

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**ESTUDO DE SUBSTÂNCIAS DE BAIXA MASSA MOLAR
QUE MIMETIZAM AS FENOLOXIDASES COM
APLICAÇÕES EM TRATAMENTOS DE EFLUENTES
INDUSTRIAIS**

Autora: Mariângela Fontes Santiago

Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade Estadual de Campinas para
a obtenção do título de Doutor em Ciências.

CAMPINAS - 1999

UNIDADE	Ia
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	Sa 59e
V.	Ex.
TOMBO BC/	41050
PROJ.	278100
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	27/04/00
N.º CPD	

CM-00140586-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

Sa59e

Santiago, Mariângela Fontes

Estudo de substâncias de baixa massa molar que mimetizam as fenoloxidasas com aplicações em tratamentos de efluentes industriais / Mariângela Fontes Santiago. -- Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Fenoloxidase. 2. Sideróforos.
3. Desferrioxamina B. I. Durán Caballero,
Nelson Eduardo. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química. III. Título.

AGRADECIMENTOS

-Ao Prof. Dr. Nelson Durán pela orientação, confiança e amizade.

-Aos colegas e amigos do Laboratório de Química Biológica, Airton, Ana Olívia, Burgos, Chico, Daniel, Dárcio, Denise, Josy, Juan, Patrício, Natália, Raquel, Renato, Ronaldo, Rosana e Sandra pela agradável convivência.

-Aos amigos Marisa, Gelson e Evelyn pelo apoio nos momentos difíceis.

-À Dra. Mariângela Burgos, à Silvana e ao Beto pelas valiosas contribuições na análise dos espectros.

-À Universidade Federal de Goiás, especialmente aos meus colegas de trabalho da Faculdade de Farmácia, pela oportunidade de fazer este doutorado.

-Ao Instituto de Química e seus funcionários pelo apoio técnico e material.

-À CAPES (PICD) pelas bolsas concedidas durante a realização deste trabalho de tese.

A meus pais, Sebastião e Dalila.

Ao Fernando.

“A coisa mais incompreensível do mundo é que o mundo é compreensível.”

Albert Einstein

“Encorajar o desprendimento científico porque ele é uma das forças vivas do progresso na teoria, fonte de todo progresso na aplicação.”

Louis Pasteur

“As conquistas da indústria que enriqueceram tantos homens práticos nunca teriam ocorrido se apenas esses homens práticos tivessem existido, e se não tivessem sido antecidos por loucos desprendidos que morreram pobres, que nunca pensavam no útil e que, no entanto, tinham outro guia que não suas fantasias.”

Henri Poincaré

ÍNDICE GERAL

	Página
RESUMO	
SUMMARY	
CURRICULUM VITAE	
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1- Hipóteses da biodegradação da lignina por substâncias de baixa massa molecular	7
2.2- Potencial redox	11
2.3- O papel do ferro para os microrganismos	12
2.4- Quelantes biológicos e os metais de transição	13
2.5- Sideróforos	15
2.5.1- Substâncias de baixa massa molecular produzidas por fungos de decomposição marrom	17
2.5.2- Substâncias de baixa massa molecular produzidas por fungos de decomposição branca	22
2.5.3- Sideróforos produzidos por bactérias	24
2.6- Enzimas lignolíticas	27
2.6.1- Lacases	27
2.6.2- Ligninas-peroxidases	27
2.6.3- Manganês-peroxidases	28
2.7- Aplicações biotecnológicas de fungos e bactérias produtores de enzimas lignolíticas e/ou sideróforos	28
3- OBJETIVOS	31
3.1- Objetivo geral	31
3.2- Objetivos específicos	31
4-PARTE EXPERIMENTAL	33
4.1- PARTE 1	33
4.1.1- Preparação do ligante e reagente	33
4.1.2- Determinação do Fe(II)	33
4.1.3- Análise da reação de oxidação pelo complexo DB/Fe(III)	33
4.1.4- Análise enzimática	34
4.1.5- Determinação do Fe(II) pela técnica de ressonância paramagnética de elétrons (EPR)	35
4.1.6- Determinação de manganês pela técnica de fluorescência de raio X	35
4.1.7- Medida da quimioluminescência	35
4.1.8- Análise da reação da FMN e da FAD com a o-dianisidina	36
4.2- PARTE 2	36

4.2.1- Efluentes	36
4.2.2- Condições de tratamento do efluente papaleiro (kraft E1 e licor negro) com o complexo DB/Fe(III)	36
4.2.3- Distribuição de massa molecular das cloroligninas contidas no efluente kraft E1 e das ligninas contidas no licor negro	36
4.2.4- Análise por HPLC do efluente kraft E1	37
4.2.5- Determinação da cor dos efluentes	37
4.2.6- Determinação de fenóis totais do efluente kraft E1 e do licor negro	37
4.2.7- Determinação de Fe(III) nos efluentes	38
4.2.8- Lignina	38
4.2.9- Análise de degradação da lignina pelos complexos DB/Fe(III) e AHA/Fe(III) por fluorescência	38
4.2.10- Análise de degradação do efluente kraft E1 pelos complexos DB/Fe(III) e AHA/Fe(III) por fluorescência	38
4.2.11- Análise da reação da FMN com o efluente kraft E1	39
4.3- PARTE 3	39
4.3.1- Microrganismos	39
4.3.2- Manutenção das culturas dos microrganismos	40
4.3.3- Preparação do inóculo dos microrganismos	40
4.3.4- Lavagem da vidraria para a produção e determinação dos sideróforos	40
4.3.5- Determinação da produção dos sideróforos em MS pelo método do CAS	40
4.3.6- Produção dos sideróforos em meio líquido	41
4.3.7- Detecção dos sideróforos em meio líquido pelo método do CAS	41
4.3.8- Determinação dos sideróforos do tipo hidroxamato	42
4.3.9- Determinação dos sideróforos do tipo catecolato	43
4.4- PARTE 4	43
4.4.1- Efluentes	43
4.4.2- Condições de tratamentos dos efluentes pelos microrganismos	43
4.4.3- Determinação das atividades enzimáticas após o tratamento dos efluentes com microrganismos	44
4.4.4- Determinação do oxalato nos caldos filtrados dos microrganismos	45
4.4.5- Determinação da cor dos efluentes	46
4.4.6- Determinação de fenóis totais do efluente kraft E1 e do licor negro	46
4.4.7- Detecção dos sideróforos em meio líquido pelo método do CAS	46
4.5- PARTE 5	46
4.5.1- Extração dos sideróforos do tipo catecolato	46
4.5.2- Identificação dos sideróforos do tipo catecolato	47
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1- PARTE 1: Determinação da atividade de fenoloxidase	48
5.2- PARTE 2: Degradação de efluentes industriais	63

5.3- PARTE 3: Seleção de microrganismos na produção de sideróforos	78
5.4- PARTE 4: Aplicação dos microrganismos selecionados no tratamento de efluentes industriais	89
5.5- PARTE 5: Tentativa de identificar a estrutura química provável do sideróforo do <i>G. trabeum</i>	100
6.1- CONCLUSÕES PARCIAIS	62
6.2- CONCLUSÕES PARCIAIS	77
6.3- CONCLUSÕES PARCIAIS	88
6.4- CONCLUSÕES PARCIAIS	99
6.5- CONCLUSÕES PARCIAIS	110
6.6- CONCLUSÃO FINAL	111
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura	Página
1- Representação esquemática de uma lignina de madeira mole (softwood)	4
2- Formação de cátions radicais a partir de estruturas não fenólicas da lignina	5
3- Mecanismo dos glicopeptídeos	8
4- Mecanismo de oxidação do ácido 2,3- dihidroxibenzóico	9
5- Mecanismo do quelante produzido pelo <i>G. trabeum</i>	11
6- Grupos ligantes de sideróforos	16
7- Estrutura do sideróforo do grupo dos hidroxamato, a desferrioxamina B	16
8- Substâncias de baixa massa molecular produzidas pelo <i>G. trabeum</i>	20
9- Sideróforo produzido pela <i>P. fluorescence</i> , chamado pioverdino	24
10- Sideróforos do tipo catecolato, produzidos pela <i>A. vinellandi</i>	26
11- Efeito do pH na formação do complexo DB/Fe(III) e na atividade de FOx	49
12- Cinética de formação do complexo na relação entre 1DB para 1Fe(III)	50
13- Cinética de formação do complexo na relação entre 2DB para 1Fe(III)	50
14- Efeito da concentração do tampão na formação do complexo DB/Fe(III) e na atividade de FOx	51
15- Cinética de saturação da solução de substrato da atividade de FOx	52
16- Cinética de formação do Fe (II), após a complexação do DB/Fe(III) e AHA/Fe(III)	53
17- Espectros da técnica de EPR	55
18- Espectro de fluorescência de raio X do reagente cloreto férrico	56
19- Contagem da quimioluminescência em função do tempo	58
20- Reação de hidroxilação da ftalhidrazida formando um composto ácido	59
21- Efeito do FMN e do FAD	61
22- Distribuição de massa molecular em sephadex G-50 das cloroligninas em efluente kraft E1	64
23- Cromatogramas de HPLC	65
24- Distribuição de massa molecular em sephadex G-50 das ligninas em licor negro	67
25- Distribuição de massa molecular em sephadex G-50 das ligninas em licor negro, retido em membrana de millipore	67
26- Espectros de emissão de fluorescência do tratamento do efluente kraft E1 em água deionizada	69
27- Espectros de emissão de fluorescência do tratamento do efluente kraft E1 em tampão citrato fosfato	71
28- Espectros de emissão de fluorescência do tratamento da lignina	72
29- Cinética da degradação da clorolignina pelo complexo DB/Fe(III)	73

30- Cinética da degradação da clorolignina pelo complexo AHA/Fe(III)	74
31- Espectros de fluorescência do efeito da FMN	76
32- Meio sólido (1) para determinação da produção de sideróforos	80
33- Meio sólido (2) para determinação da produção de sideróforos	81
34- Meio sólido (3) para determinação da produção de sideróforos	81
35- Cinética de produção dos sideróforos pelos fungos	83
36- Cinética de produção dos sideróforos pelas bactérias	84
37- Descoloração do efluente papelero (kraft E1)	90
38- Descoloração do efluente papelero (licor negro)	91
39- Descoloração do efluente têxtil	92
40- Descoloração do licor negro após tratamento com a <i>A. vinellandi</i>	93
41- Descoloração do efluente têxtil após tratamento com o <i>T. villosa</i>	98
42- Espectro de RMN- ¹ H da fração mais apolar	102
43- Espectro de IV da fração mais apolar	103
44- Espectro de massa da fração mais apolar	104
45- Estrutura provável de um dos sideróforos produzidos pelo <i>G. trabeum</i>	105
46- Espectro de RMN- ¹ H da fração mais polar	106
47- Espectro de IV da fração mais polar	107
48- Espectro de massa da fração mais polar	108
49- Estrutura provável de um dos sideróforos produzidos pelo <i>G. trabeum</i>	109

ÍNDICE DE TABELAS:

Tabela	Página
1- Oxidação de substratos pela lacase e pelo complexo DB/Fe(III)	57
2- Concentração de Fe(III) no efluente kraft E1 e no licor negro	64
3- Determinação da produção de sideróforos por fungos em meio sólido	79
4- Determinação da produção de sideróforos por bactérias em meio sólido	80
5- Determinação da máxima produção de sideróforos por fungos e bactérias	85
6- Determinação dos sideróforos do tipo catecolato pelos fungos e bactérias	86
7- Determinação dos sideróforos do tipo hidroxamato pelos fungos e bactérias	87
8- Determinação da atividade enzimática média da lacase antes do tratamento dos efluentes industriais	94
9- Determinação da atividade enzimática média da lacase após o tratamento dos efluentes industriais	95
10- Determinação média da máxima produção de sideróforos por fungos e bactérias e o tipo de sideróforos	96
11- Valores de pHs nos filtrados dos fungos e das bactérias após a produção dos sideróforos	97
12- Valores médios da concentração de oxalato nos filtrados dos fungos e bactérias	98

Abreviaturas:

AHA- ácido acetilidroxâmico

DBO- demanda bioquímica de oxigênio

CAS- reagente Chromo Azurol S

DQO- demanda química de oxigênio

DB- desferrioxamina B

DHBA- ácido diidroxibenzóico

EDTA- ácido etileno diamino tetracético

FAD- flavina adenina dinucleotídeo

FMN- flavina mononucleotídeo

FOx- Atividade de fenoloxidase

Gt- *Gloeophyllum trabeum*

KTBA- ácido 2-ceto-4-tiometil butírico

LiP- lignina peroxidase

MnP- Peroxidase dependente de manganês

NADH- nicotina-adenina dinucleotídeo reduzido

RESUMO

ESTUDO DE SUBSTÂNCIAS DE BAIXA MASSA MOLAR QUE MIMETIZAM AS FENOLOXIDASES COM APLICAÇÕES EM TRATAMENTOS DE EFLUENTES INDUSTRIAIS.

AUTORA : MARIÂNGELA FONTES SANTIAGO

ORIENTADOR: NELSON EDUARDO DURÁN CABALLERO

Palavras chave: fenoloxidase, sideróforos, desferrioxamina B, biodegradação.

Neste trabalho, foi determinada a atividade de fenoloxidase do complexo desferrioxamina B (DB)/Fe(III) em pH 3,0, no intervalo de temperatura de 25-30°C, utilizando como substrato a o-dianisidina e a seringaldazina. A adição de flavina mononucleotídica (FMN) mostrou afetar a atividade de fenoloxidase de DB. Estudos mecanísticos, com a técnica de EPR, e com os reagentes o-fenantrolina e ferrozina, demonstraram que DB pode reduzir Fe(III) para Fe(II). O estudo com o modelo do ácido acetilhidroxâmico (AHA), mostrou resultados similares a DB. Neste processo, espécies ativas de oxigênio, como OH[•], foram detectadas.

Estudou-se ainda a atividade de fenoloxidase de DB/Fe(III), atuando sobre o efluente kraft E1 (clorolignina) e o licor negro (lignina) nas condições pré-determinadas. No presente estudo, o licor negro, após tratamento com DB/Fe(III) na presença de oxigênio, não sofreu mudanças significativas nos fenóis totais e nem na cor, entretanto, a distribuição de massa molecular sugere mineralização em torno de 10%. Quando o sistema de DB/Fe(III) atua sobre o efluente kraft E1, aumenta a cor e o teor de fenóis totais. Não observou-se, neste caso, mineralização. Isto se deve a um cromóforo que aparece na região de 280 nm, como determinado por cromatogramas de HPLC. Observou-se um deslocamento dos picos da distribuição de massas moleculares para valores menores. A técnica de fluorescência confirmou a degradação da lignina (isolado de *Eucalyptus grandis*) e da clorolignina (efluente kraft E1) na presença dos complexos DB/Fe(III) e AHA/Fe(III) e mostrou também a interação do FMN nessa degradação.

Foi feita uma seleção de fungos e bactérias produtores de sideróforos os quais foram os seguintes: *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Lentinus edodes*, *Gloeophyllum trabeum*, *Azotobacter vinelandi* e *Pseudomonas fluorescense*. Aplicou-se em meio líquido para a produção dos sideróforos destes microrganismos. As técnicas de espectrometria de massa, infra vermelha e ressonância magnética nuclear de hidrogênio mostraram a possibilidade de produção do sideróforo do tipo catecolato do fungo *G. trabeum*. O fungo que apresentou maior produção de sideróforo foi o *G. trabeum* e a bactéria foi a *A. vinelandi* (catecolato).

Os tratamentos dos efluentes papelero e têxtil, durante quatro dias com esses microrganismos, apresentaram resultados significativos na descoloração. Os melhores resultados de descoloração utilizando tratamentos do efluente kraft E1 foram: *T. versicolor* (65%), *G. trabeum* (60%) e a *A. vinelandi* (57%). O tratamento do licor negro foi mais efetivo em relação a descoloração com a bactéria *A. vinelandi* (84%). Os tratamentos do efluente têxtil apresentaram os seguintes resultados de descoloração: *L. edodes* (90%), *T. villosa* (89%), *T. versicolor* (88%), *G. trabeum* (75%) e *A. vinelandi* (52%). Todos os microrganismos apresentaram sideróforos, mas o *T. versicolor*, *T. villosa* e o *L. edodes* mostraram também atividade enzimática significativa de lacase (EC 1.10.3.2), usando seringaldazina como substrato. Não foram determinadas atividades significativas de manganês peroxidase (EC 1.11.1.7) e de lignina peroxidase (EC 1.11.1.7). O oxalato foi determinado em concentrações significativas. Logo, os sideróforos apresentam um grande potencial para os tratamentos de efluentes nas indústrias de papel e têxtil.

SUMMARY

STUDY OF SUBSTANCES OF LOW MASS MOLAR WITH MIMETIC PHENOLOXIDASES ACTIVITY: APPLICATIONS IN TREATMENTS OF INDUSTRIAL EFFLUENTS.

AUTHOR: MARIÁNGELA FONTES SANTIAGO

ADVISOR: NELSON EDUARDO DURÁN CABALLERO

Key words: phenoloxidase, siderophore, desferrioxamine B, biodegradation.

In this work the activity of phenoloxidase desferrioxamina B (DB)/Fe(III) complex was determined in pH 3.0, citrate fosfate buffer 20 mmol.L⁻¹, temperature in the range of 25-30°C, using as substrate o-dianisidina and seringaldazine. Addition of flavin mononucleotide (FMN) affected the activity of phenoloxidase of DB/Fe(III). Previous mechanistic studies with the technique of EPR and the reagents o-fenantroline and ferrozine demonstrated that DB can reduce Fe(III) to Fe(II) and the same was observed for the acetylhydroxamic acid (AHA). In that process, active oxygen species (e.g., OH) were detected.

The activity of phenoloxidase of DB was also studied acting on the kraft E1 effluent (chlorolignin) and on the black liquour (lignin) at the conditions already determined. In the present study, the black licor after treatment with DB/Fe(III) in the presence of oxygen did not suffer significant changes in the total phenols and nor even in the color, however, the distribution of molecular mass suggests a 10% of mineralization. When the system of DB/Fe(III) acts on the kraft E1 effluent, it increases the color and the contents of total phenols. It was not observed, in this case, mineralization. This is due to the chromophore that appears at 280 nm, as determined by HPLC. A displacement of the peaks of molecular mass distribution for smaller values was observed. The fluorescence technique confirmed the degradation of lignin (isolated of *Eucaliptus grandis*) and of the chlorolignin (kraft E1 effluent) in the presence of both DB/Fe(III) and AHA/Fe(III) complexes and showed also the FMN in this degradation.

The fungi and bacteria selection, producers of siderophores, were: *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Lentinus edodes*, *Gloeophyllum trabeum*, *Azotobacter vinelandi* and *Pseudomonas fluorescence*. The liquid medium for the siderophores production of these organisms was determined. The techniques of mass spectrometry, IR and NMR-¹H confirmed the siderophore catecholate-typed of the fungus *G. trabeum*. The fungus that presented larger siderophore production was *G. trabeum* and the bacteria was *A. vinelandi* (catecholate).

Paper and textile effluents after four days of biological treatment were efficiently decolorized. The best results using treatments of descolorization of the kraft E1 effluent were: *T. versicolor* (65%), *G. trabeum* (60%) and to *A. vinelandi* (57%). The treatment of the black licor the more cash went with to bacteria *A. vinelandi* (84%). The best treatments of the textile effluent presented the following results of descolorization : *L. edodes* (90%), *T. villosa* (89%), *T. versicolor* (88%), *G. trabeum* (75%) and *A. vinelandi* (52%). All the microorganisms presented siderophores, but the *T. versicolor*, *T. villosa* and the *L. edodes* also showed significant lacase enzymatic activity using syringaldazine as substrate. Significant activities of peroxidase dependent of manganese and peroxidase lignin were not determined. The oxalato was determined in significant concentrations. Therefore, siderophores show great potential in the treatment of effluents from the paper and textile industries.

CURRICULUM VITAE

1- Dados Pessoais :

1.1- Nome: *Mariângela Fontes Santiago*

1.2- Nacionalidade: Brasileira

1.3- Endereço:

- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás. Praça Universitária- Cep: 74.605-220 /Caixa postal 131- Cep: 74.001-970- Goiânia-GO- Fone: (0XX - 62) 223-5974, Fax: (0XX - 62) 223-5974.

2- Formação Acadêmica:

2.1- Doutorado: Ciências

Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas -Campinas - SP.

- Título da Tese: ESTUDO DE SUBSTÂNCIAS DE BAIXA MASSA MOLECULAR QUE MIMETIZAM AS FENOLOXIDASES COM APLICAÇÕES EM TRATAMENTO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS.

2.2- Mestrado: Microbiologia

Departamento de Microbiologia - Universidade Federal de Viçosa - Viçosa - MG

- Título da Tese: PRODUÇÃO E PROPRIEDADES DE PECTINA LIASE DE UM ISOLADO DE *Penicillium expansum*.

2.3- 3º grau: Nutrição - Universidade Federal de Viçosa - Viçosa- MG.

3- Experiência Profissional:

3.1- Bolsista de aperfeiçoamento científico no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- Participação nos projetos: Avaliação da produção de enterotoxina estafilocócicas e correlação entre dependência de cálcio, autoglutinação, presença de plasmídeo e efeito letal de amostra de *Yersinia sp.* isoladas de alimentos.

3.2- Professora do curso prático da disciplina Microbiologia Geral da Universidade Federal de Viçosa-MG.

3.3- Professora concursada da disciplina de Enzimologia Industrial e Tecnologia das Fermentações, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás.

4- Trabalhos apresentados em Congressos como Abstrats:

4.1- Santiago, M. F., Coelho, J. L. C., Silva, D. O. (1991) Produção de pectina liase (PL) e poligalacturonase (PG) extracelulares de uma linhagem de *Penicillium expansum*. XVI Congresso Brasileiro de Microbiologia e EX SINAIFERM, Santos, SP.

4.2- Santiago, M. F., Coelho, J. L. C., Silva, D. O. (1992) Partial Characterization of the Pectin Liase from *Penicillium expansum*. XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq.

4.3- Santiago, M.F., Peralta-Zamora, P., Durán, N. (1996) A mimetic phenoloxidase activity: Desferrioxamina B reduces oxygen to hydroxyl radical in the presence of o-dianisidine or seringaldazine. V seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas, Maringá, PR.

4.4- Santiago, M. F., Dúran, N. (1998) Degradação oxidativa de lignina e clorolignina por modelos biomiméticos. XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq, p. 195.

5- Publicações em Revistas e Anais Completos:

- 5.1- Santiago, M.F., Peralta-Zamora, P., Durán, N. (1996) Atividade mimética de fenoloxidase: complexo desferrioxamina B/ Fe(III) atuando no licor negro e efluente Kraft E1. *Proc. 1º Reunião de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente* (E. Esposito Ed.) Campinas, SP, p.174-180.
- 5.2- Santiago, M.F., Peralta-Zamora, P., Durán, N. (1997) Polyhydroxamate/iron (III) complex as a mimetic model of phenoloxidase and its bioremediation of pulp and paper residues. *5th Brazilian Symposium Chemistry Lignin and other Wood Compound* (Luiz Pereira Ramos Ed) Curitiba, PR, 6, 567-575.
- 5.3- Durán, N., Santiago, M. F., Parra, C., Rodriguez, J. (1998) Mimetic phenoloxidase activity: lignin and chlorolignin degradation with low molecular weight chelators. *Proceeding of 7th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* (M. Paice and J. Saddler Eds) Vancouver, Canada, 7B, p. 163-168.
- 5.4- Durán, N., Parra, C., Santiago, M. F., Rodriguez, J. (1998) Alternative pulp biobleaching process: Hydroxamate iron complex with phenoloxidase activity acting on lignin. *Proceeding of Fifth European Workshop on Lignocellulosic and Pulp* (D. Robert, D. Lachenal, G. Gellerstedt and O. Faix) Portugal, 83-86.
- 5.5- Parra, C., Santiago, M. F., Rodriguez, J., Durán, N. (1998) Hydroxamate iron complex with phenoloxidase activity acting on lignin and chlorolignins *Biochemical and Biophysical Research Communications* 251, 399-402.
- 5.6- Durán, N., Santiago, M. F., Parra, C., Rodriguez, J., Freer, J., Baeza, J. (1998) Fungal metabolize compound with phenoloxidase activities: Bioremediation of pulp bleaching effluent. *Third Latin American Biodegradation & Biodeterioration Symposium (LABS 3)* no prelo.
- 5.7- Santiago, M. F., Moraes, S. G., Durán, N., (1998) Seleção de cepas produtoras de sideróforos e sua aplicação no tratamento de efluentes têxtil e papelero. *Proc. 2º Reunião de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente* (C. H. L. Soares, Ed.) no prelo.

6- Patentes:

- 6.1- Durán, N., Santiago, M. F. (1996) "Desferrioxamina B/Fe(III) modelo de fenoloxidase: Redução de oxigênio para radical hidroxila". *Patente Brasileira* Nº PI9700552
- 6.2- Durán, N., Santiago, M. F., Zamora-Peralta, P. (1996) "Processo de descontaminação do licor negro e efluente Kraft E1 com o complexo desferrioxamina B/ Fe (III)" *Patente Brasileira* Nº PI9700553

7- Participações nas Organizações de Eventos:

- 7.1- Membro da Comissão Científica da XI Semana Científica Farmacêutica - Universidade Federal de Goiás.
- 7.2- Membro da Comissão Organizadora do II Encontro de Pesquisadores da Universidade Federal de Goiás.

1- INTRODUÇÃO

A lignina é a mais abundante macromolécula orgânica depois da celulose. É o constituinte característico entre as paredes celulares dos tecidos de vegetais vasculares, tais como madeira, sendo responsável por sua rigidez (Fengel e Wegener, 1984; Han e Shiraishi, 1991; Sjoestrom, 1993; Kennedy *et al*, 1996; Kuhad *et al*, 1997).

Tem-se demonstrado muito interesse e dedicação ao estudo da biodegradação da lignina nos últimos anos. Dentro dessa abordagem, muitos trabalhos tem sido direcionados para os fungos que degradam a madeira. Esses estudos são basicamente divididos em três categorias principais, definidas de acordo com a característica dada à madeira durante o processo de degradação: 1) os de degradação branda (soft-rot), que agrupam espécies das classes Ascomicotina e Deuteromicotina, recebem essa denominação por produzirem um amolecimento nas camadas superficiais da parede da célula vegetal (Kirk, 1987; Blanchete, 1991); 2) os fungos de degradação marrom (brown-rot) são da classe Basidiomicotina e degradam principalmente os polissacarídeos da parede celular, com limitada degradação da lignina (Crowling, 1961) e 3) os fungos de degradação branca (white-rot), que pertencem às classes Basidiomicotina e Ascomicotina, apresentam uma capacidade muito grande de degradar todos os componentes da madeira, inclusive a lignina (Ander e Eriksson, 1977; Rodriguez *et al*, 1997a), através da produção de enzimas lignolíticas e/ou substâncias não enzimáticas que oxidam compostos fenólicos, muitos deles relacionados com lignina (Eriksson *et al*, 1990; Durán e Esposito, 1997).

Ao lado da ação das enzimas ligninolíticas produzidas por esses fungos, a biodegradação de lignina por substâncias quelantes de ferro de baixa massa molar, como sideróforos, tem sido investigada com bastante intensidade e trabalhos nessa

linha vêm ganhando um espaço cada vez maior (Goodell *et al*, 1997, 1998; Durán e Machuca, 1995; Rodríguez *et al*, 1997ab; Santiago *et al*, 1997, Paszczynski *et al*, 1999).

Foi nesse contexto que os objetivos do presente trabalho centraram-se no estudo de vários aspectos sobre os sideróforos produzidos por fungos e bactérias.

2- REVISÃO DE LITERATURA

A degradação microbiana de lignina exerce um papel essencial no ciclo do carbono e na função dos microrganismos, que são em sua maioria os fungos (basidiomicetos) superiores que habitam a madeira e o solo. É fundamental para as biotecnologias emergentes, tais como a degradação de poluentes orgânicos, o branqueamento enzimático de polpas e a polpação biomecânica. Porém, a ligninólise coloca um problema mecanístico para a ação fúngica pois a lignina, que é uma macromolécula heterogênea e amorfa (Figura 1), não é suscetível aos mecanismos hidrolíticos normais (Hammel *et al*, 1993). Pensou-se que os mecanismos básicos estivessem esclarecidos com a descoberta das Lignina-peroxidases (LiPs) que tinham a propriedade de quebrar ligações carbono-carbono nos compostos modelos de lignina (Tien e Kirk, 1984; Renganathan *et al*, 1985; Leonowicz *et al*, 1999). Porém, muitos esforços foram, e ainda são, dirigidos para a elucidação dos mecanismos pelos quais as ligninases atuam na biodegradação de lignina. Elas são capazes de ionizar várias substâncias não-fenólicas aromáticas, originando radicais cátion arila (Kirk *et al*, 1986; Leonowicz *et al*, 1999). Quando o substrato é um modelo dimérico de lignina, o radical cátion decai por uma quebra espontânea da ligação C α -C β da cadeia lateral arila (Shoemaker *et al*, 1985; Eriksson *et al*, 1990; Leonowicz *et al*, 1999) originando produtos de quebra semelhantes aos encontrados em culturas de fungos (Figura 2). Esse processo desperta o interesse de pesquisadores por ser de grande significado ecológico, pois, ao lado da celulose, a lignina é o polímero renovável mais abundante sobre a Terra. Além disso, a madeira é um dos recursos naturais de grande importância econômica.

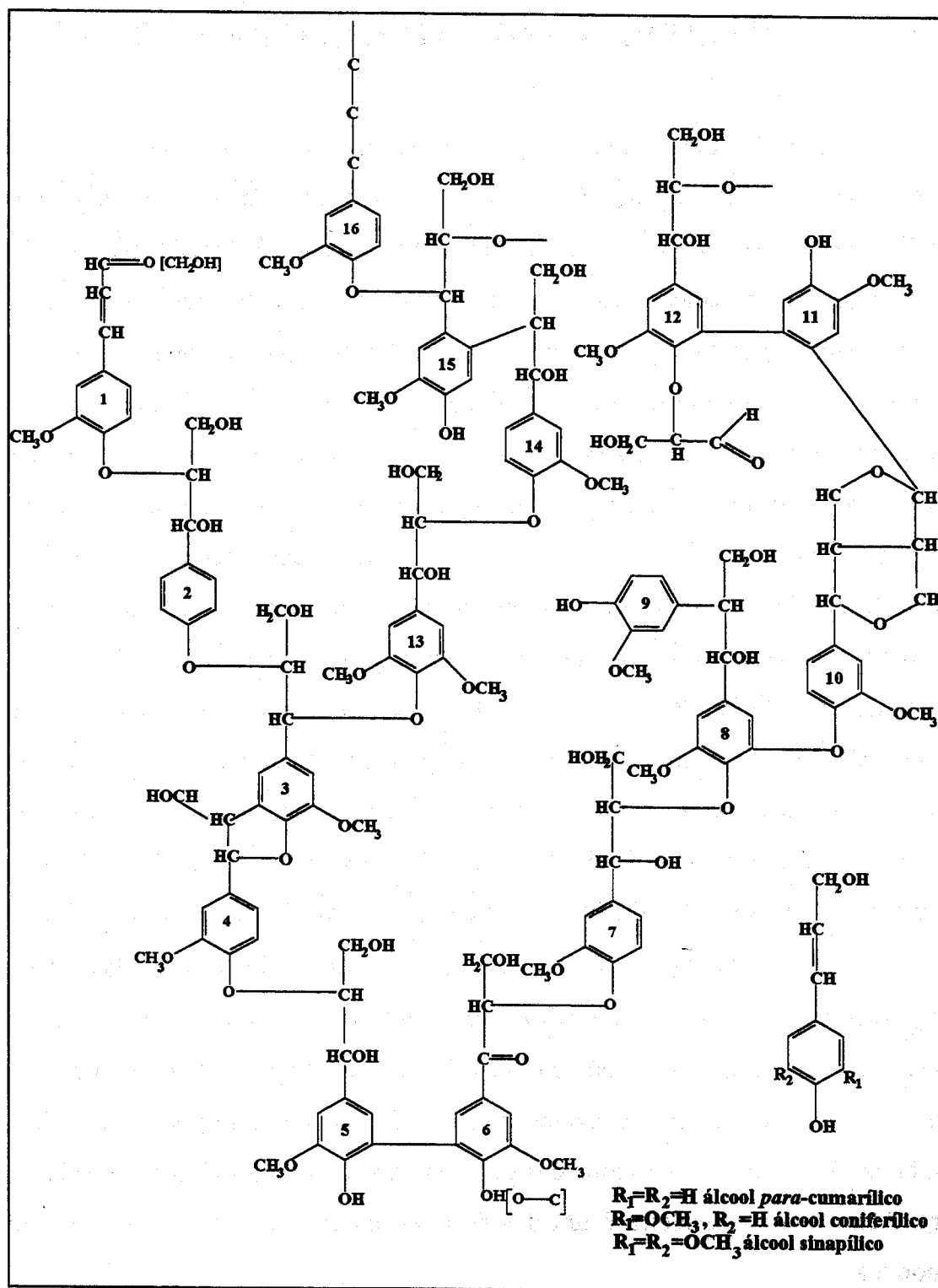


Figura 1- Representação esquemática de uma lignina de madeira mole (softwood), de acordo com Adler (1977). Os álcoois precursores também são representados nesta figura, à direita.

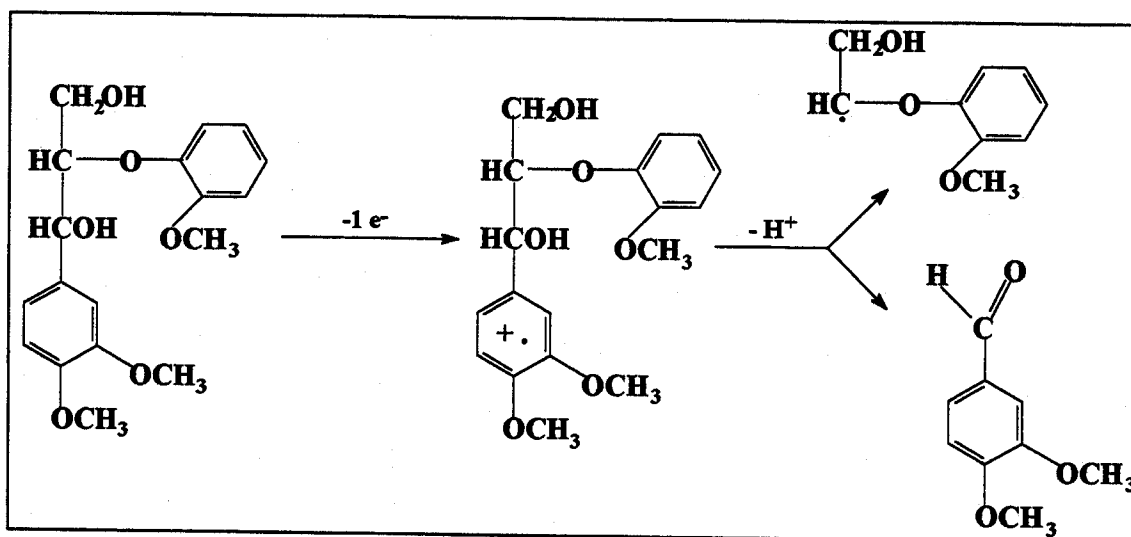


Figura 2- Formação de cátions radicais a partir de estruturas não fenólicas da lignina e posterior clivagem da ligação α - $\text{C}\beta$ (Eriksson, 1990).

