

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS LONDRINA
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL

IGOR SHOITI SHIRAISHI

**ANÁLISE DO PERFIL DE METABÓLITOS RESULTANTE DA MODIFICAÇÃO
ENZIMÁTICA DA LIGNINA KRAFT PELOS ISOLADOS FÚNGICOS Br-274 E
JUMAD002**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA
2017

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS LONDRINA
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL

IGOR SHOITI SHIRAISHI

**ANÁLISE DO PERFIL DE METABÓLITOS RESULTANTE DA MODIFICAÇÃO
ENZIMÁTICA DA LIGNINA KRAFT PELOS ISOLADOS FÚNGICOS Br-274 E
JUMAD002**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Engenharia
Ambiental da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná para obtenção do título
de bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Juliana Feijó de
Souza Daniel

Coorientador: Prof. Dr. Robert Frans
Huibert Dekker

LONDRINA
2017



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Londrina
Coordenação de Engenharia Ambiental



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Monografia

**ANÁLISE DO PERFIL DE METABÓLITOS RESULTANTE DA MODIFICAÇÃO
ENZIMÁTICA DA LIGNINA KRAFT PELOS ISOLADOS FÚNGICOS Br-274 E
JUMAD002**

por

IGOR SHOITI SHIRAISHI

Monografia apresentada no dia 30 de junho de 2017 ao Curso Superior de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Edson Fontes de Oliveira
(UTFPR)

Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana
(UTFPR)

Profa. Dra. Juliana Feijó de Souza Daniel
(UTFPR)
Orientador

Profa. Dra. Edilaine Regina Pereira
Responsável pelo TCC do Curso de Eng. Ambiental

AGRADECIMENTOS

Este Trabalho de Conclusão de Curso representa todo o meu percurso na graduação em Engenharia Ambiental. Assim, não agradeço somente àqueles envolvidos diretamente neste trabalho, mas sim, a todos que fizeram parte da minha vida durante o período de faculdade.

Agradeço a Deus, por me deixar trilhar um caminho abençoado durante esses anos e por me presentear com ótimas companhias. Eu não conseguiria sem o Seu auxílio.

Um agradecimento especial à minha orientadora, Juliana Feijó, que me acompanha desde 2014. Obrigado pela orientação, atenção e por me passar seu apreço pela pesquisa científica. Também ao meu coorientador, Robert Dekker, e sua esposa, Aneli Dekker, que muito me ajudaram na realização deste trabalho. Tenho grande admiração pelas suas carreiras como professores e pesquisadores.

Aos amigos do Laboratório QuiMiBio: Letícia, minha parceira desde outros projetos, Thais, George, Wellington e Isabela. Também agradeço aos que entraram mais recentemente no Laboratório, Karol e Ana, assim como aos demais amigos da universidade, Ana Flávia, Bárbara, Lígia...

À UTFPR, sua estrutura, equipamentos e técnicos – Rafael, Carlos, Érika, Laura, Roberta e Filippe – e pelo auxílio financeiro do edital de apoio ao TCC. À International Foundation for Science, CAPES e CNPq.

Aos professores que compõem minha banca, Edson Fontes de Oliveira e Renato Márcio Ribeiro Viana, agradeço pelos conselhos e por dedicarem parte de seus tempos para correção deste trabalho, desde o TCC1.

Aos integrantes do Laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada (LAMBDA) pelo auxílio nos experimentos.

Aos meus queridos pais, Paulo e Luci, pelo amor incondicional e por me fornecerem todo o necessário para uma educação e formação de qualidade. Obrigado por valorizarem e me ensinarem a valorizar a vida acadêmica. À minha irmã, Aline, e a meus familiares pelo auxílio e incontáveis bons momentos.

Agradeço às amigas que as matérias difíceis me proporcionaram, especialmente àquelas com quem passei muitos finais de semana estudando e fazendo trabalhos: Bruna Sacramento, minha dupla de todas as horas, que me ajudou

do primeiro ao último semestre. Lílian, Carol, Fernanda e Janaina, obrigado pelas intensas horas de companhia nos estudos. Minha casa continua aberta para vocês.

Aos amigos que se tornaram minha família quando morei longe de casa, Caia, Túlio, Paula, Eduardo e Akemi. Vocês não sabem da força que me deram.

Enfim, a todos que me ajudaram em minha graduação, de coração: muito obrigado!

“Apesar de nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles”

(Augusto Cury)

RESUMO

A busca pela modernização dos processos industriais é essencial à competitividade de mercado e à mudança do atual modelo de produção insustentável, extremamente dependente de recursos não-renováveis. A lignina, por exemplo, é um polímero natural e renovável muito abundante no planeta Terra, que pode formar uma série de compostos importantes à indústria, porém seu uso como matéria-prima ainda é fracamente explorado. Com o intuito de fomentar novas pesquisas sobre a produção de compostos de interesse comercial por via biológica, o objetivo deste estudo foi analisar os perfis de metabólitos resultantes da biotransformação da lignina Kraft, a partir da ação enzimática de dois isolados fúngicos selecionados: Br-274 e JUMAD002. Nove fungos foram obtidos pelo isolamento de cogumelos presentes em fragmentos florestais, borra de café, além de outros organismos previamente isolados, compondo a micoteca QuiMiBio da UTFPR Londrina. Os microrganismos foram avaliados, por meio de três parâmetros: velocidade de crescimento micelial, taxa de inibição e presença de modificações, em meio sólido contendo lignina Kraft. Posteriormente, selecionou-se dois fungos para experimento de biotransformação da lignina Kraft em meio líquido de Vogel, com período de incubação de 7, 14 e 21 dias à temperatura ambiente. Para cada tempo de cultivo, obteve-se um extrato livre de células (ELC), que foi utilizado para a quantificação da atividade da enzima lacase por oxidação do substrato ABTS. Ainda, o ELC foi extraído com acetato de etila para a determinação do perfil dos metabólitos por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados do teste em meio sólido demonstraram baixa inibição do fungo JUMAD002 (8,1%) além de mudanças da coloração do meio. Estudos prévios com o fungo Br-274 apresentaram sua comprovada capacidade ligninolítica, sendo esses dois microrganismos selecionados para o experimento de biotransformação. A atividade média da lacase para o fungo Br-274 mostrou-se crescentes com o tempo de incubação, com valor máximo de 9,0 U/mL em 21 dias. O fungo JUMAD002 apresentou máxima atividade aos 14 dias de incubação, com 4,0 U/mL. A análise do perfil de metabólitos revelou que o microrganismo Br-274 não formou novos compostos, indicando a degradação completa dos constituintes da lignina. Já o fungo JUMAD002 apresentou possíveis metabólitos da transformação enzimática do polímero. Os resultados obtidos com o microrganismo JUMAD002 incentivam a continuação do estudo realizado, por meio da identificação dos compostos formados e avaliação da viabilidade da produção dos metabólitos em grande escala.

Palavras-chave: Biotransformação. Biorrefinaria. Atividade enzimática. Cromatografia líquida de alta eficiência.

ABSTRACT

The search for modernization of industrial processes is essential to market competitiveness and to change the current model of unsustainable production, which is highly dependent on non-renewable resources. Lignin, for example, is a very abundant natural and renewable polymer on Earth, which may form a number of important compounds for the industry, but its use as a raw material is still poorly exploited. In order to promote new researches on the production of commercially important compounds by biological means, the objective of this study was to analyze the profiles of metabolites resulting from the biotransformation of the Kraft lignin, from the enzymatic action of two selected fungal isolates: Br-274 and JUMAD002. Nine fungi were obtained from mushrooms present in forest fragments, coffee grounds, as well as other previously isolated organisms, composing the QuiMiBio fungal collection of UTFPR Londrina. The microorganisms were evaluated by three parameters: mycelial growth rate, rate of inhibition and presence of modifications, in solid medium containing Kraft lignin. Subsequently, two fungi were selected for experiment of biotransformation of Kraft lignin in Vogel liquid medium, with incubation period of 7, 14 and 21 days at room temperature. For each culture time, a cell free extract (CFE) was obtained, which was used to quantify the activity of the laccase enzyme by oxidation of the ABTS substrate. Furthermore, the CFE was extracted with ethyl acetate to determine the profile of the metabolites by high performance liquid chromatography. The results of the tests in solid medium showed low inhibition of the fungus JUMAD002 (8.1%) in addition to changes in the color of the medium. Previous studies with the fungus Br-274 showed its proven ligninolytic capacity, so these two microorganisms were selected for the biotransformation experiment. The mean activity of laccase for the Br-274 fungus increased with the incubation time, with a maximum value of 9.0 U/mL in 21 days. The fungus JUMAD002 presented maximum activity at 14 days of incubation, with 4.0 U/mL. Analysis of the metabolite profile revealed that the microorganism Br-274 did not form new compounds, indicating complete degradation of the lignin constituents. The fungus JUMAD002 presented possible metabolites of the enzymatic transformation of the polymer. The results obtained with the microorganism JUMAD002 encourage the continuation of the study, by identifying the formed compounds and evaluating the viability of the metabolites production on large scale

Keywords: Biotransformation. Biorefinery. Enzymatic activity. High performance liquid chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular da celulose.	17
Figura 2 – Estruturas do álcool p-cumarílico (I); álcool coniferílico (II) e álcool sinapílico (III), precursores da lignina.	18
Figura 3 – Ligações mais comuns entre as unidades de fenilpropano e suas respectivas abundâncias.	19
Figura 4 – Segmento de um polímero de lignina.	20
Figura 5 – Degradação de substrato lignocelulósico por ação da hifa fúngica.	23
Figura 6 – Produtos da oxidação de uma molécula dímera de lignina 1-(3,5-dimetoxi-4-hidroximetil)-2-[4-(hidroximetil)-2-metoxifenoxi]-1,3-dihidro-xipropano (1) por MnP produzida por <i>P. caryosporium</i> : (2) forma cetônica de (1), (3) 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona, (4) 2,6-dimetoxi-1,4,-dihidroxibenzeno, (5) 2-[4-(hidroximetil)-2-metoxifenoxi]-3-hidroxiopropanal], (6) seringaldeído, (7) álcool vanílico e (8) vanilina.	26
Figura 7 – Centro de cobre de lacase de <i>Bacillus subtilis</i>	28
Figura 8 – Ciclo catalítico da lacase.	29
Figura 9 – Transformações redox de ABTS à radical catiônico (ABTS•+) e dicatiônico (ABTS ²⁺).	30
Figura 10 – Produtos da biotransformação da subestrutura 1-(3,5- dimethoxy-4-hydroxyphenyl)-2-(3,5-di- methoxy-4-ethoxyphenyl)propane-1,3-diol (I): moléculas II a VII.	31
Figura 11 – Produtos da biotransformação da subestrutura 1-(3,5-dimethoxy-4-ethoxyphenyl)-2-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)propane-1,3-diol (I): moléculas II a IV.	32
Figura 12 – Produtos da biotransformação da subestrutura éter veratril glicerol-β-guaiacil (forma α-carbonila) (I): guaiacol (II) e ácido verátrico (III).	32
Figura 13 – Fluxograma dos processos realizados no estudo.	34
Figura 14 – Ilustração da etapa de inoculação do micélio fúngico no centro da placa de Petri.	36
Figura 15 – Ilustração da etapa de mensuração do diâmetro do micélio fúngico.	37
Figura 16 – Ilustração dos procedimentos de preparo do pré-inóculo e inóculo.	39

Figura 17 – Ilustração do isolado fúngico Br-274 em a) meio BDA após 7 dias de crescimento e b) microscopia 100x.	42
Figura 18 – Ilustração do isolado fúngico JUANT070 em a) meio BDA após 4 dias de crescimento e b) microscopia 500x.	43
Figura 19 – Ilustração do isolado fúngico JUMAD001 em a) meio BDA após 7 dias de crescimento e b) microscopia 100x.	44
Figura 20 – Ilustração do isolado fúngico JUMAD002 em a) cogumelo, b) meio BDA após 3 dias de crescimento e c) microscopia 100x.	44
Figura 21 – Ilustração do isolado fúngico JUMAD003 em a) cogumelo, b) meio BDA após 7 dias de crescimento e c) microscopia 100x.	45
Figura 22 – Ilustração do a) verso e b) anverso do isolado fúngico JUMAD004 meio BDA sólido após 7 dias de crescimento.	46
Figura 23 – Ilustração do isolado fúngico JUMAD005 em a) cogumelo, b) meio BDA após 7 dias de crescimento e c) microscopia 100x.	46
Figura 24 – Ilustração de a) um cogumelo do gênero Ganoderma e b) o isolado fúngico JUMAD006 em meio BDA após 7 dias de crescimento.	47
Figura 25 – Ilustração do isolado fúngico JUCAF001 em a) meio BDA após 7 dias de crescimento e b) microscopia 500x.	48
Figura 26 – Crescimento do micélio dos nove isolados fúngicos.	49
Figura 27 – Comparação entre tratamento (placa à esquerda) e controle (placa à direita) dos fungos a) JUMAD002 e b) Br-274.	50
Figura 28 – Formação de halo no a) anverso e b) verso da placa de Petri pelo fungo JUMAD002.	51
Figura 29 – Cromatograma da lignina Kraft sem tratamento, extraída do meio líquido	55
Figura 30 – Cromatogramas dos extratos de controle do fungo Br-274 em a) 7 dias, b) 14 dias e c) 21 dias.	56
Figura 31 – Cromatogramas dos extratos de tratamento da lignina Kraft pelo fungo Br-274 em a) 7 dias, b) 14 dias e c) 21 dias.	57
Figura 32 – Cromatogramas dos extratos de controle do fungo JUMAD002 em a) 7 dias, b) 14 dias e c) 21 dias.	60
Figura 33 – Cromatogramas dos extratos de tratamento da lignina Kraft pelo fungo JUMAD002 em a) 7 dias, b) 14 dias e c) 21 dias.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado da taxa de inibição dos nove isolados fúngicos.....	50
Tabela 2 – Atividade enzimática da lacase produzida pelo fungo Br-274.	52
Tabela 3 – Atividade enzimática da lacase produzida pelo fungo JUMAD002.....	53
Tabela 4 – Massa seca dos extratos de Br-274 e JUMAD002.....	54
Tabela 5 – Principais compostos revelados por CLAE da lignina Kraft.	55
Tabela 6 – Principais compostos revelados por CLAE dos extratos de controle do fungo Br-274.....	58
Tabela 7 – Compostos exclusivos revelados por CLAE dos extratos de tratamento do fungo JUMAD002.	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVOS GERAIS	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 COMPONENTES DA MADEIRA	17
3.1.1 Celulose.....	17
3.1.2 Hemicelulose	17
3.1.3 Lignina	18
3.2 O PROCESSO KRAFT	20
3.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FUNGOS	21
3.4 BIOTRANSFORMAÇÃO DA LIGNINA POR FUNGOS	22
3.4.1 Fungos da podridão marrom.....	23
3.4.2 Fungos da podridão branca.....	24
3.5 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS.....	24
3.5.1 Manganês peroxidase (MnP).....	25
3.5.2 Lignina peroxidase (LiP)	26
3.5.3 Lacase (Lac).....	27
3.6 METABÓLITOS DA BIOTRANSFORMAÇÃO DA LIGNINA	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO	34
4.2 ANÁLISE DO CRESCIMENTO FÚNGICO EM MEIO SÓLIDO CONTENDO LIGNINA KRAFT	35
4.2.1 Velocidade de crescimento do micélio	36
4.2.2 Taxa de inibição	37
4.2.3 Modificações no meio sólido	37

4.3 CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO LIGNINA KRAFT.....	38
4.3.1 Preparo do pré-inóculo	38
4.3.2 Cultivo em meio líquido.....	38
4.4 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE	39
4.5 EXTRAÇÃO E GERAÇÃO DO PERFIL DE METABÓLITOS.....	40
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	42
5.1.1 Isolado fúngico Br-274.....	42
5.1.2 Isolado fúngico JUANT070.....	42
5.1.3 Isolado fúngico JUMAD001	43
5.1.4 Isolado fúngico JUMAD002.....	44
5.1.5 Isolado fúngico JUMAD003.....	45
5.1.6 Isolado fúngico JUMAD004.....	45
5.1.7 Isolado fúngico JUMAD005.....	46
5.1.8 Isolado fúngico JUMAD006.....	47
5.1.9 Isolado fúngico JUCAF001	47
5.2 ANÁLISE DA VELOCIDADE DE CRESCIMENTO DO MICÉLIO.....	48
5.3 ANÁLISE DA TAXA DE INIBIÇÃO.....	49
5.4 ANÁLISE DAS MODIFICAÇÕES NO MEIO SÓLIDO	51
5.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE DE Br-274 E JUMAD002.....	52
5.6 ANÁLISE DO PERFIL DE METABÓLITOS	54
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICE A - Espectros de UV-VIS dos compostos e respectivos tempos de retenção (TR).....	72

APÊNDICE B - Áreas dos picos referentes aos principais compostos abordados no tratamento da lignina Kraft, de acordo com o fungo estudado e tempo de cultivo.....	75
--	-----------

1 INTRODUÇÃO

A indústria de exploração da madeira é muito importante economicamente para a América do Sul, sendo o Brasil um de seus maiores representantes. Contudo, a modernização dessas indústrias é vital para se manterem no mercado com crescimento contínuo e sustentável. Isto pode ser alcançado pela implementação de novas técnicas ambientalmente amigáveis, capazes de produzir maior quantidade de valor a partir do aproveitamento mais completo e eficiente de uma quantidade fixa de recursos.

As indústrias papelarias que utilizam o processo Kraft, metodologia mais comum para a extração da celulose, produzem grande quantidade de licor negro, um subproduto que contém uma variedade de substâncias, como a lignina e seus derivados fenólicos. A lignina é um polímero aromático heterogêneo natural e é o segundo biopolímero vegetal mais abundante no planeta Terra depois da celulose, no entanto, seu uso como um recurso renovável é fracamente explorado.

Das milhões de toneladas anuais de lignina resultantes do processo de polpação (transforma o material vegetal em matéria-prima para a fabricação do papel) no mundo, apenas cerca de 2% do polímero potencialmente disponível é comercializado como agente de dispersão ou ligação. A maior parte de sua massa é queimada para geração de bioenergia de baixo custo pelas indústrias papelarias, o que não condiz com o desenvolvimento sustentável, leva à geração de gases de efeito estufa e à perda de compostos químicos valiosos presentes na madeira.

As substâncias presentes na lignina têm grande potencial como matérias-primas em diversos ramos da indústria como: bioenergético, químico, farmacêutico e alimentício. O composto fenólico siringaldeído, por exemplo, pode ser produzido pela oxidação do polímero e tem propriedades antifúngicas, antimaláricas, inseticidas e antioxidantes, mas a produção em larga escala ainda é inviável economicamente. Outros compostos de interesse como a vanilina e o guaiacol também poderiam ser produzidos, porém enfrentam as mesmas barreiras tecnológicas.

Pouco se sabe sobre a degradação biológica da lignina, sendo os processos químicos mais presentes na literatura. A transformação do polímero por microrganismos tende a agregar grande quantidade de valor ao processo, uma vez que tratamentos biológicos costumam ser menos agressivos ao meio ambiente e mais

baratos. Isto aumenta a possibilidade de aceitação do processo tanto pela sociedade quanto pela indústria.

É fato que o atual sistema produtivo é extremamente dependente de recursos fósseis esgotáveis e com grande potencial poluidor. Assim, é de grande importância o desenvolvimento de novas técnicas viáveis que garantam exploração sustentável de um recurso natural renovável, oferecendo uma alternativa ao atual sistema insustentável de produção e consumo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem por objetivo analisar os perfis de metabólitos resultantes da biotransformação da lignina Kraft, a partir da ação enzimática de dois isolados fúngicos pertencentes à micoteca do laboratório QuiMiBio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar fungos com potencial de biotransformar a lignina Kraft.
- Selecionar dois isolados fúngicos a partir de testes em meio sólido contendo lignina Kraft.
- Quantificar a atividade da enzima lacase em cada um dos diferentes tempos de cultivo em meio líquido.
- Determinar o perfil de metabólitos resultante da biotransformação da lignina Kraft por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) a partir do cultivo em meio líquido.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 COMPONENTES DA MADEIRA

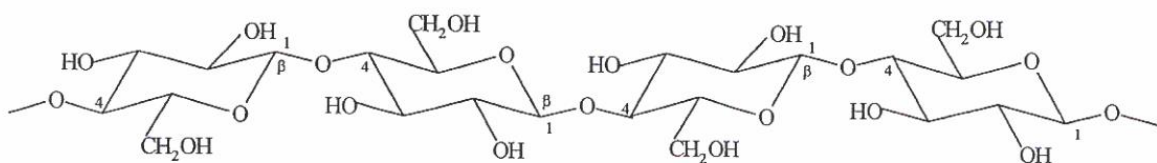
A madeira é um recurso bastante versátil e de grande resistência mecânica. Sua composição é basicamente celulose, hemicelulose e lignina, representando no conjunto cerca de 95% de seu peso (FENGEL; WEGENER, 1984).

3.1.1 Celulose

A celulose representa o principal composto da madeira, responsável por 40 a 50% de seu peso seco. É um polímero de cadeia longa, constituído por moléculas de glicose unidas por ligações β (1 \rightarrow 4), conforme a Figura 1 (AGAPITO, 2007). Entre as várias cadeias, estabelecem-se ligações de hidrogênio, formando fibrilas elementares. O conjunto das fibrilas elementares forma as microfibrilas, considerada como unidades estruturais da parede celular. O conjunto de microfibrilas é denominado fibrila e esta origina a fibra de celulose (ESTEVES, 2011).

A celulose apresenta muitas partes com alto grau de ordenação (frações cristalinas), garantindo-lhe rigidez, densidade e resistência. Já as ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares são responsáveis por sua insolubilidade e baixa reatividade (AGAPITO, 2007).

Figura 1 – Estrutura molecular da celulose.



Sjostrom (1981).

3.1.2 Hemicelulose

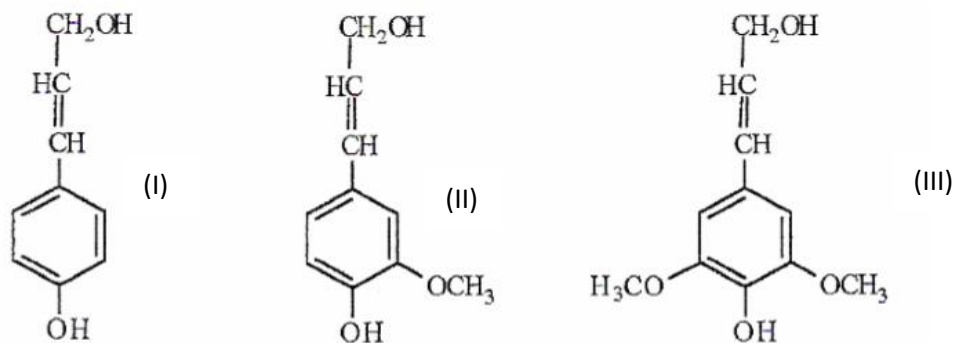
A hemicelulose é um polissacarídeo intimamente associado à celulose. É um composto estrutural na parede celular das plantas e desempenha funções na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal (SJOSTROM, 1981). Sua

estrutura é composta por ácidos hexurônicos, hexoses e pentoses em quantidades variáveis de acordo com a parte e a espécie da árvore (FENGEL; WEGENER, 1984).

