

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
BACHARELADO EM QUÍMICA

OSMAR ANTONIO BALDO PIRES

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS DE
FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA COMO PRÉ-TRATAMENTO
PARA SACARIFICAÇÃO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA
2015

OSMAR ANTONIO BALDO PIRES

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS DE
FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA COMO PRÉ-TRATAMENTO
PARA SACARIFICAÇÃO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2 do Curso Superior de Bacharelado em Química Tecnológica do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBi – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – *Campus* Curitiba, como requisito parcial para obtenção de título de Bacharel em Química Tecnológica.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Giselle Maria Maciel.

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto.

Coorientadora: Dr^a. Cristiane Vieira Helm

CURITIBA

2015

AGRADECIMENTOS

Sem dúvida inúmeras pessoas participaram desta importante etapa que dará um novo rumo à minha vida, quero agradecer imensamente a todos que por alguma razão se envolveram e me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimentos especiais a Deus, pela saúde e disposição que pude ter durante toda a graduação, e à minha família que mesmo distante sempre me motivou e me deu a segurança necessária para me dedicar exclusivamente aos estudos.

Gostaria de agradecer à Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) que, através dos professores auxiliou em minha formação acadêmica. Em especial, deixo o meu agradecimento à Professora Dr^a. Giselle Maria Maciel pela orientação e apoio durante o desenvolvimento do Trabalho de Conclusão de Curso.

Agradeço da mesma forma a Embrapa Florestas, especialmente à Dr^a. Cristiane Vieira Helm e ao Dr. Fabricio Augusto Hansel, pela ajuda técnica, instrumental e pelas conversas informais que ajudaram a solucionar dúvidas quanto a este projeto.

Por fim, agradeço àqueles que fizeram muito mais agradável minha trajetória durante toda a graduação, minha namorada Tayane Baranceli pelo amor e paciência em todos os momentos e aos amigos e companheiros Lucas Karas e Michele Dias.

RESUMO

PIRES, Osmar Antonio B. Produção e aplicação de extratos enzimáticos de fungos da podridão branca como pré-tratamento para sacarificação de resíduos agrícolas. 2015. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Química Tecnológica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

O etanol é uma das fontes renováveis de energia mais aplicadas, porém sua produção utiliza grandes quantidades de fontes vegetais de carboidratos, desviando a produção de alimentos e inflacionando o valor da terra. Contornando esse empecilho a segunda geração de etanol emprega resíduos lignocelulósicos da agroindústria. Uma importante limitação para o etanol 2G é a barreira físico-química formada pela lignina e hemicelulose que dificulta a hidrólise da celulose. Neste trabalho, estudou-se a produção de extratos enzimáticos ricos em lacase, uma enzima lignolítica importante na biodegradação da lignina realizada pelos fungos da podridão branca da madeira. Foram testados os fungos *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* e *Trametes* sp. em cultivo submerso estático e agitado, além da adição de possíveis indutores de lacase, como casca de arroz, eucalipto moído e sulfato de cobre (II). Os cultivos duraram 7 dias, a 28 °C e 120 rpm (no agitado) em meios contendo glicose, fosfato de potássio monobásico, sulfato de magnésio e peptona. Os extratos enzimáticos foram filtrados em papel filtro e a atividade de lacase verificada espectrofotometricamente a 420 nm de acordo com a degradação do ácido 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico). Os melhores resultados para cada fungo foram: 7182,81 ± 383,03 U/L, *Pleurotus ostreatus* com sulfato de cobre e eucalipto; 2679,89 ± 369,58 U/L, *Trametes* sp. com sulfato de cobre e casca de arroz; 217,95 ± 7,77 U/L, *Ganoderma lucidum* com sulfato de cobre e eucalipto. Em seguida, os extratos produzidos foram aplicados em casca de arroz e eucalipto urofila juntamente com mediadores químicos para lacase (siringaldazina, extrato hidroalcoólico de uva bordô e os ácidos vanílico, ferúlico, gálico e 4-hidroxibenzoico). Os produtos deste tratamento foram sacarificados com o coquetel de celulases e hemicelulases Cellic Ctec2 (Novozymes). As maiores liberações de açúcares foram obtidas quando o tratamento com lacase foi feito com o ácido 4-hidroxibenzoico (2,93 g L⁻¹ para a casca de arroz e 1,07 g L⁻¹ para o eucalipto urofila).

Palavras chave: Etanol de segunda geração. Etanol lignocelulósico. Pré-tratamento biológico. Hidrólise enzimática.

ABSTRACT

PIRES, Osmar Antonio B. Production and application of enzymatic extracts of white rot fungi as pre-treatment of agricultural wastes for subsequent saccharification. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Química Tecnológica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

Ethanol derived from biomass is one of the most applied renewable sources of energy, however, in its production are used carbohydrate sources grown only for the alcoholic fermentation, diverting food production and rendering more expensive the land price. In the second generation of ethanol are employed lignocellulosic wastes from agroindustry. A bottleneck of this technique is the physical and chemical barrier formed by lignin which hinders the conversion of cellulose into simple sugars. In this work was studied the production of enzyme extracts rich in laccase, an important lignolytic enzyme which is present in the biodegradation of lignin by white rot fungi. Fungi *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* and *Trametes* sp. were tested in static and shaken submerged culture, besides the addition of potential inducers of laccase, rice husks, milled eucalyptus and copper (II) sulfate. The cultivations were run in 7 days, at 28 °C and 120 rpm (shaken) and the medium contained glucose, monobasic potassium phosphate, magnesium sulfate and peptone. The enzymatic extracts were filtered through filter paper and the laccase activity was detected spectrophotometrically at 420 nm according to the degradation of 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzotiazolino-6-sulfonic acid). The best results for each fungus were: 7182.81 ± 383.03 U/L, *Pleurotus ostreatus* with copper sulfate and eucalyptus; 2679.89 ± 369.58 U/L, *Trametes* sp. with copper sulfate and rice hulls; 217.95 ± 7.77 U/L, *Ganoderma lucidum* with copper sulfate and eucalyptus. Then the produced extracts were applied on rice husk and *Eucalyptus Urophylla* together with chemical mediators for laccase (syringaldazine, hydroalcoholic extract of grape and the acids vanillic, ferulic, gallic and 4-hydroxybenzoic). The products of this treatment were saccharificated with Cellic Ctec2 (Novozymes). The highest releases of sugars were obtained when the treatment with laccase was run with 4-hydroxybenzoic acid (2,93 g L⁻¹ for rice husk and 1,07 g L⁻¹ for *Eucalyptus Urophylla*).

Keywords: Second generation ethanol. Lignocellulosic ethanol. Biological pretreatment. Enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura típica de material lignocelulósico	15
FIGURA 2 – Aplicação dos fungos na biotecnologia	19
FIGURA 3 – Diferentes fungos e condições de cultivo empregadas	27
FIGURA 4 – Espectros de infravermelho para casca de arroz	37
FIGURA 5 – Espectros de infravermelho para eucalipto urofila	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Composição de resíduos agroindustriais produzidos em larga escala no Brasil	17
TABELA 2 – Atividades de lacase obtidas em 48 horas de cultivo a 28 °C para os fungos <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Trametes</i> sp. e <i>Ganoderma lucidum</i>	34
TABELA 3 – Compostos fenólicos totais nos sobrenadantes detectados após a etapa de biodegradação do eucalipto urofila e da casca de arroz	36
TABELA 4 – Açúcares liberados na sacarificação da casca de arroz	41
TABELA 5 – Açúcares liberados na sacarificação do eucalipto	43

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

ABTS – Ácido 2,2"-azino-bis (3-etilbenzetiazolino-6-sulfônico)

AF – Ácido ferúlico

AHB – Ácido 4-hidroxibenzóico

AG – Ácido gálico

AV – Ácido vanílico

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FTIR-ATR – Infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada

HBT – 1-hidroxibenzotriazol

KBr – Brometo de potássio

LiP – Lignina peroxidase

MnP – Manganês peroxidase

sd – *standard deviation* (desvio padrão)

Si – Siringaldazina

UVA – Extrato hidroalcoólico de uva bordô

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 JUSTIFICATIVA	11
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
3.1 ETANOL COMBUSTÍVEL	12
3.2 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO (2G)	12
3.3 COMPOSIÇÃO, ESTRUTURA E DISTRIBUIÇÃO DOS COMPONENTES DA MATÉRIA LIGNOCELULÓSICA.....	14
3.4 PRINCIPAIS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS BRASILEIROS	16
3.5 PRODUÇÃO BRASILEIRA DE ARROZ E EUCALIPTO	17
3.6 FUNGOS E SUA IMPORTÂNCIA NA BIOTECNOLOGIA.....	18
3.6.1 Fungos no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos	20
3.6.2 Fungos da podridão branca, parda e suave e seus potenciais enzimáticos.....	20
4 OBJETIVOS	24
4.1 OBJETIVO GERAL	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
5 METODOLOGIA	25
5.1 PREPARO DOS SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS	25
5.2 CULTIVO E ARMAZENAMENTO DAS CEPAS FÚNGICAS.....	25
5.3 PREPARO DOS EXTRATOS RICOS EM LACASE	26
5.3.1 Testando diferentes condições de cultivo.....	26
5.3.2 Ensaio de atividade de lacase nos extratos enzimáticos.....	27
5.3.3 Produção de extrato enzimático para pré-tratamento da casca de arroz e eucalipto.....	28
5.4 BIODEGRADAÇÃO (PRÉ-TRATAMENTO) DA CASCA DE ARROZ E DA SERRAGEM.....	28
5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DA BIODEGRADAÇÃO.....	29
5.5.1 Quantificação de compostos fenólicos	30
5.5.2 Quantificação de mono e dissacarídeos.....	30
5.5.3 Caracterização da biomassa tratada com lacase por infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada.....	31
5.6 SACARIFICAÇÃO DA BIOMASSA PRÉ-TRATADA	31
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
6.1 PRODUÇÃO DE LACASE, LIGNINA PEROXIDASE E MANGANÊS PEROXIDASE.....	33
6.2 ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO.....	35
6.3 SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	40
7 CONCLUSÕES	44
8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	45
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

O uso de combustíveis fósseis leva a problemas ambientais e econômicos, como as emissões de gases de efeito estufa e a volatilidade e incerteza nos preços de petróleo. Por isso, é importante buscar fontes alternativas de energia.