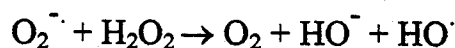
Dada à complexidade e à heterogeneidade da molécula de lignina (Figura 1), desde os primeiros estudos da sua degradação por microrganismos tem proposto a existência de um mecanismo extracelular oxidativo e, relativamente, não específico. Na verdade, apesar dos muitos trabalhos para se entender os mecanismos de reação das LiPs, há poucas evidências de que elas possam realmente quebrar a lignina polimérica por ação direta (Haemmerli *et al* 1986, Odier *et al*, 1988; Sarkanen *et al*, 1991). Uma das questões que se levantou contra a ação direta de enzimas foi quanto ao tamanho dos poros da madeira que não permitiria a difusão das LiPs (Carpita *et al*, 1979; Tepfer e Taylor, 1981; Flournoy *et al*, 1991). Somado a isso, o fato de outras enzimas apresentarem atividade degradativa frente à lignina, entre outras as Manganês-peroxidases (MnPs) e lacases, sugere-se que a biodegradação da matriz lignocelulósica da madeira não seja um processo simples envolvendo atividades enzimáticas únicas, reforçando a tese de que esse processo deva ser resultado de uma ação conjunta entre enzimas e substâncias de baixa massa molar (Paszczyński *et al*, 1988; Goodell *et al*, 1998; Paszczyński *et al*, 1999), principalmente aquelas com capacidade de quelar metais (Enoki *et al*, 1989; Hirano *et al*, 1995; Goodell *et al*, 1997). Para responder pela

despolimerização não explicada da parede celular, vários grupos de pesquisa têm focado possíveis mecanismos que empregam agentes de baixa massa molar, que poderiam penetrar potencialmente e iniciar a despolimerização da parede celular da madeira.

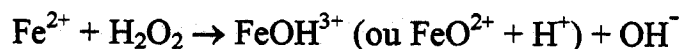
Uma pesquisa feita por Koenings (1975) na ação de *reativos de Fenton* contra celulose e componentes da parede celular da madeira, sugere que o ferro e o peróxido de hidrogênio eram altamente envolvidos na produção de radicais hidroxilas, os quais poderiam iniciar a despolimerização da celulose em madeira:



Também podem ser gerados os radicais hidroxilas na presença de metais pela reação relacionada por Haber-Weiss (1934) como:



O radical ferrila, uma alternativa interessante que pode ser considerada para o radical hidroxila, tem sido sugerido por Shen e colaboradores (1992) como um produto da reação de Fenton:



Acredita-se que a espécie ferrila é tão reativa quanto o $\text{HO}^\cdot$ mas com um certo grau de seletividade, sendo possível que os sideróforos participem na degradação de lignina sem mediar a produção de radical hidroxila.

Portanto, a lignina e os polissacarídeos de madeira são degradados consideravelmente, pela reação de Fenton, isto é, o $\text{O}_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 , e o $\text{OH}^\cdot$,

produzidos pela substância de baixa massa molar, devem transformar a camada da parede celular, despolimerizando a celulose e a lignina (Thompson e Corbett, 1985; Miller, 1986; Kohdzuma *et al*, 1991; Hirano *et al*, 1995; Goodell *et al*, 1997, 1998). Entretanto, essa função pode ser dada pelos quelantes de metais que são reciclados em diferentes estados de oxidação (Schmidt *et al*, 1981, Hider, 1984; Goodell *et al*, 1998), sendo que a atividade de fenoxidase pode ser atribuída ao complexo com o Fe(III), e não pelo Fe(II). Então, deve haver um mecanismo através do qual a força redutora ocorre. Em vários fungos lignolíticos, o oxalato e a celobiose-desidrogenase podem participar dessa redução (Evans *et al*, 1994; Ander, 1994; Hyde e Wood, 1997; Shimada *et al*, 1997; Goodell *et al*, 1997; Aguilar *et al*, 1999).

Esse estudo visa a elucidação da atuação de quelantes de metais naturais (sideróforos), usando como modelo a desferrioxamina B e a seleção de microrganismos produtores de sideróforos para a aplicação em efluente papelero (kraft E1), licor negro, que é também da indústria papelera, e têxtil.

2.1- Hipóteses da biodegradação da lignina por substâncias de baixa massa molar

Uma hipótese sobre o mecanismo relacionado à degradação de madeira por fungos de decomposição branca e marrom envolve *glicopeptídeos* produzidos por esses fungos (Enoki *et al*, 1989; Hirano *et al*, 1995; Enoki *et al*, 1997). Segundo estes autores, essas substâncias catalisam uma reação de redox entre os doadores de elétron e o O_2 , produzindo H_2O_2 por O_2^- e reduzindo H_2O_2 para $HO^\cdot$. Além disso, as substâncias reduzem Fe(III) para Fe(II) e adsorvem fortemente Fe(II) (Figura 3). Machuca e Durán (1993) propuseram um mecanismo de substâncias de baixa massa molar do tipo hidroxamato (sideróforos), produzido por fungo de degradação marrom o *Thermoascus aurantiacus*, que é similar ao da glicoproteína (Enoki *et al*, 1989), e mostraram que a atividade de fenoxidase está presente no

metabólito de *T. aurantiacus*, sendo capaz de oxidar a o-dianisidina (Machuca *et al.*, 1999).

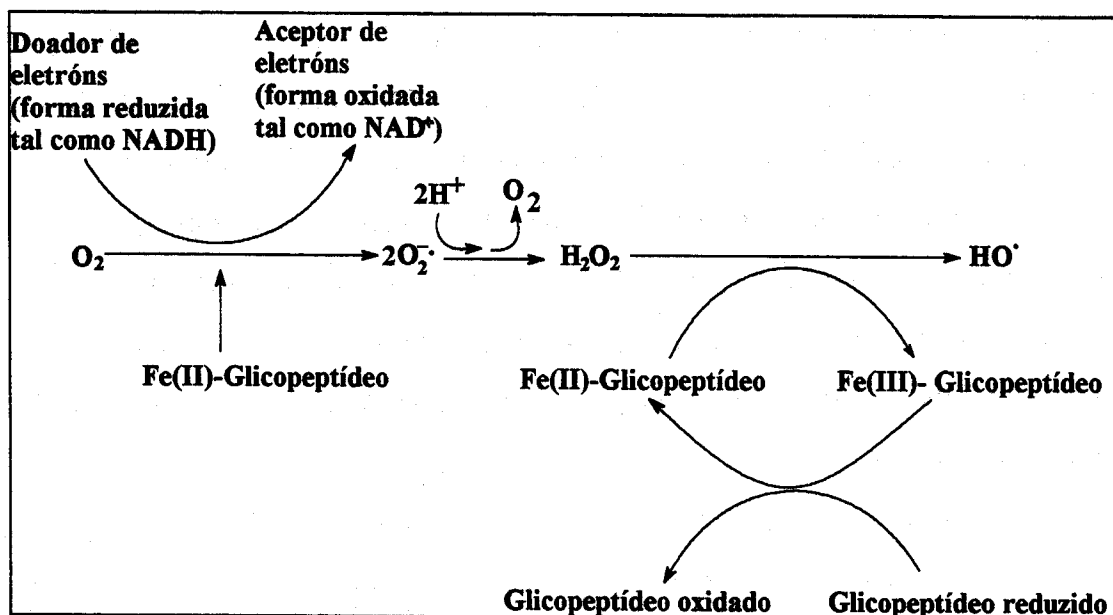


Figura 3- Mecanismo dos glicopeptídeos proposto por Enoki e colaboradores (1989).

Pesquisa feita nessa área por Highley (1980) e Schmidt e colaboradores (1981) mostrou uma madeira degradada por produtos reativos da reação de Fenton, exibindo características físicas e químicas semelhantes às dos fungos de madeira de degradação marrom. Contudo, não foi descrita uma explicação plausível para a produção de substâncias de baixa massa molar e esquemas de reações propostas.

Wood (1994) também investigou rotas para a produção de reativo de Fenton em fungos e Hyde e Wood (1995) também propuseram um mecanismo para degradação de lignina por fungo de decomposição marrom, baseado na química de Fenton. No modelo deles, uma autooxidação (reações de oxidação em fase líquida) dependente de pH e do Fe(II) é postulada para produzir peróxido de hidrogênio e para iniciar as reações de Fenton que conduzem à formação dos radicais hidroxilas. Na ausência de reagentes da química de Fenton ou da espécie reativa de oxigênio, não se espera que o Fe(II) promova uma degradação oxidativa da

celulose da madeira (Kirk *et al*, 1991). Entretanto, outros mecanismos para a produção de peróxido de hidrogênio também foram sugeridos por oxidase ácida (ácido oxálico) em fungos de decomposição marrom (Espejo e Agosin, 1991; Aguilar *et al*, 1999). Kirk e colaboradores (1991) mostraram somente que a degradação oxidativa de materiais lignocelulósicos é envolvida no ataque de fungos de decomposição marrom e, segundo Goodell e colaboradores (1997), qualquer explicação que tente descrever a degradação da parede celular da madeira por estes fungos deveria incluir rotas metabólicas oxidativas plausíveis.

A hipótese apoiada por Goodell e colaboradores (1995, 1997) foi baseada no mecanismo do 2,3-diidroxibenzóico, que consiste em oxidantes de um elétron, como as espécies de Fe(III), reagindo com um derivado de catecolato por um mecanismo de duas etapas com formação de um intermédio de semiquinona radical (Mentasti *et al*, 1977). Quando o ácido 2,3-diidroxibenzóico (DHBA) é oxidado por espécie de Fe(III), o passo inicial na reação envolve a formação de um complexo de DHBA-ferro. O complexo é oxidado pelo Fe(III) adicional para formar o intermediário semiquinona com redução simultânea do ferro, observado na figura 4 e demonstrado por Xu e Jordan (1988). Muitas das combinações da mistura do quelante *Gloeophyllum trabeum* (Gt) (sideróforos), isoladas por Goodell e colaboradores (1997), são derivadas de benzeno hidroxilado, que se espera reagir com ferro de uma maneira semelhante ao DHBA.

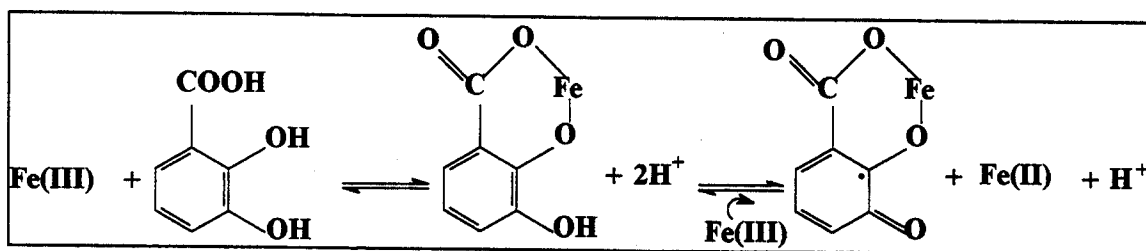


Figura 4- Mecanismo de oxidação do ácido 2,3-diidroxibenzóico proposto por Xu e Jordan (1988).

Goodell e colaboradores (1997) sugerem também que os quelantes de baixa massa molar funcionam com outros metabólitos, inclusive o ácido oxálico, mediando a degradação lignocelulósica. Isso quer dizer que o ácido oxálico complexaria primeiro com o ferro que está sob a forma insolúvel de hidróxido ou óxido na natureza para torná-lo em um estado disponível para o quelante Gt, que retiraria este ferro do oxalato, reduzindo-o para que, posteriormente, ocorresse a química de Fenton (Figura 5). Existem outras propostas envolvendo o ácido oxálico, ou seja, o oxalato foi postulado para representar um papel de ataque direto de ácido na celulose da madeira e hemicelulose (Green *et al*, 1991; Shimada *et al*, 1994) e também foi sugerido que o oxalato possa funcionar, reduzindo Fe(III) para Fe(II) que, então, reage com H_2O_2 para gerar $OH^\cdot$ (Schmidt *et al*, 1981; Shimada *et al*, 1997). Porém, Hyde e Wood (1995) e outros (Zepp *et al*, 1992; Sedlak e Hoigné, 1993; Sulzberger e Laubscher, 1995) observaram que o oxalato não reduz Fe(III), exceto com uma reação dependente de luz. Então, o oxalato não pode funcionar como um catalisador direto do tipo Fenton para a reação química em madeira, pois a degradação de madeira normalmente não acontece sob a luz e a temperatura é relativamente baixa. Não seria esperado que esses fatores representem um papel nos processos naturais de decadência mediada por fungos (Goodell *et al*, 1997).

Entre as substâncias de baixa massa molar, podemos englobar os *glicopeptídeos*, como sugere Enoki e colaboradores (1997), e os quelantes de ferro do tipo sideróforos (Durán, 1995; Durán e Machuca, 1995; Tanaka *et al*, 1996a; Santiago *et al*, 1996; Rodríguez *et al*, 1997a; Goodell *et al*, 1995, 1997, 1998; Paszczyński *et al*, 1999). Propõe-se que os sideróforos possam ter um papel direto na modificação da lignina (Santiago *et al*, 1996, 1997; Jellison *et al*, 1990). Portanto, esses metabólitos podem descolorir efluente kraft E1, licor negro, efluente têxtil e fazer o branqueio de polpas (Durán e Machuca, 1995; Santiago *et al*, 1996, 1997).

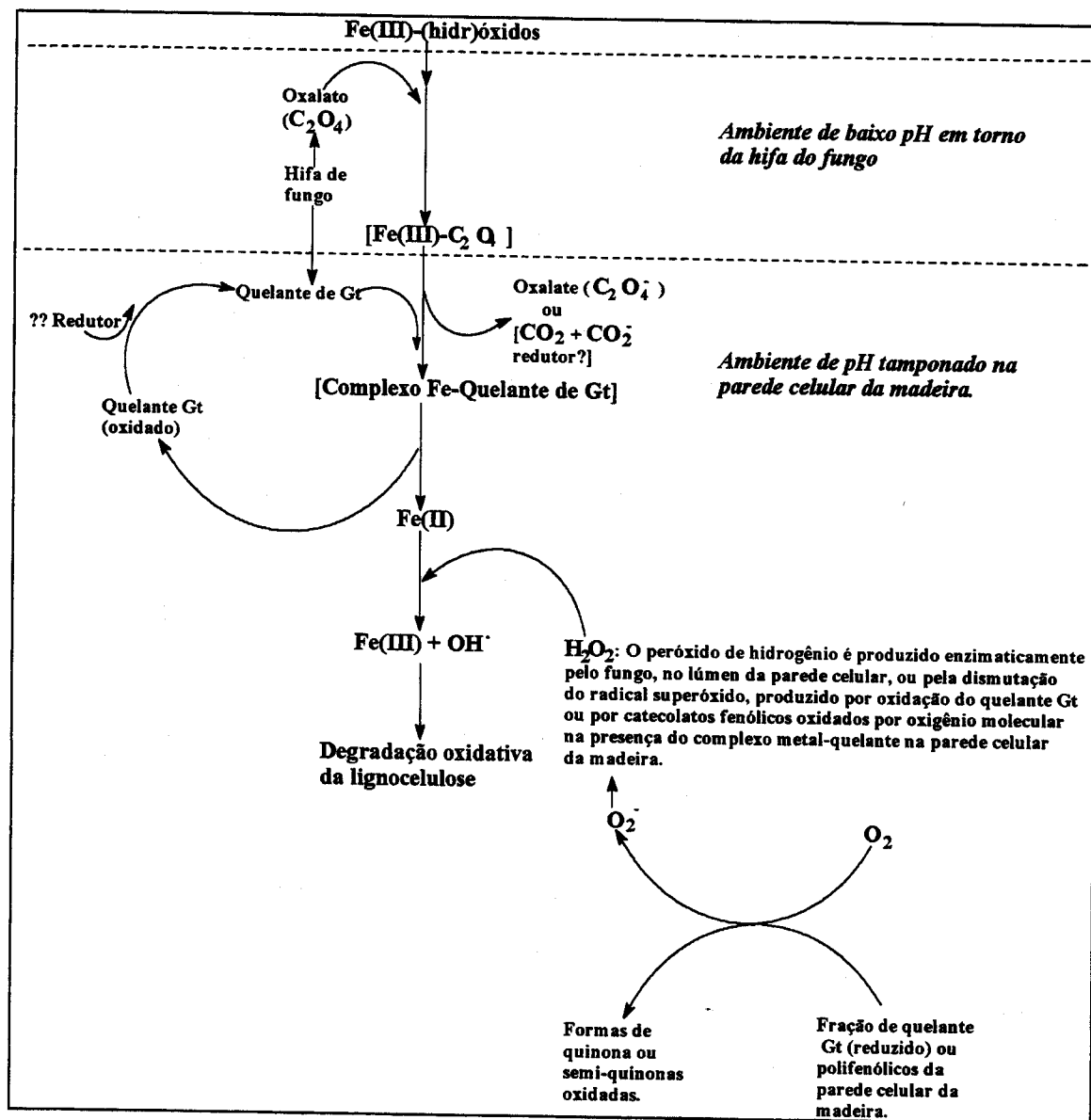


Figura 5- Mecanismo do quelante *G. trabeum* proposto por Goodell e colaboradores (1997).

2.2- Potencial redox

O ácido etileno diamino tetraacético (EDTA), como um composto quelante de metal, foi estudado extensivamente por Halliwell e Gutteridge (1990). Florence (1984) mostrou que o complexo EDTA-ferro, somado ao peróxido de hidrogênio,

forma os radicais hidroxilas. O EDTA acelera a formação de radicais hidroxilas dependente de ferro, abaixando o potencial de redox do Fe(III)/Fe(II) para 0,65V, tornando, assim, a reação de ferro e peróxido do hidrogênio termodinamicamente possível para a formação de radicais hidroxilas (Sutton e Winterbourn, 1984). Estudos de eletroquímica mostraram que o quelante de *G. trabeum* também reduz o potencial de redox do par Fe(III)/Fe(II) (Goodell *et al*, 1997, 1998). Isso pode ser demonstrado ao monitorar a redução de Fe(III) na presença de ferrozina, um quelante de Fe(II) usado na identificação de ferro reduzido (Stookey, 1970; Gibbs, 1976; Sorensen, 1982). Goodell e colaboradores (1997) mostraram que, quando o quelante de *G. trabeum* está presente em excesso e o pH estimado é abaixo da neutralidade, todo o ferro disponível é rapidamente reduzido. Isto foi determinado através da ferrozina como indicador de Fe(II) pelo aumento da absorbância a 562 nm. Eles demonstraram também que, aumentando a quantidade de Fe(III) na reação, na presença de quelante em excesso, aumenta a taxa de redução de ferro na solução. A taxa de reação é aumentada em ambientes de pHs mais baixos, pois estes ambientes são mais favoráveis à redução do ferro. Goodell e colaboradores (1997) determinaram também que, em valores de pH 7, a redução de ferro está muito limitada. Raymond e colaboradores (1984) determinaram os valores de potencial redox de todos os hidroxamatos, como por exemplo a desferrioxamina B, que é de -468 mV, e observaram que todos eles alcançam os redutores biológicos conhecidos, tais como: *Chromatium* ferredoxina, a -490 mV, ou NADH-desidrogenase, a -300 mV a pH 7,0. Os sideróforos apresentam potenciais dependentes de pH, como por exemplo enterobactin apresenta um potencial de -750 mV caindo a valores de +170 mV a pH 4,0 (Raymond *et al*, 1984).

2.3- O papel do ferro para os microrganismos

O ferro é o segundo metal mais abundante na litosfera e inclui aproximadamente 5% da crosta terrestre (Nealson, 1983; Budavari *et al*, 1989).

Concentrações de ferro em solos podem variar de 1 a 20% (Hartwing e Loepper, 1993). Ele é um dos elementos inorgânicos mais importantes e necessários para a vida, pois ele faz parte das mais diversas funções biológicas, como por exemplo do transporte de oxigênio, da fixação de nitrogênio e das numerosas reações de fotossíntese (Crichton e Ward, 1994). Apesar de ser abundante na natureza na forma de Fe(III), é altamente insolúvel em pH fisiológico (pH ~7), resultando em uma concentração de íon férrico dissolvido da ordem de 10^{-17} M. Isso limita sua disponibilidade para manter o metabolismo celular da maior parte dos microrganismos (Hartwing e Loepper, 1993), os quais requerem concentrações da ordem de 10^{-8} a 10^{-6} M do metal para crescer. Nos tecidos animais, o ferro aparece complexado com várias proteínas, como por exemplo transferrina, hemoglobina, lactoferrina e ferritina. Em consequência dessa dificuldade, esses microrganismos desenvolveram mecanismos eficientes de captação seletiva de ferro, quer seja no solo, no meio aquático ou nos tecidos animais, e de transporte para o interior da célula (Bullen, 1991; Winkelmann, 1992). Esse fenômeno ocorre também em meio de cultura, em laboratório, quando o meio contém baixa concentração do metal.

2.4- Quelantes biológicos e os metais de transição

Um dos mecanismos de aquisição de ferro que é estudado amplamente em diferentes espécies de microrganismos, quando se encontram em meios onde há baixas concentrações deste micronutriente, é o de produção de sideróforos. Eles são definidos como agentes quelantes de baixa massa molar (300-1000 Da), específicos para o íon férrico e produzidos por bactérias e fungos quando crescidos em situação de estresse, no meio de baixa concentração de ferro (Neilands, 1995). O papel principal dessas substâncias é sequestrar o ferro do ambiente e torná-lo disponível à célula microbiana. As pesquisas nessa área começaram em torno de cinco décadas, mas o interesse por essas substâncias intensificou-se com a constatação de que a maioria dos microrganismos aeróbicos e anaeróbicos

facultativos, incluindo bactérias e fungos, sintetizam pelo menos um tipo de sideróforo (Ecker *et al*, 1982; Emery, 1980a; b).

Em geral, nos ambientes naturais, como por exemplo em solos alcalinos e calcários, a concentração do íon férrico livre é sempre limitante e este não está disponível para a atividade microbiana ou de plantas. Os níveis totais de ferro na madeira são significativamente mais baixos que os encontrados no solo e são freqüentemente da ordem de 0-2 μM em madeira não degradada (Jellison *et al*, 1992; 1993). Portanto, espera-se que os níveis de ferro solúvel na madeira sejam muito menores, pois, assim, a produção de quelantes deve ser ativada em praticamente todos os ambientes adequados ao crescimento natural dos fungos que degradam madeira. A maioria dos sistemas de quelantes que foram estudados em microrganismos na natureza, podem funcionar no sequestro de metais de transição de outro quelante. Estes quelantes podem ser produzidos na competição com outros microrganismos ou podem ser encontrados como produtos de degradação orgânica, como por exemplo em terras húmicas (Page, 1993; van der Helm e Winkelmann, 1994). A produção de quelante de ferro com alta afinidade permite aos microrganismos o sucesso na competição por metais limitantes no ambiente. Alguns quelantes que não são sideróforos, como o ácido etileno diamino tetraacético (EDTA) e os catecóis, não só isolam metais como também são conhecidos por possuírem função de redução (redução de potencial redox) e possuem a capacidade de reduzir espécies de metais de transição (Ahmad, 1995). Embora considere-se freqüentemente que o EDTA iniba todas as reações dependentes de ferro, o EDTA forma um complexo com o ferro, sendo que este complexo foi observado promover reações de oxidação (Minotti e Aust, 1987; Cheeseman, 1993), sugerindo a redução do ferro. A redução de espécies de metais foi demonstrada com derivados de ácidos dihidroxibenzóico (Xu e Jordan, 1988) semelhantes a alguns sideróforos bacterianos (Figura 4).

2.5- Sideróforos

Nas últimas três décadas, mais de 100 sideróforos naturais foram isolados e caracterizados e apresentam uma considerável variação estrutural (Crowley *et al*, 1991; Drechsel e Jung, 1998). Estruturalmente, é possível diferenciar os sideróforos em dois grandes grupos, os do tipo catecolato ou fenolato e os do tipo hidroxamato. As estruturas dos sideróforos produzidos por diferentes microrganismos são muito variadas, podendo apresentar, além do grupo funcional característico, um ou mais aminoácidos, ou às vezes algum cromóforo. Outros tipos de estruturas encontradas em sideróforos são o hidroxamato-catecolato, os α -hidroxicarboxilatos (derivados de citrato) e as oxazolininas (Neilands, 1984; Hider, 1984; Winkelmann, 1992). Os hidroxamatos são produzidos por fungos e bactérias e os fenolatos são encontrados principalmente em bactérias; o ferricromo e a enterobactina são, respectivamente, os representantes mais típicos (Neilands, 1993). Os sideróforos, em geral, foram encontrados e caracterizados em muitos fungos filamentosos (Winkelmann, 1974; Ernst e Winkelmann, 1974; Konetschny-Rapp *et al*, 1988; Huschka *et al*, 1986; Jalal *et al*, 1984; Berner *et al*, 1991) embora os fenolatos tenham sido encontrados recentemente em fungos que promovem a degradação de madeira (Jellison *et al*., 1991a,b; Goodell *et al*, 1997; Paszczynski *et al*, 1999).

De uma maneira geral, o ferro é quelado por um complexo invariável e termodinamicamente estável de seis átomos de oxigênio que fazem parte da estrutura química dos diversos tipos de sideróforos, passando a formar uma associação denominada complexo ferro-sideróforo (Neilands, 1995). O grupo ligante (Figura 6) usualmente contém os átomos de oxigênio dos ânions de hidroxamato (a) ou catecolato (b).

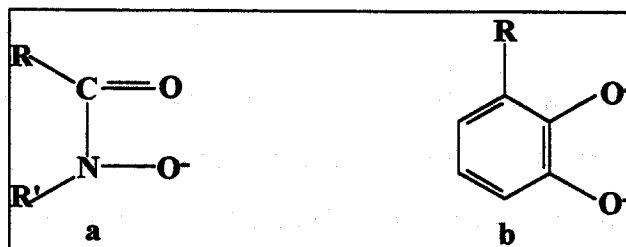


Figura 6-Grupos ligantes de sideróforos: ânions hidroxamato (a) e catecolato (b).

Uma grande classe de sideróforos apresenta um grupo funcional, o hidroxamato, que quela o ferro na forma bidentada (Caudle *et al*, 1994), como por exemplo a desferrioxamina B, que é um siderofóro sintetizado naturalmente por alguns microrganismos do solo (Powell *et al*, 1982). Sendo que três hidroxamatos podem se ligar com todos os sítios de ligação do ferro, ou seja, é hexadentado, somente um ligante é necessário para completar a coordenação do ferro (Caudle e Cumbliss, 1994) (Figura 7).

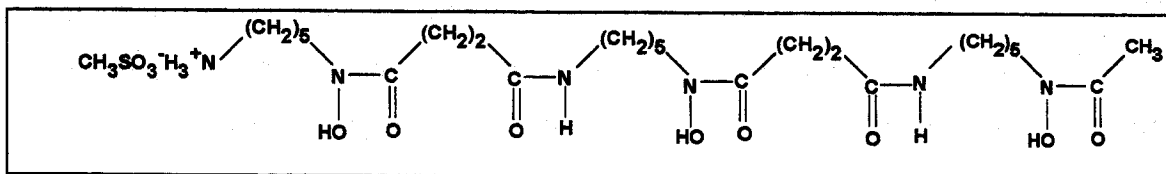


Figura 7- Estrutura do sideróforo do grupo dos hidroxamatos, a desferrioxamina B.

A condição essencial que regula a biossíntese dos sideróforos por microrganismos é um ambiente pobre em ferro. Muitos microrganismos somente secretam os complexantes quando a concentração de Fe no ambiente é $\leq 1,0 \mu\text{M}$. (Bagg e Neilands, 1987).

Segundo Powell e colaboradores (1982), para ocorrer a produção de sideróforos, além da baixa concentração de ferro, do pH e do potencial redox, é importante a aeração direta, pois ela afeta a atividade dos microrganismos que obrigatoriamente requerem oxigênio para a sua produção.

A sacarose e os casoaminoácidos foram escolhidos como fontes de carbono e fontes de nitrogênio porque favorecem o crescimento rápido e a produção de sideróforos de uma grande variedade de bactérias e fungos (Buyer *et al*, 1990).

A degradação da matriz lignocelulósica da madeira é um processo dependente da geração de espécies radicalares. Dentro desse processo, o ferro desempenha um papel muito importante, tanto na degradação por fungos de decomposição branca quanto marrom. Entretanto, até o presente momento, poucos estudos relacionam a produção destes complexantes com o processo de degradação de madeira ou de outros substratos lignocelulósicos. Portanto, esses complexantes, citados pela literatura, que podem ser sideróforos são mencionadas em termos mais amplos por vários autores, como por exemplo substâncias ou compostos de baixa massa molar ou quelantes.

2.5.1- Substâncias de baixa massa molar produzidos por fungos de decomposição marrom

Substâncias extracelulares que causam uma reação de oxidação de um elétron na presença de H_2O_2 foram isoladas da madeira, contendo culturas dos fungos de decomposição marrom, como *Gloeophyllum trabeum* e *Tyromyces palustris* (Enoki *et al*, 1992; Hirano *et al*, 1995; Hirano *et al*, 1997); as preparações parcialmente purificadas continham Fe(II) (0.12-0.2%); proteínas (12-23%), e carboidratos neutros (22-35%); a massa molar das substâncias calculadas por filtração de gel era muito pequeno, em torno de 1000-5000. As substâncias catalisaram uma reação de redox entre doadores de um elétron como NADH e O_2 , produzindo H_2O_2 por O_2^- e reduzindo H_2O_2 para $HO^\cdot$. Além disso, as substâncias reduziram Fe(III) para Fe(II) e adsorveram fortemente Fe(II) (ver figura 3 na página 8). Enoki e colaboradores (1997) examinaram os possíveis papéis do sistema de oxidação de um elétron e mediram as mudanças na produção da substância extracelular de baixo massa molar (1000-5000), que catalisa a reação

redox entre o O_2 e um doador de elétron para produzir $HO^\cdot$. A produção de $HO^\cdot$ e a atividade de oxidação de um elétron foram relacionadas às taxas de degradação de madeira, da celulose cristalina, e dos modelos de lignina nas culturas. A oxidação de um elétron foi determinada medindo-se a produção de etileno a partir de KTBA (ácido 2-ceto-4-tiometil butírico). Essa oxidação foi causada pela produção do radical hidroxila em uma reação de redox entre O_2 e certos doadores de elétrons catalisados pela substância de baixa massa molar do fungo de decomposição marrom (Chandhoke *et al*, 1992, Enoki *et al*, 1997; Hirano *et al*, 1997).

Jellison e colaboradores (1990) isolaram um sideróforo produzido pelo fungo de decomposição marrom *G. trabeum* quando crescia em um meio líquido e em cavacos de madeira. O sideróforo pareceu ser do tipo catecolato, e era extraído com solventes orgânicos do meio de cultura. Os autores utilizaram uma fração parcialmente purificada do sideróforo no tratamento de polpa não branqueada, e observaram que após 30 minutos de incubação era possível apreciar (visualmente) uma descoloração da polpa. Jellison e colaboradores (1997a b) mostraram a influência da concentração de metais de transição (ferro, mangânes e cálcio) e outros parâmetros experimentais, como, pH da cultura, temperatura de incubação e concentração de nitrogênio no meio de cultura; que desempenham um papel significativo na biodegradação da madeira pelos fungos de decomposição marrom (*G. trabeum* e *Postia placenta*). A concentração alta de ferro e manganês (150-200 μM) reprimiram a produção de compostos ligantes de metais (sideróforos) (Jellison *et al*, 1997a).

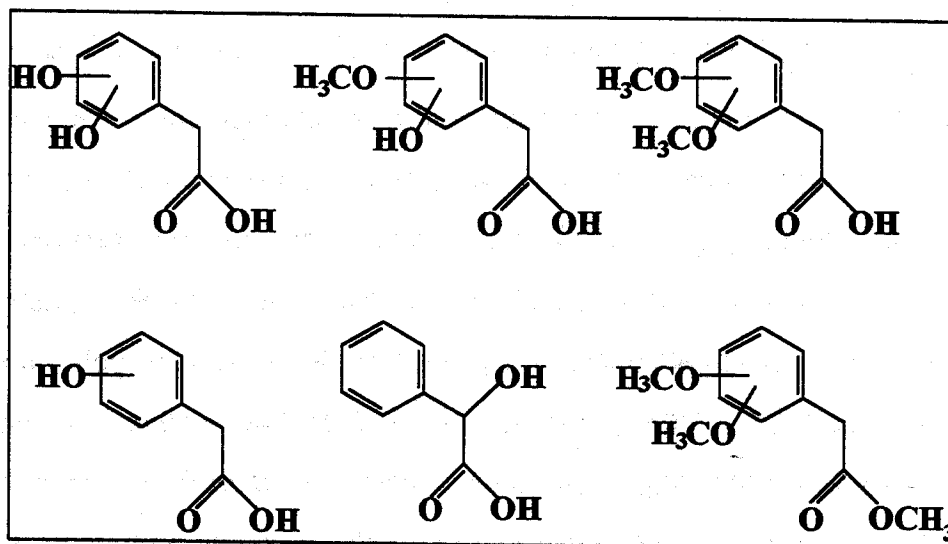
Goodell e colaboradores (1995, 1997) isolaram 15 substâncias do tipo fenolato da cultura de *G. trabeum* e estas substâncias mostraram capacidade de complexar Fe(III), produzir radicais hidroxila em presença de H_2O_2 e catalisar as reações de oxidação via transferência de um elétron, da mesma forma como

acontece com as enzimas ligninolíticas (ver figura 5 na página 11). Algumas das 15 substâncias mostraram capacidade de reduzir o Fe(III) para Fe(II), adsorvê-lo e, desta forma, estabilizá-lo. A reação de redução era mais rápida em pHs ácidos do que em meios mais básicos, sendo que acima do pH 7,0 não havia redução. Os autores postularam uma hipótese para o ciclo redox das substâncias, que se inicia com a liberação do complexante pela hifa fúngica dentro do lúmen da célula vegetal, onde o meio é fortemente ácido. O quelante (sideróforo), a seguir, complexa o Fe(III) presente na madeira e o reduz para Fe(II). Em meio ácido, o ferro sob a forma de Fe(II) é altamente estável e, assim, é transportado pelo quelante até as camadas da parede celular. Dentro da parede, o pH mais alto pode propiciar um ambiente onde o Fe(II) complexado é facilmente disponível para reagir com o H_2O_2 presente, gerando radicais $HO\cdot$ que iniciam as reações de despolimerização, como já foi mencionado anteriormente (Figura 5). Os quelantes que foram previamente isolados de fungos não são do tipo fenolato (Winkelmann e Winge, 1994). Embora quelantes de fenolato sejam produzidos freqüentemente por bactérias, os quelantes de *G. trabeum* são os primeiros quelantes de fenolato com alta afinidade por metais produzidos por fungos que são informados pela literatura (Goodell *et al*, 1997, Paszczynski *et al*, 1999). São conhecidos muitos microrganismos para produzir mais de uma espécie de sideróforos (Ecker *et al*, 1982). Espera-se, então, que outras espécies de quelantes sejam produzidas por *G. trabeum* (Goodell *et al*, 1997). A possível produção adicional de ácido hidroxâmico ou de quelantes de função mistas por *G. trabeum* não foi investigada por Goodell e colaboradores (1997).