3.1.3 Lignina

A lignina, também conhecida por lenhina, é um dos compostos aromáticos mais abundantes na biosfera e o mais abundante composto aromático em plantas vasculares (SJOSTROM, 1981), onde proporcionam grande coesão entre as fibras dos tecidos vegetais (LISBOA et al., 2005). A lignina é uma substância formada por diversas unidades de fenilpropano, como o *p*-cumarílico (I), o álcool coniferílico (II) e o álcool sinapílico (III), ilustrados na Figura 2.

Figura 2 – Estruturas do álcool *p*-cumarílico (I); álcool coniferílico (II) e álcool sinapílico (III), precursores da lignina.



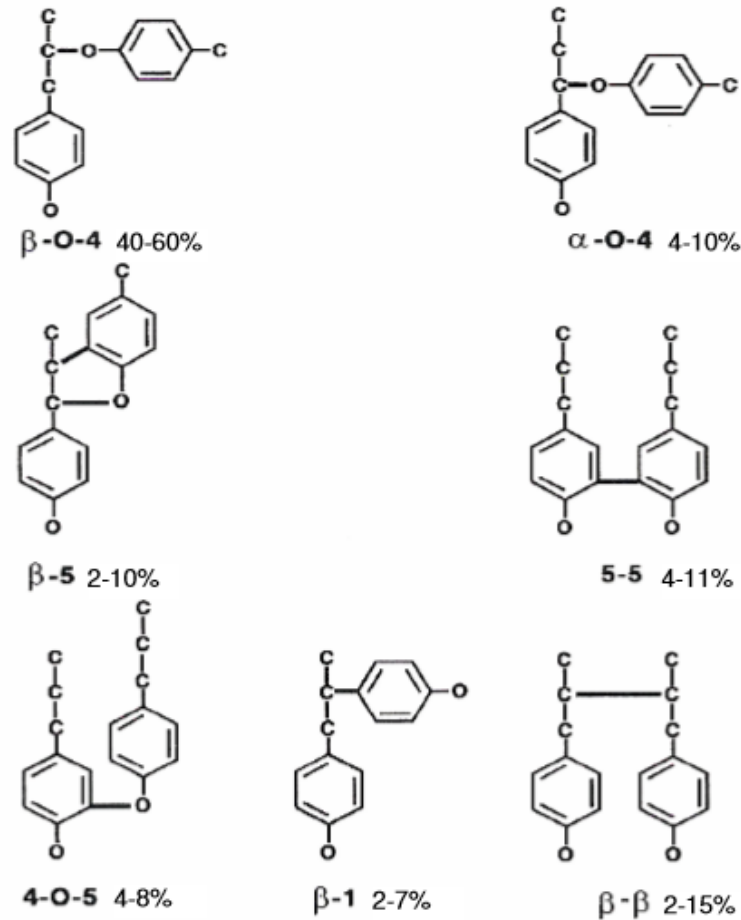
Sjostrom (1981).

Ligações carbono-oxigênio (C-O-C) de éter são as predominantes entre as unidades de fenilpropano, enquanto as ligações restantes são do tipo carbono-carbono (C-C) (SJOSTROM, 1981). As moléculas de lignina são formadas por polimerização, por meio de enzimas peroxidases das plantas (ESTEVEZ, 2011).

A lignina possui estrutura química bastante irregular e indefinida, podendo apresentar-se sob uma série de subestruturas (Figura 3), das quais a mais abundante apresenta a ligação (β -O-4) entre as unidades de fenilpropano (SJOSTROM, 1981).

As principais características químicas da lignina são heterogeneidade, alto peso molecular, estrutura irregular, alta insolubilidade e recalcitrância (Figura 4). O tipo de lignina varia com as características da madeira: em gimnospermas – “softwood” –, a lignina é constituída por unidades de tipo *p*-coumarílico e coniferílico, já nas de angiospermas – “hardwood” –, por unidades dos três álcoois (SJOSTROM, 1981).

Figura 3 – Ligações mais comuns entre as unidades de fenilpropano e suas respectivas abundâncias.



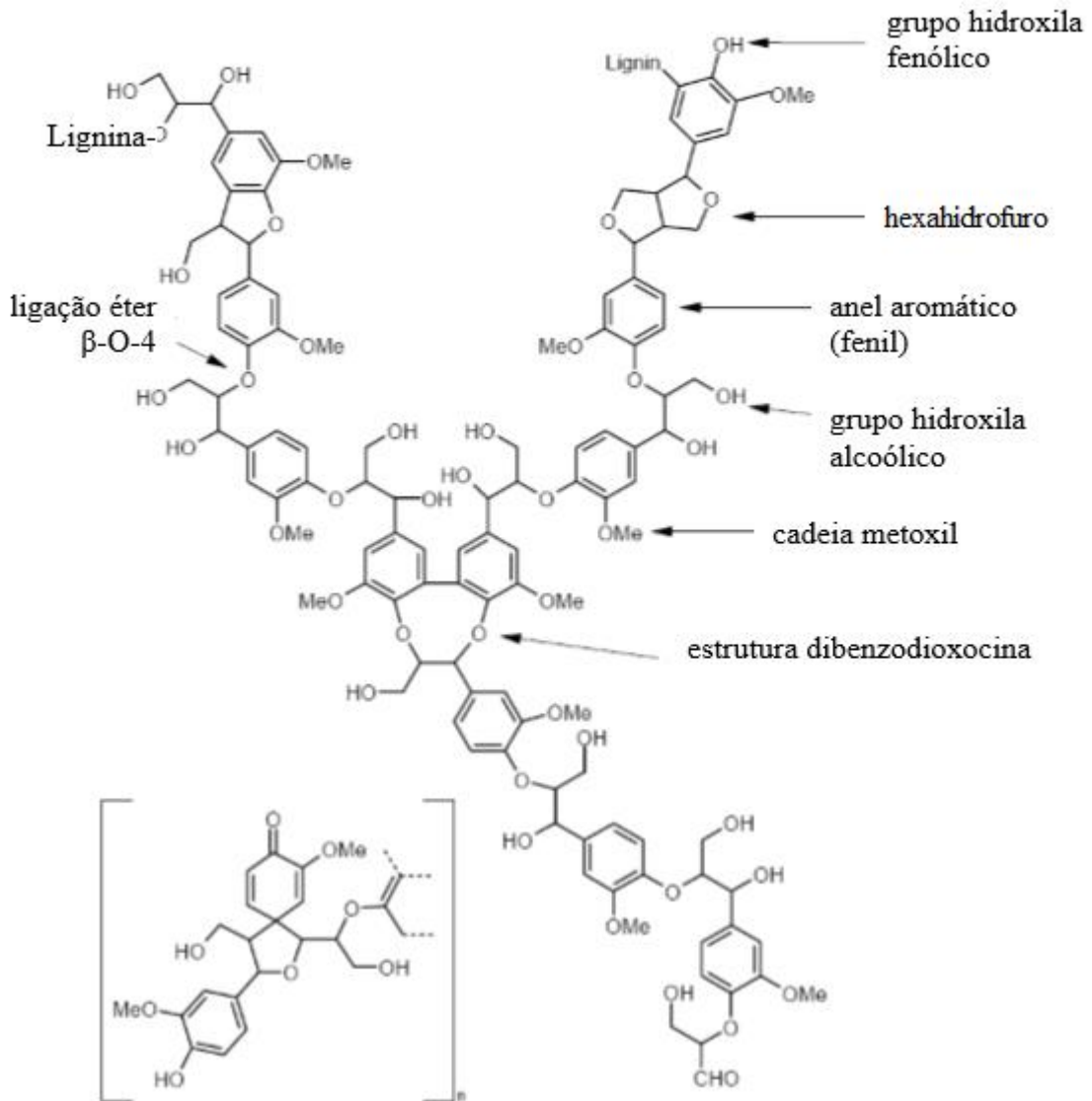
Sjostrom (1981).

Na parede celular vegetal, a lignina encontra-se associada a hemiceluloses por vários tipos de ligações covalentes. O alto grau de ramificação da lignina e o grande tamanho de sua molécula a tornam de difícil incorporação pelos microrganismos, levando a crer que os mecanismos ligninolíticos sejam extracelulares. Estes mecanismos devem ser oxidativos, para que as ligações do tipo éter, estáveis, sejam quebradas (AGAPITO, 2007).

As unidades de fenilpropano da lignina são altamente metoxiladas (presença de grupos CH_3O -), na posição C-3 para as gimnospermas e C-3 e C-5 para angiospermas. O grau de metoxilação varia de acordo com a espécie vegetal (FENGEL; WEGENER, 1984). Na lignina Kraft (oriunda do processo Kraft, descrito em 4.2) mais de 50% das hidroxilas de aromáticos potencialmente reativas podem estar

metoxiladas (HU et al., 2011). Isso é uma grande oportunidade para a exploração de lignina por meio de modificações químicas e biológicas, pois são grupos disponíveis a modificações (BASHTAN-KANDYBOVICH et al., 2012).

Figura 4 – Segmento de um polímero de lignina.



Brunow (2011).

3.2 O PROCESSO KRAFT

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos discorre sobre o processo de polpação Kraft, que é tradicionalmente utilizado pelas indústrias papeleras para a extração da celulose da madeira. A metodologia envolve a digestão por cozimento de aparas de madeira em alta temperatura e pressão pelo licor branco,

uma solução aquosa de sulfeto de sódio e hidróxido de sódio capaz de dissolver a lignina, hemicelulose e extrativos vegetais anteriormente ligados à celulose (USEPA, 1990).

A maioria das indústrias que empregam o processo Kraft utilizam digestores em batelada, que após o cozimento dos materiais, forma o licor negro no local de separação, rico em lignina, compostos orgânicos da madeira, produtos químicos usados na digestão e água. O licor é então concentrado e queimado para reaproveitamento energético dentro da indústria (USEPA, 1990, HARILA; KRIVILINNA, 1999). Assim, o licor negro é a principal fonte de lignina Kraft na indústria e esse subproduto tem grande potencial para aplicações mais nobres (BASHTAN-KANDYBOVICH et al., 2012).

3.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FUNGOS

Os fungos são organismos eucarióticos heterotróficos que podem ser encontrados em diversos ambientes como o solo, a água, o ar, outros organismos e matéria em decomposição. O sucesso na colonização de variados ambientes vem da sua reprodução por esporos, facilmente transportados e de grande resistência às condições externas (BANWART, 1981).

Os fungos, em sua grande maioria, são compostos por hifas – estruturas tubulares, delimitadas pela parede celular – que em conjunto formam os micélios fúngicos (CARLILE, 1995). As hifas podem ou não ser divididas por septos, responsáveis pela segmentação do micélio em unidades similares de células. Os septos apresentam poros, que permitem a troca de estruturas celulares entre diferentes pontos do micélio (GRIFFIN, 1993).

Existe grande variedade de ciclos reprodutivos entre as espécies fúngicas, sendo essa uma importante característica na classificação desses organismos em grupos (MAIA; CARVALHO JUNIOR, 2010). Dentre os grupos mais estudados encontram-se os ascomicetos e os basidiomicetos. O primeiro grupo é o que apresenta maior número de organismos, com cerca de 28.600 espécies (HAWKSWORTH; SUTTON; AINSWORTH, 1983), representando cerca de 75% das espécies fúngicas. Os ascomicetos caracterizam-se pela formação do ascósporo (esporo) no interior de segmentos especializados das hifas, denominado asco (GRIFFIN, 1993).

O grupo dos basidiomicetos compreendem cerca de 25% das espécies fúngicas e caracterizam-se pela formação dos basidiósporos (esporos) por estruturas localizadas nas extremidades das hifas, os basídios. Estes são similares ao asco dos ascomicetos, mas distinguem-se pelo local de formação dos esporos. Enquanto o ascósporo se forma no interior do asco, os basidiósporos se formam externamente ao basídio (GRIFFIN, 1993).

Apesar de serem considerados microrganismos, alguns fungos apresentam estruturas reprodutivas – corpos de frutificação – macroscópicas, conhecidas como cogumelos. Estes podem pertencer ao grupo dos ascomicetos ou basidiomicetos (GUERRERO; HOMRICH, 1999).

3.4 BIOTRANSFORMAÇÃO DA LIGNINA POR FUNGOS

A biotransformação consiste em reações químicas realizadas por um agente biológico que converte determinado substrato em um ou mais produtos de catalisadores enzimáticos. De forma geral, são processos de baixo custo e considerável robustez (ADELIN et al., 2011).

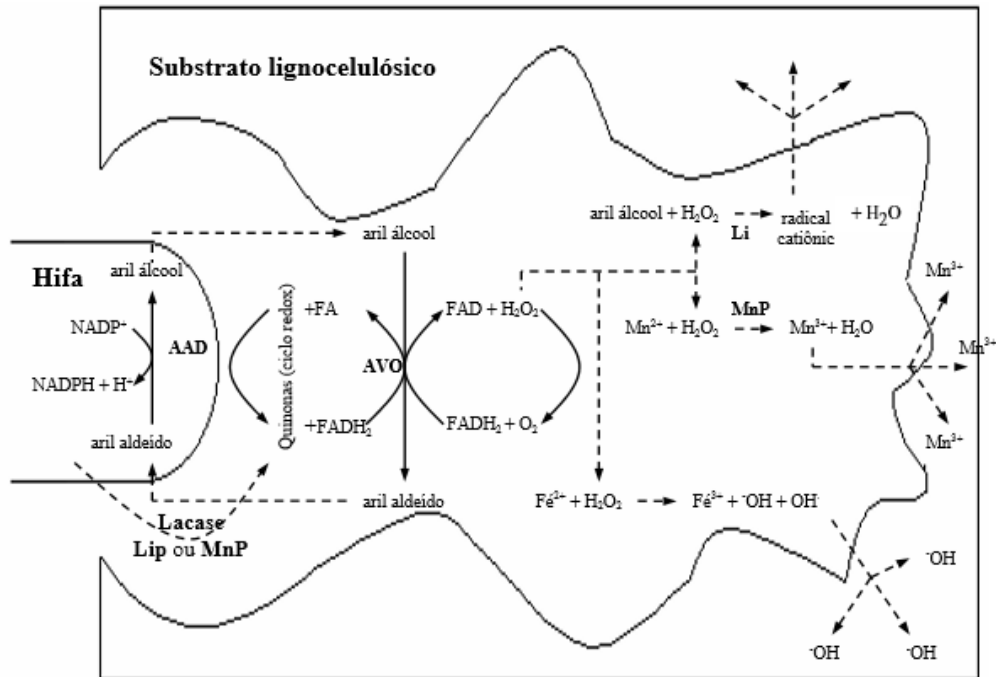
Os fungos são importantes agentes na biotransformação e biodegradação da matéria orgânica e fazem a manutenção do ciclo do nitrogênio, fósforo e potássio, ao incorporarem essas substâncias à sua biomassa (SALVI, 2011). Além de degradarem um amplo espectro de compostos orgânicos, os fungos apresentam o desenvolvimento de hifas, que aumentam a superfície de contato com o material a ser degradado, otimizando a eficiência do processo (CETEM, 2008).

A ação da hifa sobre a madeira a ser degradada e a relação entre as enzimas e radicais no processo de transformação de substratos lignocelulósicos são ilustrados na Figura 5. As enzimas são secretadas pelas hifas, que agem em conjunto com outras enzimas e mediadores na oxidação dos componentes da madeira. A enzima lacase (Lac), por exemplo, oxida os radicais derivados de lignina, como hidroquinonas e semiquinonas, produzindo oxigênio. Este é utilizado por outras enzimas, como glioxal oxidase (GOx) e/ou álcool veratrílico oxidase (AVO). AVO e GOx, por sua vez, produzem H_2O_2 , substrato para atividade das enzimas lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) (LEONOWICZ et al., 1999).

O estudo da modificação da lignina por fungos é mais voltado aos basidiomicetos (BUGG et al., 2011). Estes contemplam grupos de fungos capazes de

degradar a madeira, como os de podridão branda, podridão marrom e podridão branca (BLANCHETTE, 1995). Entretanto, as enzimas ligninolíticas podem ser produzidas por diversos fungos, como o ascomiceto *Botryosphaeria rhodina*, produtor de lacase (BASHTAN-KANDYBOVICH et al., 2012).

Figura 5 – Degradação de substrato lignocelulósico por ação da hifa fúngica.



Moreira Neto (2006), adaptado de Leonowicz et al. (1999).

Os principais obstáculos à utilização de fungos no tratamento da lignina vêm de sua sensibilidade a ambientes extremos e condições críticas de substrato, como baixas concentrações de oxigênio dissolvido, pH elevado e altas concentrações da lignina (DANIEL; NILSSON, 1998).

3.4.1 Fungos da podridão marrom

Os fungos da podridão marrom desenvolvem-se principalmente sobre gimnospermas, onde degradam os polissacarídeos da madeira após uma modificação parcial da lignina. O processo resulta em um material de coloração marrom devido à lignina oxidada. Esse grupo de fungos representa apenas 7% de todos os basidiomicetos degradados de madeira (BUGG et al., 2011).

Exemplos de fungos da podridão marrom incluem *Coniophora puteana* (PANDEY; PITMAN, 2003), *Monilinia* spp, *Torula fructigena*, *Sclerotinia fructigena*, *Ciboria fructicola*, *Oospora fructigena* (BYRDE; WILLETTS, 1977), *Postia placenta* e *Gloeophyllum trabeum* (FILLEEY et al., 2002).

3.4.2 Fungos da podridão branca

De forma geral, os fungos de podridão branca recebem maior atenção em estudos de degradação da lignina por apresentarem um sistema enzimático bastante eficiente (HATAKKA, 1994). Assim, também tendem a apresentar melhores resultados na modificação da lignina quando comparados aos demais microrganismos (MIKIASHVILI et al., 2005).

Os estudos sobre as enzimas e os mecanismos de ataque a lignina demonstram que a dificuldade em atacar o polímero provém de sua irregularidade molecular e pela impossibilidade de ser absorvida por células e degradada por enzimas intracelulares (BUGG et al., 2011). Assim, os fungos da podridão branca desenvolveram mecanismos não-específicos, por enzimas extracelulares, para promover a sua modificação (BARR; AUST, 1994).

Exemplos na literatura de fungos da podridão branca com potencial de atacar a lignina são os basidiomicetos *Phanerochaete chrysosporium* (ORIARAM; LABOSKY JR.; ROYSE, 1989; PANDEY; PITMAN, 2003; BUGG et al., 2011), *Coriolus versicolor* (KAWAI; UMEZAWA; HIGUCHI, 1988; PANDEY; PITMAN, 2003;), *Trametes versicolor* (JOHANSSON; WELINDER; NYMAN, 1993; SCHLOSSER; GREY; FRITSCHÉ, 1997), *Ceriporiopsis vermisporea* (BUGG et al., 2011; FERNANDEZ-FUEYO et al., 2012), *Pleurotus ostreatus* (ORIARAM; LABOSKY JR.; ROYSE, 1989), *Lentinula edodes* (ORIARAM; LABOSKY JR.; ROYSE, 1989) entre outros. Além da espécie de fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* (BASHTAN-KANDYBOVICH et al., 2012; YADA JUNIOR, 2016).

3.5 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

O cultivo de microrganismos em condições adequadas pode proporcionar a produção de enzimas extracelulares ligninolíticas (MIKIASHVILI et al., 2005). A lacase

(Lac), a lignina peroxidase (LiP) e a manganês peroxidase (MnP) são as três enzimas mais importantes nos sistemas enzimáticos ligninolíticos (AGAPITO, 2007) e expressam-se em metabolismo secundário, quando as fontes de carbono ou de nitrogênio são restritas (SWAMY; RAMSAY, 1999)

De acordo com Mikiashvili et al. (2005), a cultura de fungos de podridão branca na presença de lignina induz significativamente a produção de enzimas ligninolíticas, sem a adição suplementar de indutores específicos no meio de cultura. A produção das três enzimas em simultâneo é uma capacidade que só algumas espécies de fungos possuem, entre elas a espécie *Trametes versicolor* (ERIKSSON, 1997).

Apesar das reações enzimáticas de LiP e MnP terem sido caracterizadas pela literatura, não foi comprovado que essas enzimas são responsáveis pela oxidação da molécula integral da lignina. Assim, considera-se que outras reações estão envolvidas nas quebras iniciais do polímero, para posterior ação das enzimas LiP e MnP (BUGG et al., 2011).

3.5.1 Manganês peroxidase (MnP)

A manganês peroxidase (MnP) é produzida por fungos basidiomicetos (HOFRICHTER, 2002) e foi registrada pela primeira vez em uma cepa de *P. cryosporium* (BUGG et al., 2011). Apresenta-se em formas variadas, sendo que uma cepa do fungo da podridão branca *Ceriporiopsis subvermispora* foi capaz de produzir até 11 isoformas dessa enzima (BUGG et al., 2011).

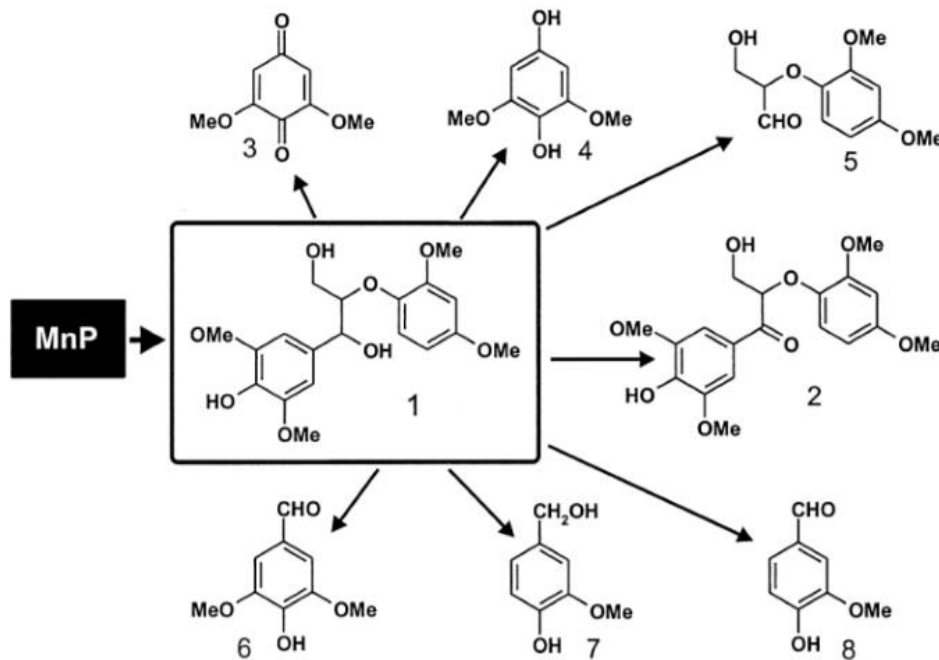
A formação de Mn^{3+} pela enzima MnP é capaz de oxidar os componentes fenólicos da lignina, como mostra o estudo pioneiro de Forrester et al. (1988), que observou alterações na lignina tratada por MnP. Dentre os produtos formados encontravam-se vanilina e ácido protocatecoico. O Mn^{3+} é capaz de oxidar diversos substratos fenólicos, inclusive substratos secundários que se encontram distantes da sua zona ativa, devido ao seu potencial de difusão (BUGG et al., 2011).

