



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
Câmpus Apucarana e Londrina



IGOR SHOITI SHIRAISHI

**BIODEGRADAÇÃO DA LIGNINA KRAFT: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
LACASE PELO ISOLADO JUMAD053 E ANÁLISE DOS PRODUTOS POR CLAE**

DISSERTAÇÃO

LONDRINA

2019

IGOR SHOITI SHIRAISHI

**BIODEGRADAÇÃO DA LIGNINA KRAFT: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
LACASE PELO ISOLADO JUMAD053 E ANÁLISE DOS PRODUTOS POR CLAE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Apucarana e Londrina, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Ambiental. Área de Concentração: Saneamento Ambiental

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

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Julliana Izabelle Simionato

LONDRINA

2019

TERMO DE LICENCIAMENTO

Esta Dissertação está licenciada sob uma Licença Creative Commons *atribuição uso não-comercial/compartilhamento sob a mesma licença 4.0 Brasil*. Para ver uma cópia desta licença, visite o endereço <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> ou envie uma carta para Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, Califórnia 94105, USA.



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

S558b Shiraishi, Igor Shoiti

Biodegradação da lignina kraft: otimização da produção de lacase pelo isolado JUMAD053 e análise dos produtos por CLAE – Câmpus Londrina / Igor Shoiti Shiraishi. – Londrina: [s.n.], 2019.

82 f. : il.; 30 cm.

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

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Julliana Isabelle Simionato

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Londrina, 2019.

Bibliografia: f. 67-77

1. Lacase. 2. Lignina - Biodegradação. I. Daniel, Juliana Feijó de Souza, orient. II. Simionato, Juliana Isabelle, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. V. Título.

CDD: 628



TERMO DE APROVAÇÃO

**BIODEGRADAÇÃO DA LIGNINA KRAFT: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
LACASE PELO ISOLADO JUMAD053 E ANÁLISE DOS PRODUTOS POR CLAE**

por

IGOR SHOITI SHIRAISHI

Dissertação de Mestrado apresentada no dia 25 de outubro de 2019, às 14 horas, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Câmpus Apucarana e Londrina, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O mestrando foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos membros abaixo assinados. Após avaliação da Dissertação, a Banca Examinadora considerou a Dissertação aprovada. O presente termo assinado ficará depositado na Coordenação do Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental – PPGEA.

Prof^a. Dr^a. Juliana Feijó de Souza Daniel
(UTFPR – Câmpus Londrina)

Prof. Dr. Armando Mateus Pomini
(Universidade Estadual de Maringá)

Prof. Dr. Alessandro Francisco Martins
(UTFPR – Câmpus Apucarana)

Prof. Dr. Alesandro Bail
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

*Dedico este trabalho à minha família:
À minha mãe, Luci,
Ao meu pai, Paulo e
À minha irmã, Aline.
Por todo o amor e cuidado ao longo
de minha caminhada.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que abençoou cada momento deste trabalho e nos mostra que todo esforço é válido.

À Prof.^a Dr.^a Juliana Feijó de Souza Daniel pela orientação e acompanhamento desde a iniciação científica até a conclusão deste mestrado. Tem sido uma longa jornada e eu agradeço por cada aprendizado.

À Prof.^a Dr.^a Julliana Izabelle Simionato pela coorientação e direcionamento no preparo das amostras e elaboração da dissertação.

À Prof.^a Dr.^a Aneli de Melo Barbosa Dekker pela grande ajuda no planejamento dos experimentos e na elaboração da dissertação.

Ao Prof. Dr. Robert Frans Huibert Dekker por trazer o projeto de valorização da lignina em nosso grupo de pesquisa e compartilhar seu extenso conhecimento do tema.

Ao Prof. Dr. Dionísio Borsato pelo auxílio com as análises estatísticas.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Alessandro Francisco Martins e Prof. Dr. Armando Mateus Pomini, agradeço pela prontidão em aceitar meu convite.

À Beatriz Ribeiro Redondo por ser parte fundamental na realização dos experimentos, pelo zelo e dedicação e por ser uma grande parceira de laboratório.

Ao técnico de laboratório Carlos Gianjacomo pela indispensável colaboração com as análises por CLAE.

À Prof.^a Dr.^a Lyssa Sakanaka, ao Prof. Dr. Orlando de Carvalho Junior e aos técnicos Eng. Juliano Daniels e Talita Kato pela colaboração na incubação dos experimentos e análises enzimáticas.

À Paula Consoli pela realização de experimentos prévios que auxiliaram grandemente minha pesquisa.

À Eng.^a Bruna Sacramento pelo auxílio com a parte escrita e elaboração do mapa das coletas.

À Eng.^a Caroline Wikuats pela revisão da dissertação.

Aos colegas (e ex-colegas) do Laboratório de Química de Microrganismos e Bioatividade – QuiMiBio pelo companheirismo e ajuda na execução dos experimentos: Renato Dorte, Gabriela Pardino, Karoline Morais e Antônio Vital.

*Um brinde ao inesperado.
E às diversas formas de seguir em frente!
(Fernanda Mello)*

RESUMO

A lignina é um polímero aromático muito abundante na biosfera, onde representa cerca de 30% de todo o carbono orgânico, além de ser a principal fonte de compostos aromáticos em plantas vasculares. A valorização desse polímero tem despertado o interesse na produção sustentável de insumos, pois os produtos de sua degradação, possuem importantes aplicações industriais. O objetivo deste trabalho foi otimizar as condições de cultivo para produção de lacase na presença de lignina Kraft pelo isolado fúngico JUMAD053 e avaliar os produtos da sua biodegradação. Quarenta e sete isolados fúngicos foram avaliados quanto à produção de lacase constitutiva em meio líquido. O microrganismo que apresentou maior atividade de lacase nas condições pré-estabelecidas teve sua produção enzimática otimizada por um delineamento experimental 3^3 em 15 ensaios experimentais. Variou-se as concentrações de extrato de levedura (0,5 até 3,0%) e lignina Kraft (0 até 0,5%) e o tempo de cultivo variou de 4 até 10 dias. A atividade de lacase foi determinada utilizando-se os substratos ABTS e DMP. Posteriormente o isolado selecionado foi cultivado conforme as condições otimizadas nos respectivos planejamentos fatoriais e os cultivos foram extraídos com solventes orgânicos e submetidos à CLAE. O isolado JUMAD053 foi selecionado por apresentar maior atividade de lacase constitutiva (5,37 U/mL). O planejamento fatorial demonstrou máxima atividade de lacase de 9,8 U/mL utilizando-se o substrato ABTS nas condições: 1,125% de extrato de levedura, 0,5% de lignina Kraft e 10 dias de cultivo. A máxima atividade de lacase utilizando-se o substrato DMP foi de 8,4 U/mL, seguindo as condições: 1,125% de extrato de levedura, 0,25% de lignina Kraft e 7 dias de cultivo. A incubação do microrganismo nas condições otimizadas para ABTS levou a produção de dois possíveis produtos da biodegradação da lignina Kraft, dentre eles, o ácido benzoico. Com relação aos cromatogramas resultantes das condições otimizadas para DMP, foi observada a produção de outros dois compostos, sendo essas substâncias possíveis produtos da biodegradação da lignina Kraft. Os perfis de metabólitos obtidos a partir da biodegradação da lignina Kraft validam os objetivos deste trabalho e baseiam futuros experimentos para a valorização da lignina.

Palavras-chave: Biorrefinaria. Atividade enzimática. Planejamento fatorial. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

ABSTRACT

Lignin is a very abundant aromatic polymer in the biosphere where it represents about 30% of all organic carbon and is the main source of aromatic compounds in vascular plants. The valorization of this polymer has aroused the interest in the sustainable production of derivatives, since its degradation products have important industrial applications. The objective of this work was to optimize the culture conditions for laccase production in the presence of Kraft lignin by the fungal isolate JUMAD053 and to evaluate the products of lignin biodegradation. Forty-seven fungal isolates were evaluated for constitutive laccase production in liquid medium. The microorganism that presented higher laccase activity under the pre-established conditions had its enzymatic production optimized by a factorial design 3^3 in 15 experimental assays. It was varied the concentrations of yeast extract (0.5 to 3.0%) and Kraft lignin (0 to 0.5%) as well as cultivation period, from 4 to 10 days. Laccase activity was determined using the substrates ABTS and DMP. Subsequently, the selected isolate was cultivated according to the optimized conditions pointed by the respective factorial designs and the cultures were extracted with organic solvents and submitted to HPLC. Isolate JUMAD053 was selected because it presented the highest constitutive laccase activity (5.37 U/mL). Factorial design demonstrated a maximum laccase activity of 9.8 U/mL using the substrate ABTS under the conditions: 1.125% yeast extract, 0.5% Kraft lignin and 10 days of cultivation. The maximum laccase activity using the substrate DMP was 8.4 U/mL, following the conditions: 1.125% yeast extract, 0.25% Kraft lignin and 7 days of cultivation. The incubation of the microorganism under conditions optimized for ABTS led to the production of two possible products of Kraft lignin biodegradation, such as benzoic acid. Regarding the chromatograms resulting from the optimized conditions for assays with DMP, it was observed the production of another two compounds, possible products of Kraft lignin biodegradation. The profiles of metabolites obtained from the biodegradation of Kraft lignin validate the objectives of this work and base future experiments for lignin valorization.

Keywords: Biorefinery. Enzymatic activity. Factorial design. High Performance Liquid Chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas do álcool p-cumarílico (I); álcool coniferílico (II) e álcool sinapílico (III), precursores da lignina.....	20
Figura 2 – Ligações mais comuns entre as unidades de fenilpropano e suas respectivas abundâncias.....	21
Figura 3 – Segmento de um polímero de lignina.....	22
Figura 4- Produtos da oxidação de uma molécula dímera de lignina (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	29
Figura 5 – Produtos da biodegradação da subestrutura modelo da lignina (I): moléculas II a VII.....	35
Figura 6 – Produtos da biodegradação da subestrutura modelo da lignina (I): moléculas II a IV.....	35
Figura 7 – Produtos da biodegradação da subestrutura éter veratril glicerol-β-guaiacil (forma α-carbonila) (I): guaiacol (II) e ácido verátrico (III).	36
Figura 8 - Cromatograma da lignina extraída da parede celular de aspargos.....	37
Figura 9 – Fluxograma dos processos realizados no estudo	42
Figura 10 – Isolado fúngico JUMAD053 a) crescendo sobre madeira e b) em meio BDA.....	52
Figura 11 – Gráfico de Pareto para avaliação de importância dos parâmetros a partir das condições de otimização para a atividade de lacase medida com ABTS.....	54
Figura 12 – Curvas de resposta à produção de lacase (Y) medida por ABTS, considerando-se os fatores extrato de levedura (X_1), lignina Kraft (X_2) e tempo de incubação (X_3).....	55
Figura 13 – Superfície de resposta da produção de lacase utilizando-se o substrato ABTS: fixando-se a) X_1 em 1,125%, b) X_2 em 0,5% e c) X_3 em 10 dias à direita.....	56
Figura 14 – Gráfico de Pareto para avaliação de importância dos parâmetros a partir das condições de otimização para a atividade de lacase medida com DMP	58

Figura 15 - Curvas de resposta à produção de lacase (Y) medida por DMP, considerando-se os fatores extrato de levedura (X_1), lignina Kraft (X_2) e tempo de incubação (X_3).....	59
Figura 16 – Superfície de resposta da produção de lacase utilizando-se o substrato DMP: fixando-se a) X_1 em 1,125%, b) X_2 em 0,25% e c) X_3 em 7 dias.	60
Figura 17 – Cromatograma dos padrões analíticos utilizados no estudo ($\lambda = 272$ nm) e respectivos tempos de retenção: álcool vanílico (4,777 min), ácido siríngico (6,793 min), ácido p-cumárico (10,693 min), ácido ferúlico A (12,583 min), ácido 2,6-dimetoxibenzoico (13,267 min), ácido ferúlico B (14,453 min), ácido benzoico (20,770 min) e veratraldeído (22,390 min)	62
Figura 18 - Cromatograma da Lignina Kraft sem tratamento ($\lambda = 220$ nm)	63
Figura 19 – Cromatogramas dos extratos dos sobrenadantes sob condições otimizadas para o substrato ABTS: A) Lignina Kraft sem fungo (controle) e B) Lignina Kraft tratada pelo isolado JUMAD053	67
Figura 20 - Cromatogramas dos extratos dos sobrenadantes sob condições otimizadas para o substrato DMP: A) Lignina Kraft sem fungo (controle) e B) Lignina Kraft tratada pelo isolado JUMAD053	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Exemplos na literatura de degradação da lignina por fungos da podridão branca	26
Quadro 2 -Alguns produtos da lignina, estruturas moleculares e aplicações	32
Quadro 3 -Metodologias de extração de compostos que são precursores da lignina a partir de diferentes substratos.	38
Quadro 4 - Metodologias de análise da lignina e seus produtos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	40
Quadro 5 - Principais termos que compõem um planejamento fatorial e respectivas definições	41
Quadro 6 – Descrição do local de coleta dos quarenta e sete isolados fúngicos utilizados neste estudo	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Delineamento Box-Behken para três variáveis em três níveis para otimizar a produção de lacase pelo JUMAD053	44
Tabela 2 - Sistema de incubação utilizado para determinar a atividade da lacase por ABTS	45
Tabela 3 - Sistema de incubação utilizado para determinar a atividade da lacase por DMP	46
Tabela 4 - Atividades de lacase (U/mL) medidas a partir dos substratos ABTS e DMP para os principais isolados fúngicos	50
Tabela 5 – Planejamento fatorial composto central para otimizar a produção de lacase quantificada utilizando-se o substrato ABTS.....	53
Tabela 6 - Planejamento fatorial composto central para otimizar a produção de lacase quantificada utilizando-se o substrato DMP	57
Tabela 7 - Curvas de calibração obtidas para os padrões analíticos	61
Tabela 8 - Análise dos comprimentos de onda (λ), tempo de retenção e áreas dos produtos da lignina Kraft tratada pelo isolado JUMAD053, condições otimizadas para ABTS	64
Tabela 9 - Análise dos comprimentos de onda (λ), tempo de retenção e áreas dos produtos da lignina Kraft tratada pelo isolado JUMAD053, condições otimizadas para DMP	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVOS GERAIS	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1 COMPONENTES DA MADEIRA	19
3.1.1 Lignina: abundância e características gerais	19
3.2 A PRODUÇÃO DA LIGNINA PELO PROCESSO KRAFT	22
3.3 FUNGOS LIGNINOLÍTICOS: CARACTERÍSTICAS GERAIS E BIODEGRADAÇÃO	24
3.3.1 Fungos da podridão marrom e branca	25
3.4 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS	27
3.4.1 Lignina peroxidase (LiP)	28
3.4.2 Manganês peroxidase (MnP)	29
3.4.3 Lacase (Lac)	30
3.5 PRODUTOS DA BIODEGRADAÇÃO DA LIGNINA	32
3.6 A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) NA IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO DA LIGNINA	36
3.7 PLANEJAMENTO FATORIAL: FUNDAMENTOS E CONCEITOS BÁSICOS	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 MATERIAIS E REAGENTES	42
4.2 ISOLADOS FÚNGICOS	42
4.3 SELEÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS PRODUTORES DE LACASE CONSTITUTIVA	43
4.4 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE NA PRESENÇA DE LIGNINA – PLANEJAMENTO FATORIAL	43

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LACASE	45
4.6 ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO	46
4.7 IDENTIFICAÇÃO POR CLAE DE ALGUNS COMPOSTOS AROMÁTICOS EXTRAÍDOS APÓS CULTIVO NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 SELEÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS PRODUTORES DE LACASE CONSTITUTIVA.....	48
5.1.1 Características dos Isolado JUMAD053	51
5.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE NA PRESENÇA DE LIGNINA – PLANEJAMENTO FATORIAL.....	53
5.3 IDENTIFICAÇÃO POR CLAE DE ALGUNS COMPOSTOS AROMÁTICOS EXTRAÍDOS APÓS CULTIVO NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS	61
6 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICES.....	82

1 INTRODUÇÃO

A dependência mundial dos recursos fósseis não renováveis aumentou de forma expressiva no último século, despertando uma preocupação com o meio ambiente e o interesse pela economia sustentável. Assim, o uso de matérias-primas e tecnologias baseadas em carbono, mas livres de materiais fósseis recebe especial atenção na pesquisa e a aplicação industrial. É o caso do processo da biorrefinaria em que se realiza a conversão enzimática de materiais lignocelulósicos – constituídos de lignina e celulose - em combustíveis e produtos com valor agregado (BRENELLI et al., 2018; LONGE et al., 2018).

A lignina é um polímero aromático polissubstituído muito abundante na biosfera, onde representa cerca de 30% de todo o carbono orgânico, além de ser o composto aromático mais abundante em plantas vasculares (SJOSTROM, 1981; LU et al., 2017). A lignina desempenha uma importante função nas plantas ao proporcionar maior resistência e rigidez à parede celular (CONESA et al., 2002), além de grande coesão entre as fibras dos tecidos vegetais (LISBOA et al., 2005).

Por ser uma importante fonte natural de carbono e de compostos aromáticos, a lignina tem protagonizado pesquisas de produção renovável e sustentável, pois seus produtos de biodegradação possuem importantes aplicações industriais. O ácido benzoico, exemplo de derivado da lignina, é uma substância comumente usada na indústria alimentícia e para a obtenção de intermediários químicos (QIN et al., 2018) além de ter potencial uso como agente antimicrobiano (WEI et al., 2018) e tuberculostático (RANDO et al., 2002).

Apesar de seu grande potencial, das 70 milhões de toneladas de lignina produzidas anualmente, como subproduto do processo de produção de papel, apenas 2% é beneficiada e comercializada como agente dispersante ou ligante (LU et al., 2017). Sua maior parte é descartada ou queimada para produção de energia de baixo custo nas indústrias de papel e celulose, o que não se alinha ao desenvolvimento sustentável, contribui à geração de gases de efeito estufa e à perda de compostos químicos valiosos presentes na madeira (RAGAUSKAS et al., 2014; TEN, VERMERRIS, 2015; LU et al., 2017).

Portanto, vê-se uma grande oportunidade na pesquisa pela conversão biológica da lignina – a biorrefinaria – como tecnologia sustentável, de baixo custo e

economicamente viável para garantir uma finalidade mais nobre à lignina e diminuir a dependência dos recursos fósseis.

Dentre os microrganismos capazes de promover a biodegradação da lignina, destacam-se os fungos da podridão branca. Estes utilizam enzimas, como as lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases, secretadas pelas hifas, atuando na oxidação dos componentes da madeira (LEONOWICZ et al., 1999). A enzima lacase, por exemplo, oxida compostos derivados de lignina, como hidroquinonas e semiquinonas, produzindo oxigênio (TIEN; KIRK, 1984).

Os fungos da podridão branca recebem maior atenção nos estudos de degradação da lignina, pois apresentam um sistema enzimático muito eficiente (HATAKKA, 1994). Esse grupo de microrganismos desenvolveu mecanismos não específicos, por enzimas extracelulares, para promover a modificação da lignina (BARR; AUST, 1994; HATAKKA, 1994).

A lacase (benzenodiol: oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2) é uma enzima com a capacidade de oxidar vários compostos aromáticos catalisando a remoção de elétrons e prótons de grupos hidroxifenólicos e aminoaromáticos (MAYER; STAPLES, 2002). É uma enzima muito versátil, de grande interesse biotecnológico, especialmente seu uso na preparação de biossensores para a detecção de compostos fenólicos, na degradação de compostos aromáticos, como mediador para a oxidação de resíduos da indústria de celulose e como agente de biorremediação (ELEGIR et al., 2005; KADRI et al., 2017).

Neste trabalho, quarenta e sete isolados fúngicos, obtidos de madeira em decomposição, foram avaliados quanto ao potencial de produzir lacase em meio líquido. O microrganismo JUMAD053, produtor da maior quantidade da enzima, foi estudado quanto às condições ótimas de produção da enzima lacase e quanto aos produtos originados pela degradação biológica da lignina.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho foi otimizar as condições de cultivo para produção de lacase na presença de lignina Kraft pelo isolado fúngico da madeira JUMAD053 e avaliar os produtos da biodegradação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Selecionar um isolado fúngico da podridão branca pela produção de lacase constitutiva.
2. Otimizar as condições de cultivo para a produção enzimática do isolado JUMAD053, seguindo um planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta.
3. Identificar, por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e auxílio se padrões analíticos, alguns produtos da degradação da lignina.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 COMPONENTES DA MADEIRA

A madeira é um recurso muito 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).

