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

PAULA CONSOLI IRENO FRANCO

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE PELO *Pleurotus ostreatus* NA PRESENÇA DE LIGNINA E ANÁLISE DE METABÓLITOS POR CLAE

Dissertação

LONDRINA
2019

PAULA CONSOLI IRENO FRANCO

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE PELO *Pleurotus ostreatus* NA PRESENÇA DE LIGNINA E ANÁLISE DE METABÓLITOS 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: Profa. Dra. Juliana Feijó de Souza Daniel
Co-orientador: Prof. Dr. Robert Frans Huibert Dekker

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

F825o Franco, Paula Consoli Ireno
Otimização da produção de lacase pelo *Pleurotus ostreatus* na presença de lignina e análise de metabólitos por CLAE / Paula Consoli Ireno Franco. - Londrina : [s.n.], 2019.
94 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profª Drª Juliana Feijó de Souza Daniel
Coorientador: Prof. Dr. Robert Frans Huibert Dekker
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Londrina, 2019.
Bibliografia: f. 82-94.

1. Lacase. 2. Fungos. 3. Pleurotus ostreatus. 4. Lignina. 5. Biodegradação. 6. Compostos aromáticos. I. Daniel, Juliana Feijó de Souza, orient. II. Dekker, Robert Frans Huibert, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. V. Título.

CDD: 628

Ficha catalográfica elaborada por Cristina Benedeti Guilhem - CRB: 9/911

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

TERMO DE APROVAÇÃO

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE PELO *Pleurotus ostreatus* NA PRESENÇA DE LIGNINA E ANÁLISE DE METABÓLITOS POR CLAE.

Por

PAULA CONSOLI IRENO FRANCO

Dissertação de Mestrado apresentada no dia 17 de outubro de 2019, 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. A mestranda foi arguida 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 – Orientadora
(UTFPR – Câmpus Londrina)

_____

Prof[a]. Dr[a]. Aneli de Melo Barbosa Dekker – Membro titular
(Universidade Estadual de Londrina)

_____

Prof[a]. Dr[a]. Julliana Izabelle Simionato – Membro titular
(UTFPR – Câmpus Londrina)

_____

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

"A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso". Portaria n° 0345, de 15 de março de 2017.

Dedico este trabalho a minha mãe, Ivana, por todo o companheirismo, amor e suporte ao longo da caminhada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pelo dom da vida.

Agradeço aos meus pais, Ivana e Aloisio, que não mediram esforços para que eu pudesse alcançar mais essa etapa de minha vida. Sem o apoio de vocês nada seria possível.

Aos meus avós, Ivoni e Uracy, por cada abraço, conselho e incentivo quando tudo parecia que não estava dando certo.

Ao meu noivo, Matheus, por todo o companheirismo, compreensão, apoio e amor nessa jornada árdua.

A Luiza Helena e ao José Carlos, por tudo que fizeram por mim ao longo dessa etapa. Vocês foram sensacionais.

A minha orientadora, Professora Dra. Juliana Feijó de Souza Daniel, por todo o tempo dedicado a este projeto e também agradeço seus ensinamentos, tanto profissional quanto pessoal.

Ao professor Robert Dekker, pela coorientação e conversas.

A professora Dra. Aneli de Melo Barbosa Dekker, por me acolher em seu laboratório e transmitir o seu conhecimento a mim. Também por ter me direcionado nas etapas do trabalho.

A professora Dra. Julliana Simionato, por todo conhecimento transmitido a mim e por todos os “puxões de orelha” na minha vida pessoal.

Ao professor Dionísio Borsato, pela colaboração.

Ao Dr. Mário Seki e Dra. Matiko Seki por todo suporte que me deram ao longo dessa caminhada, pela “carona” de Assis-Londrina/Londrina-Assis. Sem a ajuda de vocês eu não conseguiria ter chego ate aqui.

A minha psicóloga Flávia Souza, por toda conversa e incentivo recebido.

Ao Nelson, técnico do laboratório de bioquímica da UEL, por toda ajuda.

A minha amiga, Flávia Arruda, por todo o tempo que passamos juntas e por sempre me dar uma palavra amiga quando tudo estava “escuro”.

A Jeseka, Tatiane e Natalia por toda a ajuda no começo desse trabalho e pela amizade que construímos.

Aos membros do Grupo QUIMIBIO, Karoline, Beatriz, Gabriela, Igor, Antônio, por todo companheirismo. E também ao ex-membro, Renato Dorte, que foi de extrema importância para mim no início do trabalho.

Ao técnico de laboratório, Carlos, que foi um anjo em minha vida durante a realização das analise, eu desejo o meu muito obrigada, sem a sua colaboração nada seria possível.

A todos que de alguma forma torceram por mim durante essa etapa de minha vida.

“É exatamente disso que a vida é feita: de momentos! Momentos os quais temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso próprio aprendizado, por algum motivo. Nunca se esquecendo do mais importante: nada na vida é por acaso..”. (XAVIER, CHICO)

RESUMO

FRANCO, Paula Consoli Ireno. **Otimização da produção de lacase pelo *Pleurotus ostreatus* na presença de lignina e análise de metabólitos por CLAE.** 2019. 95 folhas. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2019.

O desenvolvimento de novos processos biotecnológicos se faz necessário para agregar valor à lignina, que é um biopolímero natural e renovável, presente na parede celular das plantas, e constituído por resíduos de compostos aromáticos e fenólicos. Fungos decompositores de madeira, tanto basidiomicetos como ascomicetos são produtores de enzimas ligninolíticas, que catalisam a degradação da lignina através de despolimerização oxidativa. A biodegradação da lignina em seus compostos constituintes agrega valor a ela, porque diferentes produtos são úteis para várias indústrias. Neste trabalho os fungos *Botryosphaeria. ribis, Ganoderma* lucidum e uma cepa de *Pleurotus ostreatus* Florida foram avaliados como produtores de lacase, visando selecionar o melhor produtor desta polifenol oxidase, a qual é uma enzima ligninolítica, que colabora na biodegradação da lignina. O *P. ostreatus* produziu os maiores títulos de lacase, e foi selecionado para otimizar a produção desta enzima por um planejamento estatístico fatorial 3^3, avaliando-se as variáveis: concentração de lignina (0 a 0,25 % m/v); concentração de extrato de levedura (0 a 4 % m/v) e tempo de cultivo (4 a 10 dias). A lignina foi a principal variável que estimulou a produção de lacase, quando a atividade foi determinada com 2,6-dimetoxifenol (DMP) como substrato. O ótimo da produção de lacase (5,73 U/mL) foi obtido utilizando-se 0,87 g% m/v de lignina e 4,5 g% m/v de extrato de levedura, em 10 dias de cultivo. O extrato livre de células (ELC), obtido após o cultivo do fungo, nas condições otimizadas foi tratado por partição líquido-líquido com acetato de etila, para a determinação dos produtos de degradação da lignina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O procedimento de extração líquido-líquido foi validado usando padrões analíticos. Os produtos de degradação da lignina foram analisados por CLAE e mostrou picos desconhecidos. As analises nos comprimentos de onda na faixa do UV (220, 272 e 309 nm) avaliados, mostraram a presença de vários picos e as amostras estão sendo identificadas.

Palavras-chave: Lignina; Fungos ligninolíticos, Compostos aromáticos.