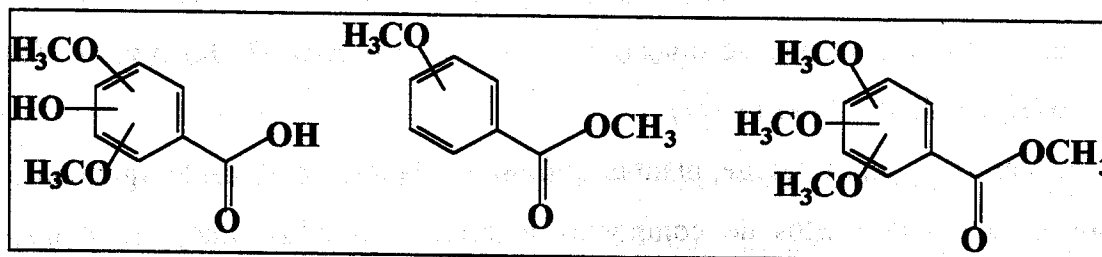
Compostos fenólicos de plantas sofrem oxidação, produzindo quinonas, taninos e outros derivados de compostos fenólicos oxidados (Pueyo e Ariza, 1993). Alguns autores mostraram que os compostos fenólicos oxidam-se naturalmente durante um certo tempo, ocorrendo a produção de peróxido de hidrogênio pela autooxidação dos compostos fenólicos. A quantidade e o grau de

oxidação foram sugeridos afetar o potencial mutagênico de compostos fenólicos que também foram relacionados diretamente à quantidade de peróxido de hidrogênio, produzida pela autooxidação dos compostos fenólicos. É provável que alguns dos derivados de fenolato produzidos por *G. trabeum* passem por uma autooxidação de modo semelhante a outros catecóis, hidroquinonas e outros compostos fenólicos de materiais de planta (Leanderson e Tagesson, 1993) (ver figura 4 na página 9). Um número grande de reações oxidativas de derivados de fenolato podem ser produzidas pelo fungo *G. trabeum*, como mostra o grande número de compostos observados nas análises feitas por Goodell e colaboradores (1997) (Figura 8).

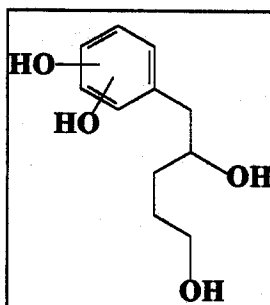
Derivados do ácido hidroxifenilacético:



Derivados do ácido hidroxibenzóico:



Derivado do dihidroxifenilpentano-1,4-diol:



Derivados do hidroxibenzeno:

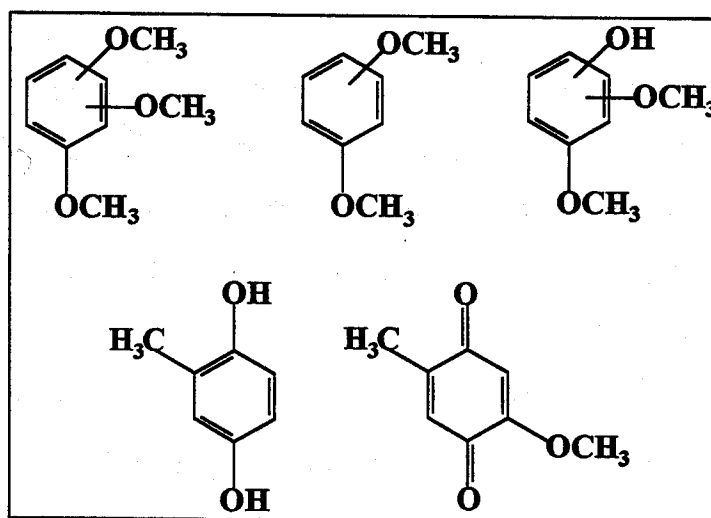


Figura 8- Substâncias de baixa massa molar produzidas pelo fungo *G. trabeum*, segundo Goodell (1997).

Embora trabalhando com a mesma cepa do fungo *G. trabeum*, Enoki e colaboradores (1997) e Goodell e colaboradores (1997, 1998) descreveram substâncias com mecanismos redox semelhantes, com idênticas propriedades redutoras de Fe(III), porém estruturalmente diferentes. Enquanto Goodell e colaboradores (1995, 1997) descreveram as substâncias como sideróforos do tipo catecolato, com uma massa molar de aproximadamente 1000 Da e que reagem fortemente com o corante chromo azurol S (CAS), Enoki e colaboradores (1989, 1997) afirmaram que o composto é um glicopeptídeo com uma massa molecular um pouco maior (1000-5000 Da), e não mencionaram se estes reagem com o corante chromo azurol S (CAS). A caracterização das substâncias feita por

Goodell e colaboradores (1995) é muito mais precisa, uma vez que estes utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para separar os diferentes sideróforos. Diferentemente, Enoki *et al* (1989) somente utilizaram coluna Sephadex G-50 e G-25 para separar uma fração que oxida KTBA e que pode ser constituída de mais de um composto de baixa massa molar.

2.5.2- Substâncias de baixa massa molar produzidas por fungos de decomposição branca

Estudos mostraram que os fungos de decomposição branca *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor*, produzem inibidores extracelulares como os que anulam a atividade de LiP durante a incubação medida pelo ensaio baseado no álcool veratrílico (Archibald, 1992; Orth *et al*, 1993, Enoki *et al*, 1997; Tanaka *et al*, 1999). O inibidor apresentado na cultura de *T. versicolor* tem uma baixa massa molar (Archibald, 1992). A atividade de LiP poderia ser inibida pelas reduções competitivas de H_2O_2 a $HO^\bullet$, de Fe(III) para Fe(II) e pela adsorção forte de Fe(II) feita pelas substâncias de baixas massas molares isoladas da decomposição marrom, da decomposição branca e da decomposição branca de fungos, pois a lignina peroxidase requer H_2O_2 e tem o Fe(III) ou Fe(IV) no sítio ativo da enzima para a oxidação do álcool veratrílico.

Substâncias extracelulares com baixa massa molar que catalisam a reação de redox entre doadores de elétron como NADH e O_2 , produzindo $HO^\bullet$ por O_2^- e H_2O_2 , foram isolados de culturas de *Irpex lacteus* (Tanaka *et al*, 1992) e *Phanerochaete chrysosporium* (Tanaka *et al*, 1996b, 1999). Em culturas *I. lacteus*, a grande atividade de oxidação de um elétron da substância de baixa massa molar foi correlatada com a atividade degradante da madeira, mas a atividade de fenoloxidase não foi apresentada (Tanaka *et al*, 1993). Uma substância extracelular que teve atividade de oxidação de único elétron foi isolada da madeira

que possuía culturas de *P. chrysosporium*. A substância foi purificada parcialmente através de acetona e precipitada por cromatografia em gel filtração e conteve aproximadamente 18% de proteína, 20% de carboidrato neutro e 0,28% de Fe(II). Essa substância era de baixa massa molar (1000-5000 Da) e catalisou as reações de redox entre um doador de elétron e O₂, produzindo H₂O₂ e reduzindo H₂O₂ para HO·, reduziu Fe(III) para Fe(II) e adsorveu fortemente o Fe(II) (Tanaka *et al*, 1996b). Também a taxa de degradação de madeira em culturas de *P. chrysosporium* foi relacionada à produção de HO· nas culturas, mas não para as atividades de LiP e MnP (Backa *et al*, 1992; Tanaka *et al*, 1996a; Tanaka *et al*, 1999). Uma quantidade grande de HO· sempre é produzida em culturas de fungos de decomposição branca, nas quais a madeira é degradada ativamente (Enoki *et al*, 1997, Tanaka *et al*, 1999). A lignina e, principalmente, a celulose de madeira são degradadas somente por decomposição branca quando as culturas dos fungos têm forte atividade de fenoloxidase (Tanaka *et al*, 1985, 1986). Para a polimerização de fenóis, a fenoloxidase requer H₂O₂ e passa o ferro na forma de Fe(III) ou Fe(IV) no sítio ativo da enzima. Então, a substância de baixa massa molar pode inibir a atividade da fenoloxidase, que causa a polimerização da lignina em madeira por meio das reduções competitivas de H₂O₂ para HO·, de Fe(III) para Fe(II) e de adsorção forte de Fe(II). Os fungos de decomposição marrom removem os polissacarídeos em madeira, de preferência a lignina, deixando um resíduo amorfo, um composto friável em grande parte das ligninas, e mostram nenhuma ou pouca atividade de fenoloxidase, até mesmo debaixo das condições nas quais os fungos degradam a madeira ativamente. A relação de remoção do componente da lignina para a perda de massa da madeira é mais alta para a decomposição branda causada por ascomicetos e deuteromicetos, que mostram atividades de fenoloxidase significativas. Entretanto, as relações da perda de lignina para a perda de massa da

madeira sempre são mais baixas que 1% na decomposição branda causada por fungos que mostram nenhuma ou pouca atividade de fenoloxidase (Tanaka *et al*, 1992). Portanto, pelo menos uma fenoloxidase dos fungos de decomposição branca tem que representar um papel importante na degradação da lignina em colaboração com o sistema que produz H_2O_2 e reduz H_2O_2 para $HO\cdot$ e Fe(III) para Fe(II).

2.5.3- Sideróforos produzidos por bactérias

A figura 9 mostra um sideróforo característico de cor amarelo-verde, solúvel em água e fluorescente debaixo de luz ultravioleta, que é chamado de pioverdino (Stanier, 1986; Hamdan *et al*, 1991). Ele é produzido principalmente por *Pseudomonas fluorescence*, que é uma bactéria gram negativa e, atualmente, bastante estudada. A produção dos sideróforos dá-se em ambientes limitados de ferro e, devido a sua função de quelar o ferro, solubiliza o ferro insolúvel (hidróxido de ferro), tornando-o solúvel (Stanier, 1986).

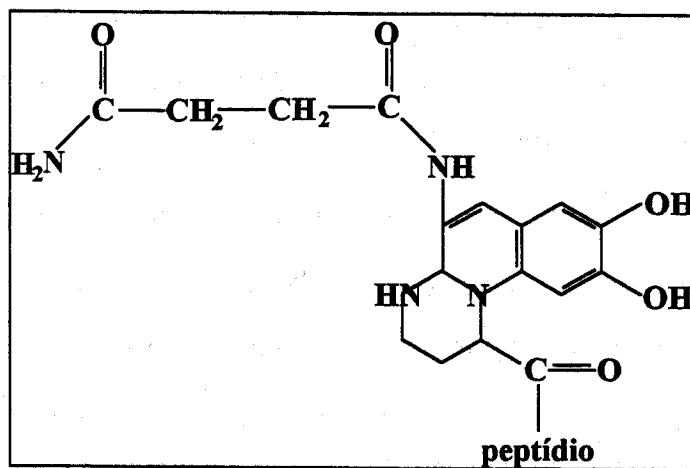


Figura 9- Sideróforo produzido principalmente pela *P. fluorescence*, chamado pioverdino.

Azotobacter vinelandi é uma bactéria gram negativa, aeróbica, presente no solo, que desempenha um importante papel no ciclo do nitrogênio do ambiente,

sendo que é uma das poucas bactérias que fixa o nitrogênio aerobicamente (Brill, 1980). Portanto, para fixar-se o nitrogênio a *azotobacter* deve-se acumular molibdênio e ferro para usá-los como cofatores nas enzimas nitrogenases (Robson e Postgate 1980). Entretanto, no solo, o ferro está presente como hidróxido ou óxido, sob condições aeróbicas e em pH neutro, sob a forma extremamente insolúvel. Portanto, para sequestrar, ligar e promover o armazenamento desse escasso nutriente essencial, *A. vinelandii*, usa uma variedade de sistemas para o armazenamento de ferro (Neilands 1981, Page e Huyter, 1984). Quando o ferro está em concentrações baixas ($>7\mu\text{M}$) ou quando ele está ligado na superfície celular, as células usam o ácido 2,3-diidroxibenzoico (2,3-DHBA) (Figura 10A) como um ligante de baixa afinidade para facilitar o armazenamento do ferro (Page e Huyer, 1984). Em condições de maior deficiência de ferro, são induzidos ligantes para o sistema de armazenamento com elevada afinidade para esse metal, no qual outros sideróforos são secretados ao redor do ambiente para solubilizar e quelar o ferro (Page e Huyer, 1984). *A. vinelandii* produz sideróforos do tipo catecolato, azotoquelino (*N,N*¹ bis(2,3-diidroxibenzoil-L-lisina, Corbin *et al* 1969) (Figura 10B) e aminoquelino (2,3-diidroxibenzoil-putrescina, Page e von Tiggestrom, 1988) (Figura 10C) quando a concentração de ferro está abaixo ou em torno de $7\mu\text{M}$. Espera-se que esses compostos monocatecóis e dicatécóis simples tenham uma baixa afinidade por ferro (Hider 1984), mas são produzidos em abundância e efetivamente extraem o ferro de uma variedade de minerais do metal insolúvel (Page e Huyer 1984). Nas concentrações abaixo de $3\mu\text{M}$, são formados os sideróforos azobactinos do tipo pioverdino que possui uma elevada afinidade por metais (ver figura 9 na página 24) (Page e Huyer, 1984; Page *et al*, 1991). Um outro tipo de sideróforo de *A. vinelandii* recentemente isolado por Cornish e Page (1995) foi mostrado. Ele é chamado de protoquelino e é um composto tricatecolato. Sua estrutura é a união da estrutura do azotoquelino e do aminoquelino (Figura 10D).

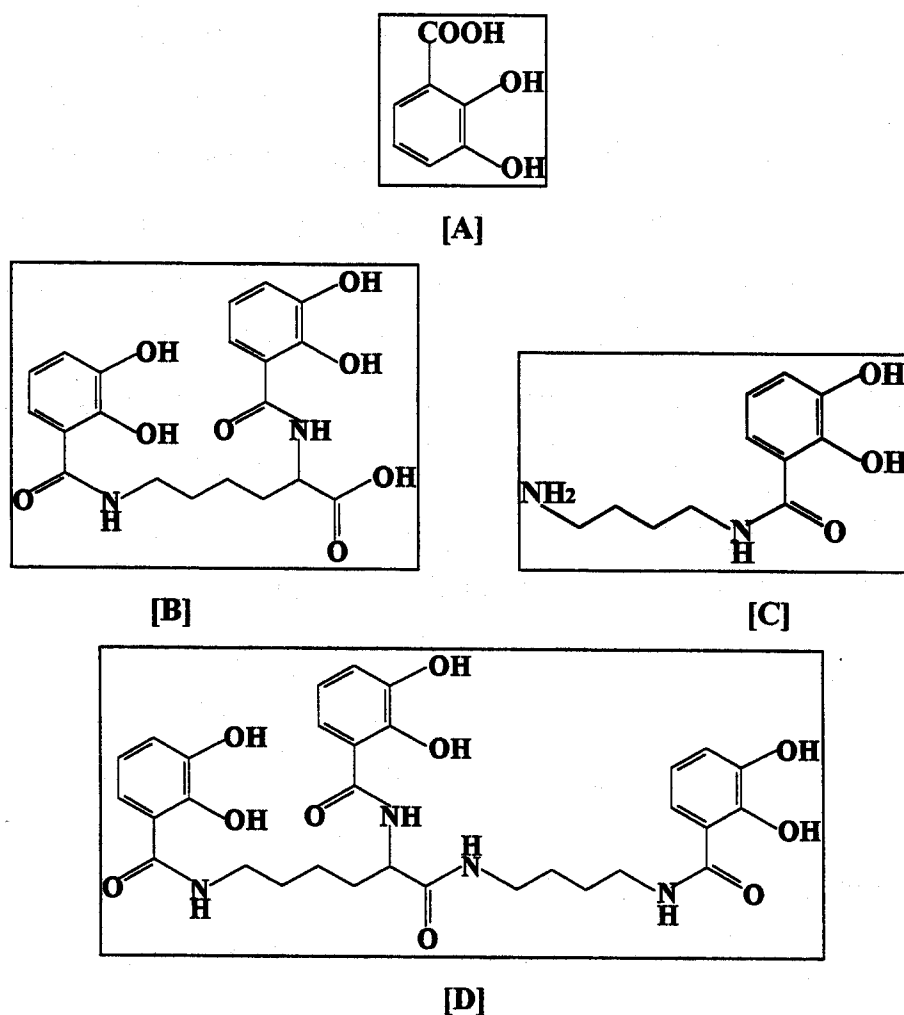


Figura 10- Sideróforos do tipo catecolato, produzidos pela *Azotobacter vinelandi*. (A) 2,3-DHBA, (B) Azotoquelino, (C) aminoquelino e (D) protoquelino.

A capacidade dos sideróforos aminoquelino, azotoquelino e protoquelino de participarem na formação de $\text{HO}^\cdot$ pela reação de Fenton também foi estudada por Cornish e Page (1998). Esses autores mostraram que os complexos aminoquelino/ Fe(III) eram iguais ao EDTA/ Fe(III) na capacidade de catalisar a formação de $\text{HO}^\cdot$, enquanto que os complexos protoquelino/ Fe(III) e azotoquelino/ Fe(III) geraram 70% menos de $\text{HO}^\cdot$ sob as mesmas condições.

2.6- Enzimas lignolíticas

2.6.1- Lacases (Benzenediol: oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2)

A lacase é uma polifenoloxidase produzida por diversos fungos, plantas e bactérias (Givaudan *et al*, 1993; Thurston, 1994; Faure *et al*, 1995; Gianfreda *et al*, 1999). A enzima é uma glicoproteína que contém cobre no seu sítio ativo e que catalisa a redução de O₂ para a água, com simultânea oxidação de substratos fenólicos. Em geral, as lacases contêm 4 átomos de cobre por molécula de enzima, embora existam enzimas com 2, 3 e até 6 átomos de cobre (Thurston, 1994; Agostinelli *et al*, 1995).

As lacases são produzidas pela maioria dos fungos basidiomicetos de decomposição branca, tais como *Trametes versicolor*, *Lentinus edodes*, *Phlebia radiata*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pleurotus* sp., *Phanerochate chrysosporium* etc. Diversos ascomicetos e alguns deuteromicetos, como *Botryosphaeria* sp., *Trichoderma* sp., também produzem lacases (Gianfreda *et al*, 1999; Rodriguez *et al*, 1999).

2.6.2- Lignina-peroxidases (LiP; EC 1.11.1.7)

Tien e Kirk (1983) e Glenn e colaboradores (1983) isolaram uma peroxidase extracelular de *Phanerochate chrysosporium* que degradava lignina de madeira até produtos de baixa massa molar e que oxidava álcool veratrílico para aldeído veratrílico. Essa enzima é uma glicoproteína que contém Fe-protoporfirínico IX como grupo prostético. Ela é dependente de H₂O₂ para a sua atividade e para o seu ciclo catalítico (Podgornik *et al*, 1999).

A LiP é produzida por grande parte dos fungos basidiomicetos de decomposição branca, tais como *Phlebia radiata*, *Phlebia tremellosa*, *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Lentinus edodes* e *Bjerkandera adusta*. Durán e colaboradores (1987) e Ferrer e colaboradores (1992) também detectaram e purificaram a LiP a partir de culturas do ascomiceto *Chrysonilia sitophila*. Esse

fungo mostrou-se bastante eficiente na degradação de madeira mole, de lignosulfonatos e de compostos de modelos de lignina (Rodríguez e Durán, 1991; Ferraz *et al*, 1991; Nogueira *et al*, 1992; Ferraz e Durán, 1995; Rodríguez *et al*, 1997a).

2.6.3- Manganês peroxidases (MnP, EC 1.11.1.7)

Kuwahara e colaboradores (1984) isolaram pela primeira vez a enzima MnP de culturas de *P. chrysosporium*. A maioria das propriedades estruturais dessa enzima é semelhante às de LiP, sendo que ela é uma glicoproteína com Fe-protoporfirínico IX, como grupo prostético, dependente de H₂O₂ para a sua atividade e com um ciclo catalítico semelhante ao de LiP (Paszcynski *et al*, 1985; Rodriguez *et al*, 1999).

As MnPs são produzidas por uma série de fungos de decomposição branca, como *Trametes versicolor*, *Phebia radiata*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes*, *Panus tigrinus*, *Trametes villosa*, entre outros.

2.7- Aplicações biotecnológicas de fungos e bactérias produtores de enzimas lignolíticas e/ou sideróforos

Em anos recentes, parece que o setor industrial está se conscientizando que o desenvolvimento e o meio ambiente tem que ser tratados juntos. A preocupação com relação ao meio ambiente está visível no que se refere, por exemplo, ao interesse de muitas empresas na implantação de sistemas de gestão ambiental e de interação e implementação das normas da série ISO 14000 (Kunz, 1997; Petillo *et al*, 1998).

A maioria das empresas tem demonstrado preocupação em reduzir os níveis de poluição e implementar novas tecnologias para a redução dos compostos clorados. Supõe-se que essa preocupação se deva principalmente às crescentes

pesquisas desenvolvidas na área, à ação de ambientalistas, às pressões do mercado externo e também da opinião pública (Dúran e Esposito, 1997).

A utilização de fungos e bactérias na indústria de papel e celulose objetiva reduzir os requerimentos energéticos e o consumo de reagentes químicos durante os diferentes estágios, desde a obtenção das pastas celulósicas a partir da madeira até a obtenção da polpa branqueada. Portanto, os fungos e bactérias podem ser aplicados na biopolpação das madeiras, no branqueamento das polpas, na modificação da superfície da fibra de polpas mecânicas, na descoloração de efluentes, na biorremediação de solos contaminados e na bioconversão de lignina para subprodutos químicos. A eficiência desses processos está diretamente relacionada com a capacidade do fungo ou da bactéria de degradar lignina (Mehta e Gupta, 1991; Onysko, 1993).

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

Um dos problemas principais para a indústria de papel nessa área é a cor do efluente. A cor é devido principalmente à presença de lignina e de seus derivados, que também são responsáveis pelo cheiro desagradável dos efluentes. Eles são obtidos principalmente na polpação, no branqueamento e no processo de recuperação química da polpa e de fabricação do papel. Efluentes que se originam da primeira fase de extração alcalina (E1) estão altamente coloridos e contribuem com 80% de cor, 30% de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e 60% de demanda química de oxigênio (DQO) para a carga de poluição total. Os efluentes contêm, além de lignina e de seus derivados, fenóis clorados, cloro e hidrocarbonetos clorados responsáveis pelo caráter tóxico e mutagênico destes

efluentes (Eriksson, 1990; Mehta e Gupta, 1991; Bajpai *et al*, 1993; Bajpai e Bajpai, 1994).

Os efluentes industriais coloridos, passíveis de sofrerem descoloração por ação de microrganismos ligninolíticos e/ou produtores de sideróforos, podem, em função de suas características e de suas origens, serem subdivididos em dois grupos: o primeiro é representado pelos efluentes da indústria de celulose e papel, o segundo é representado por corantes sintéticos presentes nos efluentes da própria indústria de corante e nos efluentes de indústria têxtil, normalmente não eliminados dos efluentes pelos tratamentos biológicos ou físico-químicos tradicionais. Neste grupo as lignina-peroxidases mostram-se bastantes efetivas, promovendo a descoloração de compostos derivados do trifenilmetano, de corantes heterocíclicos, de corantes azo e de corantes poliméricos (Kling, 1997). Portanto, o tratamento do efluente da indústria têxtil é também de grande importância para evitar danos ao meio ambiente.

3- OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GERAL

Os trabalhos recentes permitem supor que agentes quelantes de baixa massa molar, notadamente os sideróforos, exercem papel importante na biodegradação da lignina e, conseqüentemente, da clorolignina. A atuação desses sideróforos por meio da reação de Fenton é um estudo para tentar entender o envolvimento das substâncias de baixa massa molar nos mecanismos de biodegradação da lignina ou da clorolignina. Assim, esse estudo, no qual se propôs investigar esses mecanismos, seria um dos primeiros passos para gerar informação a respeito da produção e da utilização de sideróforos de fungos e de bactérias degradantes de lignina e que, de alguma forma, possam futuramente colaborar para o tratamento de efluentes tóxicos e, assim, ajudar a evitar o impacto ambiental.

3.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1- Estudo para determinar as condições usando um modelo natural de fenoloxidase de sideróforo para que esse seja capaz de produzir espécies reativas de oxigênio.
- 3.2.2- Aplicação desse modelo nas condições determinadas no tratamento de efluentes tóxicos.
- 3.2.3- Determinação de um meio de cultura para a produção de sideróforos de microrganismos.
- 3.2.4- Seleção de microrganismos produtores de siderofóros.
- 3.2.5- Identificação do tipo catecolato e/ou hidroxamato dos sideróforos desses microrganismos.

3.2.6- Aplicação desses microrganismos produtores em efluentes tóxicos.

3.2.7- Investigação da estrutura química provável de um dos sideróforos mais importante para o tratamento dos efluentes tóxicos.

4- PARTE EXPERIMENTAL

PARTE 1

4.1.1- Preparação do ligante e reagente- O ligante (Desferrioxamina B- DB) foi adquirido da empresa SIGMA e foi preparada uma solução estoque de 0,4 mg/mL em água deionizada, obtendo uma concentração final de $2,4 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. O cloreto férrico (Merck) usado foi em uma concentração de 20 mmol.L^{-1} com uma concentração final de $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

4.1.2- Determinação do Fe(II)- A ferrozina e a o-fenantrolina foram preparadas em água deionizada em uma concentração de 1%. A determinação do ferro (II) foi feita com 0,2 mL de ferrozina, 0,4 mL de tampão acetato a $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ a pH 4,5, 0,4 mL de desferrioxamina B e 6 μL de ferro (III) a 562 nm durante 3 minutos (Lawrence, 1970, modificado). O valor da absorvância corresponde a formação do complexo. Foi subtraída da absorvância total, ou seja, da absorvância de formação de Fe(II) mais a absorvância de formação do complexo DB/Fe(III). A medida com a o-fenantrolina foi feita da mesma forma, diferenciando somente da leitura espectrofotométrica a 510 nm.

4.1.3- Análise da reação de oxidação pelo complexo DB/Fe(III)- A atividade do complexo foi determinada utilizando o-dianisidina e seringaldazina, adquiridos da empresa SIGMA, como substratos. A oxidação da o-dianisidina foi conduzida numa mistura de reação que continha 0,4 mL de DB de sua solução estoque, 6 μL de FeCl_3 20 mmol.L^{-1} , 0,5 mL de tampão citrato fosfato $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH=3,0). Para a escolha do tampão foi considerado a concentração molar e 0,1 mL de o-dianisidina $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, num volume final de 1,0 mL a 25°C . A reação iniciou-se pela adição do FeCl_3 e a velocidade de oxidação foi acompanhada durante 3

minutos a 460 nm. O mesmo foi feito, quando mencionado, com a seringaldazina em uma concentração de $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ preparada em metanol e medida espectrofotometricamente a 525 nm. A atividade foi determinada como atividade relativa da oxidação da o-dianisidina em 0,5 minuto de reação e por μmol de substrato oxidado (o-dianisidina e seringaldazina) por minuto em 1,0 mL de mistura de reação. O tempo (0,5 minuto) escolhido foi por estar na faixa que apresentou uma maior atividade de oxidação da o-dianisidina. O coeficiente de extinção molar de $29.400 \text{ mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$ para a oxidação da o-dianisidina em água deionizada e $65.000 \text{ mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$ para a oxidação da seringaldazina em metanol foi usado para o cálculo somente da atividade de oxidação do complexo, isto é, foi subtraída a absorvância correspondente a formação do complexo.

4.1.4- Análise enzimática (Szklarz *et al*, 1989 -modificado)- A enzima utilizada para análise foi uma lacase comercial, adquirida da empresa SIGMA, em uma solução estoque de $1 \text{ mg}/0,5 \text{ mL}$ (1 mg de sólido = 235 U) e a atividade foi determinada utilizando o-dianisidina ($\epsilon_{460\text{nm}} = 29.000 \text{ mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$ em água deionizada) e seringaldazina ($\epsilon_{525\text{nm}} = 65.000 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ em metanol) como substratos enzimáticos. A mistura de reação para medir a oxidação da o-dianisidina era composta de $3 \mu\text{L}$ de lacase (unidades adicionadas segundo peso de sólido = $1\text{U}/\text{mL}$ no ensaio), $0,9 \text{ mL}$ de tampão acetato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,5 e $0,1 \text{ mL}$ de o-dianisidina $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, num volume final de $1,0 \text{ mL}$ e a 25°C . A reação iniciou-se pela adição da enzima e a velocidade de oxidação desta foi acompanhada durante 3 minutos a 460 nm. A reação da seringaldazina foi acompanhada durante 3 minutos a 525 nm ($\epsilon_{525\text{nm}} = 65.000 \text{ mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$ em metanol). A mistura de reação foi preparada da mesma forma que a o-dianisidina, exceto a solução de $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de seringaldazina que foi preparada em metanol. Uma unidade de atividade de fenoloxidase tipo lacase foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar $1 \mu\text{mol}$ de substrato (o-dianisidina ou

seringaldazina) por minuto em 1 mL de mistura de reação, durante o estado estacionário inicial, taxa linear, sob as condições de análise.

4.1.5- Determinação do Fe(II) pela técnica de ressonância paramagnética de elétrons (EPR)- Foi pesado 0,1 g de desferrioxamina B (SIGMA) e adicionado 3,0 mL de tampão citrato fosfato 20 mmol.L⁻¹, pH 3,0 e, após a mistura da solução, foi adicionado 0,023g de cloreto férrico e colocado imediatamente no espectrômetro. Os controles foram os seguintes: 0,023 g de cloreto férrico em 3,0 mL de tampão citrato fosfato, 0,1 g de desferrioxamina B em 3,0 mL de tampão citrato fosfato e somente 3,0 mL de tampão citrato fosfato. As análises foram medidas em um espectrômetro da marca Bruker Eleksys X- Band Spectrometer regulado para a temperatura ambiente e com a cavidade de TE₁₀₂.

4.1.6- Determinação de manganês pela técnica de fluorêscencia de raio X- Foram pesados 300 mg do sal cloreto férrico (MERCK) e adicionados em um porta amostra apropriado. Foi utilizado um espectrômetro de fluorescência de raios-X de energia dispersiva, modelo Spectrace 5000. As condições de irradiação dessa amostra foram: voltagem do tubo de raios X: 15KV; corrente do tubo: 0,03 mA; tempo de aquisição: 200 s; atmosfera de vácuo e filtro de película de alumínio de 0,05 mm.

4.1.7- Medida da quimioluminescência- O método foi descrito por Reitberger e Gierer, 1988. As condições experimentais usadas foram: 0,4 mL de DB na concentração de 0,4 mg/mL, 6 µL de FeCl₃ - 20 mmol.L⁻¹, 1,5 mL de tampão citrato fosfato 20 mmol.L⁻¹ e após 1 minuto colocou-se 1 mL de Na₂CO₃ e 0,5 mL de fitalhidrazida para gerar a quimioluminescência. Como controle, foram usados DB e Fe(III) nas mesmas concentrações e condições de análise. A emissão de quimioluminescência do composto ácido formado nas soluções, foi medidas em um aparelho Liquid Scintillation Counter System (LF-100C) Beckman, com o circuito de coincidência desconectado.

4.1.8- Análise da reação da flavina mononucleotídeo (FMN) e da flavina adenina dinucleotídeo (FAD) com a o-dianisidina- Essa reação foi feita com o mesmo procedimento da reação de oxidação da o-dianisidina com o complexo DB/Fe(III), diferindo somente no acréscimo de 10 μL de FMN $0,016 \text{ mol.L}^{-1}$ obtendo uma concentração final de $1,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ e 10 μL de FAD $0,016 \text{ mol.L}^{-1}$, obtendo também uma concentração final de $1,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

PARTE 2

4.2.1- Efluentes- O efluente kraft E1 e o licor negro com uma diluição de 100 vezes foram fornecidos por uma indústria de papel e celulose da região de Campinas, São Paulo, Brasil. As amostras foram armazenadas sob refrigeração a aproximadamente 4°C .

4.2.2- Condições de tratamento do efluente papeleiro kraft E1 e licor negro com o complexo DB/Fe(III)- Colocou-se em um Erlemmeyer de 125 mL, 3 mL de efluente, 1,5 mL de DB, 0,1 mL de FeCl_3 e 4,5 mL de tampão citrato fosfato a 20 mmol.L^{-1} (pH 3,0), sob agitação e oxigenação, durante 96 horas em temperatura ambiente. Após 48 horas, foi adicionada novamente a mesma quantidade de DB e FeCl_3 . Quando ocorria evaporação, o volume era corrigido com o tampão. Em outro Erlemmeyer, fez-se o mesmo, exceto a adição de 0,1 mL de FeCl_3 . Como controle, diluiu-se com tampão 3 mL de efluente a um volume final de 9 mL.

4.2.3- Distribuição de massa molar das cloroligninas contidas no efluente kraft E1 e das ligninas contidas no licor negro- As mudanças na distribuição da massa molar das cloroligninas contidas nos efluentes foram estudadas por filtração em

gel em coluna de Sephadex G-50 (1,5 X 60 cm). O V_0 dessa coluna foi de 44 mL. A coluna foi equilibrada e eluída com uma solução de NaOH-LiCl 0,1 mol.L⁻¹. A amostra foi de 3,0 mL de efluentes tratados e o controle, previamente filtrado, foi aplicado à coluna e eluído com um fluxo de 0,66 mL/min. Os cromatogramas foram obtidos por contínuo monitoramento da absorvância das cloroligninas em 280 nm (Bergbauer *et al*, 1992; Wang *et al*, 1992).

4.2.4- Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) do efluente kraft E1- As amostras (efluente kraft E1 tratado com o complexo DB/Fe(III) e com somente DB, o não tratado, e o controle) foram analisadas por HPLC, fase reversa, usando uma coluna C-18 Bondapack (25 cm). As amostras foram eluídas com metanol-H₂O 1:1 a um fluxo de 1 mL/min e detectadas por absorção no ultravioleta a 280 nm.

4.2.5- Determinação da cor dos efluentes- A cor do efluente foi determinada com uma alíquota de 0,5 mL, filtrada em membrana de millipore (0,45 µm) e ajustado o pH para 7,6 com tampão fosfato 0,1 mol, até o volume final de 1 mL. Nestas condições, foi medida absorvância em 465 nm do efluente Kraft E1 e do licor negro tratado com o complexo DB/Fe(III) a tempo zero, 24, 48, 72 e 96 horas (Atlow *et al*, 1984).

4.2.6- Determinação de fenóis totais do efluente kraft E1 e do licor negro-O conteúdo de fenóis totais nos efluentes tratados com complexo DB/Fe(III), previamente filtrados, foi determinado pelo método padrão descrito por Apha (1989) com o reagente de Folin Ciocalteu. A mistura de reação foi preparada pela adição de 250 µL de uma solução de carbonato-tartarato e 25 µL de uma solução do reagente de Folin-Ciocalteu, para 0,1 mL de efluente, e incubada durante 30 minutos a 25°C, após a absorvância ser lida a 700 nm. A solução de carbonato-

tartarato foi preparada por dissolução de 200 g de carbonato de sódio em 1,0 L de água destilada.

4.2.7- Determinação de Fe(III) nos efluentes- O ferro do efluente kraft E1 e do licor negro (diluição 100x) foi determinado por espectrometria de absorção atômica. As amostras foram comparadas com padrões de ferro na concentração de 2,0 mg/L e 4,0 mg/L.

4.2.8- Lignina- A lignina dioxano, utilizada nos experimentos de fluorescência, foi obtida de *Eucalyptus grandis* em nosso laboratório.

