



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



JOÃO RONALDO TAVARES DE VASCONCELLOS NETO

DIVERSIDADE E SELEÇÃO DE FUNGOS BASIDIOMICETOS
AFILOFORÓIDES PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS
LIGNOCELULOLÍTICAS EM ÁREA DE MATA ATLÂNTICA
DO SUL DA BAHIA

Feira de Santana, BA
2010

JOÃO RONALDO TAVARES DE VASCONCELLOS NETO

**DIVERSIDADE E SELEÇÃO DE FUNGOS BASIDIOMICETOS
AFILOFORÓIDES PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS
LIGNOCELULOLÍTICAS EM ÁREA DE MATA ATLÂNTICA
DO SUL DA BAHIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto (UEFS)

Co-orientador: Prof. Dr. Hélio Mitoshi Kamida (UEFS)

Feira de Santana, BA
2010

Aos meus pais pela incansável assistência, dedico.

AGRADECIMENTOS

A MEU AMOR NATASH CARMEN JATOBÁ MACHADO POR ACREDITAR NO SONHO

A TIA WANDRA E O TIO JÃO PELA AJUDA NAS HORAS DIFÍCEIS

A MINHA IRMÃ PELO CARINHO E CONFIANÇA

A SUZANA PELOS PUXÕES DE ORELHA QUANDO NECESSÁRIO

A CLARISSA PELOS VALIOSOS CONSELHOS

A GISELE PELO BOM HUMOR CONTAGIOSO

A CARLA PELAS VEZES QUE ME LEMBROU

A TAIANA E JACKELINE LAYS PELO COMPANHERISMO NO LABORATÓRIO NESTA LUTA

A Prof. Dr. HÉLIO MITOSHI KAMIDA E Prof. Dr. ARISTÓTELES GÓES NETO PELA ORIENTAÇÃO E COMPROMISSO.

A Prof. Dr^a. MARIA GABRIELA KOBLITZ PELA ORIENTAÇÃO

A FAPESB PELA CONCESSÃO DA BOLSA

A MICHELIN PELO APOIO FINANCEIRO E LOGÍSTICO

“A data mais feliz da minha vida seria aquela em que dessem a notícia de que os povos civilizados festejam sua confraternização queimando seus arsenais”

Manuel Luis Osório (General Osório)

RESUMO

A capacidade dos fungos basidiomicetos de degradar compostos lignocelulósicos, como a madeira, torna este grupo alvo de pesquisas biotecnológicas. As principais enzimas relacionadas à degradação de compostos lignocelulósicos são as lacases, lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e celulasas. Os espécimes coletados em região de Mata Atlântica do sul da Bahia na região do município de Ituberá na área de preservação das Plantações Michelin do Brasil, demonstraram ser potenciais produtores dessas enzimas quando submetidos aos testes de seleção. O fungo *Fomitella supina* apresentou o melhor potencial para descoloração do Remazol Brillante Blue R (RBBR) e degradação da Carboximetilcelulose (CMC) na técnica de "cup plate". Os resultados do estudo de parâmetros de otimização demonstraram que dentre as variáveis testadas o pH e a fonte de nitrogênio foram determinantes para a atividade de lacase. Nas condições de cultivo com pH 4,0, temperatura 35°C, tendo como fonte de nitrogênio extrato de levedura e fonte de carbono glicerol o fungo selecionado obteve a maior atividade de lacase com 250 U.L⁻¹.

Palavras-chave: lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase, fungos Aphyllophorales.

ABSTRACT

The capacity of basidiomycetes to degrade lignocellulosic compounds, such as wood, makes this target group of biotechnology research. The main enzymes related to lignocellulosic degradation compounds are laccase, lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) and cellulases. The specimens collected in the Atlantic Forest of southern Bahia in the municipality of Ituberá in the preservation area of the Michelin Plantation of Brazil shown to be potential producers of these enzymes when subjected to screening tests. The fungus *Fomitella supine* showed the best potential for decolorization of Remazol Brilliant Blue R (RBBR) and degradation of carboxymethylcellulose (CMC) in the technique of "cup plate". The results of the optimization parameters showed that among the tested variables pH and nitrogen source were instrumental in the laccase activity. In culture conditions with pH 4.0, temperature 35 ° C, with the nitrogen source yeast extract and glycerol carbon source selected fungus obtained the highest laccase activity of 250 UL-1.

Keywords: lacase, manganese peroxidase, lignin peroxidase, fungus Aphylophorales.

LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
Figura 01	Formula estrutural esquemática da lignina (adaptado de Alder, 1977)	22
Figura 02	Estrutura da celulose (Kogel-Knabner, 2002).	23
Figura 03	Estrutura tridimensional da Lacase do fungo <i>Trametes versicolor</i> (wong, 2009).	27
Figura 04	Estrutura tridimensional da lignina peroxidase do fungo <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (Wong, 2009).	28
Figura 05	Estrutura tridimensional da Manganês peroxidase do fungo <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (Wong, 2009).	29
Figura 06	Esquema em escala da área de coleta da Mata de Pacangê (Fornecido pela administração da Reserva Michelin do Brasil).	31
Figura 07	Esquema em escala da área de coleta da Mata a Vila05 (Fornecido pela administração da Reserva Michelin do Brasil).	32
Figura 08	Esquema em escala da área de coleta da Mata da Cachoeira da Pancada Grande (Fornecido pela administração da Reserva Michelin do Brasil).	33
Figura 09	Gráfico dos substratos relacionados	41
Figura 10	Fungos coletados e identificados: A. <i>Ganoderma australe</i> (262); B. <i>Ganoderma australe</i> (283); C. <i>Ganoderma australe</i> (299); D. <i>Phylloporia fruticum</i> (267); E. <i>Trametes</i> sp. (295); F. <i>Fomitopsis rosea</i> (313); G. <i>Fomitopsis rosea</i> (318); H. <i>Fomitopsis rosea</i> (322).	43
Figura 11	Fungos coletados e identificados: I. <i>Ganoderma australe</i> (325); J. <i>Microporus ostreatus</i> (327); K. <i>Phellinus gilvus</i> (349); L. <i>Rigidoporus</i> sp. (351); M. <i>Hexagonia hydnooides</i>; (365); N. <i>Microporus</i> sp. (368); O. <i>Laetiporus sulphureus</i> (369); P. <i>Microporus ostreatus</i> (331).	44
Figura 12	Fungos coletados e identificados: Q. <i>Ganoderma orbiformum</i> (373); R. <i>Ganoderma multiplicatum</i> (374); S. <i>Ganoderma stipitatum</i> (375); T. <i>Coriolopsis caperata</i> (383); U. Não identificado; (391); V. Não identificado (397); W. <i>Ganoderma multiplicatum</i> (398); X. <i>Lentinus crinitus</i> (401).	45

Figura 13	Fungos coletados e identificados: Y. <i>Auricularia polytricha</i> (405); Z. Não identificado (408); A1. <i>Lentinus crinitus</i> (417); B1. <i>Fomitella supina</i> (420).	46
Figura 14	Seleção em RBBR do <i>Fomitella supina</i> . a) fungo com 2 dias de crescimento; b) fungo com 5 dias de crescimento.	47
Figura 15	Gráfico que representa a descoloração e o crescimento, respectivamente, pelo tempo de incubação	48
Figura 16	Gráfico dos halos de degradação do CMC.	50
Figura 17	Gráfico de tendência para otimização da atividade de lacase.	54
Figura 18	Diagrama de Pareto para atividade de lacase	54
Figura A19	Proteína total pelo método de Bradford	71

LISTA DE TABELAS

Número	Título	Página
Tabela 01	O conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina em resíduos agrícolas comuns (SUN; CHENG, 2002)	24
Tabela 02	Características das enzimas ligninolíticas (WESENBERG et al. 2003).	25
Tabela 03	Dados do planejamento experimental	37
Tabela 04	Dados das variáveis do planejamento experimental	38
Tabela 05	Dados de coleta e identificação dos espécimes isolados.	42
Tabela 06	Medida dos halos de degradação.	50
Tabela 07	Resultado da ANAVA (SPSS v.90) para seleção de fungos ligninolíticos.	51
Tabela 08	Resultado da ANAVA com teste de Tukey (SPSS v.90) para seleção de fungos ligninolíticos.	51
Tabela 09	Resultado da atividade específica das enzimas lacase, LiP, MnP	52
Tabela 09 (continuação)	Resultado da atividade específica das enzimas lacase, LiP, MnP	53
Tabela 10	Tabela ANAVA para atividade de lacase.	53
Tabela 11	Tabela ANAVA para atividade de LiP	56
Tabela 12	Tabela ANAVA para atividade de MnP	56
Tabela A13	Dados referentes aos cálculos da atividade específica das enzimas de interesse.	72

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	REGIÃO DA MATA ATLÂNTICA DO NORDESTE	15
2.2	DIVERSIDADE E IMPORTANCIA DOS FUNGOS	15
2.3	APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA	18
2.4	MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	20
2.4.1	Lignina	20
2.4.2	Celulose	22
2.4.3	Hemicelulose	23
2.5	ENZIMAS	24
2.5.1	Lacase	26
2.5.2	Lignina peroxidase	27
2.5.3	Manganês peroxidase	28
2.5.4	Celulase	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	ÁREA DE COLETA	31
3.2	COLETA E ISOLAMENTO DOS ESPÉCIMES	33
3.3	PRESERVAÇÃO	34
3.4	IDENTIFICAÇÃO DOS ESPÉCIMES	35
3.5	SELEÇÃO DE FUNGOS QUANTO A CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOCELULÓSICAS	35
3.5.1	Enzimas Lignolíticas	35
3.5.2	Enzimas Celulolíticas	36
3.5.3	Seleção dos isolados quanto ao potencial enzimático	36
3.6	ATIVIDADE ENZIMÁTICA: LACASE, MANGANÊS PEROXIDASE, LIGNINA PEROXIDASE E CELULASE.	37

3.6.1	Estudo de parâmetro para otimização enzimática	37
3.6.2	Determinação da atividade das enzimas de interesse	38
3.6.3	Atividade de Lacase	39
3.6.4	Atividade de Lignina peroxidase	39
3.6.5	Atividade de Manganês peroxidase	39
3.6.6	Cálculo da atividade específica	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	41
4.2	DESCRIÇÃO DO FUNGO SELECIONADO	46
4.3	SELEÇÃO DOS FUNGOS COLETADOS E ISOLADOS QUANTO AO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS DE INTERESSE	47
4.3.1	Ligninases	47
4.3.2	Celulase	50
4.3.3	Análise de Variância	51
4.4	ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETRO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS	52
4.4.1	Lacase	53
4.4.2	Lignina peroxidase	55
4.4.3	Manganês peroxidase	56
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
6	REFERÊNCIAS	59
7	APÊNDICES	71

1 INTRODUÇÃO

Os fungos juntamente com os insetos são um dos grupos mais diversos da Terra. São conhecidos apenas cerca de 105.000 espécies de fungos, aproximadamente 7% do estimado, 1,5 milhão de espécies (ALEXOPOULOS, 1996). Devido a sua diversidade e distribuição, ocupam virtualmente todos os biomas terrestres com exceção do círculo ártico, desempenhando uma grande importância ecológica. Estes organismos são responsáveis pela ciclagem de diversas substâncias no meio, principalmente madeira e seus compostos. Dentre os componentes da madeira, a lignina é o que apresenta maior resistência à biodegradação. Neste contexto, a biodegradação de lignina é um dos mais importantes fatores determinantes da degradação da madeira e conseqüentemente do ciclo de carbono na biosfera (CAMARGO, 2003). Esta capacidade de degradar os componentes da madeira foi quase que exclusivamente associada à produção de enzimas ligninocelulolíticas extracelulares (BLANCHETTE *et al.*, 1997; KULLMANN; MATSUMURA, 1997; REDDY *et al.*, 1998; MASON *et al.*, 2001; GELPKE *et al.*, 2002), sendo que as enzimas melhor caracterizadas são: as lacases (GUILLÉN *et al.*, 2000), as lignina peroxidases (LiPs), as manganês peroxidases (MnP) (CONESA *et al.*, 2002; MARTÍNEZ, 2002) e as celulases. Muitos destes fungos são basidiomicetos, um grupo fúngico de difícil delimitação. Tradicionalmente os basidiomicetos possuem uma importante ordem, os Aphylophorales com cerca de 1200 espécies, mesmo este sendo um grupo artificial reúne uma grande diversidade de famílias, gêneros e espécies com grande importância ecológica e biotecnológica. (LANDECKER, 1990; GOÉS-NETO, 1994; ALEXOPOULOS, 1996),

Sendo o conhecimento da diversidade de basidiomicetos Aphylophorales do Nordeste pequena, com poucas espécies citadas em publicações quando comparada ao total de espécimes registrados no mundo este trabalho teve como objetivo geral realizar o inventário de fungos afiloforóides de áreas de Floresta Ombrófila do sul da Bahia e fazer a prospecção de enzimas lignocelulósicas produzidas pelos mesmos. Os objetivos específicos foram (i) Coletar e identificar os espécimes de fungos basidiomicetos afiloforóides; (ii) Produzir culturas puras dos basidiomicetos afiloforóides coletados; (iii) depositar os exemplares na coleção de cultura da Universidade Estadual de Feira de Santana (CCMB) e no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS); (iv) Selecionar os fungos

coletados quanto ao potencial de produção de enzimas lignocelulolíticas utilizando Remazol Brilliant Blue R (RBBR); (v) Estudar alguns parâmetros de cultivo para otimizar a produção das enzimas lignocelulolíticas (lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase e celulase) pelos fungos isolados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 REGIÃO DE MATA ATLÂNTICA DO NORDESTE

A Mata Atlântica é um bioma arbóreo e litorâneo, e abrange os estados da costa brasileira desde o Rio Grande do Sul ao Rio Grande do Norte, com incursões no interior das regiões Sul, Sudeste e Nordeste além de Goiás e Mato Grosso do Sul. Inicialmente, abrangia 17 estados e cobria uma área de 1.130.000 Km² mas, atualmente, esta área está reduzida a aproximadamente 6% da cobertura original. Na área abrangida por esse bioma, reside 70% da população brasileira e encontram-se as maiores cidades e os mais importantes pólos industriais do país. A ocupação e uso do solo, feita de maneira desordenada, resultaram na sua quase completa destruição. No Nordeste, onde a exploração da floresta começou desde a época colonial com a extração do pau-brasil e permanece até hoje com o cultivo da cana-de-açúcar e do cacau, esse percentual varia dentre 1% e 2% em alguns estados (Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal 1998; BARBOSA et al., 2002; FERRAZ, 2002). Por esses motivos, a Mata Atlântica é considerada o bioma mais ameaçado do país e o 5º mais ameaçado do mundo, entre os 25 *hotspots* (áreas críticas para a conservação da biodiversidade) identificados no mundo (Fundação Biodiversitas, 2002).

2.2 DIVERSIDADE E IMPORTÂNCIA DOS FUNGOS

Em 1983 cerca de 64000 espécies de fungos eram conhecidas. Doze anos depois, a estimativa era de 72000, sugerindo que cerca de 700 novas espécies são descobertas a cada ano (CARLILE, 2001). Hoje se sabe que os fungos são um dos grupos mais diversos do planeta com cerca de 105.000 espécies descritas, aproximadamente 7% de um total estimado em 1,5 milhões de espécies (HAWKSWORTH, 2004). O número até agora descoberto é provavelmente apenas uma pequena proporção dos que existem. Várias abordagens têm sido utilizadas para tentar estimar o número de espécies de fungos em todo o mundo. Por exemplo, em regiões largamente estudadas, espécies de fungos podem ser seis vezes mais numerosos que os de plantas com flores. Nesta base, uma vez que cerca de 27000 plantas com flores são conhecidas, podem existir cerca de 1,6 milhão de espécies fúngicas (CARLILE, 2001). Esta absurda discrepância entre o numero de espécies

descritas e a número estimado de espécies para o grupo é resultado de uma inadequada amostragem feita em muitas partes do mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (ALEXOPOULOS, 1996). Notoriamente os fungos fazem parte de um grupo de organismos heterotróficos, desprovidos de clorofila, mas são historicamente comparados com as plantas (ALEXOPOULOS, 1996). Poucos países do mundo possuem uma diversidade biológica exuberante concentrada em seu território, e os que a possuem não têm uma política para protegê-la, seja por falta de recursos ou por locação inadequada dos mesmos. O Brasil é um destes países *megadiversos* e, a despeito de sua grande importância ecológica e econômica, pouco se conhece sobre a sua biodiversidade (GOÉS-NETO, 1994).

Ecologicamente os fungos são responsáveis pela decomposição em ecossistemas florestais (ALEXOPOULOS, 1996). Na indústria são usados na obtenção de muitos alimentos, incluindo pão, vinho, cerveja e queijo (LANDECKER, 1990) bem como serem consumidos frescos na forma de cogumelos. Hoje sabemos que os organismos pertencentes a este grupo possuem hábitos sapróbios em sua grande maioria, obtendo energia necessária para viver a partir da decomposição de matéria orgânica (OLIVEIRA, 2003).

Muitos destes fungos são basidiomicetos que participam diretamente da degradação dos principais compostos vegetais como celulose e a lignina (GOÉS-NETO, 1994). Apesar da importância histórica deste grupo, sua delimitação precisa é difícil. O conhecimento da diversidade de basidiomicetos em regiões tropicais e, especialmente no Brasil, é ainda escasso, sendo geralmente restrito às áreas de estudo dos especialistas (BICUDO; MENEZES, 1996). Esta situação não é diferente do que se conhece sobre a região semi-árida brasileira, com o agravante de que, em geral, historicamente, a região litorânea, domínio de Florestas Ombrófilas Úmidas, tem sido muito mais inventariada quanto à diversidade de basidiomicetos do que a região semi-árida do interior do Nordeste (GIBERTONI et al., 2004)

A delimitação do grupo “Fungos” tem sido uma tarefa árdua e conta com diversas abordagens. Como a grande linha filogenética dos fungos entrou em foco, existem diversas tentativas para resumir o estado do conhecimento e reestruturar as classificações de nível superior (HIBBETT, 2007). Duas importantes obras que influenciaram a taxonomia de fungos no século 21 são *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi* (KIRK et al. 2001), que contém um abrangente classificação

do nível de Reino até ao nível de gênero, e O *Mycota* VII (MCLAUGHLIN et al. 2001a, 2001b), uma volume editado com capítulos sobre todos os principais grupos de fungos. Essas publicações representam o maior avanço em direção a um classificação filogenética dos fungos, mas necessitam de atualização. Nos últimos cinco anos, somente na *Mycology and Mycological Research*, foram publicados mais de 360 artigos com a palavra-chave *mycology phylogen*, e aproximadamente 80% das mais de 100.000 seqüências fúngicas de genes rRNA foram depositadas recentemente no GenBank. Recentes publicações que tratam da pesquisa de todo o reino dos fungos com base molecular e filogenética incluem o trabalho de Taylor et al. (2004) em *Assembling the Tree of Life* (CRACRAFT; DONOGHUE, 2004), *New Higher Level Classification of Eukaryotes* (ADL et al. 2005), e a primeira grande análise, em colaboração, da Montagem do Projeto Árvore da Vida Fúngica (*Assembling the Fungal Tree of Life project-AFTOL*) (LUTZONI et al., 2004). Estudos taxonômicos sobre os grupos individuais de fungos são muito numerosos para listar (HIBBETT, 2007).