Posteriormente, o estudo realizado por Wariishi, Valli e Gold (1991) mostrou modificações químicas promovidas por enzimas na lignina sintética de angiospermas e gimnospermas. Algumas das possíveis moléculas formadas pela ação oxidativa de MnP na biotransformação de lignina são ilustradas na Figura 6.

O sistema enzimático da MnP é bastante promissor na biotransformação da lignina e mostra-se uma valiosa ferramenta para o processo de síntese orgânica

(HOFRICHTER, 2002). Entretanto, ainda são incertas as etapas de ação da enzima sobre seu substrato e quais são todos os microrganismos capazes de produzi-la.

Figura 6 – Produtos da oxidação de uma molécula dímera de lignina 1-(3,5-dimetoxi-4-hidroximetil)-2-[4-(hidroximetil)-2-metoxifenoxi]-1,3-dihidro-xiprano (1) por MnP produzida por *P. chrysosporium*: (2) forma cetônica de (1), (3) 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona, (4) 2,6-dimetoxi-1,4,-dihidroxibenzeno, (5) 2-[4-(hidroximetil)-2-metoxifenoxi]-3-hidroxiopropanal], (6) seringaldeído, (7) álcool vanílico e (8) vanilina.



Hofrichter (2002).

3.5.2 Lignina peroxidase (LiP)

A descoberta da lignina peroxidase ocorreu em 1984, produzida por culturas do fungo *Phanerochaete chrysosporium* (TIEN; KIRK, 1984), a LiP é uma glicoenzima, com um agrupamento de ferro na sua molécula, e exige a presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para sua atividade. Acredita-se que a coevolução de fungos e plantas levou ao surgimento dessa enzima, que promove desaminação de produtos de ácidos aminoaromáticos (SOUZA; ROSADO, 2009).

No processo de ataque à lignina, a LiP é inicialmente oxidada pelo peróxido de hidrogênio e oxida núcleos aromáticos da lignina, fenólicos e não fenólicos, gerando radicais catiônicos. Estes promovem reações espontâneas com H_2O e com oxigênio molecular, quebrando ligações C-C e C-O. Ocorre a despolimerização da lignina e abertura dos anéis aromáticos (KIRK et al. 1978).

3.5.3 Lacase (Lac)

O primeiro registro da enzima lacase (Lac) é atribuído a Yoshida, em 1883, quando a enzima foi extraída da árvore *Rhus vernicifera*, nativa do Japão (THURSTON,1994). A lacase é uma das enzimas com identificação mais antiga, possuindo diversos estudos sobre sua natureza e mecanismos de ação (DESAI; NITYANAND, 2010)

A Lac está relacionada ao metabolismo tanto de eucariontes quanto procariontes (DESAI; NITYANAND, 2010). Diferentemente da maioria das outras enzimas, a lacase fúngica é bastante genérica quanto ao substrato de ação, podendo catalisar a oxidação de um amplo espectro de substâncias fenólicas (VISWANATH et al., 2008). Algumas moléculas não-fenólicas também podem ser atacadas na presença de mediadores químicos como o ABTS 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (OCTAVIO et al., 2006), o HBT (hidroxibenzotriazole) e o ácido 3-hidroxiantranílico (BOURBONNAIS et al., 1995).

As lacases são proteínas multi-cobre e geralmente são codificadas por uma família de genes, cuja expressão pode ocorrer de forma constitutiva – normal ao metabolismo – ou indutiva – acentuada quando em condições apropriadas (KLONOWSKA et al. 2002). Usualmente a enzima origina-se no citoplasma e a ação sobre a lignina depende de sua secreção, entretanto, pouca atenção tem sido dada a tal mecanismo (MAYER; STAPLES 2002). Além da linhagem microbiana, a produção da lacase por fungos é consideravelmente afetada pelas condições do meio, como nutrientes, pH, temperatura e aeração (KAHRAMAN; GURDAL 2002).

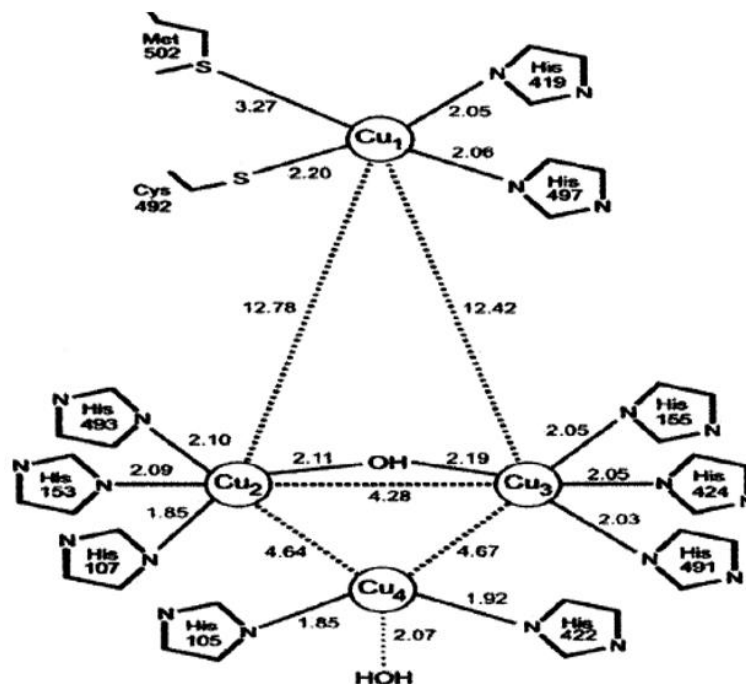
Fungos ligninolíticos expressam variados genes de lacase, codificando isoenzimas com alta similaridade na estrutura primária, mas características físico-químicas distintas (BROWN et al., 2002), que fornecem informações essenciais para estudos biotecnológicos (MOUGIN et al., 2003). Características das lacases como pH ótimo, substrato específico e massa molecular podem ser extremamente diversas (MAYER; STAPLES, 2002).

Devido à sua generalidade de ação, as lacases fúngicas são estudadas para diversas aplicações industriais. Dentre elas a transformação e degradação de lignina, produção de etanol, modificação de fibras da madeira, clareamento de corantes, síntese de produtos químicos e medicinais e remediação de solos e águas

contaminadas (SCHNEIDER et al., 1999, DURÁN; ESPOSITO, 2002, MAYER; STAPLES, 2002, BASHTAN-KANDYBOVICH et al., 2012).

O estudo realizado por Eggert e colaboradores (1997) comprovou a relação de uma lacase, produzida pelo fungo *Pycnoporus cinnabarinus*, na degradação de compostos fenólicos e não-fenólicos da lignina. O mecanismo de ação da enzima necessita de quatro átomos de cobre por unidade de proteína ativa (Figura 7), localizadas em três sítios (agrupamento trinuclear).

Figura 7– Centro de cobre de lacase de *Bacillus subtilis*.



Enguita et al. (2003).

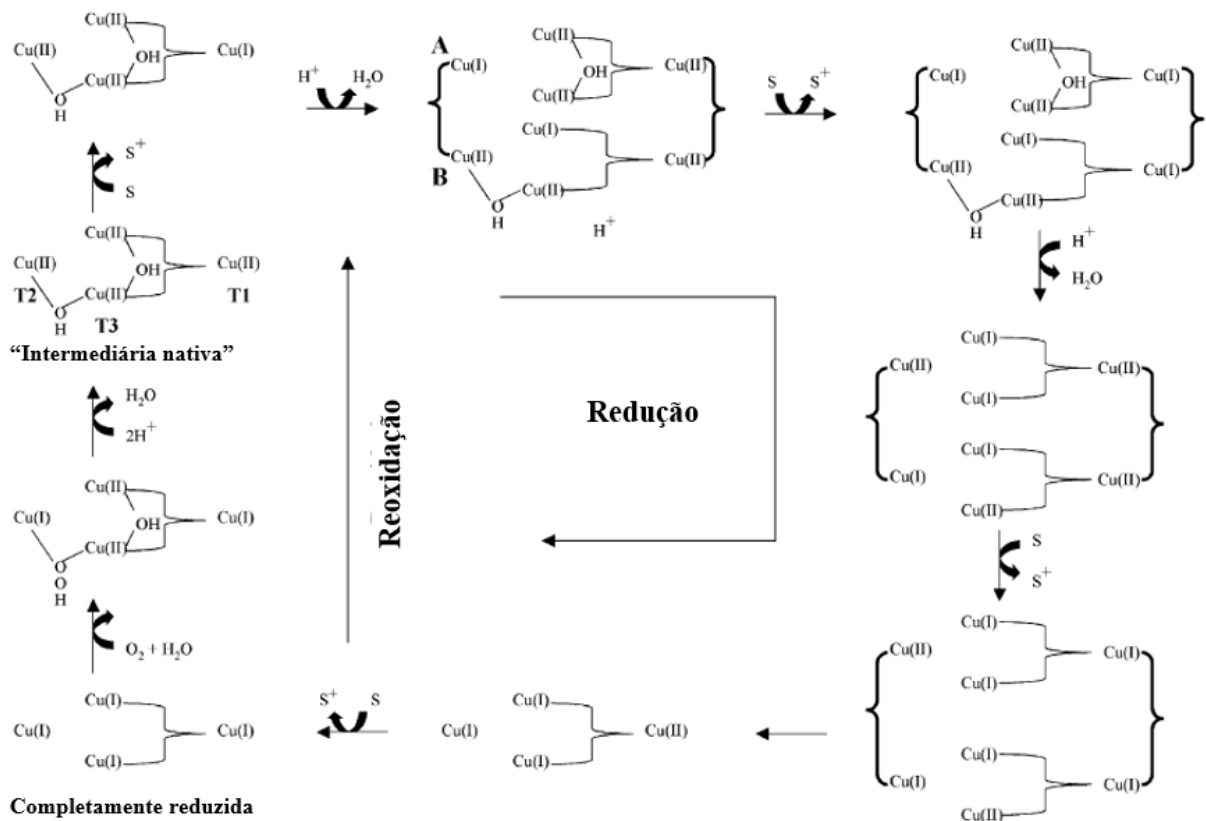
O sítio Tipo 1 (T1) – possui coloração azul. Éceptor primário de elétrons durante a catálise e usualmente exibe um grande pico no espectro visível, próximo de 610 nm, quando o cobre está no estado cúprico (Cu²⁺). O Tipo 2 (T2) - não apresenta absorvância no espectro visível e encontra-se posicionado perto do cobre tipo 3, que juntos podem promover a redução de O₂ e liberação de H₂O. O Tipo 3 (T3) é formado por um par de cobres centralizados, com máxima absorvância em 330 nm (BROWN et al., 2002).

Um modelo do ciclo catalítico de lacases (Figura 8) propõe duas possíveis rotas de ação enzimática (A e B), que diferem na parte redutiva do ciclo. A partir do estado nativo da enzima, uma molécula de substrato é oxidada pelo sítio T1, que se torna

reduzido e (A) o sítio T1 transfere o elétron para o sítio T2. Depois, o sítio T1 oxida outra molécula, ganhando mais um elétron, então, o sítio T1 e T2 transferem seus elétrons para o sítio T3. Posteriormente, O sítio T1 é reduzido novamente por outra molécula e o transfere para o sítio T2. O sítio T1 é reduzido mais uma vez, oxidando quatro moléculas de substrato no total.

A outra rota proposta (B) ocorre quando o agrupamento trinuclear é sequencialmente reduzido em três passos de transferência de elétrons do sítio T1, a partir de uma molécula de substrato que ao final fica no mesmo estado reduzido da enzima (TORRES; BUSTOS-JAIMES; BORGNE, 2003).

Figura 8 – Ciclo catalítico da lacase

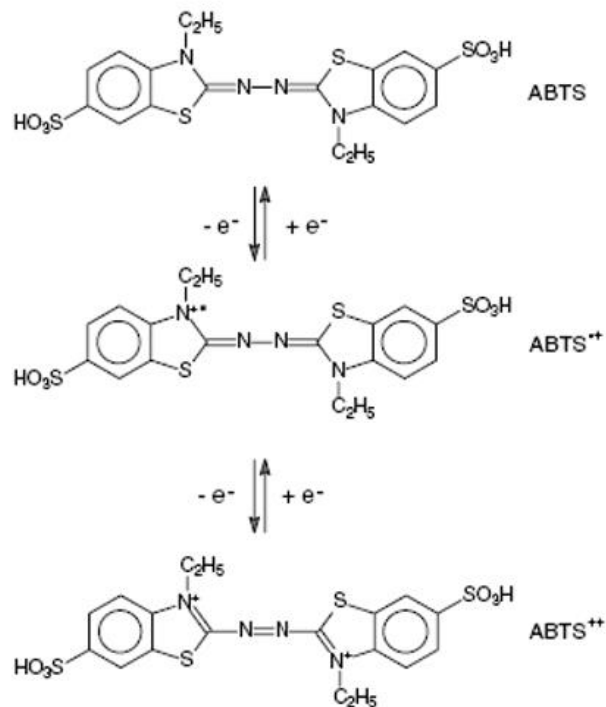


Torres; Bustos-Jaimes; Borgne (2003)

O tipo de substrato oxidado por lacases pode ser ampliado por meio de um mecanismo de reação envolvendo os mediadores redox. Estes podem ser facilmente oxidados pela lacase no sítio T1 produzindo radicais catiônicos reativos, capazes de oxidar substratos complexos de alto peso molecular antes de voltarem ao seu estado original. Os elétrons recebidos pela lacase são transferidos reduzindo oxigênio para formação de água (nos sítios agrupados T2/T3) (TORRES et al. 2003).

A atividade de lacases pode ser determinada por espectrofotometria, pelo monitoramento da coloração dos produtos de oxidação (HOFER; SCHLOSSER, 1999). A maioria dos testes utiliza guaiacol, 2,6-dimetoxifenol, siringaldazina ou o substrato não-fenólico ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico) (ABTS). Diferentemente dos substratos fenólicos, a oxidação do ABTS independe do pH e resulta na formação de um radical catiônico com coloração (ABTS•+) (Figura 9), de alta estabilidade em solução (HOFER; SCHLOSSER, 1999, JOHANNES; MAJCHERCZYK, 2000).

Figura 9 – Transformações redox de ABTS à radical catiônico (ABTS•+) e dicatiônico (ABTS⁺⁺).



Solis-Oba et al. (2005)

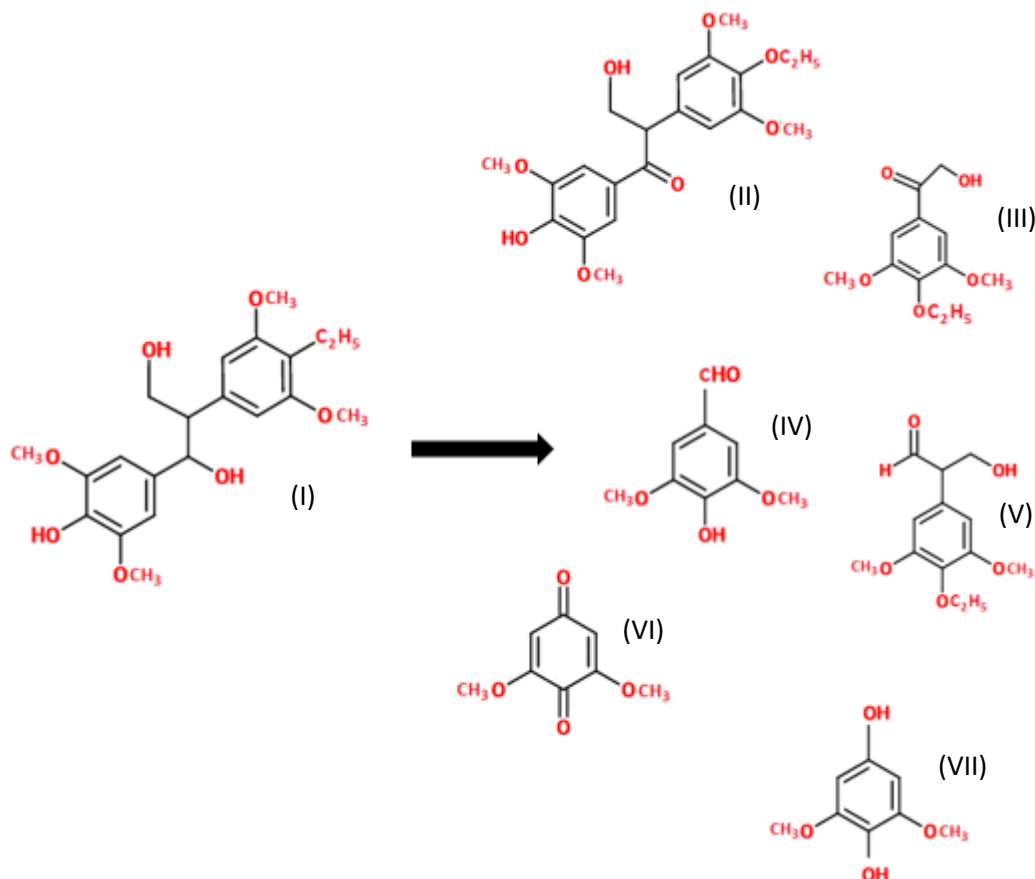
O sistema lacase-mediador apresentado tem grande potencial para a biotransformação da lignina (BASHTAN-KANDYBOVICH et al., 2012). Assim, o estudo de novas formas de lacase, com diferentes substratos específicos e estabilidade, é de grande importância para a indústria. Além disso, há a necessidade de se desenvolver um método eficiente na produção da enzima, que garanta sua viabilidade econômica (DESAI; NITYANAND, 2010).

3.6 METABÓLITOS DA BIOTRANSFORMAÇÃO DA LIGNINA

Os metabólitos fúngicos são os produtos do metabolismo desses organismos. Os processos metabólicos essenciais às funções do fungo em cultura pura são considerados como metabolismo primário, enquanto outras substâncias como toxinas e antibióticos constituem o metabolismo secundário (GRIFFIN, 1993).

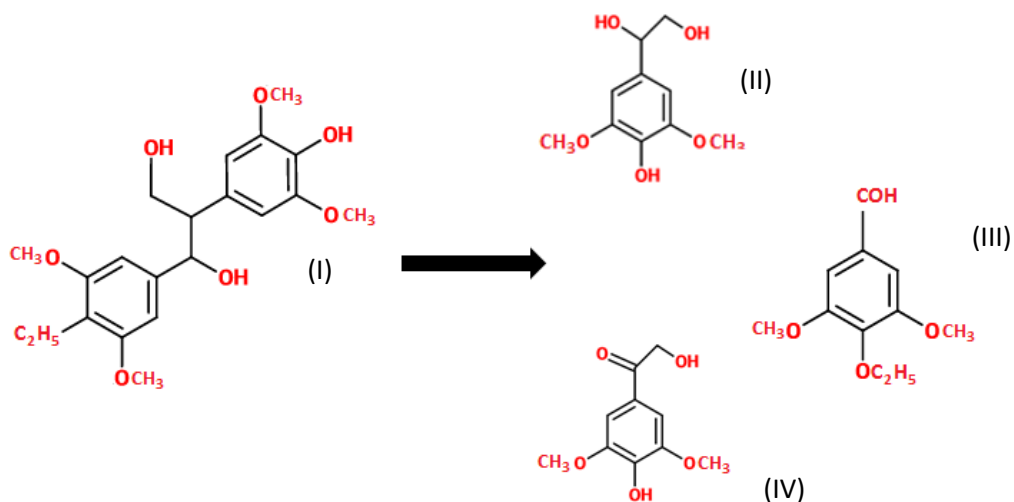
A biotransformação de duas subestruturas sintéticas da lignina (Figuras 10 e 11) foi estudada por Kawai, Umezawa e Higuchi (1988). Os autores determinaram por Cromatografia Gasosa acoplada a um Espectrofotômetro de Massas (CG-EM), após derivatização, os metabólitos resultantes da ação da lacase produzida pelo fungo *Coriolus versicolor*. A transformação deve-se à clivagem da ligação C α -C β .

Figura 10 – Produtos da biotransformação da subestrutura 1-(3,5- dimethoxy-4-hydroxyphenyl)-2-(3,5-di- methoxy-4-ethoxyphenyl)propane-1,3-diol (I): moléculas II a VII.



Adaptado de Kawai, Umezawa e Higuchi (1988)

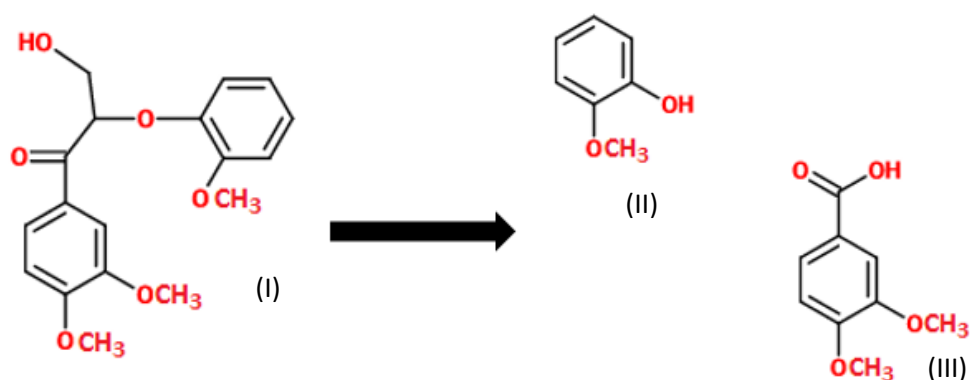
Figura 11 – Produtos da biotransformação da subestrutura 1-(3,5-dimethoxy-4-ethoxyphenyl)-2-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)propane-1,2-diol (I): moléculas II a IV.



Adaptado de Kawai, Umezawa e Higuchi (1988).

O trabalho de Eggert e colaboradores (1996) identificou produtos da biotransformação de uma subestrutura modelo sintética da lignina pela lacase produzida por *Pycnoporus cinnabarinus* (Figura 12), na presença do mediador 3-hidroxiantranilato (3-HAA). Os autores utilizaram a CLAE em coluna de C₁₈ para separação dos compostos, que foram identificados com padrões analíticos.

Figura 12 – Produtos da biotransformação da subestrutura éter veratril glicerol-β-guaiacil (forma α-carbonila) (I): guaiacol (II) e ácido verátrico (III).