A biomassa vegetal se enquadra nesta problemática como uma das mais promissoras fontes a ser explorada, pois, é muito abundante e bem difundida por toda a Terra, o que torna seu uso mais igualitário do que o das fontes fósseis.

Um combustível que parte da biomassa vegetal é o etanol, que é utilizado em veículos (especialmente no Brasil). Como ocorreu no programa pró-Álcool do governo brasileiro, o uso do etanol normalmente é incentivado em momentos de alta nas cotações do petróleo, porém nem sempre consegue competir com a gasolina. É preciso aliar os benefícios ambientais e sociais do etanol com uma produção eficiente e competitiva com os outros combustíveis ofertados.

O desenvolvimento da segunda geração de etanol (2G) aumenta o número de matérias primas que podem ser utilizadas, incluindo fontes mais baratas e abundantes do que as usadas na primeira geração. São utilizados materiais descartados de outros processos ou que têm baixo valor agregado, sendo principalmente resíduos do setor agroindustrial.¹

Dessa forma, não é necessário desviar a produção de alimentos para a de etanol e se produz mais sem aumentar a área plantada, desinflationando o valor da terra. Com a incorporação destas fontes, pode-se reduzir os custos de produção e aumentar a oferta, abaixando o preço do combustível.

Dentre os componentes destes resíduos se encontra a celulose (e hemicelulose), que é convertida à açúcares e, em seguida, à etanol. Entretanto, o ponto fundamental é permitir que as porções de celulose e hemicelulose dos materiais lignocelulósicos estejam acessíveis à hidrólise para que sejam liberados os seus monômeros, os açúcares.

O procedimento ideal é aquele que remove a barreira de lignina e hemicelulose, levando a altos rendimentos na liberação de açúcares, porém sem gerar inibidores para a etapa de fermentação (compostos tóxicos que prejudicam o

microrganismo fermentador)². É importante também, utilizar condições amenas de temperatura e pressão e evitar a geração de poluentes no processo, para que a técnica seja a mais amigável ao meio ambiente possível.

Considerando estes fatores, as rotas biológicas tendem a ser as mais interessantes, pois têm alta seletividade na degradação da lignina, não gerando inibidores e funcionam em condições próximas às condições ambientes quanto à temperatura e pressão.

Este trabalho visa desenvolver uma rota biológica para promover a quebra da estrutura rígida da lignina da casca de arroz, aumentando o acesso de enzimas celulolíticas à celulose, buscando alcançar altos rendimentos de açúcares fermentáveis com tempos de tratamento adequados à produção industrial.

2 JUSTIFICATIVA

Uma ótima fonte interessante de energia é a biomassa vegetal, na qual a energia solar é convertida e armazenada em energia química. Este tipo de material é produzido em larga escala pela agroindústria, sendo muitas vezes considerado resíduo de diversos processos.

Este trabalho visa explorar uma das maneiras de converter a energia da biomassa: a obtenção de etanol a partir de resíduos agroindustriais. Tais resíduos são grandes reservas de celulose que, com o tratamento adequado, pode ser convertida em etanol.

Com as fontes celulósicas, não se ocupam novas áreas de plantações, pois a produção vem de resíduos já gerados e que não têm finalidades nobres.

Neste trabalho, é proposta uma rota biológica para superar a barreira formada por lignina e hemicelulose que dificulta o acesso à celulose.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ETANOL COMBUSTÍVEL

De todo o consumo energético mundial, mais da metade provém de fontes fósseis não renováveis: petróleo, gás natural e os seus derivados.³ Ou seja, existe uma dependência muito grande deste tipo de material.

Independentemente de avanços nos mecanismos de detecção e prospecção dos combustíveis fósseis que fazem aumentar as reservas mundiais destes, é interessante voltar a atenção para fontes alternativas de combustíveis, para ter-se maior segurança energética. Uma boa opção é o etanol obtido da biomassa vegetal que compete com o mais importante derivado do petróleo, a gasolina.

Diversos países já assumiram compromissos de diminuição da dependência de combustíveis fósseis, o que abre uma enorme demanda para o uso do etanol. É preciso atender esta demanda sem causar desequilíbrios no uso da terra e na produção de outros produtos fundamentais, como os alimentos.

O desenvolvimento da segunda geração de etanol (2G) é muito importante neste sentido, pois passam a ser utilizadas as fontes de açúcares fermentáveis presentes em resíduos gerados em outros processos, especialmente os da agroindústria.¹

Quase todo o etanol produzido vem da fermentação alcoólica de açúcares por microrganismos, sobretudo pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que converte a molécula de glicose (um açúcar de seis carbonos) em etanol.⁴ Assim, a obtenção de novas fontes de açúcares fermentáveis pode ser incorporada facilmente à cadeia atual de produção do etanol.

3.2 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO (2G)

A primeira geração de etanol é baseada na fermentação de açúcares extraídos de fontes de sacarose ou amido, como a cana-de-açúcar e o milho,

respectivamente.⁵ A biomassa é produzida especificamente para a produção do combustível. Já a segunda geração de produção de etanol, utiliza como matéria-prima resíduos da produção agroindustrial.

A biomassa renovável composta por lignocelulose é a mais abundante na Terra, tendo produção estimada em 1×10^{10} mega toneladas no ano de 2008.⁶ Entretanto, a conversão biológica de materiais lignocelulósicos em etanol ainda possui diversos obstáculos econômicos e técnicos, devido às barreiras físicas e químicas causadas pela forte associação dos componentes do material: celulose, hemicelulose e lignina.⁷

O processo de conversão da biomassa lignocelulósica compreende as etapas de hidrólise da celulose e hemicelulose, a fermentação dos açúcares gerados, a remoção dos resíduos de lignina e a recuperação e purificação do etanol.⁷ Contudo, uma etapa fundamental é o pré-tratamento que visa a perda da estrutura rígida da lignina e da cristalinidade da celulose, elevando assim o rendimento da sua hidrólise.⁸

As recentes pesquisas em torno do pré-tratamento de materiais lignocelulósicos visam o desenvolvimento de metodologias que atendam os seguintes parâmetros:

- Viabilizar a hidrólise da celulose com baixas cargas enzimáticas (pelo menos 90% da celulose deve ser digerida, em até 5 dias e com no máximo 10 FPU/g de celulose).⁹
- Não consumir grandes quantidades de energia e de reagentes químicos, com a temperatura do pré-tratamento sendo compatível com a do processo em que está integrado.
- Não degradar os açúcares presentes na celulose e hemicelulose.
- Não gerar compostos tóxicos que inibem a etapa de fermentação. Condições muito severas nesta etapa podem levar à degradação parcial da hemicelulose, gerando compostos como furfural e hidroximetilfurfural, que inibem a hidrólise da celulose e a fermentação.²
- Utilizar resíduos no estado em que são produzidos, sem requerer reduções de tamanho de partículas ou outras etapas que consumam energia.⁷
- Possibilitar a recuperação da lignina, para simplificar as etapas posteriores e agregar valor ao processo.⁹

Quanto maior o número dos parâmetros alcançados, mais viável será a metodologia estudada, já que o pré-tratamento é ponto chave da produção do etanol 2G, sendo o segundo maior gasto do processo (atrás apenas dos gastos com insumos), nos métodos com hidrólise enzimática.⁸

3.3 COMPOSIÇÃO, ESTRUTURA E DISTRIBUIÇÃO DOS COMPONENTES DA MATÉRIA LIGNOCELULÓSICA

Os materiais lignocelulósicos são compostos principalmente por holocelulose (celulose e hemicelulose) e lignina, além de pequenas frações de extrativos (ácidos graxos, óleos essenciais, açúcares solúveis, etc).

A celulose é um biopolímero homogêneo e linear, composto por moléculas de D-glicose unidas por ligações β -1,4 glicosídicas (na ordem de 10.000 ou mais unidades). Já o biopolímero hemicelulose é composto por mais de um tipo de açúcar, incluindo hexoses (glicose, galactose, manose) e pentoses (xilose, arabinose) em ligações lineares e ramificadas (na ordem de 100 a 200 monômeros). Por fim, a lignina é uma macromolécula, podendo ser chamada de polímero heterogêneo, onde seus monômeros são grupos fenólicos contendo diferentes substituintes, o que lhe confere uma estrutura altamente complexa.¹⁰

A Figura 1 exemplifica o modo como se encontram distribuídos os componentes dos materiais lignocelulósicos.

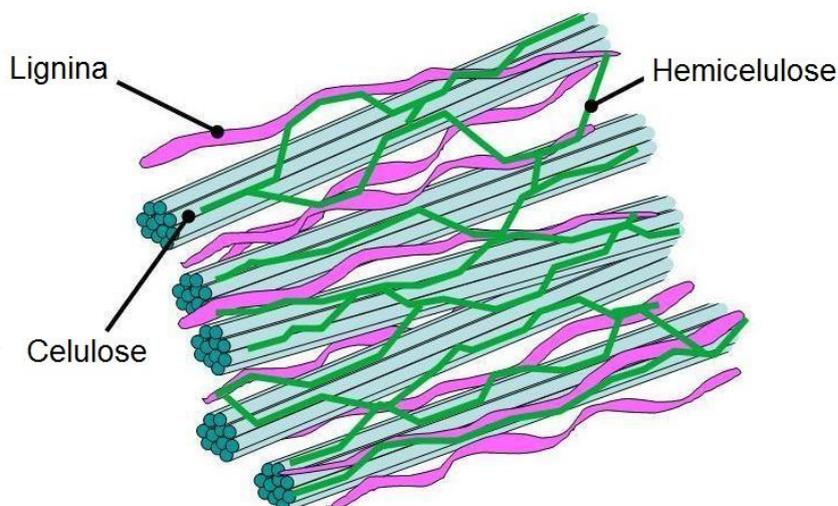


Figura 1 – Estrutura típica de material lignocelulósico

Para compreender a distribuição dos componentes dos materiais lignocelulósicos é preciso estudar a estrutura celular destes. A célula do vegetal é composta por dois domínios distintos: o protoplasma (conteúdo celular) e a parede celular.¹¹

O protoplasma corresponde a todo o conteúdo limitado pela membrana celular, e nele estão presentes as organelas celulares e os compostos necessários ao metabolismo da célula, como carboidratos, proteínas, lipídios, etc.¹¹

Já a parede celular é um tecido morto que se encontra envolvendo o protoplasma, evitando que este sofra lise osmótica e também proporcionando sustentação ao vegetal, principalmente nas plantas superiores.¹¹

A parede celular é dividida em três regiões principais:

- Lamela média: se encontra entre células adjacentes conferindo aderência entre elas. Composta principalmente por pectinas e lignina.
- Parede celular primária: finas e flexíveis, em comparação com a secundária, para poder acomodar o crescimento celular.¹² Compostas principalmente por celulose.