ABSTRACT

FRANCO, Paula Consoli Ireno. **Optimization of lacase production by *Pleurotus ostreatus* in the presente of liginin and analysis of metabolites by HPLC.** 2019. 95 folhas. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental) – Federal Technology University of Paraná. Londrina, 2019.

The development of new biotechnological processes is necessary in order to add value to lignin, which is a natural and rewewable biopolymer found in the plant cell wall, and is constituted by aromatic and phenolic residues. The wood-decaying basidiomyceteous and ascomyceteous fungi are producers of ligninolytic enzymes that catalyze lignin degradation through oxidative depolymerization. The biodegradation of lignin into its constituent compounds add value to it, because different products are obtained, which are useful in different industries. In this work the fungi *Botryosphaeria. ribis, Ganoderma lucidum* and a strain of *Pleurotus ostreatus* Florida were evaluated as laccase producers, in order to select the best producer of this polyphenol oxidase, which is a ligninolytic enzyme, that collaborates in lignin biodegradation. *P. ostreatus* produced highest laccase titers, and was selected for enzyme optimization by a 3^3 factorial statistical design to evaluate the variables: lignin concentration (0 to 0.25 % w/v), yeast extract concentration (0 a 4 % w/v) and time of cultivation (4 to 10 days) on laccase production. Lignin was the main variable which increased laccase production measure against 2,6-Dimethoxyphenol (DMP) as substrate to determine enzyme activity. Optimal laccase production (5.73 U/mL) was obtained using lignin 0.87 g% w/v, yeast extract 4,5 g% w/v and 10 days of cultivation. The extracellular fluid (ECF) obtained under the optimized culture condition was treated by partition liquid-liquid with ethyl acetate in order to determine the lignin degradation products by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The liquid-liquid extraction procedures were validated using analytical standards. Lignin degradation products were analyzed by HPLC, and indicated unknown peaks. The analysis using UV wavelength (220, 272, and 309 nm) showed the presence of several peaks, and the samples are being identified.

Keywords: Lignin; Ligninolytic fungi, Aromatic compounds

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formação da celulose pela condensação da glicose 20
Figura 2 –Fios de celulose envolvidos por hemicelulose e lignina..... 21
Figura 3 –Demonstração da organização dos principais constituintes da parede celular vegetal 22
Figura 4- Estruturas do álcool ρ-cumarílico (I); álcool coniferílico (II) e álcool sinapílico (III), precursores da lignina 23
Figura 5 – Principais ligações presentes na estrutura da lignina.....24
Figura 6 – Ligações mais comuns entre as unidades de fenilpropano e suas proporções na estrutura da lignina 25
Figura 7 – Mecanismo proposto para oxidação de substrato.....33
Figura 8 – Estrutura de coordenação da molécula de lacase.....34
Figura 9 – Fluxograma geral das etapas desenvolvidas no trabalho.....44
Figura 10 – Determinação do diâmetro da colonia fungica nos experimentos da avaliação do crescimento dos fungos em meio sólido 46
Figura 11 –Comparação do crescimento da colônia fúngica dos fungos (A) *B.ribis*, (B) *G. lucidum* e (C) P. ostreatus.....58
Figura 12 – Comparação do micélio em meio de cultivo contendo (A) glucose e (B) ausência de glucose, para os fungos (a) *B.ribis,* (b) *G lucidum* e (c) *P. ostreatus..* 59
Figura 13 – Formação do halo de coloração vermelho escuro pelo fungo *P. ostreatus* (A) na ausência de glucose; (B) na presença de glucose 61
Figura 14 – Gráfico de Paretos para o substrato ABTS com as três váriavies estudadas e ilustrando o nivel de significância para cada uma 65
Figura 15 – Gráfico de Paretos referente aos resultados da produção de lacase determinada pelo substrato DMP com as três váriavies estudadas e ilustrando o nivel de significância para cada uma 65
Figura 16 – Gráfico de Paretos para DMP com as duas váriavies estudadas e ilustrando o nivel de significância para cada uma 67
Figura 17 – Gráfico de superficie de resposta com duas váriaveis, sendo lignina e extrato de levedura 68
Figura 18 – Melhor concentração dos componentes do meio de cultivo para a produção ótima de lacase 68
Figura 19 – Cromatograma com o mix de padrões dos possíveis metabólitos da biotransformação da lignina: Álcool Vanilítico, Ácido Siríngico, Ácido *p*-coumárico, Ácido Ferúlico A e B, Ácido 2,6 dimetoxibenzóico, Ácido Benzóico e Veratraldeído. 70

Figura 20 – Cromatograma da amostra real (fungo na presença de lignina), indicando o pico do álcool vanílico 75
Figura 21 – Cromatograma do branco (A) e da amostra real (B) sobrepostos, indicando o pico do álcool vanílico presente em ambos cultuvos 76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Alguns metabólitos da Lignina, estruturas moleculares e aplicações..... 38

Quadro 2 - Metodologias de análise da lignina e seus metabólitos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência..... 41

Quadro 3 - Temperatura necessária para cada fungo produzir a enzima para converter um substrato em produto..... 49

Quadro 4 – Condições no planejamento fatorial para quantificação da atividade de lacase pelo substrato ABTS e DMP..... 51

Quadro 5 – Condições no planejamento fatorial para quantificação da atividade de lacase pelo substrato DMP..... 52

Quadro 6 – Método gradiente desenvolvido para análise dos metabólitos provenientes da biodegradação da lignina..... 55

Quadro 7 Tempo de retenção e área para cada padrão na condição estudada 69

Quadro 8 – Ensaio de recuperação em três concentrações (0,05; 0,10; 0,15 mg/mL) de mix de padrões analíticos nas amostra real sem ácido (A) e com Àcido (B)..... 72

Quadro 9 – Tempo de retenção e área (mAu/min) dos possíveis metabólitos de biodegradação da lignina formados pela ação do fungo, nos comprimentos de onda 220, 272 e 309 nm..... 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de alguns fungos produtores de enzimas capazes de degradar a lignina..... 25

Tabela 2 - Quantidade de reagente para atividade enzimática com substrato ABTS (50mm)..... 49

Tabela 3 - Quantidade de reagente para atividade enzimática com substrato DMP (10mm)..... 49

Tabela 4 – Comparação da taxa de inibição dos fungos *B. ribis; G. lucidum* e *P.ostretus* no meio de cultivo com presença de glucose e ausência de glucose..... 60

Tabela 5 – Atividade enzimática da enzima lacase (A) constitutiva e (B) indutiva dos fungos *B. ribis*, *G. lucidum*, *P. ostreatus*..... 62

Tabela 6 - Condições e resultados obtidos no planejamento fatorial para quantificação da atividade de lacase pelo substrato ABTS e DMP..... 64

Tabela 7 - Condições e resultados obtidos no planejamento fatorial para quantificação da atividade de lacase pelo substrato DMP..... 66

Tabela 8 – Resultado da curva de calibração para os padrões estudados, coeficiente de correlação e equação da reta, individual..... 71

Tabela 9 – Análise da lignina; quantidade de pico, tempo de retenção (min) e área (mAu/min) de cada, nos 3 comprimentos de onda (220, 272 e 309)..... 73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 18