A celulose é um polímero da glicose e representa o principal composto da madeira: 30 a 50% de seu peso seco (LU et al., 2017), sendo responsável pela estruturação da parede celular vegetal (BROXTERMAN; SCHOLS, 2018). Já a hemicelulose, representando de 20 a 35% do peso seco da madeira, é uma mistura de heteropolímeros, contendo uma variedade de polissacarídeos (LU et al., 2017). É um composto estrutural na parede celular das plantas e desempenha funções na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal (SJOSTROM, 1981; BROXTERMAN; SCHOLS, 2018).

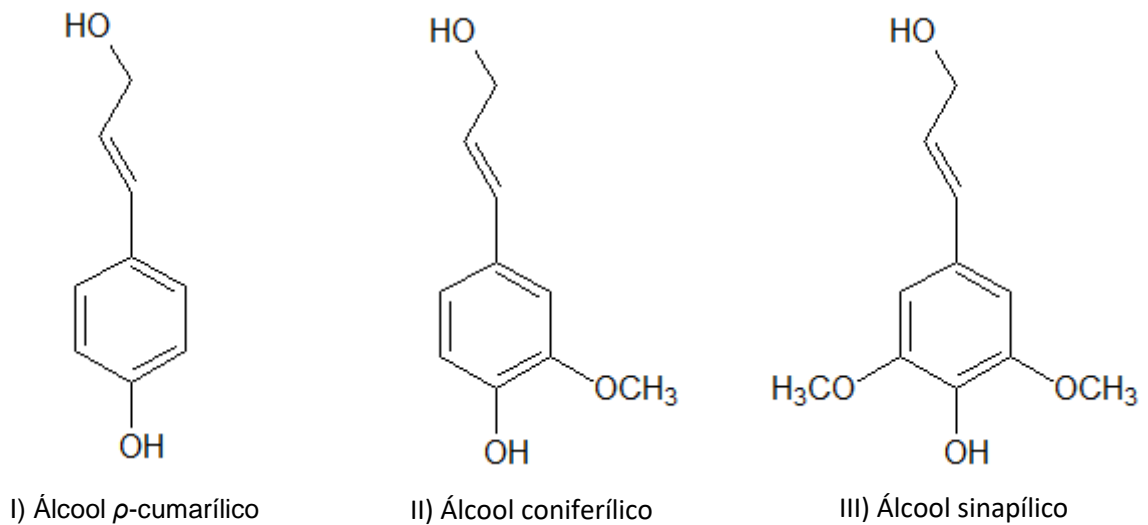
3.1.1 Lignina: abundância e características gerais

A lignina, também conhecida por lenhina, constitui de 15 a 30% do peso seco da madeira e é um dos compostos aromáticos mais abundantes na biosfera, representando cerca de 30% de todo o carbono orgânico no planeta (LUTERBACHER; ALONSO; DUMESIC, 2014). É o composto aromático mais abundante em plantas vasculares (SJOSTROM, 1981), onde proporciona grande coesão entre as fibras dos tecidos vegetais (LISBOA et al., 2005).

Em conjunto com as microfibrilas de celulose e a hemicelulose, a lignina forma um biocomposto natural, que garante grande suporte para a massa das plantas, resistência ao tempo e ao vento e longevidade (JANUSZ et al., 2017). Além de sua função estrutural, a lignina está relacionada com o transporte de água e nutrientes e proteção contra o ataque biológico e químico (LU et al., 2017). A lignina em sua forma natural, encontrada nas plantas, é denominada de protolignina (ZHU et al., 2017).

Trata-se de um polímero fenólico com substituintes variados, altamente ramificado, sendo sua estrutura principal formada por diversas unidades de fenilpropano (monômeros), derivadas do álcool *p*-cumarílico (I), do álcool coniferílico (II) e do álcool sinapílico (III), ilustrados na Figura 1.

Figura 1 – Estruturas do álcool *p*-cumarílico (I); álcool coniferílico (II) e álcool sinapílico (III), precursores da lignina.



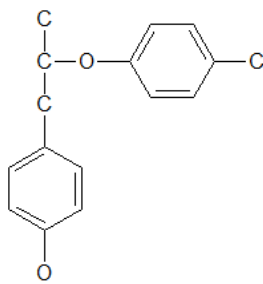
Longe (2018).

As ligações carbono-oxigênio de éter (C-O-C) 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 (ESTEVES, 2011).

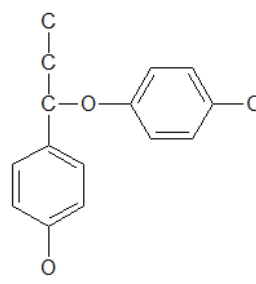
A lignina possui estrutura química tridimensional bastante irregular, podendo apresentar-se sob uma série de subestruturas (Figura 2), das quais a mais abundante apresenta a ligação (β -O-4) entre as unidades de fenilpropano (SJOSTROM, 1981; LU et al., 2017). A ligação β -O-4, além de ser a mais comum, possui grande disponibilidade à modificações e clivagens (CONSTANT et al., 2016). Apesar de amplamente estudada, vale ressaltar que a estrutura exata da protolignina ainda é desconhecida, devido a sua estrutura irregular e complexa (ZHU et al., 2017).

As principais características químicas da lignina são heterogeneidade, alto peso molecular, estrutura irregular, alta insolubilidade e recalcitrância. O tipo de lignina varia com as características da madeira: em gimnospermas – *softwood* –, a lignina é constituída por unidades de tipo *p*-cumarílico e coniferílico, já nas de angiospermas – *hardwood* –, por unidades dos três álcoois (SJOSTROM, 1981; LU et al., 2017), os quais foram apresentados na Figura 1.

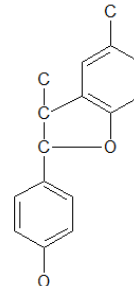
Figura 2 – Ligações mais comuns entre as unidades de fenilpropano e suas respectivas abundâncias.



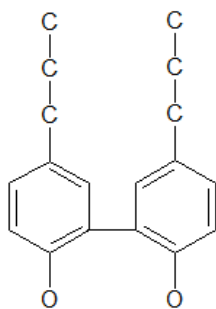
β -O-4: 40-60%



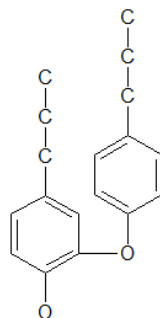
α -O-4: 4-10%



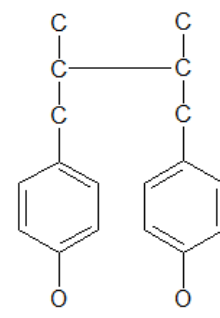
β -5: 2-10%



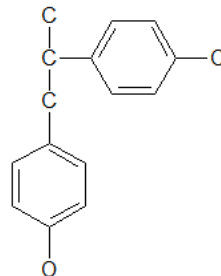
5-5: 4-11%



4-O-5: 4-8%



β -1: 2-7%



β - β : 2-15%

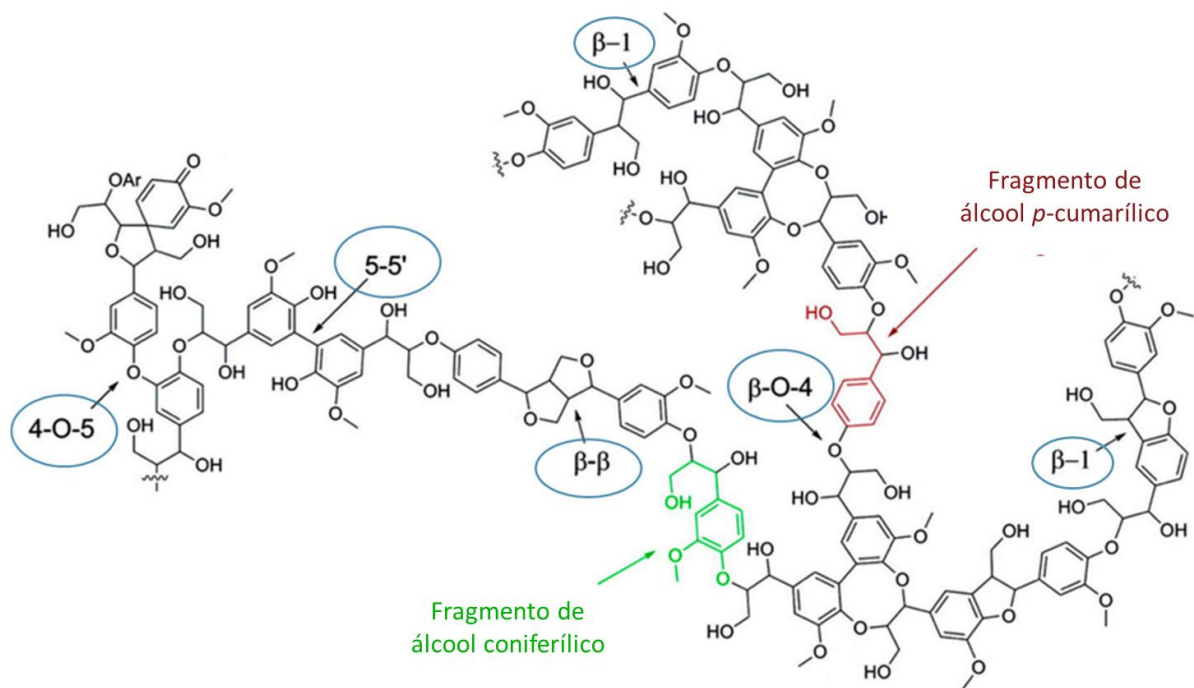
Sjostrom (1981).

Na parede celular vegetal, a lignina encontra-se associada à hemicelulose por ligações covalentes. O alto grau de ramificação da lignina e o grande tamanho de sua molécula (Figura 3) a tornam de difícil incorporação pelos microrganismos, sugerindo que os mecanismos ligninolíticos sejam extracelulares. Estes mecanismos devem ser oxidativos, para que as ligações estáveis do tipo éter sejam quebradas (AGAPITO, 2007).

Além disso, 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 3.2) 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 3 – Segmento de um polímero de lignina.



Vinardell; Mitjans (2017)

3.2 A PRODUÇÃO DA LIGNINA PELO PROCESSO KRAFT

O processo Kraft é a principal metodologia utilizada na indústria para a extração da celulose, por ser um processo de cozimento contínuo com reduzidas perdas químicas e máxima eficiência energética (CORREIA, 2010; ALVES et al., 2015)

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) descreve o processo Kraft como uma metodologia de digestão por cozimento de aparas de madeira em alta temperatura e pressão utilizando-se do 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).

Após o cozimento dos materiais, forma-se o licor negro no local de separação, rico em lignina, compostos orgânicos da madeira, produtos químicos usados na digestão e água. O licor pode ser 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).

Embora existam métodos de extração de lignina que visam seu isolamento como uma estrutura a mais próxima possível da protolignina, tais métodos foram desenvolvidos principalmente para fins analíticos, isto é, para determinação da estrutura da lignina. Esses métodos analíticos geralmente não fornecem um ponto de partida viável para esquemas de valorização da lignina. Assim, devem ser encontradas rotas de valorização eficientes para as ligninas técnicas, que são isoladas como produtos secundários dos processos de biorrefino, como é o caso da lignina Kraft (CONSTANT et al., 2016).

Apesar do grande potencial do uso da lignina após tratamento, apenas 2% das 70 milhões de toneladas de lignina produzidas anualmente é beneficiada e comercializada como agente de dispersão ou de ligação (LU et al., 2017). A maior parte da lignina produzida é descartada ou queimada para produção de bioenergia de baixo custo nas indústrias de papel e celulose, o que não se alinha ao desenvolvimento sustentável, contribui à geração de gases de efeito estufa e à perda de compostos químicos valiosos presentes na madeira (LU et al., 2017; RAGAUSKAS et al., 2014; TEN, VERMERRIS, 2015).

Em plantas industriais que não utilizam a lignina para a produção de energia, pode ocorrer o descarte do efluente bruto ou com algum tratamento em corpos d'água, resultando em impactos ambientais negativos: aumento da toxicidade, eutrofização, inibição da comunidade de fitoplânctons, algas e plantas dentre outros danos ao meio ambiente (YADAV; CHANDRA, 2015)

Assim, vê-se a necessidade do desenvolvimento de tecnologias capazes de promover o devido aproveitamento da lignina produzida nas indústrias, como é o caso da degradação biológica por fungos ligninolíticos.

3.3 FUNGOS LIGNINOLÍTICOS: CARACTERÍSTICAS GERAIS E BIODEGRADAÇÃO

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 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 compreende cerca de 25% das espécies fúngicas e caracteriza-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).

Os fungos são importantes agentes na 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).

Assim, os fungos são importantes agentes da biodegradação - 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 estabilidade (ADELIN et al., 2011).

No caso dos fungos ligninolíticos, a ação da hifa sobre a madeira a ser degradada consiste na secreção de enzimas, 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 peróxido de hidrogênio (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).

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). Assim, torna-se necessário o estabelecimento de condições ótimas de cultivo para promover sua biodegradação.

3.3.1 Fungos da podridão marrom e branca

Os fungos da podridão marrom desenvolvem-se principalmente sobre gimnospermas, onde degradam os polissacarídeos da madeira após uma modificação parcial da lignina, geralmente ocasionado por outro grupo de microrganismos. 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* (FILLEY et al., 2002).

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 fragmentar 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 utilizam-se de enzimas extracelulares, de ação não-específica, capazes de promover a sua modificação (BARR; AUST, 1994).

No Quadro 1 são apresentadas algumas aplicações da biodegradação da lignina por fungos da podridão branca.

Quadro 1 - Exemplos na literatura de degradação da lignina por fungos da podridão branca

Fungo da podridão branca	Descrição do processo	Referência
<i>Cerrena unicolor</i>	Degradação de Lignina pela enzima lacase isolada	LONGE et al., 2018
<i>Coriolus versicolor</i>	Degradação de Lignina em efluente da indústria de papel e celulose	HONG et al., 2015
<i>Echinodontium taxodii</i>	Degradação de compostos-modelo de lignina fenólicos e não fenólicos e lignina Kraft por lacase e manganês peroxidase	KONG et al., 2016
<i>Nematoloma forwardii</i>	Degradação de Lignina pela enzima manganês peroxidase isolada	LONGE et al., 2018

(continuação)

<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Degradação de Lignina pela enzima Lignina Peroxidase isolada	LONGE et al., 2018
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Degradação de Lignina em efluente da indústria de papel e celulose	HONG et al., 2015
<i>Trametes gallica</i>	Degradação de Lignina em efluente da indústria de papel e celulose	HONG et al., 2015
<i>Tyromyces albidus</i>	Degradação de Lignina em efluente da indústria de papel e celulose	HONG et al., 2015

Seguindo a evolução dos microrganismos, os fungos da podridão branca especializaram-se na degradação da lignina de angiospermas – hard wood – enquanto os fungos da podridão marrom são considerados microrganismos mais generalistas quanto ao substrato de ação (AYUSO-FERNÁNDEZ et al., 2019).

3.4 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), sendo as citadas enzimas já extensamente relatadas na literatura (ZHU et al., 2017).

Denomina-se constitutiva a enzima produzida a partir de uma expressão de genes relacionada a metabolismo primário do microrganismo, enquanto a enzima produzida pelo metabolismo secundário é a indutiva. A indução da produção de enzimas como a lacase pode ocorrer na presença de surfactantes (GIESE et al., 2004), álcool veratrílico (SALDANHA et al., 2007), entre outros.

De acordo com Mikiashvili e colaboradores (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).

O estudo desenvolvido por Ayuso-Fernández e colaboradores (2019) demonstrou que a eficiência na degradação da lignina na natureza está intimamente relacionada com o surgimento das enzimas peroxidases em conjunto com o triptofano na evolução do metabolismo fúngico.

Ainda, os autores demonstram que plantas e fungos coevoluiram, sendo que a lignina de plantas vasculares mais primitivas – gimnospermas – é mais eficientemente degradada pelas enzimas peroxidases sem a incorporação do triptofano. Por outro lado, com a evolução e surgimento das angiospermas, o metabolismo fúngico incorporou o triptofano às enzimas peroxidase, resultando na melhor degradação da lignina do tipo *hard wood* (AYUSO-FERNÁNDEZ et al., 2019).

3.4.1 Lignina peroxidase (LiP)

A Lignina peroxidase teve sua produção primeiramente relatada por uma cultura do basidiomiceto da podridão branca *Phanerochaete chrysosporium*, em meio com níveis limitados de nitrogênio (KIRK; FARREL, 1987).

É uma enzima capaz de atuar em uma variedade de substratos, sendo assim considerada não específica. É conhecida a capacidade dessa enzima em oxidar compostos aromáticos fenólicos e por participar da clivagem oxidativa da lignina em material vegetal (ASGHER et al., 2016) e também da lignina Kraft (KUMAR ET AL., 2015). A participação da lignina peroxidase pode estar restrita à oxidação de partes já fragmentadas da lignina, mais solúveis (ECKER; FULOP, 2018).

A ação da enzima deve-se ao Fe (III) de seu grupo heme, que passa por diferentes estados de oxirredução, resultando na oxidação do substrato em que a LiP atua. Compostos como o álcool veratrílico, substrato natural dessa enzima, são fundamentais para a ação oxidativa e conhecidos por induzir a produção da LiP em microrganismos (ROMRO ET AL., 2019; HATAKKA, 2001).

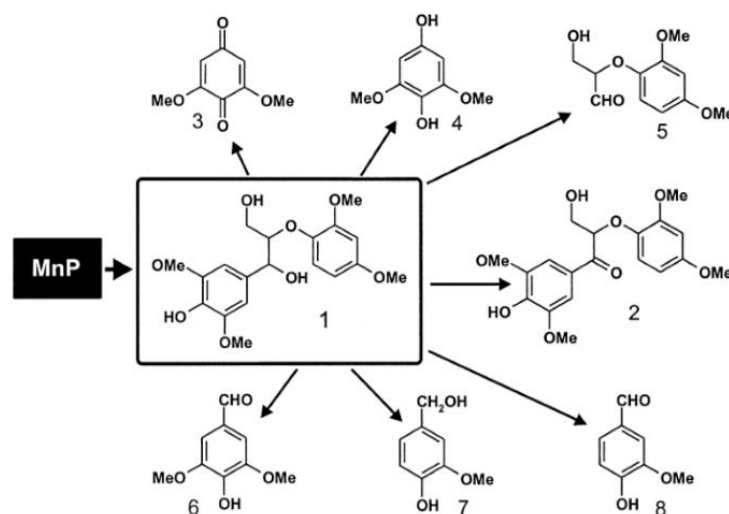
3.4.2 Manganês peroxidase (MnP)

A manganês peroxidase é produzida por fungos basidiomicetos (HOFRICHTER, 2002) e foi registrada pela primeira vez em uma cepa de *Phanerochaete crysosporium* (BUGG et al., 2011). Apresenta-se em formas variadas, sendo que uma cepa do fungo da podridão branca *Ceriporiosis 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 e colaboradores (1988), que observaram alterações na lignina tratada pela enzima em questão. 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 biodegradação de lignina são ilustradas na Figura 4.

Figura 4- Produtos da oxidação de uma molécula dímera de lignina (1) por MnP produzida por *P. crysosporium*: (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) siringaldeído, (7) álcool vanílico e (8) vanilina



Hofrichter (2002).

O sistema enzimático da MnP é bastante promissor na biodegradação 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.

3.4.3 Lacase (Lac)

O primeiro registro da enzima lacase 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, em microrganismos, plantas e animais (DESAI; NITYANAND, 2010; CHEN et al., 2015). 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; CHEN et al., 2015). 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; KOLB et al., 2012).

As lacases possuem a capacidade de transformar contaminantes em compostos de menor toxicidade e de mais fácil acesso por outros microrganismos degradadores, além de estarem relacionadas com modificações e degradação de compostos lignocelulósicos (CHEN et al., 2015).

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, localizadas em três sítios (agrupamento trinuclear).

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-sulfonato) (ABTS). Diferentemente dos substratos fenólicos, a oxidação do ABTS independe do pH e resulta na formação de um radical catiônico com coloração (ABTS^{•+}), de alta estabilidade em solução (HOFER; SCHLOSSER, 1999, JOHANNES; MAJCHERCZYK, 2000).