- Parede celular secundária: rígida e mais espessa. À medida que a célula vai parando de crescer, a parede secundária vai recebendo incrementos de lignina, sendo a mais rica neste polímero dentre as três regiões citadas.¹²

3.4 PRINCIPAIS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS BRASILEIROS

Desde a sua colonização, o Brasil tem como uma de suas principais atividades a agricultura. O país possui uma das maiores disponibilidades de terras aráveis e fontes hídricas do mundo, fatores que o levam a ser uma grande potência na produção agroindustrial.

Porém, devido à enorme produção agrícola, são geradas quantidades imensas de resíduos, como palhas, cascas, caules, folhas, entre outros. Diversos fins são dados a estes resíduos, uns mais simples como a disposição no solo, servindo como fonte de carbono e nutrientes para as futuras plantações, ou o uso como ração animal, e outros mais elaborados, como a queima para cogeração de energia, alimentando o processo de beneficiamento do produto gerado e comercializando o excedente.

Maneiras de aproveitar os subprodutos gerados são importantes para abater os gastos na disposição destes que acabam afetando o preço final do bem produzido. Poder gerar recursos com eles é ainda melhor, pois torna a agroindústria mais competitiva e rentável, atraindo mais investimentos para esta e reduzindo os preços de alimentos.

Para que um resíduo seja adequado à produção de etanol ele deve conter altas proporções de carboidratos (celulose e hemicelulose) e baixas de lignina. A Tabela 1 apresenta a composição de alguns dos principais resíduos industriais brasileiros.

Tabela 1 – Composição de resíduos agroindustriais produzidos em larga escala no Brasil

Resíduo	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Casca de arroz ¹³	36 – 47	19 – 25	10 – 24
Serragem de eucalipto ¹³	40 – 55	24 – 40	18 – 25
Serragem de pinus ¹³	45 – 50	25 – 35	25 – 35
Palha da cana-de-açúcar ¹⁴	39	30	25
Bagaço da cana-de-açúcar ^{15; 16}	40	24	18,4
Palha de milho ¹³	35 – 40	17 – 35	7 – 18

Além do teor de celulose que é convertida a açúcares, é interessante notar a porcentagem dos outros dois componentes, lignina e hemicelulose.

Grandes frações de lignina tendem a tornar o material recalcitrante à hidrólise da celulose, portanto quanto menor a quantidade presente, mais simples tende a ser o pré-tratamento do resíduo.¹⁷

Já a hemicelulose tem um ponto negativo, que é de também dificultar o acesso à celulose. Porém é outra fonte de açúcares fermentáveis, desde que o microrganismo fermentador seja capaz de metabolizar as hexoses manose e galactose, e ainda as pentoses xilose e arabinose.¹⁸

3.5 PRODUÇÃO BRASILEIRA DE ARROZ E EUCALIPTO

O setor agroindustrial é um grande gerador de resíduos sólidos e, em geral, estes são excelentes reservas de carboidratos para serem aplicados na geração de produtos de maior valor agregado, sendo bons exemplos: palhas, cascas, resíduos da produção de papel e celulose, pedúnculos, caules, entre outros.¹⁹

Resíduos da produção de arroz, como a casca e a palha, são um bom exemplo de material com potencial aplicação. Primeiro porque o arroz é a principal fonte de energia para mais da metade da população mundial, segundo a Organização das Nações Unidas para a alimentação e Agricultura (FAO), o que demonstra como sua produção é importante e abundante. E, em segundo lugar, estes resíduos possuem altas concentrações de celulose, entre 32 e 47%.^{19; 20}

Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento, o Brasil é o nono maior produtor mundial, tendo colhido 12,22 milhões de toneladas na safra de 2013/2014. Como a casca do arroz corresponde a uma fração considerável do produto final (em torno de 20%), grandes quantidades deste material são produzidas, acarretando algumas vezes em problemas quanto à sua disposição.

Outro resíduo muito gerado no Brasil é a serragem de madeira, em especial de espécies de Pinus e de Eucalipto que são utilizados em várias indústrias diferentes, como a de papel e celulose, moveleira, de placas e painéis, entre outras. Estima-se que no ano de 2012, florestas de eucalipto e pinus cobriam 6.664.812 ha do território nacional, com a maior parte sendo destinada ao setor de papel e celulose.²¹ Além de abundantes, os resíduos de madeira são muito ricos em carboidratos, podendo-se tomar como exemplo o eucalipto que possui em torno de 42% de celulose e 19% de hemiceluloses (*Eucalyptus grandis*).²²

As maneiras mais empregadas de se aproveitar estes resíduos são a disposição no solo, onde o material serve como fonte de nutrientes e proteção, e a queima em caldeiras, produzindo de energia elétrica e/ou vapor. Porém, mesmo estas aplicações tendo suas utilidades, outras opções de maior valor agregado devem ser investigadas, como a produção de etanol de segunda geração.

A casca e a palha do arroz são promissoras para a produção de etanol, porém como a casca é gerada e concentrada na usina de beneficiamento dos grãos, ela é muito mais viável de ser aplicada. Para utilizar-se a palha seria necessário coletá-la no campo e transportá-la até usina de etanol, acrescentando maiores custos ao processo.¹⁵

Assim como a casca do arroz, a serragem é massivamente gerada e concentrada nas indústrias que processam a madeira e, por isso, também é uma fonte duplamente interessante para aplicações tecnológicas.

3.6 FUNGOS E SUA IMPORTÂNCIA NA BIOTECNOLOGIA

O reino Fungi é composto por seres eucarióticos que podem se apresentar na forma de leveduras, formar pseudomicélio ou constituir hifas agrupadas ou justapostas, mas sem formação de um tecido verdadeiro.¹⁸

Os fungos têm uma posição de destaque na sociedade humana, sendo possivelmente os organismos mais úteis da biotecnologia. Estes microrganismos geram diversos compostos, dentre os quais se destacam: antibióticos, ácidos orgânicos (cítrico, glucônico, itacônico), enzimas (celulases, lipases, amilases), aromatizantes de queijos, entre outros.²³

Além da síntese de compostos de alto valor agregado, estes microrganismos são eficientes degradadores de diversos substratos, podendo ser utilizados na remediação de solos e águas contaminadas ou no tratamento de resíduos diversos. A Figura 2 exemplifica os diversos campos em que os fungos são aplicados.

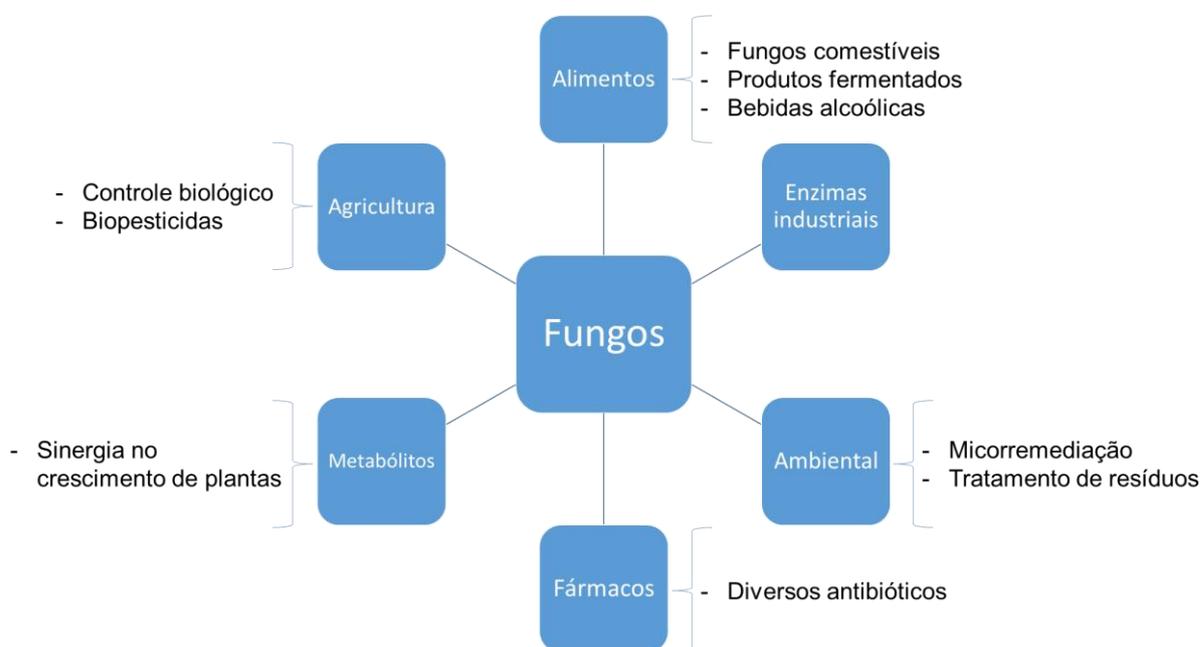


Figura 2 – Aplicação dos fungos na biotecnologia²³

Portanto, são diversas as áreas abrangidas e, à medida que avanços tecnológicos vêm sendo alcançados, a gama de aplicações dos fungos tende a aumentar ainda mais.

3.6.1 Fungos no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos

Mais uma importante aplicação de fungos, é o tratamento de materiais lignocelulósicos, tanto na indústria papelreira como na agroindústria, e em ambos os casos, o objetivo é a diminuição da quantidade de lignina nos materiais tratados.

Para a indústria papelreira, a lignina é indesejada, pois confere coloração escura ao papel, já a agroindústria utiliza diversos resíduos da produção de vegetais como ração para animais, porém a lignina dificulta a digestão destes materiais.

