, metabólitos reativos podem ser detoxificados, por exemplo, pela interação com a glutatona (SHIMADA 2006).



**Figura 2.** Relação entre metabolismo, ativação, detoxificação e toxicidade de um determinado composto químico (xenobiótico). Traduzido de Hodgson & Rose (2010).

Embora um composto químico possa ser metabolizado por diversas rotas, a via de sua ativação é, frequentemente, a rota mais curta, sendo as demais responsáveis pela detoxificação. A ativação pode tornar-se a rota dominante em certas situações, levando a toxicidade (HODGSON & ROSE 2010). A maioria das enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos pode formar metabólitos reativos. Os sistemas enzimáticos mais frequentemente envolvidos na ativação de xenobióticos são aqueles catalizados por reações de oxidação. As mono-oxigenases do sistema Citocromo P450 (CYP) são, sem dúvida, as enzimas mais importantes envolvidas na oxidação de xenobióticos (SHIMADA 2006, URLACHER & EIBEN 2006). Isto pode ser explicado pela abundância das enzimas

CYP, suas numerosas isoformas e pela indução de sua atividade por xenobióticos (GUENGERICH & SHIMADA 1991).

A ativação metabólica de químicos carcinogênicos pelo sistema CYP está bem documentada (CONNEY 1982, GUENGERICH & SHIMADA 1991, SHIMADA & FUJII-KURIYAMA 2004). O metabolismo do BaP tem sido extensivamente estudado em tecidos humanos e animais e em geral tem servido como um modelo para o metabolismo de outros HPAs. Pelo menos 15 metabólitos de Fase I, ou seja, formados inicialmente, foram documentados, sendo a maioria resultante do sistema CYP e da atividade de epóxido hidrolases (HODGSON & ROSE 2010). Muitos deles são posteriormente metabolizados por enzimas da Fase II, como as glutatona transferases e quinona redutases, a metabólitos mais polares e passíveis de detoxificação (TALALAY 2000, SHIMADA 2006).

#### **2.4. BIODEGRADAÇÃO DE HPAs**

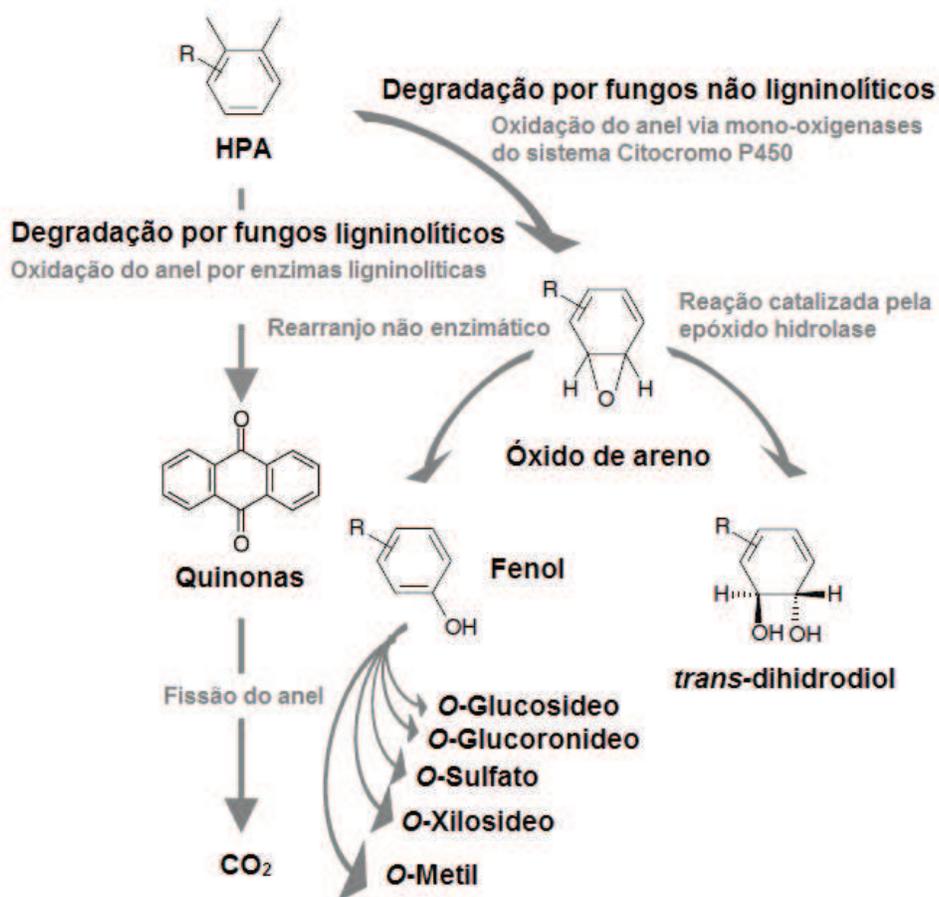
Tanto bactérias quanto fungos têm sido estudados por sua habilidade de degradação de xenobióticos, inclusive HPAs. A grande diferença no nível de conhecimento sobre o metabolismo de HPAs entre bactérias e fungos pode ser explicada pelo rápido crescimento bacteriano em meio líquido, favorecendo sua seleção e isolamento (CERNIGLIA *et al.* 1992). A degradação biológica de HPAs pode ser resultado de três diferentes processos: (i) biodegradação com assimilação do composto, que resulta em carbono e energia ao organismo e conduz à mineralização do HPA ou parte dele; (ii) detoxificação intracelular, que gera metabólitos mais solúveis em água como um pré-requisito para a excreção; (iii) co-metabolismo, que leva à degradação do HPA sem geração de energia e carbono proveniente deste composto para o metabolismo celular. Diferente de bactérias, a maioria dos fungos descritos na literatura não são capazes de utilizar HPAs como única fonte de carbono e energia (JOHNSEN *et al.* 2005, PENG *et al.* 2008).

O principal mecanismo de degradação de HPAs usado por bactérias aeróbicas é a oxidação inicial do anel aromático pela ação das enzimas dioxigenases formando *cis*-dihidrodióis. Algumas bactérias são também capazes de oxidar os HPAs pelo sistema CYP (BAMFORTH & SINGLETON 2005). No caso dos fungos não ligninolíticos, o primeiro passo no metabolismo de HPAs é a oxidação do anel aromático catalizada pela enzima mono-oxigenase do sistema CYP para produção de um óxido de areno. Esta rota é similar ao metabolismo de HPAs por mamíferos (CERNIGLIA 1997, BAMFORTH & SINGLETON 2005). Em comparação à oxidação do anel pela enzima dioxigenase formando *cis*-dihidrodióis, as mono-oxigenases incorporam somente um átomo de oxigênio para formar um óxido de areno. Este intermediário é geralmente instável em solução aquosa e pode sofrer rearranjo não enzimático dando origem a fenóis ou hidratação via epóxido hidrolase formando *trans*-dihidrodióis (SHIMADA *et al.* 1996). Estudos sobre os efeitos carcinogênicos dos metabólitos derivados do BaP demonstraram que 7,8-óxido e 7,8-dihidrodiol são compostos intermediários, enquanto que o 7,8-diol-9,10-epóxido é um forte mutagênico e carcinogênico final, isto é, capaz de ligar-se a macromoléculas, como o DNA. Outros reativos intermediários do BaP incluem quinonas e alguns produtos de conjugação (JUHASZ & NAIDU 2000).

Em adição, os fenóis podem conduzir à formação de compostos como glicuronídeos, sulfatos e glicosídeos por reações de conjugação. O isolamento desses metabólitos de Fase II e a detecção da atividade da enzima transferase correspondente são um indicativo de vias metabólicas de detoxificação, uma vez que os produtos de conjugação são considerados menos tóxicos do que o HPA de origem (CERNIGLIA 1997).

Devido à complexa estrutura do polímero de lignina, formado pela distribuição randômica de vários componentes estruturais, as enzimas ligninolíticas atuam de forma inespecífica na degradação deste polímero e, desta forma, podem também degradar uma

ampla gama de outras substâncias químicas persistentes, incluindo HPAs (POINTING 2001). Na presença de enzimas ligninolíticas, fungos de degradação branca podem oxidar HPAs gerando radicais livres hidroxila pela doação de um elétron, que oxida o anel aromático (BAMFORTH & SINGLETON 2005). Esta reação gera quinonas e ácidos em vez de dihidrodiois (Figura 3). No caso destes fungos, geralmente quinonas são acumuladas como produtos da degradação de HPAs. Sabe-se que as enzimas ligninolíticas, como as Lacases, podem somente clivar o anel aromático, sem induzir a mineralização do HPA (CERNIGLIA 1997).



**Figura 3.** As duas principais vias de degradação de HPAs por fungos. Adaptado de Bamforth & Singleton (2005).

Há um grande interesse no uso de fungos ligninolíticos para degradação de HPAs devido à baixa especificidade ao substrato de suas enzimas, o que lhe permite degradar uma ampla variedade de xenobióticos recalcitrantes. Além disso, as enzimas envolvidas são extracelulares e capazes de se difundirem no ambiente, possibilitando a oxidação de HPAs de baixa biodisponibilidade (POITING 2001). Estudos têm mostrado que a degradação de HPAs por fungos ligninolíticos pode ser resultado da atuação conjunta das enzimas ligninolíticas, mono-oxigenases do sistema CYP e epóxido hidrolases (Figura 3) (CAJTHAML *et al.* 2008, WANG *et al.* 2009, SYED *et al.* 2010, ACEVEDO *et al.* 2011).

Embora a degradação microbiana de HPAs tenha sido estudada extensivamente, os princípios bioquímicos subjacentes à sua degradação são investigados em menor grau. Para a biorremediação ser considerada uma tecnologia viável para a descontaminação de áreas poluídas, uma maior compreensão acerca dos micro-organismos envolvidos, processos enzimáticos e vias metabólicas é necessária (CERNIGLIA 1992). O objetivo final da biorremediação é reduzir a toxicidade potencial dos contaminantes ambientais, através de sua degradação a componentes inofensivos, como o dióxido de carbono e água (WILSON & JONES 1993).

## **2.5. ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS**

Entre o grupo dos fungos, os degradadores da madeira, conhecidos como ligninolíticos, são os mais estudados na biodegradação de poluentes ambientais, tais como os HPAs e corantes têxteis. Trata-se de fungos taxonomicamente diversos, sendo a maioria deles pertencente ao filo Basidiomycota.

As principais enzimas ligninolíticas produzidas por fungos de degradação branca envolvidos na degradação da lignina e de compostos xenobióticos são LiP, MnP e Lacase (POITING 2001, WESENBERG *et al.* 2003). LiPs e MnPs são heme peroxidases primeiramente descobertas no meio extracelular de *Phanerochaete chrysosporium*

cultivado sob condições de limitação de nitrogênio. Hoje, sabe-se que estas enzimas são comumente encontradas em fungos que degradam a lignina. LiPs catalizam diversas reações de oxidação, todas elas dependentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O princípio de funcionamento das MnPs é oxidar Mn<sup>2+</sup> a Mn<sup>3+</sup> usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante. Ambas possuem o grupo prostético heme (Fe-protoporfirina IX) e podem apresentar diversas isoenzimas. Lacases são glicoproteínas monoméricas, diméricas ou tetraméricas com quatro átomos de cobre por monômero, localizados no sítio catalítico. Estas oxidases multi-cobre estão presentes em bactérias, fungos, plantas e insetos. Diferentemente das peroxidases, as Lacases requerem uma molécula de oxigênio como co-substrato. As Lacases possuem uma ampla variedade de substratos, característica atualmente explorada em aplicações industriais e processos de biorremediação (ASGHER *et al.* 2008, LUNDELL *et al.* 2010).

Alguns fungos derivados de ambiente marinho foram citados na literatura como produtores de enzimas ligninolíticas. D'Souza *et al.* (2006) reportaram a produção de uma quantidade elevada de Lacase por um fungo basidiomiceto marinho não identificado. No estudo de Raghukumar *et al.* (1994) foram alcançados resultados positivos para a produção de enzimas ligninolíticas (LiP, MnP e Lacase) e descoloração de efluentes (pH 4,5 e pH 8,5) pelo fungo de degradação branca *Flavodon flavus* isolado dos detritos da alga *Thalassia hemprichii*. Em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa da Dra. Lara Sette atividades significativas de Lacase, LiP e principalmente MnP foram produzidas em 12,5% e 23% de salinidade por fungos derivados de cnidários marinhos identificados como *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849 (anamórfico), *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857 (Ascomycota) e *Mucor racemosus* CBMAI 847 (Zygomycota) (BONUGLI-SANTOS *et al.* 2010a). Os resultados obtidos nos estudos acima citados salientam o potencial uso dos fungos derivados de ambiente marinho para aplicações industriais e na biorremediação de áreas contaminadas por poluentes ambientais. Em adição, de acordo com Raghukumar (2002), uma vasta gama de efluentes industriais

possuem pH alcalino e grandes quantidades de íons sódio, e portanto, os fungos derivados de amostras marinhas parecem ideais para o tratamento destes efluentes, pois já estão adaptados a estas condições.

## **2.6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

O sistema ligninolítico e a degradação de compostos poluentes ambientais podem ser afetados por diferentes fatores abióticos e bióticos que incluem: temperatura, pH, aeração, nutrientes, pressão, exposição prévia ao composto, propriedades físico-químicas, biodisponibilidade e toxicidade do poluente (BAMFORTH & SINGLETON 2005, D'SOUZA *et al.* 2006, DING *et al.* 2008, ALAM *et al.* 2009). Antes que um micro-organismo possa ser usado em processos de biorremediação de ambientes contaminados, fatores ambientais e nutricionais fundamentais que afetam estes processos devem ser primeiramente estudados no laboratório.

A triagem e a análise de variáveis que interferem significativamente sobre a atividade ligninolítica e biodegradação de HPAs podem ser feitas variando-se um fator por vez ou através de métodos estatísticos. O primeiro método é o procedimento experimental mais difundido e usual, “*one-at-a-time*”, que envolve o estudo de uma variável por vez, no qual é avaliada uma das variáveis estudadas a diferentes condições e as demais são fixadas. Este método negligencia possíveis interações entre os fatores por não explorar completamente o espaço experimental. Tais limitações podem ser eliminadas empregando-se planejamentos experimentais estatísticos que usam um número menor de medidas e explora todo o espaço experimental. A mais bem sucedida técnica usada para análise e otimização das variáveis de um processo é conhecida por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), que possibilita a avaliação dos efeitos de cada variável individualmente e de suas interações sobre uma dada resposta (RODRIGUES & IEMMA 2009). O delineamento experimental como um todo permite a seleção prévia de

variáveis significativas a um processo quando são vários os fatores estudados sobre a resposta. Ao final a metodologia da superfície de resposta pode ser empregada para obtenção de um modelo teórico e dedução das condições otimizadas (SU *et al.* 2011).

Abdelhay *et al.* (2008) avaliaram o impacto de diferentes fatores sobre o processo de degradação do HPA fenantreno por uma linhagem de *Mycobacterium* através do delineamento experimental. A aplicação da metodologia da superfície de resposta possibilitou a degradação de 90% do HPA em 18 h e a dedução de um modelo empírico. A mesma metodologia foi aplicada com sucesso na otimização da degradação do pireno por um fungo do gênero *Penicillium* (LAUNEN *et al.* 1999).

Embora o planejamento estatístico de experimentos implique grande economia de tempo e custos devido à diminuição considerável do número de ensaios necessários ao estudo de um processo influenciado por diversas variáveis, como o processo de biodegradação, ainda são poucos os trabalhos reportados que utilizam esta metodologia (RODRIGUES & IEMMA 2009).



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho teve como objetivo principal a avaliação de três fungos basidiomicetos derivados marinhos quanto à capacidade de degradação *in vitro* dos HPAs pireno e BaP e a produção de enzimas ligninolíticas.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Avaliação da degradação de HPAs por três basidiomicetos derivados marinhos, visando à seleção do fungo mais eficiente.

1.1. Análise quantitativa da degradação dos HPAs pireno e BaP.

1.2. Avaliação do crescimento micelial.

1.3. Determinação da atividade das enzimas ligninolíticas (LiP, MnP e Lacase).

2. Utilização do fungo selecionado em experimentos de:

2.1. Degradação *in vitro* de pireno e BaP ao longo de 7 dias.

2.2. Avaliação da influência de diferentes fatores sobre a degradação de pireno e BaP, o crescimento micelial e a atividade das enzimas ligninolíticas.

2.3. Identificação dos metabólitos formados durante a degradação de pireno e BaP.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MICRO-ORGANISMOS

Para a condução do presente trabalho foram utilizados três fungos basidiomicetos: *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061, *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 e *Peniophora* sp. CBMAI 1063, os quais foram isolados das esponjas marinhas *Amphimedon viridis* e *Dragmacidon reticulatum*, de acordo com Menezes *et al.* (2010), e identificados taxonomicamente pela equipe da Divisão de Recursos Microbianos (DRM) do CPQBA/UNICAMP (Tabela 2), no âmbito do Projeto Temático FAPESP 05/60175-2, “Descoberta e desenvolvimento de potenciais agentes quimioterapêuticos a partir de invertebrados marinhos e de micro-organismos associados”, coordenado pelo pesquisador Dr. Roberto Berlinck, IQ-USP/SC. Os isolados estão depositados na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) do CPQBA/UNICAMP e foram previamente selecionados devido à alta capacidade de descoloração do corante Remazol Brillant Blue R (RBBR) em meio sólido e a eficiente produção de enzimas ligninolíticas, incluindo meios acrescidos de sal e formulados com água do mar artificial (BONUGLI-SANTOS 2010).

**Tabela 2.** Identificação dos basidiomicetos derivados marinhos e informações sobre coleta, isolamento e número de acesso.

CBMAI	GenBank	Fonte	Espécies relacionadas e % de similaridade		Identificação molecular
			ITS	D1/D2	
1061	GU388303	<i>D. reticulatum</i>	<i>Tinctoporellus epimiltinus</i> CBS 38961 e 99%	<i>Perennioporia ochroleuca</i> CBS 38736 e 96,5%	<i>Tinctoporellus</i> sp.
1062	GU388304	<i>A. viridis</i>	<i>Hemimycena</i> sp.* SP 376044 e 100%	<i>Marasmiellus</i> sp. DMC 027 e 99,3%	<i>Marasmiellus</i> sp.
1063	GU388305	<i>A. viridis</i>	<i>Peniophora</i> sp. XL A26 e 97%	<i>Peniophora incarnata</i> NH 10271 e 96,98%	<i>Peniophora</i> sp.

\*O gênero *Hemimycena* é considerado sinônimo de *Marasmiellus*.

Fonte: Bonugli-Santos *et al.* (2012).

## **4.2. SELEÇÃO DO ISOLADO MAIS EFICIENTE**

### **4.2.1. CONDIÇÕES DE CULTIVO**

Os isolados foram cultivados em meio ágar extrato de malte 2% (MA2, 20 g L<sup>-1</sup> de extrato de malte e 15 g L<sup>-1</sup> de ágar) por 10 dias a 28 °C. Após a incubação, três cilindros de 0,5 cm de diâmetro da margem das colônias foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de caldo extrato de malte 2% (MB2). Os frascos foram incubados por 72 h a 28 °C e 120 rpm para formação da biomassa inicial. Em seguida, os HPAs pireno e BaP dissolvidos em dimetilsulfóxido foram adicionados separadamente na concentração final de 0,04 e 0,02 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente (DA SILVA *et al.* 2003, PASSARINI *et al.* 2011). Os frascos foram incubados por mais 7, 14 e 21 dias nas mesmas condições. Os experimentos para as avaliações da degradação dos HPAs e das atividades ligninolíticas em meio com e sem HPA foram conduzidos separadamente e em triplicata. Com o intuito de confirmar a transformação do substrato reagente somente na presença de atividade enzimática, controles sem inóculo, com e sem HPA, também foram estabelecidos.

### **4.2.2. ANÁLISE QUANTITATIVA DA DEGRADAÇÃO DOS HPAs POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)**

As extrações e análises cromatográficas do presente trabalho foram conduzidas na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA sob a orientação da Dra. Marili V. N. Rodrigues e auxílio técnico de Sinésio Boaventura Júnior. Para a quantificação do pireno e BaP foi utilizado o método de padronização interna utilizando como padrão interno o dibutilftalato. Na etapa de extração, cada Erlenmeyer da amostra contendo o fungo em meio fermentativo MB2 foi adicionado de 50 mL de acetato de etila e submetido à desintegração celular no dispersor (Polytron) a 14000 rpm durante 1 min. Em

seguida a haste do dispersor foi lavada com acetato de etila e o material filtrado em algodão embebido com acetato de etila diretamente acoplado no funil de separação de 250 mL. As fases contidas no funil de separação foram submetidas à agitação vigorosa durante 1 min e a fase orgânica filtrada em algodão com sulfato de sódio anidro saturado com acetato de etila diretamente no balão de fundo redondo de 250 mL. A fase aquosa recolhida separadamente foi re-extraída com mais 50 mL de acetato de etila durante 1 min. As fases orgânicas foram juntadas no balão de 250 mL e evaporadas no rotaevaporador com banho entre 40-45°C até volume reduzido (cerca de 2 mL). O conteúdo do balão foi transferido analiticamente para balão volumétrico de 10 mL contendo 1mL da solução de padrão interno (dibutilftalato 578  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em acetato de etila) e submetido à análise por CG-EM.(PASSARINI *et al.* 2011). A curva analítica para quantificação dos HPAs foi construída com 13 pontos de concentração na faixa entre 0,50 e 220  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As análises cromatográficas foram realizadas num cromatógrafo a gás Agilent 6890N com detector de massas 5975 e injetor automático 7683B. A separação cromatográfica foi realizada em coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25  $\mu\text{m}$ ). As injeções foram realizadas automaticamente (1  $\mu\text{L}$ ) no modo “splitless” com a válvula aberta após 0,6 min e com o injetor operando a 290 °C. A vazão do gás de arraste (hélio) foi de 1 mL/min. A programação de temperatura da coluna foi de 180 °C para 240 °C, subindo 8 °C por minuto e de 240 °C para 310 °C, subindo 25 °C por minuto e mantendo-se nesta temperatura durante 5 min.