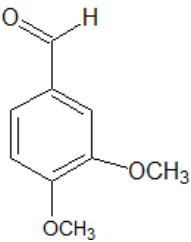
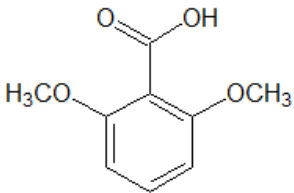
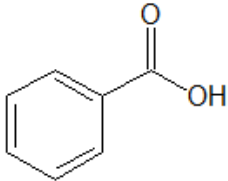
O sistema lacase-mediador apresentado tem grande potencial para a biodegradação da lignina (BASHTAN-KANDYBOVICH et al., 2012). Assim, o estudo de novas formas de lacase, com diferentes substratos específicos e estabilidade, é de grande importância para a indústria. Além disso, há a necessidade de se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

3.5 PRODUTOS DA BIODEGRADAÇÃO DA LIGNINA

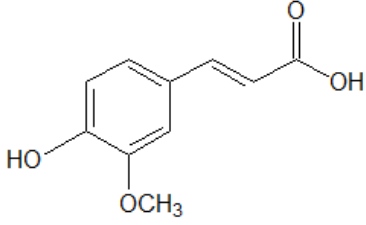
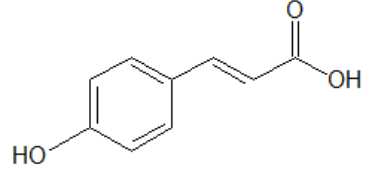
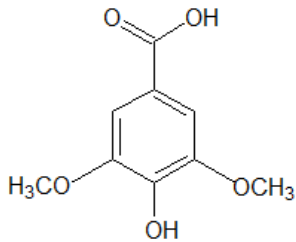
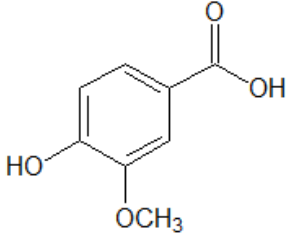
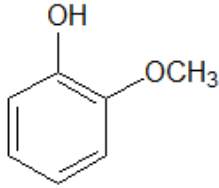
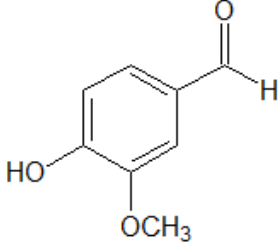
Uma revisão bibliográfica realizada por Zakzeski e colaboradores (2010) relatou a possibilidade de formação de mais de 160 tipos de monômeros fenólicos a partir da clivagem da lignina.

Dentre os produtos que podem ser originados da biodegradação da lignina encontram-se: 3,4-dimetoxibenzaldeído (CUESTA et al., 2018), ácido 2,6-dimetoxibenzoico (DEKKER; BARBOSA; SARGENT, 2002), ácido benzoico (BUGG et al., 2011; ZHU et al., 2017), ácido ferúlico (BUGG et al., 2011), ácido *p*-cumárico, ácido sirínico (BUGG et al., 2011), ácido vanílico (BUGG et al., 2011) guaiacol (BUGG et al., 2011), vanilina (BUGG et al., 2011) e veratraldeído (DEKKER; BARBOSA; SARGENT, 2002). Estes compostos, bem como suas estruturas moleculares e aplicações são descritos no Quadro 2.

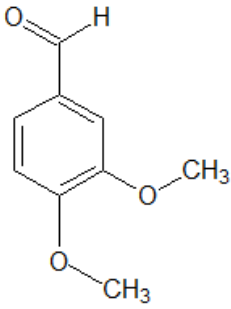
Quadro 2 -Alguns produtos da lignina, estruturas moleculares e aplicações

Composto	Estrutura molecular	Aplicações
3,4-dimetoxibenzaldeído		Substrato para produção de flavorizantes (NAIK; TILVE; KAMAT, 2014)
Ácido 2,6-dimetoxibenzoico		Potencial agente antifúngico (DEKKER; BARBOSA; SARGENT, 2002)
Ácido benzoico		Potencial agente tuberculostático (RANDO et al., 2002), antimicrobiano (WEI et al., 2018) e conservante (QIN et al., 2018)

(continuação)

Ácido ferúlico		<p>Ação antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antitrombose e anticâncer (OU; KWOK, 2004)</p>
Ácido p-cumárico		<p>Ação antioxidante (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995)</p>
Ácido siríngico		<p>Ação antioxidante (BALASUNDRAM; SAMMAN, 2006)</p>
Ácido vanílico		<p>Ação antioxidante (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995)</p>
Guaiacol		<p>Aplicações biotecnológicas (LI et al., 2008) e ação antioxidante (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995)</p>
Vanilina		<p>Indústria alimentícia (FITZGERALD, 2004; ZHAO et al., 2018)</p>

(continuação)

Veratraldeído		Potencial agente antifúngico (DEKKER; BARBOSA; SARGENT, 2002), biossensor para atividade antioxidante (KIM et al., 2007)
---------------	---	--

A biodegradação de duas subestruturas sintéticas da lignina (Figuras 5 e 6) 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 produtos resultantes da ação da lacase produzida pelo fungo *Coriolus versicolor*. As modificações devem-se à clivagem da ligação C α -C β .

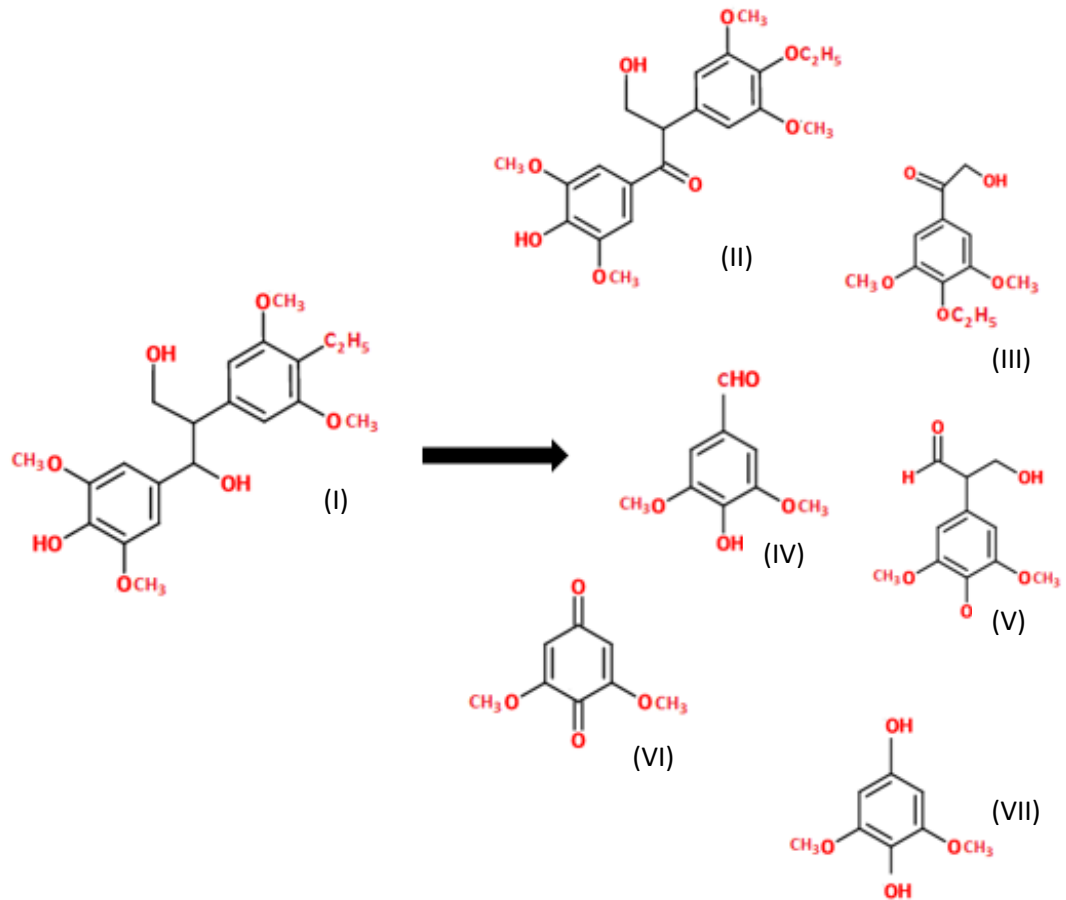
Os autores propuseram mecanismos da degradação de ambos os modelos de lignina, envolvendo a ação oxidativa da lacase produzida pelo microrganismo estudado.

O trabalho de Eggert e colaboradores (1996) identificou produtos da biodegradação de uma subestrutura modelo sintética da lignina pela lacase produzida por *Pycnoporus cinnabarinus* (Figura 7), 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.

Um experimento conduzido por Zhu e colaboradores (2017) promoveu a biodegradação da lignina por bactérias *Bacillus ligniniphilus* L1, identificando por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM) um total de 15 monômeros fenólicos, dentre eles: ácido vanílico, ácido fenilacético e ácido benzoico.

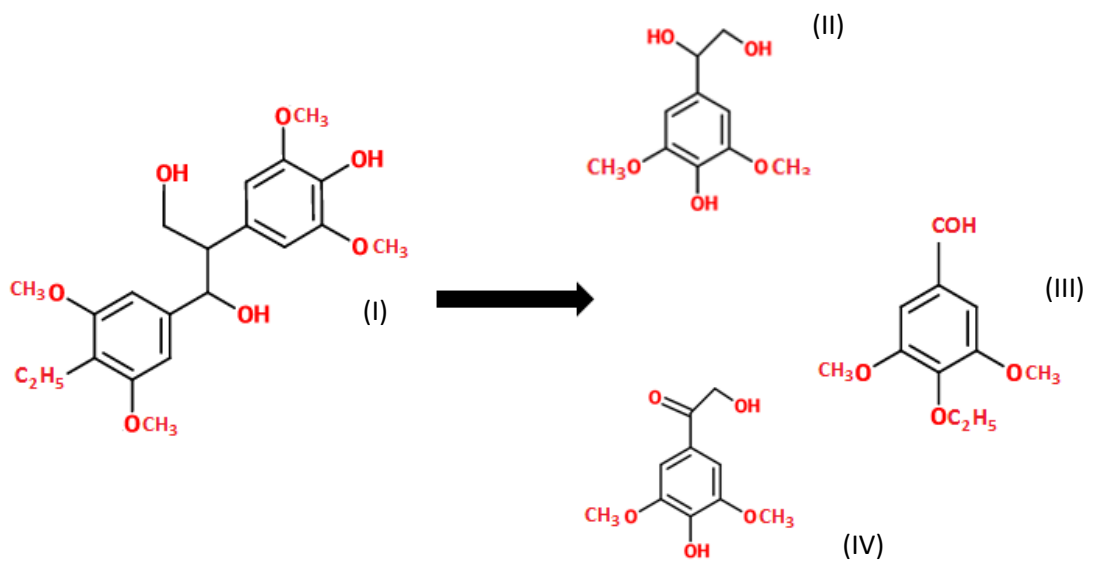
O trabalho desenvolvido por Li e colaboradores (2019) estudou os produtos originados pelo tratamento de lignina alcalina por bactérias simbiotes de cupins. Os resultados, obtidos por GC-MS demonstram a produção de uma variedade de compostos: ácido benzoico, ácido vanílico entre outros.

Figura 5 – Produtos da biodegradação da subestrutura modelo da lignina (I): moléculas II a VII.



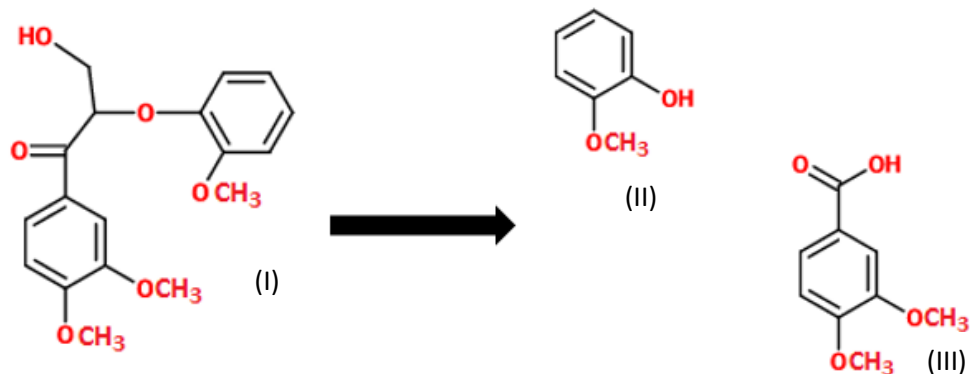
Adaptado de Kawai, Umezawa e Higuchi (1988)

Figura 6 – Produtos da biodegradação da subestrutura modelo da lignina (I): moléculas II a IV.



Adaptado de Kawai, Umezawa e Higuchi (1988).

Figura 7 – Produtos da biodegradação da subestrutura éter veratril glicerol- β -guaiacil (forma α -carbonila) (I): guaiacol (II) e ácido verátrico (III).



Adaptado de Eggert et al. (1996)

Outro importante ponto a ser destacado é que o processo de produção de biocombustíveis a partir de materiais lignocelulósicos necessita de um pré-tratamento capaz de remover a lignina, visto que o polímero pode gerar compostos aromáticos inibidores à hidrólise enzimática e a fermentação microbiana (ZENG et al., 2014). Portanto, é uma estratégia interessante e um grande desafio na área de biocombustíveis a remoção do efeito negativo da lignina e derivados no processo de sacarificação, de forma a convertê-la biologicamente em bioprodutos de valor agregado e até mesmo outros combustíveis líquidos (ZHU et al., 2017).

Também é importante ressaltar que a biodegradação da lignina não gera apenas compostos fenólicos, mas uma variedade de substâncias alifáticas, relacionadas ao conteúdo orgânico dos solos na natureza (KHATAMI et al, 2019).

3.6 A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) NA IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO DA LIGNINA

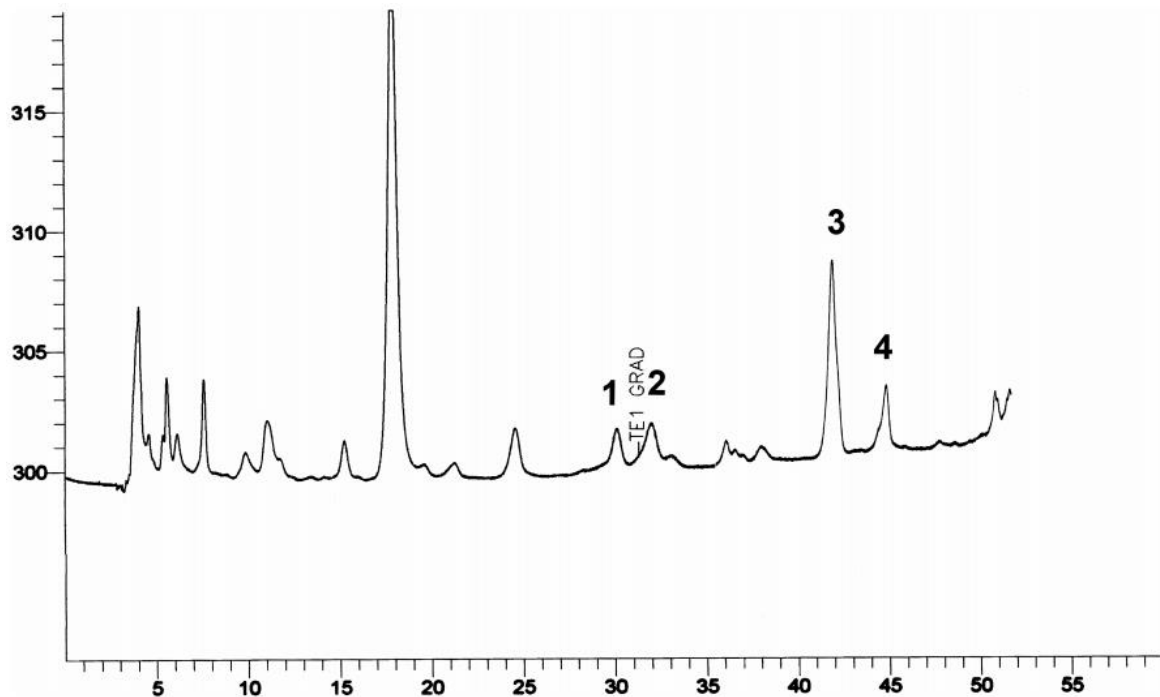
A purificação dos compostos orgânicos é feita, em sua grande maioria, por meio da cromatografia, uma técnica de separação cujos trabalhos iniciaram-se em 1903 pelo químico russo Mikhail Tswett (MCMURRY, 2009).

As diferentes técnicas cromatográficas possuem uma base comum como princípio: a mistura a ser separada é dissolvida em um solvente – fase móvel – e passada ao longo de um material adsorvente – fase estacionária – dentro da coluna cromatográfica. Como os diferentes compostos adsorvem diferentemente na fase

estacionária, eles migram em diferentes velocidades, de forma que são separados à medida que emergem (eluem) ao final da coluna cromatográfica (MCMURRY, 2009).

A Figura 8 apresenta um cromatograma da lignina extraída da parede celular de aspargos (JARAMILLO-CARMONA et al., 2008), onde cada pico representa uma substância contida no extrato. O eixo horizontal contém o tempo de retenção (T_R) dos picos, ou seja, o tempo levado desde a injeção do composto até sua eluição, já o eixo vertical representa a absorvância. O cromatograma destaca os picos dos compostos coniferil monoacetato (1), sinapil monoacetato (2), coniferil diacetato (3) e sinapil diacetato (4).

Figura 8 - Cromatograma da lignina extraída da parede celular de aspargos



Jaramillo-Carmona et al. (2008)

Entretanto, previamente ao uso de cromatógrafos, as substâncias devem ser extraídas de seus substratos. No Quadro 3 são apontadas algumas metodologias encontradas na literatura que, a partir da lignina ou de outros substratos, extraíram compostos relatados como derivados da lignina, de interesse para o presente estudo.

Quadro 3 -Metodologias de extração de compostos que são precursores da lignina a partir de diferentes substratos.

Substrato	Metodologia	Compostos de interesse extraídos	Referência
Fruto da tâmara	Aproximadamente 100g da parte comestível das tâmaras foi macerada e misturada por 3 minutos com 300 mL de metanol:água (4:1 v/v) à temperatura ambiente por 4 h	Ácido <i>p</i> -hydroxibenzoico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico e ácido sinapílico.	AL-RIMAWI; ODEH (2015)
Meio de cultivo com substratos fenólicos tratados por leveduras <i>Brettanomyces. anomalus</i> e <i>B. naardenensis</i>	O sobrenadante foi acidificado a pH 2,0 com HCl. A extração foi feita com duas partes de éter dietílico	Vinil fenol, etil fenol, vinil catecol, etil catecol, vinil guaiacol, etil guaiacol, álcool vanílico, ácido vanílico	EDLIN; NARBAD; DICKINSON (1995)
Marmelada	10g de marmelada foram extraídos com 70mL de etanol/ 2g de marmelada foi extraída com 20 mL de metanol. Amostra foi centrifugada e filtrada.	Ácido benzoico e ácido sórbico	FERREIRA et al. (2000)
Planta <i>Gastrodia elata</i>	100 mg do pó do tubérculo foi extraído com 20 mL de metanol durante 60 minutos (refluxo).	Álcool <i>p</i> -hidroxibenzil, álcool vanílico, hidroxilbenzaldeído e vanilina	LIU; LIU; ZHU (2002)
Alimentos: geleias, frutas, molhos, refrigerante	1 g das amostras foi finamente moído para extração com 25 mL de metanol. A solução foi levada ao sonificador, 50 °C, por 30 minutos, submetida ao vortex e filtrada.	Ácido benzoico, ácido sórbico	SAAD et al. (2005).