2 REFERENCIAL TEÓRICO..... 20

2.1 COMPONENTES DA MADEIRA..... 20

2.1.1 Celulose e Hemicelulose..... 20

2.1.2 Lignina 21

2.2 FUNGOS LIGNINOLITICOS..... 27

2.2.1 *Botryosphaeria ribis*..... 28

2.2.2 *Ganoderma lucidum*..... 30

2.2.3 *Pleurotus spp*:..... 30

2.3 ENZIMAS LIGNOLITICAS..... 32

2.3.1 Lacase 32

2.3.2 Produção de lacase..... 35

2.4 BIODEGRADAÇÃO DA LIGNINA..... 37

2.4.1 A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) na identificação de metabólitos da lignina..... 40

2.5 PLANEJAMENTO FATORIAL: FUNDAMENTOS E CONCEITOS BÁSICOS..... 41

3 **OBJETIVO..... 43**

3.1 OBJETIVO GERAL..... 43

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO..... 43

4 METODOLOGIA..... 44

4.1 MATERIAIS E REAGENTES..... 45

4.2 OBTENÇÃO DOS FUNGOS..... 45

4.3 CULTIVO EM MEIO SOLIDO..... 45

4.3.1 Cresimento fúngico em meio sólido contendo lignina na ausência de glucose..... 45

4.3.2 Cresimento fúngico em meio sólido contendo lignina na presença de glucose..... 45

4.4 COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO DOS TRÊS FUNGOS EM MEIO SÓLIDO 46
4.4.1 Avaliação do crescimento dos fungos..... 46
4.4.2 Taxa de inibição 46
4.4.3 Modificações de coloração do meio de cultivo sólido contendo lignina..... 47
4.5 CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO PARA A PRODUÇÃO DA ENZIMA LACASE..... 47
4.5.1 Comparação da lacase constitutiva pelos fungos *B.ribis, G. lucidum* e *P. ostreatus*..... 47
4.5.2 Comparação da produção de lacase na presença de lignina 48
4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LACASE..... 48
4.7 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE UTILIZANDO-SE PLANEJAMENTO FATORIAL 50
4.8 VALIDAÇÃO DO RESULTADO OBTIDO PELO PLANEJAMENTO FATORIAL 52
4.9 EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DA LIGNINA..... 53
4.9.1 Preparo dos padrões analíticos 53
4.9.2 Extração partição líquido-liquído..... 53
4.9.3 Validação da extração..... 54
4.10 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DOS METABOLITOS PROVENIENTES DA BIODEGRADAÇÃO DA LIGNINA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA 54
4.10.1 Curva de Calibração..... 56

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 57

5.1 ANÁLISE DO CRESCIMENTO MICELIAL 57

5.2 ANÁLISE DA TAXA DE INIBIÇÃO..... 59

5.3 ANÁLISE DAS MODIFICAÇÕES NO MEIO SÓLIDO..... 61

5.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE INDUTIVA E CONSTITUTIVA..... 62

5.5 AVALIAÇÃO DA LIGNINA COMO AGENTE INDUTOR DE LACASE PARA O *Pleurotus ostreatus* NA PRESENÇA DE LIGNINA..... 63

5.6 VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS..... 69

5.7 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CLAE..... 69

5.8 CURVA DE CALIBRAÇÃO..... 70

5.9 ENSAIO DE RECUPERAÇÃO..... 71

5.10 ANÁLISE DA LIGNINA..... 73

5.11 ANÁLISE DOS POSSIVEIS METABÓLITOS..... 74

6.CONSLUSÃO..... 81

REFERENCIAS..... 82

1. INTRODUÇÃO

Por muito tempo a madeira foi uma fonte de exploração em diversos setores industriais, como na construção civil e também na obtenção de energia. Dentre os processos industriais está a separação da celulose e da hemicelulose na produção de papel, que gera grande quantidade de resíduos, como por exemplo, a lignina, que é um dos constituintes básicos da madeira (MUÑIZ; KLOCK et al., 2005).

A lignina é o principal componente da parede celular de plantas lenhosas e sendo o segundo biopolímero mais abundante no planeta Terra, ficando atrás somente da celulose. Apesar disso, a lignina possui um potencial não explorado como fonte vegetal renovável (ABDELAZIZ et al., 2016).

A quantidade de lignina gerada pelas indústrias papeleiras gira em torno de 70 milhões de toneladas por ano (LU et al., 2017). Este valor tende a aumentar com o aumento de biorrefinarias, pois pretendem substituir matérias-primas fósseis pela biomassa lignocelulósica, apresentando uma forma alternativa de produzir produtos químicos por via biológica (CHRISTOPHER; YAO E JI, 2014). Apenas 2% de lignina estão disponíveis no mercado (vendidas como agentes de dispersão ou de ligação), pois a maior parte da lignina é utilizada nas indústrias para fornecimento de vapor e calor, gerando bioenergia de baixo custo através de sua queima (BROZONOVA et al, 2017; LU et al., 2017).

Para melhorar este cenário, a recuperação da lignina pode ocorrer por diversos processos, sendo o processo comercial mais utilizado o Kraft, aplicado em indústrias polpa e papel, correspondendo cerca de 85% da lignina recuperada no mundo (SANTOS, RODRIGUES, MENDONÇA, 2018).

Devido ao avanço dos processos biológicos, a biotransformação ou a fragmentação da lignina, significa remetê-la as reações bioquímicas realizadas por agentes biológicos e enzimas capazes de converter um determinado substrato em um ou mais produtos, gerando monômeros, dímeros ou trímeros de compostos fenólicos (CHRISTOPHER; YAO E JI, 2014).

Os metabólitos produzidos através da biotransformação da lignina possuem diversas aplicações industriais, como por exemplo, o ácido benzóico que é uma

substância comumente usada na indústria alimentícia e apresenta um potencial de uso como agente antimicrobiano, além de vários outros compostos, tradicionalmente obtidos de fontes não renováveis (QIN et al., 2018; WEI et al., 2018).

Há uma grande oportunidade, que visa a conversão biológica da lignina, pois é uma técnica de baixo custo e pode garantir uma finalidade para a lignina, diminuindo a dependência dos recursos fósseis.

Os fungos são os principais agentes na biotransformação da matéria orgânica, onde os basidiomicetos são conhecidos como agentes capazes de degradar a madeira. Entre eles destacam-se os fungos que causam podridão marrom (que degradam os polissacarídeos da madeira após uma modificação parcial da lignina) e os que promovem a podridão branca (que desenvolvem mecanismos não específicos, através de enzimas extracelulares, para promover a modificação da lignina) (MENEZES, BARRETO, 2015).

A biovalorização da lignina utilizando enzimas que promovem a degradação biológica é uma área que vem sendo bastante estudada. As lacases, enzimas produzidas por fungos que causam podridão branca, estão envolvidas na degradação da lignina oxidando estruturas fenólicas e catalisando a geração de radicais altamente reativos (ALCALDE, BULTER e ARNOLD, 2002).

Se faz necessário pesquisas que desenvolvam novas tecnologias para recuperar e agregar valor à lignina, pois a sua utilização em diversos setores como um biopolimero de baixo custo, renovável, pode ser economicamente viável (CHRISTOPHER; YAO E JI et. al., 2014).