Estudos mais específicos têm considerado outros aspectos, incluindo Sistemática de Aphylophorales e ecologia, sendo a maioria relativa a diversidade de estágios sucessórios de florestas, a qualidade do substrato, tipos de vegetação, perturbações nas florestas, a especificidade de hospedeiro e o gradiente de precipitação (BOIDIN et al., 1998; HALLENBERG; PARMASTO, 1998; GÓES-NETO et al., 2001, 2002, LINDBLAD, 2001b, HONG; JUNG, 2004; BODENSTEINER et al., 2004; KRÜGER et al. 2006, IWABUCHI et al., 1994; SIPPOLA; RENVAL, 1999; NORDEN;PALTTO, 2001; ROLSTAD et al., 2004, HATTORI, 2005, BADER et al. 1995; LODGE;CANTRELL, 1995; LINDBLAND, 1998, 2001a, LINDBLAD, 2000; GILBERT et al., 2002).

Diante disso sabemos que os fungos pertencentes ao Filo Basidiomycota caracterizam-se por produzirem basidiosporos, em estruturas especializadas, denominadas basídios. Com base nos caracteres morfológicos e na seqüência de DNAr, os Basidiomycetes distribuem-se em três classes: Hymenomycetes (onde estão inseridas as ordens Ágaricales e Aphylophorales), Ustilaginomycetes e Urediniomycetes (ALEXOPOULOS et al. 1996). Estima-se que existam aproximadamente 30.000 espécies já descritas de basidiomicetos, o que corresponderia a algo em torno de 37% dos fungos verdadeiros (KIRK et al., 2001). De uma maneira geral, os basidiomicetos são fungos que produzem, em alguma

etapa de seu ciclo de vida, microestruturas reprodutivas especializadas, os basídios, que são células que funcionam como esporângios de reprodução sexuada, produzindo meiosporos, denominados de basidiósporos devido a sua origem.

A grande maioria das espécies de Basidiomycota e aproximadamente 98% das espécies de Ágaricomycotina conhecidas são classificados como Ágaricomycetes. Os Ágaricomycetes compreendem todos os Basidiomycota que formam basidiomas, com himênio definido (HIBBETT et al., 2007). É exatamente neste grupo que estão os basidiomicetos mais popularmente conhecidos como cogumelos e orelhas-de-pau.

Os Aphyllophorales consistem num importante grupo tradicional de basidiomicetos com aproximadamente 1200 espécies descritas dependendo do que é incluído nesta ordem (ALEXOPOULOS, 1996). São principalmente saprobíotico em madeira morta (DONK, 1964; TALBOT, 1973; KENDRICK, 1992; ALEXOPOULOS et al., 1996) e são considerados os principais decompositores de madeira, especialmente as espécies de *Polyporaceae*, *Corticaceae* e *Hymenochaetaceae*. Dessa forma eles desempenham um papel crucial na ciclagem de nutrientes, liberando carbono e outros elementos, inicialmente retirados da atmosfera por organismos autotróficos em ecossistemas arbóreos e arbustivos (GILBERTSON, 1980). Muitas espécies são parasitas perigosos, especialmente em diferentes espécies de plantas (LUTTRELL, 1974; STALPERS; LOERAKKER, 1982), mas muitos outros podem ser utilizados como indicadores de perturbação ecológica em florestas nativas (NORSTEDT et al. 2001; SVERDRUP-THYGESON; LINDENMAYER, 2003) pois eles são encontrados mais frequentemente em áreas menos perturbadas e preferem colonizar nichos maiores e mais decompostos, que se tornam menos frequentes com a extração seletiva (SAMUELSSON et al., 1994; BADER et al. 1995, CLAUSEN; HEILMANN CHRISTENSEN, 2004; LINDHE et al., 2004; PENTTILA et al., 2004).

2.3 APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

Os fungos causam imensos prejuízos econômicos. Suas atividades prejudiciais como saprófitas incluem os danos à madeira, combustível, alimentos e produtos manufaturados. Como parasitas causam perdas de safras, doenças em seres humanos e animais domésticos. Porém as atividades benéficas de leveduras e

outros fungos, no entanto, também são de grande importância econômica. Eles têm sido explorados tanto como alimentos quanto no seu processamento, e na fabricação de cerveja. No século atual, a indústria de fermentação tem apresentado elevado grau de desenvolvimento, e vem produzindo uma gama crescente de produtos de valor, incluindo antibióticos, medicamentos de grande valor farmacêutico, fungicidas agrícolas e reguladores de crescimento vegetal, vitaminas e enzimas. Recentemente, com o advento da manipulação genética, os fungos estão sendo usados para produzir hormônios e proteínas, até agora disponíveis somente a partir de mamíferos (CARLILE, 2001).

"Biotecnologia" é um termo que se tornou popular na mesma época em que a manipulação genética recebeu grande publicidade. Anteriormente, a indústria da fermentação já havia alcançado considerável sofisticação técnica, e tinha direito a ser considerada como um ramo da biotecnologia. Isso levou a várias definições mais amplas de biotecnologia, por exemplo, de aplicação "dos princípios científicos" e de engenharia para o processamento de materiais por agentes biológicos para prover bens e serviços. Entre os agentes biológicos de extraordinária importância na biotecnologia estão os fungos. Em alguns casos, a utilização de fungos no fornecimento de produtos (por exemplo bebidas alcoólicas) é muito antiga, em outros (antibióticos, por exemplo) mais recentes (CARLILE, 2001).

Dentro desse contexto, entre os processos de degradação, cabem aos processos biológicos um lugar de destaque, principalmente em função da relativa facilidade encontrada na implementação de sistemas que operem em grande escala e pela eficiência destes processos (KUNZ et al. 2002). Field et al. (1992) destacam que entre os microrganismos (fungos e bactérias) que podem ser utilizados para o desenvolvimento destas técnicas de biodegradação, os fungos apresentam importante capacidade em degradar as moléculas mais complexas através da produção de enzimas específicas. Fungos, do tipo podridão branca, os quais são conhecidos pela eficiente capacidade de degradação de materiais lignocelulóticos na natureza, principalmente a madeira, no qual o sistema de degradação da lignina, produzido por estes fungos, tem potencial de aplicação no biobranqueamento da polpa de papel (ONYSKO, 1993; REID; PAICE, 1994; MESSNER; STREBOTNIK, 1994) e na biodegradação de poluentes (FIELD, 1992; BARR; AUST, 1994).

As enzimas de fungos têm se mostrado úteis na degradação de uma variedade de poluentes ambientais persistentes. Muitas dessas enzimas são

extracelulares e, na natureza, provavelmente estão envolvidas na degradação da madeira (MAYER; STAPLES, 2002). Tais fungos (podridão-branca) preferencialmente colonizam madeiras da subdivisão Angiospermas (folhosas, madeira dura) e degradam os três componentes principais, celulose, hemicelulose e lignina, deixando a região da madeira degradada com uma coloração clara. No entanto, existem variações dentre as espécies degradadoras de podridão branca (ou clara) que são providos de sistema enzimático que os tornam capazes de utilizar fontes complexas de carbono, sendo os mais eficientes na degradação da lignina, quebrando-a em moléculas menores até CO₂ (dióxido de carbono) e H₂O(água), deixando a celulose praticamente intacta (KIRK; FARREL, 1987; HATAKKA, 1994, TUOR, 1995; CAMARGO, 2003; LUNDELL et al., 2010)

A biorremediação de efluentes industriais também tem sido pesquisada utilizando fungos de podridão branca, verificando-se a capacidade destes na descoloração e descontaminação de efluentes. As enzimas encontradas, nestes casos, foram em grande parte representadas pela presença de Lacase, Manganês peroxidase (MnP) e Lignina peroxidase (LiP) confirmando, mais uma vez, o potencial dessas enzimas (MAYER; STAPLES, 2002).

2.4 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

2.4.1 Lignina

O termo lignina tem sua origem na palavra latina "*lignum*", que significa, madeira. Este termo foi introduzido por Anselme Payen em duas publicações em 1838 (PAYEN, 1838a; b) para designar o resíduo solúvel obtido no tratamento da madeira por ácido nítrico concentrado, que por um longo período teve sua constituição química na obscuridade. Peter Klason em 1917 propôs que a lignina poderia ser classificada como uma substância macromolecular constituída de unidades do álcool coniferílico, mantidas juntas através de ligações do tipo éter. Em 1940, estudos baseados em reações clássicas da química orgânica, levaram a concluir que, de uma forma geral, a lignina era constituída de unidades fenilpropanóides unidas por ligações éter e carbono. Em 1954, Lange propõe que as principais unidades aromáticas presentes na estrutura da lignina eram a p-hidroxifenila, guaiacila e seringila. A primeira fórmula química para o sistema macromolecular foi proposta por Freudenberg em 1968 e confirmada posteriormente

por outros pesquisadores (CAMARGO, 2003; SANTOS, 2001). A Lignina é encontrada em todas as plantas vasculares, o que representa uma importante fonte de carbono abundante na Terra, perdendo apenas para a celulose.

Sendo uma fonte de polímeros aromáticos renovável mais abundante na natureza, e sua decomposição é indispensável para a reciclagem do carbono. É quimicamente recalcitrante e a desagregação pela maioria dos organismos é heterogênea devido à estrutura complexa. Os fungos de podridão branca produzem uma matriz extracelular de enzimas oxidativas sinérgicas que degrada eficientemente a lignina (WONG, 2009). Ao longo dos anos, vários modelos hipotéticos da estrutura molecular da lignina foram propostos com base na teoria de acoplamento aleatório. A real estrutura de lignina é muito complexa, e modelos de lignina propostos existentes não implicam qualquer particular seqüência de unidades monoméricas, não refletem a real rede de monômeros na molécula de lignina e detalhes sobre como o processo de polimerização é controlada nas plantas não foi completamente estabelecido (CHEN; SARKANEN ; DAVIN; LEWIS, 2003).

A Lignina resiste ao ataque da maioria dos microrganismos, pois processos anaeróbios não tendem a atacar os anéis aromáticos, contudo, a degradação aeróbia da lignina é lenta. Na natureza, apenas fungos basidiomicetos de podridão branca são capazes de degradar a lignina de forma eficiente, onde solubilização e mineralização de ligninas naturais e sintéticas têm sido demonstradas (KIRK et al., 1976).

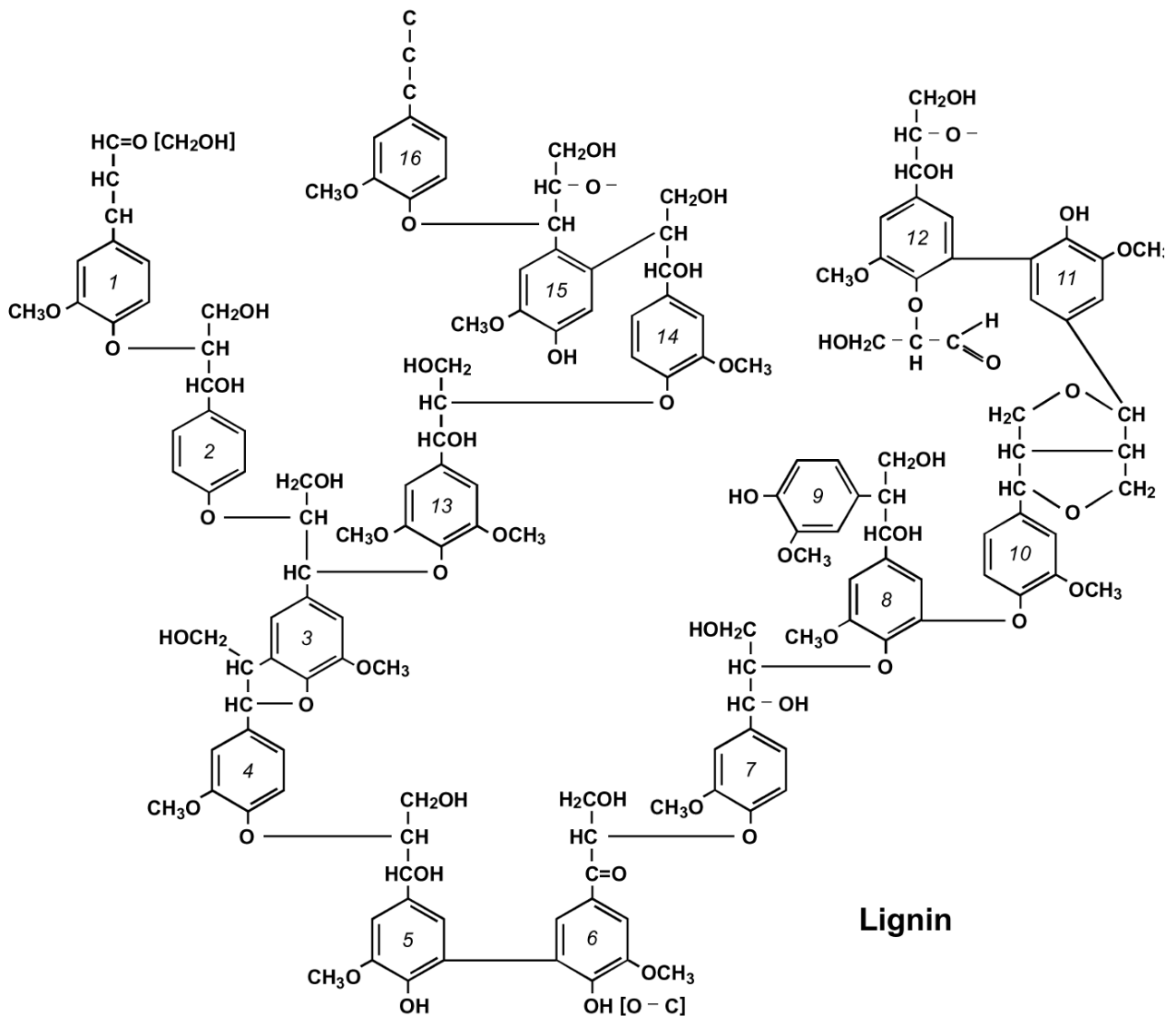


Figura 01: Formula estrutural esquemática da lignina.

Fonte: adaptado de Alder, 1977

2.4.2 Celulose

A celulose ($C_6H_{10}O_5$) $_n$ é um polímero de cadeia longa composto de um só monômero (glicose), classificado como polissacarídeo ou carboidrato. É um dos principais constituintes das paredes celulares das plantas (cerca de 33% do peso da planta), em combinação com a lignina, com hemicelulose e pectina, não é digerível pelo homem. Alguns animais, particularmente os ruminantes, podem digerir celulose com a ajuda de microrganismos simbióticos (NISHIYAMA, 2002).

A celulose é o mais abundante recurso natural renovável, sendo a produção de bioprodutos e bioenergia renováveis de menor custo com base materiais lignocelulósicos importante para o desenvolvimento sustentável dos seres humanos. A redução no custo de produção de celulase, a melhoria no desempenho

de celulase, e um acréscimo na produção de açúcares de celulose são vitais para reduzir os custos de processamento de bio-refinarias (ZHANG et al., 2006). A degradação microbiana da celulose é total e específica e tem estimulado o uso dos processos de fermentações celulolíticas pelo homem. Na natureza, esses processos representam a maior fonte de carbono para o solo (LYNCH et al. 1981). A Biodegradação de celulose por celulasas e celulosomas (as bactérias anaeróbias tendem a produzir complexos multi-enzimáticos chamados de celulosoma, os quais estão ligados à superfície celular e consistem de enzimas conhecidas como exoglucanases, endoglucanases, xilanases), produzidos por vários micro-organismos, representa o maior fluxo de carbono fixo para CO₂ atmosférico (WONG, 2009).

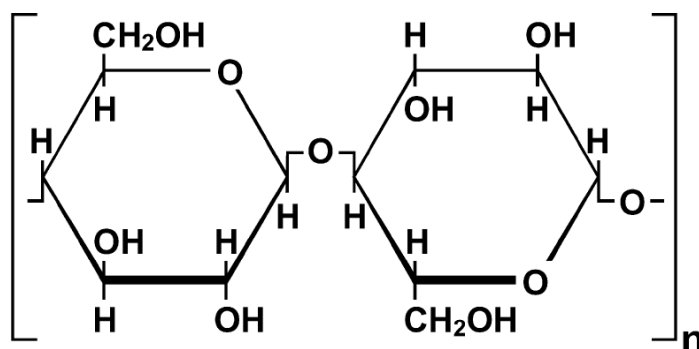


Figura 02: Estrutura da celulose.
Fonte: Kogel-Knabner, 2002.

2.4.3 Hemicelulose

Hemicelulose, outro componente importante dos insumos do solo da floresta a partir de madeira e folhas, é um polímero com freqüência de ramificação e composição heterogênea. Sua estrutura é formada principalmente por pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e oxi-hexoses (KOGEL-KNABNER, 2002). Estes tipos de hemiceluloses estão presentes nas paredes celulares de todas as plantas terrestres, com exceção de beta-(1-3,1-4)-glucanas, que são restritos a alguns grupos entre eles Poales (Ordem de plantas monocotiledôneas). A estrutura detalhada da hemicelulose e a sua abundância variam muito entre as diferentes espécies e tipos de células. O papel biológico mais importante das hemiceluloses é a sua contribuição para o reforço da parede celular por interação com a celulose e, em algumas paredes, com a lignina (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

Tabela 01: O conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina em resíduos agrícolas comuns.

Materiais lignocelulósicos	Celulose(%)	Hemicelulose(%)	Lignina(%)
Caules de madeira dura	40-45	24-40	18-25
Caule de madeira mole	45-50	25-35	25-35
Casca de nozes	25-30	25-30	30-40
Espigas de milho	45	35	15
Gramíneas	25-40	35-50	10-30
Papel	85-99	0	0-15
Palha de trigo	30	50	15
Semente de algodão	80-95	5-20	0
Jornal	40-55	25-40	18-30
Estrume de gado	1,6-4,7	1,4-3,3	2,7-5,7

2.5 ENZIMAS

As enzimas podem ser classificadas de acordo com vários critérios. O mais importante foi estabelecido pela União Internacional de Bioquímica (IUB), e estabelece 6 classes (FORGIARINI, 2006). (I) Oxidorredutases: são enzimas que catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja: reações de oxi-redução. São as desidrogenases, redutases e as oxidases; (II) transferases: enzimas que catalisam reações de transferência de grupamentos funcionais como grupos amina, fosfato, acil, carboxil, etc. Como exemplo tem-se as quinases e as transaminases; (III) hidrolases: catalisam reações de hidrólise de ligação covalente. Exemplo: as peptidases; (IV) liases: catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico. As desidratases e as descarboxilases são exemplos dessa classe; (V) Isomerases: Catalisam reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos. As epimerases são exemplos dessa classe; (VI) Ligases: Catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas já existentes, sempre às custas da energia (ATP). Como exemplo, tem-se as sintetases.