(continuação)

Planta <i>Solanum lycocarpum</i>	Um extrato foi obtido por maceração de 100g de biomassa de frutas secas com 200 mL de etanol com água (80%) à temperatura ambiente por 72h, repetindo-se mais duas vezes o processo.	Veratraldeído	TIOSSI et al. (2012)
Lignina tratada por lacase produzida pelo fungo <i>Trametes hirsuta</i>	1,43 mg/mL de lignina foi dissolvida em NaOH, até completa dissolução. A solução (30 mL) foi acidificada com 10,7 mL de 0,1 M de tampão de fosfato de sódio com 10% v/v HCl até pH 5,5. No dia seguinte o pH foi reajustado para 5,5 com HCl, gerando uma solução final de 50 mL (21,4 mM tampão e 0.86 mg/mL de lignina) com adição de água. Posteriormente a solução foi clarificada por centrifugação.	Ácido Ferúlico, 4-hidroxibenzaldeído, ácido 4-hidroxibenzaldeído, ácido sinápico, siringaldeído, ácido siríngico, ácido vanílico, vanilina	WEST et al. (2014)
Lignina Kraft degradada por bactérias	Sobrenadante foi acidificado (pH 1-2) com HCl e extraído três vezes com acetato de etila	Compostos não foram identificados	CHANDRA et al. (2007)
Aspargo	Material macerado foi extraído com etanol quente por 10 minutos para remover qualquer substância fenólica solúvel em álcool, lavado com acetona e seco no ambiente	Álcool coniferílico, coniferil monoacetilado, coniferil diacetilado, álcool sinápico, e sinapil monoacetilado	JARAMILLO-CARMONA et al. (2008)

No Quadro 4 são descritas algumas metodologias e condições que utilizam a técnica de CLAE para separação de produtos da degradação da lignina.

Quadro 4 - Metodologias de análise da lignina e seus produtos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Substrato	Coluna	Eluente	Referência
Lignina tratada por bactérias <i>Citrobacter</i>	C18 fase reversa (250 x 4.6 mm)	Acetonitrila e água (70:30), isocrático	CHANDRA; BHARAGAVA (2013)
Lignina tratada por bactéria <i>Rhodococcus</i>	C18 Zorbax Eclipse Plus (Agilente)	Água (0,1% TFA) e Metanol (0,1% TFA), gradiente	MYCROFT et al. (2015)
Lignina extraída de aspargos	“S Quiral” Spherisorb (25 x 4,6 mm)	Água (TFA 1mM) e Acetonitrila (TFA 1 mM), gradiente	JARAMILLO-CARMONA et al. (2008)
Lignina Kraft industrial tratada pelas bactérias <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Klebsiella pneumonia</i>	C18 fase reversa (250 x 4.6 mm)	Acetonitrila e água (70:30), isocrático	YADAV; CHANDRA (2015)

Apesar do grande número de aplicações dos compostos derivados da lignina, o uso da biotecnologia para valorização da biomassa vegetal, ainda é recente. Muitos compostos e propriedades ainda não foram descobertos (DEVAPPA; RAKSHIT; DEKKER, 2015) encorajando estudos mais aprofundados no tema.

3.7 PLANEJAMENTO FATORIAL: FUNDAMENTOS E CONCEITOS BÁSICOS

O planejamento fatorial é uma metodologia bastante aplicada nas diferentes áreas de pesquisa, cujos fundamentos e conceitos básicos são aqui brevemente descritos conforme Montgomery e Runger (2016) e Barbetta (2010). Trata-se de um método simultâneo, em que as variáveis de interesse são analisadas ao mesmo tempo quanto à significância e influência sobre as respostas estudadas. Os principais termos que compõem um planejamento fatorial, bem como suas respectivas definições são descritos no Quadro 5.

Para realizar um planejamento fatorial, deve-se selecionar quais são as variáveis independentes a serem avaliadas e os experimentos são realizados explorando-se os diferentes níveis desses fatores. O método é representado por b^k , em que k é o número de fatores ou variáveis independentes, enquanto b representa o número de níveis avaliados.

Quadro 5 - Principais termos que compõem um planejamento fatorial e respectivas definições

Termos	Definições
Fatores ou variáveis independentes	Características que podem ser variadas no sistema, como tempo, temperatura, concentração e nutrientes entre outros
Níveis	Grau ou faixa de variação a que os fatores independentes serão submetidos
Resposta ou variável dependente	Variável de interesse. As variáveis independentes são submetidas a níveis de variação e avaliadas estatisticamente quanto a significância na resposta
Efeitos	Mudança ocorrida na resposta quando o experimento é submetido aos diferentes níveis
Efeitos principais	Efeitos referentes aos fatores, individualmente
Efeitos de interações	Ocorrem quando o efeito de um determinado fator depende dos níveis de um outro fator.

Montgomery e Runger (2016)

Nos planejamentos experimentais em que as variáveis são exploradas em três níveis (3^k), é comum que cada um dos níveis seja codificado utilizando-se os símbolos: (+) para o nível superior, (0) para o nível médio e (-) para o nível inferior.

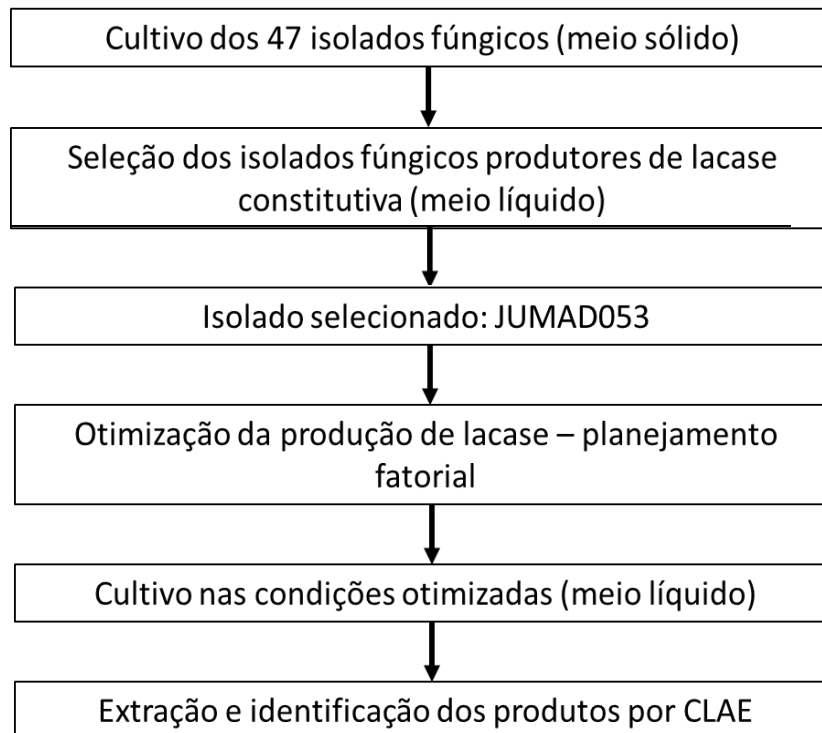
Os efeitos são divididos em duas categorias: efeitos principais, gerados pelos fatores separadamente, e efeitos de interações, quando se leva em conta as mudanças proporcionadas por mais de um fator ao mesmo tempo. Os efeitos são analisados estatisticamente (ANOVA, teste F) e dispostos em um gráfico de Pareto que discerne os efeitos mais significativos dos não-significativos.

Para que os resultados do planejamento fatorial possam ser confiáveis, deve-se levar em consideração alguns cuidados. As replicatas devem ser realizadas em número suficiente, com eventuais repetições de ensaios, de forma a reduzir o erro experimental. As replicatas devem ser repetições autênticas e realizadas de forma aleatória, evitando-se assim distorções estatísticas e o comprometimento do método. Os resultados podem ser apresentados em superfícies de resposta, destacando a região dos fatores que conduz a uma resposta ótima.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas da metodologia utilizada neste estudo seguem os processos apresentados na Figura 9:

Figura 9 – Fluxograma dos processos realizados no estudo



4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os compostos químicos ácido 2,6-dimetoxibenzoico, ácido benzoico, ácido *p*-cumárico, ácido siríngico, ácido vanílico e veratraldeído, bem como o 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfonato) (ABTS) e o 2,6-dimetoxifenol (DMP) foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. O composto ácido ferúlico foi obtido da European Pharmacopoeia® e o ágar bacteriológico da Neogen®.

A lignina Kraft foi gentilmente doada pelo Prof. Dr. Robert Dekker.

4.2 ISOLADOS FÚNGICOS

Os quarenta e sete fungos utilizados neste trabalho foram isolados a partir de basidiocarpos e troncos de árvores em decomposição. As coletas foram realizadas em diferentes cidades do Paraná (bioma Mata Atlântica), como ilustra o Apêndice A.

Os espécimes foram retirados com o auxílio de uma faca e colocados em sacos plásticos. Após assepsia externa com álcool 70% e hipoclorito de sódio, foram inoculados em meio sólido de batata-dextrose-ágar (BDA) e as colônias foram purificados por repiques sucessivos. A conservação foi realizada em placas e tubos contendo ágar inclinado e em meio de Castellani (água destilada estéril). Esses isolados ainda não foram identificados em nível de gênero e espécie.

4.3 SELEÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS PRODUTORES DE LACASE CONSTITUTIVA

Os quarenta e sete isolados fúngicos foram avaliados quanto à produção de lacase constitutiva. Esses microrganismos foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA durante 7 dias, a 28°C. Posteriormente, quatro discos (*plugs*) de 5 mm de diâmetro, totalmente cobertos por hifas dos fungos, foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 125 mL. Cada frasco continha 25 mL de meio líquido basal de Vogel (VOGEL, 1956), 1% de dextrose (m/v) e 1% de extrato de levedura (m/v). Os cultivos foram mantidos sob agitação a 180 rpm, 28 °C, por um período de 5 dias.

Em seguida, os cultivos foram centrifugados e os sobrenadantes, ou extratos livres de células (ELC), foram utilizados para determinação da atividade de lacase, conforme descrito no item 4.5. O ELC do microrganismo que apresentou maior atividade de lacase nas condições pré-estabelecidas foi utilizado nas etapas seguintes.

4.4 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE NA PRESENÇA DE LIGNINA – PLANEJAMENTO FATORIAL

O isolado fúngico JUMAD053 foi cultivado em meio sólido basal de Vogel contendo 2% de ágar (m/v) e 1% de glicose (m/v) durante 10 dias, a 28° C. Posteriormente, quatro discos (*plugs*) de 5 mm de diâmetro contendo hifas do fungo foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio Vogel com 1% de glicose (m/v), concentrações variadas de extrato de levedura (0,5 até 3,0%) e lignina Kraft (0 até 0,5%). O tempo de cultivo variou de 4 até 10 dias,

conforme mostra a Tabela 1. Os cultivos foram incubados a 28° C sob agitação constante a 180 rpm.

Os fatores e níveis descritos foram avaliados no delineamento Box-Behnker (MONTGOMERY; RUNGER, 2016) para três variáveis em três níveis (3^3), em 15 ensaios experimentais, dos quais três são repetições do ponto central. Os cultivos em cada condição foram realizados em triplicatas. Análises estatísticas, incluindo a análise de variância (ANOVA), o gráfico de Pareto e as superfícies de resposta foram obtidos a partir do programa computacional Statistica10.0.

Tabela 1 -Delineamento Box-Behken para três variáveis em três níveis para otimizar a produção de lacase pelo JUMAD053

Experimento	Fatores		
	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	0
2	+1	-1	0
3	-1	+1	0
4	+1	+1	0
5	-1	0	-1
6	+1	0	-1
7	-1	0	+1
8	+1	0	+1
9	0	-1	-1
10	0	+1	-1
11	0	-1	+1
12	0	+1	+1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
Fatores	Valores reais		
	(-1)	0	(+1)
X ₁ – Extrato de Levedura (%)	0,50	1,75	3,00
X ₂ – Lignina Kraft (%)	0,00	0,25	0,50
X ₃ – Tempo de cultivo (dias)	4	7	10

O delineamento de superfície de resposta possibilitou a elaboração de um modelo ajustado de segunda ordem, contendo efeitos lineares e quadráticos, além de interações binárias.

Decorrido o tempo de cada experimento, os cultivos foram filtrados e os sobrenadantes utilizados para determinação da atividade de lacase conforme descrito no item 4.5.

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LACASE

A atividade da lacase produzida pelo isolado fúngico JUMAD053 foi determinada conforme metodologia de Sacchetto e colaboradores (2011). Em tubos de ensaio foi adicionado 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) conforme dados da Tabela 2.

Tabela 2 - Sistema de incubação utilizado para determinar a atividade da lacase por ABTS

	Reação	C ₁	C ₂
Solução do substrato	50 µL	0 µL	50 µL
Solução tampão	150 µL	150 µL	150 µL
H ₂ O (q.s.p.)	775 µL	825 µL	800 µL
Solução de lacase	25 µL	25 µL	0 µL

A atividade da lacase define a quantidade de enzima capaz de converter um substrato em produto (DEVLIN et al., 2008). A União Internacional de Bioquímica (NC-IUB, 1979) define que a unidade de enzima (U/mL) é número de µmol de substrato oxidado por minuto, a 30°C por mL da 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 1 (YADA JUNIOR, 2016; SACCHETTO et al., 2018):

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

Onde:

U/mL: unidade de lacase por mL de solução de enzima;

AT: absorbância do ensaio (reação);

AC₁: absorbância de C₁;

AC_2 : absorvância de C_2 ;

t : tempo de incubação (em minutos);

V : volume de enzima empregado nos ensaios;

F_d : fator de diluição da solução enzimática quando necessário e

ϵ : coeficiente de extinção molar do substrato (para o ABTS, $\epsilon = 36.000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (BOURBONNAIS; PAICE, 1990).

De forma semelhante, determinou-se a atividade de lacase utilizando o substrato 2,6-dimetoxifenol (DMP), com leitura da absorvância no comprimento de onda de 468 nm (MARTINEZ et al., 2009), conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Sistema de incubação utilizado para determinar a atividade da lacase por DMP

	Reação	C_1	C_2
Solução do substrato	100 μL	0 μL	100 μL
Solução tampão	150 μL	150 μL	150 μL
H_2O (q.s.p.)	725 μL	825 μL	750 μL
Solução de lacase	25 μL	25 μL	0 μL

4.6 ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO

O isolado fúngico JUMAD053 foi cultivado em meio Vogel com 1% de glicose (m/v), conforme as condições otimizadas nos respectivos planejamentos fatoriais: 1,125% de extrato de levedura, 0,5% de lignina Kraft e 10 dias de cultivo para ABTS e 1,125% de extrato de levedura, 0,25% de lignina Kraft e 7 dias de cultivo para DMP.

Posteriormente, os cultivos foram centrifugados à 6000 rpm durante 10 minutos e filtrados em papel Whatmann n. 5. Os micélios foram tratados com 10 mL de acetato de etila enquanto os sobrenadantes foram submetidos à precipitação ácida: adição de ácido clorídrico até pH 2 e deixados estáticos durante 12 horas, 7°C (VELIOGLU; UREK, 2014).

Os precipitados foram extraídos com 20 mL de metanol: clorofórmio (2:1) enquanto os sobrenadantes foram extraídos três vezes com acetato de etila (1:1). Amostras de controle biótico (fungo e meio de cultivo), abiótico com lignina (meio de cultivo e lignina Kraft) e abiótico sem lignina (apenas meio de cultivo) foram incubadas em paralelo.

4.7 IDENTIFICAÇÃO POR CLAE DE ALGUNS COMPOSTOS AROMÁTICOS EXTRAÍDOS APÓS CULTIVO NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS

Os perfis de alguns compostos resultantes da degradação da lignina foram determinados por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando-se um equipamento UHPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific), *software* Chromeleon, pertencente ao Departamento de Química da UTFPR Londrina.

Foram utilizados os padrões analíticos: ácido 2,6-dimetilbenzoico, ácido benzoico, ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico e veratraldeído (possíveis produtos da lignina), de forma a auxiliar a identificação dos produtos da biodegradação da lignina. Curvas de calibração para os padrões analíticos foram obtidas a partir das concentrações: 0,005; 0,01; 0,05 e 0,10 mg/mL.

Foi utilizada uma coluna cromatográfica C₁₈ 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 fase móvel: solução **A**, composta de água com 1 mM de ácido trifluoracético (TFA) e solução **B**, composta de acetonitrila (JARAMILLO-CARMONA et al., 2008).

Seguindo-se a metodologia descrita pelos referidos autores, a proporção inicial da fase móvel foi de 80:20 para as soluções **A** e **B**, respectivamente, mantida até 20 minutos. Variou-se linearmente até a proporção 70:30 aos 30 minutos, 60:40 aos 40 minutos, 50:50 aos 50 minutos e 55:45 aos 55 minutos e 60:40 aos 56 minutos. A proporção inicial foi reestabelecida ao final da corrida, aos 60 minutos. O tempo total de análise foi de 60 minutos por amostra, com detecção em 220, 272, 289 e 309 nm.

Os extratos secos de acetato de etila dos micélios e dos sobrenadantes, bem como os extratos de metanol:clorofórmio dos precipitados, obtidos na etapa 4.6, foram dissolvidos em 1 mL de metanol grau HPLC e filtradas em filtros de seringa Agilent com porosidade de 0,45 µm e submetido à cromatografia líquida conforme condições citadas acima. As análises buscaram a identificação dos possíveis produtos da biodegradação da lignina.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS PRODUTORES DE LACASE CONSTITUTIVA

Um total de 47 fungos foram isolados, conforme descrições do Quadro 6, e posteriormente avaliados como produtores de lacase constitutiva em meio líquido de Vogel.

Quadro 6 – Descrição do local de coleta dos quarenta e sete isolados fúngicos utilizados neste estudo

Isolado Fúngico	Coordenadas		Local de Coleta
	Latitude (S)	Longitude (W)	
JUMAD002	25°51'00.1"	48°33'28.3"	Floresta Atlântica, Caiobá
JUMAD 007	23°19'67,5"	51°11'67.3"	UEL, Londrina
JUMAD015	23°19'68.9"	51°11'75.1"	UEL, Londrina
JUMAD026a	23°25'46.1"	51°55'77.4"	Parque do Ingá, Maringá
JUMAD026b	23°25'46.1"	51°55'77.4"	Parque do Ingá, Maringá
JUMAD032	23°25'51.1"	51°55'75,8"	Parque do Ingá, Maringá
JUMAD033	23°25'55.2"	51°55'70.8"	Parque do Ingá, Maringá
JUMAD036	23°19'16.9"	51°20'40.7"	Ribeirão Cafezal e Cambé
JUMAD037b	23°19'16.7"	51°20'40.4"	Ribeirão Cafezal e Cambé
JUMAD038b	23°19'16.9"	51°20'40.3"	Ribeirão Cafezal e Cambé
JUMAD039	23°19'58.7"	51°19'37.1"	Ribeirão Cafezal e Cambé
JUMAD040	23°17'42.9"	51°13'36.3"	Ribeirão Cafezal e Cambé
JUMAD041a	23°36'47.3"	51°16'23.1"	Ribeirão Taquara
JUMAD042a	23°36'47.3"	51°16'23.1"	Ribeirão Taquara
JUMAD042b	23°36'47.3"	51°16'23.1"	Ribeirão Taquara
JUMAD043b	23°19'68.9"	51°11'75.1"	UEL, Londrina
JUMAD045a	23°19'68.9"	51°11'75.1"	UEL, Londrina
JUMAD047b	23°19'68.9"	51°11'75.1"	UEL, Londrina
JUMAD050a	23°19'68.9"	51°11'75.1"	UEL, Londrina

(continuação)

JUMAD050b	23°19'68.9"	51°11'75.1"	UEL, Londrina
JUMAD051a	23°19'68.9"	51°11'75.1"	UEL, Londrina
JUMAD051b	23°19'68.9"	51°11'75.1"	UEL, Londrina
JUMAD052a	23°19'68.9"	51°11'75.1"	UEL, Londrina
JUMAD052b	23°19'68.9"	51°11'75.1"	UEL, Londrina
JUMAD053	23°24'28.5"	51°56'08.7"	UEM, Maringá
JUMAD054	23°24'28.5"	51°56'08.7"	UEM, Maringá
JUMAD056	23°24'13.9"	51°56'23.7"	UEM, Maringá
JUMAD057a	23°25'34.6"	51°55'56.7"	Parque do Ingá, Maringá
JUMAD057b	23°25'34.6"	51°55'56.7"	Parque do Ingá, Maringá
JUMAD 058b	23°25'36.6"	51°55'55.6"	Parque do Ingá, Maringá
JUMAD 059a	23°25'37.6"	51°55'56.1"	Parque do Ingá, Maringá
JUMAD 059b	23°25'37.6"	51°55'56.1"	Parque do Ingá, Maringá
JUMAD 061	23°25'38.9"	51°55'55.0"	Parque do Ingá, Maringá
JUMAD 062	23°25'41.0"	51°55'54.7"	Parque do Ingá, Maringá
JUMAD 064c	23°25'36.7"	51°55'51.4"	Parque do Ingá, Maringá
JUMAD 066	23°25'35.1"	51°55'44.8"	Parque do Ingá, Maringá
JUMAD 067	23°25'35.1"	51°55'44.8"	Parque do Ingá, Maringá
JUMAD 068a	23°25'35.1"	51°55'44.8"	Parque do Ingá, Maringá
JUMAD 068b	23°25'35.1"	51°55'44.8"	Parque do Ingá, Maringá
JUMAD 069b	23°27'31.1"	51°15'05.8"	Parque Mata dos Godoy, Londrina
JUMAD 070a	23°27'31.1"	51°15'05.8"	Parque Mata dos Godoy, Londrina
JUMAD 070b	23°27'31.1"	51°15'05.8"	Parque Mata dos Godoy, Londrina
JUMAD 072a	23°27'29.7"	51°15'05.9"	Parque Mata dos Godoy, Londrina
JUMAD 072b	23°27'29.7"	51°15'05.9"	Parque Mata dos Godoy, Londrina
JUMAD 073	23°27'28.4"	51°15'05.5"	Parque Mata dos Godoy, Londrina
JUMAD 074	23°19'55.2"	51°9'59.76"	Lago Igapó, Londrina
JUMAD 075	23°19'48.0'	51°9'46.8"	Lago Igapó, Londrina

Na Tabela 4 são apresentados os isolados fúngicos e as respectivas atividades de lacase utilizando-se os substratos ABTS e DMP, ordenados em ordem decrescente. O isolado fúngico JUMAD053 apresentou maior atividade de lacase

utilizando-se o substrato ABTS quando comparado aos demais microrganismos. Entretanto, sua atividade enzimática sobre o DMP foi inferior à dos outros isolados fúngicos, indicando que os diferentes isolados produzem diferentes lacases.