#### **4.2.3. AVALIAÇÃO DA ADSORÇÃO DOS HPAs AO MICÉLIO**

Após o crescimento da biomassa inicial, conforme descrito no item 4.2.1., os frascos foram esterilizados em autoclave por 30 min a 121 °C e pressão de 1 atm. Em seguida, os HPAs pireno e BaP, dissolvidos em dimetilsulfóxido, foram adicionados separadamente aos frascos (concentração final de 0,04 e 0,02  $\text{mg mL}^{-1}$ , respectivamente)

e incubados por mais 48 h nas mesmas condições. A análise quantitativa da adsorção dos HPAs por CG-EM foi realizada de acordo com o item 4.2.2. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 4.2.4. PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

As enzimas ligninolíticas LiP, MnP e Lacase foram avaliadas durante as primeiras 72 h de cultivo (antes da adição dos HPAs) e após mais 7, 14 e 21 dias em presença e ausência dos HPAs. Para a obtenção dos extratos enzimáticos, o meio líquido de cultivo foi centrifugado a 15.026 xg (10.000 rpm, Hettich Zentrifugem, Rotina 380R) por 30 min a 4 °C, após cada período de incubação. Todas as atividades enzimáticas foram medidas através de espectrofotômetro (Shimadzu UV1240, Kyoto, Japão) e determinadas a partir do cálculo da diferença de absorbância, conforme descrito a seguir.

Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de substrato por minuto. A atividade enzimática foi expressa em U L<sup>-1</sup> do caldo enzimático e os cálculos realizados a partir da Equação 1, derivada da Lei de Beer-Lambert.

$$U L^{-1} = \Delta A \times V \times 10^6 / \epsilon \times R \times t \quad \text{(Equação 1),}$$

- ΔA** diferença entre a absorbância final e a inicial
- V** volume da reação (0,001 L em todos os casos)
- 10<sup>6</sup>** converte os mols do ε para µmols
- ε** coeficiente de extinção (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)
- R** quantidade de caldo enzimático (L)
- t** tempo de reação (min)

## **LiP**

A atividade da LiP foi avaliada a partir da leitura da absorbância durante a formação do aldeído veratrílico produzido na oxidação do álcool veratrílico usado como substrato (TIEN & KIRK 1984). A mistura continha 0,2 mL de álcool veratrílico (2,0 mM) em tampão tartarato de sódio (0,4 M; pH 4,5), 0,2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,0 mM) e 0,6 mL do extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à temperatura ambiente e a formação do aldeído veratrílico determinado pela leitura da absorbância a 310 nm ( $\epsilon = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) após 10 min.

## **MnP**

A atividade de MnP foi quantificada através da leitura da absorbância durante a oxidação do vermelho de fenol a 610 nm ( $\epsilon = 4.460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A mistura da reação foi composta por 0,5 mL do extrato enzimático, 0,1 mL do substrato vermelho de fenol (0,01%), 0,1 mL de lactato de sódio (0,25 M), 0,2 mL de albumina bovina (0,5%), 50  $\mu\text{L}$  MnSO<sub>4</sub> (2,0 mM) e ativada com 50  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,0 mM) em tampão succinato de sódio (0,2 M; pH 4,5). A mistura foi incubada à temperatura ambiente e a reação interrompida após 5 min pela adição de 40  $\mu\text{L}$  de NaOH (2,0 M) (KUWAHARA *et al.* 1984).

## **Lacase**

A atividade da Lacase foi detectada à temperatura ambiente pela leitura da absorbância durante a oxidação de três diferentes substratos: ABTS, guaiacol e siringaldazina. O primeiro método consistiu na oxidação do ABTS a 420 nm ( $\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) por 5 min segundo Li *et al.* (2008). A mistura da reação continha 0,3 mL de tampão acetato de sódio (0,1 M; pH 5,0), 0,6 mL de extrato enzimático e 0,1 mL de solução de ABTS (0,5 mM). O segundo foi baseado na oxidação do guaiacol a 450 nm ( $\epsilon = 12.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) por 10 min. A mistura da reação continha 0,6 mL de tampão acetato

de sódio (0,1 M; pH 5,0), 0,2 mL de extrato enzimático e 0,2 mL de guaiacol (2,0 mM) (LI *et al.* 2008 modificado). O terceiro consistiu na oxidação da siringaldazina a 525 nm ( $\epsilon = 65.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) por 5 min. A mistura da reação continha 0,2 mL de tampão citrato-fosfato (0,05 M; pH 5,0), 0,1 mL de água deionizada, 0,6 mL de caldo enzimático e 0,1 mL de siringaldazina (1 mM) em etanol 100% (BONUGLI-SANTOS *et al.* 2010b modificado).

#### **4.2.5. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL**

O crescimento dos isolados foi quantificado em termos de peso seco micelial (mg) por mL de meio de cultura. Para tanto, a massa micelial foi coletada por filtração através de um disco de papel de filtro de 7 cm de diâmetro. O filtrado foi seco em estufa a 90 °C por 16 h. A massa micelial foi calculada pela diferença entre o peso seco total e o peso seco do papel de filtro.

### **4.3. ISOLADO SELECIONADO: *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062**

#### **4.3.1. DEGRADAÇÃO DOS HPAs AO LONGO DE 7 DIAS**

O isolado *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 foi incubado em presença de HPA por 1, 3, 5 e 7 dias sob as condições de cultivo detalhadas no item 4.2.1. A extração das amostras e a análise quantitativa da degradação dos HPAs por CG-EM foram realizadas de acordo com o item 4.2.2.

#### **4.3.2. CRESCIMENTO, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E DEGRADAÇÃO DOS HPAs EM MEIO MINERAL**

Após 72h de crescimento em meio MB2 (item 4.2.1.), a biomassa inicial do fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 foi filtrada e lavada duas vezes com 50 mL de água mili-Q estéril. Em seguida, foi transferida para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de

meio mineral (I) puro, (II) acrescido de pireno ou (III) acrescido de BaP como única fonte de carbono (concentração final de 0,04 e 0,02 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente). O meio mineral foi constituído por (em g L<sup>-1</sup> de água destilada): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,5), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,1), tartarato de amônio (0,2) e solução de elementos-traço (10 ml). A solução de elementos-traço continha (mg L<sup>-1</sup>): FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (12), MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (3), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (3), CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1), (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O (1) (HADIBARATA 2009). Em adição, a biomassa inicial foi também transferida para (IV) um novo meio MB2 sem HPA, visando comparação do crescimento fúngico e da produção das enzimas ligninolíticas nas diferentes fontes de carbono. Após 7 dias de cultivo a 28 °C e 120 rpm, os ensaios foram submetidos aos mesmos procedimentos já descritos de avaliação da degradação dos HPAs, atividade enzimática, crescimento (itens 4.2.2., 4.2.4. e 4.2.5., respectivamente), com exceção do protocolo para avaliação da atividade de MnP. Sua atividade foi determinada pelo método modificado de Wariishi *et al.* (1992) com a adição de 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mM) em 0,8 mL de tampão malonato de sódio (60 mM; pH 4,5), 50 µL de MnSO<sub>4</sub> (10 mM), e 0,1 mL de extrato enzimático. A formação do complexo Mn<sup>+3</sup>-malonato foi acompanhada pela leitura da absorbância a 270 nm ( $\epsilon = 11590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) após 5 min.

#### 4.3.3. IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS POR CG-EM

Para detecção dos metabólitos formados durante a degradação dos HPAs, o basidiomiceto *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 foi incubado em meio líquido durante 5 e 15 dias em presença de pireno e BaP, sob as mesmas condições de cultivo do item 4.2.1. Os 50 mL de meio de cultura contendo o micélio crescido foram extraídos em homogeneizador Ultra-Turrax com 60 mL de diclorometano como agente extrator. Após duas extrações, as fases orgânicas foram agrupadas e secas em rotaevaporador a vácuo em banho-maria de 30 °C. Para cada tempo de cultivo foram feitas 5 réplicas, agrupadas afim de se obter maior concentração de produtos formados. O resíduo final foi, então,

dissolvido em 2 mL de acetato de etila e 1 µL foi injetado no sistema CG-EM. Os componentes das amostras foram separados numa coluna capilar HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) na seguinte programação de temperatura: de 60 °C para 280 °C, subindo 5 °C por minuto e mantendo-se a 280 °C por 26 minutos, e de 280 °C para 310 °C, subindo 5 °C por minuto e mantendo-se a 310 °C por 5 minutos. A temperatura do injetor foi de 250 °C (injeção *splitless*) e a temperatura da interface foi de 300 °C. As amostras foram analisadas no modo varredura completa (*Full Scan*) no intervalo de 40 a 600 *m/z*. Os picos foram identificados por comparação do espectro de massas com os dados disponíveis na biblioteca do programa computacional NIST MS SEARCH versão 2.0 e independentemente pela interpretação dos padrões de fragmentação. As amostras também foram analisadas no modo monitoramento seletivo de íons (SIM). Os metabólitos foram identificados através de um íon de identificação e pelo menos um íon adicional de confirmação por composto, conforme espectros de massas descritos na literatura (Tabela 3). Técnicas de separação e derivatização dos compostos não foram utilizadas. Os experimentos foram analisados juntamente com um controle sem HPA.

**Tabela 3.** Ions monitorados na detecção dos metabólitos dos HPAs pireno e BaP.

Composto	Íons monitorados ( <i>m/z</i> )	
	Identificação	Confirmação
<b>Hidroxipireno</b>	218	189, 94
<b>Dihidroxipireno</b>	234	205, 176
<b>Pireno quinona</b>	232	204, 176, 88
<b>Pireno dihidrodiol</b>	236	218, 189, 176, 94
<b>Pirenilsulfato</b>	297	217
<b>Benzo[a]pireno quinona</b>	282	254, 226, 113
<b>Hidroxibenzo[a]pireno</b>	268	239, 119
<b>Benzo[a]pireno dihidrodiol</b>	286	268, 239, 78

Fontes: Lambert *et al.* (1994), Lange *et al.* (1994), Caportoti *et al.* (2004), Cañas *et al.* (2007), Hadibarata (2009), NIST MS SEARCH 2.0.

#### 4.3.4. INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SOBRE A DEGRADAÇÃO

A fim de se investigar o efeito das condições de cultivo sobre o processo degradativo dos HPAs e de se obter as condições necessárias a uma eficiente degradação, uma sequência de delineamentos experimentais foi estabelecido (RODRIGUES & IEMMA 2009). Inicialmente foi realizado um planejamento Plackett-Burman para avaliação das variáveis temperatura, pH, salinidade e concentrações iniciais de extrato de malte, glicose, peptona, extrato de levedura e HPA (Tabela 4). A água do mar artificial foi preparada segundo Kester *et al.* (1967) e continha (em g L<sup>-1</sup> de água destilada): NaCl (23,93), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4), KCl (0,68), NaHCO<sub>3</sub> (0,19), KBr (0,098), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0,026), NaF (0,003), MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (10,83), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (1,51) e SrCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0,02). Todas as diferentes variáveis foram preparadas em dois níveis, designados como -1 para o inferior e +1 para o superior (Tabela 4). Três ensaios no ponto central foram acrescentados à matriz para a determinação do erro padrão durante a análise dos resultados. Com um total de 15 ensaios, o delineamento permitiu a avaliação inicial do efeito das 8 variáveis sobre a degradação dos HPAs bem como sobre o crescimento do isolado e atividade ligninolítica após 7 dias de incubação. A biomassa inicial de cada ensaio foi cultivada a 120 rpm sem a presença de pireno ou BaP, adicionados separadamente em solução de dimetilsulfóxido somente após 72 h de crescimento, como descrito no item 4.2.1.

**Tabela 4.** Níveis das variáveis estudadas no delineamento de Plackett-Burman.

Variável	Nível inferior	Ponto central	Nível superior
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	22	25	28
pH	7	8	9
Salinidade (ppm)	21	28	35
Glicose (g L <sup>-1</sup> )	5	10	15
Extrato de Malte (g L <sup>-1</sup> )	5	10	15
Peptona (g L <sup>-1</sup> )	0	1	2
Extrato de Levedura (g L <sup>-1</sup> )	0	1	2
Pireno (mg mL <sup>-1</sup> )	0,04	0,06	0,08
BaP (mg mL <sup>-1</sup> )	0,02	0,04	0,06

A quantificação da degradação e do crescimento micelial foi realizada conforme descrito nos itens 4.2.2. e 4.2.5., respectivamente. As atividades ligninolíticas das enzimas Lacase, LiP e MnP foram avaliadas pela oxidação da siringaldazina e do álcool veratrílico e pela formação do complexo Mn<sup>3+</sup>-malonato, como descrito nos itens 4.2.4. e 4.3.2., respectivamente. Os cálculos para verificação dos efeitos das variáveis sobre as respostas foram realizados com o auxílio do programa computacional STATISTICA versão 7.0.

Em seguida, com base nesses efeitos, foi realizado um delineamento fatorial fracionado 2<sup>4-1</sup> com 3 repetições no ponto central capaz de avaliar o efeito de quatro variáveis sobre as respostas (Tabela 5). Neste experimento foi estudada a influência dos fatores concentração de glicose, extrato de malte, peptona e HPA após 4 dias de cultivo em presença de pireno e BaP. A biomassa inicial de cada ensaio foi incubada como descrito no item 4.2.1., sendo as demais condições de cultivo fixadas a 28 °C, pH 8, salinidade de 35 ppm e na ausência do composto extrato de levedura, pois seu nível -1 estudado foi de 0 g L<sup>-1</sup>.

**Tabela 5.** Níveis das variáveis estudadas no delineamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$ .

Fator	Nível inferior	Ponto central	Nível superior
	-1	0	+1
Glicose (g L <sup>-1</sup> )	0	2,6	5,2
Extrato de Malte (g L <sup>-1</sup> )	15	20	25
Peptona (g L <sup>-1</sup> )	2	3	4
Pireno (mg mL <sup>-1</sup> )	0,04	0,06	0,08
BaP (mg mL <sup>-1</sup> )	0,06	0,07	0,08

Finalmente, as variáveis concentração de glicose e peptona foram selecionadas para a realização de um planejamento fatorial completo  $2^2$  (DCCR) com 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central visando a melhor taxa de degradação dos HPAs pireno e BaP (concentrações iniciais de 0,08 mg mL<sup>-1</sup>) após 2 dias de cultivo (Tabela 6). A concentração do extrato de malte foi fixada a 25 g L<sup>-1</sup> e as demais condições de cultivo mantiveram-se conforme descrito no planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$ .

**Tabela 6.** Valores codificados e reais das variáveis usadas no DCCR.

Variáveis	Valores codificados				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Glicose (g L <sup>-1</sup> )	0	0,35	1,20	2,05	2,40
Peptona (g L <sup>-1</sup> )	3,0	3,3	4,0	4,7	5,0



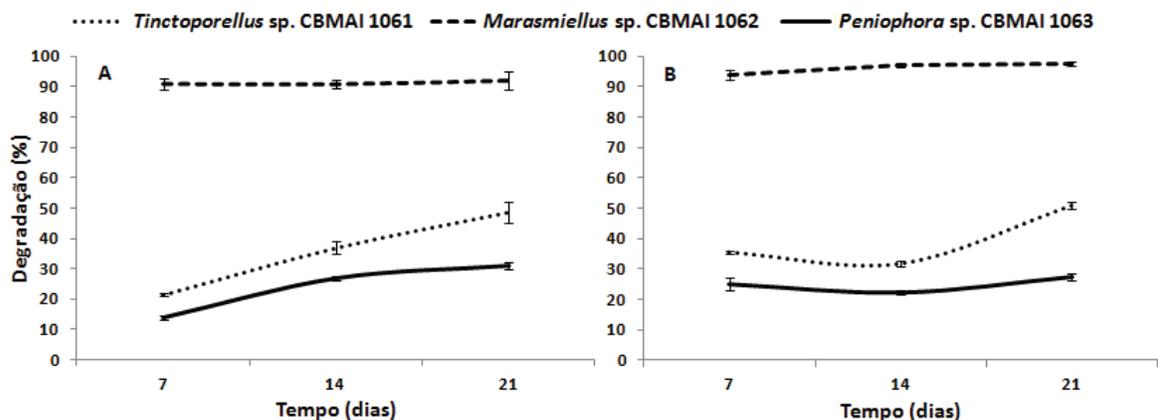
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. SELEÇÃO DO ISOLADO MAIS EFICIENTE

#### 5.1.1. DEGRADAÇÃO DOS HPAs PIRENO E BaP PELOS BASIDIOMICETOS DERIVADOS MARINHOS

Os resultados do presente trabalho demonstraram que os três basidiomicetos derivados marinhos estudados foram capazes de degradar os HPAs pireno e BaP a diferentes taxas (Figura 4, A e B, respectivamente). O fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 foi o mais eficiente, chegando a degradar mais de 90% da quantidade inicial de ambos os HPAs (0,02 e 0,04 mg mL<sup>-1</sup> de BaP e pireno, respectivamente) nos primeiros 7 dias de cultivo. Em um estudo com o fungo *Aspergillus* sp. BAP14, isolado a partir de sedimentos marinhos, Wu *et al.* (2009) obtiveram 60% de remoção de BaP a uma concentração inicial de 0,01 mg mL<sup>-1</sup> após 12 dias de incubação, o que pode ser um indicativo do grande potencial do isolado *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 em processos de biorremediação. O alto desempenho do gênero *Marasmiellus* na degradação do poluente BaP está descrito na literatura. O isolado *M. troyanus* TF216-1867 foi capaz de remover 67,5% deste HPA presente em microcosmo de solo (NEMERGUT *et al.* 2000) e 95% em meio líquido (WUNCH *et al.* 1997), a quantidades iniciais de 0,1 mg g<sup>-1</sup> de solo e 0,02 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Quanto ao basidiomiceto *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 a degradação dos HPAs foi crescente durante o período estudado, atingindo cerca de 50% após 21 dias. Entretanto, menores valores de remoção foram observados para *Peniophora* sp. CBMAI 1063, capaz de degradar cerca de 30% ambos os HPAs.



**Figura 4.** Degradação dos HPAs pireno (A) e BaP (B) pelos três basidiomicetos estudados. Os valores são médias de triplicatas e as barras verticais demonstram o erro padrão.

A fim de descartar a hipótese de que o decréscimo de HPAs tenha ocorrido devido a sua adsorção ao micélio fúngico, ensaios com micélio morto foram realizados para cada um dos três basidiomicetos estudados. Os resultados mostraram um decréscimo de até 14,9% de pireno e até 18,3% de BaP após 48 h de incubação (Tabela 7). Levando em consideração estas porcentagens encontradas, observou-se que ambos os HPAs foram degradados a taxas similares por *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062. Os demais isolados, *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 e *Peniophora* sp. CBMAI 1063, apresentaram certa variação na degradação dos HPAs, sendo o pireno degradado com maior eficiência (Apêndice A). A validação do método de extração utilizado no presente trabalho foi realizada por Passarini *et al.* (2011), onde os resultados demonstraram que foram recuperados, já na primeira extração, 98% do BaP e 96% do pireno adicionados ao meio de cultura na ausência de biomassa microbiana. Desta forma, as porcentagens de pireno e BaP recuperadas neste trabalho indicam que ocorreu adsorção dos HPAs junto à biomassa. Possivelmente esta adsorção seja devida à presença de uma bainha de exopolissacarídeos (EPS) situada ao redor do micélio. Diversos fungos de degradação

branca foram descritos como produtores de EPS, cuja função pode estar ligada à capacidade do fungo em degradar a lignina (RAGHUKUMAR *et al.* 2006). Estudos mostram que enzimas ligninolíticas secretadas ao meio extracelular ficam presas e concentradas a esta matriz de EPS em alguns fungos (BARASSA *et al.* 1998, RAGHUKUMAR *et al.* 2006, D'SOUZA *et al.* 2006). A diferença de recuperação entre os dois HPAs estudados para um mesmo isolado neste experimento pode ser justificada por suas diferenças físico-químicas (JUHASZ & NAIDU 2000).

Ainda que não desprezíveis, as porcentagens de adsorção não invalidam os resultados de degradação obtidos, especialmente no caso de *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, que apresentou elevadas taxas de degradação. Além disso, diversos estudos enfatizam a remoção de HPAs por adsorção como uma opção significativa para a biorremediação (VERMA *et al.* 2010). No caso dos fungos ligninolíticos, as enzimas concentradas na matriz de EPS em volta do micélio também contribuem com a degradação de HPAs adsorvidos à biomassa (RAGHUKUMAR *et al.* 2006).

**Tabela 7.** Recuperação dos HPAs pireno e BaP acrescidos ao micélio morto.

HPA	Isolado	Fortificação (mg mL <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	CV (%)
Pireno	<i>Tinctoporellus</i> sp. CBMAI 1061	0,04	86,2	85,1	1,76
			85,7		
			83,4		
	<i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062		89,0		
			89,9		
			88,4		
<i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063	90,6				
	90,9				
	90,0				
BaP	<i>Tinctoporellus</i> sp. CBMAI 1061	0,02	81,4	81,7	2,71
			84,1		
			79,7		
	<i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062		81,5		
			81,6		
			82,8		
<i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063	83,6				
	81,6				
	84,7				

CV: coeficiente de variação.