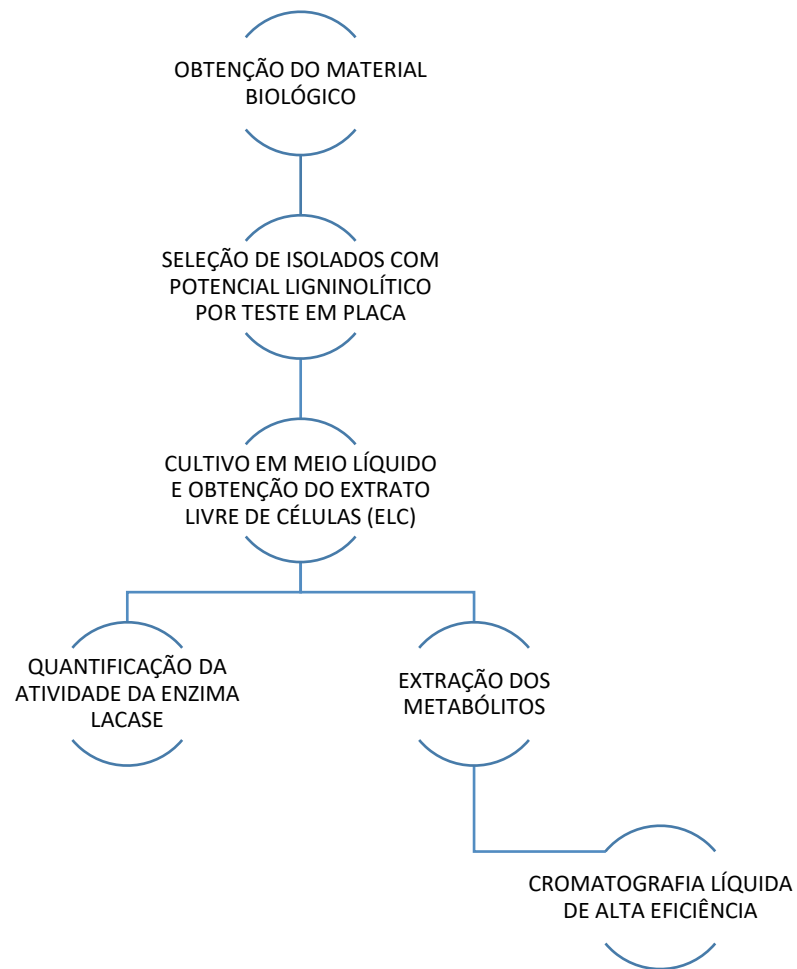
Adaptado de Eggert et al. (1996)

A vanilina e o siringaldeído são duas substâncias importantes comercialmente e podem ser produzidos pela oxidação da lignina, entretanto o uso da biotecnologia para valorização da biomassa vegetal, em especial da lignina, ainda é recente. Muitos compostos e propriedades ainda não foram descobertos (DEVAPPA; RAKSHIT; DEKKER, 2015) encorajando estudos mais aprofundados no tema.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas da metodologia utilizada neste estudo seguem os processos apresentados na Figura 13:

Figura 13 – Fluxograma dos processos realizados no estudo



4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Os microrganismos estudados foram obtidos de diferentes fontes, como fragmentos florestais, material vegetal em decomposição e borra de café. Com exceção dos fungos Br-274 e JUANT070, que já se encontravam em cultura pura, os demais microrganismos foram isolados para a realização do estudo. Os fungos que receberam a nomenclatura JUMAD foram isolados em meio BDA a partir de pequenos pedaços de cogumelos, após assepsia externa com álcool 70% e hipoclorito de sódio.

O fungo JUCAF001 foi isolado da borra de café por inoculação do material colonizado em meio BDA.

Esses fungos compõem a micoteca do laboratório QuiMiBio da UTFPR-Londrina e foram conservados em água destilada autoclavada: método de Castellani (RODRIGUES; LÍRIO; LACAZ, 1992) de forma a manter os esporos fúngicos viáveis por longos períodos de tempo.

Imagens microscópicas dos isolados fúngicos foram obtidas por meio da técnica de microcultivo (OKURA; RENDE, 2008) com a utilização do corante azul de algodão (lactofenol). As características microscópicas, juntamente com as macroscópicas, auxiliaram na identificação do provável gênero desses organismos.

A nomenclatura dada aos novos isolados é composta pelo prefixo JU, referente ao nome da orientadora, e um sufixo numérico, que corresponde à ordem de isolamento. A parte central na nomenclatura refere-se ao material de origem do fungo, sendo que ANT corresponde ao inseto *Anticarsia gemmatalis* (Lepdoptera: Noctuidae), MAD à madeira ou material vegetal e CAF à borra de café.

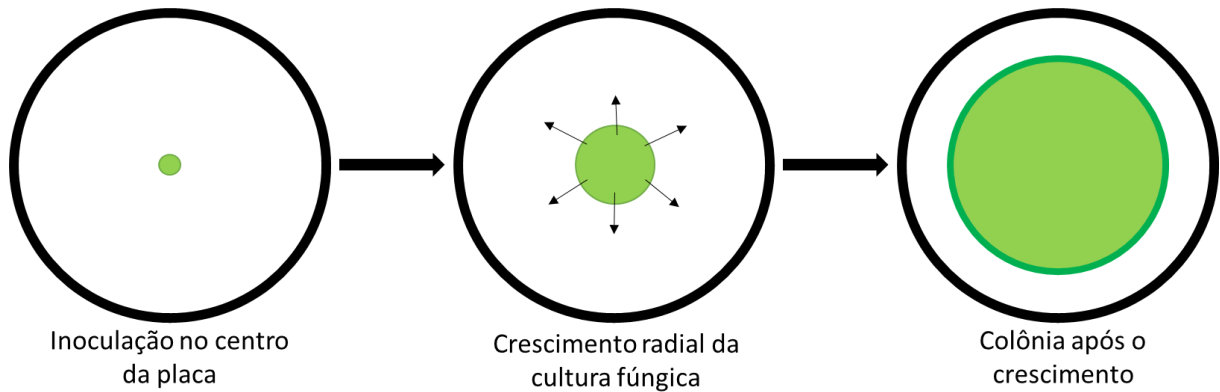
4.2 ANÁLISE DO CRESCIMENTO FÚNGICO EM MEIO SÓLIDO CONTENDO LIGNINA KRAFT

A lignina Kraft utilizada no estudo foi previamente extraída e purificada do licor negro, efluente da indústria papeleira, de madeira de gimnospermas, por meio da precipitação ácida.

Os fungos utilizados no estudo, Br-274 e JUANT070 (presentes na micoteca) e os novos isolados JUMAD001, JUMAD002, JUMAD003, JUMAD004, JUMAD005, JUMAD006 e JUCAF001, foram reativados em placa de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar). Após crescimento em incubadora BOD por 7 dias, no escuro, 28°C, os fungos foram inoculados em placas contendo 20 mL de meio sólido Vogel (VOGEL, 1956) com 0,3% (m/v) de glicose e 1,5% (m/v) de ágar. As placas foram incubadas durante 7 dias, nas mesmas condições descritas acima.

Posteriormente, discos de 9 mm de diâmetro, contendo o meio sólido coberto por micélio fúngico, foram retirados das extremidades das placas colonizadas e inoculados no centro de novas placas para a análise do crescimento em meio sólido contendo lignina Kraft como única fonte de carbono (Figura 14).

Figura 14 – Ilustração da etapa de inoculação do micélio fúngico no centro da placa de Petri.



A composição do meio sólido utilizado foi 20 mL de meio Vogel com 0,3% (m/v) de lignina Kraft dissolvida em 2% (v/v) de dimetilsufóxido (DMSO) e 1,5% (m/v) de ágar por placa de Petri. Paralelamente, placas de Petri contendo 20 mL de meio Vogel com 0,3% (m/v) de glicose, 2% (v/v) de DMSO e 1,5% (m/v) de ágar foram utilizadas como controle. O período de incubação foi de até 7 dias, em BOD, no escuro, 28°C.

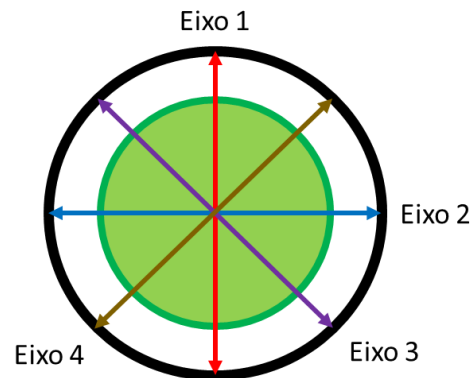
A análise do crescimento em meio sólido foi dividida em três principais parâmetros, descritos nas subseções seguintes, e tem por finalidade selecionar dois isolados fúngicos para os próximos procedimentos.

4.2.1 Velocidade de crescimento do micélio

Os fungos com maiores velocidades de crescimento são desejáveis em procedimento experimentais, pois tendem a fornecer resultados mais rapidamente, diminuindo a propensão à contaminação. Um isolado fúngico com rápido crescimento micelial em meio sólido, contendo lignina Kraft como única fonte de carbono, pode indicar uma espécie com melhor capacidade de assimilação do polímero e, conseqüentemente, sua biotransformação.

Dessa forma, a velocidade de crescimento dos nove isolados fúngicos foi avaliada diariamente por até 7 dias, pela mensuração do diâmetro do micélio em quatro eixos (Figura 15).

Figura 15 – Ilustração da etapa de mensuração do diâmetro do micélio fúngico.



4.2.2 Taxa de inibição

As medidas do diâmetro micelial nas placas de Petri com lignina Kraft foram comparadas com as das placas de controle. Assim, a partir da média aritmética das medidas, tanto do tratamento quanto do controle, pode-se obter a taxa de inibição (%), representada pela Equação 1 (TARIQ; YASMIN; HAFEEZ, 2010):

$$\text{Taxa de inibição} = \left(1 - \frac{\text{Diâmetro do tratamento}}{\text{Diâmetro do controle}}\right) \cdot 100\% \quad (1)$$

Assim, os isolados que apresentaram menores taxas de inibição indicam melhor adaptação ao meio e possível capacidade de utilizar a lignina Kraft como fonte de carbono. O cálculo da taxa de inibição foi calculado no sétimo dia de cultivo ou quando o micélio do tratamento ou controle atingiu as bordas da placa antes de 7 dias.

4.2.3 Modificações no meio sólido

As modificações no meio sólido, como clareamento da lignina Kraft, que é originalmente marrom, ou produção de pigmentos são importantes indicativos da biotransformação da lignina. O clareamento representa uma possível degradação dos compostos orgânicos originais, gerando outras substâncias incolores (BELMONTE et al., 2006). Já a produção de pigmentos pode indicar a ação destes metabólitos secundários, voltados à biotransformação do polímero (EASTWOOD et al., 2011).

Dessa forma, as placas contendo os isolados fúngicos em meio sólido contendo lignina Kraft foram acompanhadas por até 7 dias, analisando-se a existência de modificação na coloração do meio.

4.3 CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO LIGNINA KRAFT

4.3.1 Preparo do pré-inóculo

Os dois isolados fúngicos selecionados (Br-274 e JUMAD002) por meio dos procedimentos anteriores foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA durante 7 dias, 28°C. Posteriormente, seus micélios foram raspados do meio sólido e inoculados em frascos de Erlenmeyer contendo 25mL meio líquido de batata com 0.3% de glicose. Os frascos foram incubados em mesa agitadora à 180 rpm, por um período de 72h e temperatura ambiente, produzindo o pré-inóculo.

4.3.2 Cultivo em meio líquido

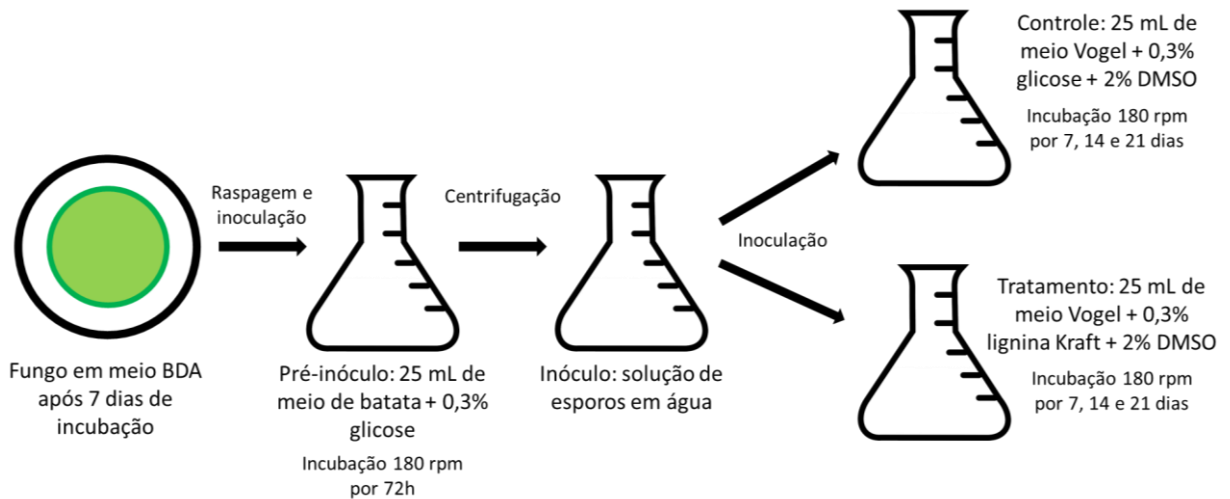
O pré-inóculo foi centrifugado à 2000 rpm durante 5 minutos, de forma que apenas a biomassa fúngica fosse coletada e, então, homogeneizada em água destilada estéril, formando uma solução de esporos (inóculo). Um volume de 1 mL dessa solução, contendo 20,8 mg de biomassa, foi inoculado em frascos de Erlenmeyers contendo 25 mL de meio Vogel com 0,3% (m/v) de lignina Kraft e 2% (v/v) de DMSO para a dissolução da lignina. Os frascos foram incubados em mesa agitadora à 180 rpm, por um período de 7, 14 e 21 dias e temperatura ambiente. As culturas foram realizadas em triplicata para cada tempo de coleta.

Paralelamente, fez-se os controles dos cultivos, em que as soluções de esporos dos dois isolados fúngicos foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer contendo 25 mL de meio Vogel, 0,3% (m/v) de glicose e 2% (v/v) de DMSO. Os controles foram incubados nas mesmas condições descritas para os tratamentos. A Figura 16 ilustra o procedimento descrito.

Após 7, 14 e 21 dias de incubação, o meio líquido contendo a biomassa foi filtrado, gerando o Extrato Livre de Células (ELC). Uma alíquota de 2 mL de cada ELC

foi reservada para a quantificação da atividade enzimática, enquanto o restante foi utilizado para extração de metabólitos.

Figura 16 – Ilustração dos procedimentos de preparo do pré-inóculo e inóculo.



4.4 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE

A atividade da lacase foi quantificada conforme Dekker e Barbosa (2001). Em tubos do tipo eppendorf foram adicionados 775 μL de água destilada, 50 μL do substrato ABTS (0,05 M), 150 μL da solução tampão citrato-fosfato pH 3 (0,25 M) e 25 μL do ELC, totalizando 1 mL. A solução foi aquecida em banho Maria a 50°C por 5 minutos e, posteriormente, fez-se a leitura da absorbância em um espectrofotômetro UV-VIS PerkinElmer Lambda 25 no comprimento de onda de onda (λ) 420 nm. Paralelamente, foram realizados os controles do ELC (C₁) e do ABTS (C₂).

C₁: 825 μL de água destilada;
150 μL da solução tampão e
25 μL de ELC.

C₂: 800 μL de água destilada;
50 μL de substrato ABTS e
150 μL da solução tampão.

A atividade enzimática é a medida da habilidade de uma enzima em converter um substrato em produto (DEVLIN et al., 2008). A União Internacional de Bioquímica (NC-IUB, 1979) define que a unidade de enzima (U) é número de μmols de substrato oxidados por minuto, a 30°C pela solução de enzima. Para o procedimento utilizado, verifica-se a conversão do ABTS pela lacase, em condições fixas de pH e temperatura. Assim, U/mL pode determinada a partir da Equação 2 (YADA JUNIOR, 2016):

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{AT - (AC_1 + AC_2)}{\varepsilon} \cdot \frac{1}{V} \cdot F_d \cdot \frac{1}{t} \cdot 1000 \quad (2)$$

Onde U/mL corresponde a unidade de lacase por mL de substrato, AT é a absorbância do tratamento, AC_1 é a absorbância de C_1 , AC_2 é a absorbância de C_2 , t é o tempo de incubação (em minutos), V é o volume de enzima empregado nos ensaios, F_d é o fator de diluição da solução enzimática quando necessário, e ε é o coeficiente de extinção molar do substrato (para o ABTS, $\varepsilon = 36.000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (YADA JUNIOR, 2016).

4.5 EXTRAÇÃO E GERAÇÃO DO PERFIL DE METABÓLITOS

Os meios líquidos denominados Extratos Livres de Células (ELC) foram extraídos por partição líquido-líquido com acetato de etila (1:1) e secos em rotaevaporador, sendo que as triplicatas foram extraídas como uma única amostra. A massa total de extrato seco, para cada tempo de cultivo, foi dissolvida em 1 mL de metanol grau HPLC e filtrada em filtros de seringa Agilent com porosidade de 0,45 μm . O mesmo procedimento de extração e filtração foi realizado para 125 mg da lignina Kraft original, não degradada, posteriormente dissolvida em 2 mL de metanol.

O perfil dos metabólitos extraídos foi obtido por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em um equipamento UHPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific) pertencente ao Departamento de Química da UTFPR Londrina. A coluna cromatográfica acoplada foi uma C_{18} Phenomenex de fase reversa, com dimensões de 250 x 4,6 mm. A injeção da amostra foi de 20 μL , ao fluxo de 1 mL/min com mistura de duas soluções como eluente: solução **A**, composta de água com 1% de ácido trifluoracético (TFA) e solução **B**, composta de acetonitrila com 1% TFA (JARAMILLO-CARMONA et al., 2008).

A proporção inicial do eluente foi de 70:30 para as soluções **A** e **B**, respectivamente. Variou-se linearmente até a proporção 10:90 em 40 minutos, sendo mantida até 42 minutos. A proporção inicial foi reestabelecida em 45 minutos e mantida até o final. O tempo total de análise foi de 50 minutos por amostra.

Os compostos foram caracterizados pelos seus espectros na faixa da luz ultravioleta e visível (UV-VIS), entre 190 e 800 nm. A interpretação dos cromatogramas, quanto às áreas dos picos, foi realizada com o auxílio do programa OriginPro 8.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados referentes ao teste de inibição em meio sólido (seção 4.2.2) e quantificação da atividade enzimática na presença ou ausência de glicose (seção 4.4) foram analisados com auxílio do programa Statistica 7: teste de Tukey ($P < 0,05$)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

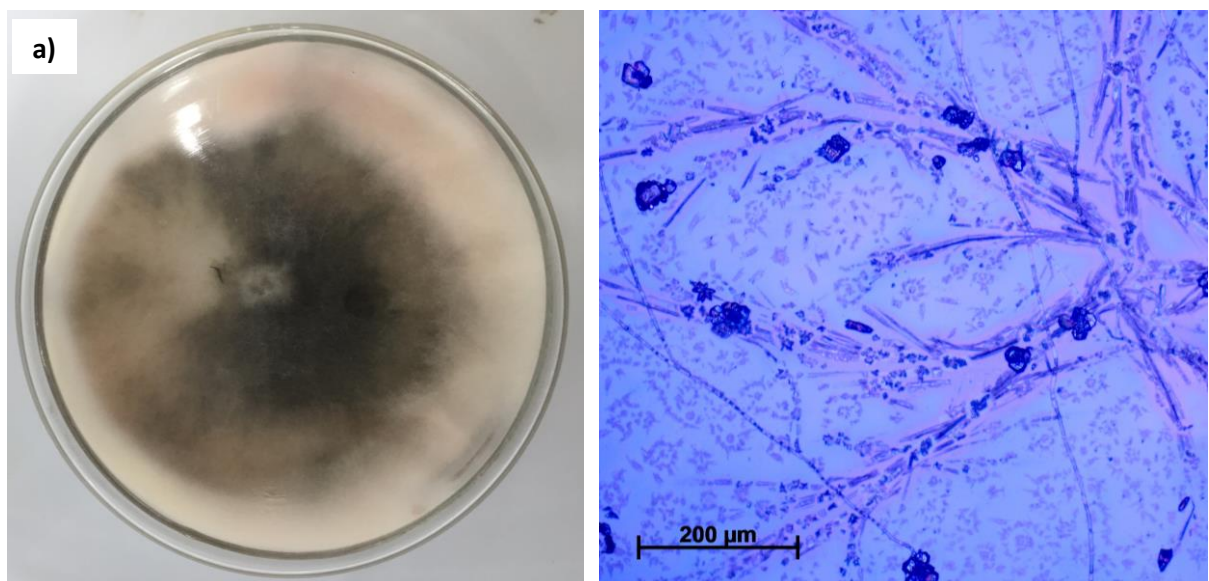
5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

As subseções seguintes caracterizam os microrganismos estudados com maiores detalhes.

5.1.1 Isolado fúngico Br-274

O isolado fúngico ligninolítico Br-274 (Figura 17) foi cedido gentilmente pela Prof.^a Dr.^a Aneli de Melo Barbosa Dekker, da Universidade Estadual de Londrina, para realização do estudo. Esse isolado é um ascomiceto com comprovada capacidade de produzir um tipo de polifenol oxidase, uma lacase, modificando a lignina Kraft por demetilação (BASHTAN-KANDYBOVICH et al., 2012; YADA JUNIOR, 2016).

Figura 17 – Ilustração do isolado fúngico Br-274 em a) meio BDA após 7 dias de crescimento e b) microscopia 100x.



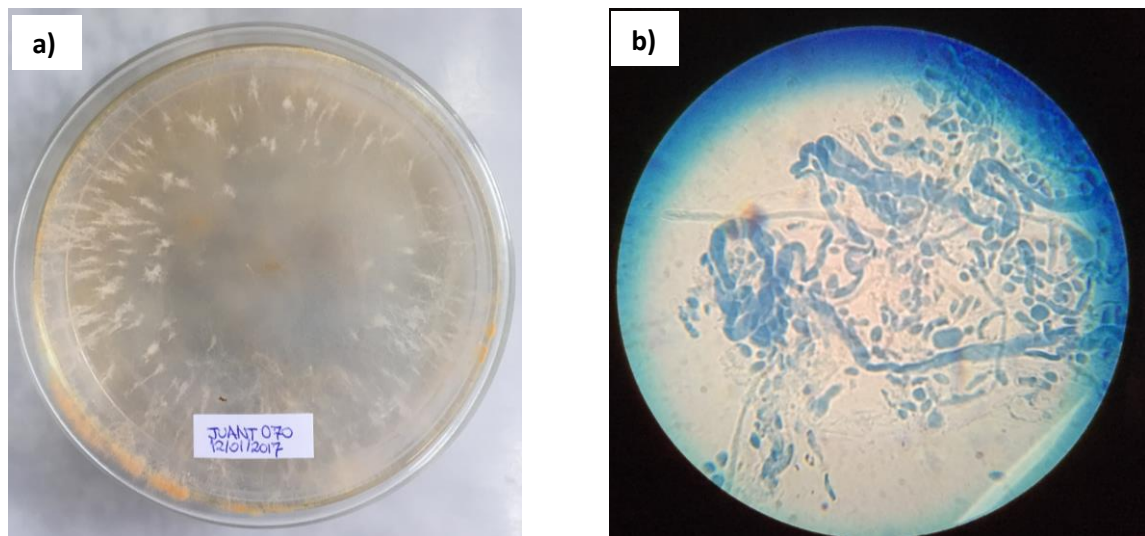
5.1.2 Isolado fúngico JUANT070

O fungo JUANT070 (Figura 18), pertencente à micoteca QuiMiBio desde 2014, foi isolado da larva do inseto *Anticarsia gemmatalis*, também conhecido como lagarta-da-soja (MOREIRA; ARAGÃO, 2009). As características macroscópicas como

coloração e crescimento vertical do micélio, e microscópicas, como o formato dos ascósporos do fungo, indicam *Neurospora* como provável gênero (GALAGAN, 2005).