A atividade de lacase é expressa pelo número de micromols oxidados do substrato por minuto, por mililitro da solução – U/mL

Tabela 4 - Atividades de lacase (U/mL) medidas a partir dos substratos ABTS e DMP para os principais isolados fúngicos

Isolado Fúngico	Atividade (U/mL)	
	ABTS	DMP
JUMAD053	5,37	0,01
JUMAD026B	0,36	0,08
JUMAD002	0,32	0,03
JUMAD072B	0,15	0,16
JUMAD042A	0,06	0,03
JUMAD054	0.05	0.02
JUMAD050A	0.03	0.00
JUMAD068B	0.03	0.00
JUMAD032	0.03	0.00
JUMAD062	0.02	0.06
JUMAD074	0.02	0.03
JUMAD041A	0.02	0.01
JUMAD070A	0.02	0.07
JUMAD045A	0.01	0.00
JUMAD066	0.01	0.00
JUMAD068A	0.01	0.00
JUMAD072A	0.00	0.00
JUMAD070B	0.00	0.00
JUMAD033	0.00	0.00
JUMAD039	0.00	0.00
JUMAD042B	0.00	0.00
JUMAD073	0.00	0.00
JUMAD067	0.00	0.00
JUMAD075	0.00	0.00
JUMAD061	0.00	0.00
JUMAD050B	0.00	0.01
JUMAD036	0.00	0.00
JUMAD059B	0.00	0.00
JUMAD007	0.00	0.00
JUMAD015	0.00	0.00
JUMAD057B	0.00	0.00
JUMAD051B	0.00	0.00
JUMAD057A	0.00	0.00
JUMAD051A	0.00	0.00
JUMAD052A	0.00	0.00

(continuação)

JUMAD043B	0.00	0.00
JUMAD026A	0.00	0.00
JUMAD056	0.00	0.00
JUMAD038B	0.00	0.00
JUMAD037B	0.00	0.00
JUMAD064C	0.00	0.00
JUMAD047B	0.00	0.00
JUMAD040	0.00	0.00
JUMAD069B	0.00	0.00
JUMAD052B	0.00	0.00
JUMAD059A	0.00	0.00

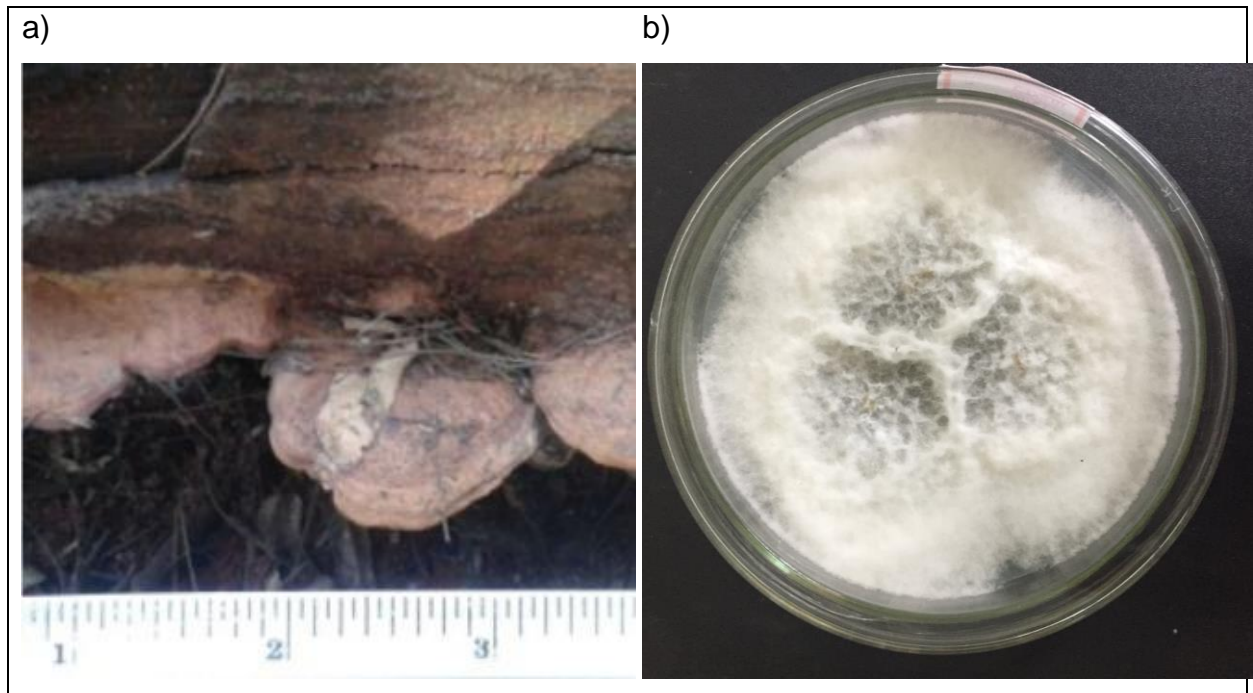
A produção de isoformas de lacase é comumente relatada na literatura para fungos, como é o caso do basidiomiceto ligninolítico *Pleurotus nebrodensis*, capaz de produzir três isoformas dessa enzima (YUAN et al., 2015). Outro exemplo é o basidiomiceto *Trametes hirsuta*, com a produção de quatro isoformas de lacase, induzida para a degradação de corantes (MOISEENKO et al., 2018).

Diferentes isoformas de enzimas ligninolíticas são encontradas em culturas fúngicas e a produção e secreção dessas isoenzimas são extremamente influenciadas pelas condições às quais os fungos em crescimento são submetidos. A disponibilidade de diferentes nutrientes no meio de cultura como fonte de carbono (glicose), nitrogênio, compostos aromáticos, compostos xenobióticos e condições estáticas ou de agitação das culturas são exemplos dessas condições (BABIC; LIKOZAR; PAVKO, 2012).

5.1.1 Características dos Isolado JUMAD053

O isolado fúngico com maior produção de lacase, JUMAD053 (Figura 10), foi obtido de seu corpo de frutificação (basidiocarpo) coletado de um tronco de árvore no campus da Universidade Estadual de Maringá, município de Maringá, Paraná, conforme coordenadas geográficas: 23°24'28.5" S e 51°56'08.7" O (DORTE, 2019). Esse microrganismo foi isolado em meio BDA e conservado em água destilada estéril, temperatura ambiente, compondo a micoteca do Laboratório QuiMiBio da UTFPR-Londrina.

Figura 10 – Isolado fúngico JUMAD053 a) crescendo sobre madeira e b) em meio BDA



As características macroscópicas do corpo de frutificação coletado na madeira indicam que este isolado seja, possivelmente, do gênero *Trametes* (GUERRERO; HOMRICH, 1999). O isolado será identificado posteriormente.

O gênero *Trametes* é comumente relatado na literatura como produtor de lacase (MOISEENKO et al., 2018), além de notável capacidade de degradar a lignina de material vegetal (YANG et al., 2019).

O trabalho desenvolvido por Kolb e colaboradores (2012) demonstrou que a lacase produzida por uma cepa de *Trametes versicolor* promoveu a modificação de uma variedade de monômeros fenólicos, sendo possível, inclusive a remoção completa de muitos desses monômeros nas condições testadas.

Yang e colaboradores (2019) obtiveram remoção de 23,7% da lignina após 45 dias em processo de compostagem de talos de tabaco, utilizando-se inóculo de *Trametes hirsuta*. O trabalho desenvolvido por Asgher e colaboradores (2018) relatou a remoção de 78,29% de lignina de bagaço de cana-de-açúcar, por lacase purificada de uma cepa de *Trametes versicolor* IBL-04 após 15 horas de incubação.

Assim, considerando o grande potencial como produtor de lacase e agente de biodegradação da lignina, o isolado JUMAD053 foi utilizado nas etapas seguintes deste estudo, em que se avaliou o potencial de indução da lignina Kraft na atividade enzimática.

5.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE NA PRESENÇA DE LIGNINA – PLANEJAMENTO FATORIAL

A produção de lacase pelo isolado fúngico JUMAD053 foi otimizada com base na metodologia de superfície de resposta testando, como fatores, diferentes concentrações de extrato de levedura (X_1) e lignina Kraft (X_2) além de diferentes tempos de cultivo (X_3), como mostram as subseções 5.2.1 e 5.2.2, medidas a partir dos substratos ABTS (Y) e DMP (Y'), respectivamente.

5.2.1 Condições otimizadas a partir do substrato ABTS

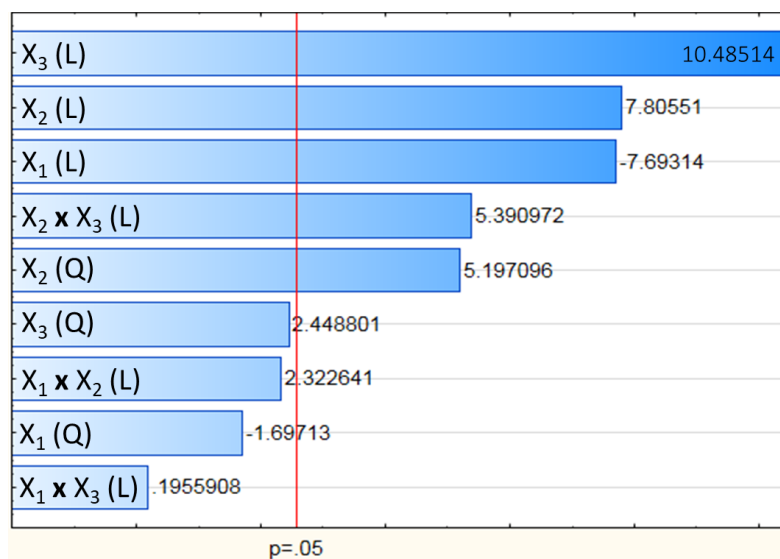
A Tabela 5 apresenta os resultados da otimização, medidos a partir do substrato ABTS. São apresentados os valores de atividade de lacase para cada replicata (Y_1 , Y_2 e Y_3), bem como o valor médio ($Y_{\text{méd}}$) e respectivos desvios padrão.

Tabela 5 – Planejamento fatorial composto central para otimizar a produção de lacase quantificada utilizando-se o substrato ABTS

Experimento	X_1	X_2	X_3	Respostas (U/mL)			
				Y_1	Y_2	Y_3	$Y_{\text{méd}}$
1	-1	-1	0	7,03	7,34	7,97	7,45 ±0,39
2	+1	-1	0	4,46	3,58	3,65	3,90 ±0,40
3	-1	+1	0	8,35	8,68	7,74	8,26 ±0,39
4	+1	+1	0	5,53	7,49	6,80	6,61 ±0,81
5	-1	0	-1	6,44	6,42	7,06	6,64 ±0,30
6	+1	0	-1	4,75	5,03	4,35	4,71 ±0,28
7	-1	0	+1	9,41	10,04	9,02	9,49 ±0,42
8	+1	0	+1	6,79	8,53	7,83	7,72 ±0,71
9	0	-1	-1	3,22	3,34	4,92	3,83 ±0,77
10	0	+1	-1	4,13	4,12	4,90	4,38 ±0,37
11	0	-1	+1	5,77	4,31	4,21	4,76 ±0,71
12	0	+1	+1	10,10	9,32	9,75	9,72 ±0,31
13	0	0	0	6,87	7,39	7,64	7,30 ±0,32
14	0	0	0	6,28	7,58	7,63	7,16 ±0,62
15	0	0	0	7,47	7,20	7,64	7,44 ±0,18
Fatores				Valores Reais			
				-1	0	+1	
X_1 – Extrato de Levedura (%)				0,5	1,75	3,0	
X_2 – Lignina (%)				0	0,25	0,5	
X_3 – Tempo (d)				4	7	10	

Os resultados apresentados no gráfico de Pareto (Figura 11) mostram a importância relativa dos efeitos das variáveis estudadas. Os efeitos são ordenados de forma decrescente, após cada efeito ser convertido em uma estatística-t dividindo-o pelo seu erro padrão (MONTGOMERY; RUNGER, 2016). As barras que ultrapassam a linha de divisão ($p=0,05$) representam os fatores que resultaram em efeitos significativos na produção de lacase, sendo (L) o linear e (Q) o efeito quadrático.

Figura 11 – Gráfico de Pareto para avaliação de importância dos parâmetros a partir das condições de otimização para a atividade de lacase medida com ABTS



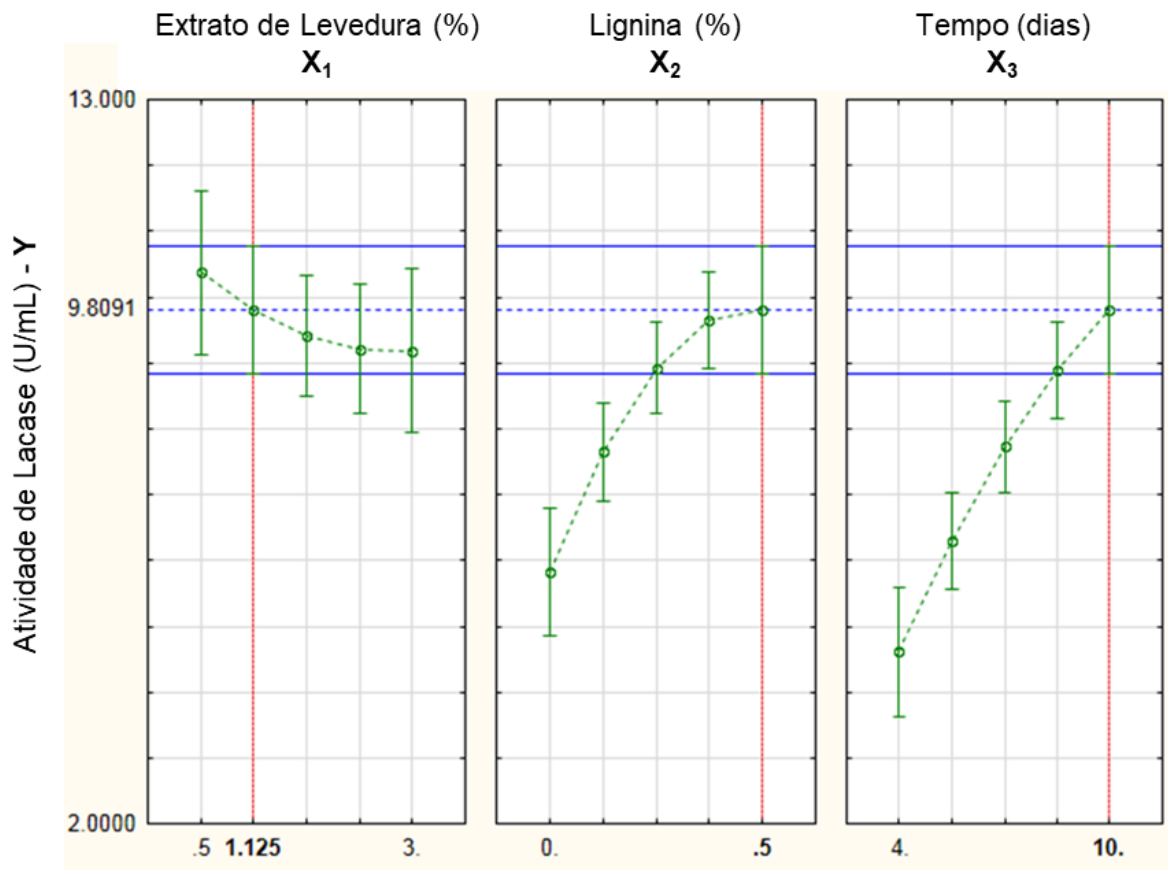
Estes resultados demonstram que na atividade de lacase determinada com o ABTS, o efeito do tempo foi o fator mais significativo na produção enzimática, seguido da concentração de lignina Kraft e extrato de levedura. O gráfico de Pareto também mostrou que as interações do extrato de levedura versus lignina Kraft e tempo não foram significantes no nível de confiança de 95%.

Os coeficientes de regressão obtidos compõem a Equação (2), que representa a produção de lacase pelo substrato ABTS. Todos os valores representados são significativos ($p<0,05$), de forma que os termos que não apresentaram significância estatística foram removidos das equações de segunda ordem, aqui representadas em sua forma reduzida.

$$Y = 7,3 - 1,11250X_1 + 1,12875X_2 + 1,51625X_3 - 1,10625X_2^2 + 1,10250X_2X_3 \quad (2)$$

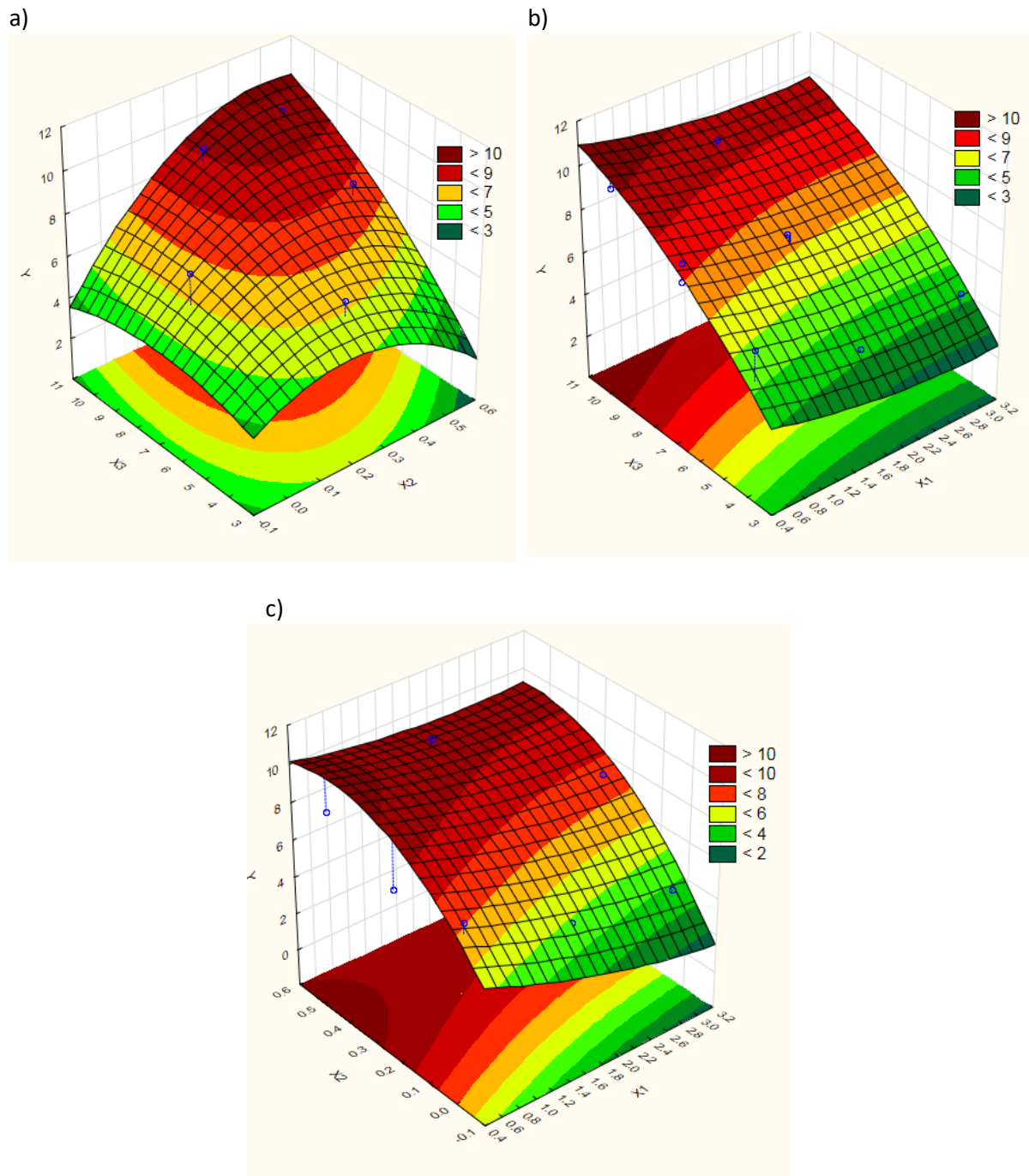
Na Figura 12 são apresentadas as curvas obtidas na otimização da produção de lacase, determinadas com o substrato ABTS, avaliando-se os diferentes níveis dos fatores estipulados.