Mais recentemente, o efeito destes microrganismos sobre materiais lignocelulósicos tem sido investigado quanto ao seu poder de aumentar o acesso de enzimas sacarificantes, que transformam a holocelulose em açúcares simples, usados, por exemplo, na produção de etanol.³

A seleção de um bom fungo deslignificante, para a produção de etanol 2G, leva em consideração a habilidade deste em romper a estrutura rígida da lignina, a perda da estrutura da hemicelulose, que também dificulta a hidrólise da celulose, e a diminuição da cristalinidade da celulose, o que aumenta a eficiência das enzimas celulolíticas.²⁴

3.6.2 Fungos da podridão branca, parda e suave e seus potenciais enzimáticos

Os fungos responsáveis pelo processo de deslignificação são os que na natureza degradam a matéria vegetal, sendo por isso, imprescindíveis no ciclo do carbono. Sem as enzimas lignolíticas e celulolíticas destes microrganismos, a madeira levaria muito mais tempo para se decompor e retornar na forma de nutrientes para o solo.²⁵

Fungos que degradam madeira são classificados em três grupos: fungos da podridão branca, que são capazes de degradar todos os componentes da madeira; fungos da podridão parda, que degradam preferencialmente os polissacarídeos; fungos da podridão suave, que degradam a lignina e os polissacarídeos mas de maneira bem mais lenta do que os outros.¹⁸

Para a produção de bioetanol, os fungos da podridão branca tendem a ser os mais interessantes, por preservarem melhor a celulose, que é a fonte dos açúcares desejados. Contudo, o acesso à celulose não depende exclusivamente da remoção da lignina, pois bons rendimentos podem ser alcançados apenas com a perda da estrutura desta, o que pode ser alcançado com os três grupos citados.²⁴

Os fungos da podridão branca (FPB) são considerados um interessante grupo de microrganismos do ponto de vista biodegradativo devido ao seu sistema enzimático ligninolítico extracelular inespecífico, o qual inclui lacases (E.C. 1.10.3.2) e peroxidases como a lignina peroxidase (E.C. 1.11.1.14), manganês peroxidase (1.11.1.13) e peroxidase versátil (E.C. 1.11.1.16). Algumas espécies de FPB são capazes de sintetizar todas as enzimas ligninolíticas (ELs) enquanto outras apenas produzem uma ou duas.²⁶

A degradação da lignina envolve etapas oxidativas, redutoras, clivagens de complexos formados entre a lignina e a hemicelulose, entre outras. Tudo isto em um mecanismo, até hoje, não muito bem elucidado.²⁵

O modo e a intensidade com que a degradação da matriz lignocelulolítica ocorre variam bastante de fungo a fungo. Tomando por base os fungos da podridão branca, que são capazes de degradar os três componentes presentes, dois sistemas podem ocorrer, a degradação simultânea ou a seletiva para a lignina, que é mais rara e ocorre com a lignina sendo atacada primeiramente.²⁷ No primeiro caso, a lignina, a celulose e a hemicelulose são degradadas a taxas iguais, já no segundo há uma preferência na remoção da lignina, com perdas moderadas de hemicelulose.²⁸

A aplicação direta de enzimas lignolíticas no pré-tratamento de biomassas tem recebido atenção crescente como uma alternativa promissora a tratamentos físico-químicos e microbiológicos convencionais por ser bastante eficiente e ecologicamente mais correta. Além disso, o uso do extrato enzimático bruto em vez das enzimas purificadas pode reduzir os custos.

3.6.2.1 Lacase

Esta é uma enzima amplamente distribuída na natureza, sendo encontrada em fungos da podridão branca, em diversas espécies vegetais, em algumas espécies de insetos e na bactéria *Azospirillum lipoferum*. Há estudos que indicam sua participação em bioprocessos como: síntese da lignina; causa de patogenicidade de alguns fungos; sistema de defesa de insetos; escurecimento de frutas; biodegradação da lignina; etc. Sendo que em todos os casos sua atividade está relacionada à oxidação de compostos fenólicos.²⁹

A lacase pertence à família das *multi-copper oxidases*, as quais possuem seus sítios ativos compostos por átomos de cobre, no caso da lacase são quatro átomos.³⁰

Conforme tem sido mostrado na literatura científica, esta enzima atua predominantemente catalisando a subtração de um elétron de grupos hidroxifenólicos da lignina, gerando radicais fenóxi que sofrem polimerização via acoplamento radicalar acompanhado da despolimerização parcial de cadeias propílicas laterais da lignina³¹. A efetividade desta reação é bastante dependente da temperatura, do potencial redox e da composição do meio.

Como a composição da lignina não é puramente de compostos fenólicos, a lacase tem seu potencial de ataque limitado, o que pode ser incrementado com o uso de mediadores fenólicos.³⁰

Estes mediadores atuam como “pontes” entre o sítio ativo da lacase e as unidades não fenólicas da lignina. Primeiramente, tais compostos são oxidados a espécies altamente reativas e, em seguida, atuam aleatoriamente sobre a lignina. Dessa forma, o potencial oxidativo da lacase pode alcançar muito mais amplamente a lignina.²⁹

Alguns compostos já testados como mediadores são: ácido 2,2"-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS); 1-hidroxibenzotriazol (HBT); ácido violúrico; siringato de metila.^{29; 30; 32} Entretanto, a gama de compostos com o potencial de incrementar a atuação de lacases é enorme.

3.6.2.2 Enzimas celulolíticas e a degradação da celulose

Outro grupo bastante importante de enzimas é o das hidrolíticas, mais especificamente, as celulolíticas. Estas, também são produzidas por uma série de fungos decompositores de madeira, porém atuam sobre os carboidratos estruturais celulose.

Os mecanismos de atuação das enzimas celulolíticas na decomposição das longas cadeias de D-glicose unidas por ligações β -1,4-glicosídicas são mais conhecidos em comparação com os mecanismos de degradação da lignina.

Um conjunto de enzimas extracelulares promove a quebra da celulose gradualmente. As endo-1,4- β -glicanases iniciam a hidrólise através de regiões amorfas espalhadas aleatoriamente pelo polissacarídeo, formando diversos finais de cadeias menores e, formando sítios para o ataque das exo-1,4- β -glicanases. Esta última classe de enzimas atua das glicoses terminais da cadeia, até a formação do dímero celobiose como principal produto. Por fim, as 1,4- β -glicosidases hidrolisam a celobiose, formando duas moléculas de glicose.^{18 27}

A presença de somente uma ou duas destas três classes leva a baixíssimos rendimentos na hidrólise, devido ao forte sinergismo entre elas.¹⁸ Outro fator importante é que quanto maior a cristalinidade da celulose, mais lenta é a degradação, pois a ação das endo-1,4- β -glicanases é inibida e, a etapa inicial da hidrólise depende das exo-1,4- β -glicanases que terão poucos sítios ativos nas cadeias (apenas as extremidades).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Produzir extratos enzimáticos de fungos da podridão branca da madeira, aplica-los em resíduos agrícolas como forma de pré-tratamento e efetuar a sacarificação destes com coquetel comercial de celulases.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar os fungos *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* e *Trametes* sp quanto à produção de extratos enzimáticos ricos em lacase em cultivo submerso;
- Avaliar o efeito da adição de indutores na atividade de lacase, sendo estes: casca de arroz in natura, serragem de Eucalipto urofila (*Eucalyptus urophylla*) moída e sulfato de cobre (II);
- Aplicar os extratos enzimáticos produzidos nos resíduos lignocelulósicos casca de arroz e serragem de *Eucalyptus urophylla*, como forma de pré-tratamento para posterior sacarificação;
- Promover a hidrólise enzimática das frações celulósicas e hemicelulósicas da casca de arroz e do Eucalipto urofila com e sem pré-tratamento com o coquetel enzimático Cellic[®] Ctec2 (Novozymes).

5 METODOLOGIA

5.1 PREPARO DOS SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

Amostras de madeira de *Eucalyptus urophylla* foram cedidas pelo Centro Nacional de Pesquisas Florestais, EMBRAPA Florestas e amostras de casca de arroz foram coletadas em uma fazenda experimental na cidade de Botucatu, interior do estado de São Paulo.

Ambas as amostras secas ao ar foram submetidas à moagem, para a madeira foi utilizado um moinho de facas tipo Wiley e para a casca de arroz utilizou-se um liquidificador comercial. Os materiais obtidos foram fracionados com o uso de peneiras tipo Mesh e as porções entre 35 e 60 mesh foram utilizadas nos experimentos.

5.2 CULTIVO E ARMAZENAMENTO DAS CEPAS FÚNGICAS

Foram testados três diferentes fungos da podridão branca da madeira para a produção de extratos enzimáticos ricos em lacase. Cepas de *Pleurotus ostreatus* e *Trametes* sp. foram obtidas no banco de fungos do Laboratório de Biotecnologia da UTFPR e uma cepa de *Ganoderma lucidum* foi cedida pelo banco do Centro Nacional de Pesquisas Florestais da EMBRAPA Florestas.

Primeiramente, todos os fungos foram repicados e cultivados em placas de Petri com o meio Ágar Batata Dextrose (PDA). O crescimento dos fungos foi realizado em estufa a 28 °C e após toda a superfície do PDA ser coberta pelo micélio fúngico, as placas de Petri foram transferidas para um refrigerador. O tempo de crescimento variou para cada fungo, ficando em torno de 7 a 11 dias.

5.3 PREPARO DOS EXTRATOS RICOS EM LACASE

Primeiramente, foram testadas diversas condições de cultivo para os três fungos estudados, visando obter extratos com atividade de lacase.

Sempre que o extrato foi preparado, utilizaram-se cepas recém ativadas

5.3.1 Testando diferentes condições de cultivo

Cada condição para produção dos extratos enzimáticos foi feita em duplicata. Foi utilizado um meio nutritivo com adição de indutores de lacase (casca de arroz ou eucalipto moído), concomitantemente ou não com a adição de sulfato de cobre II. A adição de resíduos lignocelulósicos em cultivos submersos de fungos da podridão branca pode favorecer a produção de lacase.³³

O meio nutritivo foi composto por: glicose (10 g L^{-1}); fosfato de potássio monobásico (3 g L^{-1}); sulfato de magnésio heptahidratado ($1,5 \text{ g L}^{-1}$) e peptona ($0,5 \text{ g L}^{-1}$).^{34; 35} Após a completa solubilização dos constituintes, 48 mL do meio foram transferidos para erlenmeyers de 125 mL e quando a adição de casca de arroz ou eucalipto era investigada, adicionou-se um grama destes ao erlenmeyer antes da autoclavagem. Todas as autoclavagens foram conduzidas a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 14 minutos.