Peroxidases são enzimas que utilizam peróxido de hidrogênio para catalisar a oxidação de uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. Foram isoladas a partir de uma ampla variedade de organismos e a grande maioria contém protoporfirina IX (heme) como grupo prostético. Elas se subdividem em duas

superfamílias, sendo, a superfamília das peroxidases de mamíferos que inclui enzimas como a lactoperoxidase e mieloperoxidase e da superfamília de peroxidases de plantas (ENGLISH; TSAPRAILIS, 1995; WELINDER et al., 1992).

Os membros da superfamília das peroxidases de plantas foram classificados em três classes (WELINDER; GAJHEDE, 1993): Classe I: peroxidases intracelulares (*citocromo c*, peroxidase da levedura (CCP¹)), cloroplastos e peroxidases de ascorbato citosol e gene-repetido peroxidases bacterianas. Classe II: peroxidases fúngicas extracelulares, como a lignina (LiP) e manganês (MnP) peroxidase de *Phanerochaete chrysosporium* e outras peroxidases de basidiomiceto de podridão branca, envolvidos na degradação de lignina e Classe III: peroxidase extracelular de plantas. (CONESA et al., 2002).

Tabela 02: Características das enzimas ligninolíticas.

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

Fonte: WESENBERG et al. 2003

2.5.1 Lacase (EC. 1.10.3.2)

A Lacase é uma cuproproteína do pequeno grupo de enzimas chamadas cuproproteínas azuis, cuprooxidases azuis, oxidases azuis (THURSTON, 1994), pertencem à uma ampla e diversificada superfamília de proteínas de oxidases multicobre (LUNDELL, 2010), ou ainda enzimas fenoloxidases (*p*-difenoil: dioxigênio oxido-redutase) e fazem parte de um grupo de enzimas oxidases que complexam o cobre. São produzidas por plantas superiores e por fungos, sendo secretadas pela maioria dos basidiomicetos. As lacases fúngicas em geral possuem 3 átomos de cobre embora no caso do *Trametes versicolor* sejam encontrados 4 átomos de cobre, todos no estado de oxidação Cu^{2+} na enzima nativa. As lacases catalisam oxidações por extração de um elétron de substratos fenólicos, gerando radicais fenoxilos (HIGUCHI, 1990; DURÁN, 1997; MAYER, 2002).

É uma das mais antigas enzimas descritas sendo sua atividade relatada há mais de cem anos atrás, na árvore de laca japonesa, *Vernicifera rhus* (YOSHIDA, 1883). É uma das enzimas envolvidas no processo de degradação de material lignocelulósico, trata-se de uma polifenol oxidase que contém quatro núcleos de cobre, e é capaz de oxidar o substrato usando oxigênio molecular como acceptor de elétrons (THURSTON, 1994). Os substratos oxidados pela lacase incluem orto e *n*-difenoil além de compostos aromáticos contendo hidroxila e grupos amino. Além da degradação da lignina, a lacase tem várias funções, incluindo participação na pigmentação em fungos (CLUTTERBUCK, 1990), patogenicidade em plantas (IYER; CHATTOO, 2003) e degradação de muitos compostos aromáticos (XIAO et al., 2003). Devido a essas várias funções, e a não especificidade pelo substrato, a lacase pode ser utilizada em muitos processos industriais como *biopulping*, (processamento enzimático da polpa de papel), branqueamento de corantes têxteis, remoção de compostos fenólicos, desintoxicação de efluentes e outros processos (NYANHONGO et al., 2002; SHIN, 2004).

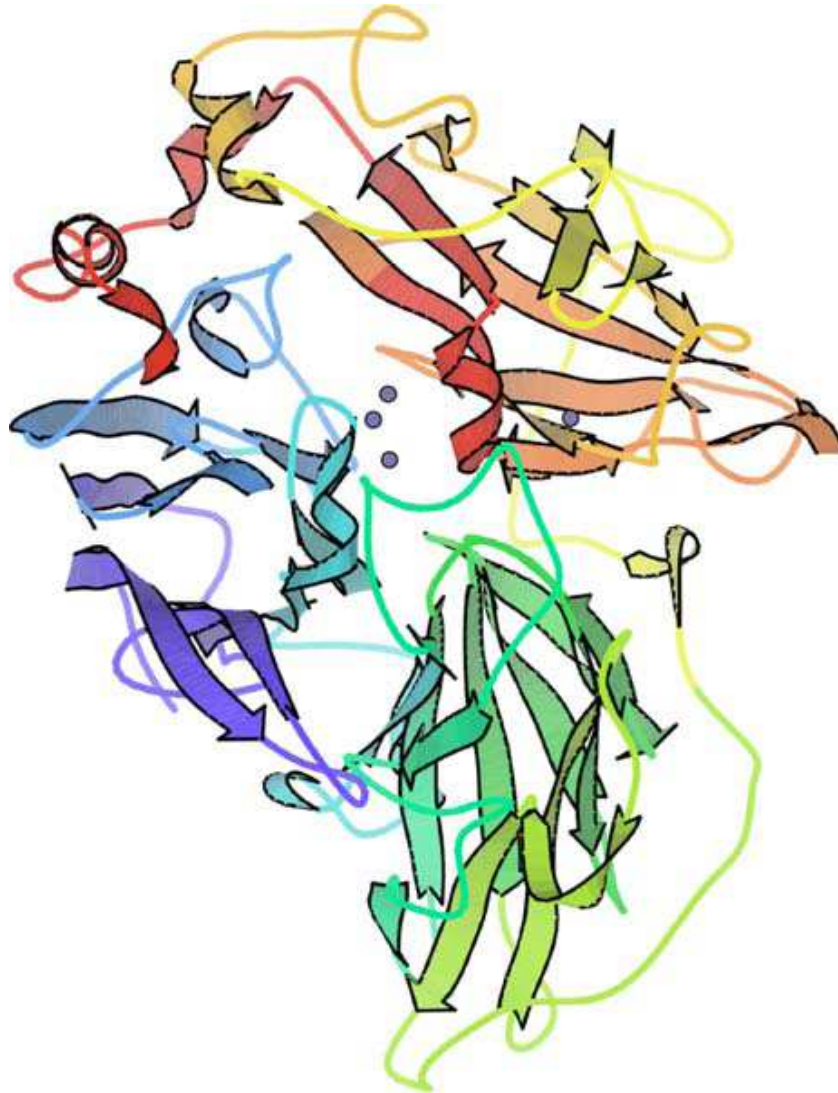


Figura 03: Estrutura tridimensional da Lacase do fungo *Trametes versicolor*.
Fonte: WONG, 2009.

2.5.2 Lignina peroxidase

A lignina peroxidase (LiP) foi primeiramente descoberta no meio extracelular de *Phanerochaete chrysosporium* cultivado sob limitação de nitrogênio (KIRK; FARRELL, 1987). Ela são hemoproteínas monoméricas com massa molecular de cerca de 40 KDa. Como as peroxidases clássicas, LiPs são oxidadas por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HAMMEL; CULLEN, 2008). A principal diferença funcional entre as LiPs e as peroxidases clássicas é que as LiPs podem oxidar anéis aromáticos que são apenas moderadamente ativado por doador de elétrons, enquanto peroxidases clássicas agem em substratos aromáticos fortemente ativado. Assim, LiPs e peroxidases podem tanto oxidar 1,2,4,5 tetramethoxybenzene, como muitos fenóis e anilinas.

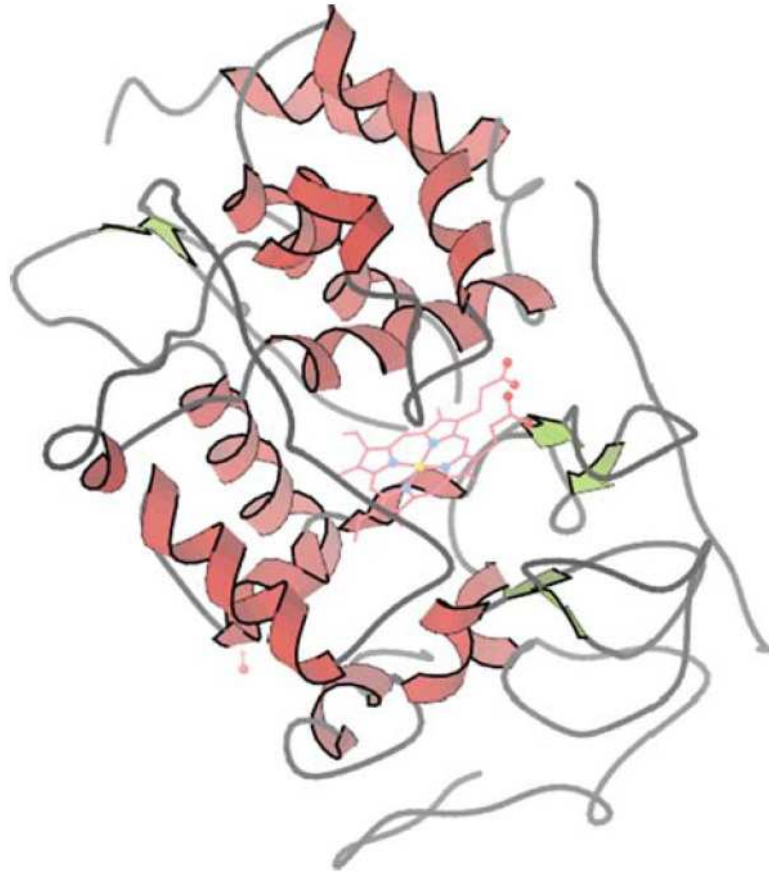


Figura 04: Estrutura tridimensional da lignina peroxidase do fungo *Phanerochaete chrysosporium*.
Fonte: WONG, 2009.

2.5.3 Manganês peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13)

Manganês peroxidase (MnP) é a mais comum das ligninas peroxidase modificadas, produzida por quase todos os basidiomicetos colonizadores de madeira que causam podridão-branca e vários fungos do solo, colonizando a serrapilheira em decomposição. Estes fungos secretam oxidoreduases inespecíficas entre estas a manganês peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13) que desempenha um papel crucial na degradação da lignina (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Esta glicoproteína contendo grupamento heme foi descoberto em *Phanerochaete chrysosporium* há quase 20 anos atrás por duas equipes internacionais de pesquisa (M. Gold e grupo de Crawford), a qual recebeu menos atenção no início em relação à lignina peroxidase (LiP), outra oxidoreduase extracelular de *P. chrysosporium*. No entanto, com a

constatação de que LiP não é, aparentemente, produzida por todos os fungos de podridão-branca, especialmente por um dos mais ativos degradadores seletivo de lignina, *Ceriporiopsis subvervispora*, o interesse se voltou a MnP. As múltiplas formas da proteína heme glicosilada com peso molecular normalmente de 40 a 50 kDa são secretadas por fungos ligninolíticos em seu microambiente, onde, MnP preferencialmente oxida manganês (II) (Mn^{2+}), sempre presente na madeira e solo, em Mn^{3+} altamente reativo, que é estabilizado por quelantes fúngicos, como ácido oxálico (ZHANG et al. , 2006).



Figura 05: Estrutura tridimensional da Manganês peroxidase do fungo *Phanerochaete chrysosporium*.
Fonte: WONG, 2009.

2.5.4 Celulase

As celulasas são enzimas com custo relativamente elevado, e uma redução significativa nos custos será importante para o seu uso comercial em biorrefinarias. Estratégias com base em celulase que podem tornar os processos de bio-refino mais econômicos incluem: aumento da produtividade volumétrica de enzimas comerciais, usando organismos que produzem enzimas em substratos mais baratos, com produção de preparados enzimáticos com maior estabilidade para processos específicos, e produzir celulasas com maior atividade específica em substratos sólidos (ZHANG et al., 2006). Recentemente, as empresas de biotecnologia *Genencor International* e *Novozymes Biotech* relataram o desenvolvimento de uma tecnologia que reduziu o custo de celulasas para o processo celulose-etanol de US\$5,40 por galão de etanol para cerca de 20 centavos de dólar por galão de etanol (MOREIRA, 2006). As duas estratégias principais foram: (I) uma melhoria econômica da produção de celulase para reduzir o custo por grama de enzimas por processo e aprimoramento das cepas, por exemplo, meio mais barato de lactose para glicose e sistema indutor alternativo e (II) uma melhora no desempenho da enzima celulase para reduzir quantidade em gramas de enzima para a realização da hidrólise (KNAUF; MONIRUZZAMAN, 2004). Atualmente, a maioria das celulasas comerciais (incluindo o β -glucosidase) são produzidas por espécies de *Trichoderma* e espécies de *Aspergillus* (ESTERBAUER et al., 1991; CHERRY; KIRK et al., 2002; FIDANTSEF, 2003;). Celulasas são utilizadas na indústria têxtil de algodão e amolecimento e acabamento do *brim*; no mercado de detergentes para o “cuidado de cor”, limpeza, na indústria de alimentos para maceração e clarificação de bebidas, na indústria de papel e celulose na melhoria da drenagem e modificação de fibras (CHERRY; FIDANTSEF, 2003; KIRK et al., 2002). O mercado de celulase espera uma expansão já que estas são usadas em grande escala na hidrólise de açúcares de materiais celulósicos pré-tratados, que podem ser fermentados de *commodities* (como milho, arroz, cana-de-açúcar, beterraba e outros), e ser convertidos em bioetanol e os produtos *biobased* (produtos obtidos por processos biológicos) (CHERRY; FIDANTSEF, 2003; HIMMEL et al., 1999; van BEILEN; LI, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE COLETA

A área de coleta foi delimitada dentro das Plantações Michelin, na chamada Reserva Plantações Michelin do Brasil no município de Ituberá no sul do Estado da Bahia a 200 km da cidade de Salvador-BA. As áreas levantadas quanto a sua biodiversidade fúngica estão localizadas em uma região conhecida com Costa do Dendê e compreendem cerca de 3000 hectares de Mata Atlântica em avançado grau de recuperação denominado Projeto Ouro Verde. As figuras abaixo mostram o mapeamento das trilhas percorridas durante a realização das coletas dentro da área do projeto Ouro Verde.

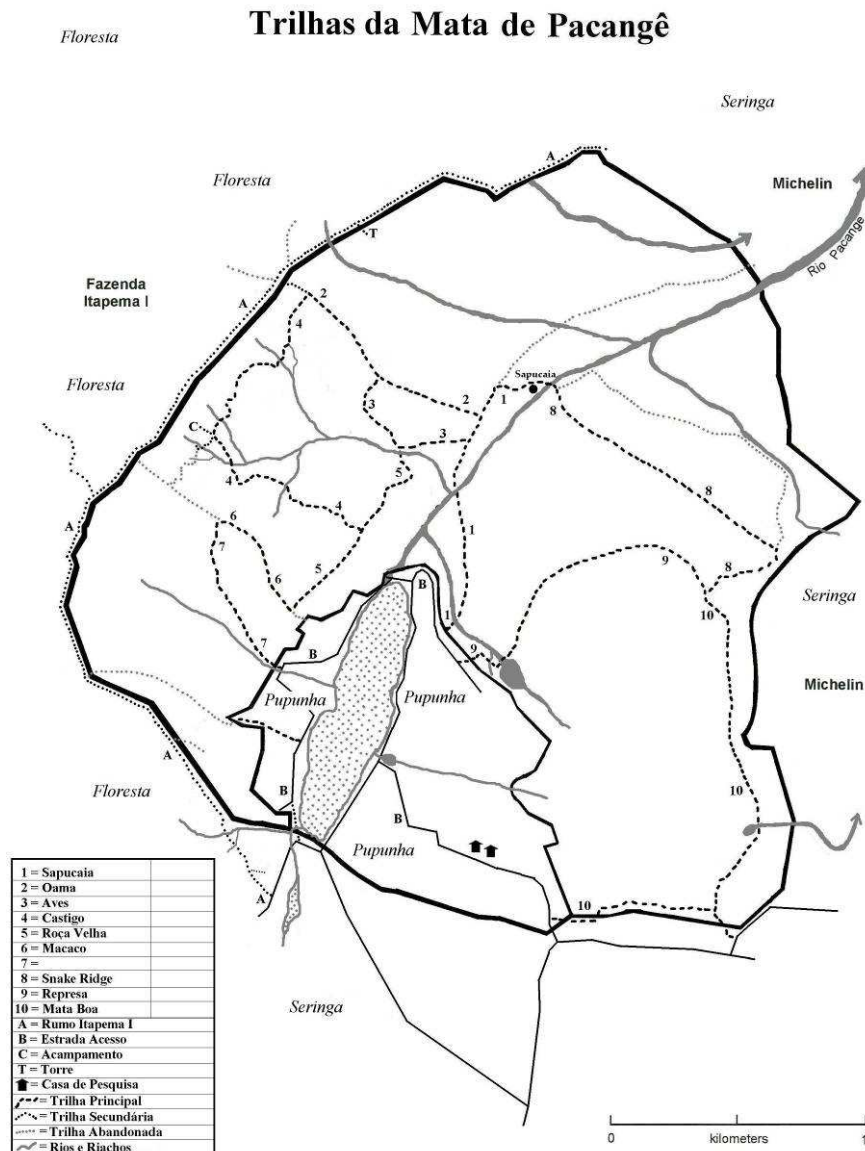


Figura 06: Esquema em escala da área de coleta da Mata de Pacangê.
Fonte: Fornecido pela administração da Reserva Michelin do Brasil.

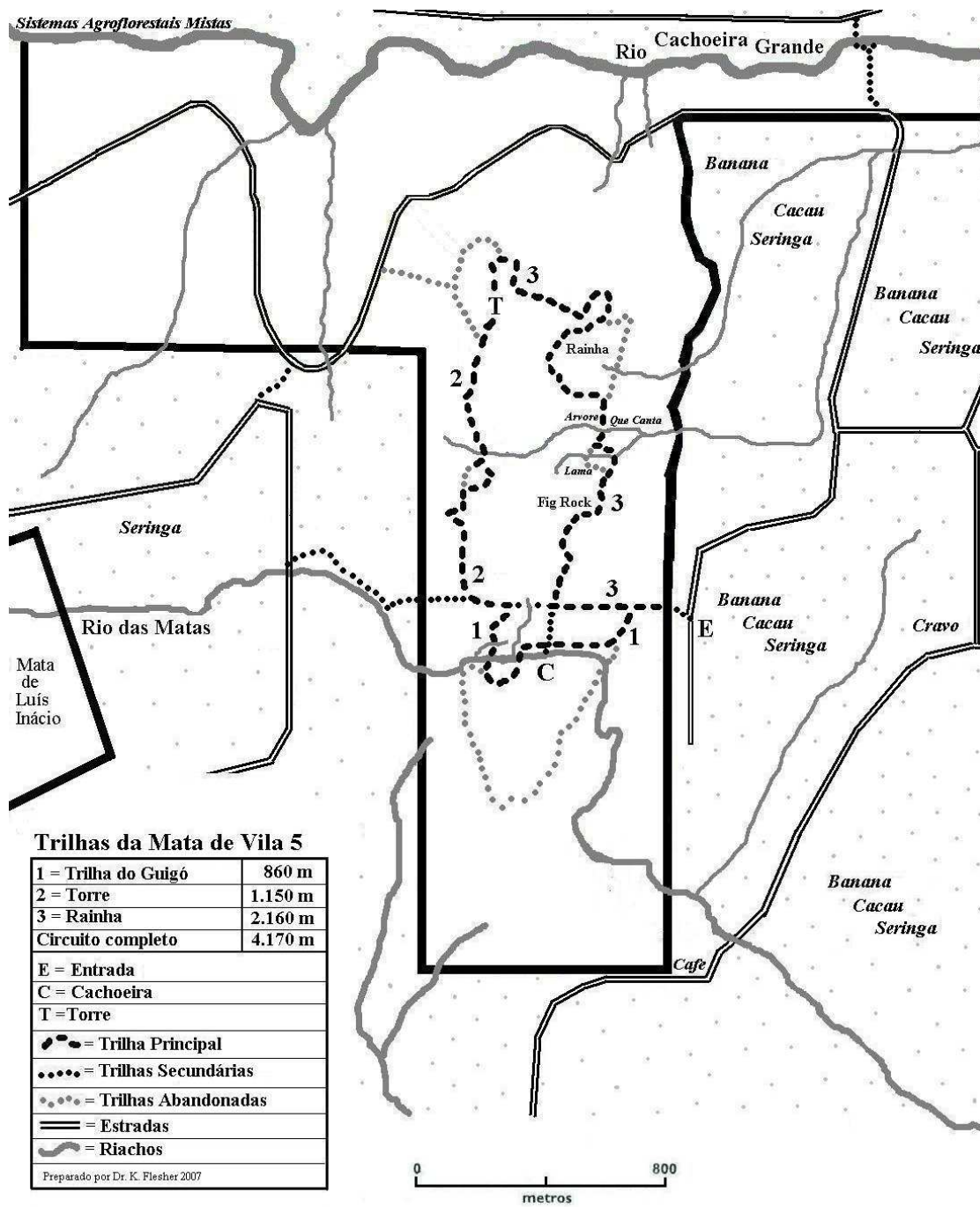


Figura 07: Esquema em escala da área de coleta da Mata a Vila05.
Fonte: Fornecido pela administração da Reserva Michelin do Brasil.