Figura 12 – Curvas de resposta à produção de lacase (Y) medida por ABTS, considerando-se os fatores extrato de levedura (X_1), lignina Kraft (X_2) e tempo de incubação (X_3)



Na Figura 13 são apresentadas as superfícies de resposta obtidas quando se determinou a atividade de lacase com o substrato ABTS. A máxima atividade de lacase de 9,8 U/mL foi obtida utilizando-se as seguintes condições: 1,125% de extrato de levedura, 0,5% de lignina Kraft e 10 dias de cultivo.

Figura 13 – Superfície de resposta da produção de lacase utilizando-se o substrato ABTS: fixando-se a) X_1 em 1,125%, b) X_2 em 0,5% e c) X_3 em 10 dias à direita.



O valor de R^2 na condição otimizada utilizando-se o substrato ABTS foi de 0,98365, indicando que os valores previstos no modelo estão bem alinhados com os valores obtidos experimentalmente.

Para confirmar a possível aplicabilidade do modelo obtido, experimentos de validação em três replicatas foram realizados usando as condições ótimas. A atividade média de lacase obtida experimentalmente foi de 10,1 U/mL, que não

apresentou diferença estatística significativa em relação ao valor previsto de 9,8 U/mL, demonstrando assim a adequação do modelo proposto.

5.2.2 Condições otimizadas a partir do substrato DMP

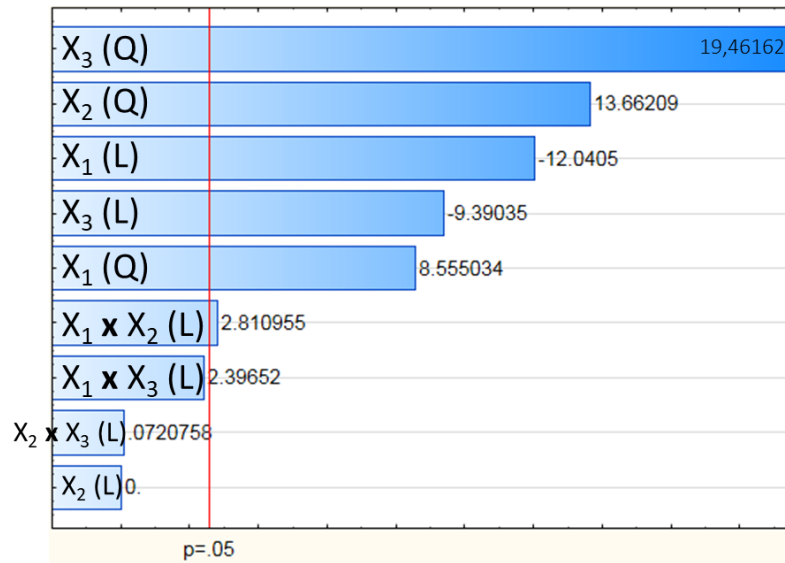
A Tabela 6 apresenta os resultados da otimização, medidos a partir do substrato DMP. De forma semelhante à subseção 5.2.1, são apresentados os valores de atividade de lacase para cada replicata (Y_1 , Y_2 e Y_3), bem como o valor médio ($Y'_{\text{méd}}$), com seus respectivos desvios padrão.

Tabela 6 - Planejamento fatorial composto central para otimizar a produção de lacase quantificada utilizando-se o substrato DMP

Experimento	X_1	X_2	X_3	Respostas			
				Y'_1	Y'_2	Y'_3	$Y'_{\text{méd}}$
1	-1	-1	0	7,25	5,68	6,89	6,61 ±0,67
2	+1	-1	0	3,31	3,15	3,28	3,25 ±0,07
3	-1	+1	0	6,81	4,53	5,88	5,74 ±0,94
4	+1	+1	0	4,20	3,45	4,17	3,94 ±0,35
5	-1	0	-1	6,35	6,19	6,02	6,19 ±0,13
6	+1	0	-1	3,46	3,35	3,34	3,38 ±0,05
7	-1	0	+1	4,10	3,91	4,14	4,05 ±0,10
8	+1	0	+1	1,76	2,99	2,96	2,57 ±0,57
9	0	-1	-1	5,23	3,47	4,45	4,38 ±0,72
10	0	+1	-1	4,45	4,09	4,81	4,45 ±0,29
11	0	-1	+1	3,10	1,39	1,97	2,15 ±0,71
12	0	+1	+1	2,36	2,39	2,02	2,26 ±0,17
13	0	0	0	10,73	6,77	6,77	8,09 ±1,87
14	0	0	0	8,54	8,14	7,47	8,05 ±0,44
15	0	0	0	12,93	5,41	6,07	8,14 ±3,40
Fatores	Valores Reais			-1	0	+1	
	X_1 – Extrato de Levedura (%)			0,5	1,75	3,0	
X_2 – Lignina (%)				0	0,25	0,5	
X_3 – Tempo (d)				4	7	10	

Na Figura 14 é apresentado o gráfico de Pareto, destacando os fatores estatisticamente importantes para a expressão da enzima lacase do microrganismo estudado, a partir do substrato DMP.

Figura 14 – Gráfico de Pareto para avaliação de importância dos parâmetros a partir das condições de otimização para a atividade de lacase medida com DMP



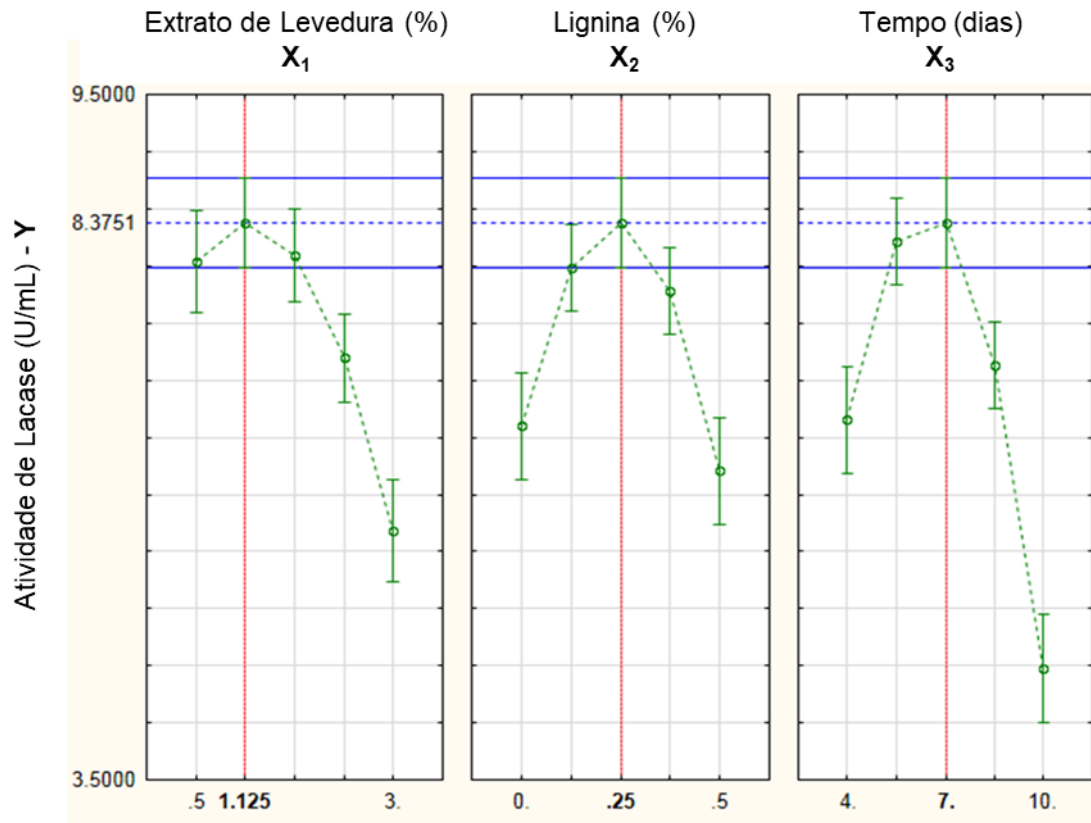
Para o substrato DMP, os efeitos mantiveram-se na mesma sequência de importância, entretanto, diferentemente dos resultados obtidos com o substrato ABTS, a interação lignina Kraft versus tempo de cultivo não se mostrou significativa para a produção de lacase. Os resultados indicam a possibilidade de produção de isoenzimas de lacase pelo isolado fúngico estudado, visto que essas isoenzimas apresentam afinidades diferentes para os substratos ABTS e DMP. Conforme relatos de Viswanath e colaboradores (2014), a produção de isoenzimas de lacase é comum em fungos ligninolíticos.

A partir dos coeficientes de regressão obtidos para o substrato DMP, obteve-se a Equação (3). Todos os valores representados são significativos ($p < 0,05$), de forma que os termos que não apresentaram significância estatística foram removidos das equações de segunda ordem, aqui representadas em sua forma reduzida:

$$Y' = 8,09333 - 1,18125X_1 - 0,92125X_3 - 1,23542X_1^2 - 1,97292X_2^2 - 2,81042X_3^2 + 0,39X_1X_2 \quad (3)$$

Na Figura 15 são apresentadas as curvas obtidas referentes a otimização da produção de lacase, determinando-se a atividade com o substrato DMP, avaliando-se os diferentes níveis dos fatores estipulados. As curvas demonstraram que a condição ótima estava dentro do intervalo dos níveis estudados.

Figura 15 - Curvas de resposta à produção de lacase (Y) medida por DMP, considerando-se os fatores extrato de levedura (X_1), lignina Kraft (X_2) e tempo de incubação (X_3)

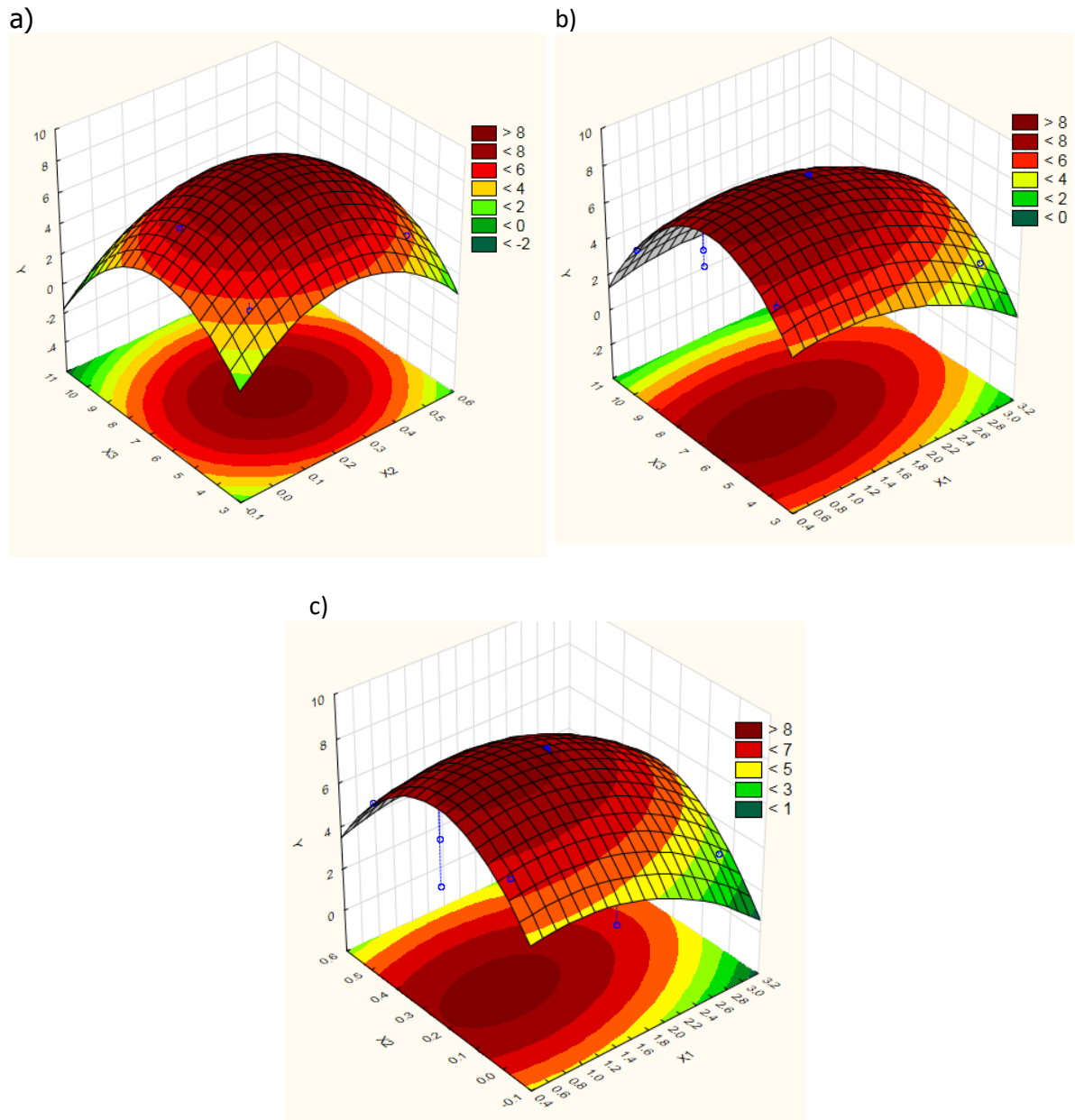


Na Figura 16 são apresentados os gráficos de superfície de resposta obtidos quando as atividades de lacase no ELC foram determinadas com o substrato DMP. A máxima atividade de lacase de 8,4 U/mL, nas seguintes condições: 1,125% de extrato de levedura, 0,25% de lignina Kraft e 7 dias de cultivo.

O valor de R^2 na condição otimizada utilizando-se o substrato DMP foi de 0,99389, demonstrando que os valores obtidos experimentalmente estão adequados ao modelo proposto.

Tavares e colaboradores (2006) otimizaram a produção de lacase para uma cepa de *Trametes versicolor* investigando a influência da concentração de glicose, pH inicial e agitação. Os autores relataram que apenas a concentração de glicose, o pH inicial e a interação entre essas duas variáveis apresentaram efeitos significativos na produção da enzima. A atividade de lacase mais alta relatada pelos citados autores foi de 11,403 U/mL na condição de 9 g/L de glicose e pH 5,0, medida com o substrato ABTS. Tal atividade mostra-se compatível à atividade obtida no presente estudo, de 9,8 U/mL, a partir de um fungo de mesmo gênero provável.

Figura 16 – Superfície de resposta da produção de lacase utilizando-se o substrato DMP: fixando-se a) X_1 em 1,125%, b) X_2 em 0,25% e c) X_3 em 7 dias.



O estudo desenvolvido por Medeiros e colaboradores (1999) otimizou a produção de lacase para uma cepa do basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, em que foram avaliadas as influências do pH inicial, concentração de extrato de levedura e a ação de alguns indutores. Os resultados demonstraram que o pH inicial e a concentração de extrato de levedura foram estatisticamente significantes na produção de enzimas.

Assim, de forma semelhante aos resultados obtidos nos estudos aqui desenvolvidos, o extrato de levedura mostra-se um importante fator na produção e lacase de basidiomicetos.

5.3 IDENTIFICAÇÃO POR CLAE DE ALGUNS COMPOSTOS AROMÁTICOS EXTRAÍDOS APÓS CULTIVO NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS

O isolado JUMAD053 foi cultivado em meio líquido de Vogel na presença da lignina Kraft, seguindo as condições ótimas de cultivo dos respectivos planejamentos fatoriaia. De forma a investigar a degradação da lignina Kraft após a incubação, as amostras foram submetidas à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com o auxílio de sete padrões analíticos de monômeros da lignina.

Para o cálculo das curvas de calibração dos padrões analíticos foram utilizadas quatro concentrações dos padrões: 0,005; 0,01; 0,05 e 0,10 mg/mL. As curvas de calibração são apresentadas na Tabela 7, juntamente com seus respectivos comprimentos de onda (λ), equações e R^2 . A partir das equações obtidas, pode-se calcular a concentração (y) em mg/mL dos compostos nas amostras, a partir de suas áreas (x) apresentadas no cromatograma.

Tabela 7 - Curvas de calibração obtidas para os padrões analíticos

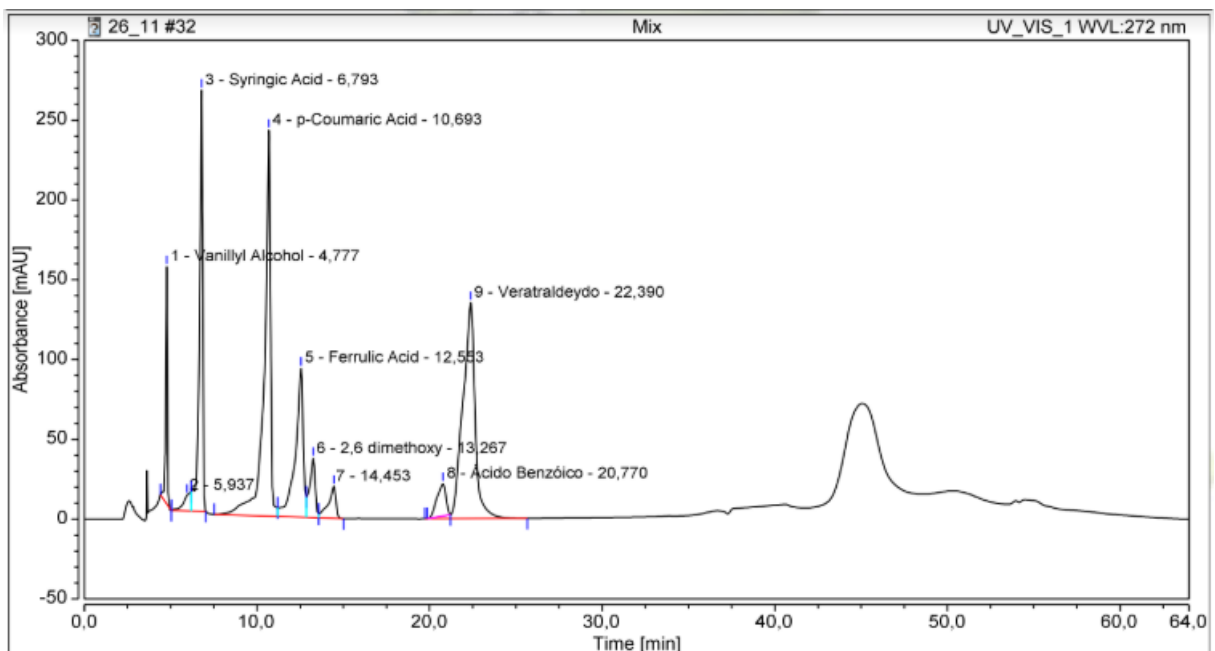
	Padrão analítico	λ (nm)	Equação da reta/polinomial	R^2
1	Ác. 2,6-dimetilbenz.	220	$y = 0,0018x - 0,0006$	0,9959
2	Ácido Benzoico	220	$y = 0,0005x - 0,0003$	0,9976
3	Ácido Ferúlico A	309	$y = 0,0008x + 0,0006$	0,9990
	Ácido Ferúlico B	220	$y = 0,0004x^2 - 0,0008x + 0,0068$	0,9963
4	Ácido Siríngico	220	$y = 0,0006x - 0,0002$	0,9977
5	Ácido Vanílico	220	$y = 0,0016x - 0,0016$	0,9968
6	Ácido <i>p</i> -cumárico	309	$y = 0,0005x + 0,0008$	0,9989
7	Veratraldeído	272	$y = 0,0006x - 0,00009$	0,9981

O padrão analítico do ácido ferúlico originou dois picos distintos nos cromatogramas, devido à sua isomeria cis-trans (URBANIÁK; SZELAG; MOLSKI, 2013), sendo assim denominados de ácido ferúlico A e ácido ferúlico B. Este teve as concentrações melhor representadas por uma equação polinomial, apresentando R^2

superior ao de uma equação linear. Os valores elevados dos R^2 demonstram o bom ajuste dos dados experimentais às equações propostas.