Soluções estoque de sulfato de cobre II a 25 mM foram preparadas e autoclavadas separadamente para evitar interações indesejadas com os nutrientes do meio de cultivo.

Nos erlenmeyers em que o sulfato de cobre seria testado como indutor de lacase foram adicionados 2 mL da solução estoque (levando a 1 mM no meio de cultivo) e naqueles sem este componente foram adicionados 2 mL de água autoclavada para que a concentração de nutrientes fosse mantida.

Para transferir os fungos do PDA para o meio líquido, foram utilizados tubos de ensaio com diâmetro de aproximadamente 14 mm para cortar o micélio fúngico. Com o auxílio de palitos de madeira, três discos foram transferidos para cada

erlenmeyer, sempre cuidando para que o micélio ficasse voltado para fora da solução.

Utilizou-se o cultivo submerso agitado e estático, ambos a 28 °C e com duração de sete dias. No cultivo estático os erlenmeyers foram postos em estufa e no agitado foi utilizado um Shaker Solab modelo SL 222 com rotação de 125 rpm.³⁵

Transcorridos sete dias, todos os cultivos foram retirados da estufa ou do shaker simultaneamente e a biomassa fúngica foi separada do extrato enzimático pela filtração em papel filtro qualitativo. Foi utilizada uma bomba de vácuo para acelerar o processo.

As diferentes condições de cultivo estão representadas na Figura 3.

Microrganismo	Forma de Cultivo	Adição de resíduo	Sulfato de cobre II
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pleurotus ostreatus</i> • <i>Trametes sp.</i> • <i>Ganoderma lucidum</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Estático • Agitado 	<ul style="list-style-type: none"> • Controle • Casca de arroz • Serragem (madeira) 	<ul style="list-style-type: none"> • Com adição • Sem adição

Figura 3 – Diferentes fungos e condições de cultivo empregadas

5.3.2 Ensaio de atividade de lacase nos extratos enzimáticos

De modo a avaliar a eficiência do complexo enzimático produzido pelos três fungos nas diferentes condições de cultivo, amostras dos extratos foram testados através dos seguintes ensaios:

- Atividade da lacase: determinada com espectrofotômetro no comprimento de onda fixo de 420 nm, através do monitoramento da oxidação do 2,2'-azino-bis(3-etiltiazolina-6-sulfonato).³⁴

- Atividade da manganês peroxidase (MnP) será avaliada pela oxidação do MnSO_4 1mM em solução tamponada em pH 4,5 com o tampão malonato de sódio 0,05 M e, na presença de H_2O_2 0,1 mM.³⁶
- Atividade da lignina peroxidase (LiP): monitoramento por medidas de absorbância a 310 nm, da oxidação do álcool veratrílico em tampão tartarato de sódio 0,1 M, a pH 3 e, na presença de H_2O_2 0,2 mM.³⁷

5.3.3 Produção de extrato enzimático para pré-tratamento da casca de arroz e eucalipto.

Após a determinação da condição de cultivo que leva à maior atividade de lacase, foi feito um aumento de escala para a produção do extrato enzimático.

O volume total de meio passou para 150 mL; conseqüentemente, o número de discos contendo micélio fúngico passou para nove e a quantidade de resíduo utilizado foi de três gramas.

Para a condição ótima foi utilizado o fungo *Pleurotus ostreatus* com adição sulfato de cobre (mesma concentração usada anteriormente) e adição de eucalipto moído.

Foram preparados nove erlenmeyers, totalizando 1,35 L de extrato enzimático. As nove porções foram misturadas, homogeneizadas e analisadas quanto à atividade de lacase (5.3.2).

5.4 BIODEGRADAÇÃO (PRÉ-TRATAMENTO) DA CASCA DE ARROZ E DA SERRAGEM

Os experimentos de pré-tratamento enzimático foram baseados em metodologias descritas na literatura.^{38; 39; 40}

Em cada ensaio foram utilizados dois gramas de casca de arroz ou eucalipto, 22 mL de extrato enzimático, 40 μL de Tween 80, 15 mL de tampão acetato de sódio a pH 4,5 contendo 1,4 mM de mediador para a lacase. A dosagem

de extrato enzimático levou a 50 unidades de atividade de lacase por grama de material.

Os mediadores testados foram: ácido vanílico (Sigma-Aldrich, 97%), ácido *trans*-ferúlico (Sigma-Aldrich, 99%), ácido gálico (Vetec, 99%), siringaldazina (Sigma-Aldrich, 99%), ácido 4-hidroxibenzóico (Sigma-Aldrich, 99%), ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzetiazolino-6-sulfônico) (Sigma-Aldrich, 98%).

Utilizou-se ainda, como mediador, um extrato hidroalcólico rico em compostos fenólicos, preparado um dia antes do ensaio com bagaço de uva bordô. Os compostos fenólicos foram extraídos em solução etanólica a 40% (v/v) durante 3 horas, com agitação de 150 rpm e 25 °C. Pelo método de Folin-Ciocalteu determinou-se a concentração de compostos fenólicos em equivalentes de ácido gálico no extrato e este foi adicionado na biodegradação de modo a conter 0,5 mM de ácido gálico no volume final da mistura.⁴¹

Todos os ensaios foram feitos em duplicata, um controle com os extratos intra e extracelulares fervidos (desnaturação enzimática) foi conduzido juntamente com as condições normais.

A biodegradação foi realizada a 28 °C, em shaker a 130 rpm e durante 48 h. Ao término, todas as misturas foram filtradas em membrana de fibra de vidro (Whatman, GF/C). Os sobrenadantes foram congelados a - 5 °C e os sólidos foram secos em estufa a 45 °C e armazenados a temperatura ambiente para futuras caracterizações.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DA BIODEGRADAÇÃO

Os sobrenadantes foram descongelados e analisados quanto à concentração de compostos fenólicos e de mono e dissacarídeos pelos métodos de Folin-Ciocalteu e do ácido 3,5-dinitrosalicílico, respectivamente.^{41; 42}

5.5.1 Quantificação de compostos fenólicos

Foi feita uma curva de calibração de ácido gálico (Vetec, 99%) numa faixa de concentração de zero a 938 mg L^{-1} . Para cada ponto da curva foi preparada uma solução com 5 mL de água destilada, 100 μL de solução de ácido gálico, 0,5 mL de reativo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) e 2 mL de solução saturada de carbonato de sódio (Vetec, 99,5%), em um balão volumétrico de 10 mL. Após agitar cada balão, as soluções foram avolumadas, homogeneizadas, mantidas ao abrigo da luz durante 2 horas e por fim, leram-se as absorbâncias de cada uma em espectrofotômetro (Bel Photonics, UV-M51) a 765 nm.

Com as amostras dos sobrenadantes foram utilizadas as mesmas quantidades de reativos, apenas substituindo os 100 μL de solução de ácido gálico por igual volume de amostra. Da mesma forma, as soluções ficaram no escuro por 2 horas e suas absorbâncias foram lidas a 765 nm.

5.5.2 Quantificação de mono e dissacarídeos

Primeiramente, preparou-se a seguinte mistura (aqui denominada de reativo DNS), conforme segue: em um béquer contendo 500 mL de água, sob agitação magnética e leve aquecimento, adicionou-se aos poucos 500 mL de NaOH 0,5 M, 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Vetec, 99%) e 300 g de tartarato de sódio e potássio tetra hidratado (Alphatec, 99%). Após a completa solubilização dos sólidos, a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 1 L e avolumada com água destilada.⁴²

Em seguida, soluções padrão de glicose com concentrações de 0 a 1 g L^{-1} foram preparadas e, em duplicata, um mL de cada concentração foi adicionado a 4 mL do reativo DNS num tubo de ensaio de 25 mL. As misturas foram agitadas em vórtex (Vixar) por 30 segundos, mantidas durante exatos 5 minutos em água fervente, transferidas para banho de gelo (em torno de um minuto), ambientadas em água e lidas em espectrofotômetro (Bel Photonics, UV-M51) a 540 nm.

Por fim, as amostras do sobrenadante foram submetidas à mesma metodologia que os padrões de glicose. Quando necessário, diluições foram realizadas nas amostras para ter-se sempre absorvâncias menores do que um.

5.5.3 Caracterização da biomassa tratada com lacase por infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada

Os sólidos obtidos após filtração foram secos a 40 °C por toda noite e analisados num FTIR Varian 640-IR equipado com aparato de leitura por reflectância total atenuada (ATR, Pike).

Uma ponta de espátula de amostra foi usada em cada leitura, as quais foram feitas com resolução de 4 cm^{-1} , em 256 scans e na faixa de número de onda de 650 a 4000 cm^{-1} .

A influência do tratamento da biomassa com a lacase dos extratos foi avaliada através da mudança na intensidade das bandas correspondentes à lignina (1427 e 1515 cm^{-1}) e à celulose (1395, 1908 e 898 cm^{-1}).^{43; 44}

5.6 SACARIFICAÇÃO DA BIOMASSA PRÉ-TRATADA

Para cada condição utilizada nos ensaios de pré-tratamento com extrato enzimático fúngico (inclusive os controles tratados com o extrato desnaturado), um grama de foi utilizado para os ensaios de sacarificação

Utilizando as condições estabelecidas na literatura^{24; 45; 46}, foram adicionados 24 mL de tampão citrato-fosfato pH 6,2 e 0,5 mL de coquetel enzimático Cellic[®] Ctec2 (Novozymes) previamente diluído na proporção de um para dez no mesmo tampão. Dessa forma, trabalhou-se com atividade de celulasas de 30 FPU por grama de celulose nos substratos, com base em dado da literatura para a composição dos substratos.¹³ Os ensaios foram mantidos em shaker a 45 °C, 130 rpm e durante 72 h.

A atividade do coquetel enzimático foi determinada através da degradação de uma tira de 1,0 x 6,0 cm (50 mg) de papel de filtro Whatman No. 1 durante 60 minutos e a 50 °C (unidades de papel filtro).⁴⁷

Ao término da sacarificação, as amostras foram filtradas em membrana de fibra de vidro (Whatman, GF/C) e os sobrenadantes foram submetidos à análise de mono e dissacarídeos, conforme o tópico 5.5.2.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 PRODUÇÃO DE LACASE, LIGNINA PEROXIDASE E MANGANÊS PEROXIDASE

Quanto aos ensaios para as enzimas manganês peroxidase e lignina peroxidase, não foram obtidos resultados positivos em nenhuma das condições testadas.