### 5.1.2. ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM PRESENÇA DE HPAs

Os ensaios para a avaliação da atividade ligninolítica e os ensaios correspondentes para a quantificação da degradação dos HPAs foram conduzidos separadamente. Contudo, ambos foram preparados e incubados no mesmo momento. Assim, evitou-se a possível inibição da atividade enzimática pelo solvente utilizado na extração e a interferência de outras variáveis, inerente à condução de ensaios separados, foi amenizada. Eibes *et al.* (2006) testaram a influência de diferentes solventes orgânicos sobre a atividade enzimática e encontraram que etanol e metanol causaram diminuição da atividade de MnP. O método de avaliação da atividade ligninolítica através de alíquotas retiradas do meio de cultura antes da extração foi descartado, uma vez que a quantidade de HPA removida seria incerta, o que comprometeria sua quantificação posterior.

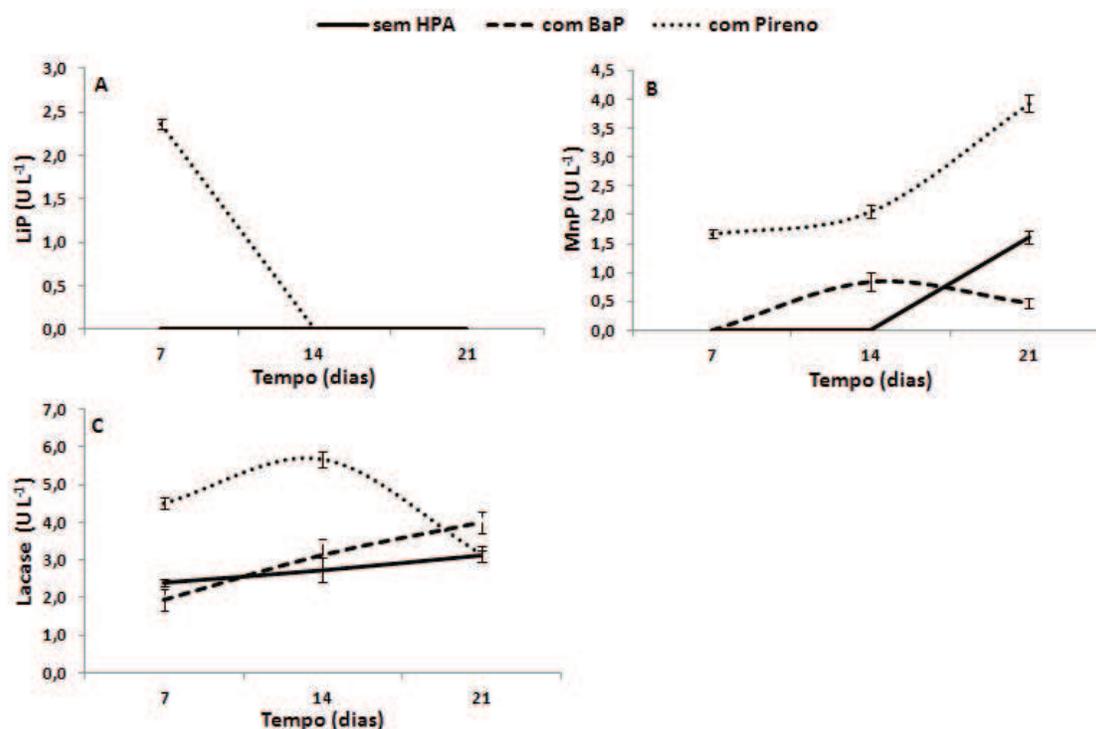
As atividades de Lacase foram mensuradas utilizando diferentes substratos (Apêndices B, C e D). Os resultados demonstraram diferenças significativas na produção desta enzima em relação ao substrato utilizado, o que está de acordo com o descrito na literatura (LI *et al.* 2008). As variações observadas na taxa de oxidação dos substratos podem ser atribuídas às diferenças de potencial redox entre enzima e substrato e à presença de diferentes isoenzimas de Lacase (ROBLES *et al.* 2000). As maiores atividades de Lacase foram obtidas com o uso de guaiacol como substrato. Os valores máximos foram de 12,33, 11,20 e 8,15 U L<sup>-1</sup>, em meio contendo pireno, BaP e sem HPA, respectivamente. Contudo, este substrato apresentou os maiores desvios padrão entre as réplicas (dados não mostrados), um indicativo da possível instabilidade do mesmo. Todos os resultados apresentados para atividade de Lacase neste estudo referem-se ao uso do substrato siringaldazina devido a seu menor desvio padrão observado. A siringaldazina foi o primeiro substrato para detecção da Lacase, descrito por Harkin *et al.* (1974), e é atualmente um dos substratos de Lacase mais utilizado e com maior especificidade (BALDRIAN 2006, SINSABAUGH 2009). O substrato ABTS apresentou valores de atividade enzimática similares aos encontrados com siringaldazina, contudo o ABTS é um substrato com menor especificidade para a atividade da Lacase, detectando outras enzimas polifenol-oxidases (SINGLA *et al.* 2010). Além disso, apresentou desvio padrão superior ao observado entre as réplicas com siringaldazina como o substrato da reação (dados não mostrados). Em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa da Dra. Lara Sette, que visou avaliação de diferentes substratos para a detecção da atividade de Lacase por basidiomicetos (BONUGLI-SANTOS *et al.* 2010b), o guaiacol foi o substrato mais sensível dentre os substratos o-dionisidina, siringaldazina e ABTS. Contudo, também apresentou grande variação entre as réplicas. Ambos os substratos siringaldazina e ABTS apresentaram baixa variação entre as réplicas, sendo este último o mais sensível.

Diferenças na atividade enzimática de LiP, MnP e Lacase foram observadas quando os fungos foram cultivados com pireno ou BaP e sem HPA durante o período de estudo. Os resultados da produção de enzimas ligninolíticas na presença de HPAs para os três basidiomicetos derivados marinhos estão apresentados a seguir:

### *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061

Em meio contendo pireno, a produção de MnP para *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 foi a maior em comparação aos outros isolados estudados, atingindo  $3,93 \text{ U L}^{-1}$  após 21 dias de cultivo. A atividade de MnP, bem como a de Lacase ( $5,67 \text{ U L}^{-1}$  após 14 dias) foram 2,44 e 2,08 vezes maior que o controle, respectivamente. Nestas condições de cultivo, a enzima LiP foi detectada apenas no 7º dia de incubação ( $2,36 \text{ U L}^{-1}$ ) (Figura 5).

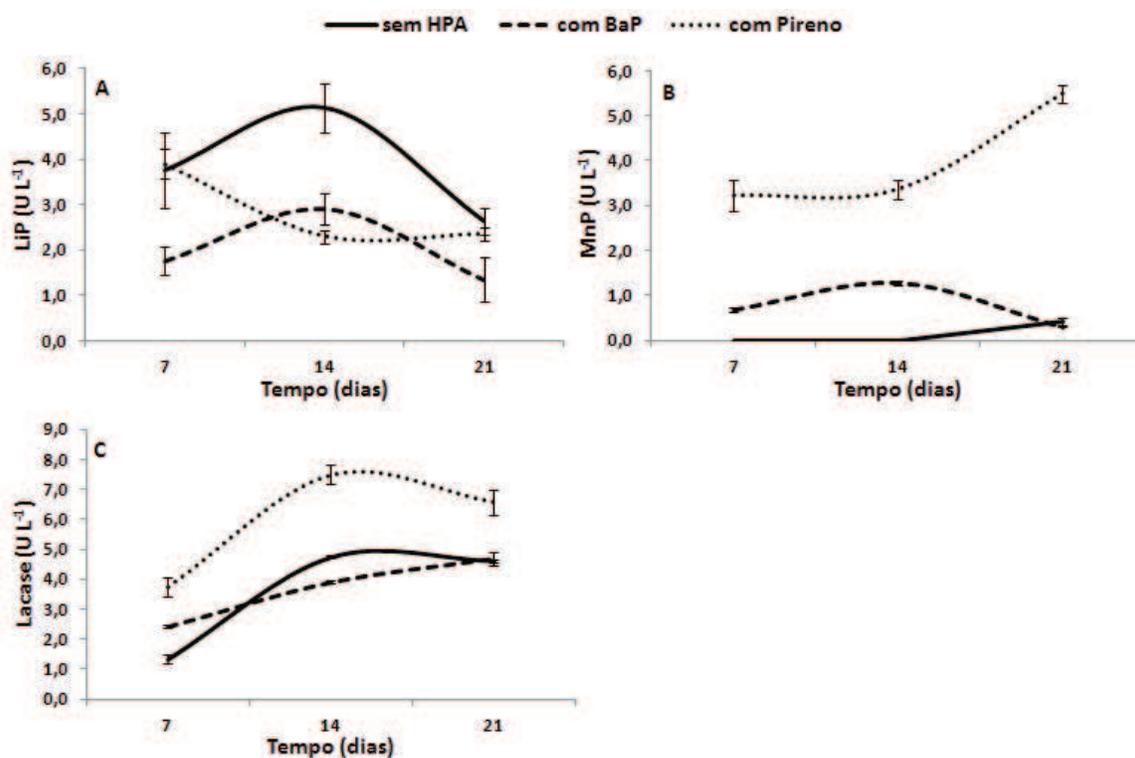
No meio contendo BaP, apenas as atividades de MnP e Lacase foram detectadas. A enzima MnP apresentou máxima produção no 14º dia de cultivo ( $0,84 \text{ U L}^{-1}$ ), enquanto que no controle a produção máxima ( $1,61 \text{ U L}^{-1}$ ) foi observada no 21º dia de cultivo. As maiores atividades de Lacase foram detectadas no 21º dia de cultivo para ambas as condições atingindo  $4,00 \text{ U L}^{-1}$  em presença de BaP e  $3,12 \text{ U L}^{-1}$  em meio sem HPA (Figura 5).



**Figura 5.** Atividade ligninolítica de *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 ao longo de 7, 14 e 21 dias em diferentes meios de cultivo. Os valores são médias de triplicatas e as barras verticais demonstram o erro padrão.

### ***Marasmiellus* sp. CBMAI 1062**

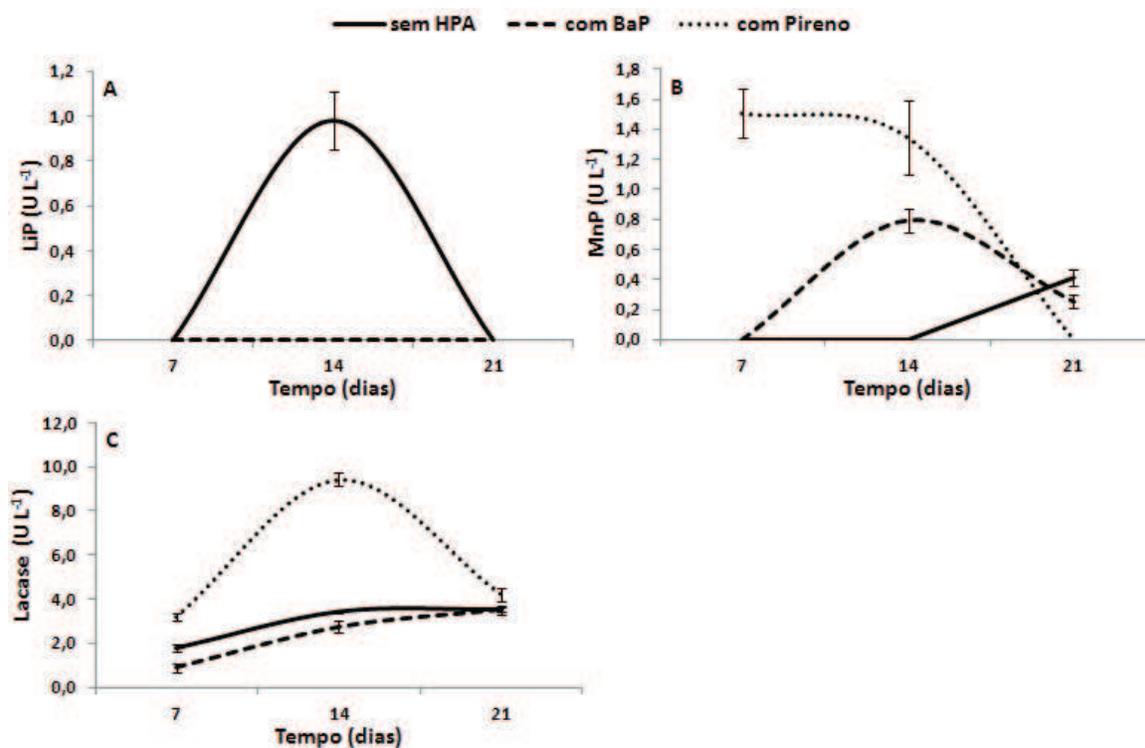
Para o fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, as atividades de MnP e Lacase foram significativamente maiores em meio contendo pireno (5,50 U L<sup>-1</sup> e 7,48 U L<sup>-1</sup>, respectivamente) do que em meio sem HPA (0,42 U L<sup>-1</sup> e 4,75 U L<sup>-1</sup>, respectivamente). Apesar da atividade da enzima LiP ter sido maior em comparação aos outros isolados estudados (3,90 U L<sup>-1</sup> em presença de pireno e 2,91 U L<sup>-1</sup> em presença de BaP), sua produção foi inferior à observada em meio sem HPA (5,13 U L<sup>-1</sup>). Em meio contendo BaP, a atividade de MnP e Lacase foram maiores que o controle em alguns períodos de cultivo (Figura 6), da mesma forma como observado para o fungo *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 (Figura 5).



**Figura 6.** Atividade ligninolítica de *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 ao longo de 7, 14 e 21 dias em diferentes meios de cultivo. Os valores são médias de triplicatas e as barras verticais demonstram o erro padrão.

### *Peniophora* sp. CBMAI 1063

Os menores valores de atividade das enzimas peroxidases MnP e LiP foram observados para o isolado *Peniophora* sp. CBMAI 1063. Para este isolado, a atividade de MnP chegou a 1,51 e 0,79 U L<sup>-1</sup> em presença de pireno e BaP, respectivamente, enquanto que a atividade de LiP foi nula. Contudo, a produção de Lacase chegou a 9,44 U L<sup>-1</sup>, com pico de produção no 14º dia em meio contendo pireno. Em presença deste HPA, as atividades de MnP e Lacase foram superiores em comparação ao controle, conforme observado também para *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 e *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 (Figura 7).



**Figura 7.** Atividade ligninolítica de *Peniophora* sp. CBMAI 1063 ao longo de 7, 14 e 21 dias em diferentes meios de cultivo. Os valores são médias de triplicatas e as barras verticais demonstram o erro padrão.

O perfil de atividade das enzimas MnP e Lacase nos três períodos de estudo apresentado pelo fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 é bastante similar àquele observado para *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061, sendo que *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 foi capaz de produzir quantidades maiores das enzimas ligninolíticas estudadas.

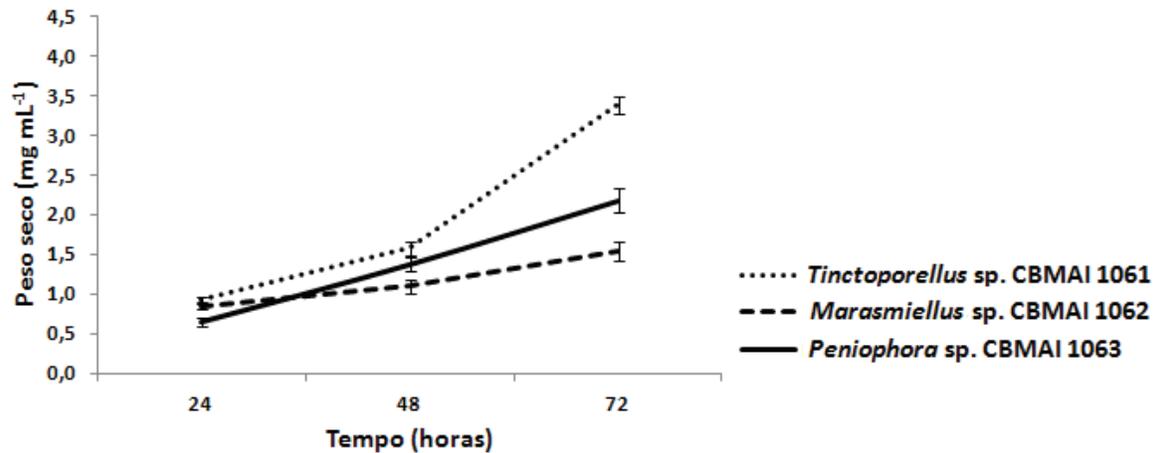
Os resultados das atividades enzimáticas na presença de pireno e BaP mostram que os HPAs podem ter induzido a atividade enzimática em alguns períodos estudados, especialmente de MnP e Lacase. Em meio contendo pireno, com exceção da produção de LiP pelos fungos *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 e *Peniophora* sp. CBMAI 1063, as enzimas estudadas apresentaram atividade significativamente maior do que em meio contendo BaP e do que o controle sem HPA. Quando os fungos foram cultivados em meio controle, os picos de produção da enzima MnP, além de menores, foram detectados no 21º dia de cultivo. Em presença de BaP o pico foi detectado no 14º dia e em meio contendo pireno as maiores produções foram detectadas no 7º dia para o fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 e 21º dia para *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 e *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062. Para a enzima Lacase, os picos de produção foram detectados no 14º dia de cultivo em meio contendo pireno e no 21º em meio contendo BaP. Com relação à enzima LiP, apenas os fungos *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 e *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 foram capazes de produzi-la em meio contendo HPA, sendo o pico de produção detectado no 7º dia de cultivo em meio contendo pireno e no 14º dia de cultivo em meio contendo BaP para ambos os fungos.

A detecção de picos de atividade ligninolítica no 14º e 21º dias de cultivo para a maior parte dos ensaios (com e sem HPA), pode estar relacionada com a baixa concentração de nutrientes, visto que a depleção de nitrogênio, por exemplo, é um dos fatores que estimulam a produção de enzimas ligninolíticas (KEYSER *et al.* 1978, CAJTHAML *et al.* 2008), o que pode ter ocorrido após dias de crescimento e consumo do meio de cultivo pelos isolados estudados.

### 5.1.3. BIOMASSA

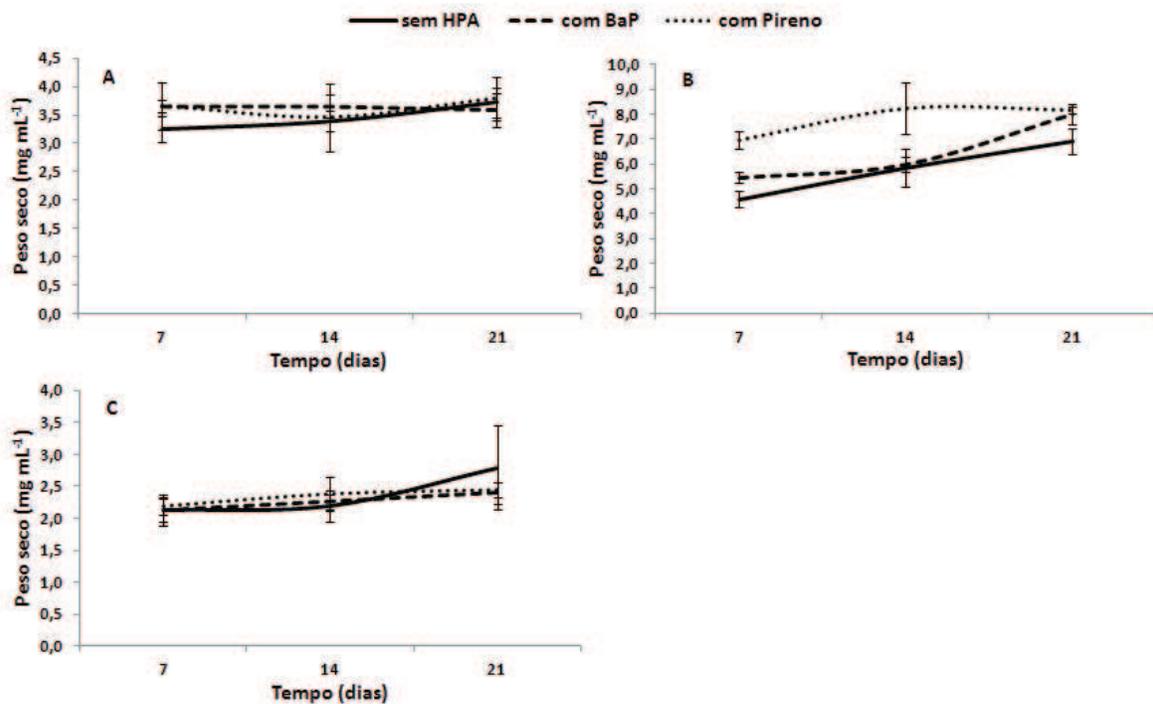
Visando avaliar a influência dos HPAs pireno e BaP no crescimento micelial dos basidiomicetos estudados, a biomassa fúngica foi determinada após 24, 48 e 72 h de incubação dos isolados, isto é, durante a formação da biomassa inicial, e após a adição dos HPAs pireno e BaP ao meio de cultivo (7º, 14º e 21º dias de cultivo).