4.2.9- Análise de degradação da lignina pelos complexos DB/Fe(III) e AHA/Fe(III) por fluorescência- Adicionou-se em um tubo de ensaio 0,25 mL de DB 3 mmol. L⁻¹ ou 0,25 mL de AHA 10 mmol.L⁻¹, 0,020 mmol.L⁻¹ de FeCl₃ 20 mmol.L⁻¹ e 0,2 mL de lignina concentrada diluída em 1mL. A reação ocorreu em um período de 24 horas com uma relação do ligante e do ferro de 2:1 ou 6:1, respectivamente, e em meio ácido (pH 3 a 4) ajustado com HCl, sendo que todos os reagentes foram preparados em água deionizada. A degradação oxidativa da lignina foi determinada pela técnica de fluorescência em meio básico, com a adição de 0,1 mL de KOH (a emissão foi na faixa de 380-540 nm e a excitação a 360 nm).

4.2.10- Análise de degradação do efluente kraft E1 pelos complexos DB/Fe(III) e AHA/Fe(III) por fluorescência- Em um tubo de ensaio colocou-se 1,9 mL de DB 3 mmol. L⁻¹ ou 1,9 mL de AHA 10 mmol.L⁻¹, 0,14 mmol.L⁻¹ de FeCl₃ 20 mmol.L⁻¹ e 1 mL de efluente kraft E1 (clorolignina), nessa ordem de adição, por um período de 24 horas e em meio ácido (pH 3 a 4) ajustado com HCl, sendo que os reagentes foram preparados em água deionizada ou em tampão citrato fosfato.

A degradação oxidativa da clorolignina foi determinada pela técnica de fluorescência em meio básico, com a adição de 0,1 mL de KOH (a emissão foi na faixa de 380-540 nm e a excitação a 360 nm). No experimento da cinética de degradação da clorolignina, foi colocado a mesma concentração dos reagentes acima mencionados, mas a emissão foi fixa em 474 nm, que corresponde à máxima emissão.

4.2.11- Análise da reação da FMN com o efluente kraft E1- Na análise foi usado somente 25 μL de DB 3 mmol. L^{-1} ou 50 μL de AHA 10 mmol. L^{-1} e 4 μL de FeCl_3 20 mmol. L^{-1} , 5 μL de FMN 0,016 mol. L^{-1} ou NADH 0,016 mol. L^{-1} , 2 mL de água deionizada e 0,5 mL de efluente kraft E1 (clorolignina), obedecendo essa ordem de adição por um período de 5 minutos e em pH 3 a 4, ajustado com HCl. A degradação oxidativa da clorolignina foi determinada pela técnica de fluorescência em meio básico com a adição de 0,1 mL de KOH 1 mol. L^{-1} . A emissão foi na faixa de 380-540 nm e a excitação a 360 nm.

PARTE 3

4.3.1- Microrganismos- Fungos: *Gloeophyllum trabeum* CCT 5453, *Trametes versicolor* CCT 4521 e *Lentinus edodes* CCT 4519 fazem parte da coleção da Fundação Tropical André Tosello - Campinas- SP e o fungo *Trametes villosa* CCT 5567 foi cedido pelo Departamento de Bioquímica (CCB) Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis-SC. Bactérias: a *Azotobacter vinelandi* 1218 faz parte da coleção da ESALQ - Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz - Piracicaba - SP e a *Pseudomonas fluorescence* 2312 foi cedida pelo Instituto Biológico de São Paulo - São Paulo - SP.

4.3.2- Manutenção das culturas dos microrganismos - Os fungos *T. versicolor*, *T. villosa* e *L. edodes* foram mantidos no meio extrato de malte e *G. trabeum* no meio ágar dextrose batata. *P. fluorescence* foi mantida em ágar nutriente e a *A. vinellandi* foi mantida no seguinte meio de cultura: manitol, 10 g; K_2HPO_4 , 0,5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,3 g; NaCl, 0,3 g; $CaCO_3$, 3 g; $MnSO_4 \cdot H_2O$, Traço; Sulfato ferroso ou férrico, Traço; ágar, 15 g; água deionizada 1000 mL, sob a temperatura de refrigeração à aproximadamente 4°C.

4.3.3- Preparação do inóculo dos microrganismos- Os fungos foram retirados do meio de manutenção e inoculados nas placas com um disco de tamanho padronizado (0,7 cm de diâmetro). No meio líquido foram inoculados dois discos com fungo. As bactérias foram retiradas diretamente dos meios de manutenção das culturas e repicadas para as placas de Petri com o meio de determinação de sideróforo. Para o meio líquido colocou-se duas alçadas de bactéria.

4.3.4- Lavagem da vidraria para a produção e determinação dos sideróforos- A vidraria para a determinação e produção dos sideróforos foi colocada primeiramente imersa no HCl 0,1mol.L⁻¹, depois no EDTA 100 mol.L⁻¹ e por último enxaguada com ácido nítrico a 2%. Após este processo foi feito um abundante enxágue com água deionizada, eliminando-se todo o ferro da vidraria.

4.3.5- Determinação da produção dos sideróforos em meio sólido pelo método do CAS- A produção do sideróforo foi determinada em placas de Petri contendo meio de cultura com ágar e 50 % da solução de chromo azurol S (CAS) (Schwyn e Neilands, 1986). O meio de cultura foi somente baseado nos métodos descritos por Schwyn e Neiland (1987), Cox (1994) e Buyer e Sikora (1990) e a proposta desse trabalho foi o seguinte meio: sacarose, 20g; bacto-casaminoácidos, 2 g; K_2HPO_4 , 1 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g; água deionizada 1000 mL. As placas foram incubadas à

temperatura de 30°C durante 10 dias (meio de cultura 1). O meio de cultura 2 é o mesmo do meio de cultura 1, diferindo apenas no acréscimo de 2% de extrato de malte nesse meio. O meio de cultura 3 constitui somente de 2% de extrato de malte (Difco) em metade da placa e na outra metade 2% de extrato de malte com 50% da solução de CAS (Milagres e Machuca, 1998) As placas foram incubadas na temperatura de 30°C, durante 10 dias. Todos os meios foram autoclavados a 121°C por 15 minutos. A solução do complexo indicador ternário (CAS) foi preparada da seguinte maneira: 0,15 mmol.L⁻¹ do reagente chromo azurol S, 0,015 mmol.L⁻¹ de uma solução de FeCl₃ em HCl, 0,6 mmol.L⁻¹ do detergente brometo de hexadeciltrimetil - amônio (HDTMA) em solução tampão de piperazina/HCl pH 5,6. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água deionizada. Quando um agente quelante, como o sideróforo, retira o Fe(III) do complexo indicador universal de sideróforos, CAS, a cor muda completamente do azul para o alaranjado.

4.3.6- Produção dos sideróforos em meio líquido- Os sideróforos foram produzidos pelos microrganismos em um meio líquido contendo sacarose, 20 g; bacto-casaminoácidos, 2 g; K₂HPO₄, 1 g; MgSO₄.7H₂O, 0,5 g; água deionizada 1000 mL, em Erlenmeyer de 125 mL com um volume de 50 mL deste meio de cultura, com um pH em torno de 7,1, sob agitação de 120 rpm por um período de 6 dias para as bactérias e 15 dias para os fungos. Foi determinada a produção em um meio líquido usando duas fontes de carbono (sacarose e glucose), sendo que o meio de cultura usado foi o mesmo do meio de cultura acima mencionado, mudando somente a fonte de carbono: 15 dias para o fungo e 6 dias para a bactéria.

4.3.7- Detecção dos sideróforos em meio líquido pelo método do CAS- O método universal de Schwyn e Neilands (1987) para determinação de sideróforos

foi utilizado para detectar a presença destes em culturas líquidas dos fungos e bactérias selecionados pelos meios de culturas sólidos. O reagente CAS complexado com o Fe(III) na solução possui uma intensa cor azul com um $\epsilon_{630\text{nm}} = 100.000 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ em água deionizada e, após reagir com o sideróforo, passa a ter uma cor alaranjada, acompanhado de uma diminuição na absorvância em 630 nm. A determinação foi feita retirando se uma alíquota de 0,5 mL do meio de cultura. Após a produção dos sideróforos pelos fungos e bactérias, colocou-se 0,5 mL da solução de CAS, incubou-se durante 12-24 horas à temperatura ambiente e mediu-se a 630nm. Como controle, utilizou-se uma cultura não inoculada para detectar a possível interferência do meio de cultura utilizado para a produção dos sideróforos.

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

$$\% \text{ de unidades de CAS} = (Ab - Aa)/Ab \times 100$$

onde:

Ab = Absorvância do controle

Aa = Absorvância da amostra

4.3.8- Determinação dos sideróforos do tipo hidroxamato- Csáky (1948) detectou sideróforo do tipo hidroxamato pela seguinte análise: o sobrenadante, contendo sideróforo (1 mL), foi hidrolisado por 1mL de H_2SO_4 a 6 mmol.L^{-1} em água fervente por 6 horas ou a 130°C por 30 min. A solução foi tamponada, adicionando-se 3 mL de acetato de sódio (35 g de acetato de sódio em 100 mL de água). Adicionou-se 1 mL de uma solução de ácido sulfanílico (1 g de ácido sulfanílico dissolvido por aquecimento em 100 mL de ácido acético a 30%, v/v) e em seguida colocou-se 0,5 mL de solução de iodo (1,3 g de iodo em 100 mL de ácido acético glacial). Após 3-5 minutos, o excesso de iodo é destruído com 1 mL da solução de arsenito de sódio (2g de Na_2AsO_4 em 100 mL de água).

Colocou-se uma solução de 1 mL de α -naftilamina (3 g α -naftilamina dissolvida em 1000 mL de ácido acético a 30 %) e, depois, adicionou-se 10 mL de água deionizada, permitindo o desenvolvimento de cor em 20 a 30 minutos e mediu-se em uma absorvância a 526 nm.

4.3.9- Determinação dos sideróforos do tipo catecolato- A análise feita para a determinação dos sideróforos do tipo catecolato foi descrita por Arnou (1937), que consiste em reagir 1 mL do filtrado do fungo ou da bactéria contendo sideróforo, com 1 mL de HCl, 1 mL de uma solução contendo 10 g de nitrito de sódio e 10 g de molibdato de sódio dissolvido em 100 mL (os catecolatos produzem uma cor amarela neste ponto) e 1 mL de NaOH (neste ponto ocorre uma mudança de cor para vermelho). A cor é estável em menos de 1 hora e a solução tem absorvância máxima a 510 nm.

PARTE 4

4.4.1- Efluentes- O efluente kraft E1 e o licor negro (diluição de 50 vezes) foram fornecidos por uma indústria de papel e celulose da região de Campinas, São Paulo, Brasil e o efluente têxtil utilizado foi coletado em uma indústria têxtil situada no município de Santa Bárbara, região de Campinas-SP. O efluente têxtil bruto utilizado foi compostado e coletado diariamente por uma semana. As amostras foram armazenadas sob refrigeração a aproximadamente 4°C. Esse último efluente somente foi usado no tratamento com microrganismo.

4.4.2- Condições de tratamentos dos efluentes pelos microrganismos- Os microrganismos foram primeiramente produzidos em meio líquido, em Erlenmeyer de 125 mL com um volume de 50 mL do meio de cultura, em um pH em torno de

7,1 sob agitação de 120 rpm por um período de 6 dias para as bactérias e 15 dias para os fungos, anteriormente. Após a produção dos sideróforos, colocou-se 50 mL do caldo que continha o fungo ou a bactéria com os seus sideróforos, em um erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de efluente papelheiro ou têxtil em um pH em torno de 5,0 e deixou-se sob agitação (180 rpm) por um período de 4 dias em uma temperatura de 30°C. Os controles foram os seguintes: 1) colocou-se 50 mL de água deionizada e 100 mL de efluentes no erlenmyer de 250 mL sem microrganismo e 2) adicionou-se 1 placa de petri com cultura dos fungos ou das bactérias nos 100 mL de efluentes com 50 mL de água deionizada sob a mesmas condições e autoclavados a uma temperatura de 121°C por 15 minutos (teste de adsorção).

4.4.3- Determinação das atividades enzimáticas após o tratamento dos efluentes com microrganismos- Após um período de 4 dias de tratamento dos efluentes, foram determinadas as atividades enzimáticas relacionadas com a degradação de lignina e seus derivados (cloroligninas). As culturas não inoculadas (controles) que continham os substratos lignocelulósicos, foram utilizadas como controles enzimáticos para descartar possíveis interferências com os métodos de determinação das atividades. As atividades enzimáticas foram determinadas espectrofotometricamente e os resultados foram expressos em μ moles de substrato oxidado durante um minuto, por mL de caldo filtrado (U/mL).

a) Lacase (Szklarz *et al*, 1989- modificado):

A atividade de lacase foi determinada utilizando seringaldazina como substrato enzimático. A oxidação da seringaldazina ($\epsilon_{525\text{nm}} = 65.000 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) foi conduzida numa mistura de reação que continha 0,6 mL do caldo filtrado, 0,2 mL do tampão acetato de sódio 50 mmol.L^{-1} (pH 5,0) e 0,1 mL de seringaldazina $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ preparada em etanol. A reação iniciou-se pela adição da

b) Lignina-Peroxidase (Tien e Kirk, 1984):

A atividade de lignina peroxidase (LiP) foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico ($\epsilon_{310\text{nm}} = 9.300 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A mistura de reação continha 0,6 mL de caldo filtrado, 0,2 mL de H_2O_2 2,0 mmol.L^{-1} e 0,2 mL de uma solução de álcool veratrílico 2,0 mmol.L^{-1} em tampão tartarato de sódio 0,4 mol.L^{-1} (pH 5,0). A reação foi iniciada pela adição do H_2O_2 e o aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado medindo-se a absorvância a 310 nm. A atividade de LiP seria expressa em U/mL.

c) Manganês-peroxidase (Kumahara *et al*, 1984):

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

4.4.4- Determinação do oxalato nos caldos filtrados dos microrganismos- A determinação enzimática quantitativa da concentração do oxalato foi realizada utilizando-se um kit da Sigma - método no. 591. O método foi adaptado para medir a concentração de oxalato nos caldos filtrados dos fungos e das bactérias, pois ele é usado para medir oxalato em urina. O procedimento adotado foi o seguinte: em um tubo de ensaio colocou-se 1 mL do reativo A [3-(dimetilamino) ácido benzóico - DMAB - 3,2 mmol.L^{-1} , 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona - MBTH - 0,22 mmol.L^{-1} tamponado no pH = 3,1], 0,5 mL do caldo filtrado do fungo ou da bactéria, 0,5 mL do diluente [EDTA tamponado no pH 7,6], sendo que o pH neste

ponto deve ficar entre 5,0-7,0, podendo ser ajustado com ácido clorídrico a 1 mol.L⁻¹ ou hidróxido de sódio a 1 mol.L⁻¹. Depois, adicionou-se 0,1 mL do reativo B [Oxalato oxidase - 3000 U/L e peroxidase - 100,000 U/L] e imediatamente misturou-se os tubos de ensaio. Foram incubados os tubos em temperatura em torno de 25°C durante 5 minutos e, após esse período, as amostras foram medidas espectrofotometricamente a 590 nm. A concentração do oxalato nos caldos filtrados dos fungos e das bactérias foi calculado utilizando-se uma curva padrão com um reagente de oxalato de sódio (MERCK), cuja a equação da reta foi a seguinte:

$$Y = 0,00719 + 1,04365 \cdot X \quad R = 0,99848$$

4.4.5- Determinação da cor dos efluentes- A cor do efluente kraft E1 e do licor negro foi determinada como no item 4.2.5. A determinação da cor do efluente têxtil teve o mesmo procedimento dos efluentes mencionados acima, diferindo apenas nas medidas espectrofotometricas, que foram a 425 nm e 480 nm.

4.4.6- Determinação de fenóis totais do efluente kraft E1 e do licor negro- O conteúdo de fenóis totais nos efluentes tratados com os fungos e bactérias, previamente filtrados, foi determinado pelo método padrão descrito pela Apha (1989) com o reagente de Folin Ciocalteau (vide item 4.2.6).

4.4.7- Detecção dos sideróforos em meio líquido pelo método do CAS- método descrito no item 4.3.7.

PARTE 5

4.5.1- Extração dos sideróforos do tipo catecolato- Foi feita uma extração líquido-líquido com acetado de etila (q.s) e 150 mL do caldo do filtrado do fungo

G. Trabeum em pH 1,8, ajustado com HCl - 1 mmol.L⁻¹ durante 4 dias (Page e von Tingerstom, 1988 e Cox, 1994). Após esse período, o solvente foi extraído em rotavapor e guardado por 2 dias para a próxima etapa. A etapa seguinte foi a separação dos catecolatos por cromatografia de camada delgada com aplicação do extrato em placas com sílica gel G. Esse extrato foi diluído em 1,0 mL de acetato de etila para a aplicação nas placas e o sistema de solvente usado foi 68% de tolueno e 32% de ácido acético. Os indicadores usados para identificar as manchas nas placas de sílica foram o iodo sublimado e a luz ultra violeta. Essas manchas (amostras) foram retiradas da placa com sílica gel G diluídas em acetato de etila, filtradas em papel de filtro e evaporadas no rotavapor. Depois foram analisadas por espectrometria de massa, espectrometria do infravermelho e pela técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

4.5.2- Identificação dos sideróforos do tipo catecolato

- a) Espectrometria de massa: Os espectros de massas das amostras (10 mg) foram registrados a 70 eV em um espectrômetro de massa VG AUTOSPEC, através da técnica de ionização por impacto de elétrons (EI).
- b) Espectrometria do infravermelho (IV): O espectro de infravermelho das amostras (10 mg) foi registrado entre 4.000 e 500 cm⁻¹, utilizando filmes num aparelho PERKIN ELMER 1430.
- c) Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN - ¹H): As amostras (10 mg) para RMN de ¹H foram preparadas por dissolução em CDCl₃/TMS. Os espectros de RMN de ¹H foram determinados em condições usuais nos seguintes espectrômetros: VARIAN (GEMINI - 300 e INOVA - 500) e BRUKER (AC 300/P).

5-RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE 1

5.1-DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE FENOLOXIDASE.

A Desferrioxamina B é um potente e específico quelante de ferro e a atividade de fenoloxidase do complexo DB/Fe(III) também foi detectada espectrofotometricamente a 460 nm, sendo que nesse trabalho a atividade de fenoloxidase apresentou maior em pH 3,0 na relação de 2 moles de desferrioxamina B para 1 mol de Fe(III) e na relação de 1 mol de DB para 1 mol de Fe(III) (Figura 11) sob temperatura entre 25°C a 30°C. A reação de Fenton ocorre em meio ácido (Fossey *et al*, 1995) e Raymond e colaboradores (1984), mostraram que esse complexo é estável sob várias condições ácidas. Assim, nesse pH foi favorecido a reação de Fenton e não houve interferência na formação do complexo (Figura 12 e 13).

As figuras 12 e 13 mostram a cinética de formação do complexo desferrioxamina B/Fe(III). A relação entre a concentração desferrioxamina B e o Fe(III) que apresentou maior atividade foi a de 2:1 (Figura 11). Apesar de 1 desferrioxamina B ser suficiente para promover a ligação com 1 ferro em todos os seus sítios de ligação, a relação de 2 desferrioxamina B para 1 de Fe(III) apresentou uma cinética mais rápida para a formação do complexo e, conseqüentemente, para a atividade de oxidação da o-dianisidina (Figuras 12 e 13). A relação de 3 desferrioxamina B para 1 Fe (III) também foi testada e não obteve uma cinética mais rápida que a relação de 2:1 (resultado não mostrado). Segundo Caudle e Cumbliss (1994), quando os três grupos de hidroxamatos da

desferrioxamina B estão ligados com todos os sítios de ligação do ferro, a medida máxima no seu espectro é 430 nm. As mudanças nos valores de λ_{max} na espectroscopia do UV/Visível promovem um conveniente método para monitorar o equilíbrio do complexo e de sua cinética. Portanto, o complexo apresentou-se estável em pH 3,0, confirmando o que foi observado por Raymond e colaboradores (1984) (Figura 12 e 13).

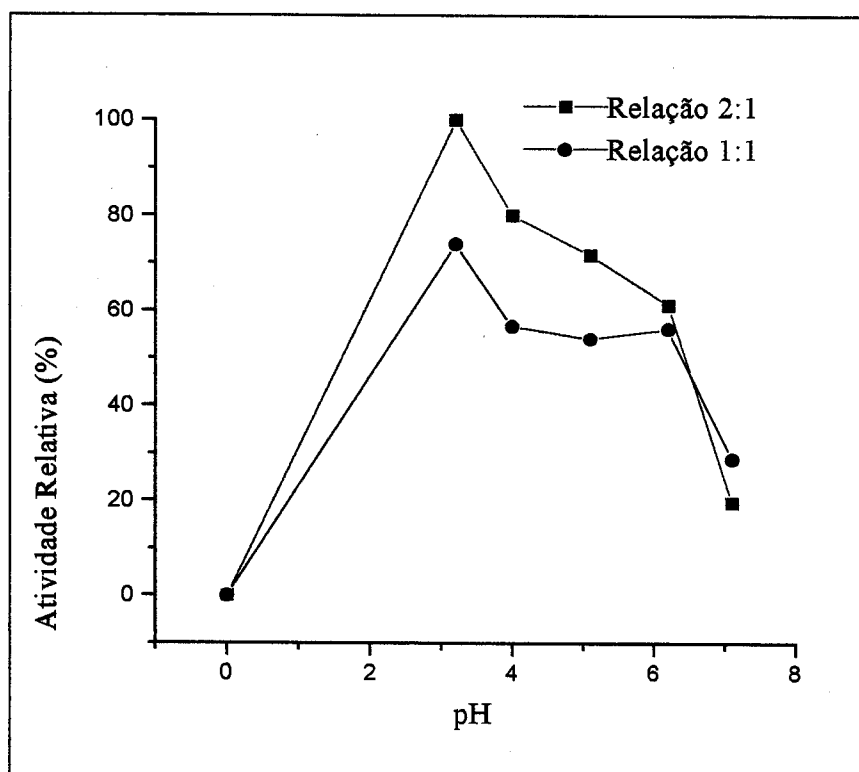


Figura 11- Efeito do pH na formação do complexo DB/Fe(III) e na reação de fenoloxidação sobre a o-dianisidina no tampão citrato-fosfato 20 mmol.L⁻¹, pH 3,0.

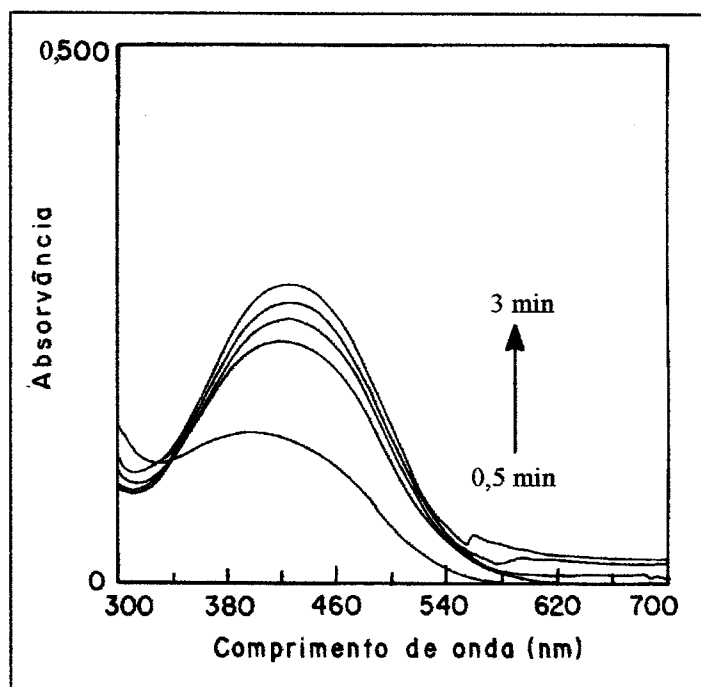


Figura 12- Cinética de formação do complexo na relação entre 1 mol de desferrioxamina B para 1 mol de Fe(III) no tampão citrato-fosfato 20 mmol.L⁻¹, pH 3,0. Os espectros foram obtidos na faixa de tempo de 0,5 a 3 minutos, a 460nm.

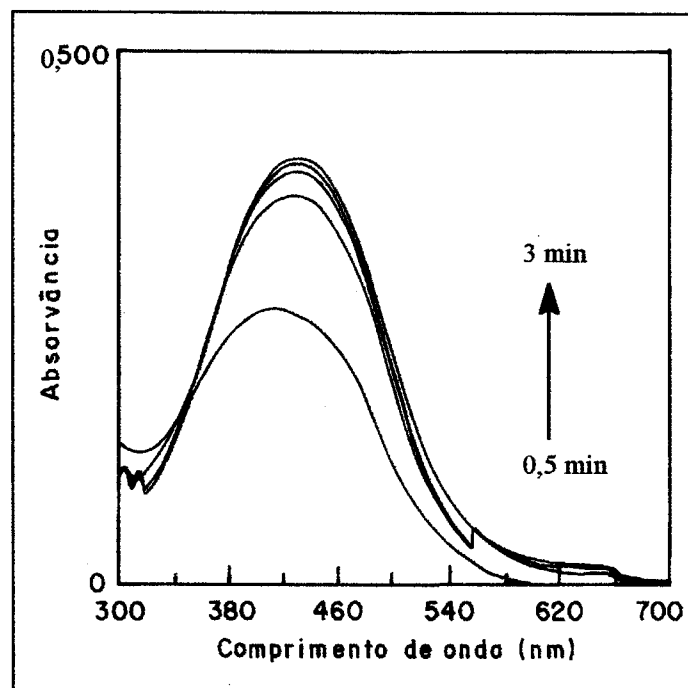


Figura 13- Cinética da formação do complexo na relação entre 2 mol de desferrioxamina B e 1 mol de Fe(III) no tampão citrato-fosfato 20 mmol.L⁻¹, pH 3,0. Os espectros foram obtidos na faixa de tempo de 0,5 a 3 minutos, a 460nm.

Nesses experimentos foram testado dois tipos de tampão e o complexo DB/Fe(III) apresentou maior atividade de fenoloxidase na presença do tampão citrato-fosfato em uma concentração de 20 mmol.L^{-1} . Entretanto no tampão acetato apresentou uma faixa de melhor atividade em uma concentração de 20 a 70 mmol.L^{-1} (Figura 14).

A concentração de $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de o-dianisidina usada nas condições experimentais apresentou-se saturada, isto é, a quantidade de substrato apresentou-se em excesso. Portanto, a concentração do substrato não é um fator limitante na faixa de concentração de $0,1$ a $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ para a oxidação da o-dianisidina (Figura 15).

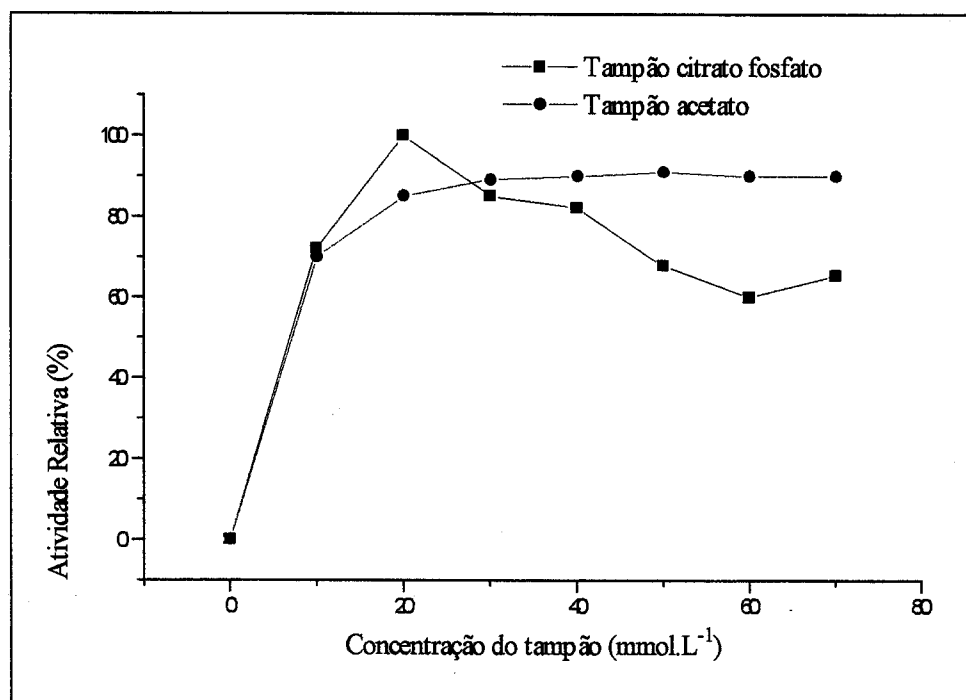


Figura 14- Efeito da concentração do tampão na região de formação do complexo desferrioxamina B e do Fe(III) e na atividade de oxidação da o-dianisidina, em pH 3,0.

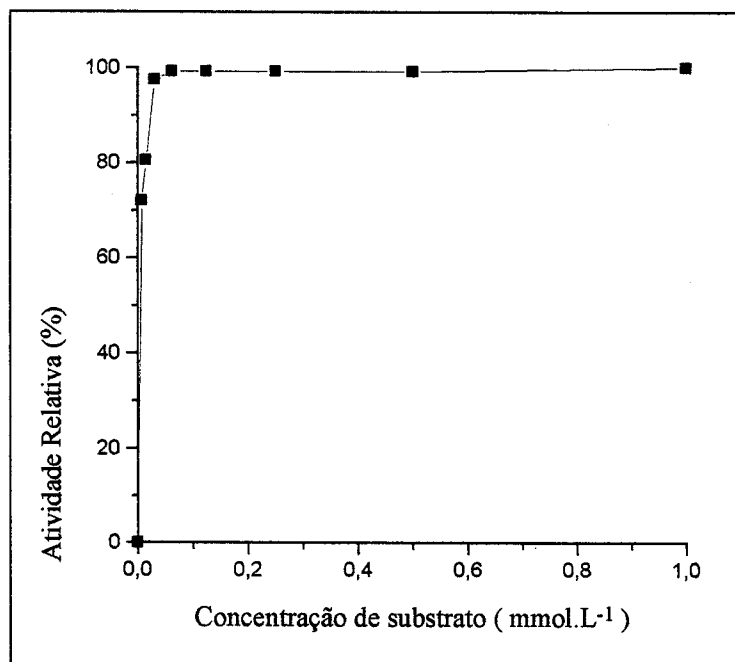


Figura 15-Cinética da saturação da solução de substrato da reação de oxidação de o-dianisidina do complexo DB/Ferro(III) no tampão citrato-fosfato 20 mmol.L⁻¹, pH 3,0.

Estudos mostraram que o DB reduz Fe(III) a Fe(II), pela reação com a ferrozina ou o-fenantrolina. Lawrence (1970) e Lundborg (1988) determinaram a formação do íon ferroso com a ferrozina e o-fenantrolina, respectivamente. Utilizando-se esta mesma técnica, foi observado que houve aumento dos íons ferrosos após a formação do complexo DB e Fe(III), confirmando a conversão de Fe(III) para Fe(II) pelo complexo DB/Fe(III) na região de banda de absorção 562 nm para a ferrozina e em 510 nm para a o-fenantrolina (Figura 16A). O mesmo resultado, usando a ferrozina, foi observado para somente uma molécula de ácido acetilhidroxâmico (AHA) com o Fe(III) como mostra a figura 16B. Os mesmos resultados foram observados para a desferrioxamina B por Solinas e colaboradores (1996) e para sideróforos de *Tyromyces palustris* (Hirano, 1995) e de *Gloeophyllum trabeum* (Goodell *et al*, 1997). Os quelantes de ferro têm uma alta afinidade por Fe(III) e possuem uma afinidade baixa por Fe(II) (Raymond *et al*, 1984, Goodell *et al*, 1997) e, segundo Goodell *et al*, (1997) em pH abaixo da

neutralidade os quelantes do *G. trabeum* possuem a capacidade de ligar-se e reduzir o ferro e, logo após, lançar esse metal para ligar-se com um indicador de Fe(II), que é a ferrozina.

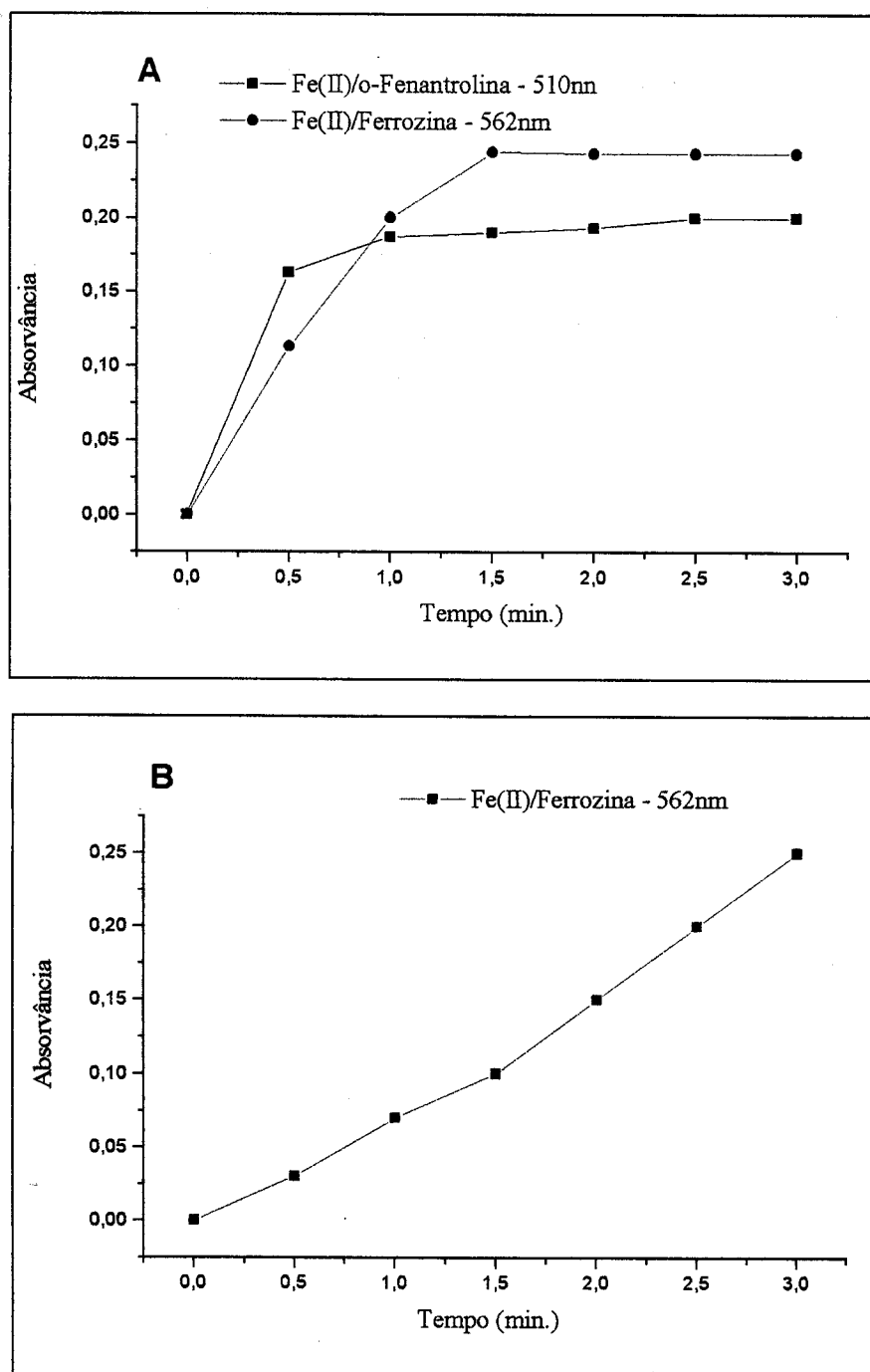


Figura 16- Cinética de formação do complexo Fe(II)/ferrozina e do Fe(II)/o-fenantrolina, após a complexação do DB com o Fe(III) (A). Cinética de formação do complexo Fe(II)/ferrozina a partir do complexo AHA/Fe(III) (B).