Pancada Grande Forest Trails

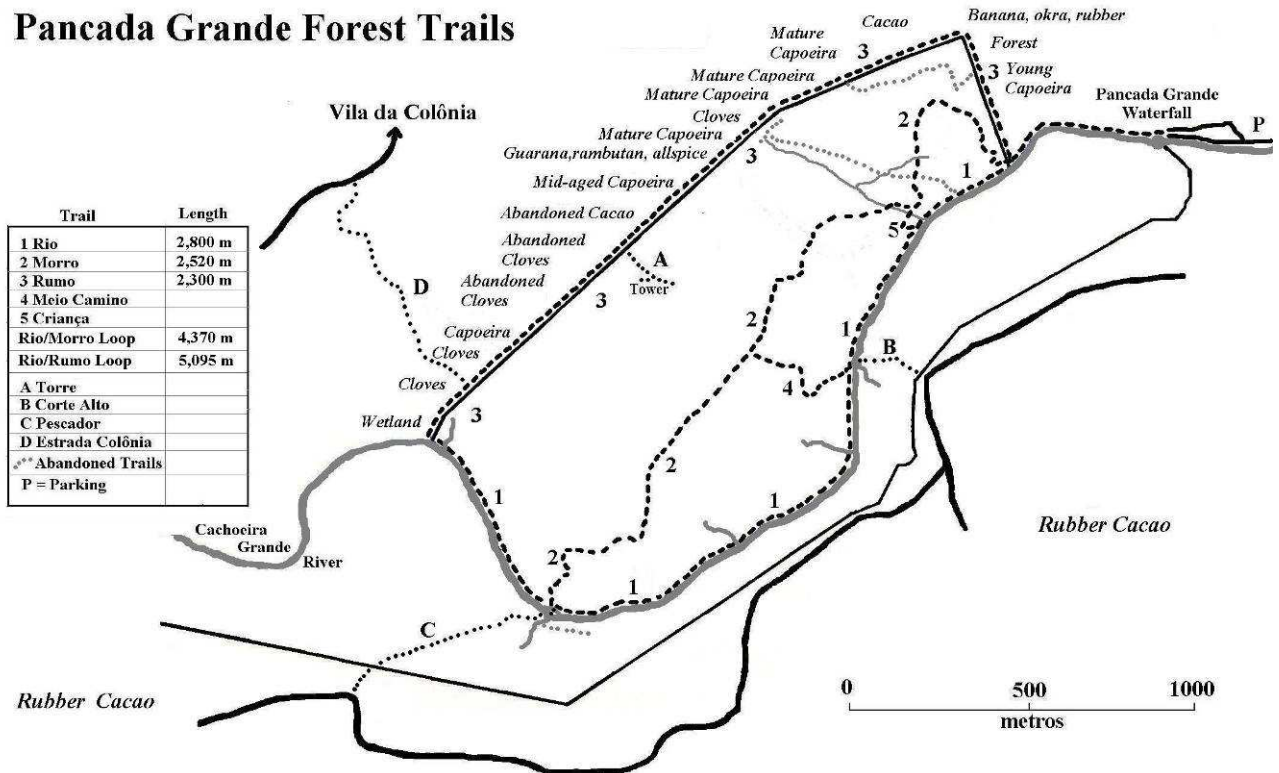


Figura 08: Esquema em escala da área de coleta da Mata da Cachoeira da Pancada Grande
Fonte: Fornecido pela administração da Reserva Michelin do Brasil.

3.2 COLETA E ISOLAMENTO DOS ESPÉCIMES

As atividades de coleta ocorreram em três momentos distintos, sendo um primeiro momento entre 25 e 30 de Abril de 2008, seguido pelos dias 24 a 29 de Agosto de 2008 e finalmente 19 a 27 de novembro de 2008. Objetivando a maior amostragem possível e o maior número de isolados. Desta forma possibilitando a coleta em períodos de estiagem e períodos úmidos na região.

No campo, os espécimes foram coletados manualmente ou com o auxílio de formão e martelo e acondicionados em sacos de papel. Todos os exemplares coletados foram georreferenciados com sistema de posicionamento global (GPS-Garmin), fotografados, numerados e dados de campo como substrato, cor, luminosidade incidente, data e local também foram devidamente registrados no momento da coleta. Os exemplares foram secos com auxílio de uma estufa de secagem de campo composta de uma caixa de madeira (90 x 90 x 90 cm) sendo a parte superior e inferior dotada de diversos furos (3 cm de \varnothing), com quatro lâmpadas de tungstênio de 150 Watts na parte inferior. Este dispositivo aquecia o ar interior na caixa forçando uma corrente de convecção, esta por sua vez retirava lentamente a

umidade dos exemplares a uma temperatura constante de 46°C, preservando desta forma algumas características importantes para sua posterior identificação.

Após a coleta do material, em uma cabine asséptica (90 x 45 x 30 cm) com uma lâmpada ultravioleta (UV) e outra fluorescente, com proteção frontal de vidro temperado, foi retirado um pedaço do exemplar com auxílio de uma pinça de ponta fina (tipo relojoeiro) para o isolamento. Foram utilizadas quatro estratégias para tal: (I) quebra do corpo de frutificação e retirada de um fragmento interno, (II) retirada direta de um fragmento e lavagem em álcool absoluto (30 segundos), posteriormente em hipoclorito de sódio 3% (30 segundos) e finalmente em água destilada estéril (60 segundos), (III) lavada em álcool absoluto e rapidamente flambada, (IV) Uma área foi exposta com auxílio de lamina de aço inoxidável estéril e um fragmento foi retirado. Estes fragmentos tratados foram inoculados em placas de Petri (3 cm de Φ) com meio de cultura (Extrato de Malte – 1,2%, Ágar – 1,5% e Água destilada) para crescimento a 28°C por 14 dias. Em alguns casos foram realizadas “esporadas” que consistiam em expor o corpo de frutificação, dentro de uma câmara úmida, em posição horizontal suportado por alfinetes, tendo o himenóforo ou região abhimenial virada para baixo para que os esporos, por meio da gravidade, se depositassem em uma folha de papel. Estes esporos foram utilizados para o preparo de culturas monospóricas. Todos os procedimentos foram realizados nos laboratórios da Reserva Michelin do Brasil.

3.3 PRESERVAÇÃO

A preservação dos isolados foi feita em triplicada por três métodos diferentes. O primeiro consistiu da manutenção da cultura em placa de Petri com meio Extrato de malte e levedura (Extrato de Malte – 1,2%, Ágar – 1,5%; Extrato de levedura – 0,2% e Água destilada – 1000 mL), onde sucessivos repiques foram feitos para manutenção da cultura viável. Um segundo método consistiu na manutenção de 5 *plugs* da cultura acima citada, submersos em água destilada autoclavada em frasco de penicilina (Castellani, 1967), mantidos em temperatura ambiente (25-28°C). O terceiro e último consistiu na manutenção dos isolados em placas de Petri com sementes de trigo previamente fervidas, autoclavadas e caladas (CaCO₃), onde sucessivos repiques foram feitos para manutenção da cultura viável.

3.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ESPÉCIMES

A identificação dos espécimes de basidiomicetos afiloforóides coletados foi baseada na morfologia das estruturas macroscópicas e microscópicas dos basidiomas. Os basidiomas foram analisados macroscopicamente quanto às características do himenóforo, dos tubos, e do contexto (tipo, cor, dimensões, consistência, textura) e, quando necessário, comparados com material já identificado depositado no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS). Para tanto um corte mais grosseiro foi feito para observar com o auxílio de um microscópio estereoscópico a existência de linha negra no contexto, disposição dos tubos, coloração do himênio, além da contagem de poros por milímetro.

Para a observação microscópica do material, foram feitos cortes à mão livre de cada basidioma, com lâminas de aço inoxidável. Os cortes foram acondicionados em lâminas de vidro e corados com hidróxido de potássio 3% e floxina 1%, segundo a técnica de Martin (1934). Também foi utilizado o reagente de Melzer, segundo Singer (1951), de modo a se observar a reação amilóide ou dextrinóide dos basidiósporos, hifas e outras microestruturas. Estruturas estéreis (setas, cystídios) foram observadas com o auxílio do microscópio óptico (NIKON Y-100), bem como o diâmetro dos esporos, formato, ornamentação e coloração.

3.5 SELEÇÃO DE FUNGOS QUANTO A CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOCELULOLÍTICAS

3.5.1 Enzimas Ligninolíticas

Foi utilizado meio de cultura Extrato de Malte – Ágar acrescido do corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR) na concentração de 0,02% (p/v) para testar as espécies de basidiomicetos quanto à habilidade de produção de enzimas ligninolíticas (GLENN; GOLD, 1983; FREITAG; MORELL, 1992). Os espécimes isolados foram incubados em placa de Petri de 9 cm de diâmetro com meio RBBR 0,02% + extrato de malte 0,5% + Ágar 1,5%. Durante 10 dias os halos de descoloração e de crescimento foram medidos com auxílio de uma régua de acrílico comum. Foram feitas medições em dois eixos perpendiculares do halo de descoloração e feito a média dos valores para cada dia de leitura.

3.5.2 Enzimas Celulolíticas

O teste para seleção de produção de enzimas celulolíticas foi realizado segundo a metodologia descrita por Dingle, Reid e Solomons (1953), através da técnica de “cup-plate”, na qual utilizou-se carboximetilcelulose (CMC) como agente indutor e o vermelho congo como revelador para visualização da formação de halos. Os isolados foram crescidos em meio líquido contendo $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 7g; K_2HPO_4 – 1,5g; MgSO_4 – 0,5g; CaCl_2 – 0,3g; Solução traço de sais ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,184g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,178g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,158g – 2,5mL; Carboximetilcelulose (CMC) – 5g; H_2O – 900mL) sendo o pH ajustado para 7,0, com tempo de crescimento de 7 dias a 28°C.

Para caracterizar a atividade enzimática foi utilizado meio de caracterização (Carboximetilcelulose (CMC) – 1%; Ágar – 2%; H_2O – 100%; pH – 7-7,4) em placa Petri de 15 cm de diâmetro com 9 poços de 8 mm de diâmetro abertos em fileiras de 3 poços de forma equidistante formando fileiras de 3 poços paralelas. Em cada poço foram colocados 150µL do meio de indução onde o fungo cresceu. Esta placa foi incubada a 28°C por 24 horas. Para revelar o halo de atividade enzimática as placas foram lavadas com solução de vermelho congo a 0,025% em tampão fosfato pH 8 por 30 minutos. Após este tempo uma nova lavagem foi feita com solução de NaCl 0,5M em tampão fosfato pH 8, possibilitando a medição dos halos.

3.5.3 Seleção dos isolados quanto ao potencial enzimático

Para a seleção do isolado com melhor atividade ligninocelulótica as medias obtidas na seleção para enzimas ligninolíticas foram submetidas à Análise de Variância (ANAVA) com aplicação do teste de Tukey com índice de significância de 5%. O teste para atividade de enzimas celulolíticas foi realizado de forma qualitativa, sendo o melhor resultado comparativo utilizado.

3.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA: LACASE, MANGANÊS PEROXIDASE, LIGNINA PEROXIDASE E CELULASE.

3.6.1 Estudo de parâmetro para otimização enzimática

A partir da seleção realizada entre os 28 fungos isolados aquele que apresentou melhor resultado para as enzimas lignolíticas e as celulolíticas foi utilizado nas análises subseqüentes. Para indicar qual seria a melhor condição de cultivo onde o fungo apresentaria a maior excreção das enzimas LiP, MnP, Lacase e Celulase foi utilizado um planejamento experimental multivariável através da aplicação do software Statistica (6.0), na qual o software forneceu planilhas de ensaio e as superfícies de resposta. As variáveis estudadas foram: temperatura de incubação, pH inicial do meio, fonte de carbono e fonte de nitrogênio, como demonstram as tabelas 03 e 04 do planejamento experimental.

Tabela 03: Dados do planejamento experimental.

Ensaio	pH	Temperatura	Fonte de Carbono	Fonte de Nitrogênio
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0

Tabela 04: Dados das variáveis do planejamento experimental.

Variáveis	-1	0	1
pH	4	7	10
Temperatura (°C)	21	28	35
Fonte de Carbono	CMC	sacarose	glicerol
Fonte de Nitrogênio	Sulfato de amônio	Peptona	Extrato de Levedura

3.6.2 Determinação da atividade das enzimas de interesse

O fungo selecionado foi cultivado em meio para indução enzimática com a fonte de nitrogênio e carbono pré-estabelecidas no planejamento experimental (Fonte de Nitrogênio – 3g; K₂HPO₄ – 1g; KCl – 0,5g; MgSO₄.7H₂O – 0,5g; FeSO₄.7H₂O – 0,01g; Fonte de Carbono – 5g; H₂O destilada - 1000mL) (*Czapek's solution Ágar* modificado). O pH, temperatura, fonte de carbono e de nitrogênio foram ajustados de acordo com a tabela do planejamento experimental. Após o período de incubação de 7 dias as culturas foram filtradas em papel de filtro com poros de 14µm em sua grande maioria, em seguida este filtrado foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min sendo o sobrenadante utilizado para as determinações enzimáticas. Para o branco, metade das alíquotas foram colocadas em banho de fervura por 10 minutos para inativar as enzimas. A atividade de cada enzima foi determinada e os resultados foram tratados no software Statística 6.0. Para a determinação das atividades de ligninases foi utilizada a equação derivada da Lei de Beer-Lambert:

$$\frac{\Delta(Ab) \times 10^6}{\epsilon \times R \times t} \text{ Atividade de ligninases } \left(\frac{U}{L} \right)$$

Onde:

$\Delta(Ab)$ é a diferença entre a absorbância dos extratos fervidos (branco) e não fervidos (teste) nos tempos estabelecidos;

ϵ é o absorbtividade molar (L.mol⁻¹cm⁻¹): sendo, LiP = 9300; MnP = 4460;

Lacase = 65000;

R é a alíquota de sobrenadante (µL);

t é o tempo de reação (minutos)

3.6.3 Atividade de Lacase

A atividade de lacase foi determinada pela oxidação de siringaldazina, segundo metodologia modificada de Szklarz (1984). O meio reacional foi composto de 500 μ L de sobrenadante do extrato centrifugado, 200 μ L de tampão citrato-fosfato (0,05M; pH 5,0), 100 μ L de água destilada e 100 μ L de siringaldazina (2mM) em etanol (0,1%). A formação do produto de reação foi acompanhada pela leitura da absorbância a 525nm em espectrofotômetro UV-Vis (Spectrum SP-2000 UV) por 5 minutos, com registros a cada 10 segundos.

3.6.4 Atividade de Lignina peroxidase

A atividade de LiP foi determinada pela oxidação de álcool veratrílico em presença de peróxido de hidrogênio, segundo Tien e Kirk (1984). O meio reacional foi composto de 500 μ L de sobrenadante do extrato centrifugado, 200 μ L de álcool veratrílico (2mM) em tampão tartarato de sódio (0,4M; pH 3,0) e 200 μ L de peróxido de hidrogênio (2mM). A formação de aldeído veratrílico foi acompanhada pela leitura da absorbância a 310nm em espectrofotômetro UV-Vis (Spectrum SP-2000 UV) por 5 minutos, com registros a cada 10 segundos.

3.6.5 Atividade de Manganês peroxidase

A atividade de manganês peroxidase foi determinada pela oxidação de vermelho de fenol na presença de peróxido de hidrogênio, segundo metodologia modificada de Kuwahara et al. (1984). O meio reacional foi composto de 500 μ L de sobrenadante do extrato centrifugado, 50 μ L de sulfato de manganês (2mM), 200 μ L de albumina bovina (0,5%)m 50 μ L de peróxido de hidrogênio (2mM) em tampão succinato de sódio (0,2 M; pH 4,5), 100 μ L de lactato de sódio (0,25 M), 100 μ L de vermelho de fenol (0,01%). A reação foi acompanhada pela leitura da absorbância a 610nm em espectrofotômetro UV-Vis (Spectrum SP-2000 UV) por 5 minutos, com registros a cada 10 segundos. A reação foi paralisada com 40 μ L de solução de hidróxido de sódio (2 M) e acompanhada por mais um minuto.

3.6.6 Cálculo da atividade específica

O teor de proteína total das amostras obtidas nos experimentos de otimização foi determinado pelo método de Bradford (1976) (Figura A19). Este consistiu na reação de 100 μ L do extrato bruto enzimático com 5mL do reagente de Bradford por 5 minutos e posterior leitura a 595nm em espectrofotômetro (Nanodrop 2000 UV-Vis). Os resultados foram comparados com uma curva padrão tendo como base a concentração previamente conhecida de albumina bovina. A atividade específica foi determinada pelo quociente da atividade enzimática pelo teor de proteína total do extrato (Tabela A13). O experimento foi realizado em triplicada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Foram coletados um total de 260 espécimes de basidiomicetos afiloforóides na Reserva Plantações Michelin do Brasil na região de Ituberá no sul da Bahia, destes foram isolados 29 espécimes. A identificação foi feita via taxonomia clássica com a utilização de manuais e chaves de identificação (Ryvarden, 2004) com exceção dos números 391, 397 e 408 que foram encaminhados para identificação molecular. Perfazendo um total de 18 espécies, 13 gêneros e 6 famílias (Ganodermataceae, Hymenochaetaceae, Polyporaceae, Fomitopsidaceae, Meripilaceae, Auriculariaceae). Os substratos relacionados foram: I. Tronco caído em decomposição, II. Árvore viva, III. Árvore morta e IV. Galho caído em decomposição. Totalizando 82,15% para o substrato I, 3,57% para o substrato II, 7,15% árvore viva para o substrato III e 7,13% para o substrato IV, detalhado na Tabela 05 e Figura 09. Todos os espécimes coletados foram depositados na Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia (CCMB) e no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS).