O isolado *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 apresentou grande aumento de biomassa nas primeiras 72 h, chegando a 3,38 mg mL<sup>-1</sup>, porém o crescimento micelial estabilizou e não ultrapassou 3,79 mg mL<sup>-1</sup> após a adição do HPA pireno (21º dia de cultivo) (Figuras 8 e 9 A). Em contrapartida, *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, que registrou o menor aumento de biomassa inicial (1,54 mg mL<sup>-1</sup> após 72 h), foi o basidiomiceto que apresentou maior crescimento micelial durante os 7º, 14º e 21º dias de incubação, chegando a 8,19 e 7,99 mg mL<sup>-1</sup>, em presença de pireno e BaP, respectivamente (Figuras 8 e 9 B). Além do maior crescimento micelial, este basidiomiceto também apresentou as maiores porcentagens de degradação dentre os três fungos estudados e de maneira geral, maiores atividades das enzimas ligninolíticas. O isolado *Peniophora* sp. CBMAI 1063 apresentou um pequeno aumento de biomassa após a adição dos HPAs, atingindo 2,17 mg mL<sup>-1</sup> nas primeiras 72 h de incubação e chegando a 2,45 e 2,39 mg mL<sup>-1</sup> após a adição de pireno e BaP, respectivamente (Figuras 8 e 9 C).



**Figura 8.** Crescimento micelial de *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061, *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 e *Peniophora* sp. CBMAI 1063 durante a formação da biomassa inicial. Os valores são médias de triplicatas e as barras verticais demonstram o erro padrão.

Como observado nos resultados apresentados na Figura 9, a presença dos HPAs pireno e BaP não interferiu negativamente no crescimento dos isolados. Os basidiomicetos cultivados na presença e ausência dos HPAs apresentaram biomassas semelhantes, com exceção do basidiomiceto *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, que apresentou maior crescimento micelial em presença dos HPAs.



**Figura 9.** Crescimento micelial de (A) *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061, (B) *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 e (C) *Peniophora* sp. CBMAI 1063 após 7, 14 e 21 dias em diferentes meios de cultivo. Os valores são médias de triplicatas e as barras verticais demonstram o erro padrão.

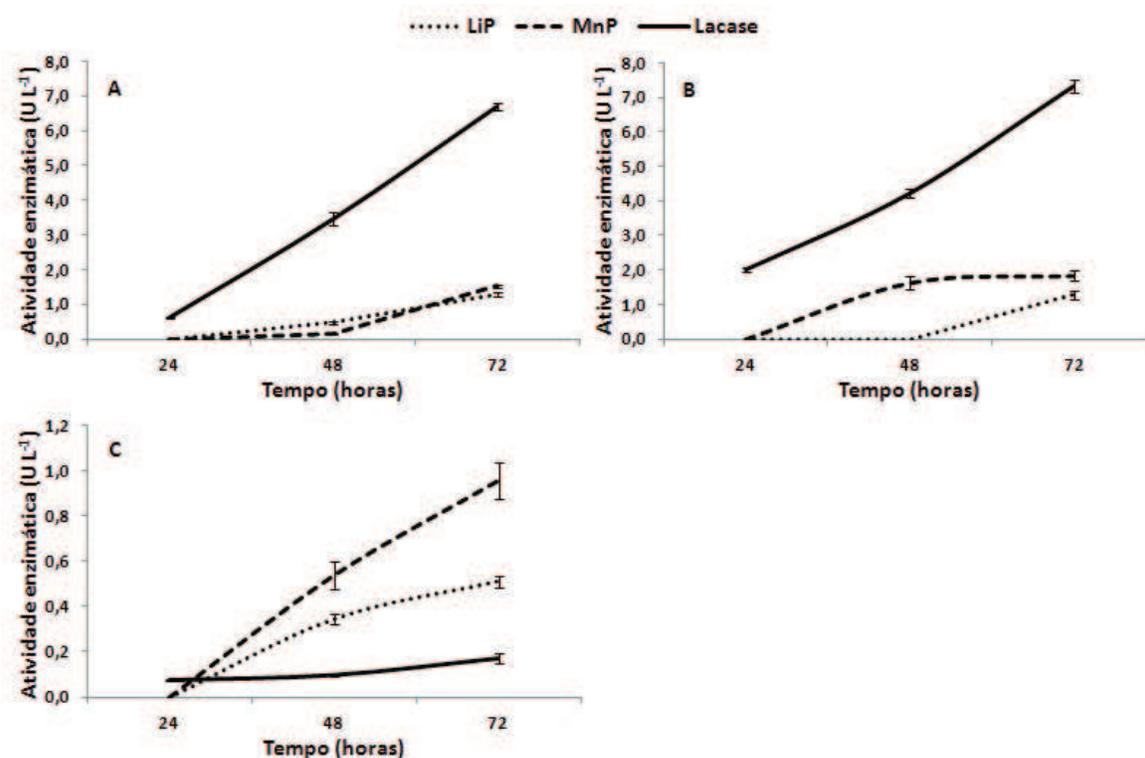
#### 5.1.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA ANTES DA ADIÇÃO DOS HPAs

Todos os basidiomicetos estudados, em especial o isolado *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, foram capazes de degradar os HPAs após 7 dias de cultivo. Visando à quantificação das enzimas ligninolíticas presentes no meio de cultivo antes da adição dos HPAs, sua determinação foi realizada após 24, 48 e 72 h de incubação.

Os resultados revelaram que os três basidiomicetos derivados marinhos produziram enzimas ligninolíticas antes da adição dos HPAs pireno e BaP ao meio de cultivo. Dentre as enzimas estudadas, a Lacase foi a mais produzida pela biomassa inicial de *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 e *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 (6,71 e 7,33 U L<sup>-1</sup>), que também produziram quantidades similares de MnP (1,52 e 1,84 U L<sup>-1</sup>) e

LiP (1,23 e 1,27 U L<sup>-1</sup>) ao final de 72 h de incubação (Figura 10). A biomassa inicial de *Peniophora* sp. CBMAI 1063 apresentou maior atividade de MnP (0,96 U L<sup>-1</sup>) do que das enzimas LiP e Lacase (0,51 e 0,17 U L<sup>-1</sup>, respectivamente) (Figura 10).

De acordo com os gráficos apresentados na Figura 10, a produção de enzimas ligninolíticas durante a formação da biomassa inicial foi crescente para a maioria das enzimas estudadas, em especial a Lacase produzida por *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 e *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 e a MnP produzida pelo fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063.



**Figura 10.** Produção de LiP, MnP e Lacase pelos basidiomicetos (A) *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061, (B) *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 e (C) *Peniophora* sp. CBMAI 1063 durante a formação da biomassa inicial. Os valores são médias de triplicatas e as barras verticais demonstram o erro padrão.

A produção enzimática, principalmente de Lacase, logo nas primeiras 72 h de incubação em meio extrato de malte confirma o caráter ligninolítico dos três

basidiomicetos recuperados de amostras marinhas e demonstra o potencial biotecnológico dos mesmos para produção das enzimas LiP, MnP e Lacase.

As Lacases têm sido objeto de intensa pesquisa nas últimas décadas devido a sua baixa especificidade ao substrato e facilidade de obtenção e manipulação, o que consequentemente possibilita uma ampla aplicação tecnológica (ASGHER *et al.* 2008). Recentemente, seu uso estendeu-se das indústrias de papel e celulose, onde são utilizadas para delignificação e branqueamento da polpa em substituição ao uso de compostos clorados, para aplicações na indústria alimentícia, em processos que melhoram a aparência de alimentos e bebidas. Seu papel na descoloração de efluentes oriundos de indústrias têxteis também tem sido destacado em estudos diversos (ASGHER *et al.* 2008, MACIEL *et al.* 2010). Devido à sua estrutura química, os corantes são resistentes ao desbotamento por exposição à luz, à água e a diferentes produtos químicos, e muitos deles são de difícil degradação devido à sua origem sintética (FORGACS *et al.* 2004). Dentre outros compostos tóxicos degradados pelas Lacases estão herbicidas, pesticidas, explosivos, HPAs, dentre outros compostos fenólicos e clorados (POITING 2001, KUNAMNENI *et al.* 2007). Estas enzimas também têm sido usadas como biocatalizadores em processos de síntese orgânica e como agente oxidante na indústria de cosméticos, em substituição ao  $H_2O_2$ . Mais recentemente, a Lacase tem sido foco de estudos bioeletroquímicos devido à sua capacidade de catalisar a transferência de elétrons sem a necessidade de um co-fator (COUTO & HERRERA 2006, KUNAMNENI *et al.* 2007). As peroxidases LiP e MnP também possuem ampla aplicação biotecnológica em diferentes setores. A enzima MnP têm sido utilizada para produção de aromas naturais, branqueamento na indústria de papel e celulose e degradação de HPAs, corantes têxteis, DDT, PCB e TNT. Enquanto que a aplicação da LiP está associada à indústria cosmética e a degradação de uma ampla variedade de xenobióticos (MACIEL *et al.* 2010).

### 5.1.5. DEGRADAÇÃO DE HPAs, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E BIOMASSA

A produção enzimática nas primeiras 72 h de cultivo mostrou não ter relação com o crescimento micelial, pois as maiores atividades de Lacase e MnP foram registradas para *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, que apresentou biomassa comparativamente menor em relação à biomassa dos fungos *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 (55%) e *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (29%) (Figuras 8 e 10).

Os resultados de produção enzimática sugerem que, na presença do HPA pireno, pode ter havido indução da produção das enzimas ligninolíticas, uma vez que foi observada uma maior atividade destas enzimas em comparação aos experimentos controle (Figuras 5, 6 e 7). Após a adição dos HPAs ao meio de cultivo, os basidiomicetos apresentaram aumento de crescimento micelial em relação à biomassa alcançada nas primeiras 72 h sem adição de HPAs, especialmente *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, o que demonstra a capacidade de proliferação na presença destes compostos. Em adição, na presença de HPA, este fungo apresentou biomassa maior que a do controle sem HPA (Figura 9).

Embora os basidiomicetos *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 e *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 tenham apresentado valores similares de atividade ligninolítica, tanto durante as primeiras 72 h quanto após a adição pireno e BaP (Figuras 5, 6 e 10), a capacidade de degradação dos HPAs estudados diferiu substancialmente (Figura 4 A e B). Por outro lado, o isolado *Peniophora* sp. CBMAI 1063 apresentou as menores porcentagens de degradação dos HPAs pireno e BaP e foi o isolado que produziu as menores quantidades das enzimas ligninolíticas, com exceção da Lacase na presença de pireno (Figuras 4 A e B, 7 e 10). Este isolado também apresentou uma menor biomassa após 7, 14 e 21 dias de cultivo em meio com e sem HPAs (Figura 9 C).

Para nenhum dos três basidiomicetos estudados as porcentagens de degradação dos HPAs pireno e BaP apresentaram correlação com a atividade ligninolítica, o que pode

também ser observado em outros estudos (DHAWALE *et al.* 1992, VERDIN *et al.* 2004, LI *et al.* 2010). Os estudos conduzidos por Li *et al.* (2010) mostraram que a atividade de Lacase produzida pelo basidiomiceto *Pleurotus eryngii* não possuía correlação com as taxas de degradação dos HPAs BaP e antraceno. No presente trabalho, o fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 foi capaz de degradar em mais de 90% ambos os HPAs nos primeiros 7 dias de cultivo (Figura 4 A e B). Entretanto, de maneira geral os picos de produção enzimática foram observados após o 14° e 21° dias de cultivo na presença dos HPAs, com exceção da LiP que apresentou pico de produção no 7° dia de cultivo, na presença de pireno (Figura 6). Cabe ressaltar, porém, que no momento da adição dos HPAs (após 72 h de cultivo), as três enzimas estudadas foram detectadas, sendo a Lacase em maiores quantidades (Figura 10 B), o que pode ter contribuído com a elevada porcentagem de degradação nos primeiros 7 dias.

A biotransformação de HPAs é um processo complexo, com diversas etapas e sujeito à ação de várias enzimas, podendo assumir rotas diferentes dependendo do grupo de micro-organismo e da espécie (HARMS *et al.* 2011). Os resultados apresentados sugerem que as três enzimas ligninolíticas podem não ser as únicas envolvidas na degradação do pireno e BaP pelos basidiomicetos marinhos.

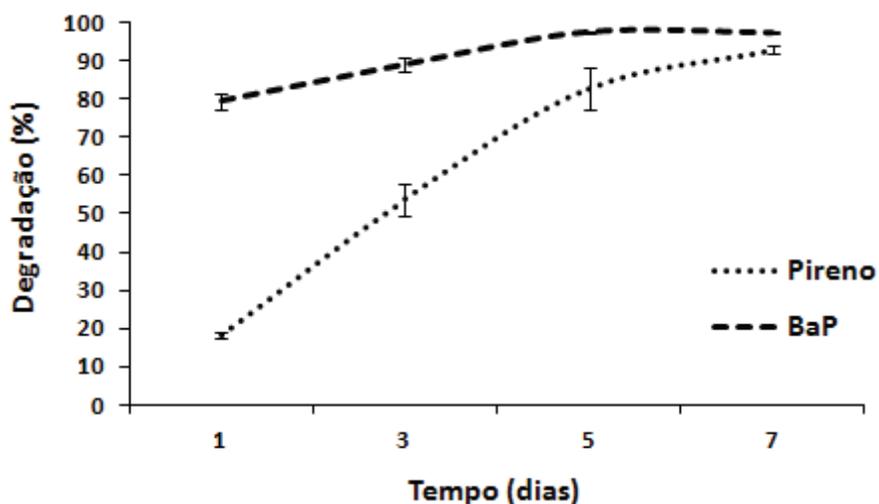
Tendo em vista a maior porcentagem de degradação dos HPAs pireno e BaP pelo fungo derivado marinho *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, bem como seu maior crescimento micelial na presença dos HPAs estudados e a produção das enzimas ligninolíticas, tanto nas primeiras 72 h de cultivo sem HPAs quanto após sua adição, este isolado foi selecionado para a condução dos estudos subsequentes referentes à degradação dos HPAs ao longo de 7 dias, avaliação dos metabólitos gerados e avaliação da influência de diferentes fatores sobre a degradação, visando à otimização do processo.

## 5.2. ISOLADO SELECIONADO: *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062

### 5.2.1. DEGRADAÇÃO AO LONGO DE 7 DIAS

Tendo em vista a avaliação e o melhor conhecimento do processo de degradação pelo basidiomiceto *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 durante os 7 primeiros dias de cultivo, a quantificação da degradação dos HPAs foi realizada após 1, 3, 5 e 7 dias de cultivo.

Os resultados demonstraram que após 24 h, 79,4% dos 0,02 mg mL<sup>-1</sup> iniciais de BaP já haviam sido degradados, atingindo no final de 7 dias 97,2% de degradação. Com relação ao pireno, a degradação ocorreu de forma mais lenta, iniciando com 18,5% dos 0,04 mg mL<sup>-1</sup> iniciais após 24 h e atingindo 92,8% após 7 dias (Figura 11). A taxa inicial de degradação não foi maior para o composto com menor número de anéis, ou seja, de menor massa molecular, conforme reportado na literatura (WANG *et al.* 2009). Estes resultados podem estar relacionados com a toxicidade do BaP, o que poderia ter demandado uma maior degradação deste composto nos primeiros 7 dias pelo fungo estudado, como uma estratégia de sobrevivência.

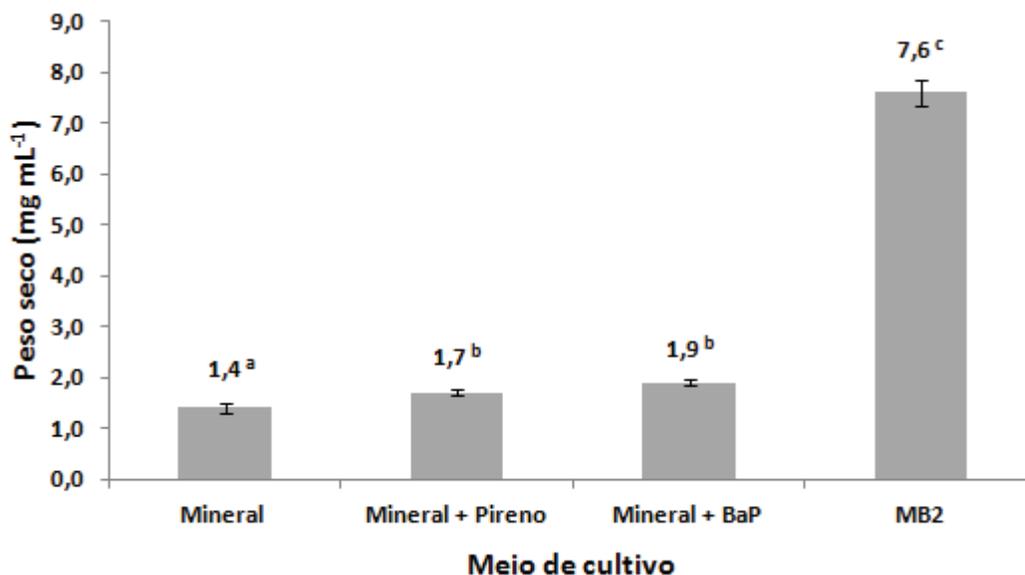


**Figura 11.** Degradação dos HPAs pireno e BaP por *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 ao longo de 7 dias. Os valores são médias de triplicatas e as barras verticais demonstram o erro padrão.

### 5.2.2. CONSUMO DE PIRENO E BaP EM MEIO MINERAL

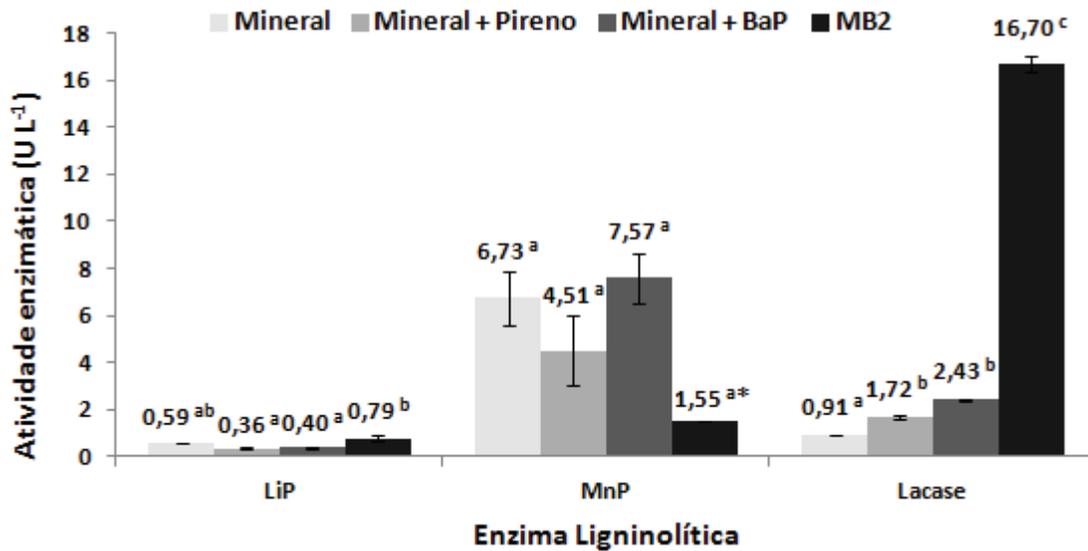
Visando avaliar a degradação de pireno e BaP, o consumo de ambos como fontes de carbono e a atividade ligninolítica durante o processo degradativo, a biomassa inicial do fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 (obtida após 72 h de cultivo em meio MB2) foi lavada e inoculada em meio mineral líquido contendo os respectivos HPAs.

Após 7 dias de cultivo em meio mineral contendo HPA, o basidiomiceto apresentou elevadas taxas de degradação, aumento de biomassa e atividade das enzimas LiP, MnP e Lacase. A biomassa atingida em presença dos HPAs pireno e BaP foi superior ao controle sem qualquer fonte de carbono adicional (Figura 12), sugerindo, juntamente com os resultados de degradação de 79,9 e 95,2%, respectivamente, o consumo, ao menos em parte, dos HPAs e/ou de seus produtos de degradação como fontes de carbono e energia. O cultivo prévio por 72 h em meio MB2 promoveu o crescimento celular, aumentando a degradação posterior dos HPAs. Segundo Shan (2009), o cultivo prévio de biomassa na presença de uma fonte de carbono adicional também caracteriza um processo co-metabólico. Se forem fornecidos exclusivamente HPAs de alta massa molecular como fonte de carbono e energia, a energia disponível para as reações iniciais podem não ser suficientes para seu crescimento. Um segundo efeito da fonte adicional de carbono é a atuação como co-substrato no metabolismo de xenobióticos pela indução de certas vias enzimáticas que tanto a fonte de carbono quanto o substrato não consumível podem compartilhar (CERNIGLIA & SUTHERLAND 2010). A via co-metabólica é de extrema importância em processos de biorremediação pois uma vez que as enzimas degradadoras de HPAs sejam induzidas por estímulos nutricionais e façam parte de seu metabolismo secundário poderão atuar independentemente da natureza e concentração do hidrocarboneto a ser degradado (BENNETT & FAISON 1997).



**Figura 12.** Massa micelial obtida em meio mineral sem fonte de carbono adicional, na presença de pireno e BaP e em meio MB após 7 dias de cultivo. Os valores são médias de triplicatas e as barras verticais demonstram o erro padrão. Letras diferentes apresentam diferenças significativas ao nível de  $p < 0,05$  (Teste de Tukey).

As atividades das enzimas LiP, MnP e Lacase foram registradas em meio mineral sem fonte de carbono adicional e na presença de pireno e BaP (Figura 13). A atividade de Lacase teve aumento significativo na presença dos HPAs, como também observado nos experimentos de seleção do fungo com melhor capacidade de degradação (item 5.1.2.). Estes resultados sugerem mais uma vez a indução de sua atividade pelos HPAs, indicando a participação desta enzima na degradação do pireno e BaP por *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062.