Foram examinadas as propriedades paramagnéticas de ferro na presença do quelante desferrioxamina B, em tampão citrato-fosfato 20 mmol.L^{-1} e em pH 3,0 (Figuras 17A e 17B). A figura 17A mostra o sinal de EPR quando em presença de tampão citrato-fosfato e Fe(III). Esse sinal é característico de Fe(III), já na figura 17B esse sinal desaparece, indicando a conversão do Fe(III) para Fe(II). Portanto, quando existe somente Fe(II) na solução, o que se observa é uma reta sem nenhum sinal, como foi mostrado por Klebanoff e colaboradores (1989). Os 6 picos apresentados tanto na figura 17A quanto na figura 17B são uma contaminação por mangânes do reagente cloreto férrico usado nos experimentos, como mostra o espectro de fluorêscencia de raio-X (Figura 18).

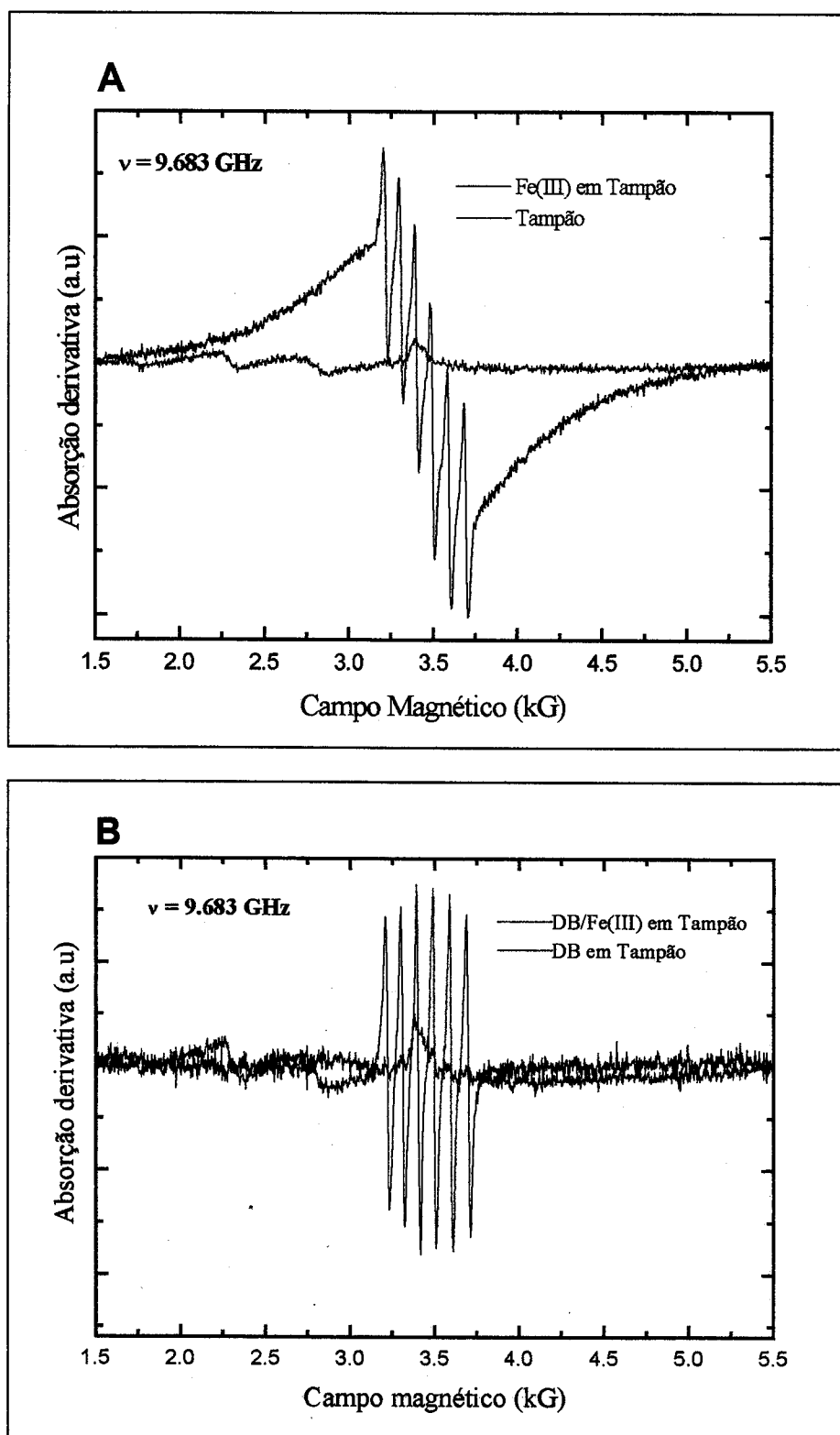


Figura 17- Espectros da técnica de EPR. Relação de 2 mol de desferrioxamina para 1 mol de Fe(III) em tampão citrato-fosfato 20 mmol.L⁻¹, pH 3,0.

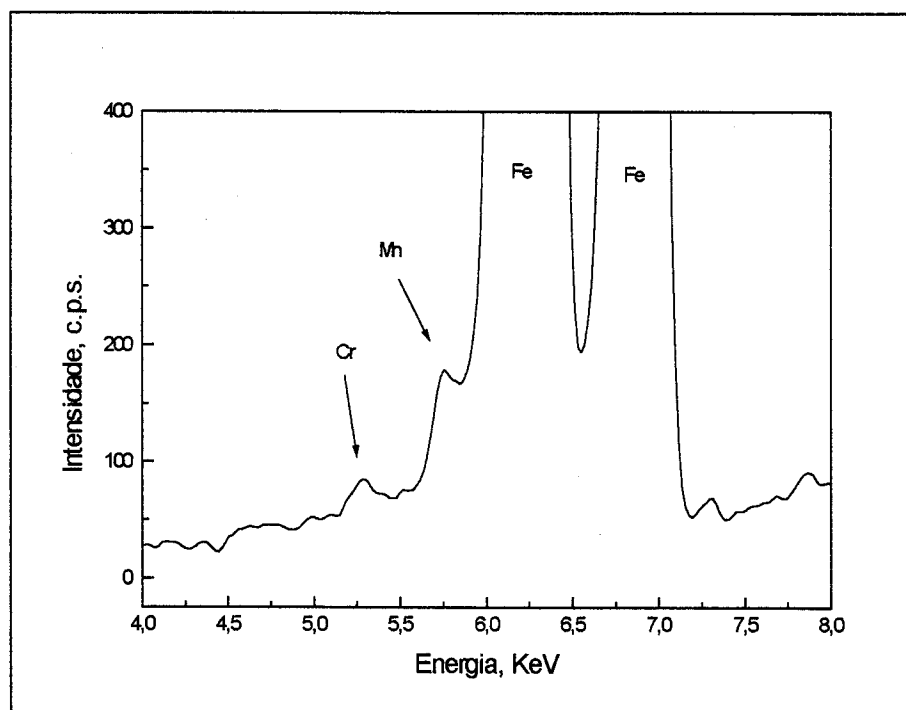


Figura 18- Espectro de fluorescência de raio X do reagente cloreto férrico usado nos experimentos.

Uma maneira de testar se o sistema DB/Fe(III) estava atuando da mesma forma que a lacase é apresentado na tabela 1, que mostra a oxidação da o-dianisidina e da seringaldazina pelos respectivos sistemas, visto que o complexo DB/Fe(II), o Fe(III) e o Fe(II) não apresentaram oxidação da o-dianisidina no período de 3 minutos em pH 3,0. Esse resultado corrobora a menor afinidade de siderofóros (hidroxamato) por Fe(II) e a importância da formação e conversão do complexo férrico para o complexo ferroso nesse pH (Raymond *et al*, 1984).

Estudos têm mostrado que, de maneira geral, é energeticamente desfavorável para o ferro ser liberado, devido a intensa estabilidade do complexo com o sideróforo (Raymond *et al*, 1984; Caudle *et al*, 1994). Entretanto, a elucidação do mecanismo de liberação do ferro do siderofóro é um problema significativo relatado para a química biológica de siderofóros e para ligantes com Fe(III) em geral (Caudle *et al*, 1994). Klebanoff e colaboradores (1989) apresentaram resultados similares, relacionados com a reação de oxidação da

o-dianisidina, e sugeriram a aceleração da oxidação do Fe(II) por DB e a dependência do pH para gerar radicais hidroxila (Klebanoff *et al*, 1989).

A figura 19 mostra que, para o sistema DB/Fe(III) na presença de ftalhidrazida ocorre quimioluminescência, indicando a presença de radicais OH[•]. Esse método é muito seletivo porque a reação de hidroxilação é específica para radicais hidroxila. Ele baseia-se na reação da ftalhidrazida não quimioluminescente com radicais hidroxila formando o ácido hidroxiftálico hidrazida (não é possível determinar a posição exata da hidroxila no anel aromático) pela oxidação deste composto, o qual emite quimioluminescência (Figura 20) (Reitberger e Gierer, 1988; Wu, 1995; Walker *et al*, 1999). A figura 20 mostra a sugestão de um mecanismo hipotético desta reação de hidroxilação da ftalhidrazida formando este composto ácido.

Tabela 1- Oxidação de substratos pela Lacase e pelo complexo DB/Fe(III).

Substrato	Lacase (a) pH 4,5 ⁽¹⁾	DB/Fe(III) pH 3,0 ⁽²⁾	DB/Fe(II) pH 3,0 ⁽²⁾	DB/Fe(II) pH 7,0 ⁽²⁾	Fe(III) pH 3,0 ⁽²⁾	Fe(II) pH 3,0 ⁽²⁾
o-Dianisidina (1mmol.L ⁻¹ x 460 nm) (b)	1,02U/L	3,40U/L	0	3,30U/L	0	0
Seringaldazina (0,5mmol.L ⁻¹ x 525 nm) (c)	0,653U/L	1,54U/L	ND(d)	ND(d)	ND(d)	ND(d)

(a)- Solução estoque de lacase (SIGMA): 1mg/0,5mL (1mg sólido = 235U)

Unidades adicionadas segundo o peso de sólido = 1U/mL no ensaio.

(b)- Absortividade molar_{460nm} = 29400 mol⁻¹.L.cm⁻¹ em água deionizada(Szklarz *et al*, 1989).

(c)- O metanol foi o solvente usado. Absortividade molar_{525nm} = 65000 mol⁻¹.L.cm⁻¹ em metanol (Szklarz *et al*, 1989).

(d)- Não determinado

(1)- Reação feita em tampão acetato - 50 mmol.L⁻¹.

(2)- Reação feita em tampão citrato-fosfato - 20 mmol.L⁻¹.

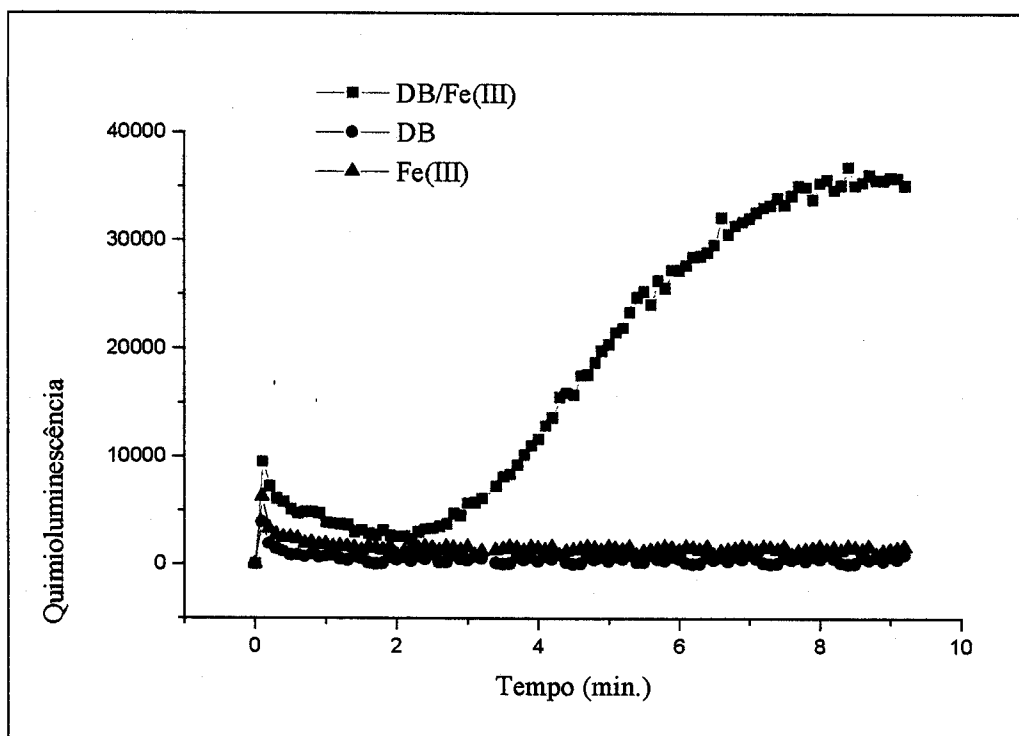


Figura 19- Contagem da quimioluminescência em função do tempo. DB/Fe(III), DB e Fe(III) no tampão citrato-fosfato 20 mmol.L⁻¹, pH 3,0 e, após 1 minuto, adicionou-se Na₂CO₃ a pH 11 e ftalhidrazida.

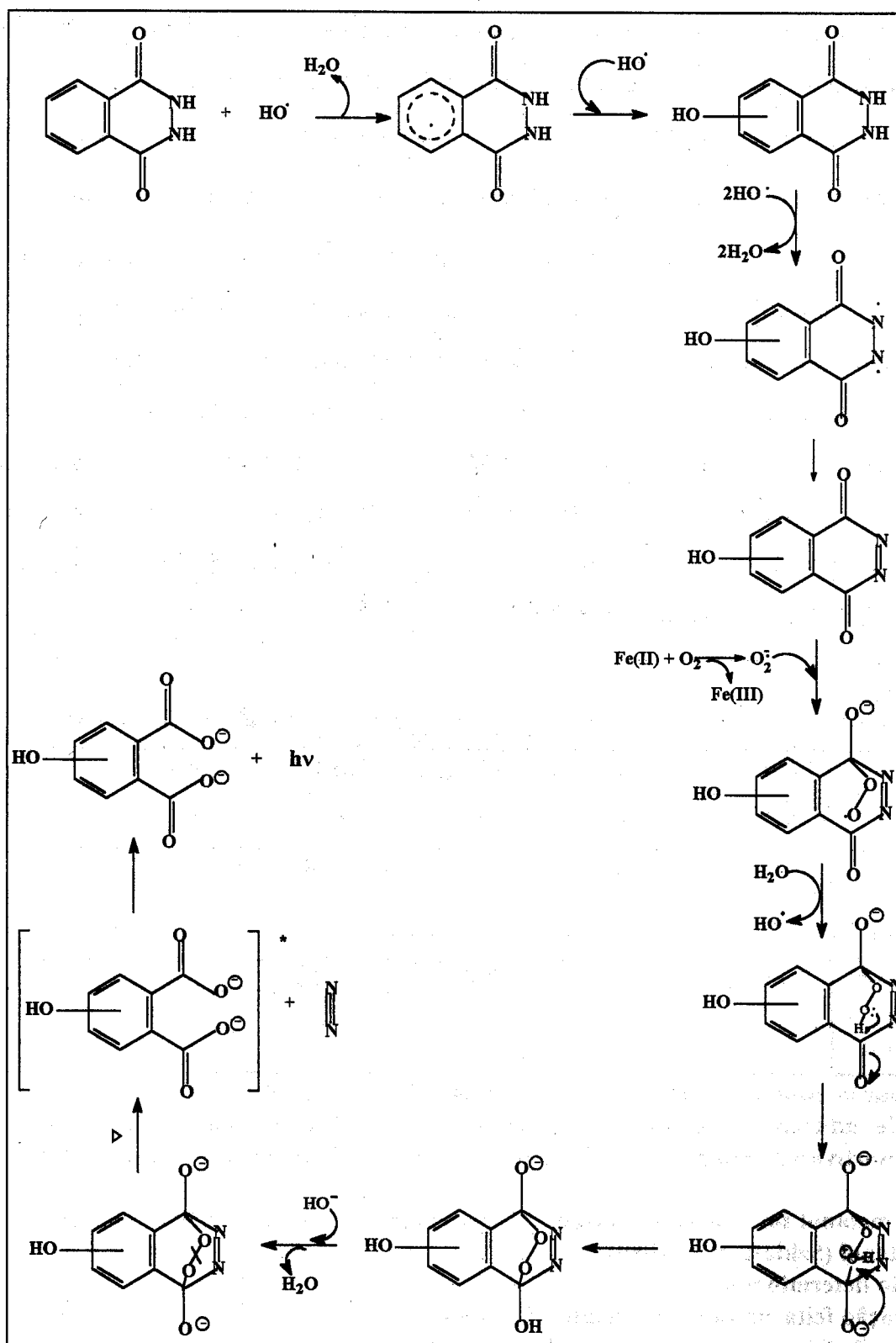


Figura 20- Reação de hidroxilação da ftalhidrazida formando um composto ácido, o qual emite quimiluminescência (mecanismo hipotético).

Estudos prévios, usando a o-dianisidina como substrato, mostraram que a adição de FMN afeta significativamente a atividade de oxidase de DB/Fe(III) (Figura 21). Medidas de potencial redox para complexos de sideróforos com o Fe(III) obtidos por voltametria cíclica mostra que os sideróforos do tipo hidroxamato geralmente têm potenciais de redução que é alcançado por vários redutores biológicos (Raymond *et al*, 1984; Adjimani e Owusu, 1997). Moody e Dailey (1983) observaram uma redução de citrato férrico extraído da bactéria *Rhodopseudomonas sphaeroides*, o qual aconteceu uma reação de redução não enzimática de Fe(III), dependente da concentração de FMN. Assim, procurou-se explorar as propriedades de uma redução não enzimática DB/FMN e observou-se que no pH 3,0 a desferrioxamina B é capaz de reduzir o Fe(III) a Fe(II), gerar o radical hidroxila e a FMN atua favorecendo este sistema. A figura 21 mostra que o FAD não favoreceu ao sistema como a FMN. Resultados similares foram obtidos pelos autores Adjimani e Owusu (1997). Outros resultados foram obtidos posteriormente com um outro substrato, ou seja, o efluente kraft E1 (ver a complementação desta discussão nas figuras 31A e 31B, páginas 73 e 74).

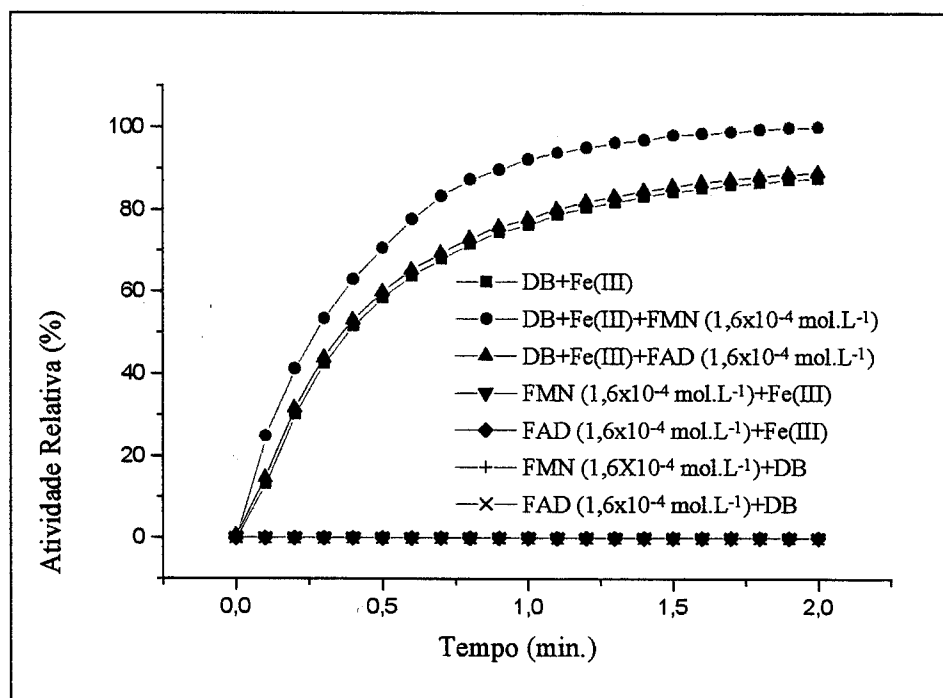


Figura 21- Efeito do FMN e do FAD no sistema DB/Fe(III) usando a o-dianisidina como substrato.

6.1- CONCLUSÕES PARCIAIS

PARTE 1

- ✓ A conversão do Fe(III) para o Fe(II) é promovida pelos modelos de sideróforos do tipo hidroxamato, como a desferrioxamina B e o ácido acetilhidroxâmico, que é um indicativo da ocorrência da reação de Fenton.
- ✓ A capacidade do sistema DB/Fe(III) para gerar radical hidroxila com a redução do Fe(III) foi demonstrada.
- ✓ A baixa afinidade dos modelos de sideróforos do tipo hidroxamato pelo Fe(II) e a conversão do Fe(III) para o Fe(II) pelo complexo parecem ser importantes para a oxidação da o-dianisidina.

PARTE 2

5.2- DEGRADAÇÃO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS.

A figura 22 apresenta a degradação do efluente kraft E1 pelo complexo DB/Fe(III). Os picos do cromatograma correspondentes ao efluente tratado com DB/FeCl₃ e DB foram deslocados em relação ao efluente controle, mas as áreas dos mesmos, após integração, não sofreram diminuição. Indicando uma degradação da clorolignina sem mineralização. Entretanto em relação ao tratado duas vezes com DB/Fe(III) houve um aumento na área. Isso se deve a um novo cromóforo que aparece na região de 280 nm, como determinado por cromatogramas de HPLC no tempo de retenção de 12,1 minutos (Figura 23). A área do efluente tratado com DB/FeCl₃ teve um aumento de 73,7%. Quando o sistema de fenoloxidase de DB com o Fe(III) atua sobre o efluente kraft E1, há um aumento da cor e do teor de fénois totais e, após 72 horas, começa a cair. Isso pode ser devido a degradações iniciais sofridas pela clorolignina. A concentração de Fe(III) do efluente kraft E1 é de $1,16 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, como mostra a tabela 2, sendo suficiente para complexar com o DB e formar cromóforos.

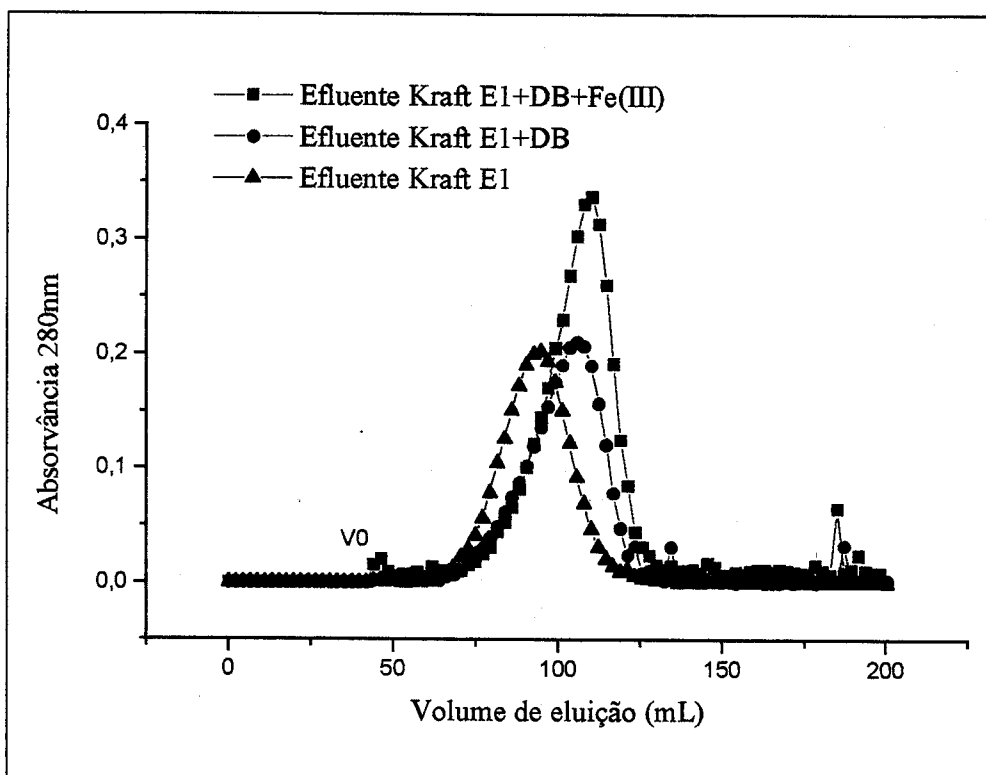


Figura 22- Distribuição de massa molar em sephadex G-50 (1,5 x 60 cm) das cloroligninas em um efluente kraft E1; tratado com DB/FeCl₃ e DB por duas vezes, durante 96 horas em temperatura ambiente. A coluna foi eluída com NaOH-LiCl 0,1 mol.L⁻¹, com um fluxo de 0,66 mL.min⁻¹.

Tabela 2- Concentração de ferro (III) no efluente kraft E1 e no licor negro.

Efluentes	Concentração de Fe (III)
Efluente kraft E1	1,16 x 10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹
Licor negro (Diluição 100X)	0,53 x 10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹

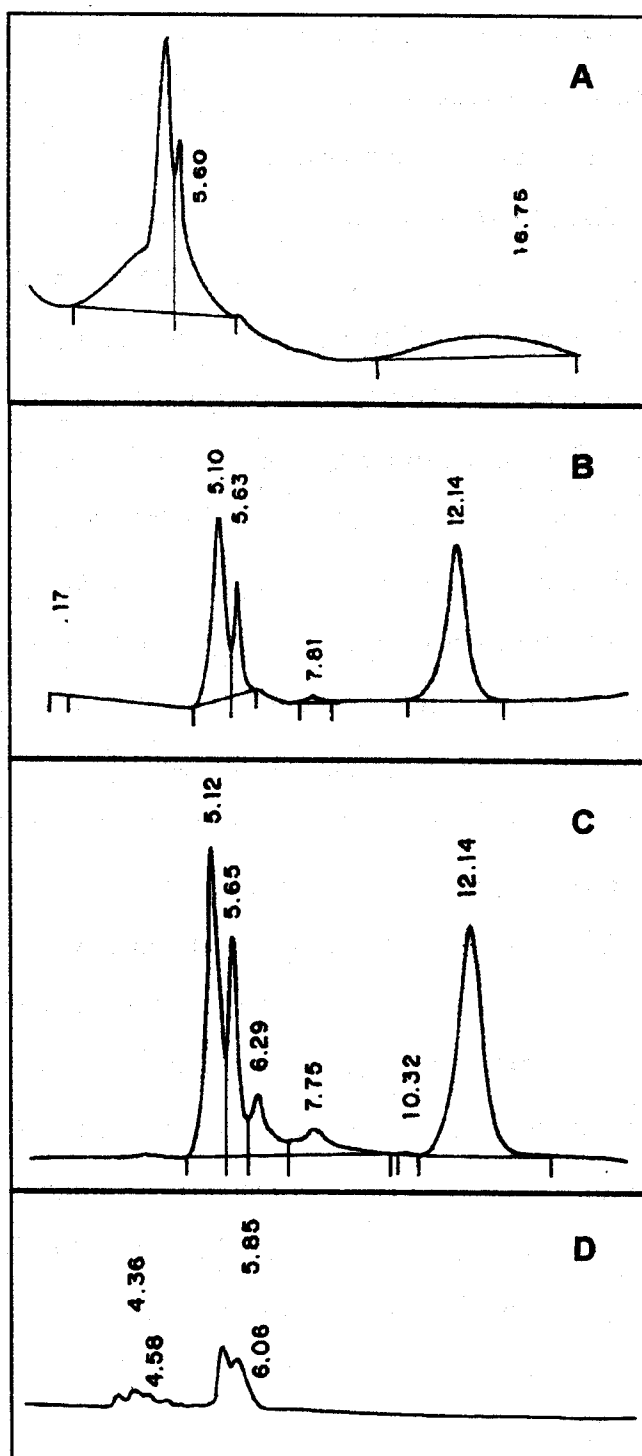


Figura 23- Cromatogramas de HPLC. Fase reversa usando uma coluna C-18 bondapack (30 cm). Os compostos foram eluídos com tampão citrato-fosfato pH 3 - 20 mmol.L⁻¹ a um fluxo de 0,60 mL.min⁻¹ e detectados por absorção no ultravioleta a 280 nm. O primeiro é o efluente kraft E1(A), o segundo o efluente kraft E1 + DB (B), o terceiro o efluente kraft E1 + DB + FeCl₃ (C) e o quarto o DB + FeCl₃ (D).

Foi feito o mesmo estudo com o licor negro e após o tratamento com DB/Fe(III) na presença de oxigênio, este não sofreu mudanças significativas nas concentrações de fenóis totais e nem na cor. Entretanto, a distribuição de massa molar sugeriu mineralização em torno de 10% (Figura 24). A figura 24 mostra o deslocamento dos picos e uma diminuição de suas áreas, sendo que as áreas dos cromatogramas foram integradas, obtendo assim uma redução de 50,2% para o efluente tratado com DB/FeCl₃ e 46,5% para o efluente tratado somente com DB, em relação à área do efluente controle. A diminuição de área do efluente, tratado somente com DB, é devido à concentração de Fe(III) ser de $0,53 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ no licor negro em uma diluição de 100 vezes (Tabela 2). Assim essa concentração de ferro é quantidade suficiente para formar um complexo de coordenação com DB e para provocar a degradação do efluente (Figura 24). Entretanto, após o tratamento com DB/FeCl₃ e DB, ambos apresentaram um precipitado quando foram filtrados em membrana Millipore. Essas membranas foram secadas e pesadas, obtendo um resíduo de 0,0024 gramas e 0,0014 gramas, respectivamente. Esses resíduos foram diluídos com NaOH $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$ e passados na coluna cromatográfica Sephadex, novamente (Figura 25). As áreas foram integradas e somadas às suas áreas correspondentes. Portanto, além de ter ocorrido na lignina uma quebra de ligações β -aril éter, uma abertura do anel aromático e desmetoxilações, houve 15,1 % e 5,4% de degradação até CO₂ e H₂O (mineralização). Atualmente, existem poucos trabalhos mostrando as propriedades oxidativas de compostos do tipo sideróforos atuando em materiais lignocelulósicos e madeira (Durán e Machuca, 1995, Santiago *et al*, 1996, 1997, Goodell *et al*, 1997, 1998, Parra *et al*, 1998abc; Paszcynski *et al*, 1999).

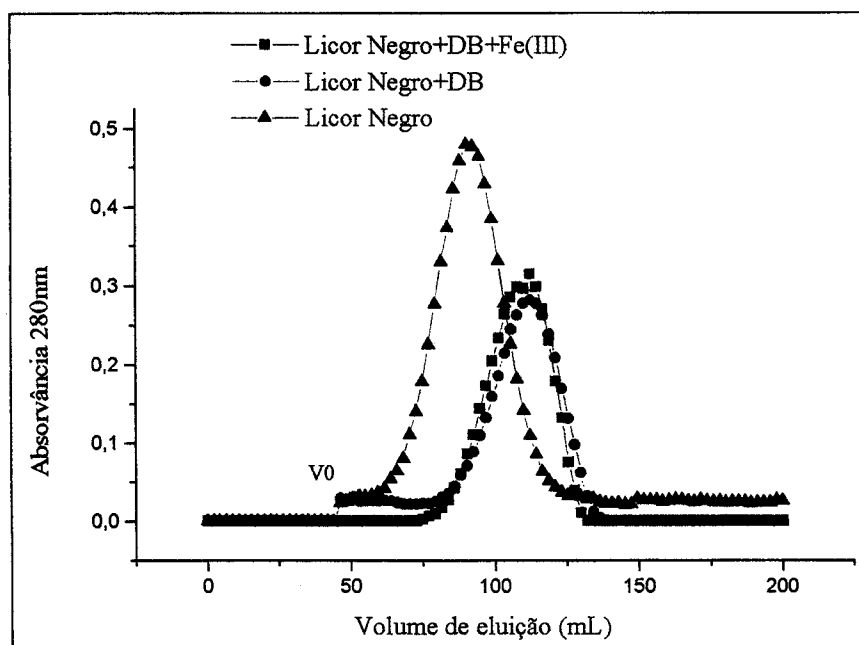


Figura 24- Distribuição de massa molar em sephadex G-50 (1,5 x 60 cm) das ligninas em um efluente do tipo licor negro; tratado durante 96 horas, em temperatura ambiente e com a adição de duas vezes de DB/Fe(III) e DB nos sistemas correspondentes. A coluna foi eluída com NaOH-LiCl 0,1 mol.L⁻¹, com um fluxo de 0,66 mL.min⁻¹.

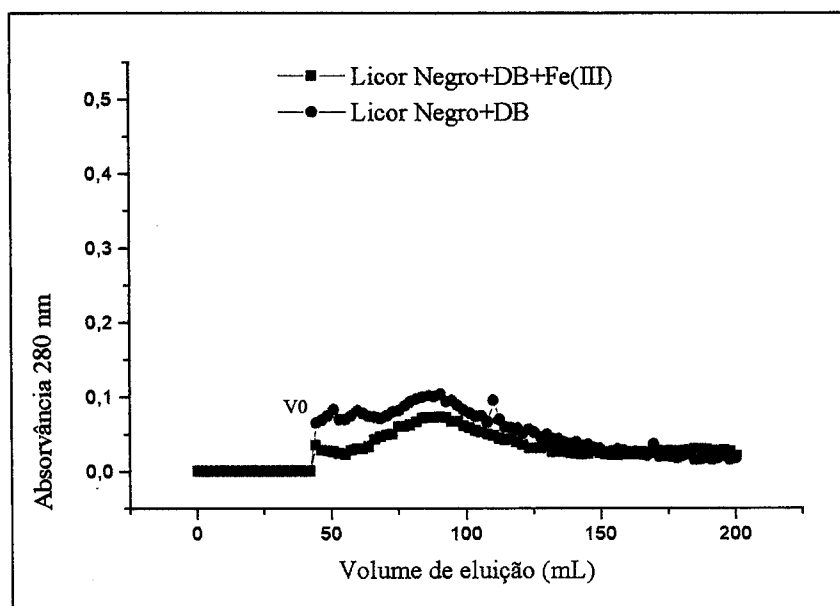


Figura 25- Distribuição de massa molar em sephadex G-50 (1,5 x 60 cm) das ligninas em um efluente do tipo licor negro, tratado durante 96 horas, em temperatura ambiente e com adição de duas vezes DB/FeCl₃ e DB nos sistemas correspondentes. Resíduo retido em membrana de millipore, após filtração, diluído em 0,001 mol.L⁻¹ de NaOH. A coluna foi eluída com um fluxo de 0,66 mL.min⁻¹.