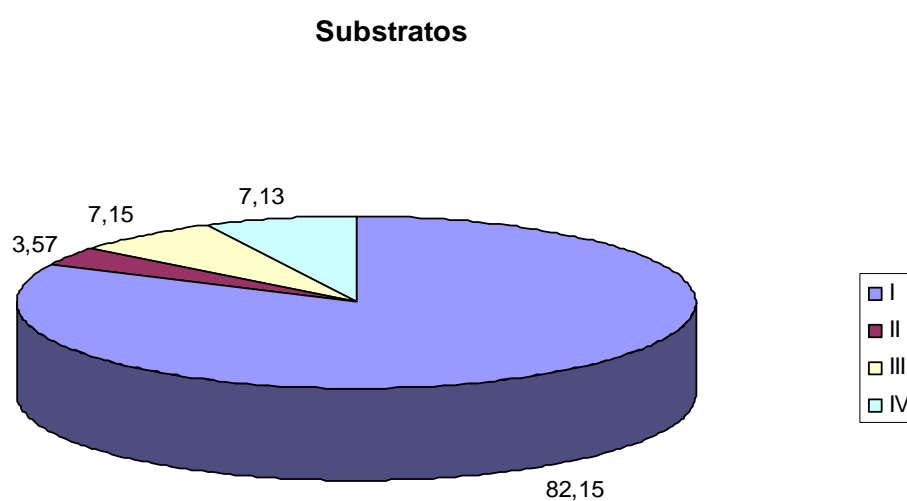


Figura 09: Gráfico dos substratos relacionados.

Tabela 05: Dados de coleta e identificação dos espécimes isolados.

Número HUEFS	Coordenada	Substrato	Espécie	Família	Número de Coleta
159846	10°30'55.3" 39°12'42.9"	árvore caída	<i>Ganoderma australe</i>	Ganodermataceae	262
159851	13°50'58.6" 39°13'42.3"	árvore viva (Araçá)	<i>Phylloporia fruticum</i>	Hymenochaetaceae	267
159867	13°50'23.0" 39°13'49.6"	árvore morta em pé	<i>Ganoderma australe</i>	Ganodermataceae	283
159879	13°47'23.7" 39°10'42.3"	árvore em pé morta (Paçuaré)	<i>Trametes sp.</i>	Polyporaceae	295
159883	13°47'48.3" 39°10'50.1"	tronco caído em decomposição	<i>Ganoderma australe</i>	Ganodermataceae	299
159897	13°50'55.6" 39°13'42.6"	tronco caído em decomposição	<i>Fomitopsis rosea</i>	Fomitopsidaceae	313
159902	13°50'33.3" 39°13'41.6"	toco de árvore em decomposição	<i>Fomitopsis rosea</i>	Fomitopsidaceae	318
159906	13°50'31.5" 39°13'43.6"	toco de árvore em decomposição	<i>Fomitopsis rosea</i>	Fomitopsidaceae	322
159909	13°50'23.0" 39°13'49.7"	tronco caído em decomposição	<i>Ganoderma australe</i>	Ganodermataceae	325
159911	13°50'23.5" 39°14'02.5"	galho caído em decomposição	<i>Microporus ostreatus</i>	Polyporaceae	327
159915	13°49'14.1" 39°12'05.8"	tronco caído em decomposição	<i>Microporus ostreatus</i>	Polyporaceae	331
159933	13°49'13.3" 39°12'16.7"	tronco caído em decomposição	<i>Phellinus gilvus</i>	Hymenochaetaceae	349
159935	13°49'22.1" 39°12'15.7"	tronco caído em decomposição	<i>Rigidoporus sp.</i>	Meripilaceae	351
159949	13°47'38.3" 39°11'12.5"	tronco caído em decomposição	<i>Hexagonia hydnoides</i>	Polyporaceae	365
159952	13°50'22.1" 39°13'56.8"	tronco caído em decomposição	<i>Microporus sp.</i>	Polyporaceae	368
159953	13°50'12.5" 39°13'55.6"	tronco caído em decomposição	<i>Laetiporus sulphureus</i>	Fomitopsidaceae	369
159956	13°50'16.1" 39°14'29.8"	tronco caído em decomposição	<i>Microporus ostreatus</i>	Polyporaceae	372
159957	13°50'15.5" 39°14'29.9"	tronco caído em decomposição	<i>Ganoderma orbiformum</i>	Ganodermataceae	373
159958	13°50'15.6" 39°14'29.8"	tronco caído em decomposição	<i>Ganoderma multiplicatum</i>	Ganodermataceae	374
9959	13°50'06.5" 39°14'39.3"	tronco caído em decomposição	<i>Ganoderma stipitatum</i>	Ganodermataceae	375
159967	13°50'05.9" 39°14'56.9"	tronco caído em decomposição	<i>Corioloopsis caperata</i>	Polyporaceae	383
*****	13°49'50.6" 39°13'25.4"	tronco caído em decomposição	*	*	391
*****	13°49'06.1" 39°12'04.5"	toco de árvore em decomposição	*	*	397
159982	13°49'04.9" 39°12'04.1"	tronco caído em decomposição	<i>Ganoderma multiplicatum</i>	Ganodermataceae	398
159985	13°48'55.0" 39°12'15.8"	tronco caído em decomposição	<i>Lentinus crinitus</i>	Polyporaceae	401
159989	13°49'06.3" 39°12'16.3"	tronco caído em decomposição	<i>Auricularia polytricha</i>	Auriculariaceae	405
*****	13°47'34.9" 39°10'45.0"	tronco caído em decomposição	*	*	408
160001	13°47'06.1" 39°10'51.8"	tronco caído em decomposição	<i>Lentinus crinitus</i>	Polyporaceae	417
160004	13°48'28.0" 39°11'06.9"	árvore viva (em ramo morto) Cheiro lembra percevejo	<i>Fomitella supina</i>	Fomitopsidaceae	420

*Espécimes não identificados



Figura 10: Fungos coletados e identificados: A. *Ganoderma australe* (262); B. *Ganoderma australe* (283); C. *Ganoderma australe* (299); D. *Phylloporia fruticum* (267); E. *Trametes* sp. (295); F. *Fomitopsis rosea* (313); G. *Fomitopsis rosea* (318); H. *Fomitopsis rosea* (322).

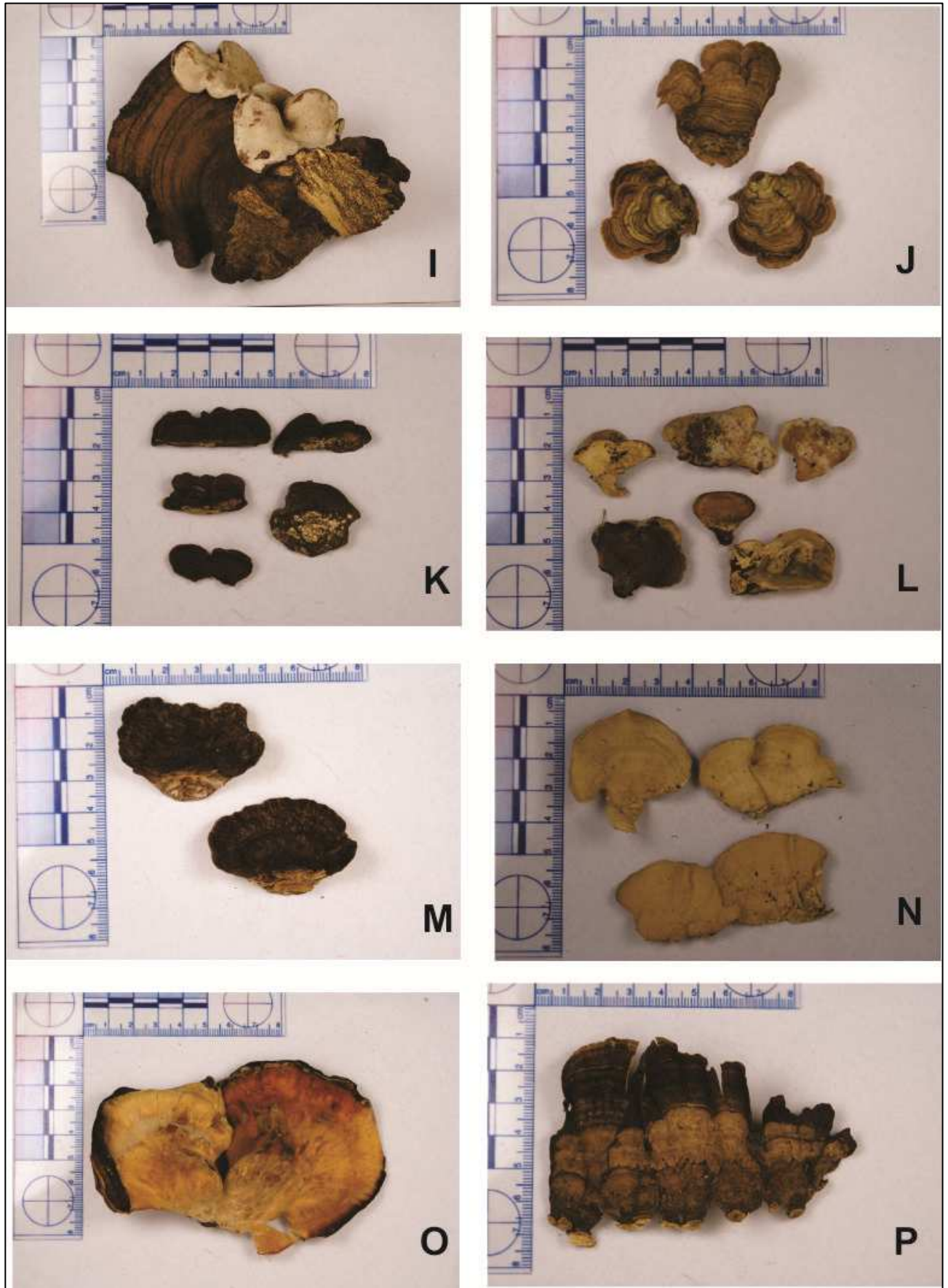


Figura 11: Fungos coletados e identificados: I. *Ganoderma australe* (325); J. *Microporus ostreatus* (327); K. *Phellinus gilvus* (349); L. *Rigidoporus* sp. (351); M. *Hexagonia hydroides*; (365); N. *Microporus* sp. (368); O. *Laetiporus sulphureus* (369); P. *Microporus ostreatus* (331).



Figura 12: Fungos coletados e identificados: Q. *Ganoderma orbiformum* (373); R. *Ganoderma multiplicatum* (374); S. *Ganoderma stipitatum* (375); T. *Corioloopsis caperata* (383); U. Não identificado; (391); V. Não identificado (397); W. *Ganoderma multiplicatum* (398); X. *Lentinus crinitus* (401).

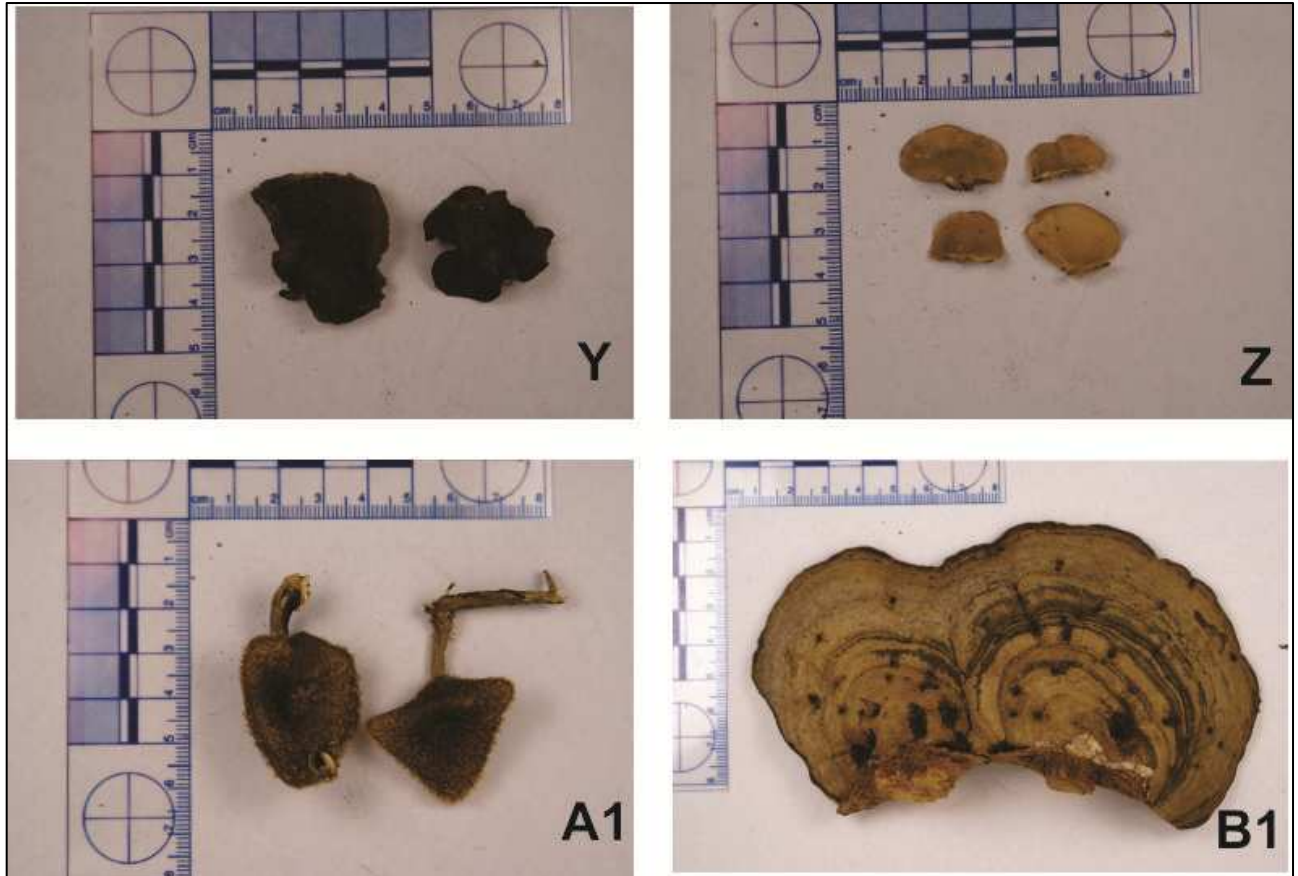


Figura 13: Fungos coletados e identificados: Y. *Auricularia polytricha* (405); Z. Não identificado (408); A1. *Lentinus crinitus* (417); B1. *Fomitella supina* (420).

4.2 DESCRIÇÃO DO FUNGO SELECIONADO

Fomitella supina (Swartz: Fr.) Murr.

Basidiocarpo: anual ou perene, efuso-reflexo, dimensões de aproximadamente 15 x 7 x 6 cm, superfície superior ocracea, zonada, no himenóforo possui coloração marrom claro, os poros são circulares com 6-7 por milímetro, o contexto é ocre a marrom, rígido – fibroso, com aproximadamente 5 cm de espessura.

Sistema Hifal: trimitico, hifa generativa contextual com parede fina, com clamps,, 3-4 μm , de diâmetro, hifa esquelética com parede fina, 4-7 μm de diâmetro, hifa ligadora com 2-3 μm de diâmetro.

Basídio: clavado, 4 esterigmas, 13-15 x 5-6,5 μm , com clamp basal.

Basidiósporos: cilíndrico, hialino, sem ornamentação, não reagente para Melzer, 7-8 x 4-4,5 μm

Tipo de podridão: Podridão branca

4.3 SELEÇÃO DOS FUNGOS COLETADOS E ISOLADOS QUANTO AO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS DE INTERESSE

Dentre os 29 espécimes testados quanto ao potencial de descoloração do Remazol Brilliant Blue R (RBBR) um total de doze (42,85%) apresentaram potencial para produção de enzimas ligninolíticas durante testes preliminares. Outro teste, específico para celulase foi aplicado para os doze espécimes positivos na descoloração do RBBR. Neste teste foram selecionados sete espécimes com potencial para produção de celulase. Para justificar a seleção de uma linhagem foi aplicado um tratamento estatístico, ANAVA com Teste de Tukey, para a diferenciação das médias obtidas no processo de descoloração. As figuras abaixo apresentam as imagens de crescimento e descoloração do meio com RBBR.

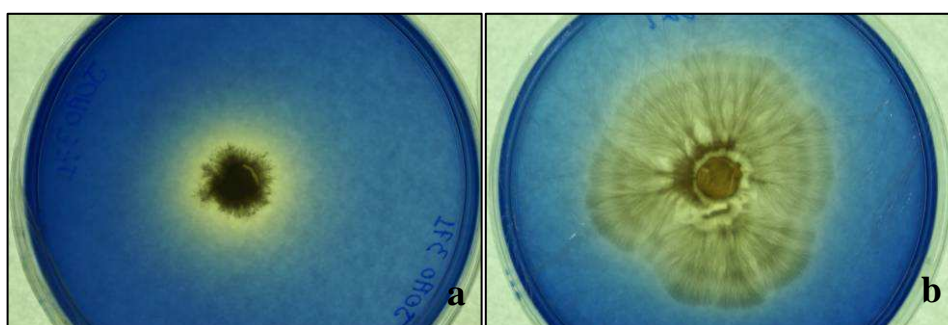


Figura 14: Seleção em RBBR do *Fomitella supina*. a) fungo com 2 dias de crescimento; b) fungo com 5 dias de crescimento.

4.3.1 Ligninases

Os Gráficos abaixo (Figura15) relacionam a descoloração e o crescimento, respectivamente, dos espécimes estudados durante o teste de potencial de descoloração do RBBR.