**Figura 13.** Produção de enzimas ligninolíticas em meio mineral sem fonte de carbono adicional, na presença de pireno e BaP e em meio MB após 7 dias de cultivo. Os valores são médias de triplicatas, exceto o valor (\*) em que apenas uma réplica foi considerada. As barras verticais demonstram o erro padrão. Letras diferentes apresentam diferenças significativas ao nível de  $p < 0,05$  (Teste de Tukey).

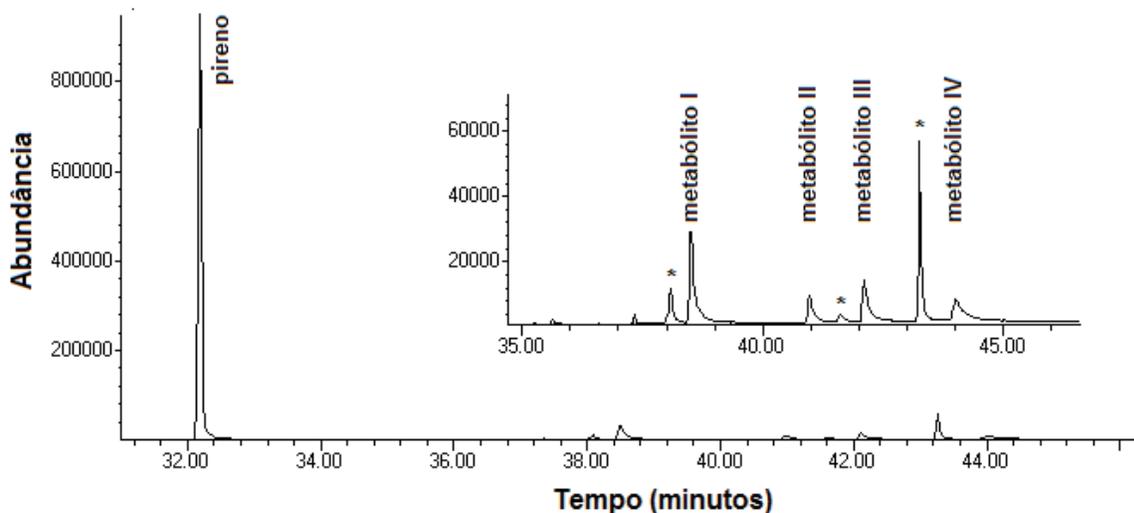
Após 72 h de cultivo em meio MB2, a biomassa inicial também foi lavada e inoculada em novo meio MB2 por 7 dias, a fim de se comparar o crescimento micelial e a atividade ligninolítica com os valores obtidos em meio mineral. Os resultados mostraram que o extrato de malte a 2% é um forte indutor da atividade de Lacase bem como uma rica e facilmente acessível fonte de carbono e energia. O fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 cresceu até 4 vezes mais e produziu até 6,9 vezes mais Lacase em meio MB2 do que em meio mineral (Figuras 12 e 13). Os resultados obtidos em meio mineral também são inferiores aos observados na etapa de seleção dos três basidiomicetos estudados (itens 5.1.2., 5.1.3. e 5.1.4.).

### 5.2.3. IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS FORMADOS DURANTE A DEGRADAÇÃO DOS HPAS

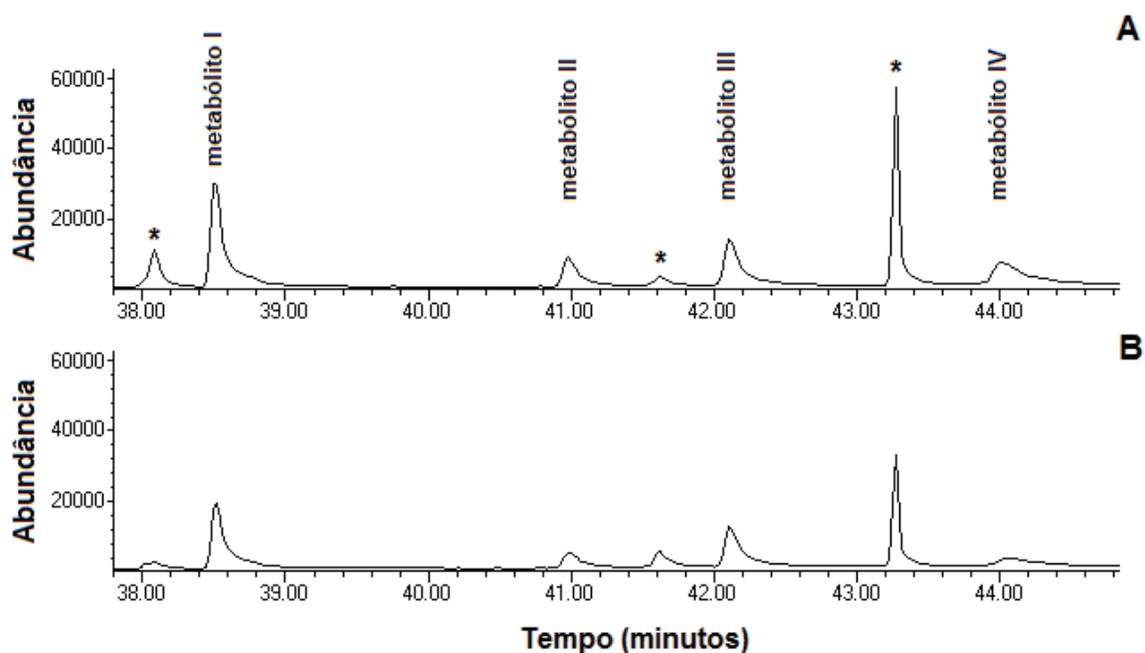
A degradação biológica de HPAs geralmente é incompleta, resultando na produção e acúmulo de produtos intermediários. A determinação das vias metabólicas de degradação dos HAPs pode ajudar a prever o destino desses compostos no ambiente e elucidar a perda de sua toxicidade (JUHASZ *et al.* 1997). Desta forma, os produtos formados pela degradação dos HPAs pireno e BaP pelo isolado *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 foram investigados. Sob as condições experimentais deste estudo, foram identificados 4 metabólitos (Tabela 8), todos eles resultantes da degradação do pireno (Figura 15). Os metabólitos foram detectados após 5 e 15 dias de cultivo, sendo sua abundância menor no 15º dia. Os demais picos observados nas Figuras 14 e 15 não puderam ser identificados.

**Tabela 8.** Identificação dos metabólitos da degradação de pireno pelo basidiomiceto *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062: tempo de retenção e características da espectrometria de massas.

Metabólito	t <sub>R</sub> (min)	Íon molecular	Íons de confirmação (m/z)	Composto sugerido	Composto parental
I	38,521	218	189	1-hidroxipireno	pireno
II	40,987	236	218, 189, 176	pirenodihidrodiol	pireno
III	42,117	236	218, 189, 176	pirenodihidrodiol	pireno
IV	44,019	234	176, 218, 189	dihidroxipireno	pireno



**Figura 14.** Perfil cromatográfico do pireno restante e dos metabólitos resultantes de sua degradação por *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 após 5 dias de cultivo (modo SIM). Os (\*) indicam picos que não puderam ser identificados.

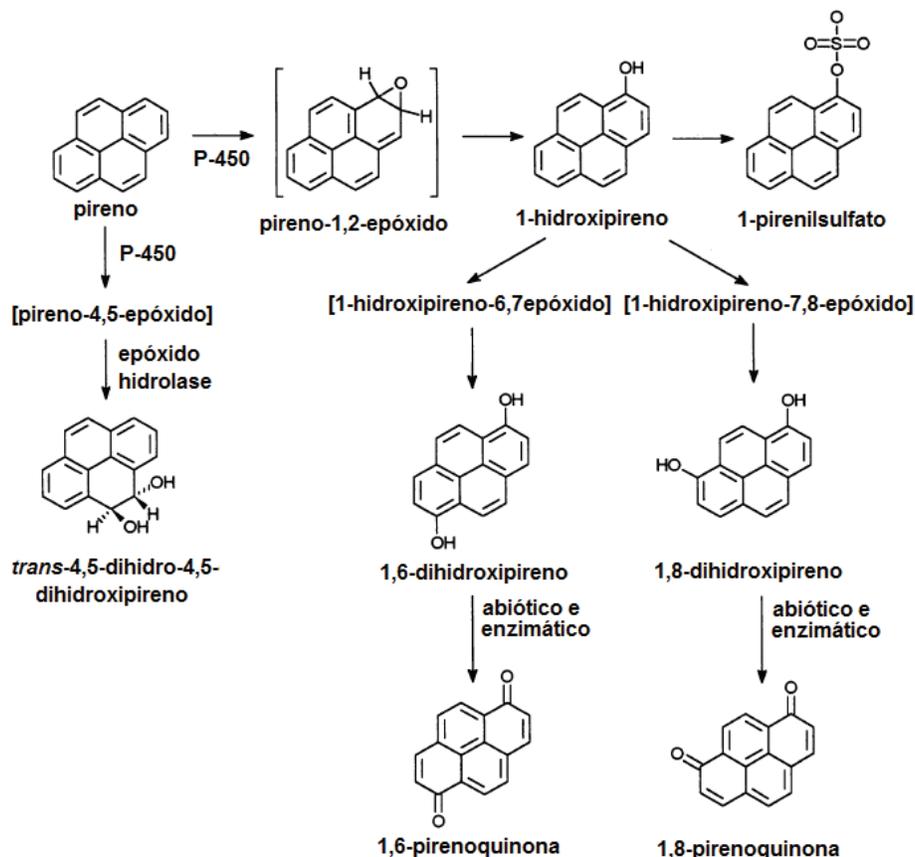


**Figura 15.** Perfil cromatográfico dos metabólitos formados pela degradação do pireno por *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 após 5 (A) e 15 (B) dias de cultivo (modo SIM). Os (\*) indicam picos que não puderam ser identificados.

A análise dos perfis cromatográficos, principalmente aqueles obtidos pelo modo SIM (Anexos A, B e C), permitiu somente a sugestão da identidade dos compostos (Tabela 8), uma vez que não foram utilizados padrões analíticos para sua confirmação. O metabólito I possui íon molecular ( $M^+$ ) de  $m/z$  218 e um íon fragmento de  $m/z$  189, resultante da perda de um grupo  $-CHO$ . Este foi o metabólito identificado mais abundante e seu padrão de espectro de massas é característico do composto hidroxipireno. A posição do grupo hidroxila não foi determinada, contudo o produto 1-hidroxipireno tem sido descrito como um metabólito do pireno pela degradação fúngica (LANGE *et al.* 1994, CERNIGLIA & SUTHERLAND 2010). Os metabólitos II e III possuem íon molecular ( $M^+$ ) de  $m/z$  236 e pico base de  $m/z$  218. Este perfil representa a perda de uma unidade de  $H_2O$  ( $M^+ - 18$ ). Íons fragmentos de  $m/z$  189,  $m/z$  176 e  $m/z$  94 também foram detectados. O padrão do espectro de massas obtido sugere que os metabólitos II e III sejam dihidrodiois. Os dois picos identificados possivelmente correspondem à diferente posição de clivagem do anel (JUHASZ *et al.* 1997). O metabólito IV possui íon molecular ( $M^+$ ) de  $m/z$  234 e íons fragmentos de  $m/z$  205 ( $M^+ - COH$ ) e  $m/z$  176 ( $M^+ - 2COH$ ). O padrão do espectro de massas obtido sugere que o metabólito IV seja o dihidroxipireno (LAMBERT *et al.* 1994). A posição dos grupos hidroxila não foi determinada. Cabe ressaltar que nenhum destes metabólitos foi detectado no controle experimental sem HPA.

Os metabólitos I, II, III e IV identificados sugerem a degradação do pireno pelas mono-oxigenases do sistema CYP e pela atividade das epóxido hidrolases (Figura 16). Mesmo fungos produtores de enzimas ligninolíticas são capazes de metabolizar HPAs por esta via, também encontrada em bactérias e mamíferos (CERNIGLIA & SUTHERLAND 2010, CHIGU *et al.* 2010, SYED *et al.* 2010). O pico característico da formação de quinonas, principais metabólitos da rota ligninolítica, não foi detectado. Isto pode ser resultado da baixa concentração destes compostos, uma vez que experimentos anteriores sugeriram a participação da enzima Lacase, capaz de oxidar os HPAs gerando acúmulo

de quinonas (Figura 3) (CERNIGLIA & SUTHERLAND 2010). Tampouco foi observado o padrão do espectro de massas correspondente ao pirenilsulfato, que indicaria a atividade de enzimas de conjugação (SUTHERLAND 1992).



**Figura 16.** Vias propostas para o metabolismo inicial de pireno por duas linhagens do basidiomiceto *Crinipelis stipitaria*. Adaptado de LANGE *et al.* 1994.

Provavelmente devido às baixas concentrações dos demais compostos, o método operacional *Full Scan* somente foi capaz de identificar o pico cromatográfico correspondente ao íon molecular de  $m/z$  218 ( $t_R=38,548$ ), identificado como 1-hidroxipireno pela biblioteca do programa computacional NIST MS SEARCH versão 2.0. Diferentemente do método *Full Scan*, o modo operacional SIM funciona como um detector seletivo altamente sensível, pois são monitorados somente os íons selecionados no

aparelho. Em vista disso, há aumento no valor da razão sinal/ruído e picos antes não detectados pelo modo *Full Scan* passam a ser identificados (ROBARDS et al. 1994).

Embora analisados sob as mesmas condições, nenhum dos intermediários da degradação do BaP teoricamente esperados puderam ser detectados, possivelmente devido à sua baixa concentração.

Os metabólitos formados pela biotransformação do pireno encontrados neste estudo foram reportados como produtos de degradação deste HPA por diversos fungos, incluindo o gênero *Marasmiellus* (LANGE et al. 1994, WUNDER et al. 1994, LANGE et al. 1996, SACK et al. 1997). Lange et al. (1996) mostraram que o isolado *Marasmiellus ramealis* JK 314 degradou até 76,5% de pireno produzindo os metabólitos 1-hidroxipireno, 1-pirenilsulfato, 1,6-hidroxipireno, 1,6-pirenoquinona e *trans*-4,5-dihidro-4,5-dihidroxipireno após 14 dias de incubação. Compostos dihidroxi, dihidrodiois, epóxidos e quinonas derivados de pireno também foram descritos para a via metabólica de degradação por bactérias, como as do gênero *Mycobacterium* (KANALY & HARAIAMA 2000, LIANG et al. 2006, PENG et al. 2008).

Os metabólitos derivados da degradação inicial de HPAs são frequentemente mais tóxicos a muitos organismos que o composto parental (SUTHERLAND 1992) e alguns podem ser de difícil degradação (HWANG et al. 2001). Além disso, sua maior solubilidade tem como consequência o aumento de sua mobilidade através dos tecidos e do ambiente. O 1-hidroxipireno, o principal metabólito do pireno, foi descrito como altamente tóxico e genotóxico (HAUSER et al. 1997) e mostrou maior toxicidade a alguns organismos que seu composto de origem (LAMBERT et al. 1994). Da mesma forma, o metabólito benzo[a]pireno 7,8-dihidrodiol foi descrito como mais carcinogênico que seu composto parental. A ativação metabólica deste dihidrodiol por microsossomos do fígado de camundongos resultou em maior força de ligação ao DNA do que aquela observada pela ativação metabólica do BaP (KAPITULNIK et al. 1977). O composto (+)-benzo[a]pireno-

7,8-diol-9,10-epóxido é altamente mutagênico a células de procariotos e eucariotos e foi considerado carcinogênico para roedores (HODGSON & ROSE 2010). Além disso, embora os HPAs sejam rápida e extensivamente oxidados por fungos de degradação branca, sua quantidade mineralizada a CO<sub>2</sub> é bastante limitada. Estudos mostram que de 0,17 a 19% de BaP marcado é recuperado como <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, sendo os metabólitos polares os maiores produtos de oxidação (BEZALEL *et al.* 1996, BOGAN & LAMAR 1996).

Contudo, cabe ressaltar que a biotransformação inicial de um composto pode abrir caminho ao ataque subsequente por outros organismos (KECK *et al.* 1989). A incapacidade de atravessar a parede bacteriana torna os HPAs pouco biodisponíveis a seu ataque, sendo este o maior fator limitante de sua degradação por bactérias (HAMMEL *et al.* 1986). O aumento da biodisponibilidade apresentado por metabólitos oxidados sugere que estes compostos possam ser mais facilmente mineralizados por bactérias. Em um estudo com o fungo basidiomiceto *Bjerkandera* sp. BOS55, até 8,5% de <sup>14</sup>C-BaP foi recuperado como <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, e até 73% como metabólitos polares. Após adição de microflora nativa ao meio de cultivo com BaP oxidado em seu 15º dia de incubação, ocorreu um rápido aumento no nível de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> recuperado, chegando a 34% após cerca de 200 dias. Em meio de cultivo com fungo não inoculado com a microflora a recuperação de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> chegou a 13,5% (KOTTERMAN *et al.* 1998).

Em adição, os metabólitos formados inicialmente, como fenóis e dihidrodiois, podem ser detoxificados através da conjugação com outras moléculas. Os conjugados produzidos por fungos incluem sulfatos, glicosídeos, glucoronídeos e xilosídeos (SUTHERLAND 1992). Estes conjugados são geralmente mais solúveis em água que o composto de origem e podem ser excretados do organismo. Portanto, os estudos citados sugerem que os fungos são capazes de promover a detoxificação de HPAs e, em colaboração com outros micro-organismos, conduzem à sua mineralização.

As possíveis estratégias de biorremediação usadas após um derramamento de óleo em ambiente marinho, por exemplo, podem ser divididas em três tipos: (I) biorremediação intrínseca, que ocorre com o passar do tempo e na ausência de intervenção humana; (II) bioestimulação, que consiste na modificação da concentração de nutrientes, da oxigenação, temperatura, pH, entre outros, visando aumento das taxas de biodegradação naturais; (III) bioaumento, que requer adição de uma microbiota óleo-degradante para completar a capacidade de degradação das populações nativas (TEIXEIRA 2010).

As técnicas biológicas que empregam a adição de micro-organismos exógenos devem ser analisadas criteriosamente devido, principalmente, aos riscos ambientais que a inserção de um micro-organismo não nativo pode gerar. O emprego desta técnica depende, primeiramente, da concordância e da autorização de órgãos governamentais e de agências de fiscalização ambiental, como a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) do Estado de São Paulo. No Brasil, mais especificamente no Estado de São Paulo, esta técnica só foi reconhecida legalmente nos últimos anos, através de publicação em 22 de junho de 2007 (Decisão de Diretoria (DD) nº 103/2007/C/E) segundo a qual "... A utilização de micro-organismos alóctones nos sistemas de remediação deverá seguir as normas técnicas CETESB e as legais pertinentes..." (CETESB 2007a). Dentre as normas a serem seguidas, destaca-se a norma técnica da CETESB nº L1.022, de junho de 2007, que trata sobre o uso de produtos biotecnológicos, constituídos de micro-organismos, destinados ao tratamento de efluentes líquidos, de resíduos sólidos e a remediação de solos e águas. Estes produtos devem estar registrados no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e ter sua aplicação no meio ambiente acompanhada por um programa de monitoramento previamente submetido à aprovação da CETESB (CETESB 2007b).

Os resultados de degradação obtidos no presente trabalho, juntamente com a identificação de alguns dos metabólitos formados durante o metabolismo do pireno pelo fungo derivado marinho *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, demonstram a importância deste organismo nas etapas iniciais de degradação dos HPAs pireno e BaP. Em adição, por este isolado ter sido recuperado do ambiente marinho, o mesmo pode apresentar vantagens biológicas quando utilizados em ambientes ou processos salinos.

#### **5.2.4. INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SOBRE A DEGRADAÇÃO**

O delineamento experimental foi usado neste estudo para avaliar a influência de algumas variáveis sobre o processo de degradação dos HPAs pireno e BaP pelo isolado *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062. O crescimento micelial e a produção de enzimas ligninolíticas também foram determinados.

#### **Plackett-Burman (PB)**

O modelo matemático de planejamento fatorial de Plackett-Burman contendo 15 ensaios foi inicialmente usado para avaliação da influência de oito variáveis (Tabela 9).

A faixa de temperatura estudada variou de 22 a 28 °C, compreendendo a média anual da temperatura da água do mar em São Sebastião, São Paulo, de aproximadamente 23 °C. Em adição, tendo em vista a adaptação de crescimento dos fungos derivados marinhos sob condições salinas e alcalinas, como as de 34,5 ppm e pH 8,2 registradas para o local e época da coleta do isolado (informações cedidas pelo CEBIMar/USP), as faixas de pH e salinidade escolhidas foram de 7,0 a 9,0 e de 21 a 35 ppm, respectivamente (Tabela 4). As variáveis pH e salinidade visaram não só a avaliação do desempenho do isolado em condições similares a seu habitat, como também sua aplicação em ambientes ou processos salinos, como a biorremediação de ambientes marinhos impactados e tratamento de efluentes têxteis. Em relação aos nutrientes do

meio de cultivo, foram avaliados os efeitos das concentrações iniciais de quatro fontes de carbono e nitrogênio: glicose, peptona e extrato de levedura, componentes do meio B&K, utilizado em estudos de degradação de poluentes ambientais por fungos marinhos (D' SOUZA *et al.* 2006), e extrato de malte, utilizado anteriormente neste trabalho (Tabela 4). Para a determinação do efeito da concentração dos HPAs, soluções de cada HPA foram separadamente adicionadas ao meio líquido após 72 h de incubação, resultando em uma concentração final de 0,02, 0,04 e 0,06 mg mL<sup>-1</sup> de BaP e 0,04, 0,06 e 0,08 mg mL<sup>-1</sup> de pireno. Tais concentrações iniciais foram aumentadas a fim de se verificar o desempenho do isolado incubado sob condições mais próximas às reportadas em estudos anteriores (ZANG *et al.* 2007, ACEVEDO *et al.* 2010, TING *et al.* 2010).