O microrganismo JUANT070 possui comprovada capacidade de produzir lacase (YADA JUNIOR, 2016). Znameroski e colaboradores (2012) demonstraram capacidade em induzir a produção de enzimas degradadoras de materiais ligno-celulósicos por uma cepa de *Neurospora crassa*. O estudo realizado por Pamidipati e Ahmed (2017) relatou degradação de resíduos da agricultura contendo lignina por uma cepa de *Neurospora discreta*.

Figura 18 – Ilustração do isolado fúngico JUANT070 em a) meio BDA após 4 dias de crescimento e b) microscopia 500x.



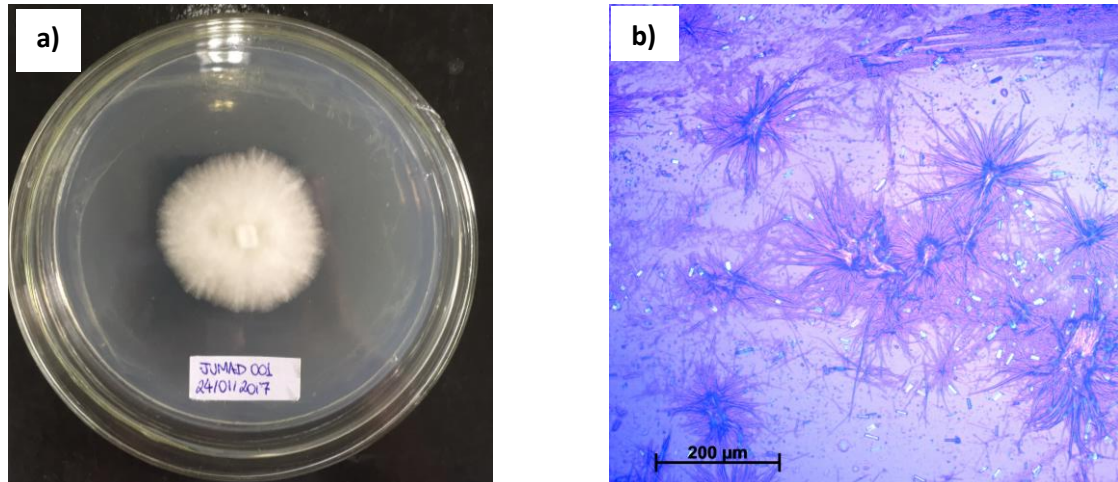
5.1.3 Isolado fúngico JUMAD001

O fungo macroscópico JUMAD001 (Figura 19), foi isolado a partir de seu cogumelo presente em uma árvore. Cogumelos que se desenvolvem nesse tipo de substrato possuem grande potencial ligninolítico (PANDEY; PITMAN, 2003), uma vez que o material vegetal que parasitam são constituídos, em grande parte, por lignina (SJOSTROM, 1981).

As características morfológicas do cogumelo indicam *Pycnoporus* como provável gênero (GUERRERO; HOMRICH, 1999), um basidiomiceto. A espécie *Pycnoporus cinnabarinus* estudada por Eggert e colaboradores (1996) possui a capacidade em biotransformar uma molécula sintética de lignina. Eugenio e

colaboradores (2009) demonstraram a capacidade da espécie *Pycnoporus sanguineus* em produzir a enzima lacase.

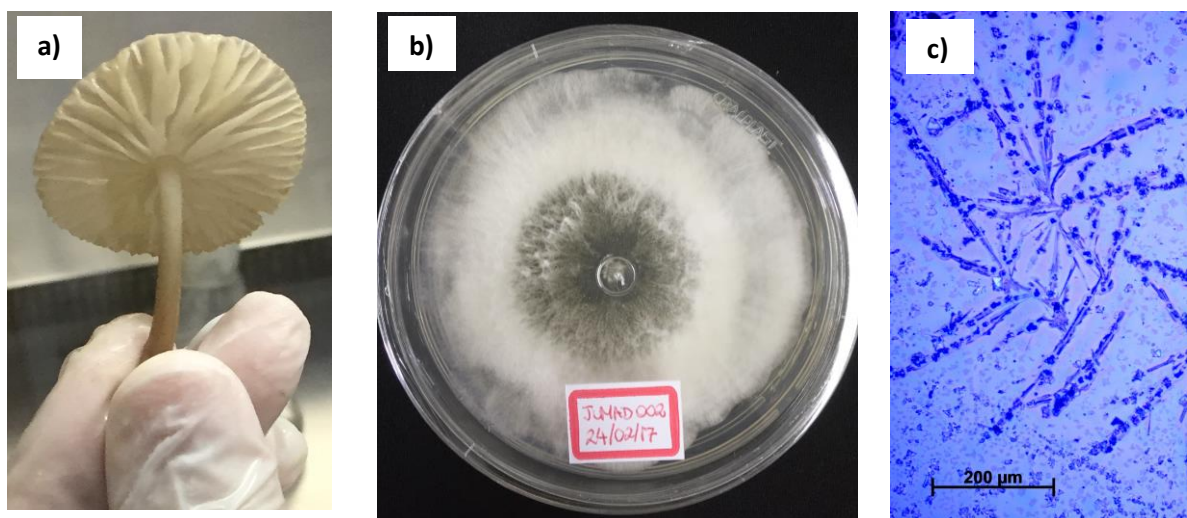
Figura 19 – Ilustração do isolado fúngico JUMAD001 em a) meio BDA após 7 dias de crescimento e b) microscopia 100x.



5.1.4 Isolado fúngico JUMAD002

O fungo macroscópico JUMAD002 (Figura 20), foi isolado a partir de seu cogumelo presente em um galho em decomposição, existente em um fragmento de Mata Atlântica em Guaratuba, PR.

Figura 20 – Ilustração do isolado fúngico JUMAD002 em a) cogumelo, b) meio BDA após 3 dias de crescimento e c) microscopia 100x.

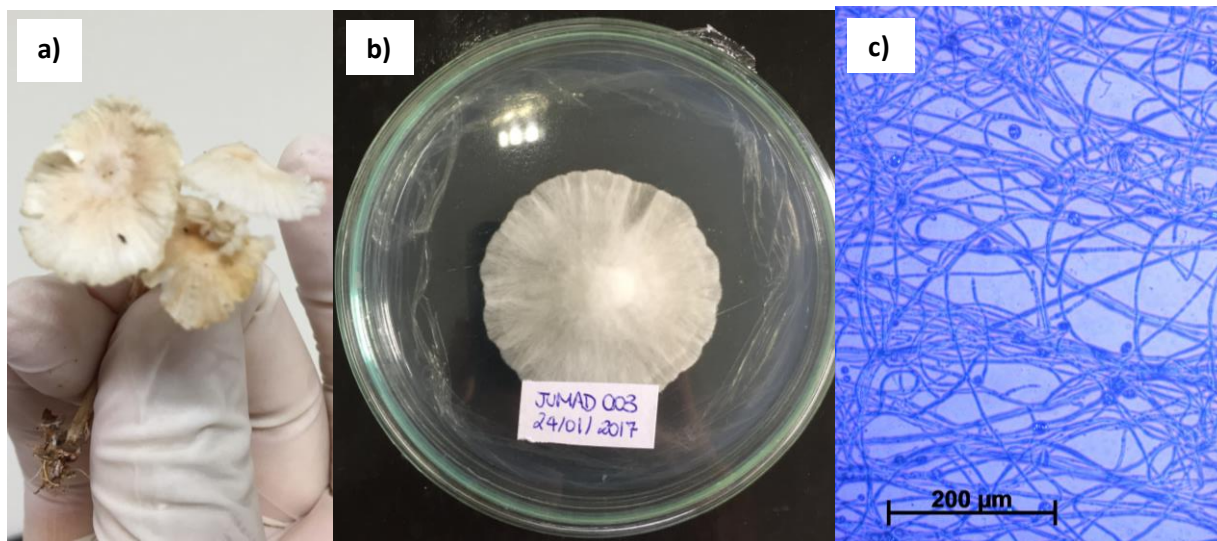


As características morfológicas do cogumelo indicam *Oudemansiella* como provável gênero (GUERRERO; HOMRICH, 1999), um basidiomiceto da podridão branca (GABRIC; POHLEVEN, 2015). Ruegger e colaboradores (2001) demonstraram a capacidade de crescimento da espécie *Oudemansiella canarii* em meio lignocelulósico. A mesma espécie também foi estudada quanto a produção da enzima lacase (BALARAJU et al., 2010, GABRIC; POHLEVEN, 2015).

5.1.5 Isolado fúngico JUMAD003

O fungo macroscópico JUMAD003 (Figura 21), foi isolado a partir de seu cogumelo presente em solo de fragmento de Mata Atlântica em Londrina, PR.

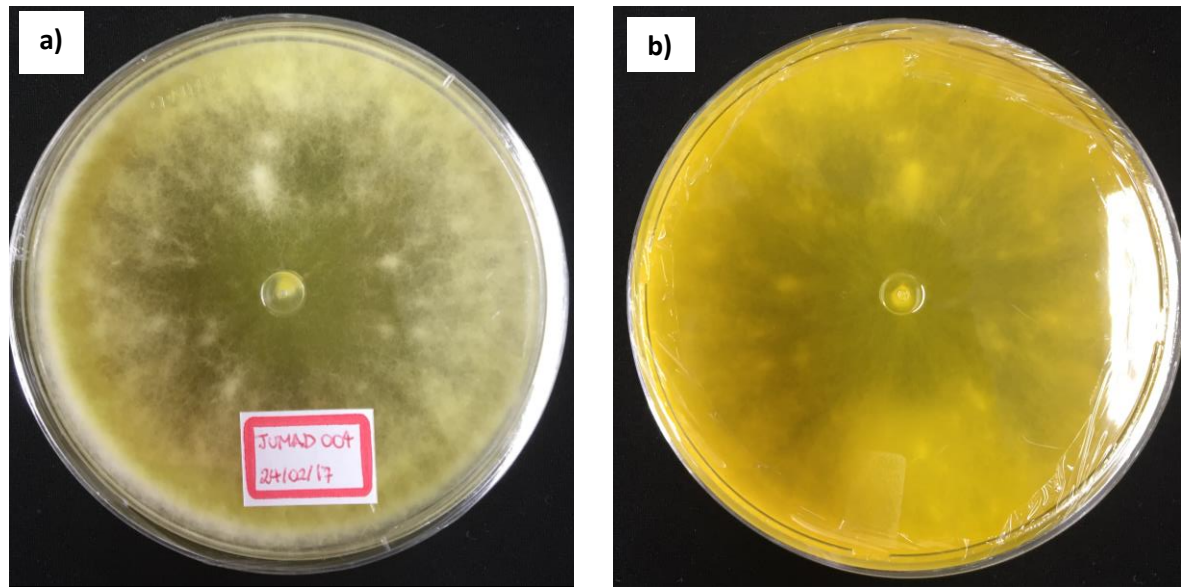
Figura 21 – Ilustração do isolado fúngico JUMAD003 em a) cogumelo, b) meio BDA após 7 dias de crescimento e c) microscopia 100x.



5.1.6 Isolado fúngico JUMAD004

O fungo JUMAD004 (Figura 22), foi isolado a partir de um cogumelo presente em um galho em decomposição de fragmento de Mata Atlântica em Londrina, PR. Entretanto, as características morfológicas indicam que o microrganismo isolado foi um ascomiceto e não o cogumelo coletado. O isolado fúngico JUMAD004 foi mantido na micoteca QuiMiBio devido à sua capacidade de produzir um pigmento amarelo cítrico, que pode ser de relevante interesse em estudos futuros.

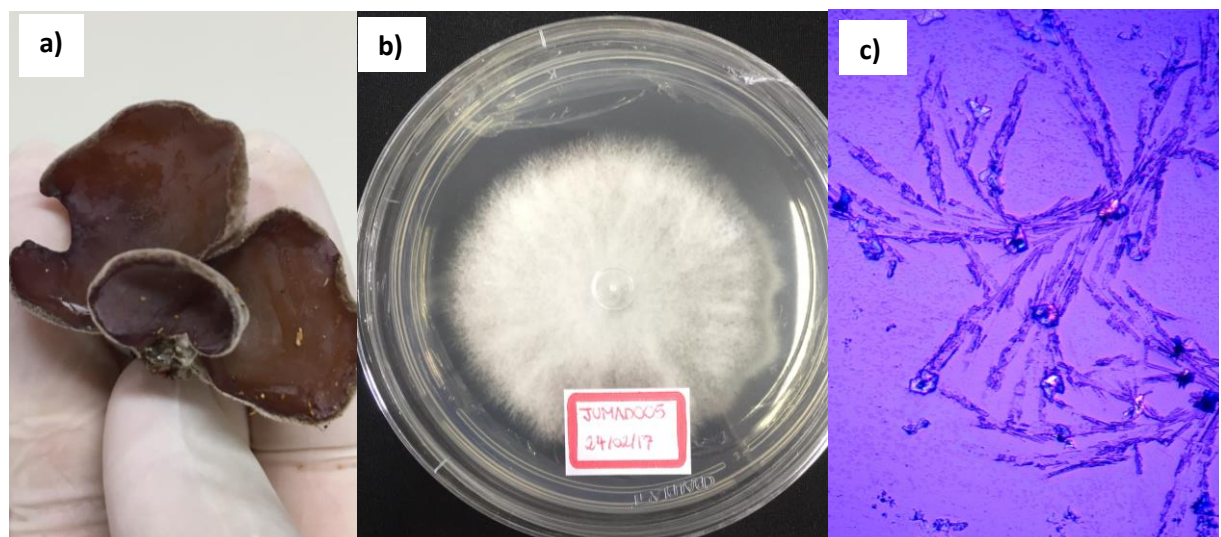
Figura 22 – Ilustração do a) verso e b) anverso do isolado fúngico JUMAD004 meio BDA sólido após 7 dias de crescimento.



5.1.7 Isolado fúngico JUMAD005

O fungo macroscópico JUMAD005 (Figura 23), foi isolado a partir de seu cogumelo presente em solo de fragmento de Mata Atlântica em Londrina, PR. As características do cogumelo sugerem *Auricularia* como provável gênero (GUERRERO; HOMRICH, 1999).

Figura 23 – Ilustração do isolado fúngico JUMAD005 em a) cogumelo, b) meio BDA após 7 dias de crescimento e c) microscopia 100x.



O estudo realizado por Fan e colaboradores (2014) demonstra que o fungo *Auricularia auricula-judae* possui capacidade de produzir lacase. Liers e colaboradores (2011) demonstraram que uma cepa de *Auricularia auricula-judae* é capaz de promover a degradação de materiais lignocelulósicos.

5.1.8 Isolado fúngico JUMAD006

O fungo macroscópico JUMAD006 (Figura 24), foi isolado a partir de seu cogumelo presente no tronco de uma árvore em Londrina, PR. As características morfológicas do cogumelo indicam *Ganoderma* como provável gênero (GUERRERO; HOMRICH, 1999), um basidiomiceto. Kuhar e Papinutti (2014), assim como Fang e colaboradores (2015) afirmam que a espécie *Ganoderma lucidum* é capaz de produzir a enzima lacase.

Figura 24 – Ilustração de a) um cogumelo do gênero *Ganoderma* e b) o isolado fúngico JUMAD006 em meio BDA após 7 dias de crescimento.



Os autores Souza, Merritt e Reddy (1999) e Sasidhara e Thirunalasundari (2014) estudaram a atividade ligninolítica via enzima da espécie *Ganoderma lucidum*.

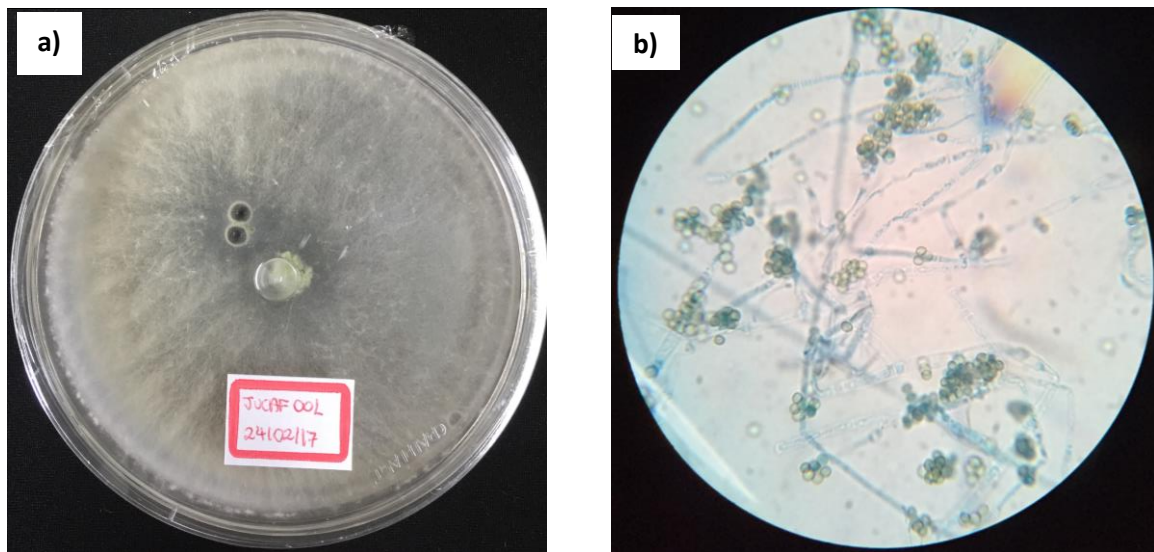
5.1.9 Isolado fúngico JUCAF001

O fungo JUCAF001 (Figura 25), foi isolado a partir de borra de café, uma vez que este material possui considerável quantidade de lignina em sua composição:

cerca de 20% (PUJOL et al., 2013). Assim, os microrganismos capazes de se desenvolver na borra de café são potenciais agentes ligninolíticos.

A coloração verde dos esporos do fungo JUCAF001, além de suas características microscópicas, como hifa septada e hialina sugerem que o fungo é uma espécie de *Trichoderma* (TOMÉ, 2015).

Figura 25 – Ilustração do isolado fúngico JUCAF001 em a) meio BDA após 7 dias de crescimento e b) microscopia 500x.



5.2 ANÁLISE DA VELOCIDADE DE CRESCIMENTO DO MICÉLIO

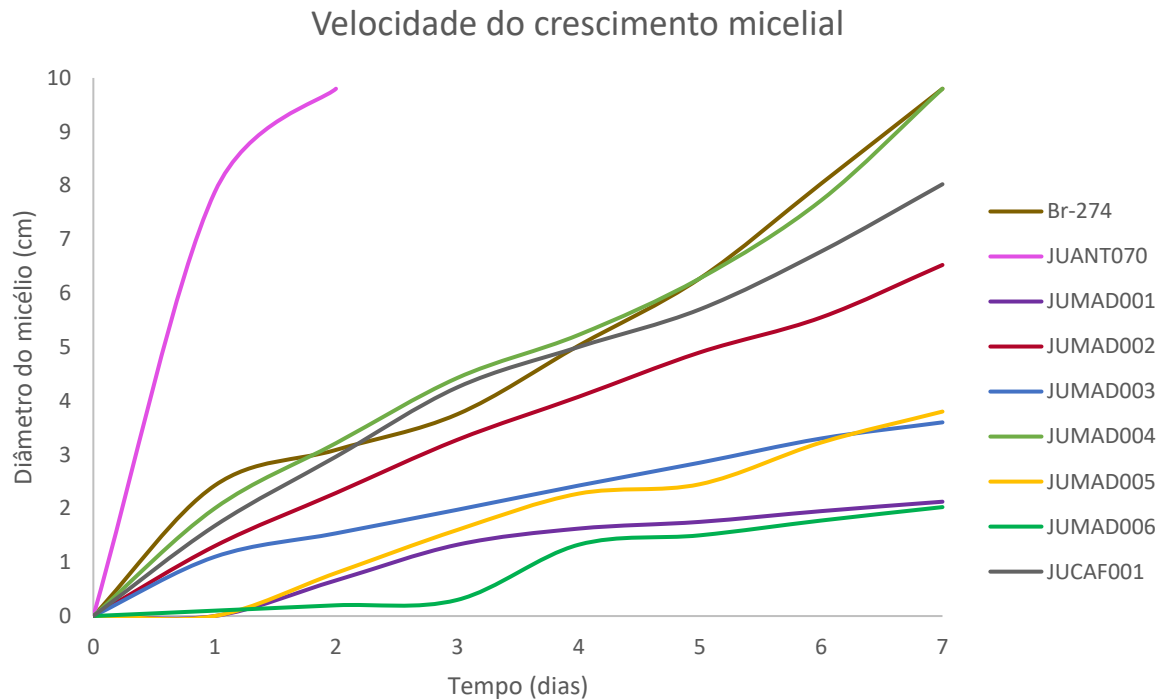
As medidas diárias do diâmetro micelial dos nove isolados fúngicos são apresentadas na Figura 26. Destaca-se que os valores se referem à média das quatro medidas realizadas para cada isolado, conforme metodologia descrita em 5.2.1. Os resultados foram coletados por um período de até 7 dias ou até que a cultura alcançasse as bordas da placa (diâmetro de 9,8 cm).

Nota-se que o isolado JUANT070, gênero *Neurospora*, apresentou o melhor resultado, alcançado os limites da placa de Petri em apenas 2 dias. A rápida adaptação deste microrganismo ao meio de cultivo pode ser influenciada pela composição do meio de Vogel, que foi originalmente desenvolvido para fungos do gênero *Neurospora* (VOGEL, 1956).

Os isolados Br-274 e JUMAD004 também apresentaram crescimento relativamente rápido, ocupando toda a placa de Petri em 7 dias. Fungos com crescimento mais lento – JUMAD005, JUMAD003, JUMAD001 e JUMAD006 – podem inviabilizar a obtenção de resultados em um curto de espaço de tempo, sendo menos

propícios à seleção para o cultivo em meio líquido. Destaca-se que os quatro microrganismos citados são cogumelos.

Figura 26 – Crescimento do micélio dos nove isolados fúngicos.



5.3 ANÁLISE DA TAXA DE INIBIÇÃO

A taxa de inibição (Tabela 1) foi calculada comparando-se o diâmetro micelial do tratamento com o do controle. Nota-se que o cálculo foi feito em diferentes tempos de incubação entre os isolados, uma vez que a inibição foi determinada em até 7 dias ou antes, caso uma placa do tratamento ou controle alcançasse as extremidades da placa de Petri.

Os fungos JUMAD001, JUMAD003, JUMAD005 e JUMAD006 apresentaram as menores taxas de inibição, indicando indiferença no crescimento micelial quanto à fonte de carbono – lignina (tratamento) ou glicose (controle). Entretanto, os quatro microrganismos citados foram os que apresentaram velocidade de crescimento mais lenta, conforme seção 5.1.