Inicialmente, este trabalho teve como objetivo a produção de lacases e, portanto, os parâmetros do meio foram constituídos de forma a potencializar a produção desta enzima. A verificação das enzimas MnP e LiP foi feita no sentido de caracterizar o extrato bruto produzido, pois, estas poderiam ter sido produzidas mesmo sem um meio específico.

Os resultados de produção de lacase estão apresentados na Tabela 2, englobando os dados referentes aos testes realizados com *Pleurotus ostreatus*, *Trametes* sp. e *Ganoderma lucidum*.

Tabela 2 – Atividades de lacase obtidas em 48 horas de cultivo a 28 °C para os fungos *Pleurotus ostreatus*, *Trametes sp.* e *Ganoderma lucidum*

Condição	Cu (II)	Resíduo	Atividade de lacase [U.L ⁻¹]		
			<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Trametes sp.</i>	<i>Ganoderma lucidum</i>
Cultivo Estático	(-)	(-)	101,80 ± 1,76	54,51 ± 12,86	5,56 ± 2,48
	(+)	(-)	125,46 ± 16,84	709,65 ± 64,79	39,90 ± 1,08
	(-)	Eucalipto	127,37 ± 15,78	158,34 ± 27,71	94,10 ± 9,22
	(+)	Eucalipto	7182,81 ± 383,03	2092,35 ± 114,59	217,95 ± 7,77
	(-)	Casca	169,05 ± 97,48	580,25 ± 87,20	104,28 ± 6,44
	(+)	Casca	3078,65 ± 554,43	2679,89 ± 369,58	190,92 ± 16,01
Cultivo Agitado (125 rpm)	(-)	(-)	15,00 ± 5,02	8,91 ± 1,97	0,07 ± 0,05
	(+)	(-)	568,32 ± 55,73	473,86 ± 54,79	12,18 ± 3,77
	(-)	Eucalipto	80,65 ± 37,04	9,57 ± 3,48	2,07 ± 0,02
	(+)	Eucalipto	1534,99 ± 465,64	646,16 ± 185,82	29,10 ± 10,69
	(-)	Casca	105,26 ± 40,93	13,51 ± 0,67	65,32 ± 14,85
	(+)	Casca	598,03 ± 122,50	1830,11 ± 824,13	121,43 ± 8,63

Onde: Cu (II) – sulfato de cobre II a 1 mM no meio de cultivo; Eucalipto – eucalipto urofila moído; Casca – casca de arroz in natura; (+) – presente no meio de cultivo; (-) – ausente no meio de cultivo. A atividade de lacase foi determinada conforme o método do ABTS, para todas as condições. Cada unidade de atividade corresponde à quantidade de enzima que oxida 1 µmol de ABTS por minuto.⁴⁸ Dados apresentados com desvio padrão (n = 2).

Com os resultados apresentados, é possível fazer uma série de considerações quanto ao cultivo destes fungos para a obtenção de lacase.

Primeiramente, observa-se que, com apenas uma exceção, todos os cultivos realizados no modo estático alcançaram atividades de lacase mais altas do que seus pares (mesmas condições) no modo agitado. A única condição para a qual isto não ocorreu foi para o *Pleurotus ostreatus* com adição de sulfato de cobre e sem adição de resíduo.

A baixa atividade de lacase para a exceção pode ser devido a alguma falha durante o preparo do cultivo, pois, conforme dados da literatura, é de se esperar que uma maior quantidade de lacase seja produzida no cultivo estático.³⁴

Outra consideração que pode ser feita é que a adição dos resíduos lignocelulósicos foi muito positiva, elevando substancialmente as atividades alcançadas em todas as condições. Tal resultado também condiz com diversos

dados encontrados na literatura e está relacionado com a as unidades fenólicas presentes na lignina do resíduo, as quais induzem a produção de lacase.^{49; 50}

Com os resultados, também foi possível identificar o *Pleurotus ostreatus* como o melhor produtor de lacase dentre os fungos e condições estudados, de modo que este foi selecionado para a produção de extrato enzimático para a continuação dos estudos.

O fungo *Trametes* sp., embora um pouco abaixo do supracitado, também obteve um resultado satisfatório quando cultivado no modo estático, com adição de sulfato de cobre (II) e de casca de arroz ou eucalipto. Já para o *Ganoderma lucidum* não foram alcançados altos níveis de atividade de lacase (máximo de 217 U L⁻¹).

Uma consideração importante é que os microrganismos são, geralmente, muito sensíveis às condições e composições dos meios de cultivo. Dessa forma, com os resultados obtidos pode-se dizer que os fungos *Pleurotus ostreatus* e *Trametes* sp. são produtores promissores de lacase, porém mesmo que o fungo *Ganoderma lucidum* não tenha se destacado neste quesito, em outras condições de cultivo é possível que grandes incrementos na produção sejam alcançados.

Há relatos na literatura científica quanto à atividade de lacase produzida por estes três fungos^{3; 26; 51}; porém, comparando-se condições de cultivo semelhantes às utilizadas neste trabalho⁵², pode-se dizer que os resultados obtidos foram satisfatórios, sobretudo por não terem sido efetuadas etapas de purificação dos extratos enzimáticos e sem terem sido realizados estudos cinéticos da produção enzimática, os quais não foram possíveis devido ao tempo limitado para a execução do trabalho.

A aplicação de extratos enzimáticos brutos apresenta atividades de lacase mais baixas do que quando se faz uso de processos de concentração e purificação, mas, por outro lado, acarreta numa economia de etapas e recursos.

6.2 ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO

Era esperado que após o período de ensaio com lacase a concentração de mediadores no meio seria substancialmente menor e os fenólicos liberados na clivagem da lignina poderiam ser detectados nas amostras. Porém, nos ensaios

utilizando o extrato enzimático desnaturado a concentração final de fenólicos foi maior do que em seus pares contendo atividade de lacase e, assim, não foi possível determinar se estava ocorrendo a degradação da lignina e liberação de fenólicos.

A Tabela 3 apresenta os resultados de fenólicos obtidos após os ensaios de biodegradação do eucalipto urofila e da casca de arroz.

Tabela 3 – Compostos fenólicos totais nos sobrenadantes detectados após a etapa de biodegradação do eucalipto urofila e da casca de arroz

Mediador	Eucalipto urofila		Casca de arroz	
	Lacase desnaturada*	Lacase in natura**	Lacase desnaturada*	Lacase in natura**
AG	259,82	75,31 ± 1,18	116,19	59,33 ± 4,14
AV	212,64	66,29 ± 3,60	148,15	43,94 ± 0,15
Si	208,71	56,96 ± 3,93	151,27	49,56 ± 1,21
AF	207,17	68,45 ± 4,47	99,86	51,96 ± 6,71
ABTS	196,36	70,18 ± 0,33	112,43	63,07 ± 8,64
AHB	195,46	107,58 ± 3,23	152,30	96,98 ± 0,27
UVA	182,94	64,84 ± 6,50	98,20	55,50 ± 0,42

Onde: * – o extrato enzimático passou por fervura para desnaturar a lacase presente (feito em apenas uma replicata); ** – o extrato enzimático não passou por processo de desnaturação (feito em duplicata); AV – ácido vanílico; AF – ácido ferúlico; AG – ácido gálico; Si – siringaldazina; AHB – ácido 4-hidroxibenzóico; ABTS – ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico); UVA – extrato hidroalcoólico de uva bordô. Dados para lacase in natura apresentados com desvio padrão (n = 2).

Os resultados de compostos fenólicos deveriam ser indicativos da degradação de lignina devido à liberação de tais compostos quando ocorre a clivagem dos grupos constituintes desta. No entanto a detecção destes compostos também pode estar relacionada à presença dos mediadores da lacase adicionados para a biodegradação.

Este resultado indica que quando não há atividade de lacase, os mediadores não são consumidos e são detectados pelo método do Folin-Ciocalteu e que, devido à presença da enzima em seu estado natural, os mediadores são oxidados pela enzima.

Portanto, com esta análise não foi possível descobrir se ocorreu a liberação de fragmentos da lignina ou se a lacase não estava propriamente clivando a lignina,

mas apenas alterando a forma como esta se polimeriza, conforme descrito na literatura.²⁷

Seria interessante caracterizar os compostos fenólicos detectados e, dessa forma, ter conhecimento se estes são provenientes da lignina ou são os mediadores. Uma técnica interessante para tal seria a cromatografia líquida de alta eficiência.

Um conhecimento adicional sobre o que ocorreu com os materiais após o tratamento com lacase pode ser observado nos espectros de infravermelho. A Figura 4 apresenta espectros obtidos com a casca de arroz.

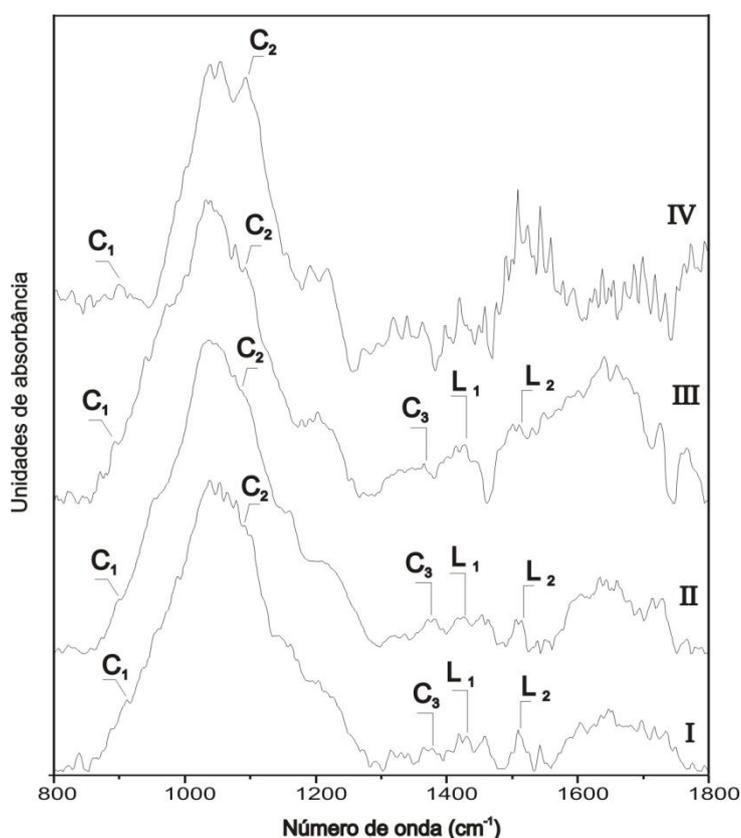


Figura 4 – Espectros de infravermelho para casca de arroz, onde: I – in natura; II – tratada com lacase desnaturada e mediador ácido ferúlico; III – tratada com lacase e mediador siringaldazina; IV – tratada com lacase e mediador ácido 4-hidroxibenzóico; C₁, C₂ e C₃ (900, 1098 e 1395 cm⁻¹) – bandas correspondentes a carboidratos; L₁ e L₂ (1427 e 1515 cm⁻¹) – bandas correspondentes à lignina.