Portanto, neste trabalho foram avaliados e comparados três diferentes fungos como produtores de lacase, para avaliar se a lignina pode atuar como indutora desta enzima, visando futuramente utilizá-lo para biodegradar a lignina em compostos aromáticos, para possível utilização nos setores das indústrias alimentícias, cosméticas, dentre outras.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 COMPONENTES DA MADEIRA

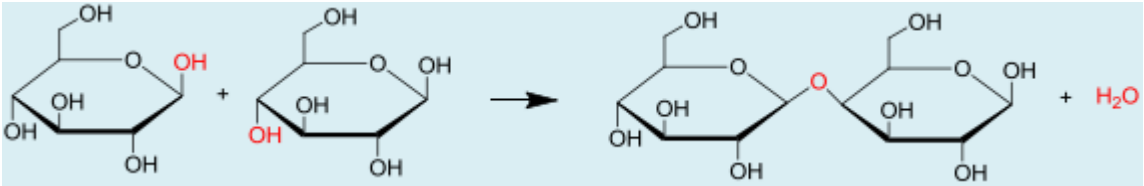
A madeira apresenta uma gama de componentes químicos que podem ser agrupados em proteínas, carboidratos, terpenos e terpenóides, ácidos alifáticos, substâncias fenólicas, aldeídos, alcoóis, alcalóides, hidrocarbonetos, entre outros (RAVEN, 2001; NULTSCH, 2005). No entanto, a parcela significativa da composição da madeira é representada por componentes estruturais como a celulose, hemicelulose e lignina, representando cerca de 90% de seu peso. (MENEZES, BARRETO, 2015).

2.1.1 Celulose e hemicelulose

Nos constituintes da madeira, a celulose se destaca por representar cerca de 40% a 50% do seu peso seco. Dentre as paredes celulares dos vegetais, a celulose é o polissacarídeo mais abundante, sendo constituída por uma cadeia linear de β-glicose ligados por ligações glicosídicas *β*(1-4). A formação da celulose ocorre através de reações sucessivas de condensação que envolve grupos OH do carbono 1 de uma β-D-glicose com o carbono 4 de outra β-D-glicose, levando à formação de um grupo éter e à saída de uma molécula de água, conforme a figura 1.

Das substâncias naturais produzidas pelos microrganismos, esta se encontra em maior quantidade, sendo uma das mais importantes, porém a sua quantidade varia de acordo com a espécie do vegetal (BENOCCI, AGUILAR-PONTES, ZHOU, 2017).

Figura 1 – Formação da celulose pela condensação da glicose



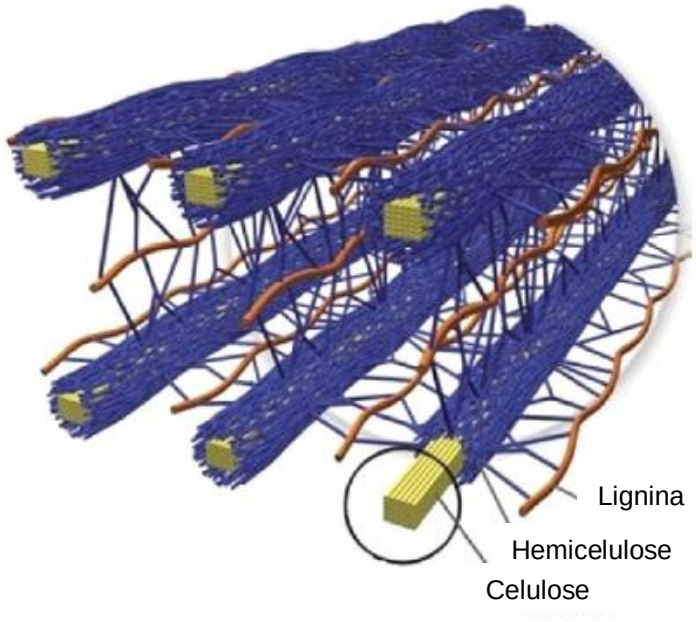
Teixeira, M. B. D. et al (2017)

A celulose tem arranjo compactado nas paredes dos vegetais, sendo que suas fibras se apresentam de forma cristalina, ou seja, mais resistentes à degradação; e uma parte amorfa suscetível ao processo de degradação KUMAR; GAUTAM; DUTT, 2016; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; AGBOR et al., 2011).

A hemicelulose representa de 20 a 35% do peso seco da madeira, é uma mistura de heteropolímeros ramificados constituídos por diferentes pentoses (D-xilose e L-arabinose) e hexoses (D-manose, D-galactose, D-glucose), sendo a xilose o monossacarídeo mais abundante (LU et al., 2017). Este é constituído por açúcares, como xilose e glucose. Existem diferentes tipos de hemiceluloses como, por exemplo, as xilanas, mananasm arabinanas e galactanas. As xilanas predominam entre as hemiceluloses e constitui o segundo polissacarídeo renovável mais abundante na natureza, ficando atrás somente da celulose (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

Apresenta-se como materiais sólidos brancos, de natureza cristalina e com baixo grau de polimerização, devido a essas características citadas a hemicelulose absorve água com facilidade (Teixeira, M. B. D. et al, 2017). Nos vegetais, encontra-se na parede celular (NULTSCH, 2005) de forma fibrosa, onde está associada ás fibras de celulose, conforme figura 2.

Figura 2 – Fios de celulose envolvidos por hemicelulose e lignina

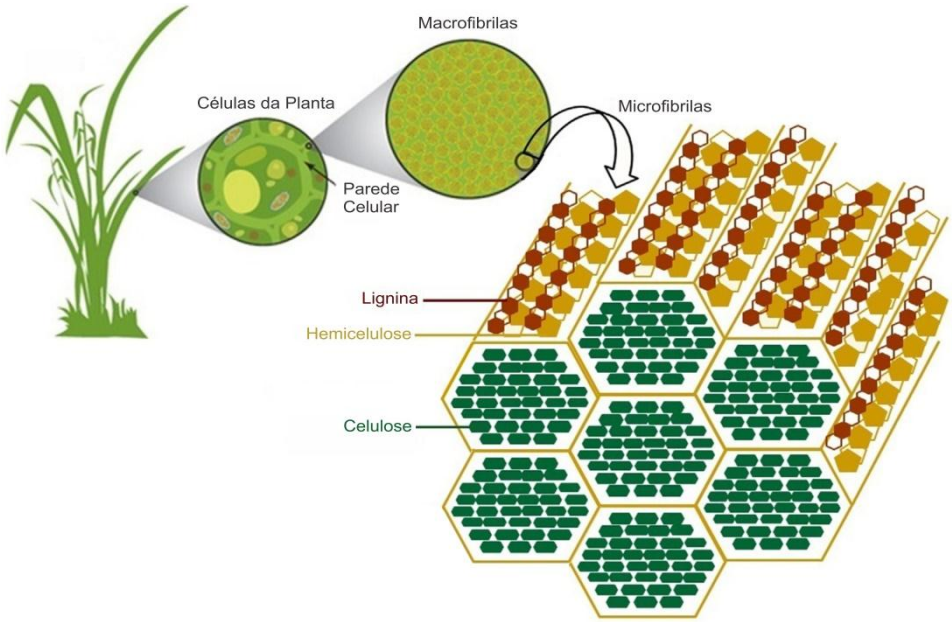


Doherty, Mousavioun, Fellows (2011)

2.1.2 Lignina

A lignina é um dos principais constituintes da biomassa vegetal, juntamente com a celulose e hemicelulose, sendo a maior fonte renovável de compostos fenólicos (DEVAPPA; RAKSHIT; DEKKER, 2015). Existe diferença entre a lignina de forma nativa e a lignina de forma isolada, pois a ultima pode ter sua estrutura e grupos funcionais modificados após o processo de extração e técnica de isolamento (HAO REN et al., 2013). A figura 3 demonstra a lignina nativa nas paredes celulares das plantas.