**Tabela 9.** Planejamento experimental do tipo Plackett-Burman para avaliação da influência de 8 fatores sobre o processo de degradação e crescimento do isolado *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 após 7 dias de cultivo.

Ensaio	Temperatura	pH	Salinidade	Glicose	Extrato de Malte	Peptona	Extrato de Levedura	HPA	Meio contendo Pireno		Meio contendo BaP	
									Degradação (%)	Biomassa (mg mL <sup>-1</sup> )	Degradação (%)	Biomassa (mg mL <sup>-1</sup> )
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	45,9	5,0	82,6	12,4
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	48,9	2,2	85,6	3,8
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	91,0	3,4	99,0	6,0
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	86,2	8,4	92,8	11,2
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	96,7	13,6	90,2	16,0
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	82,4	4,6	99,1	13,4
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	93,7	7,0	98,9	9,0
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	49,4	4,4	94,8	8,8
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	62,7	7,8	97,2	6,8
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	99,2	16,4	98,4	4,0
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	69,2	2,4	96,1	6,2
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	52,8	2,0	85,4	2,4
13	0	0	0	0	0	0	0	0	66,6	6,8	98,6	9,8
14	0	0	0	0	0	0	0	0	67,3	7,4	98,3	9,4
15	0	0	0	0	0	0	0	0	69,0	6,2	97,6	9,5

As análises mostraram que a salinidade não interferiu de maneira significativa na degradação do pireno e BaP (Tabelas 10 e 11, respectivamente). Os três maiores valores de degradação de BaP (ensaios 3, 6 e 7, destacados em cinza na Tabela 9) foram alcançados em meio com 35 ppm de salinidade e pH 9,0, o que demonstra a capacidade do isolado em tolerar e degradar de modo eficiente este HPA em condições mais extremas. Nos experimentos contendo pireno, elevados valores de degradação também foram observados (ensaios 5, 7 e 10, destacados em cinza na Tabela 9), inclusive nestas condições de salinidade e alcalinidade (ensaio 7). O pH e a temperatura apresentaram efeitos positivos sobre sua degradação, enquanto que a concentração do HPA demonstrou efeito negativo (Tabela 10).

**Tabela 10.** Níveis das variáveis e análise estatística do delineamento de Plackett-Burman sobre o processo de degradação do pireno.

<b>Fator</b>	<b>Nível inferior -1</b>	<b>Nível superior +1</b>	<b>Efeito</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>p-valor</b>
<b>Temperatura (°C)</b>	22	28	6,7500	2,7531	0,0497 <sup>a</sup>
<b>pH</b>	7	9	14,2833	2,7531	0,0020 <sup>a</sup>
<b>Salinidade (ppm)</b>	21	35	3,1833	2,7531	0,2915
<b>Glicose (g L<sup>-1</sup>)</b>	5	15	- 0,4833	2,7531	0,8664
<b>Extrato de Malte (g L<sup>-1</sup>)</b>	5	15	14,1167	2,7531	0,0022 <sup>a</sup>
<b>Peptona (g L<sup>-1</sup>)</b>	0	2	18,1167	2,7531	0,0006 <sup>a</sup>
<b>Extrato de Levedura (g L<sup>-1</sup>)</b>	0	2	5,0167	2,7531	0,1182
<b>Pireno (mg mL<sup>-1</sup>)</b>	0,04	0,08	- 26,8500	2,7531	0,0001 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> indica as variáveis de efeito significativo a  $p < 0,1$ .

**Tabela 11.** Níveis das variáveis e análise estatística do delineamento de Plackett-Burman sobre o processo de degradação do BaP.

Fator	Nível inferior -1	Nível superior +1	Efeito	Erro Padrão	p-valor
Temperatura (°C)	22	28	- 3,7833	2,0219	0,1105
pH	7	9	2,9500	2,0219	0,1948
Salinidade (ppm)	21	35	2,3833	2,0219	0,2831
Glicose (g L <sup>-1</sup> )	5	15	- 0,1833	2,0219	0,9307
Extrato de Malte (g L <sup>-1</sup> )	5	15	6,2167	2,0219	0,0218 <sup>a</sup>
Peptona (g L <sup>-1</sup> )	0	2	7,4833	2,0219	0,0101 <sup>a</sup>
Extrato de Levedura (g L <sup>-1</sup> )	0	2	0,3167	2,0219	0,8807
BaP (mg mL <sup>-1</sup> )	0,02	0,06	- 1,5500	2,0219	0,4724

<sup>a</sup> indica as variáveis de efeito significativo a  $p < 0,1$ .

Diversos estudos mostram que, diferentemente do observado para o basidiomiceto *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 no presente trabalho, a biodegradação pode ser afetada negativamente com o aumento da concentração de sal (DIAZ *et al.* 2000, MINAI-TEHRANI *et al.* 2009), incluindo a degradação de HPAs por basidiomicetos (VALENTIN *et al.* 2006). Os resultados deste trabalho reforçam a importância do isolado *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 em processos de biorremediação. Um número significativo de ecossistemas contaminados com óleo derramado é caracterizado por sua salinidade, que varia de níveis moderados a extremamente elevados como, por exemplo, estuários, praias, restingas, lagos e piscinas naturais. O óleo bruto é uma mistura complexa que contém principalmente hidrocarbonetos alifáticos, alicíclicos e aromáticos (VAN HAMME *et al.* 2003). Em adição, todo ano bilhões de galões de água residual contendo elevadas concentrações de sais e lixo orgânico são gerados pelas indústrias. Água residual oleosa também é gerada durante a produção, transporte e refino do óleo bruto. Sabe-se que esta água residual pode ser até três vezes mais salina que a água do mar (DIAZ *et al.* 2002). Salinidade elevada ou uma ampla variação de seu nível pode dificultar a biorremediação devido à ruptura da membrana celular, desnaturação de enzimas ou dessecação por

osmose, que são letais a muitos micro-organismos (KARGI & DINCER 2000). A biorremediação destes resíduos, sem etapas adicionais de diluição, requer micro-organismos que tolerem os ambientes salinos. Além disso, diversas indústrias, como as têxteis, de papel e celulose e de tintas, são grandes consumidoras de corantes que, dependendo do processo utilizado, tornam o efluente residual salino e extremamente alcalino (SHEN *et al.* 2011).

Para todos os ensaios, a atividade ligninolítica de Lacase, LiP e MnP foi ausente ou bastante reduzida em comparação ao obtido anteriormente neste trabalho (resultados não demonstrados). Portanto, os efeitos das variáveis sobre suas atividades não foram analisados e discutidos. Sabe-se que a atividade ligninolítica pode ser afetada por diferentes concentrações de sais (BONUGLI-SANTOS 2010) e em alguns casos a produção ligninolítica pode ser inexistente sob condições salinas (VALENTIN *et al.* 2006).

Para ambos os HPAs, as menores taxas de degradação (82,6% de BaP e 45,9% de pireno) foram obtidas no ensaio 1, que continha 5 g L<sup>-1</sup> de extrato de malte (-1), 0 g L<sup>-1</sup> de peptona (-1), 5 g L<sup>-1</sup> de glicose (-1), 2 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura (+1), ou seja, baixa concentração de nutrientes, e a concentração máxima de HPA (+1) deste delineamento (Tabela 9). A análise dos resultados mostrou que o extrato de malte e a peptona possuem efeito positivo sobre a degradação de ambos os HPAs estudados (Tabelas 10 e 11).

As maiores taxas de degradação de pireno e BaP (99,2 e 99,1%, respectivamente) foram obtidas em ensaios com grande acúmulo de biomassa (16,4 e 13,4 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Contudo, valores elevados também foram observados em ensaios que apresentaram menor crescimento micelial. Os efeitos das variáveis sobre o crescimento do isolado também foram avaliados a fim de garantir seu crescimento e sobrevivência frente a maiores concentrações de HPAs. Todas as variáveis apresentaram efeito significativo sobre o crescimento micelial em meio contendo pireno, sendo os nutrientes e

a temperatura de efeito positivo. Nenhuma variável mostrou efeito significativo sobre o crescimento micelial em presença de BaP.

Levando em consideração os resultados obtidos para as duas respostas (degradação e crescimento micelial) e visando um meio padrão para uma eficiente degradação de ambos os HPAs, as variáveis escolhidas para a etapa seguinte foram as concentrações iniciais de glicose, extrato de malte, peptona e HPA. Uma vez que os HPAs pireno e BaP foram degradados a elevadas taxas (82,4% e 99,1%, respectivamente, ensaio 6, Tabela 9) ainda que sob condições de sua máxima concentração inicial, o tempo de cultivo foi reduzido para 4 dias e o nível superior da concentração do BaP foi aumentado para 0,08 mg mL<sup>-1</sup>. O extrato de levedura foi removido, pois não mostrou efeito significativo sobre a degradação. Devido ao aumento da concentração inicial de BaP e diminuição do tempo de cultivo, a glicose foi mantida como uma fonte de carbono adicional, apesar de não ter apresentado efeito significativo sobre a degradação. Sua faixa de estudo variou de 0 a 5,2 g L<sup>-1</sup> no novo delineamento. O pH e a salinidade foram fixados a 8,0 e 35 ppm, respectivamente. A temperatura foi fixada a 28 °C pois teve efeito positivo para a degradação do pireno (Tabela 10).

### **Fatorial Fracionado 2<sup>4-1</sup>**

Após os resultados obtidos com o modelo Plackett-Burman, foi aplicado o modelo fatorial fracionado 2<sup>4-1</sup>, visando avaliação de 4 fatores (concentrações iniciais de glicose, extrato de malte, peptona e HPA) sobre o processo de degradação e crescimento do isolado *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, após 4 dias de cultivo.

Os maiores valores de degradação foram obtidos no ensaio 8 (Tabela 12, destacado em cinza), em que os três nutrientes estavam em seu nível superior. Neste ensaio, a concentração inicial dos HPAs era de 0,08 mg mL<sup>-1</sup>, o que mais uma vez demonstra a capacidade deste fungo em sobreviver sob elevadas concentrações destes

poluentes, mantendo uma alta taxa de degradação. Elevados valores também foram observados dos ensaios 4 e 7, em meio com pireno, e 4, 6 e 11, em meio com BaP (Tabela 12, destacados em cinza). Os menores valores de degradação foram observados no ensaio 2, em que os nutrientes de efeito positivo significativo sobre a resposta, extrato de malte e peptona, estavam em seu nível inferior. A degradação de 0,08 mg mL<sup>-1</sup> de pireno aumentou de 82,4% no delineamento utilizando PB (ensaio 6, Tabela 9) para 98,6%, em um menor tempo de cultivo (ensaio 8, Tabela 12).

**Tabela 12.** Planejamento fatorial fracionado 2<sup>4-1</sup> para avaliação de 4 fatores sobre o processo de degradação e crescimento do isolado *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 após 4 dias de cultivo.

Ensaio	Glicose	Extrato de Malte	Peptona	HPA	Meio contendo Pireno		Meio contendo BaP	
					Degradação (%)	Biomassa (mg mL <sup>-1</sup> )	Degradação (%)	Biomassa (mg mL <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	-1	-1	94,2	7,8	89,7	6,8
2	+1	-1	-1	+1	92,2	4,2	77,4	8,6
3	-1	+1	-1	+1	97,8	9,3	86,6	11,0
4	+1	+1	-1	-1	98,0	3,3	95,5	10,3
5	-1	-1	+1	+1	97,2	5,6	94,7	8,7
6	+1	-1	+1	-1	97,7	7,4	95,5	8,6
7	-1	+1	+1	-1	98,5	7,2	95,4	8,5
8	+1	+1	+1	+1	98,6	8,4	99,3	10,0
9	0	0	0	0	95,3	6,9	93,5	10,6
10	0	0	0	0	96,2	7,2	94,1	10,0
11	0	0	0	0	97,9	6,8	95,7	10,5

Como o aumento da concentração de extrato de malte só teve efeito positivo para a degradação do pireno e para o crescimento micelial em meio contendo BaP, a concentração deste nutriente foi fixada a 25 g L<sup>-1</sup> na etapa seguinte (Tabelas 13 e 14). A concentração de HPA foi fixada a 0,08 mg mL<sup>-1</sup>, porém o tempo de cultivo após sua adição foi reduzido a 2 dias. O nível superior da glicose foi reduzido a 2,4 g L<sup>-1</sup>.

No presente experimento, novamente a atividade ligninolítica foi baixa ou inexistente e nenhuma variável mostrou efeito significativo sobre ela (resultados não demonstrados). Além da condição salina, o acréscimo de peptona, que representa grande fonte de nitrogênio, pode ter levado à inibição destas enzimas, uma vez que o sistema ligninolítico de fungos de degradação branca é disparado pela falta de nitrogênio (KEYSER *et al.* 1978).

**Tabela 13.** Níveis das variáveis e análise estatística do delineamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$  sobre o processo de degradação do pireno.

Fator	Nível inferior -1	Nível superior +1	Efeito	Erro Padrão	p-valor
Glicose (g L <sup>-1</sup> )	0	5,2	- 0,3000	0,9703	0,7676
Extrato de Malte (g L <sup>-1</sup> )	15	25	2,9000	0,9703	0,0243 <sup>a</sup>
Peptona (g L <sup>-1</sup> )	2	4	2,4500	0,9703	0,0450 <sup>a</sup>
Pireno (mg mL <sup>-1</sup> )	0,04	0,08	- 0,6500	0,9703	0,5279

<sup>a</sup> indica as variáveis de efeito significativo a  $p < 0,1$ .

**Tabela 14.** Níveis das variáveis e análise estatística do delineamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$  sobre o processo de degradação do BaP.

Fator	Nível inferior -1	Nível superior +1	Efeito	Erro Padrão	p-valor
Glicose (g L <sup>-1</sup> )	0	5,2	0,3250	3,0814	0,9194
Extrato de Malte (g L <sup>-1</sup> )	15	25	4,8750	3,0814	0,1647
Peptona (g L <sup>-1</sup> )	2	4	8,9250	3,0814	0,0275 <sup>a</sup>
BaP (mg mL <sup>-1</sup> )	0,06	0,08	- 4,5250	3,0814	0,1923

<sup>a</sup> indica as variáveis de efeito significativo a  $p < 0,1$ .

## DCCR

Visando avaliação de dois fatores (concentrações iniciais de glicose e peptona) sobre o processo de degradação de 0,08 mg mL<sup>-1</sup> de HPA e crescimento do isolado *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 após 48 h de cultivo, um delineamento DCCR foi utilizado.

Ambos os HPAs foram degradados a elevadas taxas (ensaios destacados em cinza, Tabela 15). Os resultados de degradação do pireno não apresentaram variação significativa entre eles (Tabela 15). Desta forma, não foi possível construir modelos probabilísticos e obter a superfície de resposta. Entretanto, o estudo pontual dos experimentos não foi inviabilizado. Em adição, pode-se dizer que o objetivo principal, que era o de atingir uma eficiente degradação avaliando a influência de diferentes variáveis durante o processo, foi alcançado: 98,2% de degradação de pireno em 48 h de cultivo (Tabela 15, ensaio 10, destacado em cinza). O ensaio 1, que continha ambos os nutrientes glicose e peptona em seu nível -1, apresentou o menor valor de degradação: 92,5%.

**Tabela 15.** Planejamento DCCR para avaliação de 2 fatores sobre o processo de degradação e crescimento do isolado *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 após 48 h de cultivo.

Ensaio	Glicose	Peptona	Meio contendo Pireno		Meio contendo BaP	
			Degradação (%)	Biomassa (mg mL <sup>-1</sup> )	Degradação (%)	Biomassa (mg mL <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	92,5	7,3	78,9	7,6
2	+1	-1	95,1	8,0	81,0	5,3
3	-1	+1	98,0	7,8	92,6	6,9
4	+1	+1	97,5	9,0	67,7	6,2
5	-1,41	0	96,9	7,4	74,5	6,4
6	+1,41	0	98,0	9,3	73,0	5,7
7	0	-1,41	97,9	7,0	87,2	5,9
8	0	+1,41	97,8	9,2	75,1	5,6
9	0	0	97,1	6,7	83,7	6,4
10	0	0	98,2	7,0	85,8	6,4
11	0	0	98,0	6,7	85,7	6,2

Nenhuma atividade de Lacase, LiP e MnP foi registrada para todos os ensaios deste experimento. Experimentos adicionais mostraram que após 72 h de cultivo, portanto antes da adição de HPA, a biomassa inicial média das réplicas do ponto central era de 2,6 mg mL<sup>-1</sup> e nenhuma atividade LiP, MnP ou Lacase foi registrada, sugerindo a

degradação do pireno pelo isolado *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 sem a participação destas enzimas.

Os ensaios do ponto central, que possuíam as maiores taxas de degradação, foram concentrados e analisados por CG-EM para identificação dos metabólitos formados, conforme metodologia descrita no item 4.3.3. As análises através dos modos SIM e *Full Scan* possibilitaram a detecção e identificação dos metabólitos I, II, III e IV, sendo o primeiro o mais abundante. Os metabólitos identificados sugerem o metabolismo de pireno via sistema CYP e pela atividade das epóxido hidrolases, como também observado no item 5.2.3.

No caso da degradação de BaP, a regressão múltipla a partir dos resultados obtidos no DCCR para dois fatores (Tabela 15) levou a proposição de um modelo matemático. O modelo de segunda ordem envolveu todos os termos do polinômio com exceção apenas do termo quadrático da concentração de peptona, que não foi estatisticamente significativo (Apêndice E). A equação do modelo reparametrizado, a partir das variáveis codificadas, está disposta abaixo:

$$Y = 83,839 - 3,124 x_1 - 2,089 x_2 - 4,643 x_1^2 - 6,750 x_1x_2 \quad \text{(Equação 2)}$$

em que Y é a resposta predita (degradação de BaP, %);  $x_1$  e  $x_2$  são, respectivamente, as variáveis independentes concentração de glicose e de peptona em termos dos valores codificados.

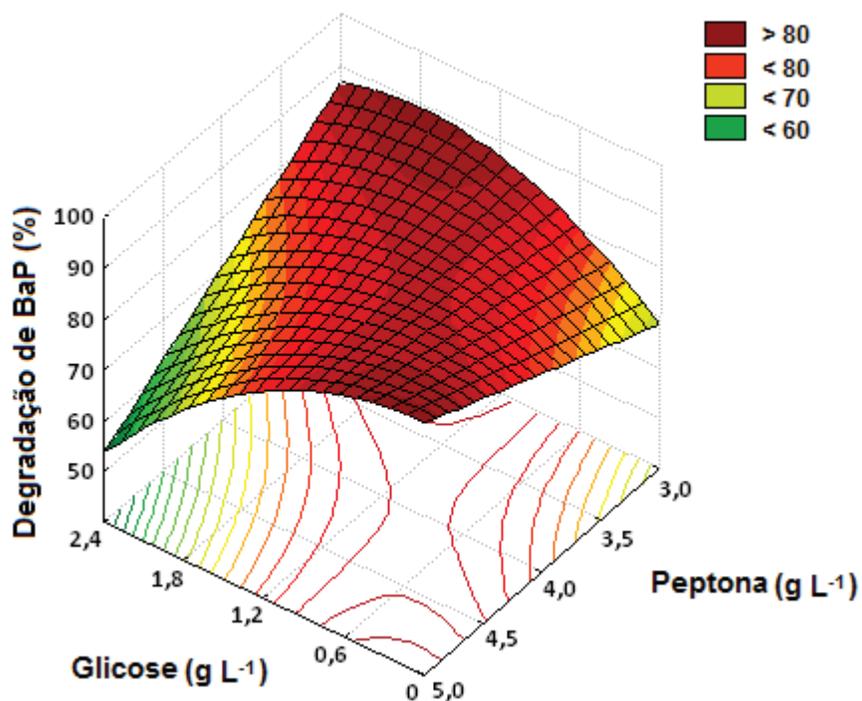
Pela ANOVA do modelo codificado, apresentada na Tabela 16, observou-se que o modelo que descreve a resposta predita (degradação de BaP) em função das variáveis estudadas, com os parâmetros estatisticamente significativos, pode ser considerado adequado. A porcentagem de variação explicada pelo modelo foi de 78%, e o  $F_{cal}$  foi

considerado significativo ( $F_{cal} > F_{tab}$ ), satisfazendo os requisitos para a construção da superfície de resposta (Figura 17) (RODRIGUES & IEMMA 2009).

**Tabela 16.** ANOVA do modelo quadrático para a degradação de BaP após 48 h de cultivo.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado ( $F_{cal}$ )
Regressão	426,85	4	106,71	5,43
Resíduo	117,87	6	19,64	
F ajuste	115,07	4	28,76	
Erro puro	2,80	2	1,40	
Total	544,72	10	54,47	

$R^2 = 0,78$ ;  $F_{tab}=3,18$ ; nível de significância = 90%.



**Figura 17.** Superfície de resposta para a degradação do BaP pelo isolado *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 em função das concentrações de glicose e peptona.

A menor porcentagem de degradação do BaP (67,7%) foi observada no ensaio 4, em que glicose e peptona estavam em seu nível +1 (2,05 e 4,7 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, Tabela 15). A maior porcentagem (92,6%) foi observada para o ensaio 3, em que a

glicose e a peptona estavam nos níveis -1 (0,35 g L<sup>-1</sup>) e +1, respectivamente (Tabela 15). Estes resultados indicam um efeito negativo do aumento da concentração de glicose sobre a resposta quando a peptona está fixada a 4,7 g L<sup>-1</sup>.

As atividades de LiP, MnP e Lacase não foram detectadas nos 11 ensaios realizados no DCCR.