Apesar de não terem sido observadas grandes alterações entre os espectros, é possível identificar que no espectro da casca de arroz tratada com

lacase e siringaldazina, há uma redução na intensidade do pico L_2 (vibrações do esqueleto aromático da lignina) e uma redução menor para o L_1 (unidades siringil e guaiacil condensadas).²²

Para a amostra onde foi utilizado o ácido 4-hidroxibenzóico não é possível analisar a região contendo os picos C_3 , L_1 e L_2 , pois tal este composto absorve nesta região e “mascara” os picos de interesse. Isto ocorre porque há adsorção do mediador no substrato durante o tratamento com lacase.

Outro pico importante é o C_2 (celulose cristalina) que é bem mais pronunciado nos espectros III e IV (tratamento com lacase e Si e AHB, respectivamente). Foram estas condições que levaram a maiores liberações de açúcares durante a sacarificação com celulasas. O mesmo ocorre para C_1 (celulose amorfa) e C_3 (celulose e hemiceluloses), porém em menor intensidade.

Nota-se que o espectro mais semelhante ao material in natura é o II, o qual corresponde ao controle utilizando extrato enzimático fervido, ou seja, sem atividade de lacase. Tal resultado condiz com o esperado e mostra que sem a lacase, o substrato não sofre alterações perceptíveis.

Na Figura 5 são apresentados alguns espectros para o eucalipto in natura e pós-tratamento com lacase.

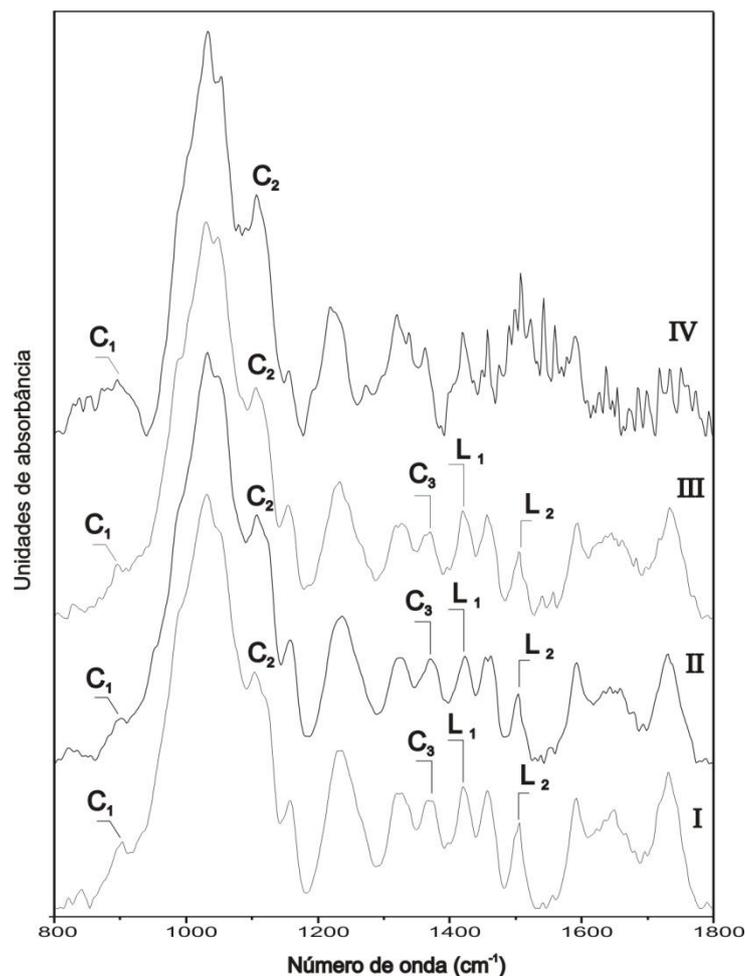


Figura 5 – Espectros de infravermelho para eucalipto urophylla, onde: I – in natura; II – tratado com lacase desnaturada e mediador ácido ferúlico; III – tratado com lacase e mediador siringaldazina; IV – tratado com lacase e mediador ácido 4-hidroxibenzóico; C₁, C₂ e C₃ (900, 1098 e 1395 cm⁻¹) – bandas correspondentes a carboidratos; L₁ e L₂ (1427 e 1515 cm⁻¹) – bandas correspondentes à lignina.

Assim como para a casca de arroz não ocorrem transformações generalizadas entre os espectros, porém o fato de serem notadas diferenças de intensidade nos picos de lignina e celulose é um indicativo de que a aplicação do extrato bruto é bastante promissora, tendo em vista que é muito mais prática e rápida do que se fazer o cultivo dos fungos da podridão diretamente sobre os substratos.

Identifica-se que no espectro do eucalipto tratado com lacase e siringaldazina, há uma pequena redução nas intensidades dos picos L₁ e L₂, o que não pode ser confirmado para o tratamento com lacase e ácido 4-hidroxibenzóico devido à absorção deste a partir de aproximadamente 1300 cm⁻¹.

É visível que os picos C_1 e C_2 são mais pronunciados após o tratamento com extrato enzimático, sobretudo quando se utilizou o ácido 4-hidroxibenzoico como mediador, o que indica que o processo está expondo as fibras de celulose, especialmente a cristalina.

Quanto às análises de açúcares liberados durante o tratamento com extrato enzimático, não foram observados resultados significativos. Em todas as amostras pequenas quantidades foram detectadas, o que se deve aos açúcares que se encontravam livres tanto na casca de arroz quanto no eucalipto e, também aos açúcares residuais presentes no extrato enzimático.

Portanto, não houve nenhuma hidrólise significativa da holocelulose durante o tratamento com extrato enzimático.

6.3 SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Como teste definitivo para se avaliar a eficiência do tratamento com o extrato enzimático foi realizada a sacarificação de todos os produtos desta etapa. De acordo com a liberação de açúcares, pode ter-se uma ideia do grau de exposição das fibras de celulose e hemicelulose dos substratos.

O aumento no acesso pode ser verificado pela diferença de açúcares liberados entre uma amostra tratada com o extrato enzimático in natura e outra que passou pelo mesmo processo, porém com o extrato fervido. A tabela 4 apresenta os resultados obtidos para a casca de arroz.

Tabela 4 – Açúcares liberados na sacarificação da casca de arroz

Glicose detectada [g/L]	Controle *	Aplicação de extrato enzimático bruto **	Após sacarificação com celulasas ***	Total
In natura	ND	ND	1,12	1,12
AV	1,37	0	0,68	2,05
AF	1,10	0	0,71	1,81
AG	0,82	0,49	0	1,31
Si	1,17	0	1,1	2,27
AHB	0,93	0,95	2,93	4,81
ABTS	1,13	0,06	0	1,19
UVA	1,00	0	0,02	1,02

Onde: * – sacarificação da casca de arroz tratada com extrato enzimático desnaturado; ** – açúcares detectados após a aplicação de extrato enzimático bruto; *** – sacarificação da casca de arroz tratada com extrato enzimático bruto; AV - ácido vanílico; AF - ácido ferúlico; AG – ácido gálico; Si – siringaldazina; AHB – ácido 4-hidroxi-benzóico; ABTS – ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico); UVA – extrato hidroalcoólico de uva bordô.

Ao analisar os dados da Tabela 4 percebe-se que os resultados obtidos para os controles não variaram muito. Isto indica que estes açúcares detectados correspondem mais ao substrato (por exemplo, açúcares livres) do que ao tratamento. Assim como a atividade de lacase é eliminada na desnaturação do extrato a atividade de celulasas (se presente) também é perdida.

Os açúcares detectados como produto da sacarificação da casca de arroz in natura também correspondem aos açúcares livres do substrato. Isto porque este material não passou por nenhuma etapa de lavagem antes da sacarificação e, como se observa, o valor obtido está dentro da faixa dos açúcares nos controles. Mesmo que tenha havido alguma hidrólise no material in natura esta ocorreu em pequenas proporções.

Mesmo que uma fração dos açúcares não seja advinda da hidrólise, esta também será importante para uma futura etapa de fermentação, ou outra aplicação do material sacarificado. Por isso a última coluna da Tabela 4 apresenta a soma dos açúcares detectados após a aplicação do extrato enzimático bruto com aqueles detectados na sacarificação com celulasas

Os resultados apresentados na coluna “Após tratamento com lacases” correspondem aos açúcares detectados logo após a etapa de biodegradação com

os extratos enzimáticos brutos. Observa-se que na maioria das condições não houve a formação de açúcares.

Porém, com o uso dos mediadores AHB e AG, foram detectadas maiores quantidades de açúcares. O que pode estar ocorrendo para estas condições é que os mediadores estejam atuando sobre a celulose e/ou hemicelulose, tendo-se em vista que são moléculas altamente energéticas e não específicas apenas para a lignina. Há trabalhos recentes que estão em consonância com tal hipótese^{32; 53}. O fato de que com o uso dos outros mediadores, não houve liberação de açúcares refuta a hipótese de que estaria ocorrendo hidrólise devido à atividade de celulasas no extrato enzimático.

Ao analisar os resultados referentes à etapa de sacarificação é notável que o uso do AHB como mediador promove a maior exposição das fibras de celulose (condizente com as análises por infravermelho). Fica verificado, portanto, que para a casca de arroz, o AHB foi o mediador mais eficiente para a etapa de tratamento com extrato enzimático.