A degradação da clorolignina foi estudada pela emissão de fluorescência usando uma determinada concentração dos modelos (DB e AHA) com Fe(III). Os resultados estão mostrados nas figuras 26A e 26B, sendo que os resultados apresentados na figura 26A mostram que todos os sistemas não obtiveram um erro relativo maior que 8% (em triplicatas). Nos resultados da figura 26B, o erro relativo foi menor que 5%, considerando triplicatas de cada amostra. As cloroligninas encontradas no efluente kraft E1, mostraram ter um decréscimo de 85% na fluorescência quando submetidas ao tratamento com os ligantes (DB e AHA) e o Fe(III), e um decréscimo de 65% quando tratada somente com Fe(III). Isso também se deve ao fato de que no efluente encontram-se compostos fenólicos capazes de quelar o ferro e produzir a oxidação destes (Figuras 26A e 26B). O mesmo estudo foi realizado, substituindo-se água deionizada por tampão citrato-fosfato, obtendo, assim, a constituição original do sistema. Nenhuma alteração na degradação da clorolignina através do DB foi observada em relação à utilização da água, como mostrado na figura 27. Um experimento semelhante, utilizando tampão citrato-fosfato e AHA, não foi realizado, devido a interferência que este tampão causa no sistema, provavelmente devido a baixa afinidade do complexo AHA/Fe(III) em comparação ao complexo citrato/Fe(III), isto é, o tampão que contém citrato complexa o Fe(III) primeiro que o AHA.

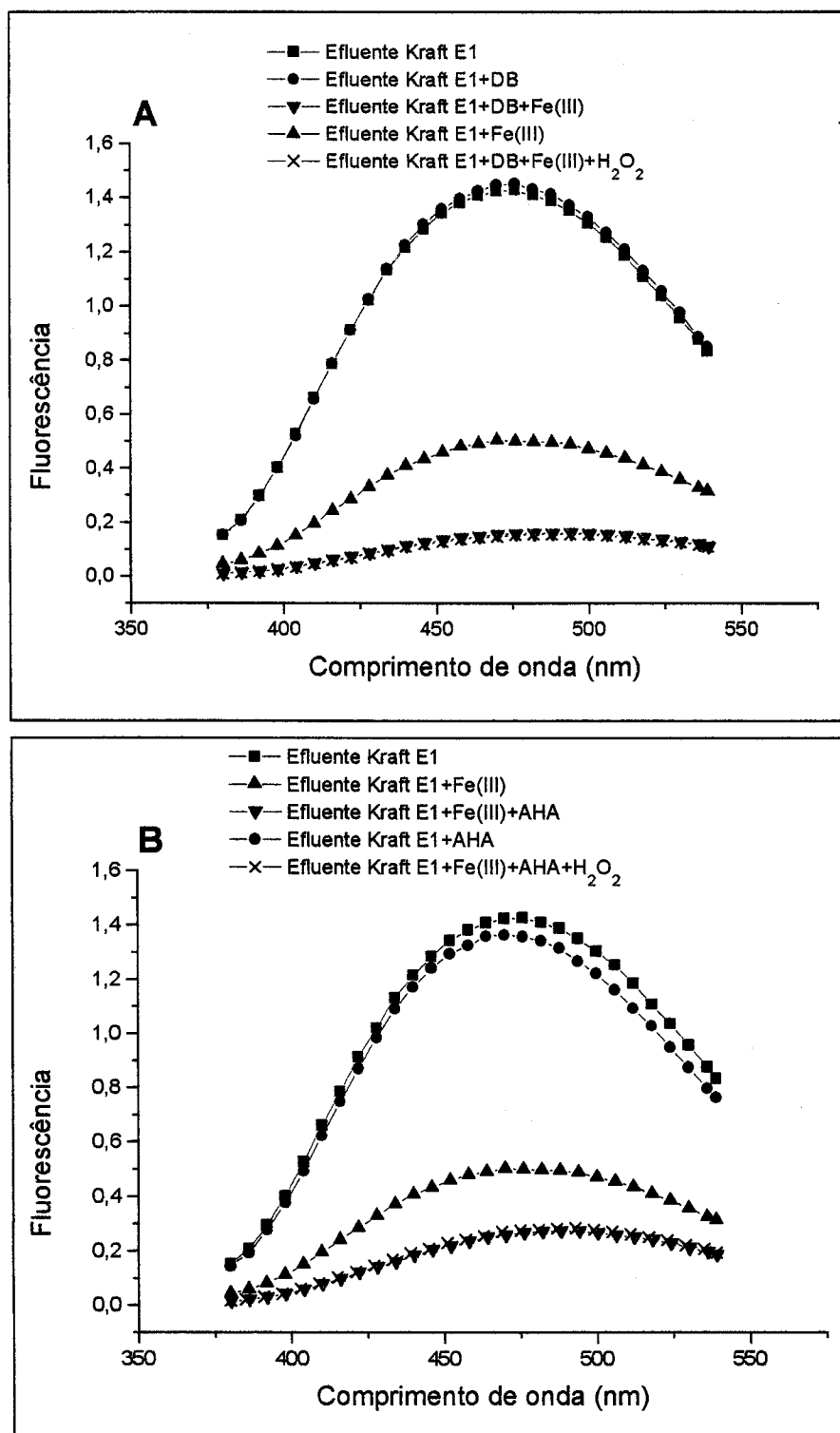


Figura 26- Espectros de emissão de fluorescência do tratamento do efluente kraft E1 com DB[2,0 mmol.L⁻¹]/Fe(III) [0,90 mmol.L⁻¹] em H₂O deionizada, pH= 3,0 (A). Espectro de emissão de fluorescência do tratamento do efluente kraft E1 com AHA[6,8 mmol.L⁻¹]/Fe(III) [0,90 mmol.L⁻¹] em H₂O deionizada, pH= 3,0 (B).

As Figuras 26A e 26B também mostraram que a adição do peróxido não interferiu nos sistemas, sugerindo que já havia sido formado peróxido de hidrogênio suficiente no meio de reação. Segundo Kirk e colaboradores (1991), uma auto-oxidação do Fe(II) é dependente do pH, produzindo peróxido de hidrogênio. Em 1993, Leanderson e Tagesson mostraram que os compostos fenólicos, ao se auto-oxidarem, promovem a produção de peróxido de hidrogênio. Foram usados métodos para dosar a concentração de peróxido nesses sistemas, mas nenhum deles mostraram-se conclusivos, sendo os métodos usados o da iodometria e o da escopoletina. A iodometria é um método volumétrico que envolve oxidação de íons iodeto (Baccan *et al*, 1985) e o método da escopoletina consiste em uma oxidação da escopoletina (7-hidroxi-6-metoxicoumarina) pela peroxidase. Existindo peróxido de hidrogênio na solução, ocorre uma perda na emissão de fluorescência a 460 nm quando a excitação a comprimento de onda de 350 nm (Root *et al*, 1975). Nesse caso, tanto o íon iodeto como a escopoletina reagem parcialmente com o ferro, mascarando a quantidade real de peróxido de hidrogênio (dados não mostrados).

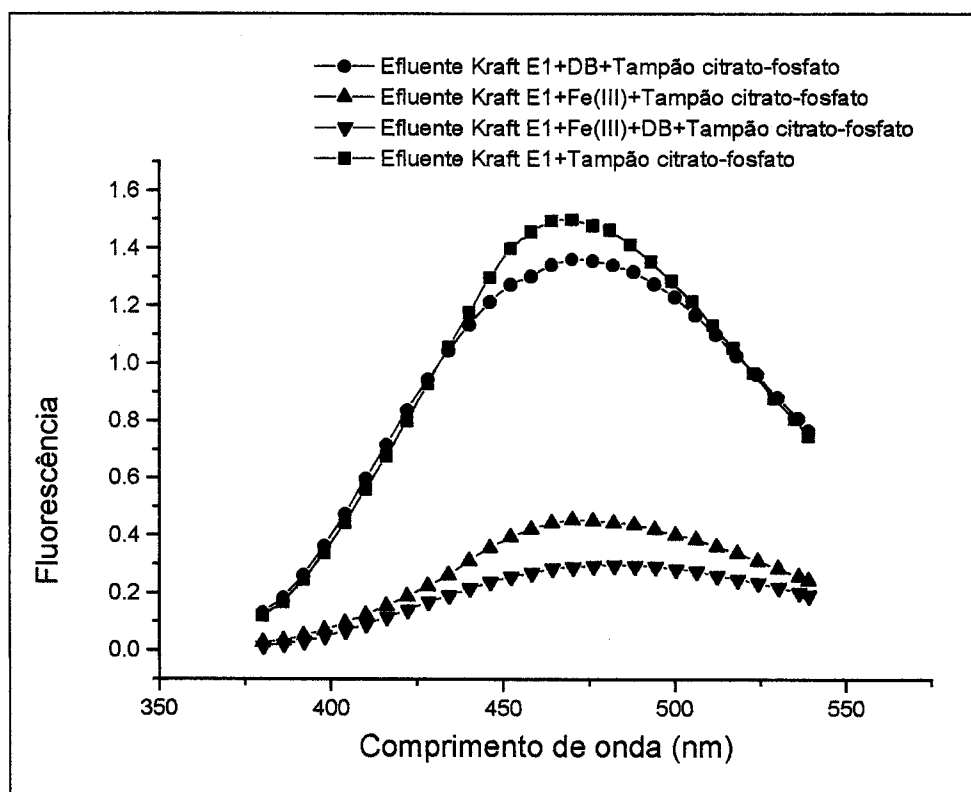


Figura 27- Espectros de emissão de fluorescência do sistema de efluente kraft E1 tratado com DB[2,0 mmol.L⁻¹]/Fe(III) [0,90 mmol.L⁻¹] em tampão citrato-fosfato 20 mmol.L⁻¹ e pH 3,0.

Outro experimento foi feito usando uma lignina dioxano como substrato. Este mostrou resultados similares, ou seja, houve um decréscimo de 90% da lignina, após o tratamento com o AHA/Fe(III) e DB/Fe(III), e um decréscimo de 60% da lignina, após 24h com o tratamento somente com o Fe(III) (Figura 28A e 28B). Estudos com outros modelos (ácido 2,3- diidroxibenzóico e ácido acético 3,4-diidroxibenzóico) também foram feitos sob as mesmas condições em nosso laboratório e apresentaram resultados semelhantes (Durán *et al*, 1998).

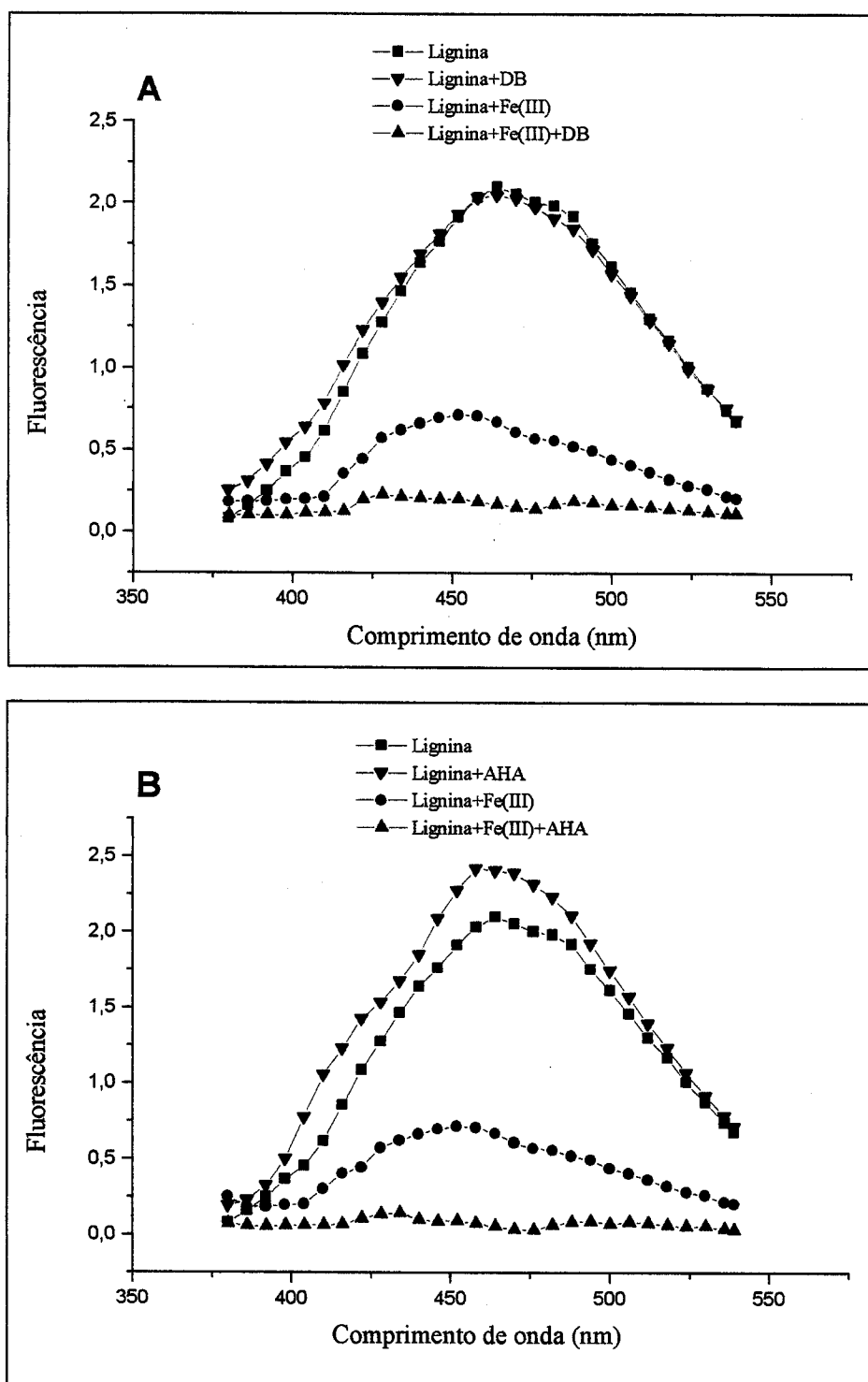


Figura 28- Espectros de emissão de fluorescência do sistema de lignina tratada com DB[0,30 mmol L⁻¹]/Fe(III) [0,13mmol L⁻¹] em H₂O deionizada pH= 3,0 (A). Espectro de emissão de fluorescência do sistema de lignina tratada com AHA[0,80 mmol L⁻¹]/Fe(III) [0,13 mmol L⁻¹] em H₂O deionizada, pH= 3,0 (B).

A cinética de degradação da clorolignina (efluente kraft E1) pelo tratamento com os ligantes e o Fe(III) mostrou ser mais eficiente que com o tratamento somente com o Fe(III). O tratamento com DB/Fe(III) é muito mais rápido do que o tratamento com AHA/Fe(III). Isso é devido a constante de afinidade do DB pelo Fe(III) ser muito maior que a constante de AHA (Figuras 29 e 30).

Os resultados mostram que, além da complexação desses ligantes com o ferro, ocorre a degradação oxidativa da clorolignina, como mostra a técnica de fluorescência (Figuras 26, 27, 28, 29 e 30). Isso confirmou-se em um experimento com FMN (Flavina mononucleotídica) que aumentou significativamente a reação de degradação da clorolignina, isto é, o FMN favoreceu a transferência de elétrons nos sistemas (Figuras 31A e 31B).

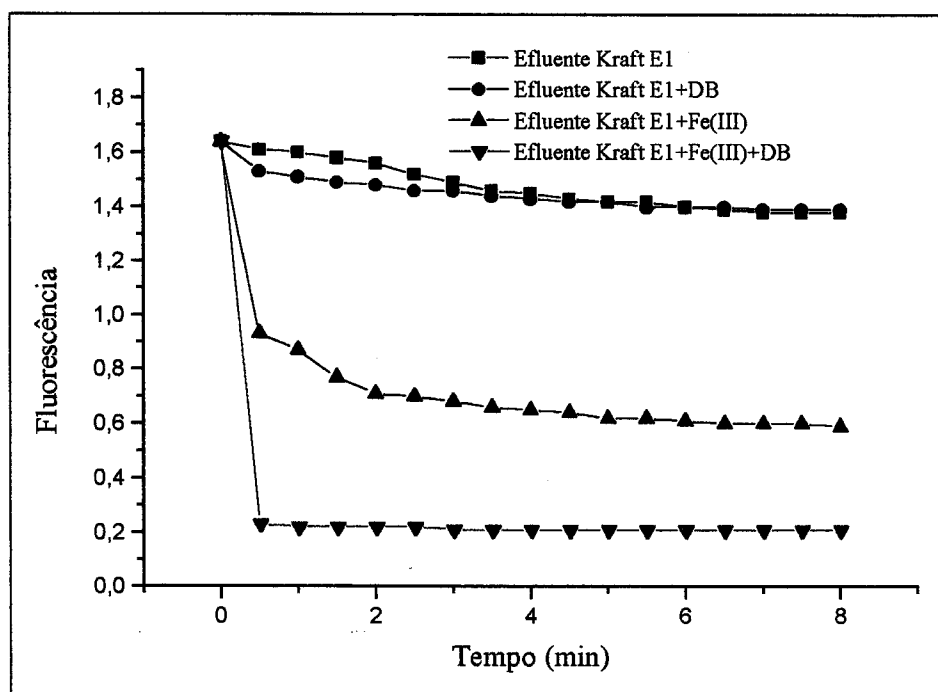


Figura 29- Cinética da degradação da clorolignina (efluente) pelo complexo DB[0,58 mmol L⁻¹]/Fe(III)[0,33 mmol L⁻¹] medida pela perda de emissão a 474 nm de fluorescência quando a excitação foi feita a 360 nm.

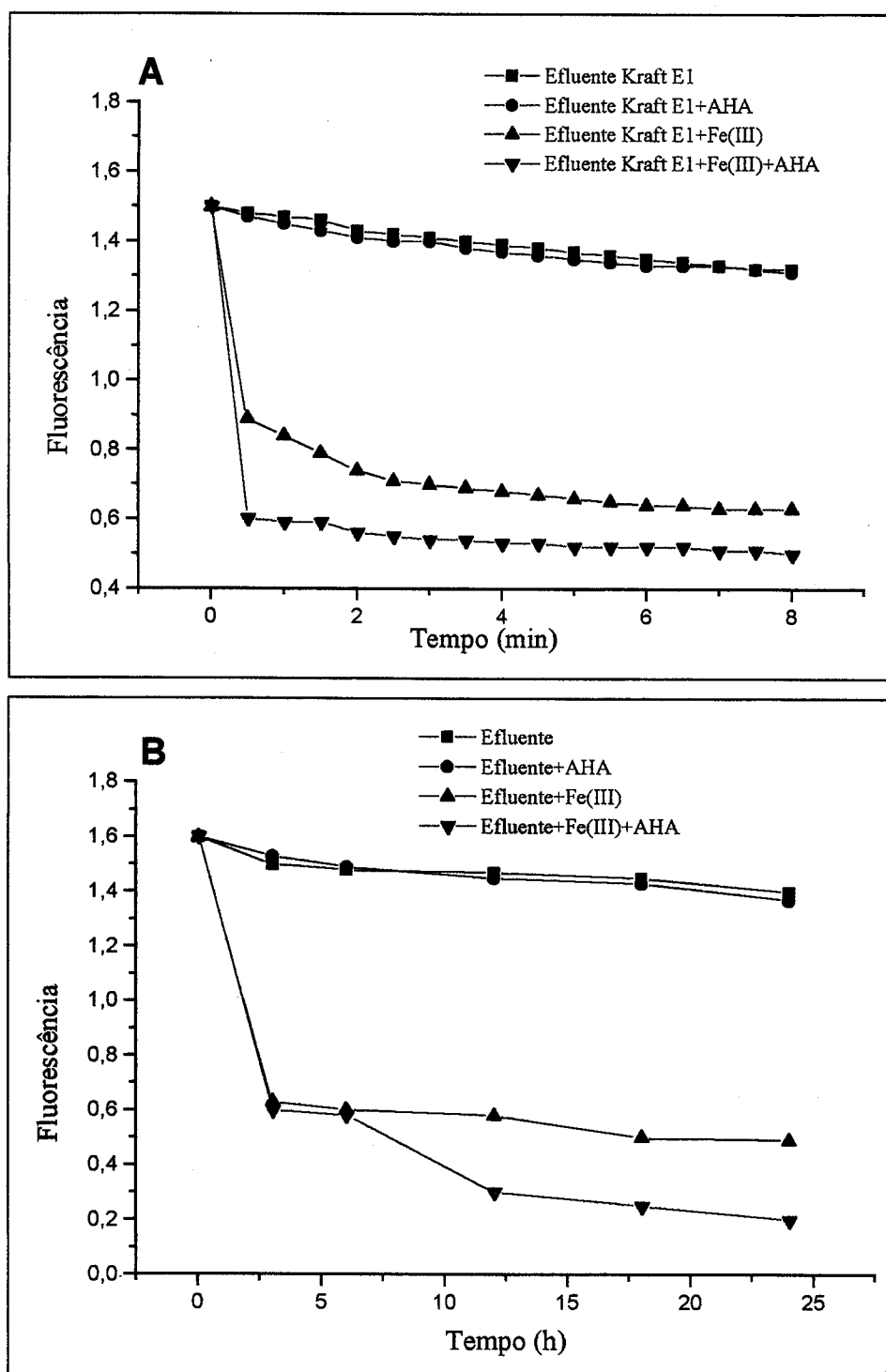


Figura 30- Cinética da degradação da clorolignina(Efluente) pelo complexo AHA[2,1mmol L⁻¹]/Fe(III)[0,33mmol L⁻¹] no intervalo de 0 a 8 minutos (A) e no intervalo de 0 a 24 horas (B) medida pela perda de emissão a 474 nm de fluorescência quando a excitação foi feita a 360 nm.

Adjimani e Owusu (1997) mostraram uma redução não enzimática de sideróforos/Fe(III), nos quais incluem a DB/Fe(III), dependente de NADH/FMN, sendo que esses autores reconhecem que esse mecanismo não é bem compreendido. Eles sugerem a transferência de elétrons em sequência do NADH para a FMN e para o receptor de elétrons, que é o siderofóro/Fe(III). Os resultados das figuras 21, 31A e 31B mostram que a transferência de elétrons é dependente somente da FMN, sendo que o complexo siderofóro/Fe(III) não é somente um receptor de elétrons, mas também um fornecedor de elétrons para os sistemas (pH 3,0). As figuras 31A e 31B também mostram que no efluente kraft E1 existem compostos fenólicos, que complexados com o ferro adicionado ou com o ferro que já existe no efluente, são capazes de funcionar como fornecedores de elétrons para o sistema no pH 3,0, mas não tão eficientemente como a DB/Fe(III). O complexo AHA/Fe(III) não apresentou tanta eficiência quanto o DB/Fe(III) no sistema, mas provavelmente é devido a competição entre os compostos fenólicos que prejudicam a transferência de elétrons por esse complexo (Figura 31B).

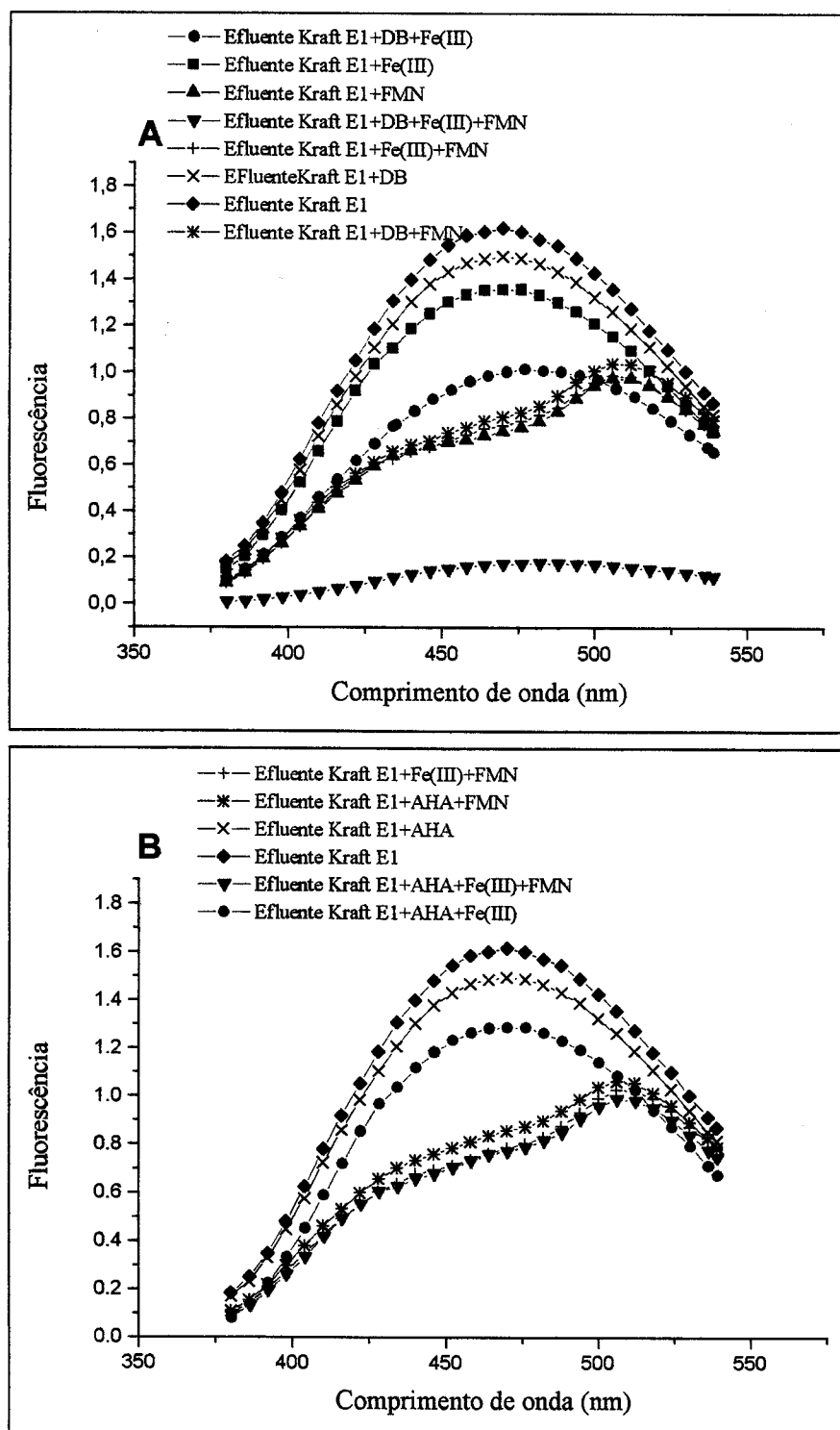


Figura 31- Espectros de fluorescência do efeito da FMN [3×10^{-5} mol.L⁻¹] com o complexo DB[0,03 mmol.L⁻¹] /Fe(III)[0,03 mmol.L⁻¹] sobre o efluente kraft E1 (A). Espectros de fluorescência do efeito da FMN [3×10^{-5} mmol.L⁻¹] com o complexo AHA[0,19 mmol.L⁻¹] /Fe(III) [0,03 mmol.L⁻¹] sobre o efluente kraft E1 (B).

6.2- CONCLUSÕES PARCIAIS

PARTE 2

- ✓ A atividade de fenoloxidase dos complexos AHA/Fe(III) e DB/Fe(III) tem um efeito sobre a lignina e clorolignina dos efluentes. Assim, é possível concluir que esses compostos podem atuar nas ligninas e nos seus derivados, encontrados nos efluentes, com a vantagem desses complexos atuarem simultaneamente como quelantes e também como sistema mimético de fenoloxidase.
- ✓ A desferrioxamina B, que é um tipo de sideróforo, quando complexada com ferro (III), apresentou atividade de fenoloxidase. Portanto, esse complexo degrada cloroligninas e ligninas a compostos menores, podendo chegar até CO_2 e H_2O (mineralização). Consequentemente, pode ocorrer a descontaminação do efluente kraft E1 e do licor negro.

PARTE 3

5.3- SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS NA PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS

Uma seleção de microrganismos produtores de sideróforos foi feita baseando na literatura. Os fungos de decomposição branca, *Trametes versicolor*, *Trametes villosa* e *Lentinus edodes* foram escolhidos devido a sua conhecida utilização em tratamento de efluentes industriais citados recentemente por alguns autores (Esposito *et al*, 1991,1992, Rodríguez *et al*, 1992, Durán *et al*, 1994, Mehna *et al*, 1995, Manzanares *et al*, 1995, Soares e Durán, 1998). Os quelantes derivados do fenolato do fungo de decomposição marron *Gloeophyllum trabeum*, foram isolados por Goodell e colaboradores (1997) e mostraram uma elevada afinidade pelo Fe(III), e uma importante redução mediada por esse metal em processo cíclico redox em valores abaixo da neutralidade. A bactéria *Azotobacter vinellandi* produz o sideróforo do tipo catecolato, 2,3-diidroxibenzoico (2,3-DHBA, Page e Huyer, 1984), azotoquelino (N, N' bis (2,3-diidroxibenzoil-L-lisina, Corbin *et al*, 1969), aminoquelino (2,3-diidroxibenzoil-putrescina, Page e Von Tigeststrom, 1988) e protoquelino, que é um tricatecolato isolado recentemente por Cornish e Page (1995). Os sideróforos de cor amarelo-verde são produzidos pelas *Pseudomonas fluorescence* e são chamados de pioverdinos (Hamdan *et al*, 1991). Portanto, os microrganismos selecionados foram os seguintes: *T. versicolor*, *T. villosa*, *L. edodes*, *G. trabeum*, *A. vinellandi* e *P. fluorescence*. A seleção foi feita usando três meios seletivos, ou seja, indicou-se a formação de um halo alaranjado nos dois primeiros meios de cultura com CAS e no terceiro uma coloração alaranjada somente na parte em que foi acrescentado CAS, que é de cor azul, sendo que esses microrganismos apresentaram uma produção significativa de sideróforos no período de 10 dias. Esses resultados estão

descritos nas tabelas 1 e 2, nos quais o número de cruzeiros equivale a uma estimativa da área formada pela cor alaranjada, isto é, seis cruzeiros representam 39 mm² de área e uma cruz representa 5 mm². Resultados similares com *Lentinus edodes*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* (Rodríguez *et al*, 1997a), *Ganoderma applanatum* (Parra *et al*, 1998), *Poria cocos*, *Laetiporeus sulfures*, *Merullius tremellosus*, *Pycnoporus coccineus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Poria medula-panis* e *Trametes versicolor* (Machuca e Milagres, 1998) foram obtidos recentemente. No período de 25 dias, as placas já estavam praticamente tomadas pela cor alaranjada para todos os fungos e bactérias. Os meios de culturas propostos foram somente baseados nos métodos descritos por Schwyn e Neilands (1987), Cox (1994) e Buyer e Sikora (1990). Os últimos autores afirmam que a sacarose, como fonte de carbono, e o casominoácido, como fonte de nitrogênio no meio de cultura, favorecem o crescimento rápido e a produção de sideróforos de uma variedade de bactérias e fungos. O extrato de malte 2% foi acrescentado devido a significativa produção de sideróforos nesse meio, mostrada por Rodríguez e colaboradores (1997a), Parra e colaboradores (1998abc), Machuca e Milagres (1998).

Tabela 3- Determinação da produção de sideróforos por fungos em três meios de cultura sólidos em placa adicionado CAS no período de 10 dias.

	<i>G. trabeum</i>	<i>L.edodes</i>	<i>T.villosa</i>	<i>T. versicolor</i>
Meio de cultura sólido (1)	++++++	+	++	++++
Meio de cultura sólido (2)	++++++	+++	+++++	+++++
Meio de cultura sólido (3)	ND	++	++++	+

ND- Não determinado.

++++++ = 39 mm²

+++++ = 32 mm²

++++ = 25 mm²

+++ = 19 mm²

++ = 12 mm²

+ = 5 mm²

Foi feito um estudo sobre fontes de carbono para a produção dos sideróforos em meio líquido e a sacarose mostrou ser a mais eficiente para esses microrganismos, porém o fungo *T. villosa* apresentou uma maior produção com a glicose (Figura 35B e Tabela 4).

As figuras 35A e 35B mostram nos a cinética da produção de sideróforos em meio líquido pelos fungos, sendo que a melhor produção foi entre o 14º e a 16º dia tanto no meio com a sacarose como no meio com glicose. Portanto, as culturas eram retiradas no 15º dia. Entretanto, as bactérias alcançaram a maior produção em torno do 6º dia no meio com glicose e no meio com sacarose. Somente *A. vinellandi* e *P. fluorescence* mantiveram-se com alta produção nesse dia, portanto, as culturas eram retiradas nesse dia para serem usadas nos tratamentos dos efluentes industriais (Figuras 36A e 36B).

G. trabeum foi um dos fungos que apresentou maior produção de sideróforo pelo meio de cultura sólido e líquido (Tabelas 3 e 5). *T. versicolor* também foi um bom produtor de sideróforo nos meios usados e *T. villosa* apresentou mais eficiência na produção no meio de cultura sólido 3 (Tabela 3), sugerindo algumas modificações no meio de produção para esse fungo. *L. edodes* não se mostrou muito eficiente na produção de sideróforos pelo meio sólido (Tabela 3), enquanto que no meio líquido ele mostrou ter uma boa produção (Tabela 5). As bactérias mostraram ser muito boas produtoras de sideróforos, tanto no meio sólido quanto no meio líquido (Tabelas 4 e 5).

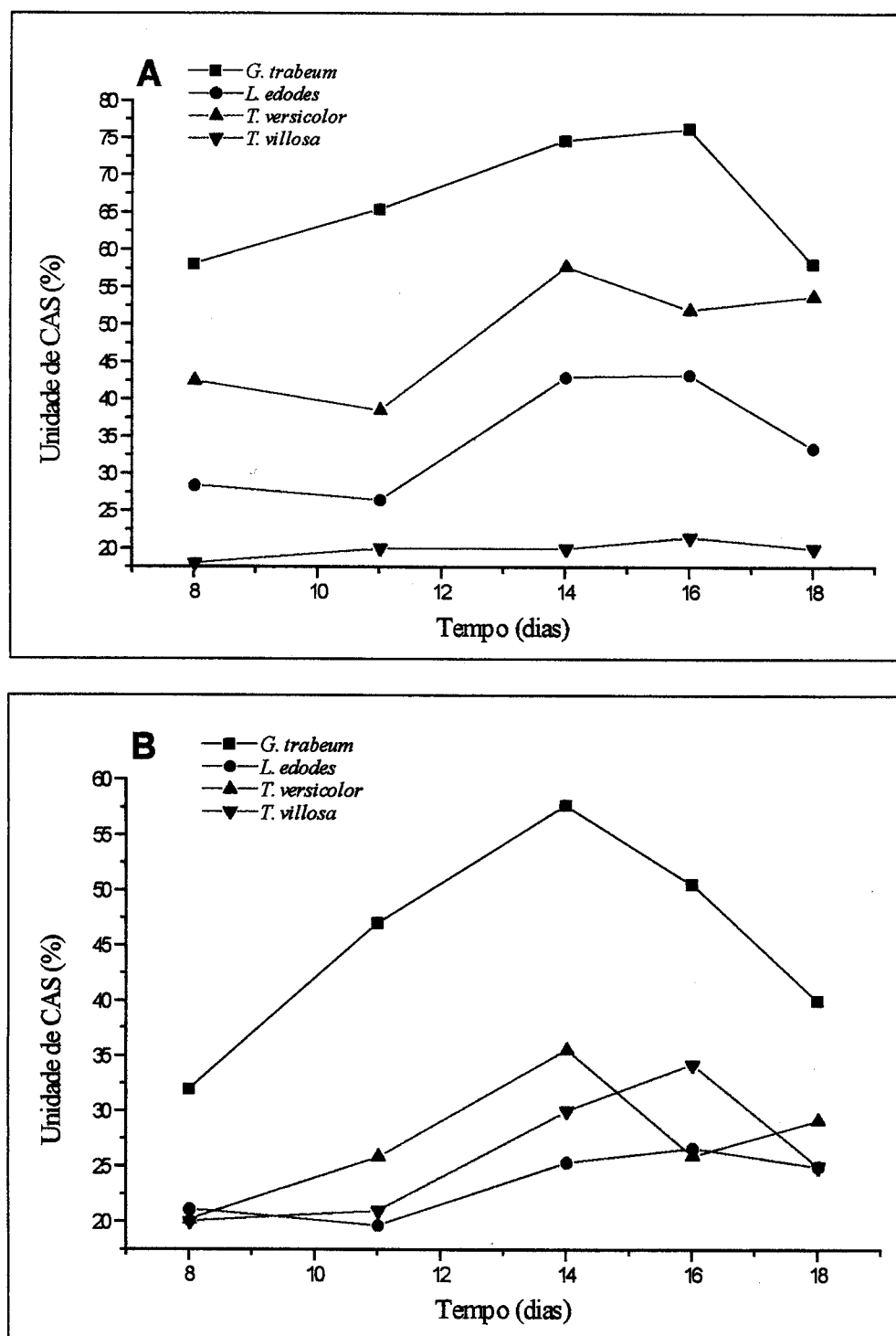


Figura 35- Cinética de produção dos sideróforos pelos fungos usando a sacarose como fonte de carbono (A). Cinética de produção dos sideróforos pelos fungos usando a glicose como fonte de carbono (B).