A superfície de resposta mostrou que o meio de cultivo contendo as concentrações máximas de glicose e peptona (2,4 e 5,0 g L<sup>-1</sup>, respectivamente) resultaria em redução da taxa de biodegradação (Figura 17). De acordo com o predito pelo modelo (Equação 2), a degradação do BaP ficaria reduzida a 53,8% se as variáveis glicose e peptona estivessem em seu nível +1,41 (2,4 e 5 g L<sup>-1</sup>, respectivamente). De acordo com a superfície de resposta, os maiores valores de degradação (em torno de 90%, segundo o modelo) podem ser obtidos na ausência de glicose (-1,41) e com 5 g L<sup>-1</sup> de peptona (+1,41). Com 0 g L<sup>-1</sup> de glicose (-1,41) e 3 g L<sup>-1</sup> de peptona (+1) a degradação do BaP seria de 86,4%.

A fim de verificar a adequação do modelo, a degradação do BaP foi testada sob condições otimizadas do meio de cultivo. Com base nos resultados observados pela superfície de resposta e visando uma elevada taxa de remoção em um meio menos complexo, a validação do modelo foi feita na ausência de glicose e com 5,0 g L<sup>-1</sup> de peptona, mantendo-se as demais condições de cultivo descritas para o DCCR. A biomassa atingida após 48 h de cultivo em presença de BaP foi de 6,9 mg mL<sup>-1</sup>. A degradação dos 0,08 mg mL<sup>-1</sup> iniciais de BaP foi de 94,4%, enquanto que o valor predito pelo modelo (Equação 2) foi de 89,5% (erro relativo de 5,2%). O modelo foi, portanto, considerado confiável para a previsão da degradação de BaP por *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062. Em adição, os erros relativos, calculados com base nas diferenças entre a degradação observada e a predita pelo modelo para cada um dos 11 ensaios, estavam todos abaixo de 10%, o que contribui com a confiabilidade e adequação do modelo (Tabela 17) (RODRIGUES & IEMMA 2009).

**Tabela 17.** Degradação observada e predita pelo modelo e erros absoluto e relativo para cada ensaio.

Ensaio	Glicose (g L <sup>-1</sup> )	Peptona (g L <sup>-1</sup> )	Degradação observada (%)	Degradação predita (%)	Erro absoluto	Erro relativo (%)
1	0,35	3,3	78,9	77,6	1,2	1,6
2	2,05	3,3	81,0	84,9	-3,9	-4,8
3	0,35	4,7	92,6	87,0	5,6	6,1
4	2,05	4,7	67,7	67,2	0,5	0,7
5	0	4,0	74,5	79,0	-4,5	-6,1
6	2,40	4,0	73,0	70,2	2,8	3,8
7	1,20	3,0	87,2	86,8	0,4	0,5
8	1,20	5,0	75,1	80,9	-5,8	-7,7
9	1,20	4,0	83,7	83,8	-0,1	-0,2
10	1,20	4,0	85,8	83,8	2,0	2,3
11	1,20	4,0	85,7	83,8	1,9	2,2

Ensaio complementares mostraram que a biomassa inicial, formada após 72 h de incubação sem BaP, sob as condições de cultivo da validação do modelo, era em média de 2,6 mg mL<sup>-1</sup>. As atividades de LiP, MnP e Lacase não foram detectadas. A fim de se detectar possíveis metabólitos, as réplicas utilizadas na validação do modelo foram concentradas e analisadas por CG-EM, conforme metodologia descrita no item 4.3.3. As análises através dos modos SIM e *Full Scan* possibilitaram a detecção de um pico cromatográfico correspondente ao íon molecular de *m/z* 268 (*t<sub>R</sub>*=51,232) (Anexo D). Os íons fragmentos de *m/z* 239 e *m/z* 119 também foram detectados, caracterizando o espectro de massas de isômeros do hidroxibenzo[a]pireno (CAÑAS *et al.* 2007). Este metabólito (metabólito V) não foi identificado nas amostras analisadas anteriormente nos ensaios de detecção de metabólitos (item 5.2.3.) provavelmente devido a sua baixa concentração e/ou pela presença de interferentes. Da mesma forma que os metabólitos resultantes da degradação do pireno, o metabólito V também sugere que o metabolismo de BaP tenha ocorrido via sistema CYP e pela atividade das epóxido hidrolases (CERNIGLIA & SUTHERLAND 2010).

Após cada etapa do planejamento experimental em presença de pireno e BaP foi observada uma redução da biomassa alcançada (PB, 16,4 mg mL<sup>-1</sup>; fatorial fracionado 2<sup>4-1</sup>, 9,3 mg mL<sup>-1</sup>; DCCR, 9,3 mg mL<sup>-1</sup>; e PB, 16,0 mg mL<sup>-1</sup>; fatorial fracionado 2<sup>4-1</sup>, 11,0 mg mL<sup>-1</sup>; DCCR, 7,6 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Entretanto, esse resultado deve ter ocorrido devido à diminuição do tempo de cultivo que passou de 7 dias (PB) para 48 h (DCCR). Mesmo após 48 h de incubação em presença de HPA, o crescimento micelial atingiu valores superiores aos obtidos na etapa de seleção dos três basidiomicetos após 21 dias de cultivo (item 5.1.3.). Em um estudo anterior reportado por Chulalaksananukul *et al.* (2006) o fungo *Fusarium* sp. E033 sobreviveu sob concentrações de 0,2 e 0,3 µg mL<sup>-1</sup> de BaP, mas seu crescimento foi significativamente limitado em comparação a concentrações mais baixas do HPA (0,1 µg mL<sup>-1</sup>). A taxa de degradação do BaP pelo fungo *Fusarium* sp. E033 também foi afetada, o que não ocorreu com o isolado *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 utilizado neste estudo, demonstrando o potencial deste fungo para aplicação em processos de biorremediação.



## 6. CONCLUSÕES

- Os métodos de triagem dos três basidiomicetos derivados marinhos (*Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061, *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 e *Peniophora* sp. CBMAI 1063) foram aplicados com sucesso e permitiram a seleção de *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 como o fungo de maior potencial para degradação dos poluentes ambientais pireno e BaP.
- O fungo selecionado foi capaz de se desenvolver e degradar de maneira rápida e eficiente todas as concentrações de pireno e BaP utilizadas no estudo e os resultados de análise dos metabólitos sugerem que o mesmo utilizou mono-oxigenases do sistema Citocromo P450 e epóxido hidrolases. A produção de enzimas ligninolíticas, em especial a Lacase, em meio contendo extrato de malte (com e sem a adição de HPA) bem como em meio mineral acrescido dos HPAs como única fonte de carbono sugere que estas enzimas possam também estar associadas ao metabolismo de pireno e BaP pelo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062. Entretanto, os metabólitos derivados da via de degradação por enzimas ligninolíticas não foram detectados nas condições estudadas.
- Quando submetido a 35 ppm de salinidade e pH 9,0, o fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 continuou apresentando altas porcentagens de degradação dos HPAs estudados, porém a atividade ligninolítica não foi detectada nestas condições.
- O planejamento experimental e sua análise estatística mostraram ser uma ferramenta importante para os estudos de degradação de HPAs, crescimento micelial e atividade ligninolítica, agregando confiabilidade aos resultados. A aplicação do planejamento experimental resultou em condições de cultivo otimizadas para uma eficiente degradação dos HPAs estudados. Em adição, foi possível a elaboração de um modelo preditivo de degradação do BaP pelo fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062.
- Os resultados apresentados nesta dissertação evidenciam o potencial do fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 para remediação de ambientes salinos e/ou alcalinos,

como é o caso de ambientes impactados por petróleo e seus derivados e de efluentes de indústrias têxteis, bem como para a aplicação biotecnológica de suas enzimas ligninolíticas. Além disso, os resultados obtidos abrem perspectivas de estudos futuros relacionados com a produção, aplicação e caracterização das enzimas ligninolíticas, degradação de HPAs utilizando consórcios microbianos; toxicidade dos metabólitos gerados, avaliação da expressão de genes que codificam para as enzimas envolvidas na degradação, entre outros.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELHAY, A., Magnin, J.P., Gondrexon, N., Baup, S. & Willison, J. 2008. Optimization and modeling of phenanthrene degradation by *Mycobacterium* sp. 6PY1 in a biphasic medium using response-surface methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78: 881–888.
- ACEVEDO, F., Pizzul, L., Castillo, M. del P., Cuevas, R. & Diez, M.C. 2011. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthracoephyllum discolor*. *Journal of Hazardous Materials* 185: 212–219.
- ALAM, Z., Mansor, M.F., Jalal, K.C.A. 2009. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white-rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* 19: 771–783.
- ANASTASI, A., Coppola, T., Prigione, V. & Varese, G.C. 2009. Pyrene degradation and detoxification in soil by a consortium of basidiomycetes isolated from compost: Role of laccases and peroxidases. *Journal of Hazardous Materials* 165: 1229–1233.
- ASGHER, M., Bhatti, H.N., Ashraf, M. & Legge, R.L. 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* 19: 771–783.
- BALDRIAN, P. 2006. Fungal laccases occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 215–242.
- BAMFORTH, S.M. & SINGLETON, I. 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80: 723–736.
- BARASSA, J.M., Gutierrez, A., Escaso, V., Guillen, F., Martinez, M.J. & Martinez, A.T. 1998. Electron and fluorescence microscopy of extracellular glucan and aryl-alcohol oxidase during wheatstraw degradation by *Pleurotus eryngii*. *Sppl. Environ. Microbiol.* 64: 325–332.
- BENNETT, J.W. & FAISON, B.D. 1997. Use of fungi in biodegradation. In: Hurst, C.J. (Ed.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington, DC, 758–765.
- BEZALEL, L., Hadar, Y., Fu, P.P., Freeman, J.P. & Cerniglia, C.E. 1996. Initial Oxidation Products in the Metabolism of Pyrene, Anthracene, Fluorene, and Dibenzothiophene by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2554–2559.
- BLUMER, M. 1976. Polycyclic aromatic compounds in nature. *Sci. Am.* 234: 34–45.
- BOGAN, B.W. & LAMAR, R.T. 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HNB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. *Applied and Environmental Microbiology* 62:1597-1603.
- BONUGLI-SANTOS, R.C. 2010. Fungos derivados de macro-organismos marinhos: diversidade genética e potencial biotecnológico. Dissertação (doutorado). 168 p. Universidade Estadual de Campinas.
- BONUGLI-SANTOS, R.C., Durrant, L.R. & Sette, L.D. 2010a. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 46: 32–37.
- BONUGLI-SANTOS, R.C., Durrant, L.R. & Sette, L.D. 2010b. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. *Fungal Biol.* 114: 863–872.
- BONUGLI-SANTOS, R.C., Durrant, L.R. & Sette, L.D. 2012. The production of ligninolytic enzymes by marine-derived basidiomycetes and their biotechnological potential in the biodegradation of recalcitrant pollutants and the treatment of textile effluents. *Water, Air, & Soil Pollution* 223: 2333–2345.
- BUGNI, T.S. & IRELAND, C.M. 2004. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat. Prod. Rep.* 21: 143–163.
- CAJTHAML, T., Erbanová, P., Kollmann, A., Novotný, C., Sasek, V., Mougin, C. 2008. Degradation of PAHs by ligninolytic enzymes of *Irpex lacteus*. *Folia Microbiol.* 53: 289–294.
- CAÑAS, A.I., Alcalde, M., Plou, F., Martínez, M.J., Martínez, A.T. & Camarero, S. 2007. Transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase is strongly enhanced by phenolic compounds present in soil. *Environ. Sci. Technol.* 41: 2964–2971.
- CAPOTORTI, G., Diganvincenzo, P., Cesti, P., Bernardi, A. & Guglielmetti, G. 2004. Pyrene and benzo(a)pyrene metabolism by an *Aspergillus terreus* strain isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbons polluted soil. *Biodegradation* 15: 79–85.
- CERNIGLIA, C.E., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3: 351–368.
- CERNIGLIA, C.E., Sutherland, J.B. & Crow, S.A. 1992. Fungal metabolism of aromatic hydrocarbons. In: Winkelmann, G. (Ed.), *Microbial Degradation of Natural Products*. Verlag Chemie Press, Weinheim, Germany, 193–217.
- CERNIGLIA, C.E. 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 19: 324–333.

- CERNIGLIA, C.E. & SUTHERLAND, J.B. 2010. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungi. In: Timmis, K.N. (Ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2079-2110.
- CETESB. 2007a. Decisão de Diretoria nº 103/2007/C/E, de 22 de junho de 2007. 40p. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/>. Acesso em 20 de fevereiro de 2012.
- CETESB. 2007b. Avaliação do Uso de Produtos Biotecnológicos para Tratamento de Efluentes Líquidos, Resíduos Sólidos e Remediação de Solos e Águas - L1.022. 21p. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/>. Acesso em 20 de fevereiro de 2012.
- CHEN, B., Wang, Y. & Hu, D. 2010. Biosorption and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solutions by a consortium of white-rot fungi. *Journal of Hazardous Materials* 179: 845–851.
- CHIGU, N.L., Hirose, S., Nakamura, C., Teramoto, H., Ichinose, H. & Wariishi, H. 2010. Cytochrome P450 monooxygenases involved in anthracene metabolism by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology Biotechnology* 87: 1907–1916.
- CHULALAKSANANUKUL, S., Gadd, G.M., Sangvanich, P., Sihanonth, P., Piapukiew, J. & Vangnai, A.S. 2006. Biodegradation of benzo(a)pyrene by a newly isolated *Fusarium* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* 262: 99–106.
- CONAMA. 2002. Resolução nº 314, de 29 de outubro de 2002. Dispõe sobre o registro de produtos destinados à remediação e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 nov. 2002. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res02/res31402.html>. Acesso em 12 de março de 2012.
- CONNAY, A.H. 1982. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: GHA clowes; memorial lecture. *Cancer. Res.* 42: 4875–4917.
- COUNTWAY, R.E., Dickhut, R.M. & Canuel, E.A. 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) distributions and associations with organic matter in surface waters of the York River, VA Estuary. *Org. Geochem.* 34: 209-224.
- COUTO, R.S. & HERRERA J.L.T. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol. Adv.* 24: 500–513.
- DAMARE, S., Raghukumar, C., Muraleedharan, U.D. & Raghukumar, S. 2006. Deep-sea fungi as a source of alkaline and cold-tolerant proteases. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 172-181.
- DECKER, M., Arand, M. & Cronin, A. 2009. Mammalian epoxide hydrolases in xenobiotic metabolism and signaling. *Arch. Toxicol.* 83: 297–318.
- DHAWALE, S.W., Dhawale, S.S. & Dean-Ross, D. 1992. Degradation of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium* occurs under ligninolytic as well as nonligninolytic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3000-3006.
- DÍAZ, M.P. Grigson, S.J.W., Peppiatt, C. & Burgess, J.G. 2000. Isolation and characterisation of novel hydrocarbon degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. *Mar. Biotechnol.* 2: 522-532.
- DING, J., Cong, J., Zhou, J. & Gao, S. 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and extracellular enzyme secretion in agitated and stationary cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Environ. Sci.* 20: 88–93.
- D'SOUZA, D.T., Tiwari, R., Sah, A.K. & Raghukumara, C. 2006. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 504–511.
- EIBES, G., Cajthmal, T., Moreira, M.T., Feijoo, G. & Lema, J.M. 2006. Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. *Chemosphere* 64: 408–414.
- FORGACS, E., Cserhádi, T. & Oros, G. 2004. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environment International* 30: 953–971
- GAN, S., Lau, E.V. & Ng, H.K. 2009. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials* 172: 532-549.
- GUENGERICH, F.P. & Shimada, T. 1991. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 4: 391–407.
- HADIBARATA, T. 2009. Oxidative degradation of benzo[a]pyrene by the ligninolytic fungi. In Obayashi, Y., Isobe, T., Subramanian, A., Suzuki, S. & Tanabe, S (Eds). *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Environmental Research in Asia*, TERRAPUB, 309–316.
- HAITZER, M., Hoss, S., Traunspurger, W. & Steinberg, C., 1998. Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms - A review. *Chemosphere* 37: 1335-1362.

- HAMMEL, K.E., Kalyanaraman, B., Kirk, T.K. 1986. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[*p*]dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *J. Biol. Chem.* 261: 16948–16952.
- HARITASH, A.K., & KAUSHIK, C.P. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J. Hazard. Mater.* 169: 1-15.
- HARKIN, M., Larsen, M.J., Obst, J.R. 1974. Use of syringaldazine for detection of laccase in sporophores of wood rotting fungi. *Mycologia* 66: 469-476.
- HARMS, H., Schlosser, D. & Wick, L.Y. 2011. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Applied and Industrial Microbiology* 9: 177-192.
- HAUSER, B., Schrader, B.H. & Bahadir, M. 1997. Comparison of acute toxicity and genotoxicity concentrations of single compounds and waste elutriate using the Microtox/Mutatox Test system. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 38: 227-231.
- HEEMKEN, O.P., Stachel, B., Theobald, N. & Wenclawiak, B.W. 2000. Temporal variability of organic micropollutants in suspended particulate matter of the River Elbe at Hamburg and the River Mulde at Dessau, Germany. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38: 11-31.
- HENNER, P., Schiavon, M. Morel, J-L & Lichtfouse, E. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) occurrence and remediation methods. *Analisis* 25: 9-10.
- HODGSON, E. & Rose, R.L. 2010. Reactive Metabolites. In: Hodgson, E. (Ed.). *A Textbook of Modern Toxicology*, 4th edition. John Wiley and Sons. Hoboken, NJ, 157-171.
- HWANG, H.M., Shi, X., Ero, I., Jayasinghe, A., Dong, S. & Yu, H. 2001. Microbial ecotoxicity and mutagenicity of 1-hydroxypyrene and its photoproducts. *Chemosphere* 45: 445–451.
- HYDE, K.D., Sarma, V.V. & Jones, E.B.G. 2000. Morphology and taxonomy of higher marine fungi. In: *Marine Mycology - A Practical Approach* (eds. K.D. Hyde and S.B. Pointing), Fungal Diversity Research Series 1: 172-204.
- JACOB, J. 2008. The significance of polycyclic aromatic hydrocarbons as environmental carcinogens. 35 years research on PAH – a retrospective. *Polycyclic Aromatic Compounds* 28: 242–272.
- JOHNSEN, A.R., Wick, L.Y. & Harms, H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Pollut.* 133: 71–84.
- JUHASZ, A.L., Britz M.L. & Stanley G.A. 1997. Pyrene Degradation and Metabolite Formation by *Burkholderia cepacia* Strain VUN 10,003. *Australasian Biotechnology* 7: 350-354.
- JUHASZ, A.L. & NAIDU, R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo(a)pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation* 45: 57-88.
- KANALY, R.A. & HARAYAMA, S. 2000. Biodegradation of high molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182: 2059–2067.
- KAPITULNIK, J., Levin, W. Conney, A.H., Yagi, H. & Jerina, D.M. 1977. Benzo[*a*]pyrene 7,8-dihydrodiol is more carcinogenic than benzo[*a*]pyrene in newborn mice. *Nature* 266: 378-380.
- KARGI, F., & DINCER, A.R. 2000. Use of halophilic bacteria in biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation. *Water Environ. Res.* 72: 170-174
- KECK, J., Sims, R.C., Coover, M. 1989. Evidence for cooxidation of polynuclear aromatic hydrocarbons in soil. *Water Res.* 23, 1467-1476.
- KENNISH, M.J. 1992. *Ecology of estuaries: anthropogenic effects*. Boca Raton: CRC Press, 494 p.
- KESTER, D.R., Duedall, I.W., Connors, D.N. & Pytkowicz, R.M. 1967. Preparation of Artificial Seawater. *Limnology & Oceanography* 12: 176-179.
- 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.
- KOHLMEYER, J. & KOHLMEYER, E. 1979. *Marine Mycology. The Higher Fungi*. Academic Press, New York.
- KOTTERMANN, M.J.J., Rietberg, H.J., Hage, A. & Field, J.A. 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbon oxidation by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 in the presence of nonionic surfactants. *Biotechnol. Bioeng.* 57: 220–227.
- KUNAMNENI, A., Ballesteros, A., Plou, F.J. & Alcalde, M. 2007. Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. A. Méndez-Vilas (Ed.), Formatex, 233-245.
- KUWAHARA, M., Glenn, J.K, Morgan, M.A. & Golo, M.H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic culture of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* 169: 247-250.