O uso dos mediadores Si, AF e AV também se mostrou eficaz em promover alguma exposição das fibras de celulose, porém em menor grau do que para o AHB. Por fim, a soma de todo o açúcar liberado apresentou resultados interessantes, sobretudo para o caso do AHB como mediador, onde se detectou a concentração de 4,31 g L⁻¹ de equivalentes de glicose, o é comparável a dados da literatura e promissor para etapas de fermentação.⁵⁴

Quanto aos dados referentes ao eucalipto urofila, têm-se os dados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Açúcares liberados na sacarificação do eucalipto

Glicose detectada [g/L]	Controle *	Aplicação de extrato enzimático bruto **	Após sacarificação com celulases ***	Total
In natura	ND	ND	1,30	1,30
AV	0,97	0,29	0,85	2,11
AF	0,99	0,19	0,05	1,23
AG	1,16	0	0	1,16
Si	1,16	0,07	0	1,23
AHB	1,2	0	1,07	2,27
ABTS	1,14	0	0,4	1,54
UVA	1,05	0,15	0	1,20

Onde: * – sacarificação da casca de arroz tratada com extrato enzimático desnaturado; ** – açúcares detectados após a aplicação de extrato enzimático bruto; *** – sacarificação da casca de arroz tratada com extrato enzimático bruto; AV - ácido vanílico; AF - ácido ferúlico; AG – ácido gálico; Si – siringaldazina; AHB – ácido 4-hidroxibenzóico; ABTS – ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico); UVA – extrato hidroalcoólico de uva bordô.

De modo semelhante aos resultados para a casca de arroz, observa-se na Tabela 5 que uma quantidade considerável de açúcares foi detectada após a sacarificação do eucalipto urofila in natura, o que também deve ser devido aos açúcares solúveis presentes no material.

Os açúcares detectados nos controles com cada mediador também parecem corresponder mais ao substrato (açúcares livres) do que ao tratamento, tendo-se em vista que os resultados variaram pouco para os diferentes mediadores.

Quanto ao uso do extrato enzimático sem desnaturação, os mediadores que levaram a maiores concentrações de açúcar (AV, AF e UVA) foram diferentes daqueles para a casca de arroz (AHB e AG). Pode estar ocorrendo o mesmo fenômeno (ataque dos mediadores à holocelulose), porém com diferentes afinidades entre tais compostos e a fração celulósica do eucalipto.

Nos resultados para a etapa de sacarificação, novamente o AHB foi o mediador mais eficiente em expor as fibras de celulose, porém, com as exceções do eucalipto tratado com lacase e AV ou ABTS, os resultados para a sacarificação deste substrato levou a menores formações de açúcar. Portanto, teve-se um indicativo de que a madeira do eucalipto urofila é um material mais recalcitrante ao ataque das lacases e/ou celulases.

7 CONCLUSÕES

Com este trabalho foi possível chegar às seguintes conclusões:

- Constatou-se o potencial dos fungos *Pleurotus ostreatus* e *Trametes* sp. na produção de lacase. O *Ganoderma lucidum* requer outro meio e/ou condições de cultivo;
- O ácido 4-hidroxibenzóico foi o mais promissor mediador para lacase de *Pleurotus ostreatus*;
- O tratamento com extrato enzimático bruto foi capaz de promover modificações nos substratos;
- A celulose tornou-se mais exposta e sua hidrólise liberou mais açúcares do que nos materiais in natura;
- A liberação de açúcares foi mais pronunciada na casca de arroz.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Caracterizar os compostos fenólicos detectados após o tratamento com o extrato rico em lacase, de modo a identificar a origem de tais compostos, se seriam apenas os mediadores utilizados no processo ou se correspondem a grupos clivados da lignina.

Realizar análises de microscopia eletrônica de varredura nos substratos obtidos após as etapas de tratamento com lacase e de sacarificação com celulasas.

Realizar leituras de FTIR com os substratos após a sacarificação com celulasas e, realizar novamente as leituras realizadas nos outros substratos, mas sem a utilização do aparato ATR e sim, pela confecção de pastilhas de KBr com as amostras.

REFERÊNCIAS

- 1 NUNES, R. D. M. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.
- 2 OLIVA, J. et al. Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105, n. 1-3, p. 141-153, 2003.
- 3 WAN, C.; LI, Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1447-1457, 2012.
- 4 BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2002.
- 5 CARA, C. et al. Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. **Fuel**, v. 87, n. 6, p. 692-700, 2008.
- 6 SÁNCHEZ, Ó. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.
- 7 ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.
- 8 MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.
- 9 YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, n. 1, p. 26-40, 2008.
- 10 CHENG, J. J.; TIMILSINA, G. R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. **Renewable Energy**, v. 36, n. 12, p. 3541-3549, 2011.
- 11 KENNEDY, J. F.; XU, L. Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites, Roger M. Rowell (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL (2005). **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 4, p. 564-565, 2006.

- 12 ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- 13 SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.
- 14 SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, p. 1004-1010, 2012.
- 15 BINOD, P. et al. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4767-4774, 2010.
- 16 GEORGIEVA, T. I.; MIKKELSEN, M. J.; AHRING, B. K. Ethanol production from wet-exploded wheat straw hydrolysate by thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacter* BG1L1 in a continuous immobilized reactor. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 145, n. 1-3, p. 99-110, 2008.
- 17 ZENG, Y. et al. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, n. 0, p. 38-45, 2014.
- 18 ESPOSITO, E. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul, RS: EDUCS, 2010.
- 19 LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 1-24, 1997.
- 20 KARIMI, K.; EMTIAZI, G.; TAHERZADEH, M. J. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 1, p. 138-144, 2006.
- 21 SILVA, D. A. L. et al. Life cycle assessment of offset paper production in Brazil: hotspots and cleaner production alternatives. **Journal of Cleaner Production**, v. 93, n. 0, p. 222-233, 2015.
- 22 CASTOLDI, R. et al. Biological pretreatment of *Eucalyptus grandis* sawdust with white-rot fungi: Study of degradation patterns and saccharification kinetics. **Chemical Engineering Journal**, v. 258, n. 0, p. 240-246, 2014.

23 WAINWRIGHT, M. **Introducción a la biotecnología de los hongos**. Zaragoza: Acribia, 1992.

24 WANG, W. et al. Investigating lignin and hemicellulose in white rot fungus-pretreated wood that affect enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 134, n. 0, p. 381-385, 2013.

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

26 ELISASHVILI, V. et al. Lentinus edodes and Pleurotus species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 3, p. 457-462, 2008.

27 MACIEL, G. M. Fundamentals, Diversity and Application of White-Rot Fungi. In: VÁZQUEZ, M. S. A. S., A. P (Ed.). **Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease**. New York: Nova Science Publishers, v.1^o ed, 2012. p.1-52.

28 BLANCHETTE, R. A. DELIGNIFICATION BY WOOD-DECAY FUNGI. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p. 381-398, 1991.

29 LI, K.; XU, F.; ERIKSSON, K.-E. L. Comparison of Fungal Laccases and Redox Mediators in Oxidation of a Nonphenolic Lignin Model Compound. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2654-2660, 1999.

30 ELEGIR, G. et al. Laccase mediator system: Oxidation of recalcitrant lignin model structures present in residual kraft lignin. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 3, p. 340-346, 2005.

31 KAWAI, S.; UMEZAWA, T.; HIGUCHI, T. Degradation mechanisms of phenolic β -1 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 262, n. 1, p. 99-110, 1988.

32 RICO, A. et al. Pretreatment with laccase and a phenolic mediator degrades lignin and enhances saccharification of Eucalyptus feedstock. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 6, 2014.

33 MOLDES, D.; LORENZO, M.; SANROMÁN, M. A. Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 4, p. 327-330, 2004.

34 HOU, H. et al. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1415-1419, 2004.

35 GALHAUP, C. et al. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 529-536, 2002.

36 WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. **J Biol Chem**, v. 267, n. 33, p. 23688-95, 1992.

37 KIRK, T. K.; TIEN, M.; FAISON, B. D. Biochemistry of the oxidation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology Advances**, v. 2, n. 2, p. 183-199, 1984.

38 MOILANEN, U. et al. The laccase-catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 6–7, p. 492-498, 2011.

39 CHEN, Q. et al. Effects of laccase on lignin depolymerization and enzymatic hydrolysis of ensiled corn stover. **Bioresource Technology**, v. 117, n. 0, p. 186-192, 2012.

40 GUTIÉRREZ, A. et al. Demonstration of laccase-based removal of lignin from wood and non-wood plant feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 119, n. 0, p. 114-122, 2012.

41 SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

42 SAQIB, A. A. N.; WHITNEY, P. J. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 11, p. 4748-4750, 2011.

43 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, n. 3, p. 151-160, 2003.

44 ZHANG, X. et al. Evaluation of biological pretreatment with white rot fungi for the enzymatic hydrolysis of bamboo culms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 60, n. 3, p. 159-164, 2007.

45 DIAS, A. A. et al. Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. **Bioresour Technol**, v. 101, n. 15, p. 6045-50, 2010.

46 JEYA, M. et al. Enhanced saccharification of alkali-treated rice straw by cellulase from *Trametes hirsuta* and statistical optimization of hydrolysis conditions by RSM. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5155-5161, 2009.

47 GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257, 1987.

48 REVANKAR, M. S.; LELE, S. S. Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 581-588, 2006.

49 BURLA, G. et al. Effects of different growth conditions on enzyme production by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. **Bioresource Technology**, v. 42, n. 2, p. 89-94, 1992.

50 ARORA, D. S.; GILL, P. K. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 1, p. 89-91, 2001.

51 SONGULASHVILI, G. et al. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 1–2, p. 57-61, 2007.

52 DONG, X. Q. et al. Sugarcane bagasse degradation and characterization of three white-rot fungi. **Bioresour Technol**, v. 131, p. 443-51, 2013.

53 MOILANEN, U. et al. Mechanisms of laccase-mediator treatments improving the enzymatic hydrolysis of pre-treated spruce. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 177, 2014.

54 SHI, J. et al. Effect of microbial pretreatment on enzymatic hydrolysis and fermentation of cotton stalks for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 1, p. 88-96, 2009.