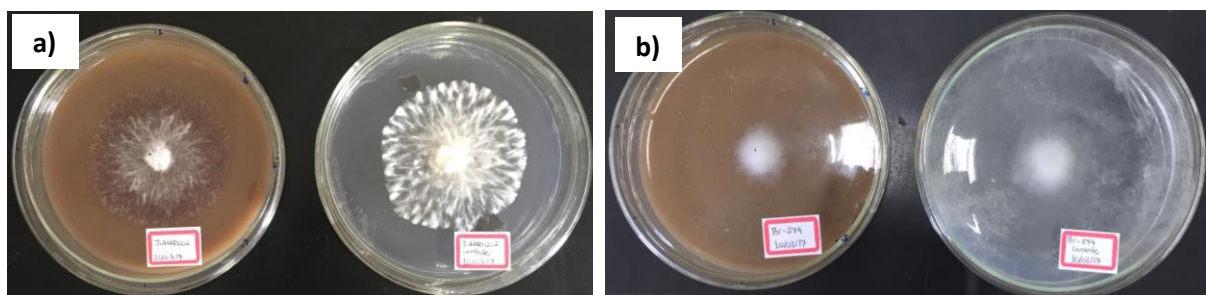
Tabela 1 – Resultado da taxa de inibição dos nove isolados fúngicos.

	Tempo de incubação (dias)	Tratamento (cm)	Controle (cm)	Inibição (%)
Br-274	5	6,3 ^{a,A}	9,8 ^{b,A}	36,0
JUANT070	1	7,9 ^{a,B}	8,7 ^{b,B}	9,5
JUMAD001	7	2,1 ^{a,C}	2,0 ^{b,C}	0
JUMAD002	7	6,5 ^{a,A,E}	7,1 ^{b,D}	8,1
JUMAD003	7	3,6 ^{a,D}	3,4 ^{b,B}	0
JUMAD004	5	6,3 ^{a,A}	9,0 ^{b,E}	30,1
JUMAD005	7	3,8 ^{a,D}	3,9 ^{a,F}	0
JUMAD006	7	2,0 ^{a,C}	2,1 ^{a,C}	0
JUCAF001	6	6,8 ^{a,E}	7,9 ^{b,G}	14,5

Valores seguidos da mesma letra não apresentam diferença estatística, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os isolados JUMAD002 (Figura 27a) e JUANT070 apresentaram taxas de inibição inferiores a 10%, indicando que os microrganismos sofreram pequena dificuldade em crescer assimilando a lignina, em relação à glicose. As maiores taxas de inibição foram dos fungos JUMAD004 e Br-274 (Figura 27b), no entanto, destaca-se que mesmo estes não apresentaram valores que pudessem comprometer a biotransformação da lignina, visto que ambos os microrganismos obtiveram altas velocidades de crescimento na seção 5.1.

Figura 27 – Comparação entre tratamento (placa à esquerda) e controle (placa à direita) dos fungos a) JUMAD002 e b) Br-274.



Utilizando-se de metodologia semelhante, Yada Junior (2016) obteve 50% de inibição do fungo Br-274 em meio BDA contendo 31,42 g/L do inseticida Belt (48% flubendiamida).

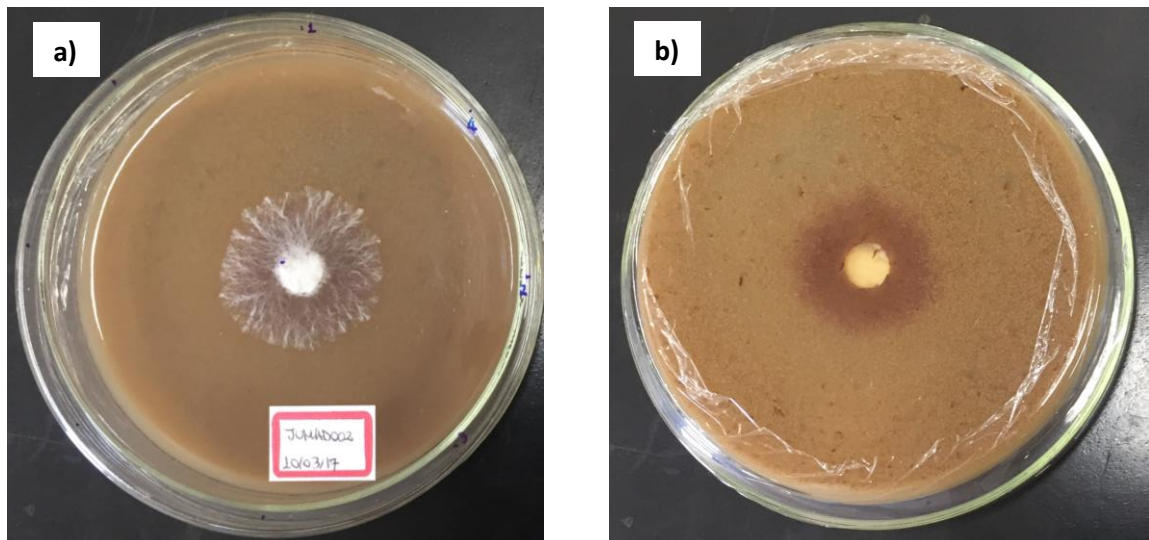
5.4 ANÁLISE DAS MODIFICAÇÕES NO MEIO SÓLIDO

Os fungos JUMAD001, JUMAD002, JUMAD003 e JUMAD006 apresentaram modificações na coloração do meio sólido contendo lignina. Os quatro microrganismos produziram um halo de coloração vermelho escura, apenas em placas de tratamento, que pode ser resultante de pigmentos mediadores da biotransformação da lignina (EASTWOOD et al., 2011) ou metabólitos do polímero.

A Figura 28 evidencia o halo formado pelo isolado fúngico JUMAD002. Após 7 dias de incubação, os fungos JUMAD001, JUMAD002, JUMAD003 e JUMAD006 produziram halos com diâmetro médio de 4,7; 6,7; 5,0 e 4,7 cm, respectivamente.

A partir dos resultados obtidos nas seções 5.1, 5.2 e 5.3, os isolados Br-274 e JUMAD002 foram selecionados para cultivo em meio líquido. O fungo JUMAD002 apresentou o maior halo de coloração dentre todos os fungos avaliados, além de taxa de inibição relativamente baixa e velocidade de crescimento alta, justificando sua seleção.

Figura 28 – Formação de halo no a) anverso e b) verso da placa de Petri pelo fungo JUMAD002.



O fungo Br-274 apresentou alta velocidade de crescimento, mas não apresentou resultados de destaque nos testes de taxa de inibição e modificação do meio sólido. Contudo, estudos anteriores com esse fungo (BASHTANKANDYBOVICH et al., 2012) mostraram sua comprovada capacidade de biotransformar lignina Kraft e, portanto, o isolado Br-274 também foi selecionado para cultivo em meio líquido.

5.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE DE Br-274 E JUMAD002

Após o cultivo em meio líquido de Vogel dos fungos selecionados pelas etapas anteriores, pode-se calcular a atividade da enzima lacase nos cultivos com 7, 14 e 21 dias. Os resultados obtidos para o fungo Br-274 constam na Tabela 2.

Tabela 2 – Atividade enzimática da lacase produzida pelo fungo Br-274.

Tempo de Cultivo	Tratamento			Controle	
		Atividade (U/mL)	Atividade média (U/mL)	Tempo de Cultivo	Atividade (U/mL)
7 dias	I	4,11	3,30 ^a	7 dias	0 ^a
	II	3,00			
	III	2,78			
14 dias	I	3,89	4,52 ^{a,b}	14 dias	0 ^a
	II	3,44			
	III	6,22			
21 dias	I	12,89	9,00 ^b	21 dias	0 ^a
	II	8,67			
	III	5,44			

Valores seguidos da mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05).

Nota-se quantidades crescentes na atividade média da enzima com o tempo, indicando a estabilidade da lacase durante o período de incubação. O estudo realizado por Yada Junior (2016), que incubou o mesmo isolado fúngico na presença do inseticida flubendiamida resultou em atividade da lacase de 7,084 U/mL após dez dias de cultivo, confirmando a capacidade do fungo Br-274 em produzir essa enzima.

O resultado positivo quanto à presença da lacase nos tratamentos indica a possibilidade de o microrganismo em estudo ter utilizado essa enzima para biotransformar a lignina Kraft. Além disso, como o controle não apresentou atividade enzimática, pode-se afirmar que a lignina Kraft, presente no tratamento e ausente no controle, induziu o fungo Br-274 a produzir lacase.

É importante destacar que os valores positivos de atividade demonstram que a lacase é estável em meio contendo DMSO, não promovendo a desnaturação química da enzima. Trata-se de um resultado relevante, visto que a lignina é pouco solúvel em

água e necessita de um solubilizante, como o DMSO, para se encontrar disponível à assimilação microbiana.

A atividade enzimática da lacase do fungo JUMAD002 consta da Tabela 3.

Tabela 3 – Atividade enzimática da lacase produzida pelo fungo JUMAD002.

Tempo de Cultivo	Tratamento			Controle	
		Atividade	Atividade média	Tempo de Cultivo	Atividade
7 dias	I	0	2,03 ^{a,b}	7 dias	0 ^a
	II	2,89			
	III	3,22			
14 dias	I	5,89	4,00 ^b	14 dias	0 ^a
	II	2,33			
	III	3,78			
21 dias	I	0	0 ^a	21 dias	0 ^a
	II	0			
	III	0			

Valores seguidos da mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05).

Nota-se um valor crescente de atividade até 14 dias de cultivo, indicando que o microrganismo pode ter utilizado a lacase para gerar transformações nas moléculas de lignina Kraft, utilizando-a como fonte de carbono. Entretanto, a atividade foi nula aos 21 dias do experimento, o que pode ser explicado pelo consumo da enzima pelo próprio fungo.

Dessa forma, os resultados obtidos mostram que o fungo Br-274 apresentou melhor performance na produção de lacase, quando comparado ao fungo JUMAD002, considerando o tempo total do experimento.

O estudo realizado por Balaraju e colaboradores (2010) testou a produção da enzima lacase por uma cepa de *Oudemansiella radicata* inoculada em meio líquido por 7, 14 e 21 dias. Os resultados desses autores demonstraram que a atividade de lacase do microrganismo é máxima aos 14 dias, com 1,476 U/mL, confirmando os resultados do presente trabalho com o fungo JUMAD002.

Ainda, destaca-se que o fungo JUMAD002 não produziu lacase no controle, indicando o potencial da lignina Kraft em induzir a produção da enzima.

5.6 ANÁLISE DO PERFIL DE METABÓLITOS

As massas dos extratos, após secagem em rotaevaporador, constam na Tabela 4, conforme o fungo utilizado e o tempo de cultivo.

Tabela 4 – Massa seca dos extratos de Br-274 e JUMAD002.

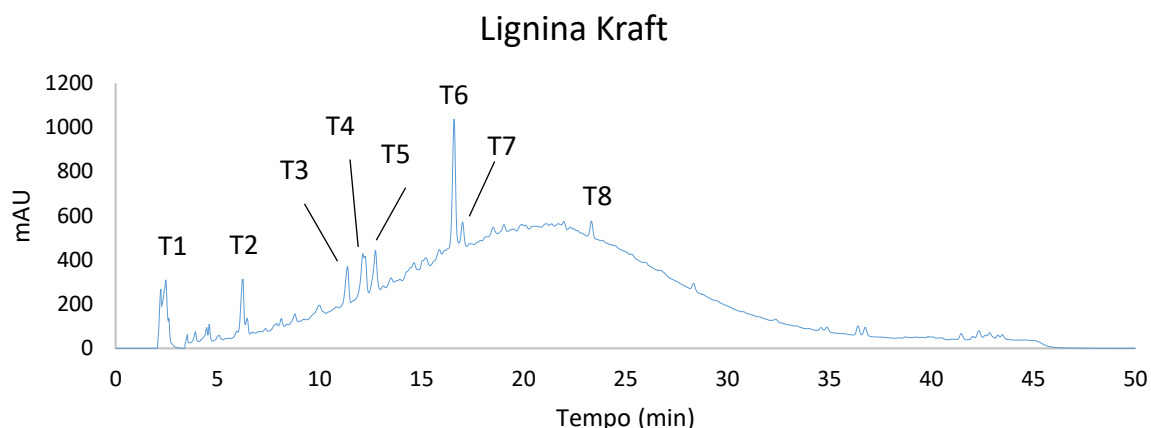
Tempo de cultivo (dias)	Fungo	Massa seca (mg)	
7	Br-274	Controle	8,2
		Tratamento	31,1
14	Br-274	Controle	1,2
		Tratamento	41,2
21	Br-274	Controle	1,3
		Tratamento	29,4
7	JUMAD002	Controle	3,2
		Tratamento	23,4
14	JUMAD002	Controle	0,3
		Tratamento	31,3
21	JUMAD002	Controle	0,9
		Tratamento	10,0

Os valores de tratamento referem-se ao fungo incubado na presença de lignina Kraft, enquanto os valores de controle ao fungo na ausência de lignina Kraft.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos extratos permitiu a geração de seus respectivos cromatogramas. A Figura 29 apresenta os resultados da lignina Kraft sem tratamento, obtida pela extração de 112,5 mg do polímero original em meio líquido de Vogel, com acetato de etila, posteriormente dissolvidos em 2 mL de metanol. Assim, a concentração das substâncias tende a ser duas vezes menor, quando comparada às amostras dos tratamentos.

Nota-se que o cromatograma da lignina Kraft sem tratamento é uma mistura de oito principais compostos (Tabela 5), possivelmente, monômeros e dímeros originados do polímero. O estudo realizado por Chandra e colaboradores (2007) também relatou a presença de diferentes compostos na lignina Kraft purificada, com pelo menos três picos de absorção nos primeiros cinco minutos de cromatografia líquida com acetonitrila e água (70:30).

Figura 29 – Cromatograma da lignina Kraft sem tratamento, extraída do meio líquido



O composto com maior área de pico (279,12) da Figura 29 foi o T6, com tempo de retenção em 16,59 minutos. Este e os demais compostos presentes no cromatograma foram comparados e avaliados com os picos resultantes após o tratamento biológico.

Tabela 5 – Principais compostos revelados por CLAE da lignina Kraft.

Composto	Tempo de retenção (min)	Picos de absorção no espectro de UV-VIS (nm)	Área do pico
T1	2,21	202, 284	6,88
T2	6,23	202, 230, 280, 308	69,81
T3	11,35	202, 276	122,48
T4	12,18	200, 276	191,10
T5	12,74	202, 276	170,48
T6	16,59	204, 260	272,19
T7	17,01	202, 280	130,75
T8	23,33	202, 288	158,89

A Figura 30 traz os cromatogramas referentes aos extratos das amostras de controle do fungo Br-274, ou seja, cultivo na ausência de lignina Kraft. Já a Figura 31 traz os cromatogramas do polímero tratado pelo fungo Br-274. As análises foram restritas aos picos com tempo de retenção de até 30 minutos, uma vez que os sinais localizados fora desse intervalo são resultantes do sistema gradiente.

Ainda, o pico denominado como S também é resultante do sistema gradiente utilizado, sendo que seu tempo de retenção foi de 3,50 minutos.

Figura 30 – Cromatogramas dos extratos de controle do fungo Br-274 em a) 7 dias, b) 14 dias e c) 21 dias.

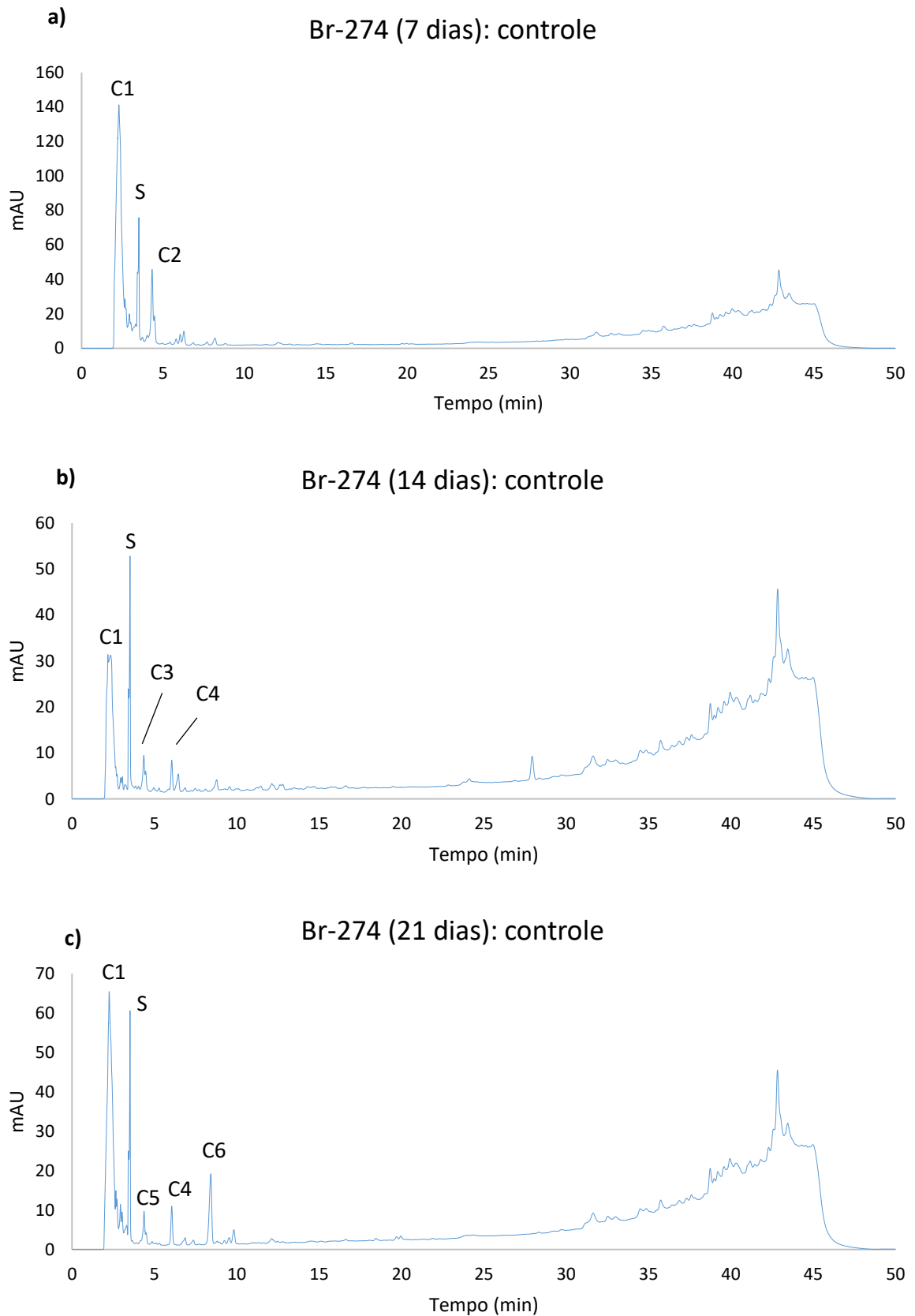
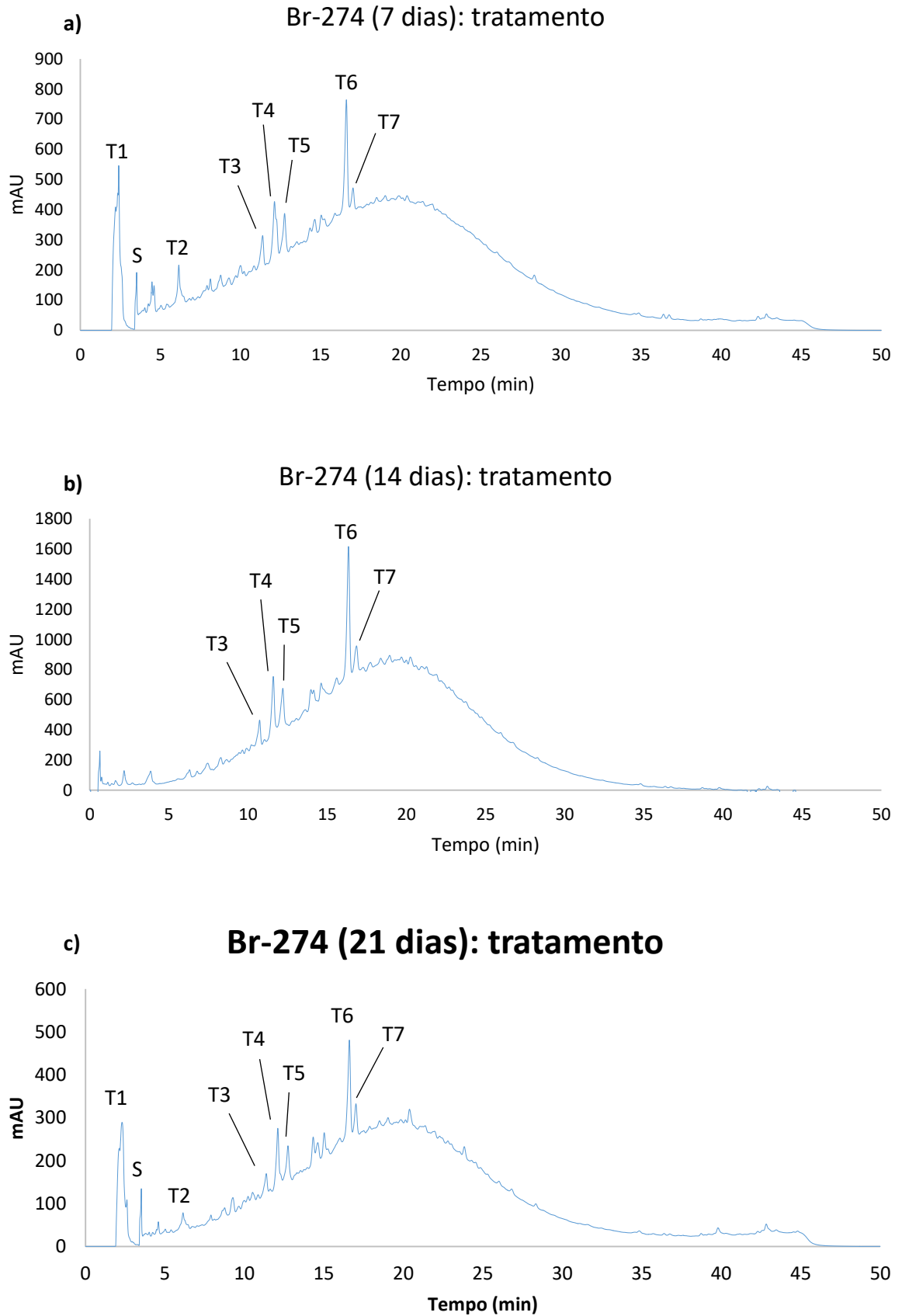


Figura 31 – Cromatogramas dos extratos de tratamento da lignina Kraft pelo fungo Br-274 em a) 7 dias, b) 14 dias e c) 21 dias.



Os cromatogramas de controle do fungo Br-274, destacam a presença de seis compostos principais (Tabela 6). Os compostos C2, C3 e C5, exclusivos dos extratos de 7, 14 e 21 dias deste fungo, respectivamente, apresentam tempos de retenção bastante próximos, entretanto, os picos de máxima absorção no espectro de UV-VIS indicam substâncias distintas.

Tabela 6 – Principais compostos revelados por CLAE dos extratos de controle do fungo Br-274.