Figura 3 – Demonstração da organização dos principais constituintes da parede celular vegetal



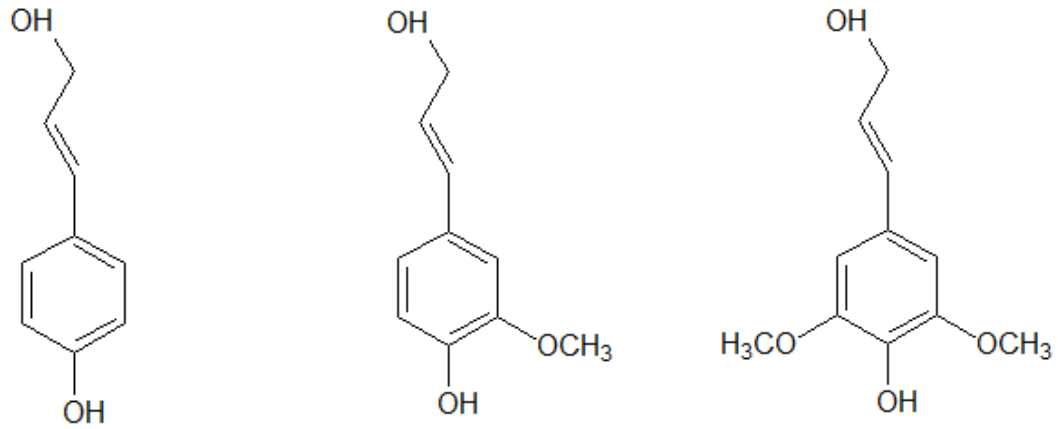
KHATTAB; WATANABE (2019)

É um biopolímero natural, heteropolimero amorfo, o segundo maior componente celular da madeira e o mais abundante na terra, depois da celulose (ABDELAZIZ et al., 2016). Encontra-se na parede celular dos vegetais, conferindo rigidez (MENEZES; BARRETO, 2015). É uma macromolécula sintetizada por via radicalar, sua composição química é composta por porções aromáticas e alifáticas, tornando-se uma fonte útil de obtenção de produtos químicos de valor aromático agregado, sendo uma alternativa às fontes petroquímicas (UZAN et al., 2009).

A composição da lignina dependerá fortemente das espécies vegetais, visto que esta composição é basicamente formada por unidades de fenilpropano (figura

4), sendo o álcool *ρ*-cumarílico; álcool coniferílico e álcool sinapílico, dando origem a uma macromolécula tridimensional e amorfa, que representa cerca de 20 a 30% do total dos compostos lignocelulósicos.

Figura 4 - Estruturas do álcool ρ-cumarílico (I); álcool coniferílico (II) e álcool sinapílico (III), precursores da lignina.

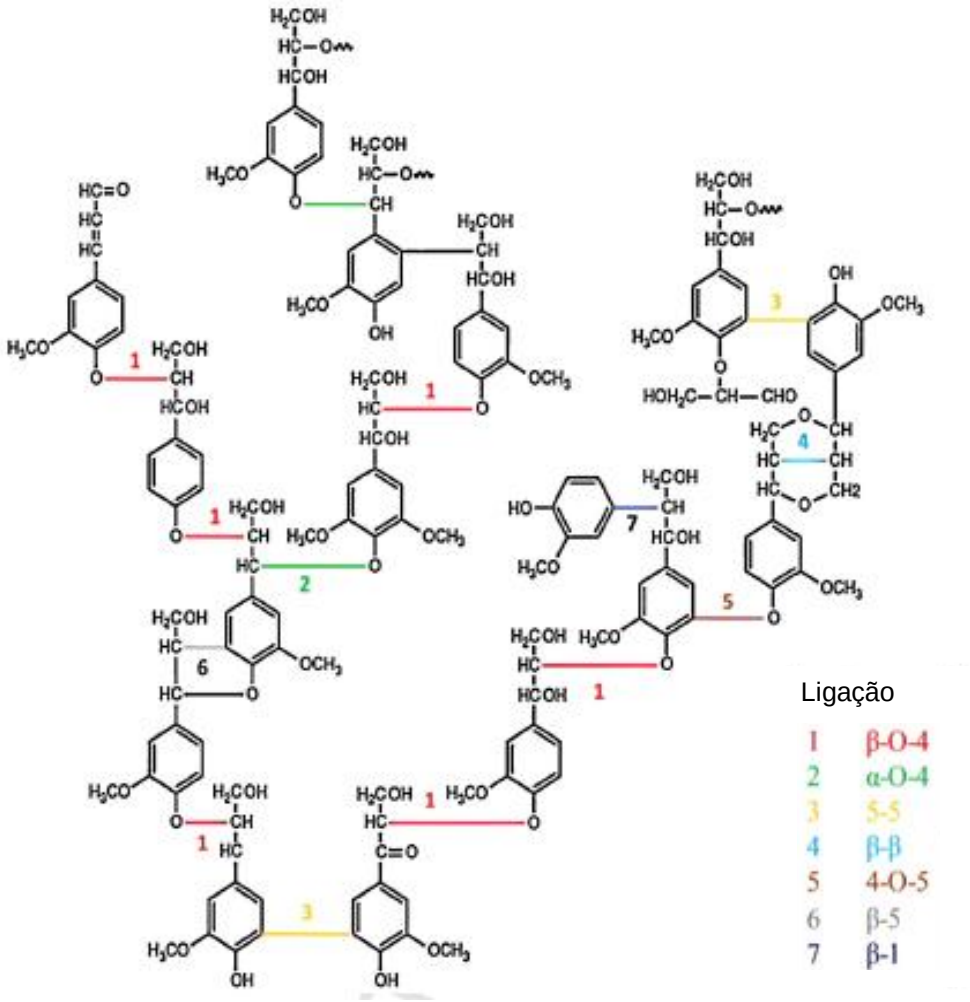


I) Álcool *ρ*-cumarílico II) Álcool coniferílico III) Álcool sinapílico

BRUIJNINCX et al. 2016 – adaptado pelo autor

Há diferentes ligações do tipo carbono-carbono e carbono-oxigênio (figura 5), uma vez que esta última é a predominante entre as unidades de fenilpropano. Devido apresentar abundantes grupos funcionais disponíveis, a lignina torna-se mais suscetível á modificações químicas (THAKUR; THAKUR, 2014). Portanto, a lignina possui diversos tipos de substruturas que se repetem de forma aleatória, e as ligações C-C e C-O-C são predominante. (DOHERTY; MOUSAVIOUN; FELLOWS, 2011).