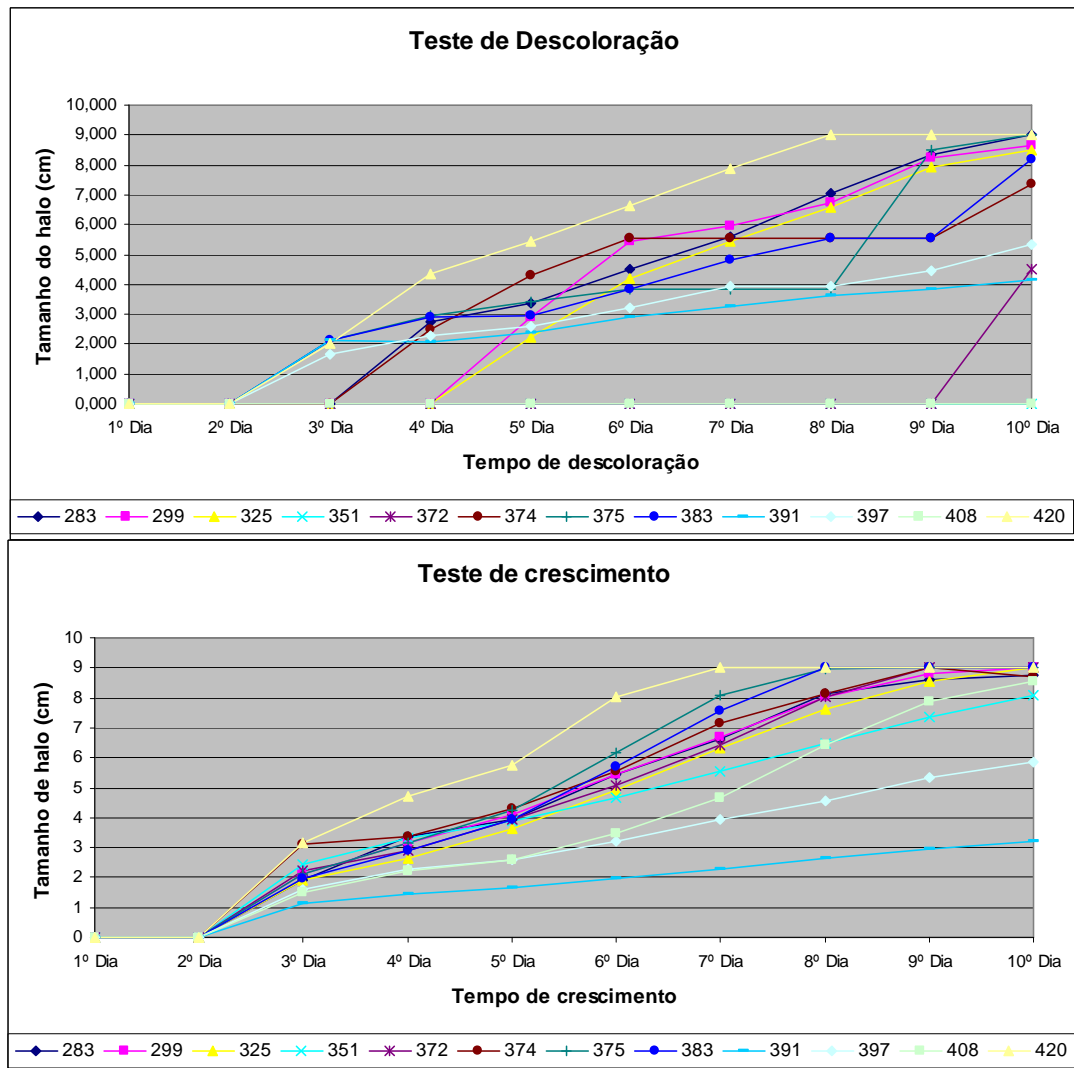


Figura 15: Gráfico que representa a descoloração e o crescimento, respectivamente, pelo tempo de incubação.

Dentre os doze espécimes estudados dez apresentaram potencial de descoloração do RRBR em meio sólido, sendo o espécime 420 (*Fomitella supina*) com maior potencial para a descoloração do RRBR, apresentando descoloração total da placa Petri de 9 cm de diâmetro com 8 dias de incubação com início da descoloração no 3º dia. Segundo Eichlerová et al. (2007) testes realizados para a descoloração do RRBR pelo fungo de podridão branca *Dichomitus squalens*, apresentaram um período de 14 dias de incubação para total descoloração do meio com RRBR em meio sólido.

Eichlerová et al (2006) ressaltam que nos casos de diversos corantes (RBBR, Verde Malaquita, Cristal Violeta) a descoloração teve início no 3º dia de incubação com um tempo maior que dez dias, em média, para a total descoloração da placa de Petri de 9 cm de diâmetro, mas apresentando um tempo menor para a descoloração do corante Amarantho. No caso específico do RBBR a descoloração teve início no 3º dia de incubação e no 10º dia a descoloração estava quase completa. Outra relação encontrada foi a da taxa de crescimento micelial com a capacidade de descoloração para corantes como o RBBR, Verde Malaquita e Cristal Violeta, onde a taxa de descoloração parece acompanhar o crescimento micelial.

A forma e velocidade de crescimento das colônias testadas apresentaram significativa modificação durante os testes de descoloração, em alguns casos o espécime perdeu a capacidade de descolorir o meio com RBBR ou se tornou inviável com crescimento irregular. Eichlerová et al (2007) concluíram em seu estudo que características morfológicas e crescimento do fungo testado (*Ischnoderma resinsum*) foram marcadamente modificadas por corantes industriais como o RBBR, confirmando a natureza tóxica destes corantes.

Em Souza et al. (2005) demonstraram que não houve correlação entre a atividade enzimática e descoloração de efluentes, uma vez que a alta atividade de fenoloxidasas não foi correlacionada com alta taxa de descoloração. Pode ser observado com *T. versicolor*, microrganismos com alta atividade de lacase, conforme descrito por Addleman e Archibald (1993) e Addleman et al. (1995), que nas condições experimentais produziu $105 \pm 7 \text{ U.L}^{-1}$ e a cor foi reduzida em apenas $65 \pm 4\%$.

4.3.2 Celulase

A Tabela 06 apresenta a média dos halos de degradação para os 12 isolados com potencial para produção das enzimas de interesse.

Tabela 06: Medida dos halos de degradação.

Linhagem	Média (cm)	desvio padrão
283	0,36	0,00E+000
299	0,84	9,66E-001
325	0,73	8,49E-001
351	1,67	2,35E-002
372	0,00	0,00E+000
374	1,10	2,36E-002
375	0,40	8,49E-001
383	1,10	7,07E-002
391	0,00	0,00E+000
397	0,00	0,00E+000
408	0,00	0,00E+000
420	1,49	1,41E-001

O teste para produção de celulase, gráfico abaixo (Figura16), mostra que o fungo 351 e 420 foram os melhores produtores em potencial.

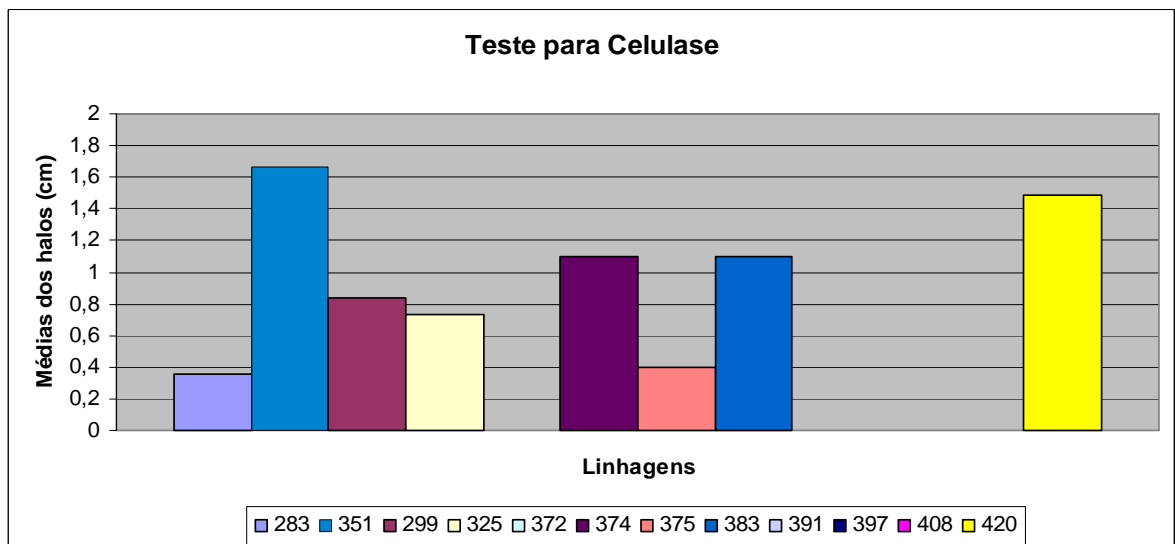


Figura 16: Gráfico dos halos de degradação do CMC.

4.3.3 Análise de Variância

Para a diferenciação das médias encontradas foi aplicada análise de variância (ANAVA) com teste de Tukey utilizando o software SPSS v9.0 para Windows®. As tabelas abaixo demonstram os resultados encontrados.

Tabela 07: Resultado da ANAVA (SPSS v.90) para seleção de fungos ligninolíticos.

ANAVA					
	Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	F	Sig.
Entre os Grupos	330.407	11	30.037	4.462	.000
Dentro dos Grupos	727.104	108	6.732		
Total	1057.511	119			

Tabela 08: Resultado da ANAVA com teste de Tukey (SPSS v.90) para seleção de fungos ligninolíticos.

Tukey				
	N	Subconjunto para alpha = .05		
TRAT		1	2	3
351	10	.0000		
408	10	.0000		
372	10	.4500	.4500	
391	10	2.4263	2.4263	2.4263
387	10	2.7430	2.7430	2.7430
325	10	3.4966	3.4966	3.4966
383	10	3.5897	3.5897	3.5897
374	10	3.6349	3.6349	3.6349
375	10	3.7512	3.7512	3.7512
299	10	3.7898	3.7898	3.7898
283	10		4.0615	4.0615
420	10			5.3342
Sig.		.062	.093	.348

O teste estatístico de ANAVA com o teste de Tukey subdivide os tratamentos por grupos de acordo com a semelhança dos resultados, ou seja, quanto mais parecida estatisticamente for a média mais próximas são colocadas. Na tabela fica claro que o fungo 420 ficou isolado em um subgrupo pois sua média difere estatisticamente dos demais fungos analisados. Após a aplicação do teste de seleção e do teste de Tukey, o fungo 420 (*Fomitella supina*) foi selecionado mediante a comparação dos gráficos plotados anteriormente para o potencial de descoloração e o resultado da diferenciação das médias (teste de Tukey).

Lembrando que a ferramenta estatística não aponta o melhor resultado, apenas mostra se há diferença significativa entre as médias encontradas. Desta forma o potencial demonstrado pelo isolado 420 foi confirmado estatisticamente quando este se diferenciou dos demais isolados e no gráfico apresentou o melhor desempenho.

4.4 ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Após o processo de seleção o fungo *Fomitella supina* foi testado quanto a potencial atividade para as enzimas Lignina peroxidase (LiP), Manganês peroxidase (MnP), Lacase com parâmetros pré estabelecidos. Para a enzima celulase não foi detectada atividade durante as leituras, pois os resultados encontrados não se encontravam dentro da curva padrão estabelecida para calcular a concentração da enzima. Sendo assim esta enzima não foi avaliada quanto aos parâmetros de otimização. A Tabela 09 mostra a atividade especifica encontrada para cada enzima estudada em determinados parâmetros.

Tabela 09: Resultado da atividade específica das enzimas lacase, LiP, MnP.

Ensaio	pH	Temp	Fonte C	Fonte N	AE Lac	AE MnP	AE LiP
1	-1	-1	-1	-1	0	414,494346	-11202,4574
2	1	-1	-1	-1	0	2424,534	-98,3689497
3	-1	1	-1	-1	13,38846174	2657,05415	-32,7568361
4	1	1	-1	-1	0	2925,15775	-49,0253686
5	-1	-1	1	-1	0	-16216,5521	-13,7334892
6	1	-1	1	-1	4,62088792	-28,211966	-37,4995056
7	-1	1	1	-1	3,846217074	-5,49643159	-6,56026838
8	1	1	1	-1	0,1263931	-11,7860699	-14,4397544
9	-1	-1	-1	1	65,54633826	-29,6161423	-10,9954335
10	1	-1	-1	1	11,34329287	-1,8523122	-81,6964526
11	-1	1	-1	1	93,1874629	-16,015638	-52,4805295
12	1	1	-1	1	0	-12,3090384	-23,262059
13	-1	-1	1	1	203,5276715	41,7891584	-149,261796
14	1	-1	1	1	1,019199684	123,321185	4,73791501
15	-1	1	1	1	250,0593088	406,716924	21,7819013

Tabela 09 (continuação): Resultado da atividade específica das enzimas lacase, LiP, MnP.

Ensaio	pH	Temp	Fonte C	Fonte N	AE Lac	AE MnP	AE LiP
16	1	1	1	1	1,768676265	19,2578367	-28,4727809
17	0	0	0	0	20,54737829	382,069784	-70,7919297
18	0	0	0	0	68,26157243	-236,348251	280,349147
19	0	0	0	0	27,11693194	311,220381	52,8071255
20	0	0	0	0	421,3862273	17,8811148	-431,063581

· Dados em negrito foram descartados pelo programa Statistica 6.0 para otimizar os resultados

4.4.1 Lacase

A atividade para lacase foi a melhor entre as enzimas estudadas. Apresentando 250 U.L⁻¹ como maior atividade nos parâmetros de pH 4,0, tendo Extrato de levedura como fonte de nitrogênio, glicerol como fonte de carbono e temperatura de 35°C com 7 dias de incubação. A atividade encontrada no ensaio 20 foi descartado para otimizar os resultados durante a análise estatística. Pelo exposto na Tabela 09 e Figura 18, a fonte de nitrogênio e o pH foram significativos para a atividade de lacase. O valor de R² foi 0,91295, indicando uma boa correlação entre as respostas previstas e observadas.

Tabela 10: Tabela ANAVA para atividade de lacase.

Anava – R ² = 0,91295					
	SQ	GL	MQ	Fcalc	Ftab
Regressão	84310,2389	10	8431,024	8,390342	1% 5,81
Resíduo	8038,7891	8	1004,849		5% 3,35
Falta de Ajuste	6701,23	6			10% 2,54
Erro puro	1337,56	2			25% 1,63
Total	92349,03	18			

Segundo Hatvani & Mécs (2003), quando pesquisaram a atividade enzimática em *Lentinula edodes* crescendo em resíduo de malte, sob diferentes formas de incubação, no meio líquido, encontraram a maior atividade de lacase no 30º dia de incubação com aproximadamente 100 U.L⁻¹. Resultados semelhantes foram reportados por Kaal et al. (1995) ao analisarem a atividade de enzimas ligninolíticas de fungos de podridão branca crescendo em meio líquido, onde a atividade de lacase foi de aproximadamente 70 U.L⁻¹ Chaparro et al. (2009) ao analisar a

atividade enzimática de fungos de podridão branca degradadores de madeira encontraram atividade de aproximadamente 170 U.L^{-1} entre o 9º e 10º dias de incubação. Assim o isolado 420 tem potencial para produção de lacase pois apresentou atividade de 250 U.L^{-1} no 7º de incubação.

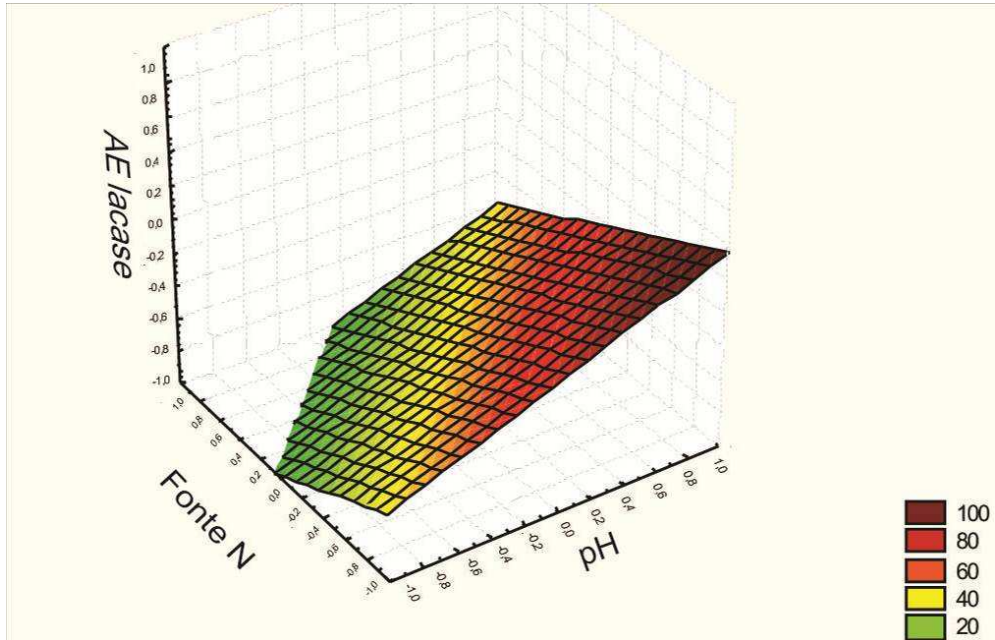


Figura 17: Gráfico de tendência para otimização da atividade de lacase.

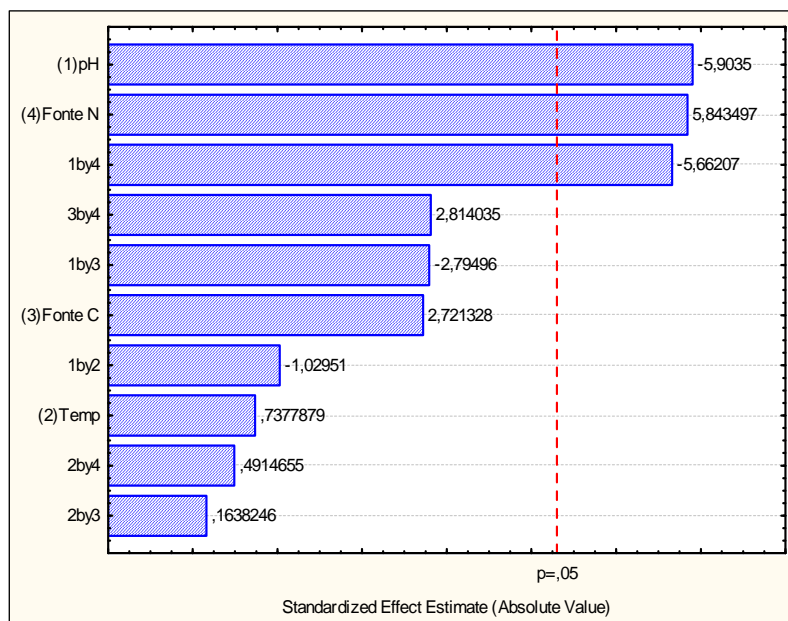


Figura 18: Diagrama de Pareto para atividade de lacase.

Os resultados (Figura18) demonstram que dentre os parâmetros estudados a fonte de nitrogênio e o pH e a interação entre esses dois parâmetros influenciaram na atividade de lacase. Aparentemente a fonte de carbono e a temperatura não foram determinantes para a atividade de lacase. Regina e Broetto (2005) ao testarem meios de indução com diferentes materiais lignocelulóticos encontraram atividades enzimáticas diferentes. Outros trabalhos parecem ligar a fonte de carbono, como compostos aromáticos, ao aumento da atividade de lacase no meio. Elisashvili et al. (2010) relataram que alguns dos compostos aromáticos utilizado na fermentação de material lignocelulótico por *Trametes versicolor* e *Ganoderma lucidum* tiveram uma influência significativa sobre a produção de lacase. Contudo outras fontes de carbono como ácido ferúlico parecem não interferir na atividade de lacase pelos fungos *Pycnoporus cinnabarinus* e *Pleurotus pulmonatus* (SOUZA et al. 2004; HERPOEL et al. 2000). As características genéticas das espécies e linhagens, assim como os parâmetros físico-químicos como pH, nitrogênio, temperatura, oxigenação, presença de minerais interferem na produção e ação das enzimas (VYAS et al. , 1994; TUOR et al., 1995; KAMIDA et al., 2005; ZHAO et al., 2008).