Composto	Tempo de retenção (min)	Picos de absorção no espectro de UV-VIS (nm)
C1	2,25	260
C2	4,33	192, 256
C3	4,36	228, 260
C4	6,01	216, 260
C5	4,40	206, 244, 302
C6	8,42	208, 246

Os cromatogramas de tratamento da lignina Kraft pelo fungo Br-274, destacam a presença de sete compostos principais, todos já presentes no perfil de metabólitos da lignina Kraft sem tratamento. Dessa forma, para a metodologia utilizada, não foi possível a detecção de novos metabólitos, mas sim uma possível degradação completa dos fragmentos do polímero.

Chandra e colaboradores (2007) apresentaram resultado semelhante no tratamento de lignina Kraft por diferentes cepas de bactérias, em que os cromatogramas não revelaram novos metabólitos, mas sim, diminuição da área dos picos já existentes referentes ao polímero original.

Os resultados positivos quanto à atividade da enzima lacase, em até 21 dias de incubação do fungo Br-274, suportam a possível degradação completa de parte dos compostos. Como a lignina Kraft era a única fonte de carbono para o fungo, os compostos presentes no polímero tiveram que ser assimilados pelo organismo em estudo para que pudesse produzir a enzima.

Destaca-se que a concentração de extrato para 7 e 21 dias de cultivo do tratamento da lignina Kraft pelo fungo Br-274 foi bastante semelhante: 31,1 e 29,4 mg/mL (Tabela 4), respectivamente. No entanto, a área do pico diminuiu significativamente para todos os compostos revelados. A área do pico de T6 foi de 249,09 em 7 dias para 187,88 em 21 dias. Esse resultado também suporta a possível degradação dos compostos do polímero pelo fungo Br-274.

A Figura 32 traz os cromatogramas referentes aos extratos das amostras de controle do fungo JUMAD002, enquanto a Figura 33 traz os cromatogramas da lignina Kraft tratada pelo mesmo microrganismo.

Nota-se os compostos evidenciados na Figura 32 também estão presentes na Figura 30, assim, as substâncias evidenciadas no cultivo de controle do fungo JUMAD002 também constam no controle de Br-274. Entretanto, este apresentou compostos exclusivos, C3, C5 e C6, quando comparado àquele. O composto C1, comum em todos os cromatogramas de controle de ambos os fungos possui máximo de absorção em 260 nm.

Os cromatogramas da Figura 33 trazem importantes resultados, uma vez que evidenciam três compostos, T9, T10 e T11, presentes apenas no tratamento com o fungo JUMAD002. A Tabela 7 apresenta a caracterização desses compostos quanto ao tempo de retenção e os máximos de absorção no espectro de UV-VIS.

Tabela 7 – Compostos exclusivos revelados por CLAE dos extratos de tratamento do fungo JUMAD002.

Composto	Tempo de retenção (min)	Picos de absorção no espectro de UV-VIS (nm)
T9	4,47	202, 216, 262, 290
T10	6,47	200, 228, 276
T11	15,03	202, 284

A altura dos picos no tratamento da lignina Kraft segue uma relação direta com a quantidade de extrato obtida em cada tempo de cultivo, sendo que para 14 dias de tratamento, obteve-se maior quantidade de extratos, resultando em maiores alturas nos picos dos cromatogramas.

Os três compostos em destaque representam possíveis metabólitos da biotransformação enzimática da lignina Kraft. A identificação desses compostos pode ser realizada com padrões analíticos dos principais metabólitos da lignina, usando a CLAE acoplada a um espectrômetro de massas.

A formação dos compostos T9 e T10 foi registrada desde a primeira extração, em 7 dias, sendo os compostos presentes durante todo o período de análise. Já o composto T11 evidencia-se a partir da amostra de 14 dias de incubação, sendo que em 21 dias apresenta-se como um pico bastante definido.

Figura 32 – Cromatogramas dos extratos de controle do fungo JUMAD002 em a) 7 dias, b) 14 dias e c) 21 dias.

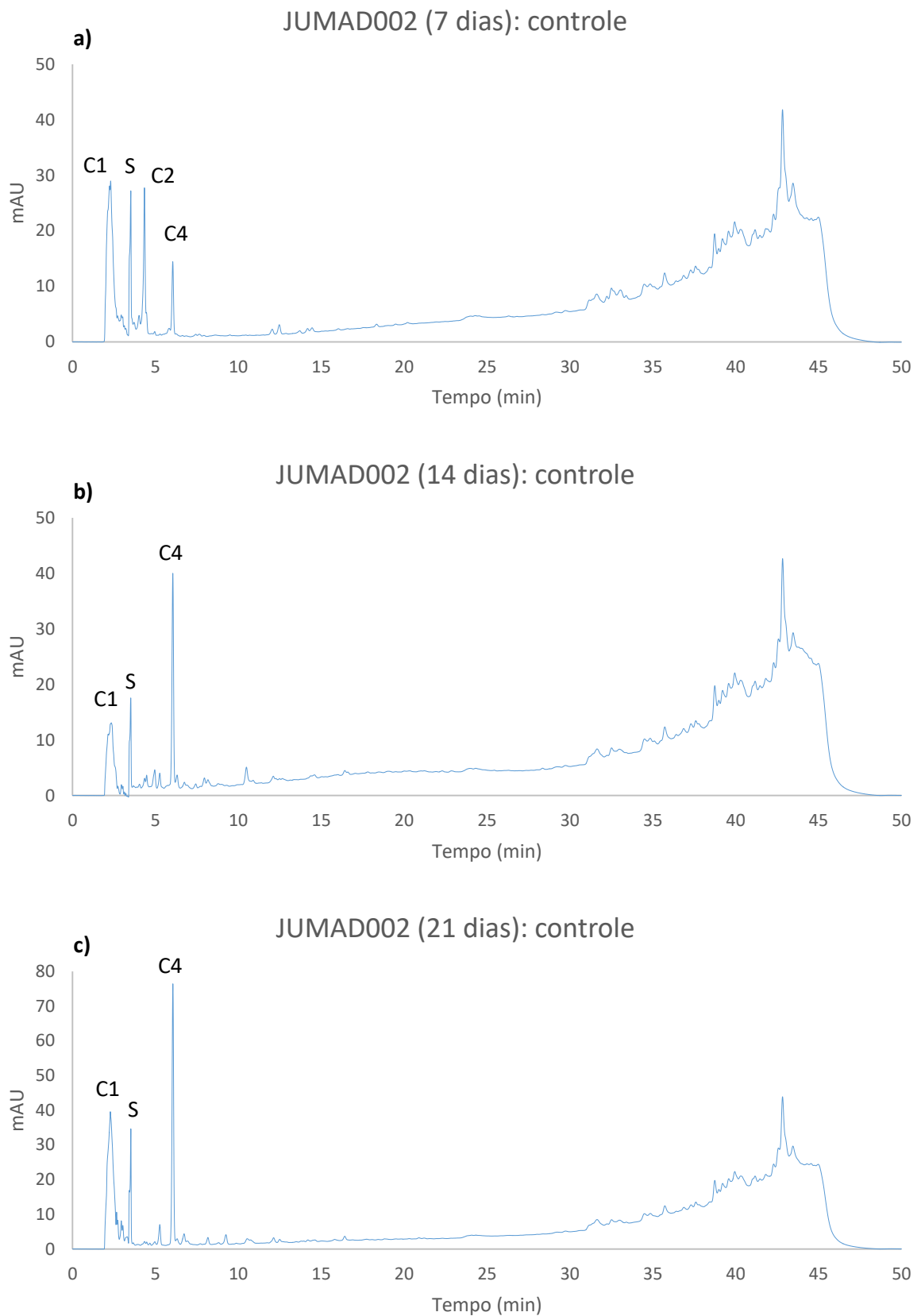
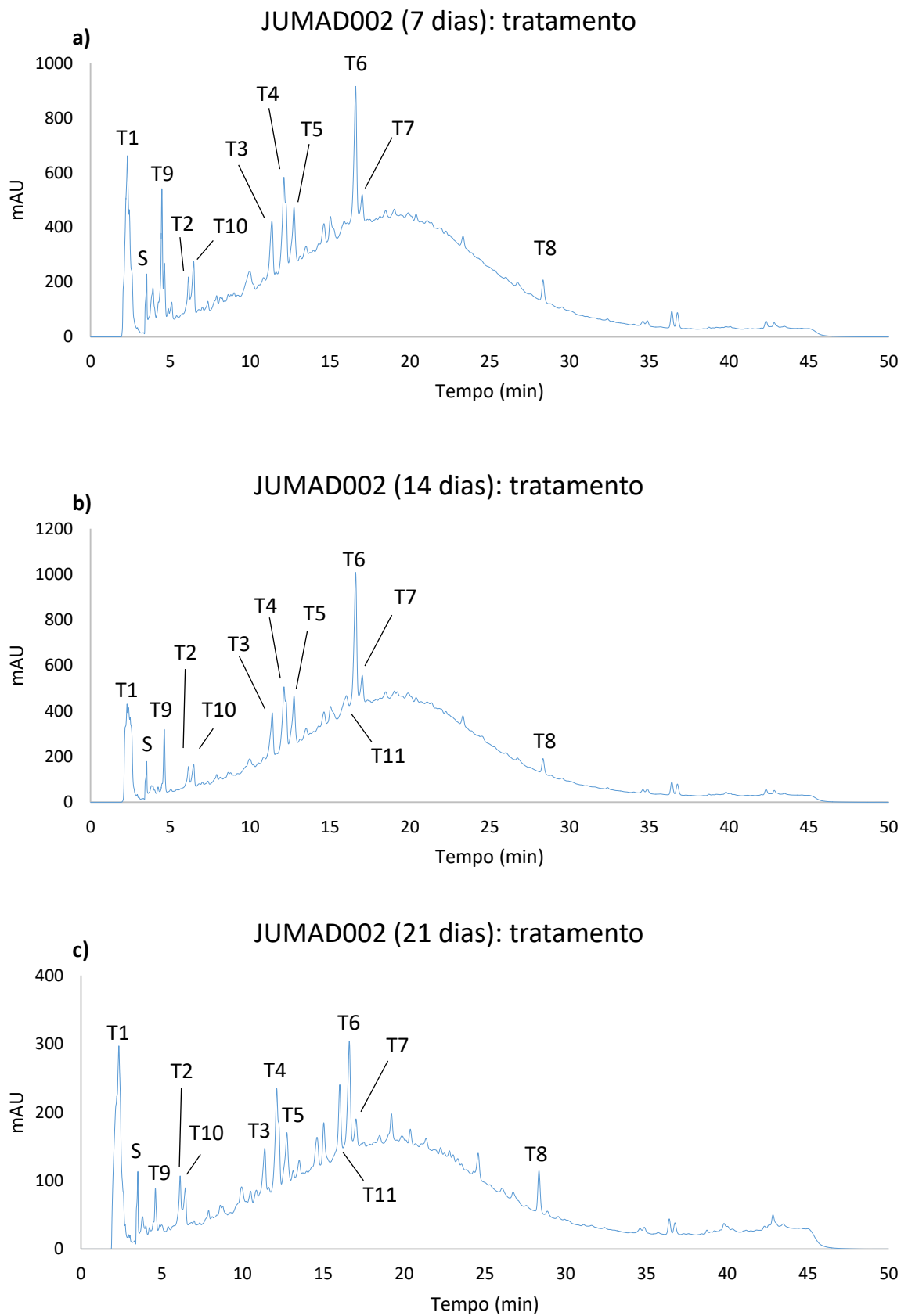


Figura 33 – Cromatogramas dos extratos de tratamento da lignina Kraft pelo fungo JUMAD002 em a) 7 dias, b) 14 dias e c) 21 dias.



Dessa forma, o fungo JUMAD002 apresentou melhores resultados quanto à principal análise proposta: a formação de novos metabólitos a partir da lignina Kraft. Esses metabólitos possuem provável origem da quebra dos compostos da lignina por intermédio da enzima lacase, registrada até 14 dias para o fungo JUMAD002.

Os espectros no UV-VIS de todos os compostos destacados e suas áreas de pico para cada cultivo encontram-se nos Apêndices 1 e 2, respectivamente.

Nota-se que os máximos de absorção no espectro de UV-VIS dos novos compostos não se assemelham aos dos principais produtos da degradação da lignina, como o álcool coniferílico (213,9; 265,2 e 298,3 nm), o álcool sinapílico (222,0 e 274,0 nm) e o ácido trans-cinâmico (276,5 nm), relatados por Jaramillo-Carmona e colaboradores (2008). Também se diferem dos espectros apresentados por Rittsiegl e colaboradores (2002) dos compostos guaiacol, erol e siringaldeído.

Finalmente, os resultados obtidos incentivam futuros estudos com o microrganismo JUMAD002, envolvendo a identificação dos metabólitos formados e sua incubação em grande escala, para produção e purificação dos compostos de interesse.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos pelos testes em meio sólido indicaram baixa inibição do fungo basidiomiceto JUMAD002 (8,2%) e presença de modificações na coloração do meio. Este fungo, juntamente com o isolado Br-274, de potencial ligninolítico, foram selecionados para os experimentos de quantificação da atividade da enzima lacase e biotransformação da lignina Kraft.

Os valores da atividade média da enzima lacase para o fungo Br-274 mostraram-se crescentes com o tempo de incubação, com valor máximo de 9,0 U/mL em 21 dias. Já o fungo JUMAD002 apresentou máxima atividade aos 14 dias de incubação (4,0 U/mL) e atividade nula aos 21 dias.

O perfil dos metabólitos formados pelo fungo Br-274 não revelou a produção de novos compostos, uma vez que os picos evidenciados já estavam presentes no perfil dos constituintes da lignina Kraft não degradada. Entretanto, a produção da enzima lacase durante 21 dias de cultivo, em meio líquido contendo o polímero como única fonte de carbono, mostra a atividade biológica do microrganismo, que possivelmente promoveu a degradação completa da lignina Kraft ao invés da biotransformação.

Os resultados apresentados pelo fungo JUMAD0002 revelaram a presença de três compostos novos, que são possíveis metabólitos formados pelo tratamento biológico da lignina Kraft. Esses compostos foram evidenciados pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e caracterizados por seus espectros na faixa da luz ultravioleta e luz visível.

Portanto, a presença de possíveis metabólitos pelo tratamento com o fungo JUMAD002 validam os objetivos propostos no estudo e incentivam futuros trabalhos com o microrganismo, em que os compostos formados possam ser determinados com padrões analíticos ou espectrometria de massas. Caso os compostos sejam de interesse comercial, pode-se avaliar sua viabilidade na produção em grande escala e validar a técnica à biorrefinaria na indústria.

REFERÊNCIAS

- ADELIN, E.; SERVY, C.; CORTIAL, S.; LEVAIGUE, H.; GALLARD, F. F.; MARTIN, M.T.; RETAILLEAU, P.; BUSSABAN, B.; LUMYONG, S.; OUZZANI, J. Biotransformation of natural compounds. Oxido-reduction of Sch-642305 by *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 8, 2011.
- AGAPITO, M.S.M. **Tratamento de efluente de produção de pasta kraft por *Trametes versicolor***. Dissertação (Mestrado em Gestão Ambiental). Departamento de Ambiente e Ordenamento, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2007.
- BALARAJU, K.; PARK, K.; JAHAGIRDAR, S.; KAVIYARASAN, V. Production of cellulase and laccase enzymes by *Oudemansiella radicata* using agro wastes under solid-state and submerged conditions. **Research in Biotechnology**, v.1, n.1, p. 408-414, 2010.
- BANWART, G.J. **Basic food microbiology**. Westport: The AVI Publishing Company, 1981.
- BARR, D.P.; AUST, S.D. Mechanism white rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science & Technology**, v. 28, p. 78-87, 1994.
- BASHTAN-KANDYBOVICH, I.; VENKATESAGOWDA, B.; BARBOSA, A.M.; MALEK, L.; DEKKER, R.F.H. Modification of Kraft lignin by biological demethylation. **Journal of Science & Technology for Forest Products and Processes (CANADA)**, v. 2, p. 16-27, 2012.
- BELMONTE, M.; XAVIER, C.; DECAP, J.; MARTINEZ, M.; SIERRA-ALVAREZ, R.; VIDAL, G. Improved aerobic biodegradation of abietic acid in ECF bleached kraft mill effluent due to biomass adaptation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 135, p. 256-263, 2006.
- BIROLI, W.G.; YAMAMOTO, K. Y.; OLIVEIRA, J.R.; NITSCHKE, M.; SELEGUIM, M.H.R.; PORTO, A.L.M. Biotransformation of dieldrin by the marine fungus *Penicillium miczynskii* CBMAI 930. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n.1, p. 39-43, 2014.
- BLANCHETTE, R.A. Degradation of the lignocellulosic complex in wood. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 999–1010, 1995.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G.; REID, I.D.; LANTHIER, P.; YAGUCHI, M. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in Kraft lignin depolymerization. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1876-1880, 1995.
- BOZZEL, J.J.; HOLLADAY, J.E.; JOHNSON, D.; WHITE, J.F. Top Value-Added Chemicals from Biomass, Volume II: Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin. **Pacific Northwest National Laboratory, National**

Renewable Energy Laboratory, Office of Biomass Program, U.S. Department of Energy, 79 p., 2007.

BROWN, M.A.; ZHAO, Z.; MAUK, A.G. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. **Inorganica Chimica Acta**, v. 331, p. 232-238, 2002.

BRUNOW, G. 2001. Methods to reveal the structure of lignin. **Hofrichter M., Steinbüchel A. (Eds.)**. Lignin, Humic Substances and Coal. Wiley-VCH, Alemanha, p. 89-116, 2001.

BUGG, T.D.H.; AHMAD, M.; HARDIMAN, E.M.; RAHMANPOUR, R. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1883-1896, 2011.

BYRDE, R.J.; WILLETTS, H.J. **The Brown Rot Fungi of Fruit: their biology and control**, Nova Iorque: Pergamon Press, 1977.

CARLILE, M.J. The success of the hypha and mycelium. In GOW, N.A.R; GADD, G.M. **The Growing Fungus**. Londres: Chapman & Hall, 1995, p. 3-19.

CETEM. **Fungos filamentosos: agentes de degradação de petróleo e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (haps)**. Série Tecnológica Ambiental, Centro de Tecnologia Mineral, Ministério de Ciência e Tecnologia, 2008.

CHANDRA, R.; RAJ, A.; PUROHIT, H.J.; KAPLEY, A. Characterisation and optimisation of three potential aerobic bacterial strains for kraft lignin degradation from pulp paper waste. **Chemosphere**, v. 67, p. 839-846, 2007.

DANIEL, G.; NILSSON, T. Developments in the study of soft rot and bacterial decay. In BRUCE, A.; PALFREYMAN, J.W. (Eds). **Forest Products Biotechnology**. Londres: Taylor & Francis, 1998, p. 37-62.

DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.81-88, 2001.

DESAI, S.S.; NITYANAND, C. Microbial Laccases and their Applications: A Review. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 98-124, 2010.

DEVAPPA, R.K.; RAKSHIT, S.K.; DEKKER, R.F.H. Forest biorefinery. Potential of poplar phytochemicals as value-added co-products. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 681-716, 2015.

DEVLIN, T.M.; STRYER, L., BERG, J.; TYMOCZKO, J. **Bioquímica: Libro de Texto com Aplicaciones Clínicas**. Reverté: Barcelona, ed. 5, p. 421, 2008.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 28, p. 83-99, 2000.

EASTWOOD, D.C. et al. The Plant Cell Wall–Decomposing Machinery Underlies the Functional Diversity of Forest Fungi. **Science Express**, v. 333, n. 6051, p. 762-765, 2011.

EGGERT, C.; TEMP, U.; DEAN, J.F.D.; ERIKSSON, K.E. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. **FEBS Letters**, v. 391, p. 144-148, 1996.

EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K.E. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. **FEBS Letters**, v. 407, p. 89-92, 1997.

ENQUITA, F.J.; MARTINS, L.O.; HENRIQUES, A.O.; CARRONDO, M.A. Crystal Structure of a Bacterial Endospore Coat Component. A Laccase with enhanced thermostability properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 19416-19425, 2003.

ERIKSSON, L., **Biotechnology in the Pulp and Paper Industry**, Springer: Berlin, 1997.

EUGENIO, M.E.; CABAJO, J.M.; MARTÍN, J.A.; GONZÁLEZ, A.E.; VILLAR, J.C. Laccase production by *Pycnoporus sanguineus* under different culture conditions. **Journal of Basic Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 433-440, 2009.

FAN, X.; ZHOU, Y.; XU, Z.; BIAN, Y. Cloning, expression, and phylogenetic analysis of a divergent laccase multigene family in *Auricularia auricula-judae*. **Microbiological Research**, v. 169, n. 5, p. 453-462, 2014.

FANG, Z.; LIU, X.; CHEN, L.; SHEN, Y.; ZHANG, X.; FANG, W.; WANG, X.; BAO, X.; XIAO, Y. Identification of a laccase Glac15 from *Ganoderma lucidum* 77002 and its application in bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 54, 2015.

FENGEL, D., WEGENER, G., **Wood - Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Nova lorque: Walter de Gruyter, 1984.

FERNANDEZ-FUEYO et al. Comparative genomics of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* provide insight into selective ligninolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 21, p. 8352, 2012.

FILLEY, T.R.; CODY, G.D.; GOODELL, B.; JELLISON, J.; NOSER, C.; OSTROFSKY, A. Lignin demethylation and polysaccharide decomposition in spruce sapwood degraded by brown rot fungi. **Organic Geochemistry**, v. 33, n. 2, p. 111-124, 2002.

FORRESTER, I.T.; GRABSKI, A.C.; BURGESS, R.R.; LEANTHAM, G.F. Manganese, Mn-dependent peroxidases, and the biodegradation of lignin.

Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 157, p. 992-999, 1988.

GABRIC, M.V.; POHLEVEN, F. Laccase application for upgrading of lignocellulose fibers. **Drvna Industrija**, v. 66, n. 1, p. 49-55, 2015.

GALAGAN, J. **Spotlight**: *Neurospora crassa*, cruising in the evolutionary slow lane. Broad Institute. Disponível em: <<https://www.broadinstitute.org/news/spotlight-neurospora-crassa-cruising-evolutionary-slow-lane>> Acesso em 17 de maio de 2017.

GIBSON, A.; DEKKER, R.F.H.; MALEK, L. Adaptation of Ti(III)-NTA colorimetric assay for use in detecting microbial demethylation of lignin and lignin derived compounds in aerobic conditions. **Journal of Microbiological Methods**, v. 101, p. 28–32, 2014.

GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**, ed.2, Nova Iorque: Wiley-Liss, 1994.

GUERRERO, R.T.; HOMRICH, M.H. **Fungos macroscópicos comuns no Rio Grande do Sul**: guia para identificação. ed. 2, Porto Alegre: Ed. Universidade/ UFRGS, 1999.

HARILA, P.; KIVILINNA, V.A. Biosludge incineration in a recovery boiler. **Water Science Technology**, v. 40, p. 195–200, 1999.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzyme from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Review**, v. 13, p. 125–135, 1994.

HAWKSWORTH, D.L.; SUTTON, B.C.; AINSWORTH, G.C. **Dictionary of the Fungi**, ed. 7, Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1983.