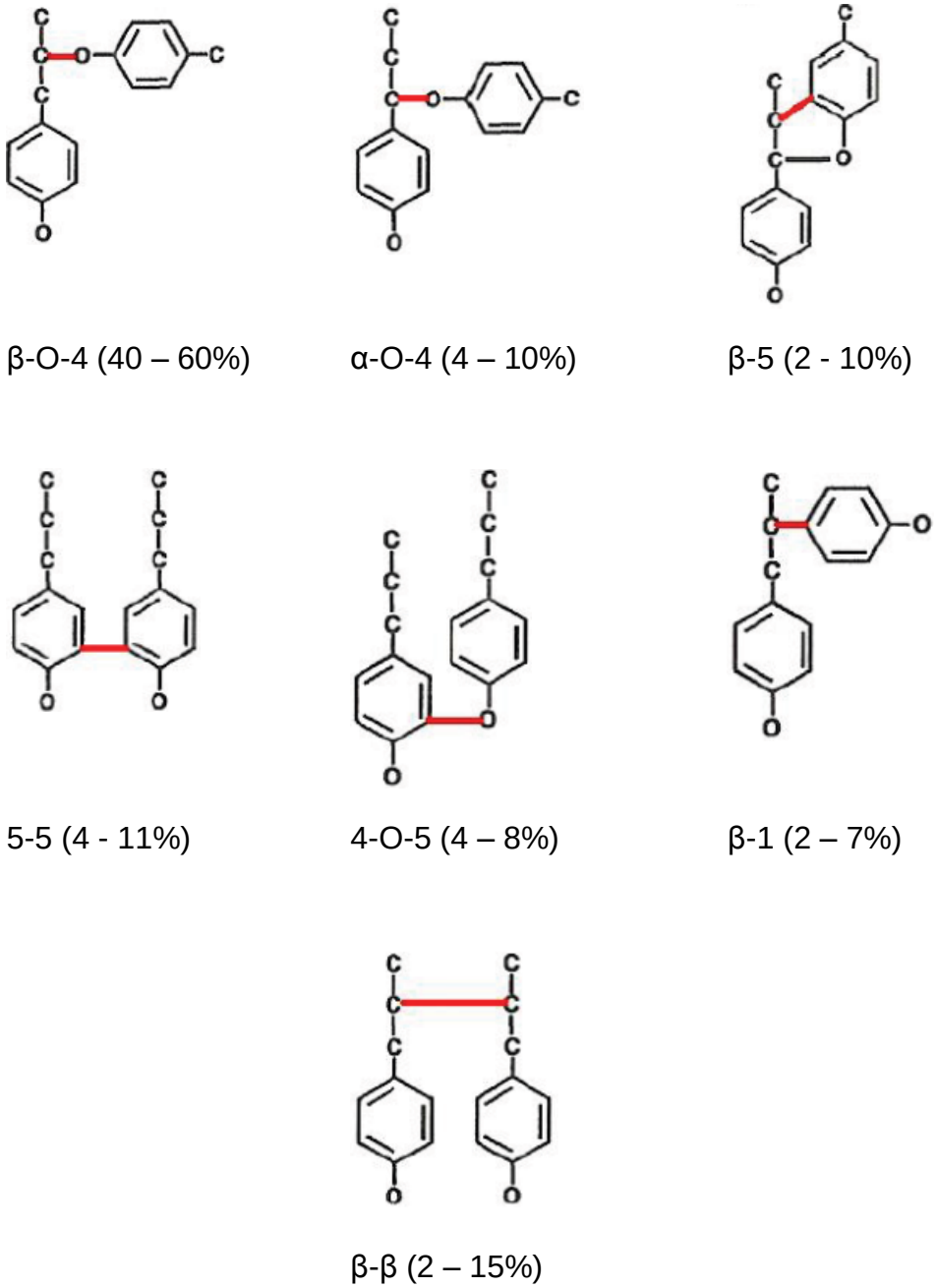
Figura 5 – Principais ligações presentes na estrutura da lignina



THAKUR; THAKUR (2014)

Apresentando uma estrutura química tridimensional bastante irregular, a lignina apresenta uma série de substruturas, entre quais a mais abundante (β-O-4) ocorre entre as unidades de fenilpropano (figura 6) (LU et al., 2017; SJOSTROM, 1981). Este tipo de ligação predominante possui grande disponibilidade às modificações e clivagens. (CONSTANT et al., 2016).

Figura 6 - Ligações mais comuns entre as unidades de fenilpropano e suas proporções na estrutura da lignina.



Sjostrom (1981) - adaptado pelo autor

As madeiras angiospermas (*hardwood*) e gimnospermas (*softwood*) apresentam concentrações diferentes de lignina, uma vez que, cada uma delas, apresenta uma porção variável dos seus principais constituintes. A *hardwood* apresenta na sua composição principalmente o álcool coniferílico e álcool sinapílico, enquanto que a *softwood* apresenta o coniferílico (BRUIJNINCX et al. 2016).

A reatividade da lignina depende da forma e da composição dos grupos funcionais dentro das unidades monoméricas, os três tipos de grupos funcionais reativos de destaque são: *p*-hidroxifenil, ácido carboxílico e hidroxila alifática (XU, FERDOSIAN, 2017). As unidades de fenilpropano são altamente metoxiladas (presença de grupos $CH3O^{-}$) sendo que na lignina kraft mais de 50% das hidroxilas aromáticas potencialmente reativas, podem estar metoxiladas (HU et al., 2011). O nível de metoxilação pode variar conforme o tipo de madeira. Para a utilização da lignina é necessário que ocorra um processo de extração, onde dois desses processos de extrair a lignina utilizada na indústria são o processo de polpação Kraft e o processo de polpação sulfonada (CHRISTOPHER; YAO; JI, 2014).

O processo químico de polpação Kraft resulta como subproduto a lignina Kraft. Atualmente esse processo vem sendo aplicado em cerca de 90% das indústrias papeleiras devido apresentar uma alta qualidade do produto final. A lignina Kraft é resultante do licor negro dissolvido na presença de Na_2SO_4. (SCHUTYSER et al., 2018).

A lignina sulfonada são polieletrólitos aniônicos solúveis em água. No processo de polpação sulfonada, uma solução aquosa contendo dióxido de enxofre e um agente sulforoso é usado para quebrar as ligações dos polissacarídeos. Esse processo pode ocorrer tanto em meios alcalinos, quanto em pH neutro ou em condições ácida regulada pelo sal bisulfito (XU, FERDOSIAN, 2017). Independente do pH do meio as posições α-reativas são sulfonadas, levando a grupos benzil sulfonato (ARO; FATEHI, 2017). Esses grupos são os responsáveis por aumentar a solubilidade. O lignossulfonato resultante pode ser isolado e é geralmente obtida como um sal (Na^{+}, NH_3^{+}, Mg_2^{+}, Ca_2^{+}).Os lignosulfonatos têm um maior teor de enxofre (4-8%) em comparação com a lignina Kraft (SCHUTYSER et al., 2018; ARO; FATEHI, 2017, MAGINA; MARQUES; EVTUGUIN, 2015)

A lignina pode sofrer quebras oxidativas (também chamada de despolimerização oxidativa) de suas ligações através da ação de fungos que são produtores de enzimas oxidorredutases. Embora existam diferentes microrganismos que produzem enzimas degradadoras de lignina, os fungos da podridão branca recebem um maior destaque na produção dessas enzimas. O sistema enzimático ligninolítico é constituído por três classes principais: lacases, manganês peroxidases (MnP) e lignina peroxidase (LiP) (SUKUMARAN; ABRAHAM; MATHEW, 2017).