- LANGE, B., Kremer, S. Sterner, O & Anke, H. 1994. Pyrene Metabolism in *Crinipellis stipitaria*: Identification of trans-4,5-Dihydro-4,5-Dihydroxypyrene and 1-Pyrenylsulfate in Strain JK364t. Applied and Environmental Microbiology 60: 3602-3607.
- LANGE, B., Kremer, S. Sterner, O & Anke, H. 1996. Metabolism of pyrene by basidiomycetous fungi of the genera *Crinipellis*, *Marasmius* e *Marasmiellus*. Can. J. Microbiol. 42: 1179-1183.
- LAMBERT, M., Kremer, S. Sterner, O. & Anke, H. 1994. Metabolism of pyrene by the basidiomycete *Crinipellis stipitaria* and identification of pyrenequinones and their hydroxylated precursors in strain JK375t. Applied and Environmental Microbiology 60: 3597-3601.
- LAUNEN, L.A., Pinto, L.J. & Moore, M.M. 1999. Optimization of pyrene oxidation by *Penicillium janthinellum* using response-surface methodology. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 510–515.
- LI, A., Zhu, Y., Xu, L., Zhu, W. & Tian, X. 2008. Comparative study on the determination of assay for laccase of *Trametes* sp. African Journal of Biochemistry Research 2: 181-183.
- LI, X.Z., Lin, X.G., Zhang, J., Wu, Y.C., Yin, R., Feng, Y.Z. & Wang Y. 2010. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by crude extracts from spent mushroom substrate and its possible mechanisms. Current Microbiology 60: 336–342.
- LIANG, Y., Gardner, D.R., Miller, C.D., Chen, D., Anderson, A.J., Weimer, B.C. & Sims, R.C.. 2006. Study of Biochemical Pathways and Enzymes Involved in Pyrene Degradation by *Mycobacterium* sp. Strain KMS. Appl. Environ. Microbiol 72: 7821-7828.
- LUNDELL, T.K., Mäkelä, M.R. & Hildén K. 2010. Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes – ecological, functional and phylogenetic review. Journal of Basic Microbiology 50: 5–20.
- MACIEL, M.J.M., Silva, A.C. & Ribeiro, H.C.T. 2010. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. Electronic Journal of Biotechnology, vol. 13, no. 6. <http://dx.doi.org/10.2225/vol13-issue6-fulltext-2>.
- MINAI-TEHRANI, D., Minoui, S. & Herfatmanesh, A. 2009. Effect of salinity on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) of heavy crude oil in soil. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 82: 179–184.
- NIKOLAOU, A., Kostopoulou, M, Lofrano, G. & Meric, S. 2009. Determination of PAHs in marine sediments: analytical methods and environmental concerns. Global NEST Journal 11: 391-405.
- NEMERGUT, D.R., Wunch, K.G., Johnson, R.M. & Bennet, J.W. 2000. Benzo[a]pirene removal by *Marasmiellus troyanus* in soil microcosms. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 25: 116-119.
- NOVOTNÝ, Č., Svobodová, K., Erbanová, P., Cajthaml, T., Kasinath, A., Lang, E. & Šašeka, A. 2004. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. Soil Biology & Biochemistry 36: 1545-1551.
- ONUSKA, F.I. 1989. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. In: Afghan, B.K.; Chau, A.S.Y. (Ed.). Analysis of trace organics in the environment. Boca Raton: CRC Press, 346 p.
- OSTERHAGE, C. 2001. Isolation, Structure Determination and Biological Activity Assessment of Secondary Metabolites from Marine-derived Fungi. Tese de Doutorado. Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, Alemanha.
- PASSARINI, M.R.Z., Sette, L.D. & Rodrigues, M.V.N. 2011. Improved extraction method to evaluate selected PAHs degradation by marine fungi grown in fermentative medium. Journal of the Brazilian Chemical Society 22: 564-570.
- PATEL, H., Gupte, A. & Gupte, S. 2009. Biodegradation of fluoranthene by basidiomycetes fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1. Applied Biochemistry and Biotechnology 157: 367-376.
- PENG, R.H., Xiong, A.S., Xue, Y., Fu, X.Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.S. & Yao, Q.H. 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. FEMS Microbiology Reviews 32: 927–955.
- POINTING, S.B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Appl. Microbiol Biotechnol 57: 20-33.
- RAGHUKUMAR, C, Raghukumar, S., Chinnaraj, A., Chandramohan, D., D'Souza, T.M. & Reddy, C.A. 1994. Laccase and other lignocellulose modifying enzymes of marine fungi isolated from the coast of India. Botanica Marina 37: 515-523.
- RAGHUKUMAR, C. 2002. Bioremediation of coloured pollutants by terrestrial versus facultative marine fungi. In: Fungi in Marine Environment. (ed. K.D. Hyde) Fungal Diversity Research Series 7: 317-344.
- RAGHUKUMAR, C., Mohandass, C., Kamat, S. & Shailaja, M.S. 2004. Simultaneous detoxification and decolorization of molasses spent wash by the immobilized white-rot fungus *Flavodon flavus* isolated from a marine habitat. Enzyme and Microbial Technology 35: 197-202.
- RAGHUKUMAR, C., Shailaja, M.S., Parameswaran, P.S., & Singh, S.K. 2006. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous media by the marine fungus NIOCC#312: involvement of lignin-degrading enzymes and exopolysaccharides. Indian J. Mar. Sci. 35: 373–379.

- RAGHUKUMAR, C. 2008. Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. *Fungal Diversity* 31: 19–35.
- REDDY, C.A. 1995. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Current Opinion in Biotechnology* 6: 320-328.
- ROBLES, A., Lucas, R., Cienfuegos, G.A. & Galvez, A. 2000. Phenol-oxidase (laccase) activity in strains of the hyphomycete *Chalara paradoxa* isolated from olive mill wastewater disposal ponds. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 484-490.
- ROBARDS, K., Haddad, P. & Jackson, J. 1994. Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods. Academic Press, ISBN 0125895704, New York, 495 p.
- RODRIGUES, M.I. & IEMMA, A.F. 2009. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Cárita Editora, Campinas, Brasil, 358 p.
- SACK, U., Heinze, T.M., Deck, J., Cerniglia, C.E., Martens, R., Zadrazil, F. & Fritsche, W. 1997. Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3919–3925.
- DA SILVA, M.; CERNIGLIA, C.E.; POTHULURI, J.V. & CANHOS, V.P. 2003. Screening filamentous fungi isolated from estuarine sediments for the ability to oxidize polycyclic aromatic hydrocarbons. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19: 399-405.
- SINGLA, R., Gangulia, A. & Ghosha, M. 2010. Antioxidant Activities and Polyphenolic Properties of Raw and Osmotically Dehydrated Mushroom (*Agaricus bisporus*) Snack Food. *International Journal of Food Properties* 13: 1290–1299.
- SINSABAUGH, R.L. 2009. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 1-14.
- SHAN, X., Junxin, L., Lin, L. & Chualing, Q. 2009. Biodegradation of malathion by *Acinetobacter johnsonii* MA19 and optimization of cometabolism substrates. *Journal of Environmental Sciences* 21: 76–82.
- SHEN, C.S., Shen, Y., Wen, Y.Z., Wang, H.Y., & Liu, W.P. 2011. Fast and highly efficient removal of dyes under alkaline conditions using magnetic chitosan-Fe(III) hydrogel. *Water Res.* 45: 5200-5210.
- SHIMADA, T., Hayes, C.L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S.S., Guengerich, F.P. & Sutter, T.R. 1996. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res* 56: 2979–2984.
- SHIMADA, T. & FUJII-KURIYAMA, Y. 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* 95: 1-6.
- SHIMADA, T. 2006. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. 2006. *Drug Metab. Pharmacokinet* 21: 257-276.
- SVOBODOVÁ, K., Erbanová, P., Sklená, J. & Novotný, Č. 2006. The role of Mn-dependent peroxidase in dye decolorization by static and agitated cultures of *Ipex lacteus*. *Folia Microbiologica* 51: 573-578.
- SU, Y., Zhang, X., Hou, Z., Zhu, X., Guo, X. & Ling, P. 2011. Improvement of xylanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* SDYKY-1 using response surface methodology. *New Biotechnology* 28: 40-46.
- SUTHERLAND, J.B. 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 9: 53-61.
- SYED, K., Doddapaneni, H., Subramanian, V. & Lam, Y.W. 2010. Genome-to-function characterization of novel fungal P450 monooxygenases oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 399: 492–497.
- TALALAY, P. 2000. Chemoprotection against cancer by induction of Phase 2 enzymes. *BioFactors* 12: 5-11.
- TAO, S., Cao, H., Liu, W., Li, B., Cao, J., Xu, F., Wang, X., Coveney, R.M.Jr., Shen, W., Qin, B. & Sun, R. 2003. Fate modeling of phenanthrene with regional variation in Tianjin, China. *Environmental Science and Technology* 37: 2453-2459.
- TEIXEIRA, V.L. 2010. Caracterização do Estado da Arte em Biotecnologia Marinha no Brasil. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. Ministério da Ciência e Tecnologia. Série B. Textos Básicos de Saúde. 134 p.
- TIEN, M. & KIRK, T.K. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization and catalytic properties of unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 81: 2280-2284.
- TING, W.T.E., Yuan, S.Y., Wu, S.D. & Chang, B.V. 2010. Biodegradation of phenanthrene and pyrene by *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65: 238-242.

- TORTELLA, G.R., Diez, M.C. & Durán, N. 2005. Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. *Critical Reviews in Microbiology* 31: 197–212.
- URLACHER, V.B. & EIBEN, S. 2006. Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application. *TRENDS in Biotechnology* 24: 324-330.
- VALENTIN, L., Feijoo, G., Moreirab, M.T. & Lema, J.M. 2006. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 58: 15–21.
- VAN HAMME, J.D., Singh, A. & Ward, O.P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 503–549.
- VERDIN, A., Sahraoui, A.L.H. & Durand, R. 2004. Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *Int. Biodeter. Biodegr.* 53: 65–70.
- VERMA, A.K., Raghukumar, C., Verma, P., Shouche, Y.S. & Naik, C.G. 2010. Four marine-derived fungi for bioremediation of raw textile mill effluents. *Biodegradation* 21: 217-233.
- WANG, C., Sun, H., Li, J., Li, Y. & Zhang, Q. 2009. Enzyme activities during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in soils. *Chemosphere* 77: 733-738
- 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.
- WESENBERG, D., Kyriakides, I., & Agathos, S.N. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Advan.* 22: 161–187.
- WILD, S.R. & JONES, K.C. 1995. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environ. Pollut.* 88: 91–108.
- WILSON, S.C. & JONES, K.C. 1993. Bioremediation of soils contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental Pollution* 88: 229–249.
- WU, H.R., He, T.T., Lun, J.S., Maskaoui, K., Huang, T.W. & Hu, Z. 2009. Removal of Benzo[a]pyrene by a fungus *Aspergillus* sp. BAP14. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 1395–1401.
- WUNCH, K.G., Feibelman, T. & Bennet, J.W. 1997. Screening for fungi capable of removing benzo[a]pyrene in culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 620-624.
- WUNDER, T., Kremer, S., Sterner, O. & Anke, H. 1994. Metabolism of the polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene by *Aspergillus niger* SK 9317. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 636–641.
- ZANG, S., Li, P., Li, W, Zhang, D. & Hamilton, A. 2007. Degradation mechanisms of benzo[a]pyrene and its accumulated metabolites by biodegradation combined with chemical oxidation. *Chemosphere* 67: 1368–1374.

**APÊNDICE A.** Valores de degradação de pireno e BaP obtidos e calculados para os três basidiomicetos estudados durante a etapa de seleção do isolado mais eficiente.

HPA	Isolado	Tempo de cultivo (dias)	Degradação obtida (%)	Degradação calculada (%)
Pireno	<i>Tinctoporellus</i> sp. CBMAI 1061	7	21,4	6,5
		14	36,9	22,0
		21	48,7	33,8
	<i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062	7	90,9	80,0
		14	90,7	79,8
		21	92,2	81,3
	<i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063	7	13,8	4,3
		14	26,8	17,3
		21	30,9	21,4
BaP	<i>Tinctoporellus</i> sp. CBMAI 1061	7	35,4	17,1
		14	31,7	13,4
		21	50,8	32,5
	<i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062	7	94,0	75,9
		14	97,2	79,1
		21	97,6	79,5
	<i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063	7	25,1	8,4
		14	22,3	5,6
		21	27,4	10,7

Degradação calculada: degradação obtida descontando-se o valor médio de adsorção.

**APÊNDICE B.** Atividade das enzimas LiP, MnP e Lacase pelo basidiomiceto *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 durante a etapa de seleção do isolado mais eficiente.

Enzima	Tempo de cultivo (dias)	Atividade ligninolítica (U L <sup>-1</sup> )		
		Com pireno	Com BaP	Sem HPA
<b>LiP</b>	7	2,36	0	0
	14	0	0	0
	21	0	0	0
<b>MnP</b>	7	1,67	0	0
	14	2,06	0,84	0
	21	3,93	0,47	1,61
<b>Lacase (siringaldazina)</b>	7	4,50	1,94	2,40
	14	5,67	3,14	2,73
	21	3,15	4,00	3,12
<b>Lacase (ABTS)</b>	7	8,15	2,70	3,83
	14	5,05	6,87	6,59
	21	7,61	7,68	3,87
<b>Lacase (guaiacol)</b>	7	18,00	6,33	11,37
	14	21,12	8,92	10,22
	21	23,38	3,79	38,94

**APÊNDICE C.** Atividade das enzimas LiP, MnP e Lacase pelo basidiomiceto *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 durante a etapa de seleção do isolado mais eficiente.

Enzima	Tempo de cultivo (dias)	Atividade ligninolítica (U L <sup>-1</sup> )		
		Com pireno	Com BaP	Sem HPA
<b>LiP</b>	7	3,90	1,77	3,75
	14	2,30	2,91	5,13
	21	2,35	1,36	2,63
<b>MnP</b>	7	3,22	0,68	0
	14	3,36	1,27	0
	21	5,50	0,30	0,42
<b>Lacase (siringaldazina)</b>	7	3,74	2,43	1,33
	14	7,48	3,91	4,75
	21	6,58	4,69	4,62
<b>Lacase (ABTS)</b>	7	7,48	3,46	5,26
	14	5,73	12,11	10,98
	21	10,11	10,11	9,81
<b>Lacase (guaiacol)</b>	7	6,19	11,20	8,15
	14	12,33	5,00	1,61
	21	3,91	1,46	1,10

**APÊNDICE D.** Atividade das enzimas LiP, MnP e Lacase pelo basidiomiceto *Peniophora* sp. CBMAI 1063 durante a etapa de seleção do isolado mais eficiente.

Enzima	Tempo de cultivo (dias)	Atividade ligninolítica (U L <sup>-1</sup> )		
		Com pireno	Com BaP	Sem HPA
<b>LiP</b>	7	0	0	0
	14	0	0	0,98
	21	0	0	0
<b>MnP</b>	7	1,51	0	0
	14	1,34	0,79	0
	21	0	0,25	0,41
<b>Lacase (siringaldazina)</b>	7	3,19	0,89	1,78
	14	9,44	2,75	3,42
	21	4,19	3,54	3,52
<b>Lacase (ABTS)</b>	7	6,48	2,26	4,08
	14	5,78	9,74	10,41
	21	8,63	8,87	9,49
<b>Lacase (guaiacol)</b>	7	16,63	11,58	10,35
	14	23,39	8,33	9,52
	21	30,72	21,79	22,35

**APÊNDICE E.** Coeficientes de regressão do DCCR para a degradação do BaP por *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062.

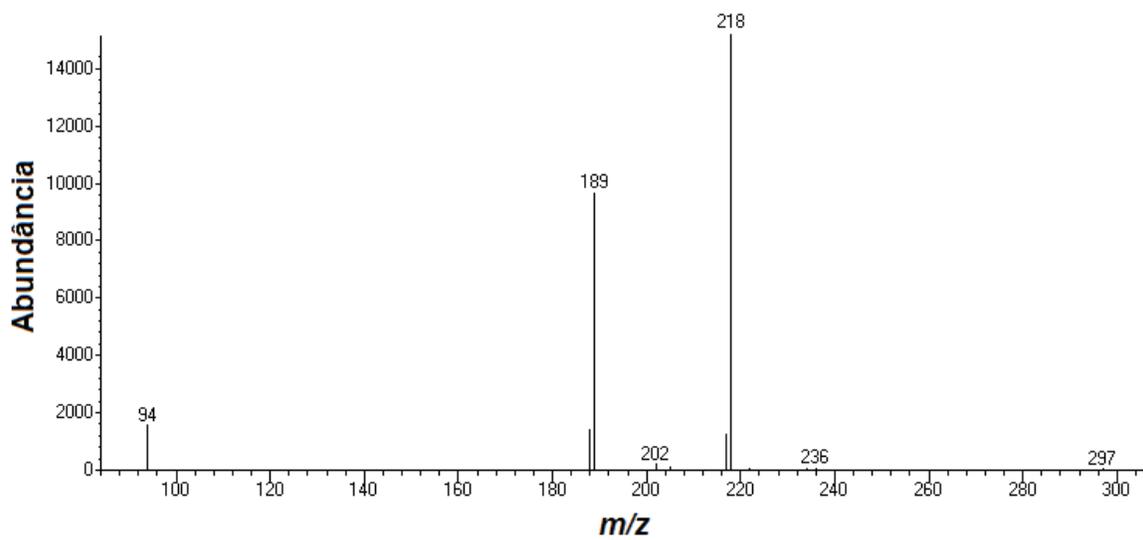
<b>Fator</b>	<b>Coeficiente de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>p-valor</b>
<b>Média</b>	85,0562	0,6839	0,0000 <sup>a</sup>
<b>X<sub>1</sub> (L)</b>	-3,1237	0,4194	0,0175 <sup>a</sup>
<b>X<sub>1</sub> (Q)</b>	-5,0216	0,5005	0,0098 <sup>a</sup>
<b>X<sub>2</sub> (L)</b>	-2,0889	0,4194	0,0380 <sup>a</sup>
<b>X<sub>2</sub> (Q)</b>	-1,2994	0,5005	0,1218
<b>X<sub>1</sub> X<sub>2</sub></b>	-6,7500	0,5923	0,0076 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> indica os parâmetros significativos a  $p < 0,1$ ;

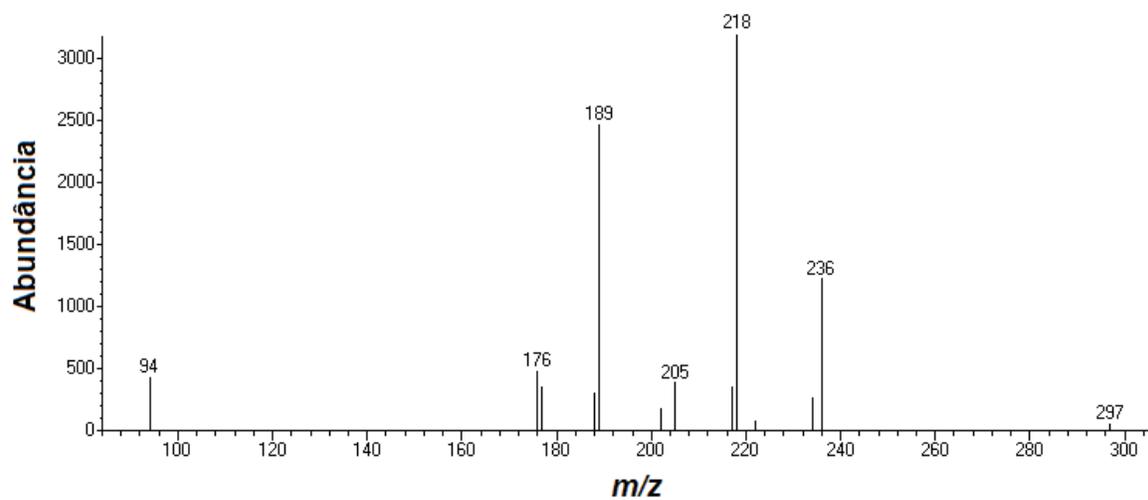
X<sub>1</sub> e X<sub>2</sub> indicam as variáveis concentração de glicose e de peptona, respectivamente.

L e Q indicam termos lineares e quadráticos, respectivamente.

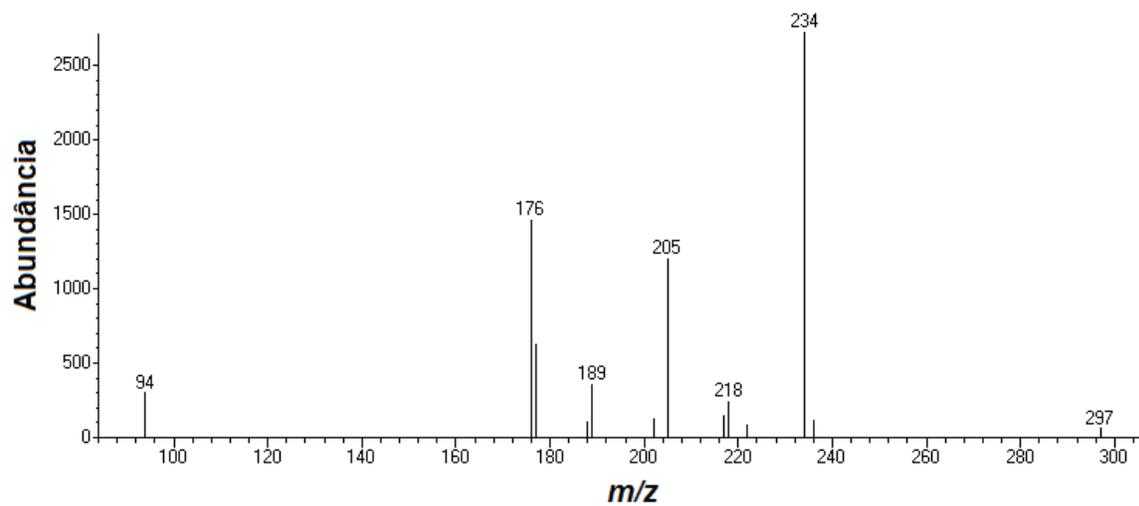
**ANEXO A.** Espectro de massas do metabólito I representando o íon molecular de  $m/z$  218 e o principal íon fragmento de  $m/z$  189 (modo SIM).



**ANEXO B.** Espectro de massas dos metabólitos II e III representando o íon molecular de  $m/z$  236 e pico base de  $m/z$  218 (modo SIM).



**ANEXO C.** Espectro de massas do metabólito IV representando o íon molecular de  $m/z$  234 e os principais íons fragmentos de  $m/z$  205 e 176 (modo SIM).



**ANEXO D.** Espectro de massas do metabólito V representando o íon molecular de  $m/z$  268 e os principais íons fragmentos de  $m/z$  239 e 119 (modo *Full Scan*).