Estudos demonstraram que para *Pycnoporus sanguineus* CY788 a melhor produção de lacase se deu em meios contendo altos níveis de carbono e baixos níveis de nitrogênio (Pointing et al. 2000). Contudo de forma contrária, a produção de lacase por outros fungos como, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Trametes versicolor* e *Trametes gallica* foi aumentada em culturas com altos níveis de nitrogênio (EGGERT et al. 1996b; GALHAUP et al. 2002; DONG et al. 2005). Garcia (2006) relata que não existe um indutor ótimo para lacase comum a todos os fungos.

4.4.2 Lignina peroxidase

Os Resultados da análise estatística são apresentados na Tabela 11. Em aproximadamente 55% dos ensaios, a atividade de LiP não foi detectada, o que pode ser interpretado como erro experimental.

Tabela 11: Tabela ANAVA para atividade de LiP.

Anava – R² = 0,65634					
	SQ	GL	MQ	Fcalc	Ftab
Regressão	77877416,0612	10	7787742	1,527851	1% 5,81
Resíduo	40777495,3724	8	5097187		5% 3,35
Falta de Ajuste	40714045	6			10% 2,54
Erro puro	63451	2			25% 1,63
Total	118654911	18			

O valor de R² foi relativamente baixo (0,65634) indicando que não há boa relação entre as respostas observadas e preditas. Xu et al. (2009) Não detectaram atividade de LiP para o basidiomiceto *Irpex lacteus* CD2 antes do 25º dia de incubação. Relatam também que nas primeiras etapas da degradação da lignina são necessários agentes de baixo peso molecular, sendo que a LiP e outras enzimas envolvidas no processo possuem um alto peso molecular dificultando sua penetração na compacta estrutura lignocelulósica.

Além disso, as condições de cultivo podem influenciar a expressão dos genes responsáveis pela produção de LiP (RUTTIMANN et al. 1992, RAJAKUMAR et al. 1996, D' SOUZA et al. 1999). Compostos fenólicos causam inativação da atividade de LiP e interferem na oxidação do álcool veratrílico por peroxidases, causando inibição competitiva pelo substrato enzimático (CAMELO et al. 1999). Nestas condições de cultivo torna-se necessária a utilização de outros substratos para a determinação da atividade de LiP. Além disso, seria necessária análise molecular para identificar a presença de genes de LiP, antes de se poder afirmar que *F. supina* não produz esta enzima.

4.4.3 Manganês peroxidase

Os Resultados da análise estatística são apresentados na Tabela12.

Tabela 12: Tabela ANAVA para atividade de MnP.

Anava – R² = 0,59748					
	SQ	GL	MQ	Fcalc	Ftab
Regressão	168601957,9167	10	16860196	1,187467	1% 5,81
Resíduo	113587640,8769	8	14198455		5% 3,35
Falta de Ajuste	113462118	6			10% 2,54
Erro puro	125523	2			25% 1,63
Total	282189599	18			

O experimento montado não apresentou resultados estatísticos significativos (R^2 inferior a 0,75 e F_{calc} não significativo em nível de 25%). Contudo neste caso a baixa correlação entre as variáveis estudadas e o fato da variabilidade entre os resultados não ser significativa, pode esta ligada as condições de cultivo. O fungo testado pode não produzir a enzima nas condições específicas (composição do meio, pH e temperatura) as quais foi submetido, mas em outras condições pode vir a expressar a atividade MnP. Xu et al. (2009) relatam que durante o processo de descoloração do RBBR o *Irpex lacteus* foi capaz de descolorir o meio e que a MnP teve o principal papel neste processo. Contudo durante o experimento de biodegradação a atividade de MnP não foi detectada.

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

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos na coleta e identificação dos espécimes coletados demonstraram que a área estudada possui relativa diversidade de fungos afiloforóides. Entre os isolados 12 fungos apresentaram potencial atividade enzimática o que revela um potencial biotecnológico latente nestes organismos pouco inventariados. Os testes de seleção quanto ao potencial de produção para enzimas lignocelulolíticas deixam claro esse potencial biotecnológico. Contudo durante os estudos de parâmetros para a otimização o fungo selecionado, *Fomitella supina*, apresentou atividade mensurável apenas para enzima lacase, sendo que LiP e MnP não apresentaram atividade satisfatória nas condições testadas. Quatro hipóteses foram levantadas para a falta de atividade para essas enzimas. (i) as condições de cultivo não favoreceram a atividade dessas enzimas; (ii) no caso da LiP pode estar ligado ao fato do gene responsável pela expressão da LiP não estar presente, já que sua presença é relativamente rara em fungos basidiomicetos,; (iii) erro experimental durante a leitura da atividade enzimática; (iv) Sucessão da atividade de diferentes enzimas em tempos diferentes durante a degradação do substrato na incubação, ou seja, o tempo destinado a incubação na indução da atividade enzimática pode ter favorecido a atividade da lacase (maior atividade) pois esta enzima normalmente é a primeira a acessar o substrato lignocelulolítico. Em trabalhos futuros é necessário o estudo de outros parâmetros de otimização para MnP, em relação a LiP é importante o estudo molecular para identificar um possível gene responsável pela expressão dessa enzima e otimizar a atividade de lacase em estudos futuros.

6 REFERÊNCIAS

ALDER, E.. Lignin chemistry-past, present and future. **Wood Science and Technology**, -----, v. 11, p.169-218, 1977.

ADDLEMAN, K.; ARCHIBALD, F. S.. Kraf pulp bleaching and delignification by dicaryons and monocaryons of *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, -----, v. 59, p.266-273, 1993.

ADDLEMAN, K. et al. Production and characterization of *Trametes versicolor* mutants unable to bleach hard wood Kraft Pulp. **Applied and Environmental Microbiology**, -----, v. 61, p.3687-3694, 1995.

ALEXOPOULOS, C. J, et al. **Introductory Mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.

ADL, Sm. et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, New York, p. 399-451, 2005.

BALDRIAN, P. et al. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. **Applied and Environmental Microbiology**, -----, v. 156, n. 5-6, p.670-676, 2005.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, N. Biodiversity in Brazil a first approach. Proceedings of the Workshop Methods for the assessments of biodiversity in plants and animals. Campos do Jordão, São Paulo, Brazil. 1996.

BARBOSA, M. R. V.; THOMAS, W. W. Biodiversidade, conservação e uso sustentável da Mata Atlântica no Nordeste. In: Araújo, E. L.; Moura, A. N.; Sampaio, E. V. S. B.; Gestinari, L. M. S. & Carneiro, J. M. T. (eds.). **Biodiversidade, Conservação e Uso Sustentável da Flora do Brasil**. Imprensa Universitária UFRPE, Recife, p.19-22, 2002.

BARDER, P.; JANSSON, S.; JONSSON, B. G.. Wood-inhabiting and substratum decline in selective logged boreal spruce forests. **Biological Conservation**, Umeå, Sweden, v. 72, p.355-362, 2 nov. 1995..

BARR, D. P.; AUST, S. D.. Effect of superoxide and superoxide dismutase on lignin peroxidase-catalyzed veratryl alcohol oxidation. **Archives of Biochemistry And Biophysics**, Logan, Utah, v. 311, n. 2, p.378-382, 1994.

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

BODENSTEINER, P. et al. Phylogenetic relationships of cyphelloid homobasidiomycetes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Berlin, v. 33, p.501-515, 2004.

BOIDIN, J.; CANALES, R.. Taxonomie moleculaire des Aphylophorales. **Mycotaxon**, Paris, n. 66, p.445-491, 1998.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Primeiro relatório nacional para a convenção sobre diversidade biológica**. Brasília, p. 283, 1998.

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

CAMARGO, F. A.. **Obtenção, caracterização e estudo de biodegradação de blendas de poli (3-hidroxibutirato- co-valerato)/(phbv) com lignina de bagaço de cana de açúcar**. 2003. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Unicamp, Campinas, 2003.

CARLILE, M. J.; GOODAY, G. W.; WATKINSON, S. C.. **The Fungi**. 2ª ed. New York: Academic Press, 2001. 588 p.

CARAMELO, L.; MARTÍNEZ, M. J.; MARTINEZ, A. T.. A Search for Ligninolytic Peroxidases in the Fungus *Pleurotus eryngii* Involving α -Keto- γ -Thiomethylbutyric Acid and Lignin Model Dimers. **Applied And Environmental Microbiology**, -----, v. 65, n. 3, p.916-922, 1999.

CASTELLANI, A.. Maintenance and Cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, p. 181-184.1967.

CONESA A., PUNT P.J., VAN DEN HONDEL C.A. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. **Journal of Biotechnology**. v. 93, p. 143-158, 2002.

CHEN, Y.; SARKANEN, S.. Macromolecular lignin replication: A mechanistic working hypothesis. **Phytochemistry Reviews**, St. Paul, v. 2, n. 3, p.235-255, 2003.

CHERRYR, J. R; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion In Biotechnology**, Davis, California, Usa, v. 14, n. 4, p.438-443, 2003.

CHAPARRO, D. F.; ROSAS, D. C.; VARELA, A.. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). **Revista iberoamericana de Micología**, Quindío, v. 26, n. 4, p.238-243, 2009.

CLUTTERBUCK, A. J.. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. **Journal of General of Microbiology**, -----, p. 1731-1738, 1990.

CRACRAFT, J.; DONOGHUE, Mj.. **Assembling the Tree of Life**. Oxford: Oxford University Press, 2004.

DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G.. An historical perspective on lignan biosynthesis: Monolignol, allylphenol and hydroxycinnamic acid coupling and downstream metabolism. **Phytochemistry Reviews**, Netherlands, v. 2, n. 3, p.257-288, 2003.

DINGLE, J.; REID, W. W.; SOLOMONS, G. L.. The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides. II. Application of the "cup-plate" assay to the estimation of enzymes. **Journal for the Science of Food and Agriculture**, -----, p. 149-155, 1953.

DONG, J. L. et al. Influence of culture conditions on laccase production and isozyme patterns in the white-rot fungus *Trametes gallica*. **Journal of Basic Microbiology**, p.190-198, 2005.

DONK, M.a.. A conspectus of the families of Aphylophorales. **Persoonia**, -----, v. 3, p.199-324, 1 jan. 1964.

DURÁN, N.; ESPÓSITO, E.. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. **Microbiologia Ambiental**, Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p. 269-292. 1997.

D'SOUZA, T. M.; MERRITT, C. S; REDDY, C. A.. Lignin-Modifying Enzymes of the White Rot Basidiomycete *Ganoderma lucidum*. **Applied And Environmental Microbiology**, -----, v. 65, n. 12, p.5307-5313,1999.

ESTERBAUER, H. et al. Production of *Trichoderma cellulase* in laboratory and pilot scale. **Bioresource Technology**, Graz, Austria, v. 36, n. 1, p.51-65, 1991.

EICHLEROVA, I.; HOMOLKA, L.; NERUD, F.. Evaluation of synthetic dye decolorization capacity in *Ischnoderma resinsum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Czech Republic, p. 759-766, 2006.

EICHLEROVA, I. et al. Decolorization of Orange G and Remazol Brilliant Blue R by the white rot fungus *Dichomitus squalens*: Toxicological evaluation and morphological study. **Chemosphere**, Czech Republic, v. 69, p.795-802, 2007

EGGERT, C. et al. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. **Febs Letters**, Heidelberg, v. 391, p.144-148, 1996.

ELISASHVILI, V. et al. Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Tbilisi, Georgia, p.1-6. 9 jun. 2010.

FERRAZ, E. M. N. Panorama da Floresta Atlântica no Estado de Pernambuco. 2002. In: Araújo, E. L.; Moura, A. N.; Sampaio, E. V. S. B.; Gestinari, L. M. S. & Carneiro,

J. M. T. **Biodiversidade, Conservação e uso Sustentável da Flora do Brasil**. Imprensa Universitária UFRPE, Recife, p.23-26, 2002.

FIDALGO, O; BONONI, V.L.R. Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. **Manual do Instituto de Botânica**, nº 4, São Paulo. 1989.

FIELD, J.A. et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white-rot fungi. **Applied And Environmental Microbiology**, Wageningen, The Netherlands, v. 58, n.1, p.2219-2226, 1992.

FONSÊCA, M.P.. **Aphylophorales da Reserva Estadual Armando de Salles Oliveira, São Paulo, SP**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo. p.171, 1994.

FORGIARINI, Eliane. **Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis Pela Enzima Horseradish Peroxidase (HRP)**. 2006. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

FREITAG M, MORRELL JJ. Decolorization of the polymeric dye poly R-478 by wood-inhabiting fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 811–22, 1992.

FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS. 2002. **Relatório Perspectivas do Meio Ambiente no Brasil**. www.estadão.com.br/ext/ciencia/biod.pdf. 28/08/2009.

GALHAUP, C. et al. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme Microbiology Technology**, -----, v. 30, p.529-536, 2002.

GARCIA, Telma Alves. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus***. 2006. 126 f. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

GELPKE M.D.S., LEE J., GOLD M.H. Lignin peroxidase oxidation of veratryl alcohol: Effects of the mutants H82A, Q222A, W171A, and F267L. **Biochemistry**, v. 41, p. 3498-3506, 2002.

GIBERTONI, T. B.. **Aphylophorales (Basidiomycotina) em áreas de Mata Atlântica do Nordeste Brasileiro**. 2004. 277 f. Tese (Doutorado) - Ufpe, Recife, 2004.

GILBERT, G. S.; FERRER, A.; CARRANZA, J.. Polypore fungal diversity and host density in a moist tropical forest. **Biodiversity and Conservation**, Netherlands, v. 11, n. 6, p.947-957, 29 maio 2002.

GILBERTSON, R. L.. Wood-Rotting Fungi of North America. **Mycologia**, Tucson, Arizona, v. 72, n. 1, p.1 - 49, 29 jan. 1980.

GUILLÉN F., MUÑOZ C., GÓMEZ-TORIBIO V., MARTÍNEZ A.T., MARTÍNEZ M.J. Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from

Pleurotus eryngii. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 170-175, 2000.

GÓES-NETO, A.. **Diagnóstico da Biodiversidade de Macromicetos do Estado da Bahia: Evolução histórica e situação atual**. 1994. Monografia - Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 1994.

GÓES-NETO, A.; LOGUERCIO-LEITE, C.; GUERRERO, R. T.. Morphological cladistic analysis of tropical Hymenochaetales (Basidiomycota). **Mycotaxon**, v. 79, p. 467-479. 2001.

GÓES-NETO, A.; LOGUERCIO-LEITE, C. ; GUERRERO, R. T.. Molecular phylogeny of tropical Hymenochaetales (Basidiomycota). **Mycotaxon**, v. 84, p. 337-354, 2002.

GLENN JK, GOLD MH. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45: p. 1741–7, 1983.

HALLENBERG, N.; PARMASTO, E.. Phylogenetic studies in species of Corticiaceae growing on branches. **Micologia**, São Paulo, v. 4, n. 90, p.640-654, 1998.

HAMMEL, K. E., MOEN, M. A., Depolymerization of a Synthetic Lignin in vitro by Lignin Peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**. v.13, p.15-18,1991.

HAMMEL, K. E; CULLEN, Dan. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. **Current Opinion In Plant Biology**, Madison, v. 11, p.349-355, 2008.

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

HATVANI, N.; MÉCS, I.. Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of *Lentinula edodes*. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, New York, v. 55, p.199-203, 2003.

HAWKSWORTH, D. L.. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies In Mycology**, Madrid, v. 50, p.9-18, 27, 2004.

HATTORI, T.. Diversity of wood-inhabiting polypores in temperate forest with different vegetation types in Japan. **Fungal Diversity**, Tsukuba, Ibaraki, v. 18, p.73-88, 2005.

HEILMANN-CLAUSEN, J.; CHRISTENSEN, M.. Does size matter? On the importance of various dead wood fractions for fungal diversity in Danish beech forests. **Forest Ecology And Management**, Denmark, v. 201, p.105-117, 8 jun. 2004.

HEILMANN-CLAUSEN, J.; CHRISTENSEN, M.. Wood-inhabiting macrofungi in Danish beech-forests – conflicting diversity patterns and their implications in a conservation perspective. **Biological Conservation**, Denmark, v. 122, n. 4, p.633-642, 1 abr. 2005.

HERPOEL, I. et al. Selection of *Pycnoporus cinnabarinus* strains for laccase production. **FEMS Microbiology Letters**, -----, p. 301-306, 2000.

HIBBETT, D. S., BINDER, M., BISCHOFF, J. F., BLACKWELL, M., CANNON, P. F., ERIKSSON, O. E., HUHDORF, S., JAMES, T., KIRK, P. M., LÜCKING, R., LUMBSCH, T., LUTZONI, F., MATHENY, P. B., MCLAUGHLIN, D. J., POWELL, M. J., REDHEAD, S., SCHOCH, C. L., SPATAFORA, J. W., STALPERS, J. A., VILGALYS, R., AIME, M. C., APTROOT, A., BAUER, R., BEGEROW, D., BENNY, G. L., CASTLEBURY, L. A., CROUS, P. W., DAI, Y.-C., GAMS, W., GEISER, D. M., GRIFFITH, G. W., GUEIDAN, C., HAWKSWORTH, D. L., HESTMARK, G., HOSAKA, K., HUMBER, R. A., HYDE, K., IRONSIDE, J. E., KÖLJALG, U., KURTZMAN, C. P., LARSSON, K.-H., LICHTWARDT, R., LONGCORE, J., MIADLIKOWSKA, J., MILLER, A., MONCALVO, J.-M., MOZLEY-STANDRIDGE, S., OBERWINKLER, F., PARMASTO, E., REEB, V., ROGERS, J. D., ROUX, C., RYVARDEN, L., SAMPAIO, J. P., SCHÜßLER, A., SUGIYAMA, J., THORN, R. G., TIBELL, L., UNTEREINER, W. A., WALKER, C., WANG, Z. WEIR, A., WEIß, M., WHITE, M. M., WINKA, K., YAO, Y.-J., ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. **Mycological Research**, v. 111, n. 5, p.509-547, 2007.

HIGUCHI, T.. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. **Wood Science And Technology**, Japão, v. 24, p.23-63, 1990.

HIMMEL, ME.; ADNEY, WS.; WYMAN, CE.. Cellulase for commodity products from cellosic biomass. **Current Opinion In Biotechnology**, Hall, Hanover, v. 10, n. 4, p.358-364, 1999.

HONG, Sg.; JUNG, Hs.. Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondrial small-subunit ribosomal DNA sequences. **Mycologia**, -----, v. 96, p.742-755, 1 jan. 2004.

IYER, G.; CHATTOO, B.. Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **FEMS Microbiology Letters**, -----, v. 227, p.121-126, 2003.

IWABUCHI, S.; SAKAI, S.; YAMAGUSH, O.. Analysis of mushroom diversity in sucessional young forest and equilibrium broad-leaved forest. **Mycoscience**, -----, v. 35, n. --, p.1-14, 1 jan. 1994.