2.2 FUNGOS LIGNINOLÍTICOS

A maioria dos fungos ligninolíticos pertence à classe dos ascomicetos e dos basidiomicetos. O primeiro grupo caracteriza-se pela formação do ascósporo (esporo) no interior de segmentos especializados das hifas, denominado asco, o segundo grupo é caracterizado por fungos filamentosos capazes de produzir esporos e apresentam micélios constituídos por hifas, ou seja, filamentos septados (GUGLIOTTA e CAPELARI, 1998; GRIFFIN,1994).

Essas classes de fungos vêm sendo bastante estudadas devido possuir grande capacidade de produzir enzimas. Os basidiomicetos são considerados os principais causadores do apodrecimento da madeira, pois produzem enzimas capazes de degradar os compostos lignocelulósicos presentes na mesma (GIARDINA et al., 2010; GUPTA et al., 2013).

A biodegradação de compostos lignocelulósicos vem sendo bastante discutida devido seus resíduos poderem gerar energia e também levando em conta que são resíduos abundantes na natureza. Os organismos mais eficientes na degradação deste material são os fungos basidiomicetos e ascomicetos de degradação branca ou marrom (FERRAZ, 2010).

Os fungos da podridão marrom são representados por cerca de 7% de todos os basidiomicetos degradadores da madeira. Eles se desenvolvem sobre gimnospermas, onde degradam os polissacarídeos da madeira após uma modificação parcial da lignina, o que resulta em uma coloração marrom, devido a lignina oxidada (BUGG et al., 2011).

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

Os mais eficientes para a degradação da lignina, são os fungos pertencentes a podridão branca, pois produzem vários tipos de oxidorredutases, tendo seu sistema enzimático ligninolítico constituído por três classes de destaque, sendo: lacases, MnP e LiP. Essas enzimas atuam indiretamente na quebra do material, o

que resulta em uma quebra oxidativa das ligações da lignina (BUGG et al., 2011; SUKUMARAN; ABRAHAM; MATHEW, 2017).

Existem exemplos na literatura de fungos como produtores de enzimas degradadoras da lignina, conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1 – Exemplos de alguns fungos produtores de enzimas capazes de degradar a lignina

Fungo	**Degradação da lignina (%)**	**Enzimas**	**Referências**
Anthracophyllum discolour	75	Manganes Peroxidase	ACEVEDO et al., 2011
Botryosphaeria rhodina	100	-	BASHTAN-KANDYBOVICH et al., 2012;
	-	Lacase	DEKKER, BARBOSA, 2001
Coriolus versicolor	-	Lacase	KAWAI; UMEZAWA; HIGUCHI, 1988
	45.53	-	PANDEY; PITMAN, 2003
Fusarium proliferatum	19.6	-	REGALADO et al., 1997
Phanerochaete chrysosporium	-	Lignina peroxidase	HIRATSUKA et al., 2005
	-	Lignina peroxidase	SHI et al., 2008
Pleurotus ostreatus	-	Lacase Manganês Peroxidase	KUNJADIA et al., 2016

Fonte: Autoria própria

Cada espécime de fungo secreta enzima na presença de um substrato, sendo que este pode variar de espécime para espécime, podendo ser utilizado palha de cereal, borra de café, bagaço da cana-de-açúcar dentre outros materiais (KUNJADIA et al. 2016).

2.2.1 *Botryosphaeria ribis*

O fungo *Botryosphaeria ribis* é um ascomiceto pertencente à família *Botryosphaeriaceae*, que são importantes fungos patógenos degradadores de

plantas lenhosas e não lenhosas em regiões temperadas e tropicais (GONÇALVES, 2016). Mesmo com todas as pesquisas, ele ainda é muito conhecido por ser um dos principais fungos causadores de doenças em plantas, trazendo grandes transtornos principalmente na área da agricultura e exportação (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2005; SALDANHA, 2007).

Os fungos pertencentes a esta família podem ser considerados agentes patogênicos fracos, já que estes se aproveitam de momentos de stress e fragilidade da planta, como por exemplo, momentos de seca, temperaturas baixas ou elevadas, deficiências nutricionais e danos causados por outros patógenos ou pragas (GONÇALVES, 2016).

Estes agentes patogênicos direcionam seus ataques principalmente à parede celular das plantas utilizando-se de enzimas-chave associadas à hidrólise. E apesar de isolados destes fungos estarem sendo estudados pelo seu importante papel na produção de lacase, a identificação das espécies dessa família acaba sendo muito complicado principalmente pela sua diversidade morfológica entre os teleomorfos (designação à capacidade reprodutiva de um fungo e ou seu ciclo de vida) (SALDANHA, 2007).

Nas pesquisas de Colturato (2011) existe uma discussão sobre métodos que controlam a incidência do *Botryosphaeria ribis* através de diferentes agentes antifúngicos, mas é certo que uma vez instalada a doença, fica difícil controlá-la. Vemos também que a seca de ponteiro (conhecida por “dieback”, caracterizada pela desfolha e morte subta dos galhos) e os cancros (tumores) formados pelo fungo continuam gerando preocupação e têm ganhado maior atenção.

Outros estudos também relacionam a incidência e agressividade do fungo diretamente com os níveis de boro. Em Silveira, Gonçalves & Krugner (1998), esta descrito que a deficiência de boro aumentou a agressividade do *B. ribis* afetando principalmente a região basal do caule da planta, enquanto concentrações foliares de boro, em torno de 30 mg kg, foram suficientes para diminuí-la. Em condições de extrema deficiência, houve queda dos níveis de potássio tornando as plantas analisadas ainda mais suscetíveis.

2.2.2 *Ganoderma lucidum*

O gênero *Ganoderma* são fungos basidiomicetos que possuem a capacidade de conversão da lignina e celulose em gás carbônico e água através de suas enzimas oxidativas (peroxidases e lacases) e hidrolíticas (beta-glicosidases e celulases), os resíduos gerados nessa quebra são muitas vezes utilizados como substratos para outros cogumelos comestíveis ou ainda na produção de biomassa fúngica empregada em processos industriais (HELM et al. 2009; CLEMENTINO, 2011).

Este gênero se desenvolve em temperatura média de 30 °C produzindo uma série de enzimas degradadoras de lignina, que permitem degradar facilmente a lignina e a celulose da madeira, assim como outros substratos vegetais utilizados para o seu cultivo (HELM et al, 2009).

Este fungo de podridão branca é o cogumelo medicinal mais vendido no mundo e vem sendo utilizado na medicina chinesa há milênios. Apesar de sua grande utilidade no tratamento de diversas doenças como, por exemplo, o câncer, alergias, hipertensão arterial, diabetes e outras, também foram constatados o seu potencial promissor como produtor de biomassa (URBEN et al., 2001).

Em relação à busca por agentes que possuam um grande potencial de compostos biologicamente ativos, o fungo *G. lucidum* acaba se destacando e alguns de seus triterpenos do tipo lanostano apresentaram uma atividade anti-HIV1 e anti-HIV Protease (SANTOS et al., 2000).

Nos estudos apresentados por Valginhak e Santa (2018), os dados acabaram mostrando que este fungo teve um melhor desenvolvimento micelial na presença de resíduos que possuíam ambos 100% de serragem de *Pinus sp*. e fibra da estação de tratamento de efluentes.