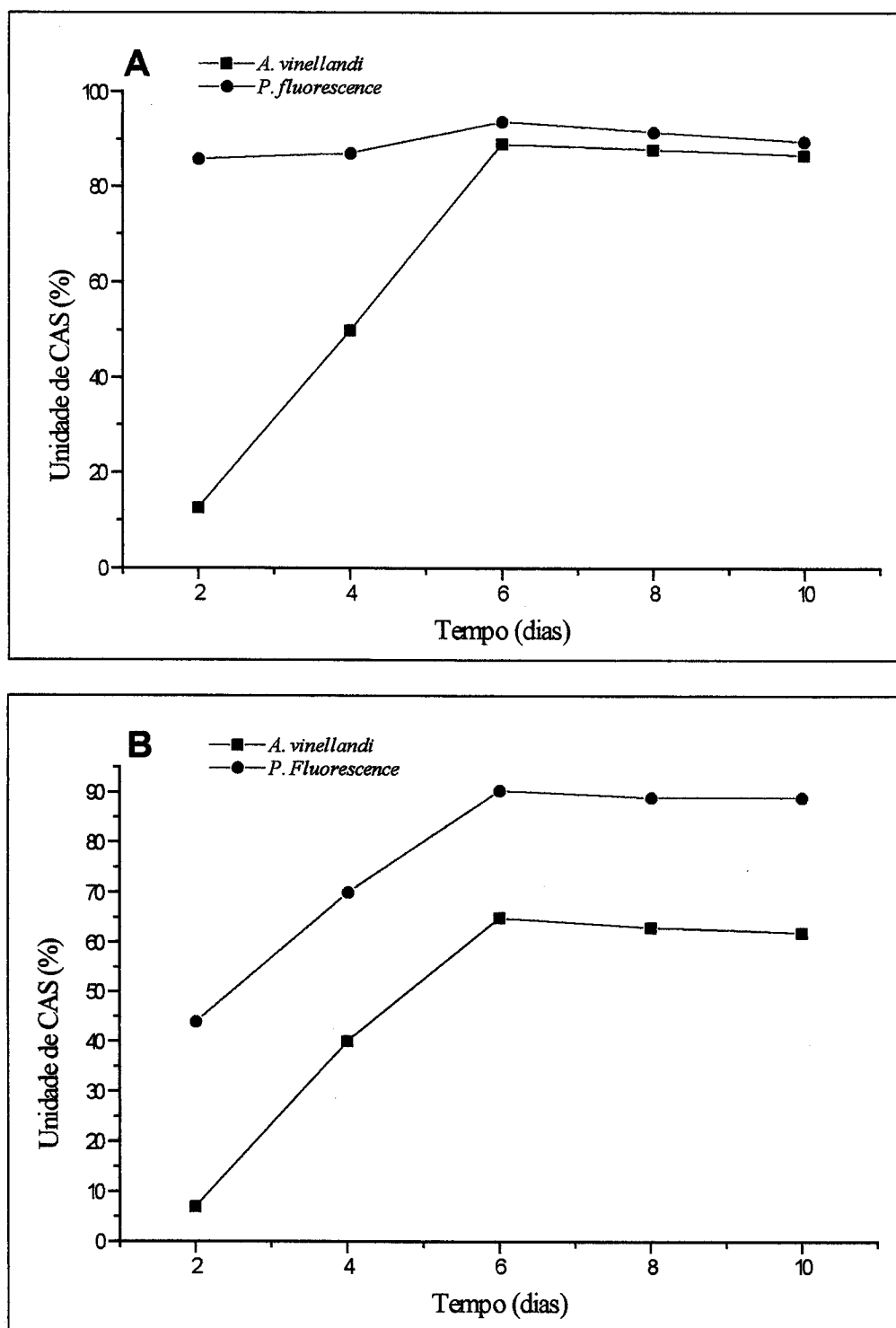


Figura 36- Cinética de produção dos sideróforos pelas bactérias usando a sacarose como fonte de carbono (A). Cinética de produção dos sideróforos pelas bactérias usando a glicose como fonte de carbono (B).

Tabela 5- Determinação da máxima produção de sideróforos por fungos e bactérias com duas fontes de carbono medido pelo método líquido do Chromo Azurol.

Microrganismo	Fonte de carbono	Unidades de CAS (%)
<i>L. edodes</i>	Sacarose	44
	Glicose	27
<i>T. versicolor</i>	Sacarose	55
	Glicose	36
<i>T. villosa</i>	Sacarose	29
	Glicose	34
<i>G. trabeum</i>	Sacarose	76
	Glicose	50
<i>A. vinellandi</i>	Sacarose	82
	Glicose	65
<i>P. fluorescence</i>	Sacarose	90
	Glicose	88

No teste de identificação de sideróforo do tipo catecolato (teste de Arnou, 1937) *G. trabeum* apresentou uma leitura de absorvância de 0,2 para o meio com sacarose e 0,13 para o meio com glicose, sendo que *L. edodes* e *T. versicolor* apresentaram somente no meio com sacarose a absorvância de 0,07 e 0,05, respectivamente, mas *T. villosa* apresentou zero de absorvância (Tabela 6). Esses resultados confirmaram o que foi mencionado por Goodell e colaboradores (1997), que mostraram a produção de sideróforo do tipo catecolato (fenolato) pelo fungo *G. trabeum* e também confirmaram o que foi observado por Rodrigues e colaboradores (1997a), que foi a produção de catecolatos pelos fungos *T. versicolor* e *L. edodes*. A possível produção adicional de ácido hidroxâmico, ou quelantes de funções mistas, por *G. trabeum* não foi investigado por Goodell e colaboradores (1997). Os fungos de decomposição branca *L. edodes* e *T.*

versicolor apresentaram uma quantidade muito pequena de sideróforo do tipo catecolato, sendo que esse tipo de sideróforo já foi observado em culturas de *Phanerochate chrysosporium* e *Coriolus versicolor* por Fekete e colaboradores (1989a). Entretanto, todas as bactérias apresentaram leituras de absorvância em torno de 0,2, tanto no meio com sacarose quanto no meio com glicose, como mostra a Tabela 6.

Tabela 6: Determinação dos sideróforos do tipo catecolato produzido pelos fungos e bactérias pelo teste de Arnow (1937).

Microrganismo	Fonte de carbono	A _{510nm}
<i>L. edodes</i>	Sacarose	0,07
	Glicose	ND
<i>T. versicolor</i>	Sacarose	0,05
	Glicose	ND
<i>T. villosa</i>	Sacarose	0
	Glicose	ND
<i>G. trabeum</i>	Sacarose	0,2
	Glicose	0,13
<i>A. vinellandi</i>	Sacarose	0,20
	Glicose	0,20
<i>P. fluorescence</i>	Sacarose	0,20
	Glicose	0,12

ND- Não determinado

O teste de identificação de sideróforos do tipo hidroxamato (teste Csáky, 1948) deu positivo para a bactéria *P. fluorescence* e para os fungos *G. trabeum*, *T. villosa*, *L. edodes* e *T. versicolor*. A literatura menciona que os quelantes do tipo catecolato são produzidos mais freqüentemente por bactérias e os quelantes do tipo hidroxamatos são produzidos por fungos. Assim, os fungos estudados apresentaram produção de sideróforo do tipo hidroxamato (Goodell *et al*, 1997).

Mas, quem apresentou maior produção de sideróforos do tipo hidroxamato foi a bactéria *P. fluorescence* e os fungos apresentaram uma pequena quantidade desse tipo de sideróforo (Tabela 7).

Tabela 7: Determinação dos sideróforos do tipo hidroxamato produzido pelos fungos e bactérias pelo teste de Csáky (1948).

Microrganismo	Fonte de carbono	A _{526nm}
<i>L. edodes</i>	Sacarose	0,05
	Glicose	ND
<i>T. versicolor</i>	Sacarose	0,09
	Glicose	ND
<i>T. villosa</i>	Sacarose	0,08
	Glicose	ND
<i>G. trabeum</i>	Sacarose	0,10
	Glicose	0,12
<i>A. vinellandi</i>	Sacarose	0
	Glicose	0
<i>P. fluorescence</i>	Sacarose	0,15
	Glicose	0,13

ND- Não determinado.

6.3- CONCLUSÕES PARCIAIS

PARTE 3

- ✓ Os meios de cultura sólido e o meio de cultura líquido usados foram adequados para fornecer uma idéia dos fungos e das bactérias mais eficientes na produção de sideróforos. O método de CAS em meio líquido confirmou os resultados obtidos pelo método de CAS em meio sólido, apesar de uma variação para o fungo *L. edodes*.
- ✓ As condições determinadas para a produção de sideróforos em meio líquido apresentaram os melhores resultados para os seguintes fungos e bactérias: *G. trabeum*, *T. versicolor*, *A. vinellandi* e *P. fluorescence*.
- ✓ Os métodos químicos permitiram a identificação do grupo (hidroxamato ou catecolato) de sideróforo que cada fungo ou bactéria produzia.

PARTE 4

5.4- APLICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS SELECIONADOS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS.

A aplicação desses microrganismos nos efluentes papaleiro (kraft E1 e licor negro) e têxtil, com as condições ajustadas para a produção e geração dos radicais hidroxilas pelos sideróforos, apresentou resultados significativos na descoloração desses (Figuras 37, 38, 39 e 40). O meio de cultura sem adição de Fe(III), usado na produção de sideróforos de *G. trabeum* e da *A. vinellandi*, apresentou uma adequada produção e obteve uma descoloração eficiente dos três efluentes, como mostram as Figuras 37, 38 e 39. Entretanto, no meio de cultura após a adição de 1 mmol.L⁻¹ de Fe(III) não houve produção de sideróforos. Consequentemente, obteve-se uma baixa descoloração dos efluentes (Figuras 37, 38 e 39), ou seja, a produção dos sideróforos dos microrganismos no meio de cultura foi reprimida quando somada a uma alta concentração de ferro. Isso ocorreu porque os sideróforos produzidos por todos os microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos, com algumas exceções, normalmente são reprimidos por alta concentração de ferro no meio (Guerinot, 1994).

A atuação dos sideróforos da bactéria *A. vinellandi* foi bastante significativa, principalmente no licor negro, pois, no meio líquido, sem adição de Fe(III) obteve-se uma descoloração de 96% enquanto que o meio líquido com adição de 1mmol.L⁻¹ de Fe(III), inibindo a produção do sideróforos, obteve-se somente 15% de descoloração (Figura 40).

tratamento deste efluente em processos combinados com fotocatalise (Esposito *et al*, 1992, Durán *et al*, 1994). Rodríguez e colaboradores (1992) mostraram que a enzima manganês-peroxidase tem um pequeno efeito na descoloração do efluente papelero kraft E1 e sugeriram a atuação de outras enzimas. Manzanares e colaboradores (1995) mostraram uma descoloração em efluentes de indústria papelera de 70% com o fungo *T. versicolor*. Detectaram também atividades enzimáticas de lacase e manganês-peroxidase. Mehna e colaboradores (1995) observaram 92% de descoloração de efluente papelero com o *T. versicolor*. *T. villosa* também apresentou atividade enzimática de lacase em torno de 1U.L^{-1} (Tabela 8) antes do tratamento. Após o tratamento sua atividade enzimática aumentou (Tabela 9). Consequentemente, houve uma eficiente descoloração do efluente papelero kraft E1 (Figura 37) e do efluente têxtil (Figura 40), sendo que esse fungo apresentou uma baixa produção de sideróforos (Tabela 10). Soares e colaboradores (1998) mostraram uma descoloração de 70-80% do efluente papelero kraft E1 com o fungo *T. villosa*. Enquanto, que é descrito na literatura tratamentos de efluente têxtil somente com o fungo *Trametes versicolor*. Knapp e Newby (1999) utilizaram o fungo *Coriolus versicolor* para descolorir um efluente contendo um cromóforo diazo acoplado e o resultado após o tratamento foi de 70 a 80% de descoloração.

Tabela 8- Determinação da atividade enzimática média da lacase antes do tratamento dos efluentes industriais usando a serigaldazina como substrato.

Microrganismos	Atividade enzimática (U.L^{-1})	
	Meio líquido sem Fe(III) .	Meio líquido com a adição de $1\text{mmol.L}^{-1} \text{Fe(III)}$.
<i>L. edodes</i>	0,74	0,77
<i>T. versicolor</i>	13,00	13,20
<i>T. villosa</i>	1,00	1,43
<i>G. trabeum</i>	0,04	0,04
<i>A. vinellandi</i>	0	0
<i>P. fluorescence</i>	0	0

A bactéria *P. fluorescence* apresentou uma significativa produção de sideróforos, (Tabela 10), mas não descoloriu os efluentes (Figuras 37, 38 e 39). Isso pode ser devido ao tipo de sideróforo que ela produz (pioverdino) que, segundo Coffman e colaboradores (1990), é usado para prevenir a reação de Fenton em pH neutro. Assim, conclui-se que ele também não favorece a geração de radicais hidroxil nas condições usadas. Enquanto que Dao e colaboradores (1999) produziram o pioverdino de uma *Pseudomonas aeruginosas* e sugeriram que com a produção dele houve uma maior susceptibilidade do microrganismos a danos oxidativos (Dao et al, 1999). Outra hipótese que pode ser sugerida é que o pH, após a produção do sideróforo da *P. fluorescence* é em torno de 8,0 (Tabela 11). Então, o pH nos tratamentos dos efluentes industriais não permanece nas condições para gerar radicais hidroxil, ou seja, em pH ácido, enquanto que os outros microrganismos estudados após a produção dos sideróforos, apresentaram o pH na faixa de 3,0-5,0. Assim, ao serem colocados para os tratamentos dos efluentes (pH ajustado em 5,0), permaneceram em condições ácidas (Tabela 11).

Tabela 9- Determinação da atividade enzimática média da lacase após o tratamento dos efluentes industriais usando a serigaldazina como substrato.

Microrganismos	Atividade enzimática (U.L ⁻¹)	
	Meio líquido sem Fe(III).	Meio líquido com a adição de 1mmol.L ⁻¹ Fe(III).
<i>L. edodes</i>	0,20	0,21
<i>T. versicolor</i>	9,90	10,40
<i>T. villosa</i>	5,88	4,50
<i>G. trabeum</i>	0	0
<i>A. vinellandi</i>	0	0
<i>P. fluorescence</i>	0	0

Tabela 10- Determinação média da máxima produção de sideróforos por fungos e bactérias medidos pelo método líquido do chromo azurol e a identificação do tipo de sideróforos (Arnow, 1937; Csáky, 1948).

Microrganismos	Unidades de CAS (%)		Tipo de sideróforos
	Meio líquido sem Fe(III).	Meio líquido com a adição de 1 mmol.L ⁻¹ Fe(III).	
<i>L. edodes</i>	46	0	catecolatos e hidroxamatos
<i>T. versicolor</i>	55	0	catecolatos e hidroxamatos
<i>T. villosa</i>	29	0	hidroxamato
<i>G. trabeum</i>	75	0	catecolatos e hidroxamatos
<i>A. vinellandi</i>	80	0	catecolatos
<i>P. fluorescence</i>	90	0	catecolatos e hidroxamatos

Os fungos e as bactérias estudados não apresentaram atividades enzimáticas extracelulares significativas de manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP), isto é, os valores determinados ficaram em torno de 0,025 U.L⁻¹. Segundo Reddy (1993), em condições de excesso de nitrogênio e carbono ocorrem uma completa repressão na síntese de LiP e MnP. Nesse caso poderia estar ocorrendo essa repressão para estas enzimas, pois as condições para produção de sideróforos é exatamente o contrário, ou seja, uma alta concentração de carbono e nitrogênio. Outra hipótese é que a substância de baixa massa molecular pode estar inibindo a ação da LiP e MnP, como sugeriram pesquisadores nas seguintes referências, Archibald (1992), Enoki e colaboradores (1997), Tanaka e colaboradores (1999).

Tabela 11- Valores de pHs nos filtrados dos fungos e das bactérias após a produção dos sideróforos.

Microrganismos	pH	
	Meio líquido sem Fe(III).	Meio líquido com a adição de 1mmol.L ⁻¹ Fe(III).
<i>L. edodes</i>	4,2	5,0
<i>T. versicolor</i>	4,8	5,0
<i>T. villosa</i>	3,5	4,8
<i>G. trabeum</i>	4,0	5,0
<i>A. vinellandi</i>	3,0	3,5
<i>P. fluorescence</i>	8,0	8,1

A tabela 12 mostra a concentração de oxalato nos filtrados dos fungos e das bactérias e observou-se quantidades significativas, mas esses filtrados não foram colocados na presença de luz com o efluente (reação feita no escuro), consequentemente, não seriam capazes de descolorir esses efluentes industriais. Entretanto, o ácido oxálico pode estar favorecendo o acesso do sideróforo pelo ferro, isto é, o ácido oxálico sequestra o ferro do hidróxido ou óxido de ferro, formando o oxalato, que é um fraco quelante para esse metal, tornando-o assim mais acessível para o sideróforo (Goodell *et al*, 1997). Mas, ele não se mostrou essencial, pois a bactéria *A. vinellandi* não produz o ácido oxálico e mostrou resultados significativos na descoloração dos efluentes. Uma outra hipótese sugerida por Goodell e colaboradores (1997) é que possa existir, no ambiente microbiano, um outro quelante orgânico fraco, capaz de solubilizar o ferro sob a forma de óxido e torná-lo disponível para o sequestro subsequente pelo sideróforo. Portanto, pode ser que a bactéria *A. vinellandi* não produza ácido oxálico, mas produza um outro ácido que faz com que o pH do meio de produção seja reduzido para 3,0 (Tabela 11).

A adsorção de todos os efluentes pelos fungos também foi testada e não se observou uma adsorção maior que 10%, como exemplo disto é mostrado na figura

6.4- CONCLUSÃO PARCIAL

PARTE 4

- ✓ Os fungos *G. trabeum* e *T. versicolor* e a bactéria *A. vinellandi* foram os melhores produtores de sideróforos e também apresentaram grande eficiência para o tratamento do efluente industrial papeleiro (kraft E1) e licor negro e o efluente têxtil, indicando que os sideróforos podem ser uma boa alternativa para melhorar os problemas ambientais causados pelos efluentes industriais.

PARTE 5

5.5- TENTATIVA DE IDENTIFICAR A ESTRUTURA QUÍMICA PROVÁVEL DO SIDERÓFORO DO *Gloeophyllum trabeum*.

Os sideróforos foram obtidos segundo Page e von Tingerstom (1988) e Cox (1994) via uma extração líquido-líquido com o acetato de etila para o sideróforo do tipo catecolato, e com álcool benzílico para os do tipo hidroxamato. Entretanto, somente a primeira extração foi efetiva, pois para o tipo hidroxamato não foi possível obter a separação de fases para a sua extração. Realizou-se uma separação por cromatografia em placa preparativa dos sideróforos do tipo catecolato, utilizando como eluente tolueno/ácido acético (68/32). Pela cromatografia de camada delgada do produto original foram observadas 6 manchas, sendo que duas delas foram isoladas e analisadas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ^1H), infra vermelho (IV) e espectrometria de massa (EM), como mostram os espectros apresentados nas figuras 42, 43, 44, para o primeiro produto (Estrutura mostrada na figura 45) e nas figuras 46, 47 e 48 para o produto mais polar (Estrutura mostrada na figura 49).

O conjunto dos resultados pelas análises dos espectros indica a provável presença de uma substância derivada do ácido hidroxifenilacético (Goodell *et al*, 1997).

A figura 42 mostra o espectro de RMN do produto apolar obtido, no qual pode-se observar os sinais dos hidrogênios aromáticos (Ha) em dois conjuntos principais com multipletes na região entre 7,34 e 7,58 ppm (Estrutura mostrada na figura 45). Nesse espectro, observa-se ainda um sinal em 3,65 a 3,66 ppm, que pode ser atribuído à metila de um éster (Estrutura mostrada na figura 45).

O espectro de infravermelho (Figura 43) apresenta uma banda em 3422 cm^{-1} que pode ser atribuída a uma hidroxila. Em 1730 cm^{-1} , observa-se uma banda de uma carbonila de éster.

A hipótese do caráter aromático é sustentada pelo fragmento de fenila observado em m/z 76, que pode ser dissubstituído, como mostra o espectro de massa da fração mais apolar isolada na figura 44.

A partir da análise dos dados dos espectros de RMN- ^1H , IV e massas a substância presente no extrato deve possuir um anel benzênico dissubstituído, como está mostrado na estrutura da figura 45. Estudos posteriores para a confirmação desta estrutura se faz necessário, pois o extrato utilizado mostrou-se como uma mistura de várias substâncias, devendo então passar por um processo de purificação.

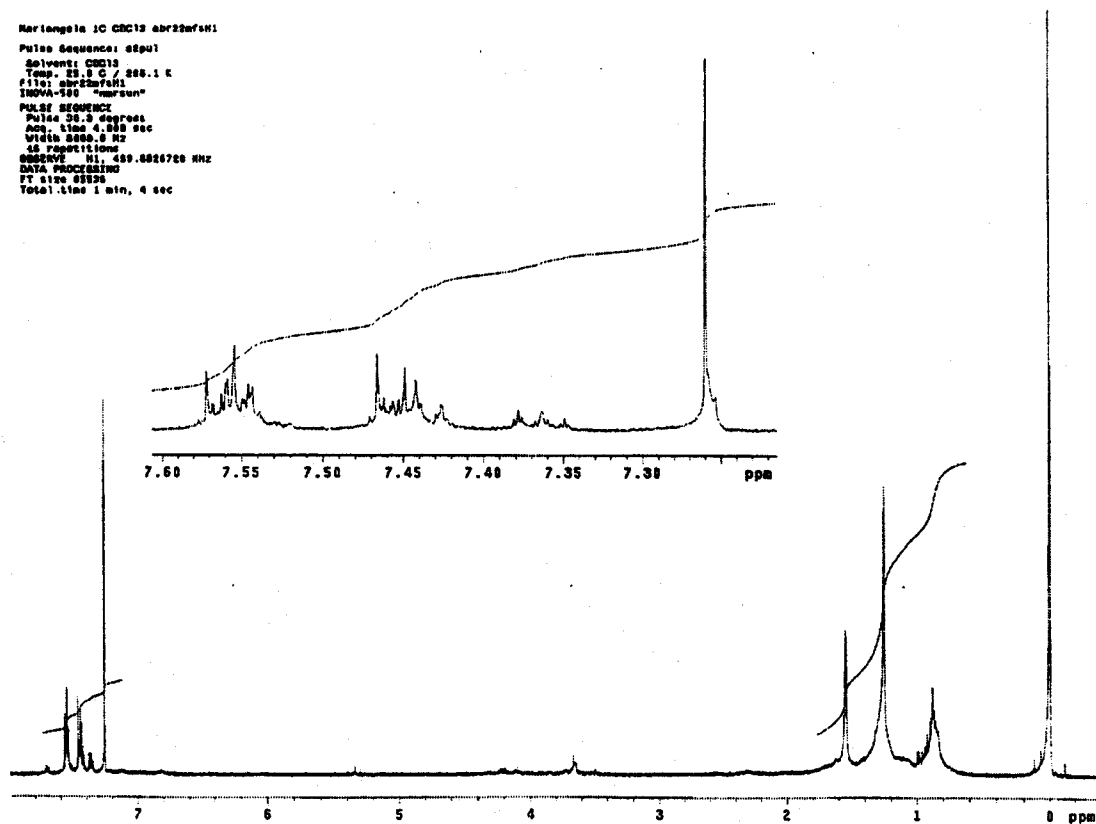


Figura 42- Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-¹H) da fração mais apolar, separada pela cromatografia de camada delgada.

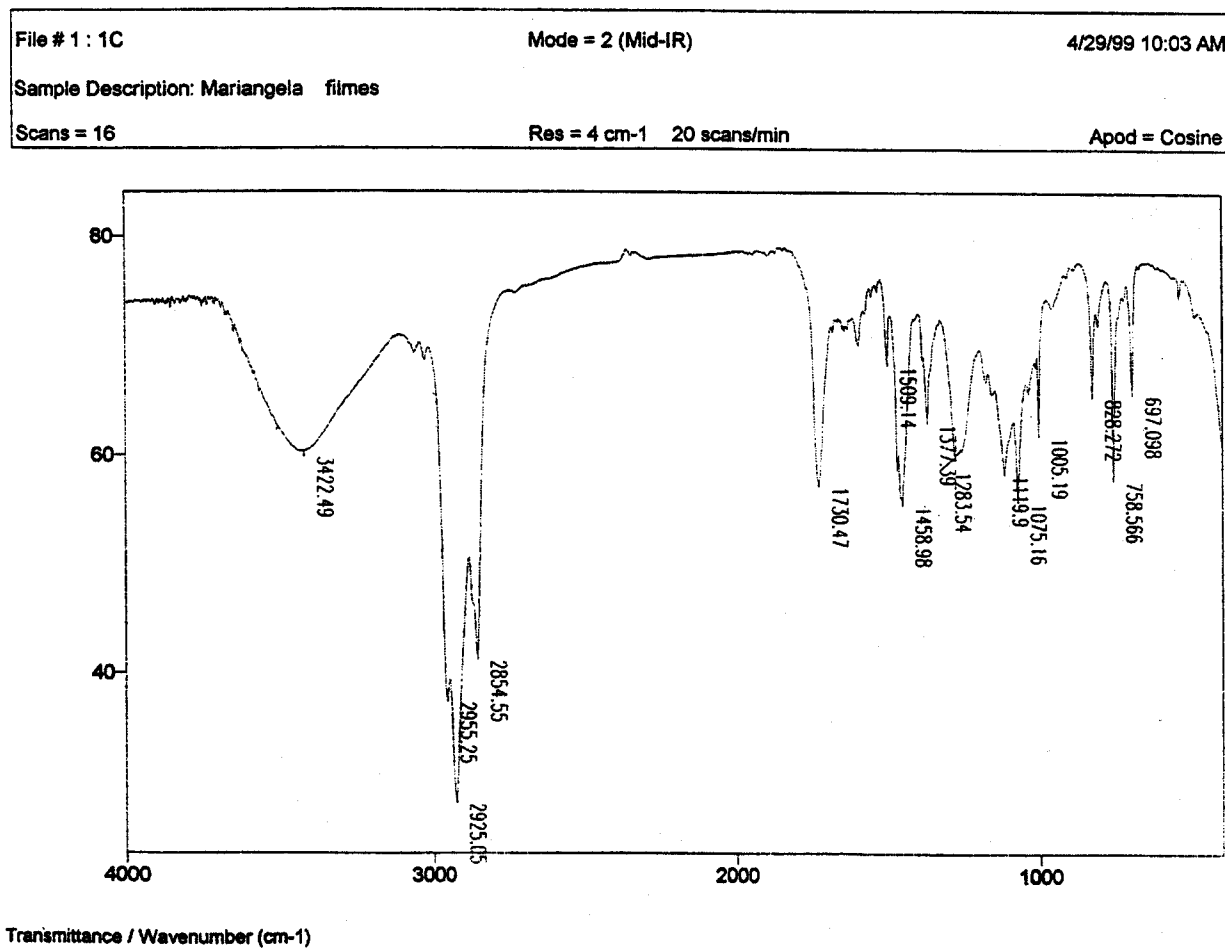


Figura 43- Espectro de Infra Vermelho da fração mais apolar, separada pela cromatografia de camada delgada.

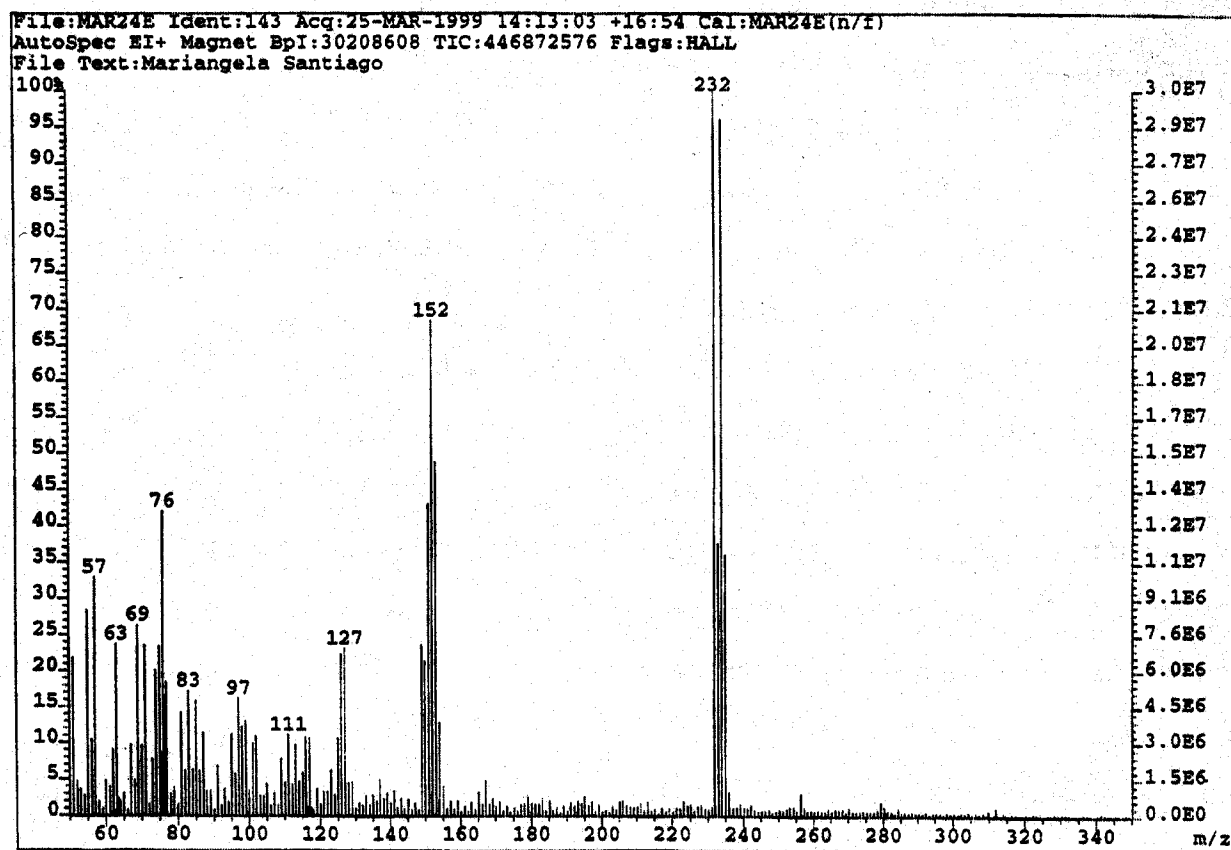


Figura 44- Espectro de Massa da fração mais apolar, separada pela cromatografia de camada delgada.

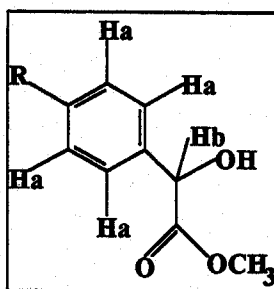


Figura 45- Estrutura provável de um dos sideróforos produzido pelo fungo *Gloeophyllum trabeum*.

A fração mais polar isolada apresenta em seu espectro de RMN- ^1H (Figura 46) um multipletes em 7,80 a 7,60 ppm e 7,50 a 7,40 ppm, que é um indicativo da presença de hidrogênios aromáticos (Ha) na estrutura do composto. Pode-se observar também que em 3,65 ppm ocorre um sinal que pode ser atribuído a uma metila ligada a um oxigênio (Estrutura mostrada na figura 49).

Pelo espectro de infravermelho desse composto (Figura 49), observa-se a deformação axial de OH em 3413 cm^{-1} e a deformação axial normal de C=O em 1740 cm^{-1} do tipo de um éster. Em 1375 cm^{-1} observa-se uma banda de deformação angular, atribuída à ligação OH.

O espectro de massa mostrou dois fragmentos em m/z 77 e 167, os quais também são observados no espectro do composto puro ácido acético 3,4-diidroxibenzóico usado como padrão e que foi isolado por Goodell e colaboradores (1997) (Figura 8). Pode-se observar nesse espectro uma mistura de substâncias, dificultando assim a análise. Assim, a estrutura química proposta é somente uma **tentativa de caracterização** para uma das substâncias produzidas pelo fungo *G. trabeum*, pois é necessário um processo mais eficiente de purificação da substância para sua identificação.