A Figura 17 apresenta o cromatograma contendo os picos de todos os setes padrões analíticos utilizados no estudo e seus respectivos tempos de retenção.

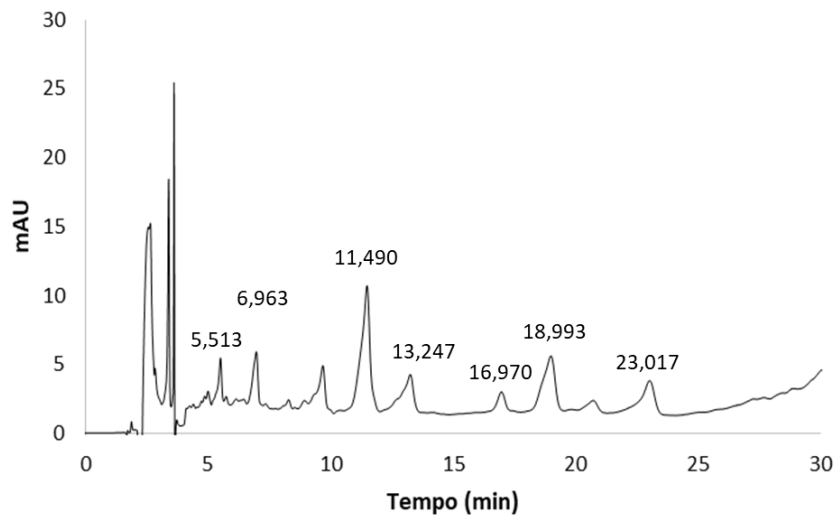
Figura 17 – Cromatograma dos padrões analíticos utilizados no estudo ($\lambda = 272$ nm) e respectivos tempos de retenção: álcool vanílico (4,777 min), ácido siríngico (6,793 min), ácido p-cumárico (10,693 min), ácido ferúlico A (12,583 min), ácido 2,6-dimetoxibenzoico (13,267 min), ácido ferúlico B (14,453 min), ácido benzoico (20,770 min) e veratraldeído (22,390 min)



A Figura 18 traz o cromatograma da Lignina Kraft utilizada no estudo, dissolvida em metanol grau HPLC, sem qualquer tratamento ou incubação. O cromatograma revelou uma série de compostos resultantes do próprio tratamento Kraft. Tais resultados estão em concordância com os obtidos por Zhu e colaboradores (2017) que também encontraram diversos picos de fragmentos da lignina álcali em suas amostras previamente à incubação.

O tratamento da lignina Kraft pelo isolado JUMAD053, nas condições otimizadas, resultou em três extratos diferentes para cada amostra: um extrato de acetato de etila do sobrenadante, um extrato de metanol: clorofórmio do precipitado e um extrato de acetato de etila do micélio.

Figura 18 - Cromatograma da Lignina Kraft sem tratamento ($\lambda = 220$ nm)



As substâncias de interesse dos cromatogramas, que apresentaram variações em suas áreas após tratamento pelo isolado JUMAD053, são apresentadas nas Tabelas 8 e 9. As substâncias apresentadas são exclusivas das amostras contendo lignina Kraft tratada ou não tratada pelo isolado, sendo que os picos existentes nos controles (fungo e meio de cultivo e apenas meio de cultivo) foram descartados da presente análise.

Os compostos que apresentaram picos com tempo de retenção coincidentes com os tempos de retenção dos padrões analíticos levam os nomes das respectivas substâncias. Já os picos que não coincidiram com os tempos de retenção dos padrões analíticos são denominados apenas como “Composto” e enumerados. Os resultados foram apresentados conforme comprimento de onda (λ) do cromatógrafo que resultou em maiores valores das áreas.

A análise dos cromatogramas resultantes das condições otimizadas para ABTS (Tabela 8) revelam diminuição na área do composto ácido 2,6-dimetoxibenzoico após tratamento com o isolado JUMAD053. Por outro lado, foi registrada a produção de outros dois compostos: ácido benzoico e Composto I.

Tabela 8 - Análise dos comprimentos de onda (λ), tempo de retenção e áreas dos produtos da lignina Kraft tratada pelo isolado JUMAD053, condições otimizadas para ABTS

Substância	λ (nm)	T_R (min)	Extrato Sobrenadante		Extrato Precipitado		Extrato Micélio	
			LK com fungo	LK sem fungo	LK com fungo	LK sem fungo	Com LK	Sem LK
Ácido 2,6-dimetoxibenzoico	220	13,268±0,036	6,185±0,880	30,571±1,659	1,435±0,393	1,720±0,737	0,477±0,175	ND
Composto I	220	14,060±0,023	0,892±0,083	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido Benzoico	220	20,949±0,226	0,742±0,216	ND	ND	ND	ND	ND

LK = Lignina Kraft. T_R = tempo de retenção. ND = não detectado. Em azul as substâncias que apresentaram aumento da área total nas amostras tratadas e em vermelho as que apresentaram redução

Tabela 9 - Análise dos comprimentos de onda (λ), tempo de retenção e áreas dos produtos da lignina Kraft tratada pelo isolado JUMAD053, condições otimizadas para DMP

Substância	λ (nm)	T_R (min)	Extrato Sobrenadante		Extrato Precipitado		Extrato Micélio	
			LK com fungo	LK sem fungo	LK com fungo	LK sem fungo	Com LK	Sem LK
Composto II	272	10,822±0,614	0,394±0,150	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido 2,6-dimetoxibenzoico	220	12,943±0,032	ND	14,055±4,893	ND	ND	ND	ND
Veratraldeído	272	23,731±0,388	ND	ND	0,298±0,158	2,317±1,039	ND	ND
Composto III	272	26,443±0,040	1,770±0,249	ND	1,258±0,318	ND	ND	ND

LK = Lignina Kraft. T_R = tempo de retenção. ND = não detectado. Em azul as substâncias que apresentaram aumento da área total nas amostras tratadas e em vermelho as que apresentaram redução

O composto indicado como ácido 2,6-dimetoxibenzoico estava presente nas amostras de lignina não tratada, apresentando notável diminuição de área nos extratos do sobrenadante (de 30,571 para 6,185) ou em unidades de concentração: de 54,43 para 10,53 µg/mL. A redução na concentração também foi percebida nos extratos do precipitado (de 2,50 para 1,98 µg/mL) após o tratamento com isolado fúngico para esse composto. Tais resultados representam um indício de que o composto em questão foi utilizado pelo microrganismo durante o período de incubação.

Os autores Wang, Liang e Gao (2018) relataram que a incubação de determinados monômeros da lignina juntamente com uma cepa da bactéria *Sphingobacterium* sp. HY-H levou a formação de outros monômeros e até mesmo compostos alifáticos, como o etanol. Dessa forma, a diminuição das concentrações dos monômeros relatada no presente trabalho pode estar relacionada à formação de outros compostos.

Outra explicação para a remoção de monômeros fenólicos é a polimerização a partir da lacase, visto que a enzima está relacionada tanto à despolimerização quanto à polimerização de compostos fenólicos (CHEN et al., 2015).

Longe e colaboradores (2018) demonstraram que as enzimas fúngicas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase purificadas e testadas separadamente levaram a degradação da lignina. Entretanto, a utilização *in vivo* do fungo da podridão branca *Grammothele fuligo*, produtor de uma mistura das enzimas, resultou na repolimerização dos compostos derivados da lignina.

Ainda conforme Tabela 8, o ácido benzoico (0,07 µg/mL) e o Composto I apresentaram picos exclusivos nas amostras dos extratos do sobrenadante da lignina tratada. Tal resultado indica a formação desses novos compostos durante a incubação, possivelmente a partir da biodegradação da lignina pelo isolado JUMAD053.

O ácido benzoico é um potencial produto liberado da lignina, sendo amplamente utilizado na indústria alimentícia e como precursor sintético para outras moléculas (QIN et al., 2018). Além disso, foram relatados na literatura o potencial uso dessa substância como agente antimicrobiano (WEI et al., 2018) e tuberculostático (RANDO et al., 2002).

A liberação de ácido benzoico a partir da quebra da lignina foi previamente relatada na literatura por Wang e colaboradores (2014). Zhu e colaboradores (2017)

também detectaram a presença desse composto após a biodegradação da lignina pela bactéria *Bacillus ligniniphilus* L1. Esses autores relataram, inclusive, a presença de ácido benzoico em lignina álcali previamente ao tratamento biológico.

A possibilidade de produção do ácido benzoico, além de outras moléculas como o Composto I, mesmo que em pequenas quantidades, proporcionam importantes direcionamentos para o aproveitamento e a valorização da lignina. Estudos mais aprofundados podem ser realizados buscando condições que aumentem a produção desses compostos.

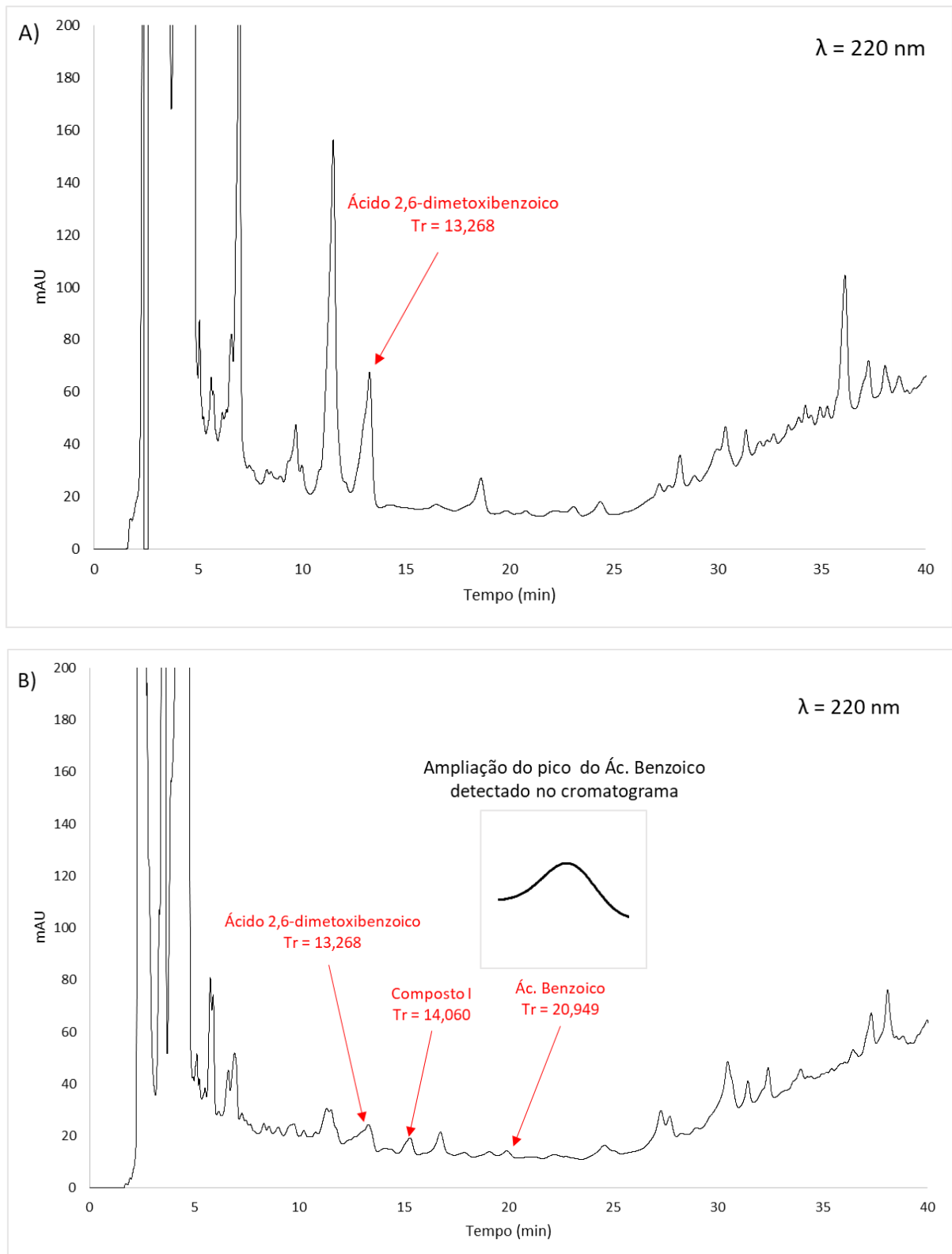
Os cromatogramas resultantes da condição otimizada para o substrato DMP (Tabela 9) demonstraram a produção dos Compostos II nas amostras tratadas dos extratos do sobrenadante, além da geração do Composto III tanto nas amostras tratadas dos extratos do sobrenadante quanto do precipitado. Apesar de não identificados pelos padrões analíticos, tais compostos representam potenciais derivados de interesse da lignina.

O composto indicado na Tabela 9 como ácido 2,6-dimetilbenzoico, com concentração inicial de 24,70 µg/mL, sofreu completa remoção, ou seja, não revelou picos no cromatograma após o tratamento. O composto de mesmo tempo de retenção do veratraldeído sofreu considerável redução nos extratos do precipitado (de 1,30 para 0,09 µg/mL), indicando comportamento semelhante ao encontrado nas condições otimizadas para o substrato ABTS.

A Figura 19 traz o perfil das substâncias contidas em uma amostra de lignina Kraft nas condições otimizadas para o substrato ABTS. Encontram-se indicados os compostos (picos) de interesse, incluindo aqueles que não foram identificados pelos padrões analíticos. De forma a se obter maiores informações sobre os compostos não identificados, as amostras foram enviadas à espectrometria de massas, sendo que os resultados não estão apresentados neste trabalho.

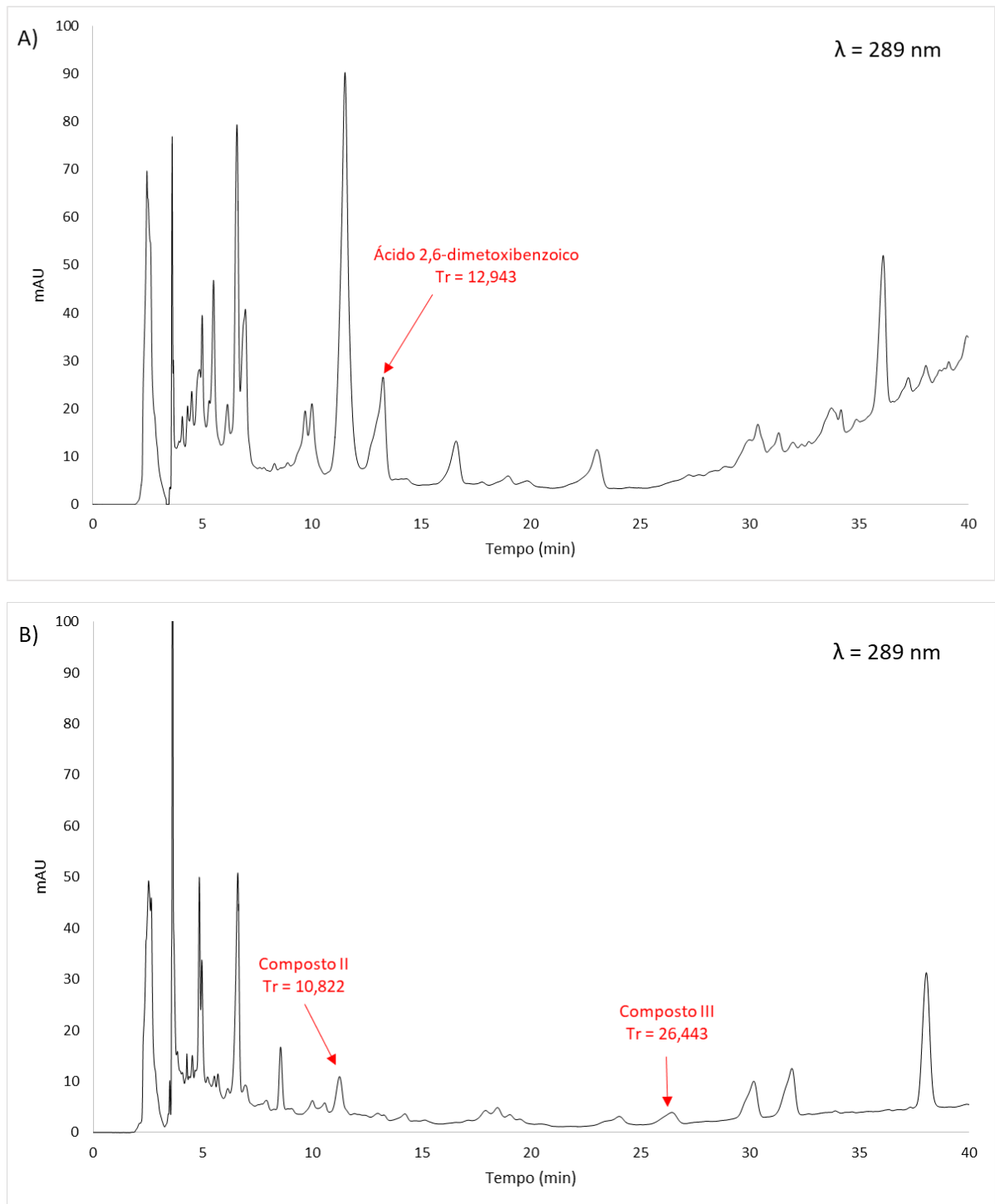
De forma semelhante, a Figura 20 traz o perfil de metabólitos das amostras de controle e tratamento nas condições otimizadas para o substrato DMP.

Figura 19 – Cromatogramas dos extratos dos sobrenadantes sob condições otimizadas para o substrato ABTS: A) Lignina Kraft sem fungo (controle) e B) Lignina Kraft tratada pelo isolado JUMAD053



As substâncias de interesse estão destacadas pelas setas vermelhas, sendo indicado seus respectivos tempos de retenção (Tr)

Figura 20 - Cromatogramas dos extratos dos sobrenadantes sob condições otimizadas para o substrato DMP: A) Lignina Kraft sem fungo (controle) e B) Lignina Kraft tratada pelo isolado JUMAD053



As substâncias de interesse estão destacadas pelas setas vermelhas, sendo indicado seus respectivos tempos de retenção (Tr)

Apesar dos resultados apontarem que as concentrações de alguns monômeros sofreram redução ao invés de aumento após o tratamento biológico, a valorização da lignina também pode ser obtida a partir da remoção dos seus monômeros, como é o caso da produção de bioetanol a partir de matérias lignocelulósicas (JURADO et al., 2009). Os autores demonstraram maior produtividade na produção do etanol após remoção de 70-75% dos monômeros fenólicos, a partir da lacase produzida por *Trametes villosa* e *Coriolopsis rígida*, uma vez que tais compostos podem ter ação fungicida e bactericida.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, o isolado JUMAD053 de provável gênero *Trametes*, um basidiomiceto degradador de madeira, foi selecionado baseado em sua notável produção de lacase constitutiva (5,37 U/mL).

As condições ótimas foram determinadas para produção de lacase desse isolado, a partir de um planejamento fatorial 3³, levando-se em conta a concentração de extrato de levedura, concentração de lignina Kraft e tempo de cultivo, a partir dos substratos ABTS e DMP. Os resultados previram máximas atividades de lacase de 9,8 e 8,4 U/mL medidas a partir dos substratos ABTS e DMP, respectivamente.