KAAL, E.; FIELD, J. A.; JOYCE, T. W.. Increasing lignolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen sufficient media. **Bioresource Technology**, Essex, v. 53, p.133-139, 1995.

KAMIDA, H. M. et al. Biodegradação de efluentes têxteis por *Pleurotus sajo-caju*. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p.629-632, 2005.

KLASON, P.. Ü. Lignin und Lignin-Reaktionen. **Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, -----, v. 53, n. 5, p.-----, 1917.

KENDRICK, B.. **The fifth kingdom**. 2 ed. Newburyport: Focus Information Group, 1992.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; DAVID, J. C.; STALPERS, J.. Ainsworth and Bisby's **Dictionary of the Fungi**. 9th ed. CAB International, Wallingford, UK. 2001.

KIRK, T. K.; CONNORS, W. J.; ZEIKUS, J. Gregory. Requirement for a Growth Substrate During Lignin Decomposition by Two Wood-Rotting Fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Madison, Wisconsin, v. 32, n.1, p.192-194, 1976.

KIRK T.K., FARELL R.L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**. v. 41, p. 456-506, 1987.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.I; FUGLSANG, C. C.. Industrial enzyme applications. **Current Opinion In Biotechnology**, Bagsvaerd, Denmark, v. 13, n. 4, p.345-351, 2002.

KNAUF, M; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. **International Sugar Journal**, -----, p. 147-150, 2004

KÖGEL-KNABNER, I.. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. **Soil Biology And Biochemistry**, Freising-weihenstephan, Germany, v. 34, n. 2, p.139-162, 2002.

KULLMANN S.W., MATSUMURA F. Identification of a novel cytochrome P-450 gene the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 63, p. 2741-2746, 1997.

KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLD, M. H.. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**., p. 169-247, 1984.

KUNZ, A. et al. Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis. **Revista Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p.78-82, 2002.

KRÜGER, D.; PETERSEN, R. H.; HUGHES, K. W.. Molecular phylogenies and mating study data in *Polyporus* with special emphasis on group "Melanopus" (Basidiomycota). **Mycological Progress**, Berlin, v. 4, n.5, p.185-206, 16 fev. 2006.

LANDECKER, E. M. **Fundamentals of the fungi**. 3. ed. New Jersey: prentice hall, 1990.

LYNCH, J. M. et al. Cellulase activities of some aerobic microorganisms isolated from soil. **Journal Of General Microbiology**, -----, p. 231-236, 1981.

LINDHE, A.; ASENBLAD, N.; TORESSON, H.. Cut logs and high stumps of spruce, birch, aspen and oak – nine years of saproxylic fungi succession. **Biological Conservation**, Uppsala, Sweden, v. 119, p.443-454, 6 jan. 2004.

LINDBLAND, I.. Wood-inhabiting fungi on fallen logs of Norway spruce: relations to forest management and substrate quality. **Nordic Journal of Botany**, Norway, p. 243-255. 1 jan. 1998.

LINDBLAD, I.. Host specificity of some wood-inhabiting fungi in a tropical forest. **Mycologia**, Lawrence, Ks, v. 92, n.3, p.399-405, 2000.

LINDBLAND, I.. Diversity of poroid and some corticioid wood-inhabiting fungi along the rainfall gradient in tropical forests, Costa Rica In: **Diversity and distribution of wood-inhabiting Basidiomycetes on decomposing logs-examples from tropical and boreal forests**. PhD Thesis. University of Oslo, Norway, 1- 23, 2001a.

LINDBLAND, I.. Diversity of poroid and some corticioid wood-inhabiting fungi along the rainfall gradient in tropical forests, Costa Rica. **Journal of Tropical Ecology**, Costa Rica, p. 353-369, 2001b.

LODGE, D. J.; CANTRELL, S.. Fungal communities in wet tropical forests: variation in time and space. **Canadian Journal of Botany**., Canada, v. 73, p.1391-1398, 16 ago. 1995.

LUNDELL, T. K.; MÄKELÄ, M. R.; HILDÉN, K.. Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes – ecological, functional and phylogenetic review. **Journal of Basic Microbiology**, Helsinki, Finland, v. 50, n. , p.5-20, 2010.

LUTTRELL, E. S.. Parasitism of Fungi on Vascular Plants. **Mycologia**, Athens, Georgia, v. 66, n. 1, p.1-15, 29 jan. 1974.

LUTZONI, F. et al. TAssembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. **American Journal of Botany**, New York, p.1446-1480, 2004.

MARTIN, C. G.. Three new Heterobasidiomycetes. **Mycologia** v. 26, p. 261-265, 1934

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

MASON, M.G., BALL A.S., REEDER B.J., SILKSTONE G., NICHOLLS P., WILSON M.T. Extracellular heme peroxidases in Actinomycetes: a case of mistaken identity. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p. 4512-4519, 2001.

MAYER, A. M., STAPLES, R. C., Lacase: New functions for an old enzyme. **Phytochemistry**. v.60, p.551- 565, 2002.

MESSNER, K.; SREBOTNIK, E.. Biopulping: An overview of developments in an environmentally safe paper-making technology. **FEMS Microbiology Reviews**, Vienna Austria, v. 13, n. 2-3, p.351-364, 1994.

MCLAUGHLIN, DJ; MCLAUGHLIN, EG; LEMKE, PA. **The Mycota: Systematics and Evolution**. Vol. VII. Part A Berlin: Springer-verlag, 2001a.

MCLAUGHLIN, DJ; MCLAUGHLIN, EG; LEMKE, PA. **The Mycota: Systematics and Evolution**. Vol. VII. Part B Berlin: Springer-verlag, 2001b.

MOREIRA, S. L.. **Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno.** 2006. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.

NISHIYAMA, Y.; LANGAN, P.; CHANZY, H.. Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. **Journal of the American Chemical Society**, Tokyo, v. 124, n. 31, p.9074-9082, 2002.

NOGUEIRA, E.B.S; CAVALCANTI, M.A.Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, v.27, p.7-9, 1996.

NORDÉN, Björn; PALTTO, Heidi. Wood-decay fungi in hazel wood: species richness correlated to stand age and dead wood features. **Biological Conservation**, Göteborg, Sweden, v. 101, n. 1, p.1- 8, 26 jan. 2001.

NORDÉN, B. et al. Relative importance of coarse and fine woody debris for the diversity of wood-inhabiting fungi in temperate broadleaf forests. **Biological Conservation**, Göteborg, Sweden, v. 117, p.1-10, 9 jun. 2004.

NORSTEDT, G.; BADER, P.; ERICSON, L.. Polypores as indicators of conservation value in Corsican pine forest. **Biological Conservation**, Umeå, Sweden, v. 99, p.347-354, 3 maio 2001.

NYANHONG, G. et al. Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. **Bioresource Technology**, -----, v. 84, p.259-263, 2002.

OLIVEIRA, Eurico Cabral de. **Introdução à Biologia Vegetal.** 2ª São Paulo: Edusp, 2003. 266 p.

ONYSKO, Kira A. et al. Biological bleaching of chemical pulps: A review. **Biotechnology Advances**, Waterloo, Ontario, Canada, v. 11, n. 2, p.179-198, 1993.

PAYEN, Anselme. Me´moire sur la composition du tissue des plantes et du ligneux. **Comptes Rendus**, -----, v. 7, p.1052-1056, 1838.

RAJAKUMAR, S. et al. LiP-like genes in *Phanerochaete sordida* and *Ceriporiopsis subvermispora*, white rot fungi with no detectable lignin peroxidase activity. **Applied And Environmental Microbiology**, -----, v. 62, p.2660-2663, 1996.

PENTTILA, Reijo; SIITONEN, Juha; KUUSINEN, Mikko. Polypore diversity in managed and old-growth boreal *Picea abies* forests in southern Finland. **Biological Conservation**, Helsinki, Finland, v. 117, p.271-283, 6 jan. 2004.

REDDY, G.V.B.; GELPKE, M.D.S.; GOLD, M.H. Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of reductive dechlorination. **Journal of Bacteriology**. v.180, p. 5159-5164,1998.

REID, Ian D.; PAICE, Michael G.. Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. **Biotechnology Advances**, Pointe-claire, Quebec, Canada, v. 13, n. 2-3, p.1369-375, 1994.

REGINA, Magali; BROETTO, Fernando. Atividade de enzimas oxidativas do *lentivula edodes* em meio de cultura líquida de subprodutos energéticos. **Energia Agrícola**, Botucatu, v. 20, n. 1, p.47-61, 2005.

RYVARDEN, L.. **Neotropical polypores Part 1**. Oslo: Fungiflora, 2004. 229 p.

RODRIGUES, E.C.. **Caracterização citogenética e bioquímica do fungo celulolítico *Humicola sp.***.Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1987.

ROLSTAD, J. et al. Wood-decaying fungi in boreal forest: are species richness and abundance influenced by small-scale spatiotemporal distribution of dead wood? **Biological Conservation**, Ås, Norway, v. 117, n. , p.539-555, 1 jun. 2004.

RUTTIMANN, C. et al. Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycetes *Phlebia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispora*. **Biotechnology And Applied Biochemistry**, -----, v. 16, n. , p.64-76, 1992.

SAMUELSSON, J.; GUSTAFSSON, L.; INELOG, T.. **Dying an dead trees-a review of their importance for biodiversity**. Sweden: Swedish Threatened Species Unit, p. 110, 1994.

SHELLER, Henrik Vibe; ULVSKOV, Peter. Hemicelluloses. **Annual Review Of Plant Biology**, Emeryville, California, v. 61, p.263-289, 2010.

SANTOS, F. H.. Análise Conformacional de modelos de lignina. **Química Nova**, Juiz de Fora - Mg, v. 24, n. 4, p.480-490, 2001.

SHEARER, C.A. Fungal competition. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 1259-1264, 1995.

SHIN, K. S.. The role of enzymes produced by white-rot fungus *Irpex lacteus* in the decolorization of the textile industry effluent. **Journal of Microbiology**, -----, p.19-26, 2004.

SINGER, R.. **The *Ágaricales* (mushrooms) in modern taxonomy**. Lilloa: 1-832. 1951.

SIPPOLAA, Anna-Iiisa; RENVALL, Pertti. Wood-decomposing fungi and seed-tree cutting: A 40-year perspective. **Forest Ecology And Management**, Rovaniemi, Finlândia, v. 115, n. --, p.183-201,1999.

SOUZA, J.V.B. et al. Fungal treatment of a delignification effluent from a nitrocellulose industry. **Bioresource Technology**, Lorena, São Paulo, v. 96, p.1936-1942, 2005.

SOUZA, CGM et al. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. **Journal of Basic Microbiology**, -----, p.129-136, 2004.

STALPERS, J.A.; LOERAKKER, W.M.. Laetisaria and Limonomyces species (Corticaceae) causing pink diseases in turf grasses. **Canadian Journal Botan Y**, Canada, p. 529-537, 1982.

SUN, Ye; CHENG, Jiayang. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Raleigh, v. 83, p.1-11, 2002.

SVERDRUP-THYGESON, A.; LINDENMAYER, D.B.. Ecological continuity and assumed indicator fungi in boreal forest: the importance of the landscape matrix. **Forest Ecology And Management**, Oslo, Norway, v. 174, n. , p.353-363, 23 jan. 2002.

SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R. K.; SINSABAUGH, R. L.; LINKINS, A. E., **Mycologia**, v. 81, p. 234, 1984.

TALBOT, P.h.b.. Aphyllophorales I: General characteristics. Telephoroid and cupuloid families. In: AINSWORTH, G. C.; SPARROW, F.k.; SUSSMAN, A.. **The fungi - An advanced treatis**. IIVB Nova York: Academic Press, 1973. p. 327-349.

TSAPRAILIS, G.; ENGLISH, A.M. Catalytic structure–function relationships in heme peroxidases. **Advances In Inorganic Chemistry**, -, v. 43, n. , p.79-125, 1995.

THURSTON, Ch.. The structure and function of fungal lacasses. **Microbiology**, London, v. 140, p.19-26, 1994.

TIEN, M.; KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂ requiring oxygenase. **Proceeding of the National Academy of Science USA**, v. 81, p. 2280-2284, 1984.

TUOR U, WINTERHALTER K, FIECHTER. A Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology** v. 41, p. 1–17, 1995.

van BEILEN, Jb; LI, Z.. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion In Biotechnology**, -----, v. 13, n.4, p.338-344, 2002.

VYAS, B. R. M.; VOLC, J.; SASEK, V.. Effects of temperature on the production of manganese peroxidase and lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. **Folia Microbiologica**, Praga, v. 39, n. 1, p.19-22, 1994.

WELINDER, K.G.; MAURO, J.M.; NORSKOV-LAURITSEN, L.. Structure of plant and fungal peroxidases. **Biochemical Society**, -, v. 20, p.337-340, 1992.

WELINDER, K.G.; GAJHEDE, M.. Structure and Evolution of Peroxidases. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 3., 1993, Denmark. **Proceedings of : Plant**

Peroxidases Biochemistry and Physiology.. Denmark: University of Geneva, 1993. p.10 - 14.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N.. Whiterot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, Louvain-la-neuve, Belgica, v. 22, p.161-187, 2003.

WONG, Dominic W. S.. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Albany, v. 157, p.174-209, 2009.

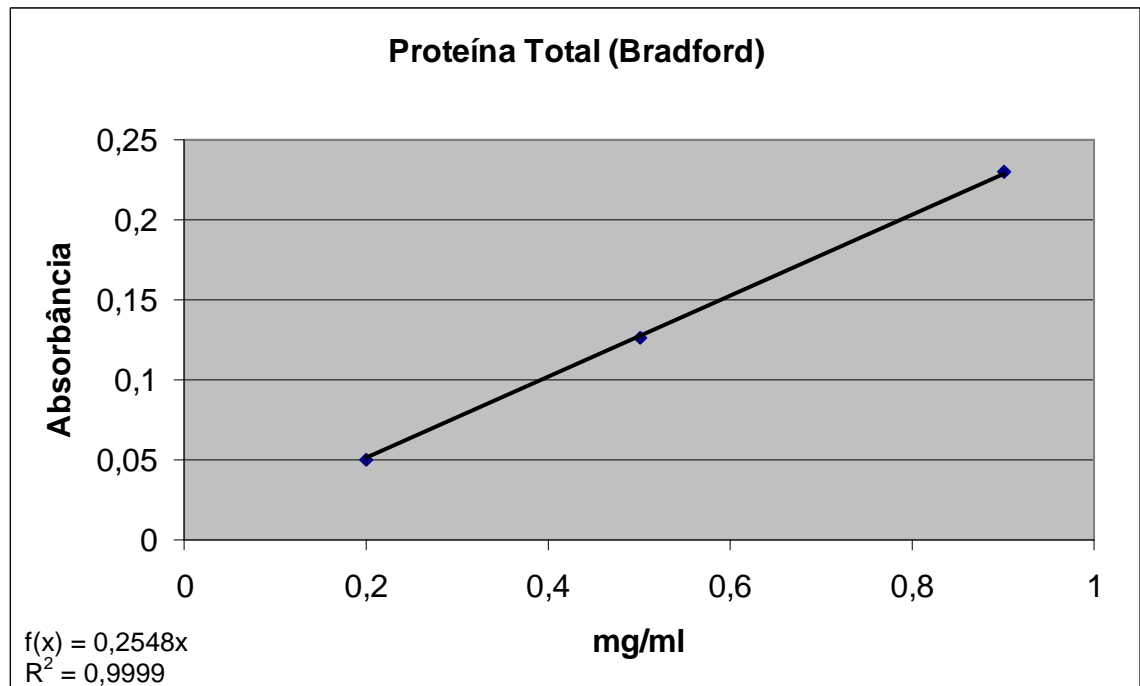
XIAO, Y. et al. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, -----, v. 60, p.700-707, 2003.

XU, C.; MA, F.; ZHANG, X.. Lignocellulose degradation and enzyme production by *Irpex lacteus* CD2 during solid-state fermentation of corn stover. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, Wuhan, p. 372-375, 2009.

YOSHIDA, H.. Chemistry of lacquer (Urushi). Part 1. **Journal Of The Chemical Society**, Japão, p. 472-486. 1883.

ZHANG, H. et al. Efficient production of laccases by *Trametes* sp. AH28-2 in cocultivation with a *Trichoderma* strain. **Appl. Microbiol. Biotechnol Chemical Socytie**, -----, v. 73, p.89-94, 2006.

ZHAO, L. H. et al. Decolorization of cotton pulp black liquor by *Pleurotus ostreatus* in a bubble-column reactor. **Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology**, New York, v. 80, p.44-48, 2008.

APÊNDICE I**CURVA PADRÃO DE ALBUMINA PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS****Figura A19:** Gráfico da Curva de Proteína total pelo método de Bradford.

APÊNDICE II

DADOS REFERENTES AOS CÁLCULOS DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DAS ENZIMAS DE INTERESSE.

Tabela A13: Dados referentes aos cálculos da atividade específica das enzimas de interesse.

Ensaio	Lacase (U/L)	LiP (U/L)	MnP (U/L)	Proteína Total (mg/L)	Atividade Específica (Lacase)	Atividade Específica (LiP)	Atividade Específica (MnP)
1	-0,476068376	-4,80585424	-6,95690085	0,0004	-1109,71649	-11202,45744	-16216,55209
2	-0,998290598	-14,202509	-4,07324365	0,1444	-6,91433	-98,36895	-28,21197
3	1,456410256	-3,56332139	-0,59790732	0,1088	13,38846	-32,75684	-5,49643
4	-0,349145299	-3,73058542	-0,89686099	0,0761	-4,58828	-49,02537	-11,78607
5	-0,088034188	-0,69892473	-1,50722471	0,0509	-1,72982	-13,73349	-29,61614
6	0,435042735	-3,53046595	-0,17438964	0,0941	4,62089	-37,49951	-1,85231
7	1,845726496	-3,14814815	-7,6856004	0,4799	3,84622	-6,56027	-16,01564
8	0,045726496	-5,22401434	-4,45316393	0,3618	0,12639	-14,43975	-12,30904
9	8,332905983	-1,39784946	5,31265571	0,1271	65,54634	-10,99543	41,78916
10	0,953846154	-6,869773	10,3699552	0,0841	11,34329	-81,69645	123,32119
11	22,90641026	-12,9002389	99,9750872	0,2458	93,18746	-52,48053	406,71692
12	-0,219230769	-4,40860215	3,64972596	0,1895	-1,15677	-23,26206	19,25784
13	13,11837607	-9,62066906	24,6263079	0,0645	203,52767	-149,26180	382,06978
14	0,183760684	0,85424134	-42,6133533	0,1803	1,01920	4,73792	-236,34825
15	44,74786325	3,89784946	55,692576	0,1789	250,05931	21,78190	311,22038
16	0,284615385	-4,5818399	2,877429	0,1609	1,76868	-28,47278	17,88111
17	2,906837607	-10,0149343	58,6385152	0,1415	20,54738	-70,79193	414,49435
18	1,538888889	6,32019116	54,6586946	0,0225	68,26157	280,34915	2424,53400
19	0,447863248	0,87216249	43,8839063	0,0165	27,11693	52,80713	2657,05415
20	9,29957265	-9,51314217	64,5553064	0,0221	421,38623	-431,06358	2925,15775