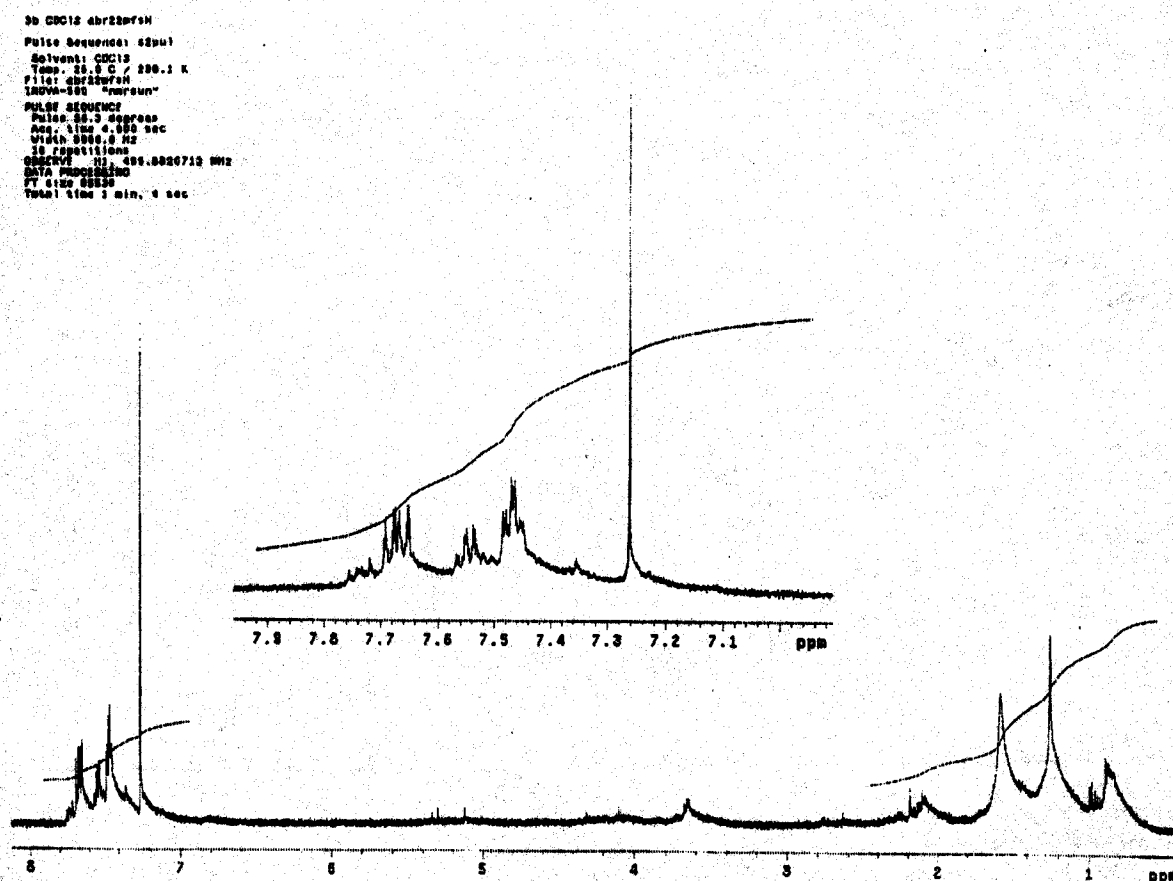


Figura 46- Espectro de RMN-¹H da fração mais polar separada pela cromatografia de camada delgada.

File # 1 : 3B
Sample Description: Mariangela filmes
Scans = 16
Mode = 2 (Mid-IR)
Res = 4 cm-1 20 scans/min
4/29/99 10:07 AM
Apod = Cosine

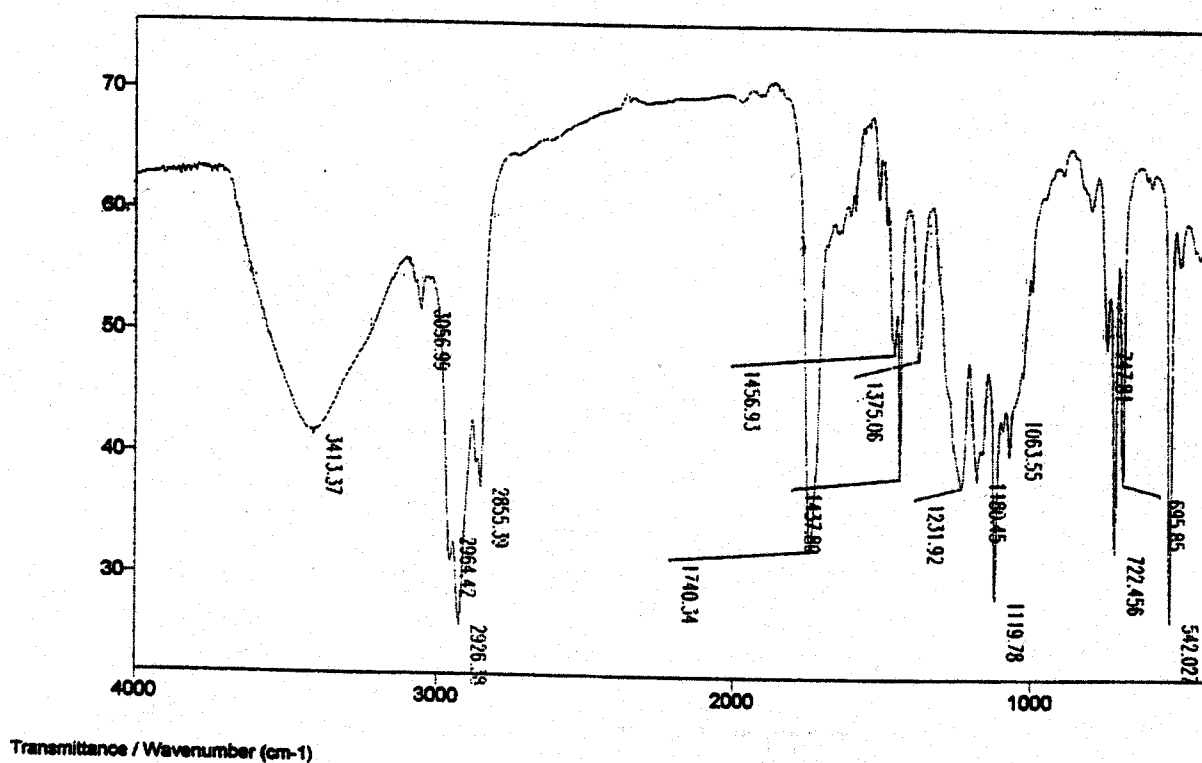


Figura 47- Espectro de IV da fração mais polar separada pela cromatografia de camada delgada.

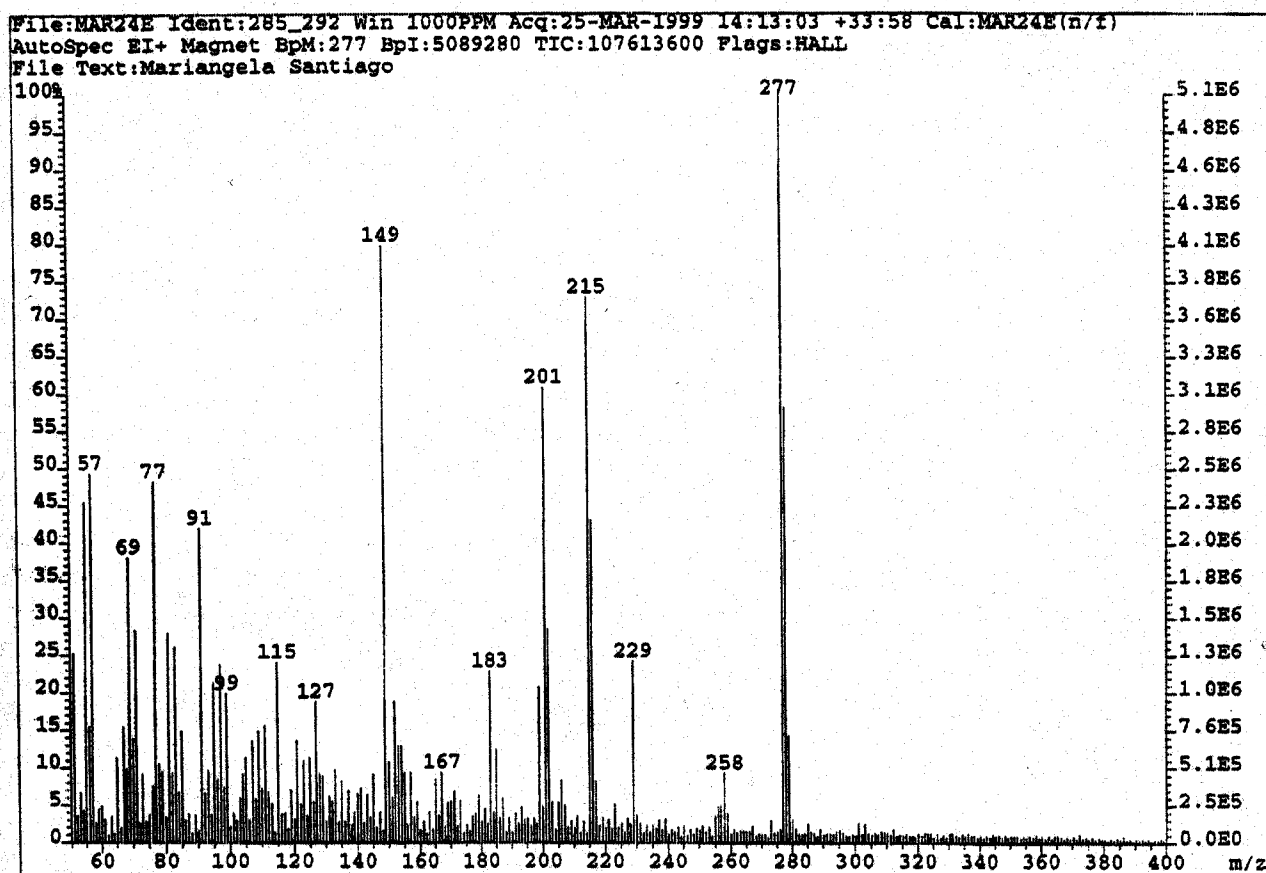


Figura 48- Espectro de Massa da fração mais polar separada pela cromatografia de camada delgada.

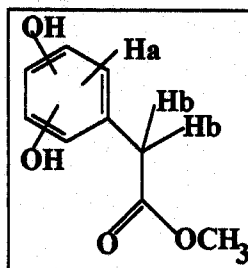


Figura 49- Estrutura química provável de um dos sideróforos produzido pelo fungo *Gloeophyllum trabeum*.

6.5- CONCLUSÃO PARCIAL

PARTE 5

- ✓ As técnicas de espectrometria de massa, infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio usadas para a identificação dos sideróforos mostraram a produção dos sideróforos do tipo catecolato, embora a estrutura nesta etapa somente pôde ser sugerida.

6.6- CONCLUSÃO FINAL

Nesse trabalho pode-se observar que os sideróforos exercem um papel importante na biodegradação da lignina e seus derivados. Os experimentos iniciais com modelos de sideróforos, principalmente com a desferrioxamina B, mostraram que eles são capazes de reduzir o Fe(III) e gerar espécies reativas de oxigênio. Estudos complementares na elucidação dos mecanismos de biodegradação da lignina e clorolignina pelos sideróforos, se fazem necessário. A aplicação desses sideróforos em efluentes industriais mostrou ser bastante promissora, principalmente após a comprovação que eles participam da biodegradação da lignina ou clorolignina e que são eficazes. Esse estudo mostra a necessidade de uso de microrganismos eficientes na produção de sideróforos. Foram utilizados alguns métodos químicos para determinar o tipo de sideróforo que cada microrganismo produzia (hidroxamato e catecolato), e para confirmar esses resultados foram utilizados também as técnicas de espectrometria (espectrometria de massa, infravermelho e ressonância magnética de hidrogênio). Posteriormente houve a tentativa de caracterizar os sideróforos do tipo catecolato produzido pelo fungo *G. trabeum*. Embora não tenhamos obtido a estrutura química exata desses sideróforos, foi possível sugerir uma estrutura; portanto, seria interessante uma continuação desse estudo de caracterização mais detalhado.

A capacidade dos sideróforos para gerar radical hidroxila com a redução do Fe(II) é de grande importância na elucidação do mecanismo de biodegradação da lignina. A formação dessa espécie oxidante permite a degradação significativa de efluentes derivados da indústria de papel e têxtil. A possibilidade de usar essa série de novas substâncias com essa capacidade é de grande importância para o tratamento de efluentes industriais.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adjimani, J. P., Owusu, E. (1997) *J. Inorg. Biochem.* 66, 247-252.
- Agostinelli, E.; Cervoni, L.; Giartosio, A.; Morpurgo, L. (1995) *Biochem. J.*, 306, 697-702.
- Aguilar, C.; Urzua, U.; Koenig, C.; Vicuna, R. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* 366, 275-282
- Ahmad, S. (1995) Em *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. Chapman and Hall, NY, p. 457.
- Ander, P.; Eriksson, K. E. (1977) *Physiol. Plant* 41, 239-248
- Ander, P. (1994) *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 235-239.
- Apha (1989) *Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 17ED. American Publ. Health Ass., N Y., N°5550 B, p.568.
- Arnow, L.E. (1937) *J. Biol. Chem.* 118, 531-533.
- Archibald, F. S.; Roy, B. (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1496-1499.
- Atlow, S.C.; Bonadona-Aparo, L.; Klibanov, A.M. (1984) *Biotechnol. Bioeng.* 26, 599-603.
- Baccan, N.; Andrade, J. C.; Godinho, O. E. S.; Barone, J. S. (1985) *Química Analítica Quantitativa Elementar*, Ed. Edgard Blücher Ltda, 2ª Edição, p. 196-203.
- Bajpai, P.; Mehna, A.; Bajpai, P. K. (1993) *Process Biochem.* 46, 274-276.
- Bajpai, P.; Bajpai, P. K. (1994) *J. Biotechnol.* 33, 211-220.
- Berner, I.; Greiner, M.; Metzger, J.; Jung, G.; Winkelmann, G. (1991) *Biol. Met.* 4, 113-118.
- Bergbauer, M.; Eggert, C.; Kalnowski, G. (1992) *Biotechnol. Lett.* 14, 317-322.
- Blanchete, R. A. (1991) *Annu. Rev. Phytopathol.* 29, 381-398
- Brill, W.J. (1980) *Microbiol. Rev.* 44, 449-467.

- Budavari, S.; O'Neil, M. J.; Smith, A.; Heckelman, P. E. (1989) Em *Encyclopedia of Drugs and Biologicals*. 11^a edição. Merck e Co. Rahway, N.Y., p.1605.
- Bullen, J. J. (1991) *Rev. Infect Dis.* 3, 1127-1138.
- Buyer, J. S.; Sikora, L. J. (1990) *Plant and Soil* 129, 101-107.
- Carpita, N.; Sabulase, D.; Montezinos, D.; Delmer, D. P. (1979) *Science* 205, 1144-1147.
- Caudle, M.T.; Crumbliss, A.L. (1994) *Inorg. Chem.* 33, 4077-4085.
- Caudle, M.T.; Cogswell, L.P.; Crumbliss, A.L. (1994) *Inorg. Chem.* 33, 4759-4773.
- Chandhoke, V.; Goodell, B.; Jellison, J.; Fekete, F. A. (1992) *FEMS Microbiol. Lett.* 90, 263-266.
- Cheeseman, K. H. (1993) Em *DNA and free radicals*. Halliwell, B. and Aruoma, O.I. (Eds.), Ellis Horwood, Chichester, UK, p.108-144.
- Coffman, T.J.; Cox, C. D.; Edeker, B. L.; Britigan, B. E. (1990) *J. Clin. Invest.* 86, 1030-1037.
- Corbin, J. L.; Bulen, W.J. (1969) *Biochemistry* 27, 2745-2752.
- Cornish, A. S.; Page, W. J. (1995) *Bio Metals*, 8, 332-338.
- Cornish, A. S.; Page, W. J. (1998) *Microbiology* 144, 1747-1754.
- Cox, C. D. (1994) *Methods Enzymol.* 235, 315-372.
- Crichton, R. R.; Ward, R. J. (1994) *Biochemistry* 31, 11255-11264.
- Crowley, D. E.; Wang, Y. C.; Reid, C. P. P.; Szaniszlo, P. J. (1991) *Plant and Soil* 130, 179-198.
- Crowling, E. B. (1961) Em *Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by white-rot and brown-rot fungi*. Tech Bull 1258. USDA Washington, DC. p.79-81.
- Csáky, T. (1948) *Acta Chem. Scand.* 2, 450-453.
- Dao, K. H. T.; Hamer, K. E.; Clark, C. L.; Harshman, L. G. (1999) *Ecol. Appl.* 9, 441-448

- Durán, N.; Ferrer, I.; Rodríguez, J. (1987) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 16, 157-167.
- Durán, N.; Machuca, A. (1995) *Holz als Roh-Werkstoff* 53, 346.
- Durán, N. (1995) *Proc. 4th Braz. Symposium on lignin*, Recife, PE, Brasil, p.164-169.
- Durán, N.; Esposito, E. (1997) Em *Microbiologia Ambiental* (Melo, I. S.; Azevedo, J. L. Eds) Embrapa, CNPMA; Jaguariúna, SP, p. 269-292.
- Durán, N.; Santiago, M. F.; Parra, C.; Rodríguez, J. (1998) *Proc. 7th Int. Conf. Biotechnol. in the Pulp and Paper Industry*, Vancouver, Canada p. B163-B166.
- Drechsel, H.; Jung, G. (1998) *J. Peptide Science* 4, 147-181.
- Ecker, D.J.; Passavant C. W.; Emery T. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 720, 242-249.
- Emery, T. (1980a) *Nature* 287, 776-777.
- Emery, T. (1980b) *Biochim. Biophys. Acta* 629, 382-390.
- Enoki, A.; Tanaka, H.; Fuse, G. (1989) *Wood Sci. Technol.* 23, 1-12.
- Enoki, A.; Hirano, T.; Tanaka, H. (1992) *Mater Org.* 27, 247-261.
- Enoki, A.; Itakura, S.; Tanaka, H. (1997) *J. Biotechnol.* 53, 265-272.
- Eriksson, K. E. (1990) *Wood Sci. Technol.* 24, 79-101.
- Ernst, J.; Winkelmann, G. (1974) *Arch. Microbiol.* 100, 271-282.
- Espejo, E.; Agosin, E. (1991) *Appl. Envir. Microbiol.* 57, 1980-1986.
- Esposito E.; Canhos, V. P.; Durán N. (1991) *Biotechnol. Lett.* 13, 571-576.
- Esposito E.; Canhos, V. P.; Durán N. (1992) *Proc. 2nd Braz. Chem. Lignin and Other Wood Comp.* Campinas, SP, Brasil 3, 356-361.
- Evans, C.S.; Dutton, M. V.; Guillen, F.; Veness, R. G. (1994) *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 235-239.
- Faure, D.; Bouillant, M. L.; Bally, R. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1144-1146.

- Fengel, D.; Wegener, G. (1984) Em *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*. W. de Gruyter (ed.), New York, NY, 613p.
- Ferraz, A.; Baeza, J.; Durán, N. (1991) *Lett. Appl. Microbiol.* 13, 82-86.
- Ferrer, I.; Esposito, E.; Durán, N. (1992) *Enzyme Microb. Technol.* 14, 402-406.
- Florence, T. M. (1984) *J. Inorg. Biochem.* 22, 221-230.
- Flournoy, D. S.; Kirk, T. K.; Highley, T. (1991) *Holzforschung* 45, 383-388.
- Fossey, J., Lefort, D., Sorba, J. (1995) Em *Free Radical in Organic Chemistry* 1ed. New York, Wiley, 307p.
- Gianfreda, L.; Xu, F.; Bollang, J. M. (1999) *Bioremediation J.* 3, 1-25.
- Gibbs, C. R. (1976) *Anal. Chem.* 48, 1197-1201.
- Givaudan, A.; Effosse, A.; Faure, D.; Potier, P.; Bouillant, M. L.; Bally, R. (1993) *FEMS Microbiol. Lett.* 108, 205-210.
- Glenn, J. K.; Gold, M. H. (1983) *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1741-1747.
- Goodell, B.; Liu, J.; Jellison, J.; Lu, J.; Paszczynski, A.; Fekette, F. (1995) Em *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: Recent Advances in Applied and Fundamental Research* (E. Srebit Ed.) Facultas-Universitätsverlag, Vienna, Austria, p. 591-594.
- Goodell B.; Jellison J.; Liu J.; Daniel G.; Paszczynski A.; Fekete F.; Krishnamurthy S.; Jun L.; Xu G. (1997) *J. Biotechnol.* 53,133-162.
- Goodell B.; Yamamoto, K.; Jellison, J.; Nakamura, M.; Fujii, T.; Takabe, K.; Hayashi, N. (1998) *Holzforschung* 52, 345-350.
- Green, F.; Larsen, M. J.; Winandy, J. E.; Highley, T. L. (1991) *Mater Org.* 26, 191-213.
- Guerinot, M. L. (1994) *Ann. Rev. Microbiol.* 48, 743-772.
- Haber, F.; Weiss, J. (1934) *Proc. R. Soc. Lond. (A)* 147, 332-351.
- Haemmerli, S. D.; Leisola, M. S. A.; Sanglard, D.; Fiechter, A. (1986) *J Biol. Chem.* 261, 6900-6903.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (1990) *Methods Enzymol.* 186, 1-85.

- Hamdan, H.; Weller, D. M.; Thomashow, L. S. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* 3270-3277.
- Hammel, K.E.; Jensen, K. A.; Mozuch, M. D.; Landocci, L. L.; Tien, M.; Pease, E. A. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 12274-1228.
- Han, D. N. S.; Shiraishi, N. (Eds) *Wood and cellulosic chemistry* (1991) (Monce) Dekker, Inc. New York, N.Y. p 408.
- Hartwing, R. C.; Loepper, R. H. (1993) *Em Iron Chelation in plant and Soil Microorganisms*. Academic Press. Barton, L. L. e Hemming, B. C. (Eds), NY, p 465-482.
- Helm, D. v. d.; Winkelmann, G. (1994) *Em Metal Ions in Fungi*. Winkelmann, G. and Winge, D. R. (Eds.), Marcel Dekker, NY, p.39-98.
- Hider, R. C. (1984) *Struct. Bonding* 58, 25-87.
- Highley, T. (1980) *Mater Org.* 15, 81-90.
- Hirano, T.; Tanaka, H.; Enoki, A. (1995) *Mokuzai Gakkaishi* 41, 334-341.
- Hirano, T.; Tanaka, H.; Enoki, A. (1997) *Holzforschung* 51, 389-395.
- Huschka, H. G.; Jalal, M. A.; Van Der Helm. D.; Winkelmann, G. (1986) *J. Bacteriol.* 167, 1020-1024.
- Hyde, S. M.; Wood, P. M. (1995) *Int. Res. Group on Wood Preservation Series*. Box 5607, S-114 86. Stockholm, Sweden. Document IRG/WP 95-10104.
- Hyde, S. M.; Wood, P. M. (1997) *Microbiology-UK* 143, 259-266.
- Jalal, M.A.; Mocharla, R.; Van Der Helm D. (1984) *J. Chromatogr.* 301, 247-252.
- Jellison J.; Goodell B.; Fekete F.; Chandhoke V. (1990) *Int. Res. Group Wood Preservation*. Documento n°. IRG/WP/1442, 1-16.
- Jellison, J.; Chandhoke, V.; Goodell, B.; Fekete, F. (1991) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 805-809.
- Jellison J.; Smith K.; Shortle, W. (1992) *Int. Res. Group Wood Preservation Series*. Box 5607, S-114 86. Stockholm, Sweden. Document IRG/WP 1552.

- Jellison, J.; Connolly J.; Smith, K.; Shortle, W. (1993) *Int. Res. Group Wood Preservation Series*. Box 5607, S-114 86. Stockholm, Sweden. Document IRG/WP 10048-93.
- Jellison, J.; Chen Y., Fekete, F. A. (1997a) *Holzforschung* 51, 503-510.
- Jellison, J.; Connolly, J.; Goodell, B.; Doyle, B.; Illman, B.; Fekete, F.; Ostrofsky, A. (1997b) *Int. Biodeterioration Biodegradation* 39, 165-179.
- Kennedy, J. F.; Philips, G. O.; William, P. A. (Eds) (1996) *The Chemistry and Processing of Wood and Plant Fibrous Materials* Cambridge, U.K. p 430.
- Kirk, T. K.; Tien, M.; Kersten, P. J.; Mozuch, M. D.; Kalyanaraman, B. (1986) *Biochem. J.* 236, 279-287.
- Kirk, T. K. (1987) *Phyl. Trans. R. Soc. Lond.* A321, 461-474.
- Kirk, T. K.; Ibach, R.; Mozuch, M. D.; Conner, A. H.; Highley, T. L. (1991) *Holzforschung* 45, 239-244.
- Klebanoff, S.J.; Waltersdorph, A. M.; Michel, B.R.; Rosen, H. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 19765-19771.
- Kling, S.H. (1997) *Peroxidase e Efluentes Industriais Corados, 5ª Sessão Técnica*, Enzitec 97, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Knapp, J. S.; Newby, P. S. (1999) *Wat. Res.* 31, 575-577.
- Koenig, J. W. (1975) *Em Cellulose as a Chemical and Energy Resource Symposium 5, Biotechnology and Bioengineering*. Wilke, C. R. (Ed.), Wiley, NY, 5, 151-159.
- Kohdzuma, Y.; Minato, K.; Katayama, Y.; Okamura, K. (1991) *Mokuzai Gakkaishi* 41, 334-341.
- Konetschny-Rapp, S.; Huschka, H. G.; Winkelmann, G.; Jung G. (1988) *Biol. Met.* 1, 9-17.
- Kuhad, R. C.; Singh, A.; Eriksson, K. L. (1997) *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 57, 45-125.

- Kumahara, M.; Glenn, J.K.; Morgan, M. A.; Gold, M. H. (1984) *FEBS Lett.* 169, 247-250.
- Kunz, A. (1997) *Tecnia* 2, 137-141.
- Lawrence, L. S. (1970) *Anal. Chem.* 42, 779-781.
- Leanderson, P.; Tagesson, C. (1993) Em *DNA and Free Radicals*. Halliwell, B., Aruoma, O.I. (Eds), Ellis Horwood, Chichester, UK, p. 293-314.
- Leonowicz, A.; Szklarz, G.; Wojtas-Wasilewska, M. (1985) *Phytochemistry* 24, 393-396.
- Leonowicz, A.; Matuszewska, A.; Luterek, J.; Ziegenhagen, D.; Wojtas-Wasilewska, M.; Cho, N. S.; Hofrichter, M.; Rogalski, J. (1999) *Fungal Gen. Biol.* 27, 175-185.
- Linko, S. (1992) *Biotechnol. Adv.* 10, 191-236.
- Lundborg, A. (1988) *Mat. Org.* 23, 259-269.
- Machuca, A.; Durán, N. (1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 43, 37-44.
- Machuca A.; Milagres A. M. F. (1998) *Proc. 7th Inter. Conf. Biotechnology Pulp Paper Ind.* 7B, 245-248.
- Machuca, A.; Aoyama, H.; Durán, N. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 20-26.
- Manzanares, P.; Fajardo S.; Martín, C. (1995) *J. Biotechnol.* 43, 125-132.
- Mehna, A.; Bajpai, P.; Bajpai, P. K. (1995) *Enzyme Microbiol. Technol.* 17, 18-22.
- Mehta, V.; Gupta, J. K. (1991) *Research Ind.* 36, 161-167.
- Mentasti, E.; Pelizzetti, E.; Baiocchi, C. (1977) *J. C. S. Dalton* 24, 132-135.
- Milagres, A. M. F.; Machuca, A. (1998) *XXVII^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq* Abstr. G-37, 70.
- Miller, A. R. (1986) *Res. Commun.* 141, 259-269.
- Minotti, G.; Aust, S. D. (1987) *Chem. Phys. L.* 44, 191-208.
- Moody, M. D.; Dailey, H. A. (1983) *Anal. Biochem.* 134, 235-236.

- Nealson, K. (1983) Em *Biomineralization and biological metal accumulation*. Westbroek, P. e Jong, E. W. (Eds.) Reidel, Dordrecht, p. 459-479.
- Neilands, J. B. (1981) *Annu. Rev. Biochem.* 50, 715-731.
- Neilands, J. B. (1984) *Struct. Bonding* 58, 1-24.
- Neilands, J.B. (1993) *Arch Biochem. Biophys.* 302, 1-3.
- Neilands, J. B. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 26723-26726.
- Nogueira, R. F. P.; Pilli, R. A.; Durán, N. (1992) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 33, 169-176.
- Odier E.; Mozuch, M. D.; Kalyanaraman, B.; Kirk, T.K. (1988) *Biochimie* 70, 847-852.
- Onysko, K. A. (1993) *Biotechnol. Adv.* 11, 179-198.
- Orth, A. B.; Royse, D. J.; Tien, M. (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4017-4023.
- Page, W. J.; Huyer M. (1984) *J. Bacteriol.* 158, 496-502.
- Page, W. J.; Tigerstrom M. von. (1988) *J. Gen. Microbiol.* 134, 453-460.
- Page, W. J.; Collinson, K. S.; Demange, P.; Dell, A.; Dell, A.; Abdallah, M. A. (1991) *Biol. Met* 4, 217-222.
- Page, W. J. (1993) Em *Iron Chelation in Plants and Soil Microorganism*. Barton, L. L. e Hemming, B. C. (Eds) New York: Academic Press, 75-110.
- Parra C.; Santiago M. F.; Rodriguez, J.; Durán, N. (1998a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 719-722.
- Parra C.; Rodriguez J.; Baeza J.; Freer J.; Durán N. (1998b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 399-402.
- Parra C.; Oses J. R.; Urtubia I.; Baeza J.; Freer J.; Rodríguez J. (1998c) *Proc. 7th Inter. Conf. Biotechnology pulp paper Ind.* 7A, 161-164.
- Paszczynski, A.; Huynh, V. B.; Crawford, R. (1985) *FEMS Microbiol. Lett.* 29, 37-41.

- Paszczyński, A.; Crawford, R. L.; Blanchete, R. A. (1988) *Appl Environ. Microbiol.* 54, 62-68.
- Paszczyński, A.; Crawford, R. L.; Funk D.; Goodell, B. (1999) *Appl Environ. Microbiol.* 65, 674-679.
- Petillo, V. L. S.; Philippi, J. A. (1998) *Anales XXVI Congresso Int. Americano Ingeniería Sanitaria ambiental Lima, Peru* p. 54.
- Podgornik, H.; Grgic, I.; Perdih, A. (1999) *Chemosphere* 38, 1353-1359.
- Powell, P. E. (1982) *J. Plant Nutrition* 5, 653-673.
- Pueyo, C.; Ariza, R. R. (1993) Em *DNA and Free Radicals*. Halliwell, B. e Aruoma, O. I. (Eds) Ellis Horwood, Chichester, UK, p. 275-291.
- Raymond, K.N.; Müller, G. ; Matzanke, B. F. (1984) *Top. Curr. Chem.* 123, 49-102.
- Renganathan, V.; Miki, K.; Gold, M. H. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 241, 304-314.
- Reitberger, T.; Gierer, J. (1988) *Holzforschung*. 42, 351-356.
- Rodríguez, J.; Durán, N. (1991) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 30, 185-191.
- Rodríguez, J.; Ferraz, A.; Nogueira, R. F.; Ferrer, I.; Esposito, E.; Durán, N. (1997a) *Appl Biochem. Biotechnol.* 62, 233-242.
- Rodríguez, J.; Oses, R.; Parra C.; Freer, J.; Baeza, J. (1997b) *Proc. 5th Braz. Symp. Chem. Lignin. and other Wood Comp.* Curitiba, PR., Brasil 6, 601-604.
- Root, R. K., Metcalf, J., Oshino, N., Chance, B. (1975) *J. Clin. Invest.* 55, 945-955.
- Santiago, M. F., Peralta-Zamora, P., Durán, N. (1996) *Proc. 1^o Reunião de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente* (E. Esposito e S. G. de Moraes, Eds.) Campinas, SP, p.174-180.
- Santiago, M. F., Peralta-Zamora, P., Durán, N. (1997) *Proc. 5th Braz. Symp. Chem. Symp. Chem. Lignin. and other Wood Comp.* Curitiba, PR, Brasil 6, 567-575.

- Sarkanen, S.; Razal, R. A.; Piccariello, T.; Yamamoto, E.; Lewis, N.G. (1991). *J. Biol. Chem.* 266, 3636-3643.
- Schmidt, C.J.; Whitten, B.K.; Nicholson, D.D. (1981) *Am. Wood Preserver's Assoc.* 77, 157-164.
- Schwyn B.; Neilands J. B. (1987) *Anal. Biochem.* 160, 47-56.
- Sedlak, D. L.; Hoigné, J. (1993) *Atmos. Env.*, 27A, 2173-2185.
- Shen, X.; Tian, J.; Li, J.; Li, X. ; Chen, Y. (1992) *Free Rad. Biol. Med.* 13, 585-592.
- Shimada, M.; Ma, D. B.; Akamatsu, Y. (1994) *FEMS Microbiol. Rev.* 131,285.
- Shimada, M.; Akamatsu, Y.; Tokimatsu, T.; Mii, K.; Hattori, T. (1997) *J. Biotechnol.* 53, 103-113.
- Sjoestrom, E.(1993) *Em Wood chemistry: Fundamentals and Application* (2ª edição) New York, N.Y. p 293.
- Shoemaker, H. E.; Harvey, P. J.; Bowen, R. M.; Palmer, J. M. (1985) *FEBS Lett* 183, 7-12.
- Soares, C. H. L.; Durán, N. (1998) *Environ. Technol.* 19, 883-891.
- Solinas, V.; Deiana, S.; Gessa, C.; Pistidda, C.; Rausa, R. (1996) *Soil Biol. Biochem.* 28, 649-654.
- Sorensen, J. (1982) *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 319-324.
- Stanier, R. Y. (1986) *The microbial word* p. 405.
- Stookey, L. L. (1970) *Anal. Chem.* 42, 779-782.
- Sulzberger, B.; Laubsher, H. (1995) *Mar. Chem.* 50, 103-115.
- Sutton, H. C.; Winterbourn, C. C. (1984) *Em Oxygen Radical in Chemistry and Biology*. Bors, W.; Saran, M. (Eds.) Walter de Gruyter, Berlim, p. 177-183.
- Szklarz, G.D.; Antibus, R. K.; Sinsabaugh, R.L.; Linkins, A.E (1989) *Mycol.* 81, 234-240.
- Tanaka, H.; Fuse, G.; Enoki, A. (1985) *Mokuzai Gakkaishi* 31, 935-945.
- Tanaka, H.; Enoki, A.; Fuse, G. (1986) *Mokuzai Gakkaishi* 32, 125-135.

- Tanaka, H.; Fuse, G.; Enoki, A. (1992) *Mater. Org.* 27, 157-170.
- Tanaka, H.; Hirano, T.; Enoki, A. (1993) *Mokuzai Gakkaishi* 39, 493-499.
- Tanaka, H.; Hirano, T.; Enoki, A. (1996a) *Abstr. 46th Annu. Meet Japan Wood Research Society*, p. 369.
- Tanaka, H.; Itakura, S.; Hirano, T.; Enoki, A. (1996b) *Holzforschung* 50, 541-548.
- Tanaka, H.; Itakura, S.; Enoki, A. (1999) *Holzforschung* 53, 21-28.
- Tepfer, M.; Taylor, I. E. P. (1981) *Science* 213, 761-763.
- Thompson, N.S.; Corbett, H. M. (1985) *Tappi J.* 68, 68-71.
- Thurton, C. F. (1994) *Microbiol. (UK)* 140, 19-26.
- Tien, M.; Kirk, T. K. (1983) *Science* 221, 661-663.
- Tien, M.; Kirk, T. K. (1984) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 81, 2280-2284.
- Walker, C. C.; Dinus, R. J.; McDonough, T. J.; Eriksson, K. E. L. (1999) *Holzforschung* 53, 181-187.
- Wang, S.H.; Ferguson, J.F.; McCarthy, J.L. (1992) *Holzforshung.* 46, 219-223.
- Winkelmann, G. (1974) *Arch Mikrobiol.* 98, 39-50.
- Winkelmann, G. (1992) *Mycol. Res.* 96, 529-534.
- Winkelmann, G.; Winge, D. R. (1994) *Em Metal Ions in Fungi*. Marcel Dekker, NY, p.507
- Wood, P. M. (1994) *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 313-320.
- Wu, Z.; Sumimoto, M.; Tanaka, H. (1995) *J. Wood Chem. Tech.* 15, 27-42.
- Xu, J.; Jordan, R. B. (1988) *Inorg. Chem.* 27, 4563-4566.
- Zepp, R.G.; Faust, B. C.; Hoigne, J. (1992) *Environ. Sci. Technol.* 26, 313-319.