HOFER, C.; SCHLOSSER, D. Novel enzymatic oxidation of Mn²⁺ to Mn³⁺ catalyzed by a fungal laccase. **FEBS Letters**, v. 451, p. 186-190, 1999.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 454-466, 2002.

HU, L.; PAN, H.; ZHOU, Y.; ZHANG, M. Methods to Improve Lignin's Reactivity as a Phenol Substitute and as Replacement for other Phenolic Compounds: A Brief Review. **BioResources**, v. 6, p. 3515-3525, 2011.

JARAMILLO-CARMONA, S.; FUENTES-ALVENTOSA, J.M.; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, G.; WALDRON, K.W.; SMITH, A.C.; GUILLÉN-BEJARANO, R.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J.; JIMÉNEZ-ARAUJO, A.; RODRÍGUEZ-ARCOS, R. Characterization of Asparagus Lignin by HPLC. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 7, 2008.

JOHANNES, C.; MAJCHERCZYK, A. Laccase activity tests and laccase inhibitors. **Journal of Biotechnology**, v. 78, p. 193-199, 2000.

JOHANSSON, T.; WELINDER, K.G.; NYMAN, P.O. Isozymes of lignin peroxidase and manganese(II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. II. Partial sequences, peptide maps, and amino acid and carbohydrate compositions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 1, p. 57-62, 1993.

KAHRAMAN, S.S.; GURDAL, I.H.; 2002. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 82, p.215-217, 2002.

KAWAI, S.; UMEZAWA, T.; HIGUCHI, T. Degradation Mechanism of Phenolic β -1 Lignin Substructure Model Compounds by Lactase of *Coriolus versicolor*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 262, n. 1, p. 99-110, 1988.

KIRK, T.K.; SCHULTZ, E.; CONNORS, W.J.; LORENZ, L.F.; ZEIKUS, J.G. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Microbiology**, v. 117, p. 277-285, 1978.

KLONOWSKA, A.; GAUDIN, C.; FOURNEL, A.; ASSO, M.; PETIT, J.L.; GIORGI, M.; TRON, T. Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 6119-6125, 2002.

KUHAR, F.; PAPINUTTI, L. Optimization of laccase production by two strains of *Gaoderma lucidum* using phenolic and metallic inducers. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 46, n. 2, p. 144-149, 2014.

LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREK, J.; ZIEGENHAGEN, D.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; CHO, N.S.; HOFRIKHTER, M.; ROGALSKI, J. Biodegradation of lignin by white-rot fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p. 175-185, 1999.

LIERS, C.; ARNSTADT, T.; ULLRICH, R.; HOFRIKHTER, M. Patterns of lignin degradation and oxidative enzyme secretion by different wood- and litter-colonizing basidiomycetes and ascomycetes grown on beech-wood. **FEMS Microbial Ecology**, v. 78, n. 1, p. 91-102, 2011.

LISBOA, S.A.; EVTUGUIN, D.V.; PASCOAL NETO, C.; GOODFELLOW, B.J. Isolation and structural characterisation of polysaccharides dissolved in *Eucalyptus globulus* kraft black liquors. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 77-85, 2005.

MAIA, L.C.; CARVALHO JUNIOR, A.A. **Os fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551-565, 2002.

MIKIASHVILI, N., ELISASHVILI, S., WASSER, S., NEVO, E. Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 955-959, 2005.

MOREIRA, H.J.C.; ARAGÃO F.D. **Manual de Pragas da Soja**. Campinas, 2009.

74p.

MOREIRA NETO, S.L. **Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castabella* CCD444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente). Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.

MOUGIN, C.; JOLIVALT, C.; BRIOZZO, P.; MADZAK, C. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. **Environmental Chemistry Letters**, v. 1, p. 145-148, 2003.

NC-IUB. Nomenclature committee of the international union of biochemistry. Units of enzyme activity, Recommendations. **European Journal of Biochemistry**, v. 97, p. 319–320, 1979.

OCTAVIO, L.C.; IRMA, P.P.M.C.; RICARDO, B.R.J.; FRANCISCO, V.O. Laccases. **Advances in Agricultural and Food Biotechnology**, v. 81, p. 323-340, 2006.

OKURA, M.H.; RENDE, J.C. **Microbiologia**: roteiro de aulas práticas. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2008.

ORIRAN, T.P.; LABOSKY JR, P.; ROYSE, D.J. Lignin degradation capabilities of *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Wood and Fiber Science and Technology**, v. 21, n. 2, p. 183-192, 1989.

PACHECO, S.M.V.; SOARES, C.H.L. Imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleras. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 209-214, 2014.

PAMIDIPATI, S.; AHMED, A. Degradation of lignin in agricultural residues by locally isolated *Neurospora discreta*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, n. 4, p. 1561-1572, 2017.

PANDEY, K.K.; PITMAN, A.J. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, p. 151-160, 2003.

PUJOL, D.; LIU, C.; GOMINHO, J.; OLIVELLA, M.A.; FIOL, N.; VILLAESCUESA, I.; PEREIRA, H. The chemical composition of exhausted coffee waste. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 423-429, 2013.

RITTSIEG, K.; SUURNAKKI, A.; SUORTTI, T.; KRUUS, K.; GUEBITZ, G.; BUCHERT, J. Investigation on the laccase-catalyzed polymerization of lignina model compounds using size-exclusion HPLC. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 403-410, 2002.

RODRIGUES, E.G.; LÍRIO, V.S.; LACAZ, C.S. Preservação de fungos actinomicetos de interesse médico em água destilada. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 2, p.

RUEGGER, M.J.S.; TORNSIELO, S.M.T.; BONONI, V.L.R.; CAPELARI, M. Cultivation of the edible mushroom *Oudemansiella canarii* (Jungh.) Hohn. in lignocellulosic substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 3, p.211-214, 2001.

SALVI, M.B. **Fungos Basidiomicetos em biorremediação**. Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo, 2011.

SCHLOSSER, D.; GREY, R.; FRITSCH, W. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. **Applied Microbiology and Technology**, v. 47, p. 412-418, 1997.

SCHNEIDER, P.; CASPERSEN, M.B.; MONDORF, K.; HALKIER, T.; SKOV, L.K.; OSTERGAARD, P.R. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. **Enzyme Microbial Technology**, v. 25, p. 502-528, 1999.

SJOSTROM, E. **Wood Chemistry, Fundamentals and Applications**. 3 ed. Nova Iorque: Academic Press, 1981.

SOLIS-OBA, M.; UGALDE-SALDIVAR, V.M.; GONZALEZ, I.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 579, p. 59-66, 2005

SWAMY, J., RAMSAY, J.A., Effects of glucose and NH⁴⁺ concentrations on sequential dye decoloration by *Trametes versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25: p. 278-284, 1999.

TARIQ, M.; YASMIN, S.; HAFEEZ, F.Y.; Biological control of potato black scurf by rhizosphere associated bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 439-451, 2010.

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

TOMÉ, R. **Atlas Micologia: Trichoderma viride**. Disponível em: <<http://atlasmicologia.blogspot.com.br/2015/05/trichoderma-viride.html>> Acesso em 17 de maio de 2017.

TORRES, E.; BUSTOS-JAIMES, I.; BORGNE, S.L. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 46, p. 1-15, 2003.

USEPA. Compilation of Air Pollutant Emission Factors. Wood Products Industry. **Chemical Wood Pulping**, 1990. Disponível em:

<<https://www3.epa.gov/ttnchie1/ap42/ch10/final/c10s02.pdf>> Acesso em 31 out 2016.

VISWANATH, B., CHANDRA, M.S.; PALLAVI, H.; RAJASEKHAR-REDDY, B. Screening and assessment of laccase producing fungi isolated from different environmental samples. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 1129-1133, 2008.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Microbial Genetics Bulletin**, v.13, p.42-43, 1956.

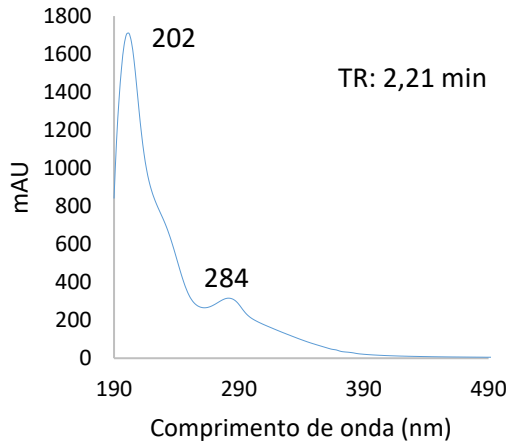
WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M.H. In vitro depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 176, n. 1, p. 269-275, 1991.

YADA JUNIOR, G.M. **Biotransformação do inseticida flubendiamida por fungos de solo e lacase; análise dos metabólitos por espectrometria de massas (LC-MS/MS)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2016.

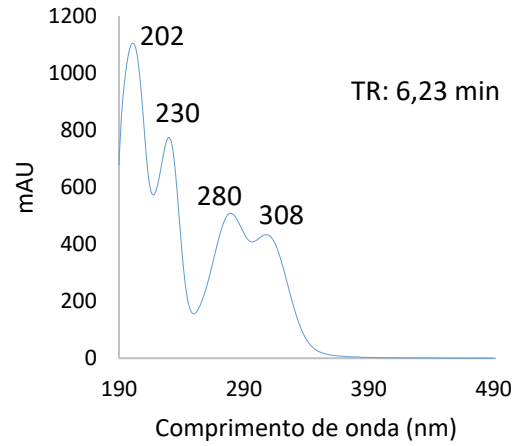
ZNAMEROSKI, E.A.; CORADETTI, S.T.; ROCHE, C.M.; TSAI, J.C.; IAVARIBE, A.T.; CATE, J.H.; GLASS, N.L. Induction of lignocellulose-degrading enzymes in *Neurospora crassa* by cellodextrins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6012-6017, 2012.

APÊNDICE A - Espectros de UV-VIS dos compostos e respectivos tempos de retenção (TR).

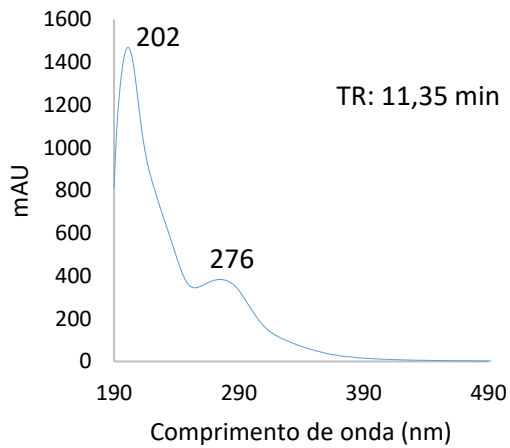
Espectro UV-VIS de T1



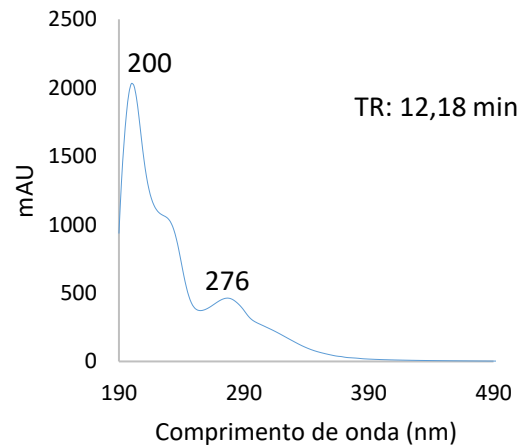
Espectro UV-VIS de T2



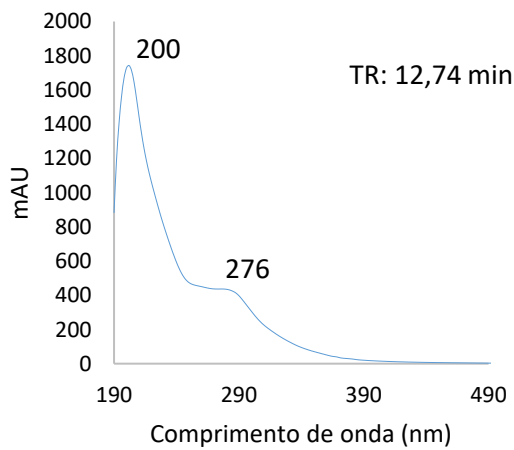
Espectro UV-VIS de T3



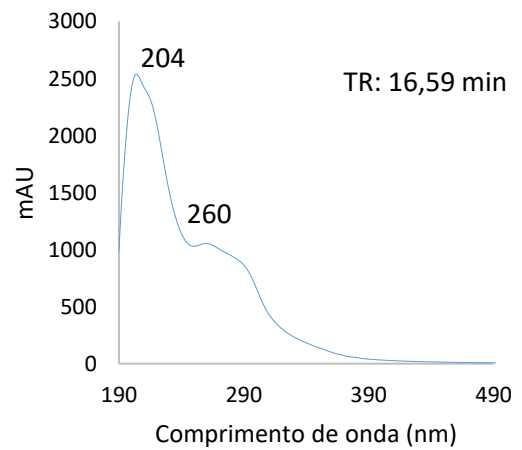
Espectro UV-VIS de T4



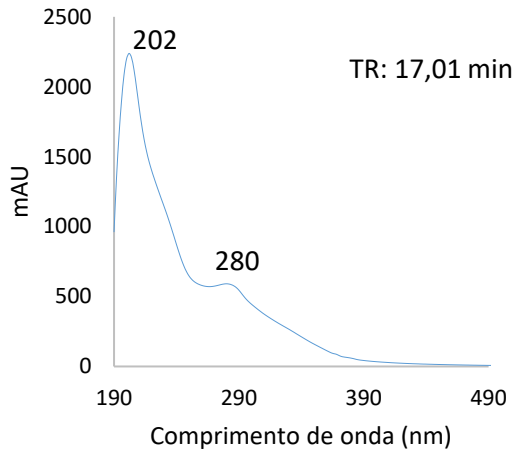
Espectro UV-VIS de T5



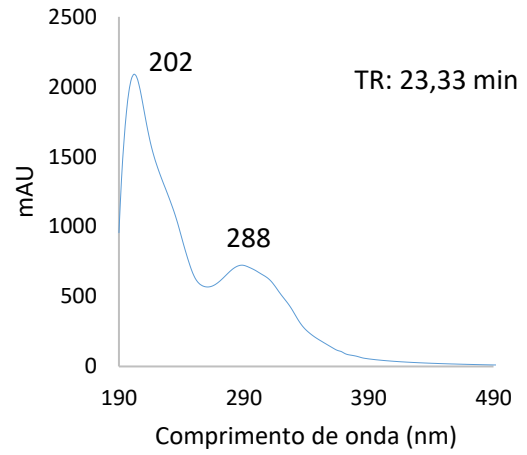
Espectro UV-VIS de T6



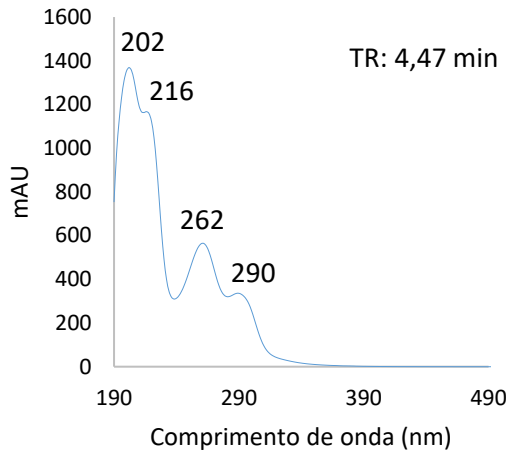
Espectro UV-VIS de T7



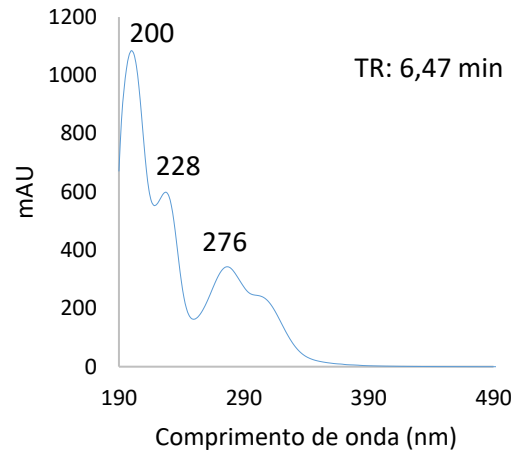
Espectro UV-VIS de T8



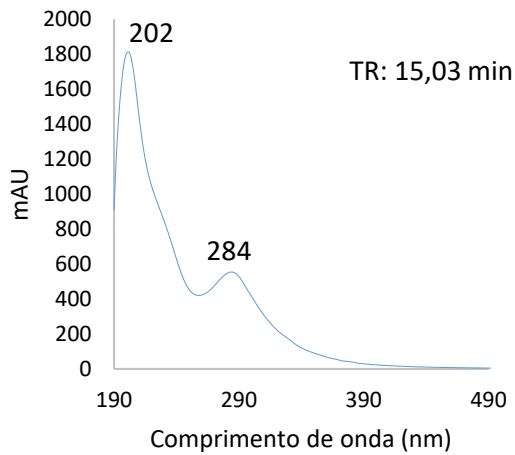
Espectro UV-VIS de T9



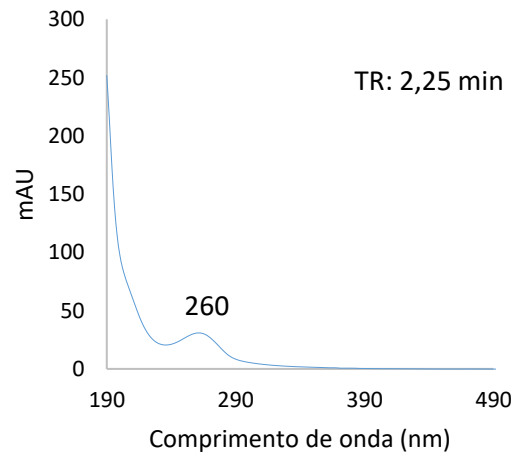
Espectro UV-VIS de T10



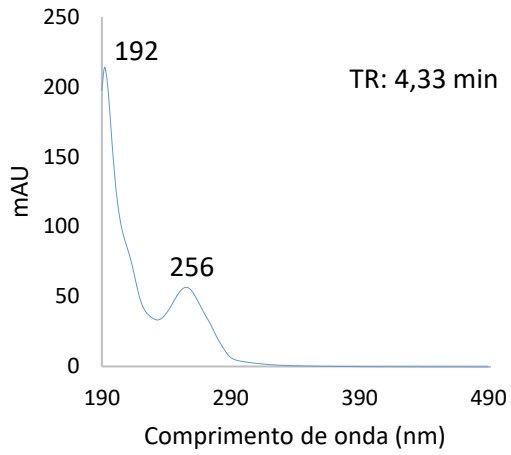
Espectro UV-VIS de T11



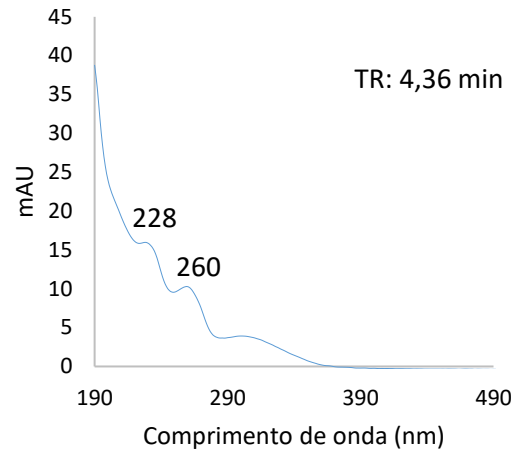
Espectro UV-VIS de C1



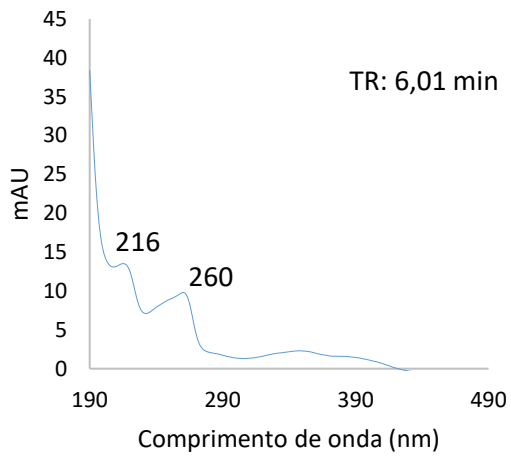
Espectro UV-VIS de C2



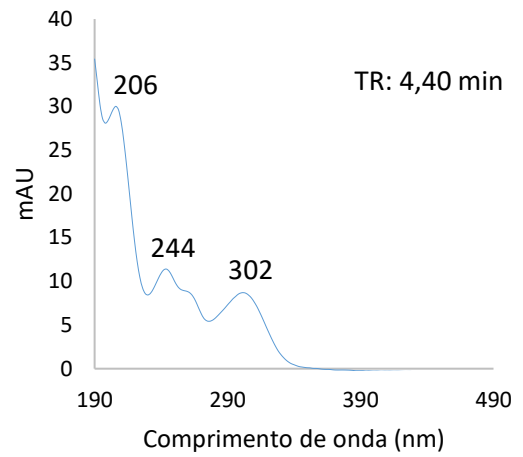
Espectro UV-VIS de C3



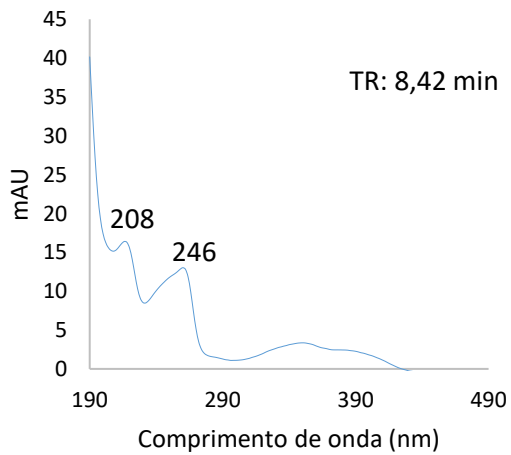
Espectro UV-VIS de C4



Espectro UV-VIS de C5



Espectro UV-VIS de C6



**APÊNDICE B - Áreas dos picos referentes aos principais compostos
abordados no tratamento da lignina Kraft, de acordo com o fungo estudado e
tempo de cultivo.**

Br-274: tratamento da lignina Kraft			
Composto	Área do pico		
	7 dias	14 dias	21 dias
T1	222,33	-	136,97
T2	44,82	-	39,72
T3	127,16	150,29	56,61
T4	205,51	267,45	91,72
T5	163,38	274,09	103,41
T6	249,09	497,92	187,88
T7	128,51	327,82	118,41

JUMAD002: tratamento da lignina Kraft			
Composto	Área do pico		
	7 dias	14 dias	21 dias
T1	247,03	201,90	135,08
T2	43,67	36,55	25,62
T3	148,58	152,11	47,12
T4	258,27	238,43	94,60
T5	195,51	176,70	70,58
T6	333,80	340,93	108,15
T7	195,36	193,75	66,53
T8	74,16	58,87	32,82
T9	115,20	52,11	13,52
T10	61,52	41,92	19,82
T11	-	147,61	81,52