A incubação do microrganismo nas condições otimizadas para ABTS levou a produção de dois possíveis produtos da biodegradação da lignina Kraft: ácido benzoico ($T_R = 20,949$ min) e Composto I, não identificado, ($T_R = 14,060$ min). Além disso, foi notada redução na área do ácido 2,6-dimetoxibenzoico ($T_R = 13,268$ min).

Com relação aos cromatogramas resultantes das condições otimizadas para DMP, foi observada a produção do Composto II ($T_R = 10,822$ min) e Composto III (26,443 min), sendo essas substâncias possíveis produtos da biodegradação da lignina Kraft. Também foi observada a redução nas áreas do ácido 2,6-dimetoxibenzoico ($T_R = 12,943$ min) e do veratraldeído ($T_R = 23,731$ min).

Para a confirmação e identificação dos compostos, as amostras serão submetidas à espectrometria de massas. A possibilidade de produção do ácido benzoico, além de outras substâncias, a partir da biodegradação da lignina Kraft valida os objetivos deste trabalho e baseiam futuros experimentos para a valorização da lignina.

REFERÊNCIAS

- ADELIN, E. et al. 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.
- AL-RIMAWI, F.; ODEH, I. Development and Validation of an HPLC-UV Method for Determination of Eight Phenolic Compounds in Date Palms. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 5, p. 1335-1339, 2015.
- ARAÚJO, J.H.B. et al. A comparative study on fungal laccases immobilized on chitosan. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 1-6, 2005.
- ASGHER, M. et al. Delignification of Lignocellulose Biomasses by Alginate–Chitosan Immobilized Laccase Produced from *Trametes versicolor* IBL-04. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 11, p. 2071–2079, 2018.
- ASGHER, M. et al. Lignocellulose degradation and production of lignin modifying enzymes by *Schizophyllum commune* IBL-06 in solid-state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 195–201, 2016.
- AYUSO-FERNÁNDEZ, I. et al. Peroxidase evolution in white-rot fungi follows wood lignin evolution in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 36, p. 17900–17905, 2019.
- BABIC, J.; LIKOZAR, B.; PAVKO, A. Optimization of Ligninolytic Enzyme Activity and Production Rate with *Ceriporiopsis subvermispota* for Application in Bioremediation by Varying Submerged Media Composition and Growth Immobilization Support. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 9, 11365-11384, 2012.
- 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.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.
- BANWART, G.J. Basic food microbiology. Westport: The AVI Publishing Company, 1981.
- BARBETTA, P.A. Comparação entre tratamentos. In: BARBETTA, P.A. **Estatística para cursos de Engenharia e Informática**, São Paulo: Atlas, 2010.

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, et al. Modification of Kraft lignin by biological demethylation. **Journal of Science & Technology for Forest Products and Processes (CANADA)**, v. 2, p. 16-27, 2012.

BLANCHETTE, R.A. Degradation of the lignocellulosic complex in wood. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 999–1010, 1995.

BOURBONNAIS, R. et al. 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.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS Letters**, v. 267, n. 1, p. 99-102, 1990.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRENELLI, L. et al. Laccase-derived lignin compounds boost cellulose oxidative enzymes AA9. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 10, 2018.

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.

BROXTERMAN, S. E.; SCHOLS, H. A. Interactions between pectin and cellulose in primary plant cell walls. **Carbohydrate Polymers**, v. 192, p. 263–272, 2018.

BUGG, T.D.H. ET AL. 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.; BHARAGAVA, N. Bacterial degradation of synthetic and kraft lignina by axenic and mixed culture and their metabolic products. **Journal of Environmental Biology**, v. 34, p. 991-999, 2013.

CHANDRA, R. et al. Characterisation and optimisation of three potential aerobic bacterial strains for kraft lignin degradation from pulp paper waste. **Chemosphere**, v. 67, p. 839-846, 2007.

CHEN, M. et al. Molecular basis of laccase bound to lignin: insight from comparative studies on the interaction of *Trametes versicolor* laccase with various lignin model compounds. **RSC Advances**, v. 5, n. 65, p. 52307–52313, 2015.

CONESA, A. et al. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. **Journal of Biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 143–158, 2002.

CONSTANT, S. et al. New insights into the structure and composition of technical lignins: a comparative characterisation study. **Green Chemistry**, v. 18, n. 9, p. 2651–2665, 2016.

CUESTA, S. et al. On the Reaction Mechanism of the 3,4-Dimethoxybenzaldehyde Formation from 1-(3',4'-dimethoxyphenyl)Propene. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 412-422, 2018.

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.; SARGENT, K. The effect of lignin-related compounds on the growth and production of laccases by the ascomycete, *Botryosphaeria* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 3, p. 374–380, 2002.

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. et al. **Bioquímica: Libro de Texto com Aplicaciones Clínicas**. Reverté: Barcelona, ed. 5, p. 421, 2008.

DORTE, R.P. Investigação de fungos ligninolíticos na produção de lacase utilizando lignina kraft e borra de café. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2019.

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.

ECKER, J. FÜLÖP, L. Lignin peroxidase ligand access channel dysfunction in the presence of atrazine. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2018.

EDLIN, D.A.N. et al. The biotransformation of simple phenolic compound by *Brettanomyces anomalus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 125, p. 311-316, 1995.

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.

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.

ENGUITA, F.J. et al. 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.

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

FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; MENDES, E.; BRITO, P.; FERREIRA, M.A. Simultaneous determination of benzoic and sorbic acids in quince jam by HPLC. **Food Research International**, v. 33, p. 113-117, 2000.

FILLEY, T.R. et al. A Lignin demethylation and polysaccharide decomposition in spruce sapwood degraded by brown rot fungi. **Organic Geochemistry**, v. 33, n. 2, p. 111-124, 2002.

FITZGERALD, D. J. et al. The potential application of vanillin in preventing yeast spoilage of soft drinks and fruit juices. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 2, p. 391–395, 2004.

FORRESTER, I.T. et al. 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 12 out. 2018.

GALANAKIS, C.M. **Handbook of Grape Processing By-Products: Sustainable Solutions**. Londres: Elsevier, 2017.

GIESE, E.C. et al. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e

indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 26, n. 4, p. 463-470, 2004.

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 Mn^{2+} to Mn^{3+} 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.

JANUSZ, G. et al. Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 6, p. 941–962, 2017.

JARAMILLO-CARMONA et al. 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.

JOKELA, J. et al. Biodegradation of two tetrameric lignin model compounds by a mixed bacterial culture. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 23, p. 38-46, 1985.

JURADO, M. et al. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6378–6384, 2009.

KADRI, T. et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 51, p. 52-74, 2017.

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.
- KHATAMI, S. et al. Lignin Contribution to Aliphatic Constituents of Humic Acids through Fungal Degradation. **Journal of Environment Quality**, v. 0, n. 0, 2019.
- KIM, J.H. et al. Enhanced activity of strobilurin and fludioxonil by using berberine and phenolic compounds to target fungal antioxidative stress response. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 134-141, 2007.
- KIRK, T.K.; FARREL, R.L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 41, p. 465-505, 1987.
- 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.
- KOLB, M. et al. Removal of monomer delignification products by laccase from *Trametes versicolor*. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 298–304, 2012.
- KONG, W. et al. Characterization of a novel manganese peroxidase from white-rot fungus *Echinodontium taxodii* 2538, and its use for the degradation of lignin-related compounds. **Process Biochemistry**, Bioenergies : Present & Prospects. v. 51, n. 11, p. 1776–1783, 2016.
- KUMAR, M. et al. Investigating the degradation process of kraft lignin by β -proteobacterium, *Pandoraea* sp. ISTKB. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 20, p. 15690–15702, 2015.
- LEONOWICZ, A. et al. Biodegradation of lignin by white-rot fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p. 175-185, 1999.
- LI et al. Biodegradation of Lignin via *Pseudocitrobacter anthropic* MP-A Isolated From the Gut of Wood-feeding Termite *Microtermes pakistanicus* (Isoptera: termitidae). **Bioresources**, v. 14, n. 1, p. 1992-2012, 2019.
- LI et al. Comparative study on the determination of assay for laccase of *Trametes* sp. **African Journal of Bacteriology Research**, v. 2, n. 8, p. 181-183, 2008.
- LIU, C.L.; LIU, M.C.; ZHU, P.L. Determination of Gastrodin, p-Hydroxybenzyl Alcohol, Vanillyl Alcohol, p-Hydroxybenzaldehyde and Vanillin in Tall Gastrodia Tuber by High-Performance Liquid Chromatography. **Chromatographia**, v. 55, p. 317-320, 2002.
- LISBOA, S.A. et al. Isolation and structural characterization of polysaccharides dissolved in *Eucalyptus globulus* kraft black liquors. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 1, p. 77–85, 2005.

LONGE, L. et al. Importance of Mediators for Lignin Degradation by Fungal Laccase. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, n. 8, p. 10097–10107, 2018.

LU, Y. et al. Structural Characterization of Lignin and Its Degradation Products with Spectroscopic Methods. **Journal of Spectroscopy**, v. 2017, p. 1–15, 2017.

LUTERBACHER, J. S.; MARTIN ALONSO, D.; DUMESIC, J. A. Targeted chemical upgrading of lignocellulosic biomass to platform molecules. **Green Chemistry**, v. 16, n. 12, p. 4816–4838, 2014.

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

MARTINEZ et al. Seleção de isolados de *Colletotrichum* da biodiversidade da Amazônia como produtores de lacases utilizando uma metodologia simplificada. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 2, p. 397-406, 2009.

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

MCMURRY, J. Determinação de estruturas: espectrometria de massa e espectrometria na região do infravermelho. In: MCMURRY, J. **Química Orgânica**. São Paulo: Cengage Learning, 2009.

MEDEIROS, M. B. et al. Optimization of some variables that affect the synthesis of laccase by *Pleurotus ostreatus*. **Bioprocess Engineering**, v. 21, n. 6, p. 483–487, 1999.

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.

MOISEENKO, K. V. et al. Laccase Isoenzymes of *Trametes hirsuta* LE-BIN072: Degradation of Industrial Dyes and Secretion under the Different Induction Conditions. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 54, n. 9, p. 834–841, 2018.

MONTGOMERY, D.C.; RUNGER, G.C. Planejamento de Experimentos com Vários Fatores. In: MONTGOMERY, D.C.; RUNGER, G.C. **Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros**, Rio de Janeiro: Anthares, 2016.

MOUGIN, C. et al. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. **Environmental Chemistry Letters**, v. 1, p. 145-148, 2003.

MYCROFT, Z. et al. Biocatalytic conversion of lignin to aromatic dicarboxylic acids in *Rhodococcus jostii* RHA1 by re-routing aromatic degradation pathways. **Green Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 4974–4979, 2015.

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.

- NAIK, M.M; TILVE, S.G.; KAMAT, V.P. Pyrrolidine and iodine catalyzed domino aldol-Michael-dehydrogenative synthesis of flavones. **Tetrahedron Letters**, v. 55, p. 3340-3343, 2014.
- 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.
- OU, S.; KWOK, K.-C. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 11, p. 1261–1269, 2004.
- 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.
- PFLIEGER, M., KROFLIČ, A. Acute toxicity of emerging atmospheric pollutants from wood lignin due to biomass burning. **Journal of Hazardous Materials**, v. 338, p. 132-139, 2017.
- QIN, H. et al. Magnetic core–shell-structured Fe₃O₄@CeO₂ as an efficient catalyst for catalytic wet peroxide oxidation of benzoic acid. **RSC Advances**, v. 8, n. 59, p. 33972–33979, 2018.
- RAGAUSKAS, A. et al. Lignin Valorization: Improving Lignin Processing in the Biorefinery. **Science**, v. 344, n.6185, p. 1246843, 2014.
- RANDO, D. G. et al. Potential tuberculostatic agents. Topliss application on benzoic acid [(5-Nitro-thiophen-2-yl)-methylene]-hydrazide series. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 557–560, 2002.
- REZENDE, M.I. et al. Growth and production of laccases by the ligninolytic fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina*, cultured on basal medium containing the herbicide, Scepter® (imazaquin). **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 460-469, 2005.
- ROMERO, J. et al. Binding and Catalytic Mechanisms of Veratryl Alcohol Oxidation by Lignin Peroxidase: A Theoretical and Experimental Study. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 17, p. 1066–1074, 2019.
- ROSADO, F. R.; SOUZA, A. F. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, v. 2, n. 1, p. 121-139, 2009.
- 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.

SAAD, B. et al. Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methyparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, p. 393-397, 2005.

SACCHETTO, J.P. et al. *Botryosphaeria* spp. as Producers of Laccase When Cultivated on Vegetable Oils as Sole Carbon Source: Optimizing Laccase Production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 on Soybean Oil. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 10, n. 7, p. 568-577, 2018.

SALDANHA, R.L. et al. Genetic diversity among *Botryosphaeria* isolates and their correlation with cell wall-lytic enzyme production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 259-264, 2007.

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. et al. 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.

SUGUIMOTO, H.H. et al. Veratryl alcohol stimulates fruiting body formation in the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 194, p. 235-238, 2001.

TAVARES, A. P. M. et al. Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 134, n. 3, p. 233–248, 2006.

TEN, E.; VERMERRIS, W. Recent developments in polymers derived from industrial lignin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 42069, p. 1-13, 2015.

THURSTON, C.F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, p. 19-26, 1994.

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

TIOSSI, R.F.J. et al. Validated Reverse Phase HPLC Analytical Method for Quantitation of Glycoalkaloids in *Solanum lycocarpum* and Its Extracts. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 966-977, 2012.

URBANIAK, A.; SZELAG, M. MOLSKI, M. Theoretical investigation of stereochemistry and solvent influence on antioxidant activity of ferulic acid. **Comput Theor Chem**, v. 1012, p. 33-40, 2013

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 26 jul. 2018.

VARES, T.; KALSI, M.; HATAKKA, A. Lignin Peroxidases, Manganese Peroxidases, and Other Ligninolytic Enzymes Produced by *Phlebia radiata* during Solid-State Fermentation of Wheat Straw. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3515–3520, 1995.

VINARDELL, M.P.; MITJANS, M. Lignins and Their Derivates with Beneficial Effects on Human Health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1219, 2017.

VISWANATH, B. et al. Screening and assessment of laccase producing fungi isolated from different environmental samples. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 1129-1133, 2008.

VELIOGLU, Z.; UREK, R.O. Concurrent Biosurfactant and Ligninolytic Enzyme Production by *Pleurotus* spp. In Solid-State Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p. 1354-1364, 2014.

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

WANG, J.; LIANG, J.; GAO, S. Biodegradation of Lignin Monomers Vanillic, p-Coumaric, and Syringic Acid by the Bacterial Strain, *Sphingobacterium* sp. HY-H. **Current Microbiology**, v. 75, n. 9, p. 1156–1164, 2018.

WANG, W. et al. Connecting lignin-degradation pathway with pre-treatment inhibitor sensitivity of *Cupriavidus necator*. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014.

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.

WEI, Q. et al. Synthesis and antimicrobial activities of novel sorbic and benzoic acid amide derivatives. **Food Chemistry**, v. 268, p. 220–232, 2018.

WEST, M.A. et al. Evaluating Lignins as Enzyme Substrates: Insights and Methodological Recommendations from a Study of Laccase-Catalyzed Lignin Polymerization. **BioResources**, v. 9, n. 2, p. 2782-2796, 2014.

XAVIER, C.R.; CHAMORRO, S.; VIDAL, G. Behavior of Aromatic Compounds Contained in Kraft Mill Effluents Treated by an Aerated Lagoon. **American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers**, 2005.

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.

YADAV, S.; CHANDRA, R. Syntrophic co-culture of *Bacillus subtilis* and *Klebsiella pneumonia* for degradation of kraft lignin discharged from rayon grade pulp industry. *Journal of Environmental Sciences*, v. 33, p. 229–238, 2015.

YANG, L. et al. Enhanced Lignin Degradation in Tobacco Stalk Composting with Inoculation of White-Rot Fungi *Trametes hirsuta* and *Pleurotus ostreatus*. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-11, 2019.

YUAN, X. et al. Biochemical Characteristics of Three Laccase Isoforms from the Basidiomycete *Pleurotus nebrodensis*. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 203, 2016.

ZAKZESKI, J. et al. The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals. *Chemical Reviews*, v. 110, n. 6, 2010.

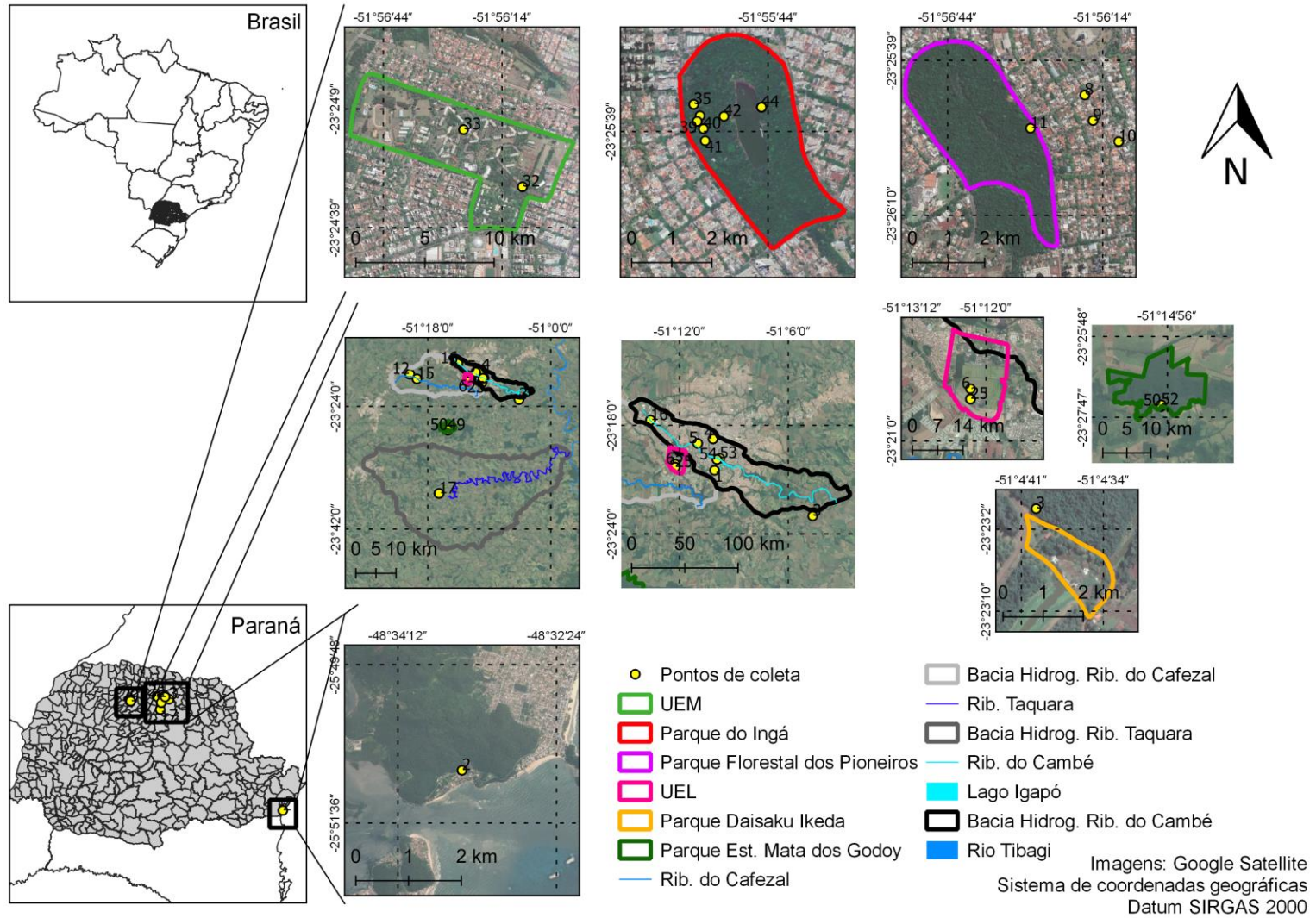
ZENG, Y. et al. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 38–45, 2014.

ZHAO, J. et al. A colorimetric assay for vanillin detection by determination of the luminescence of o-toluidine condensates. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, 11p., 2018.

ZHU, D. et al. Biodegradation of alkaline lignin by *Bacillus ligniniphilus* L1. *Biotechnology for Biofuels*, v. 10, n. 1, 2017.

ZNAMEROSKI, E.A. et al. 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: Mapa de localização dos pontos de coleta dos isolados fúngicos



Cortesia da Eng. Bruna Henrique Sacramento