

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

VALDEIR ARANTES

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

Lorena – SP
2008

VALDEIR ARANTES

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

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

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

**Lorena - SP
2008**

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

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

Arantes, Valdeir

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

163 f. : fig.

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

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

579.26 - CDU

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

AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação que agradeço:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

ARANTES, V. **Characterization of low molecular weight Fe³⁺-reducing compounds produced by fungi and mediation of Fenton reaction to degrade polysaccharides and lignin.** 2008. 163p. Thesis (Doctoral in Industrial Biotechnology) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

Brown and white rot fungi produce enzymes to degrade wood. The former produce hydrolytic and oxidative enzymes while the latter produce mainly hydrolytic enzymes. The degradation of polysaccharides and lignin by brown and white-rot fungi, respectively, do not occur next to the fungal hyphae and cannot be explained only by the enzymatic action due to the small pore size of sound wood. In this work, it was studied a non-enzymatic degradative system involving low molecular weight compounds (LMWC) with Fe³⁺-reducing activity in wood decay fungi. The brown rot fungus *Wolfiporia cocos* and the selective white rot *Perenniporia medulla-panis* were grown under varying concentration of iron. The micelial and extracellular Fe³⁺-reducing activity as well as the production of specific iron chelators (catechol and hydroxamate derivatives) were induced under iron starvation. SDS-PAGE gels of cellular proteins showed several proteins negatively iron-regulated in *P. medulla-panis* and in *W. cocos*, especially for proteins of 10 – 30 kDa. When the fungi were grown with different simple carbon source with and without microcrystalline cellulose supplementation and under iron restriction, they produced LMWC with Fe³⁺-reducing activity, which production was stimulated in the presence of cellulose. Capillary electrophoresis analyses of metal chelating compounds extracted from the growth media that promoted the highest Fe³⁺-reducing activity (L-ornithine/cellulose for *P. medulla-panis* and glucose/cellulose for *W. cocos*) in the presence and absence of iron, confirmed that, especially *P. medulla-panis* produces extracellular compounds that are iron-regulated. LMWC purified from these media showed Fe³⁺-reducing activity at pH 2.0 even when oxalic acid was added up to 20 fold the iron concentration. At pH 4.5, the Fe³⁺-reducing activity was detected at an oxalic acid concentration up to 10 fold the iron concentration. In both cases the LMWC were capable of reducing Fe³⁺ only when it was in its free form or complexed with oxalate to form Fe³⁺-mono-oxalate complex (Fe(C₂O₄)⁺). Among the several LMWC produced by *P. medulla-panis* and *W. cocos* those with Fe³⁺-reducing capability were 4-hydroxy-phenylacetic acid, 1,2-dihydroxy-methyl-benzene, 1,2,3-trihydroxy-benzene and 4-hydroxy-cinnamic acid to *W. cocos* and 1,2-dihydroxy-benzene, and 1,2,3-tri-hydroxy-benzene to *P. medulla-panis*. Both fungi also produce low molecular weight peptides with Fe³⁺-reducing capability. The purified LMWC with Fe³⁺-reducing activity from *P. medulla-panis* (Pmp) and from *W. cocos* (Wc) were utilized in the presence and absence of Fe³⁺ and H₂O₂ (mediated Fenton reaction) to oxidize polysaccharides and lignin in vitro. The highest oxidation levels were obtained with mediated Fenton reactions (Wc-Fe³⁺/H₂O₂ e Pmp-Fe³⁺/H₂O₂). Cellulose degradation by these systems was characterized by a rapid and extensive depolymerization followed by significant oxidation. Analyses of the lignin monomers released from treated and untreated softwood after ¹³C-TMAH thermochemolysis indicated lignin oxidation by the Wc-Fe³⁺/H₂O₂ and Pmp-Fe³⁺/H₂O₂ systems, mainly by demethoxylation and/or demethylation. The synergistic action between LMWC with Fe³⁺-reducing activity and the ligninolytic enzymes was evidenced to the white rot fungi *Lentinula edodes*, *P. medulla-panis* and *Trametes versicolor* with Azure B oxidation assays.

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

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. A) Representação convencional das camadas da parede das células de madeira mostrando a lamela média (LM), parede celular primária (P), as camadas da parede celular secundária (S₁, S₂ e S₃). B) Seção transversal das células de madeira, mostrando LM, S₁, S₂ e S₃, e o lúmen (L). Barra – 10 µm. 18
- Figura 2. Desenho esquemático mostrando as características micro-morfológicas de diferentes tipos de degradação da madeira por fungos. A) Degradação parda; B) Degradação branca seletiva; e C) Degradação branca simultânea. 21
- Figura 3. Álcool veratrílico como um mediador redox na oxidação da lignina catalisada por LiP. 27
- Figura 4. Mecanismo proposto para a oxidação de Mn²⁺ por LiP na presença de álcool veratrílico (AV), ácido oxálico (OA), e oxigênio. 29
- Figura 5. Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica. 31
- Figura 6. Mecanismo proposto de peroxidação de ácido graxo insaturado e geração de radical peroxila. 31
- Figura 7. Uma dos possíveis mecanismos para a oxidação da celulose por •OH. 36
- Figura 8. Reações típicas de •OH com a estrutura principal da lignina (arilglicerol-β-aril éter). 38
- Figura 9. Mecanismo proposto para a geração do radical hidroxila pela reação de Fenton mediada por glicopeptídeos de baixa massa molar produzidos por fungos de decomposição branca e parda. 40
- Figura 10. Mecanismo proposto para a geração do radical hidroxila pela reação de Fenton mediada por compostos aromáticos com atividade redutora de Fe³⁺ produzidos por fungos de decomposição parda. 43
- Figura 11. Mecanismo proposto para redução extracelular de Fe³⁺ e produção de H₂O₂ pelo fungo *G. trabeum* envolvendo compostos aromáticos redutores de Fe³⁺ e uma quinona redutase micelial (DMBQ - 2,5-dimetoxi-1,4-benzoquinona e DMHQ - 2,5-dimetoxi-1,4-hidroquinona). 45
- Figura 12. Modelo para produção do radical hidroxila, a uma certa distância da hifa envolvendo a enzima CDH e ácido oxálico. 47
- Figura 13. Efeito da concentração de ferro no crescimento de *P. medulla-panis* (□) e *W. cocos* (■) em meio sólido. BCF (baixa concentração de ferro); SCF (suficiente concentração de ferro); ECF (elevada concentração de ferro). 80
- Figura 14. Ensaio de detecção de compostos quelantes de ferro produzidos por *P. medulla-panis* cultivado em meio sólido por 7 dias em diferentes concentrações de ferro: A – BCF; B – SCF; e C – ECF. 81
- Figura 15. Ensaio de detecção de compostos quelantes de ferro produzidos por *W. cocos* cultivado em meio sólido por 7 dias em diferentes concentrações de ferro: A – BCF; B – SCF; e C – ECF. 82
- Figura 16. Efeito de diferentes concentrações de ferro no crescimento de *W. cocos*. BCF (■), SCF (●) e ECF (▲). 82
- Figura 17. Efeito de diferentes concentrações de ferro no crescimento de *P. medulla-panis*. BCF (■), SCF (●) e ECF (▲). 83

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

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