2.2.3 *Pleurotus spp*

Os fungos da espécime *Pleutorus* são basidiomicetos, pertencentes ao grupo denominado de podridão branca. O *Pleurotus ostreatus*, é um fungo degradador de polímeros, é uma espécime de fungo que vêm se destacando devido seu bom desempenho para a produção de enzimas ligninolíticas. Capaz de

secretar enzimas como lacase, manganês peroxidade, lignina peroxidase e peroxidase versátil, sendo que uma ou mais dessas enzimas são as utilizadas nesse processo de degradação (FERNÁNDEZ-FUEYO, 2014).

Segundo o estudo realizado por Menezes, Silva e Durrant (2009) o fungo *Pleurotus ssp* (BCCB068) secretou 6,23 U/L de lacase no 15° dia e o *Pleurotus sajor-caju*, 3,52 U/L no 10º dia de incubação. O cultivo foi realizado por fermentação submersa utilizando-se bagaço de cana-de-açúcar como fonte de substrato (carbono). Os resultados foram satisfatórios e indicaram que o resíduo da agroindústria é possível fonte de enzimas ligninolíticas.

No trabalho de Zancan; Barreto, Menezes (2015) foi estudado linhagem de *Pleurotus sp* 001 (P001) e *Pleurotus sp* 068 (P068). Utilizaram o bagaço de cana-de-açúcar como matriz e realizou-se uma fermentação semi-sólida. Houve a produção de enzima ligninolítica, em maior quantidade a manganês peroxidase. Concluíram que as linhagens do fungo *Pleurotus* são bons produtores de enzimas ligninolíticas.

No trabalho de Kunjadia et al. (2016), procurava-se um fungo que pudesse biodegradar os resíduos industriais (corantes) que eram eliminados nos efluentes e traziam grande prejuízo ambiental, para isso foram estudados três espécies de *Pleurotus* (*P. ostreatus, P. sapidus e P. florida*) para verificar a produção de enzimas ligninolíticas. As espécies foram cultivadas na presença de corantes e em meio liquido sob agitação. Neste estudo, foi possível analisar que estas espécies descoloriram o corante em 88% *P. Ostreatus*, 92% *P. sapidus* e 98% *P. florida*, através da produção da enzima lacase.

Erngun e Urek (2017) estudaram a produção de enzimas ligninolíticas dos fundos *P. ostreatus* (Jacq.) e *P. Kumm* (MCC16) com o auxilio de um substrato (casca de batata) usando fermentação em estado sólido. Houve uma produção de 6708,3 (± 75) U/L e 2503,6 (± 50) U/L no dia 17, respectivamente. As análises mostram que o substrato estudado tem grande potencial para a produção de enzimas ligninolíticas pela espécime *Pleurotus.*

Estudo realizado por Batal et al.,(2015) mostra a produção de lacase em condição otimizada para o fungo *P. ostreatus* em fermentação em estado sólido. O planejamento fatorial foi utilizado para vários nutrientes importantes na produção da enzima. Com a condição ótima estabelecida, o fungo produziu 32.450 U/g de atividade de lacase. Essa produção de enzima nas condições ótimas foi capaz de

reduzir 80% da descoloração de vários corantes, mostrando que a espécie tem um forte potencial na indutria.

2.3 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

Pollegioni, Tonin, Rosini (2015) relatam que algumas classes de fungos produzem enzimas ligninoliticas, sendo elas: lignina peroxidade (LiP), mangânes peroxidase (MnP), peroxidases versáteis (VPs) e lacases capazes de despolimerizar a lignina em decomposição nas paredes celulares das plantas.

As enzimas ligninolíticas secretadas por fungos predominantes da podridão branca são constituídas por três principais classes, sendo elas: a lacase, LiP e MnP essas são produzidas no metabolismo secundário, quando as fontes tanto de carbono e de nitrogênio já estão restritas (SWAMY; RAMSAY, 1999).

Uma enzima é denominada constitutiva quando ela é produzida a partir de uma expressão de gene relacionada ao metabolismo primário de determinado microrganismo, enquanto que a enzima indutiva é produzida durante o metabolismo secundário do microrganismo. Quando a produção enzimática acontece através de indução pode ocorrer na presença de diferentes indutores tais como, surfactantes, ácool veratrílico e entre outros. (SALDANHA et al., 2007, GIESE et al., 2004).

Dentre essas enzimas ligninolíticas, a lacase, é capaz de catalisar reações de oxidações que quebram a estrutura da lignina (SOLARSKA et. al., 2009). Mesmo apresentando mais dois tipos de enzimas ligninolíticas, não foi comprovado na literatura que a LiP e a MnP sejam as responsáveis pela oxidação completa da molécula de lignina, considerando-se que provavelmente ocorra outros tipos de reações no início da degradação deste polímero (BUGG et al., 2011).

2.3.1 Lacase

A lacase vem sendo estudada desde o século passado, sendo mencionada pela primeira vez por Yoshida em 1883, descoberta na seiva da árvore japonesa *Rhus Vernicifera* (GIARDINA et al., 2010). Posteriormente, em 1896, Bertrand e

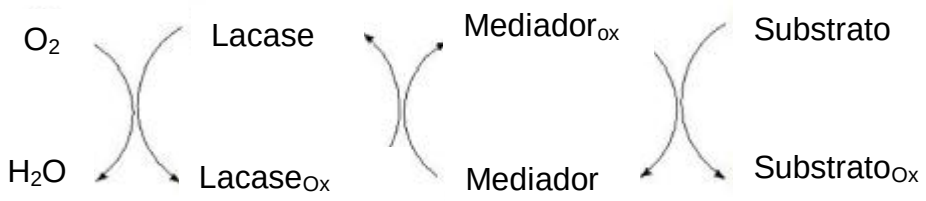
Laborde certificaram que a produção de lacase se dava por algumas espécies de fungos. (MADHAVI e LELE, 2009).

As lacases de fungos são constituidas por uma cadeia polipeptidica com 520-550 aminoácidos aproximadamente. Essas lacases são proteinas monoméricas extracelulares que apresentam um ponto isoelétrico (SITARZ, MIKKELSEN, MEYER, 2016).

Lacase (EC 1.10.3.2) são fenóis oxidases, também denominada de polifenol-oxidases que contêm múltiplos átomos de cobre (LOMASCOLO et al., 2003), classificadas como cuproproteínas, fazendo parte de um pequeno grupo de enzimas denominadas oxidases azuis (TOLEDO, 2008) e que são capazes de oxidar compostos fenólicos, reduzindo o oxigênio a água, a partir da retirada de um elétron do substrato aromático, produzindo radicais fenoxílicos (BETTIN et al, 2014). Quase todas as lacases fúngicas são monômeros ou dímeros e apresentam grau de glicosilação variando entre 10 e 25%, contribuindo, assim, para a estabilidade da enzima (JUNIOR, 2010).

A lacase apresenta um sistema denomidado de lacase-mediador, o qual é de grande desempenho para biotransformar a lignina (figura 7). Um composto químico pequeno é denominado de mediador. O sitio ativo é o portador de elétron entre a enzima e o substrato. No inicio da reação, o mediador é oxidado para intermediário e após a reação controlada, o mediador oxidado se afasta da enzima. O substrato é oxidado pelo intermediário que não pode ser oxidado diretamente pelo mediador (CHRISTOPHER, YAO, JI, 2014).

Figura 7 – Mecanismo proposto para oxidação de substrato



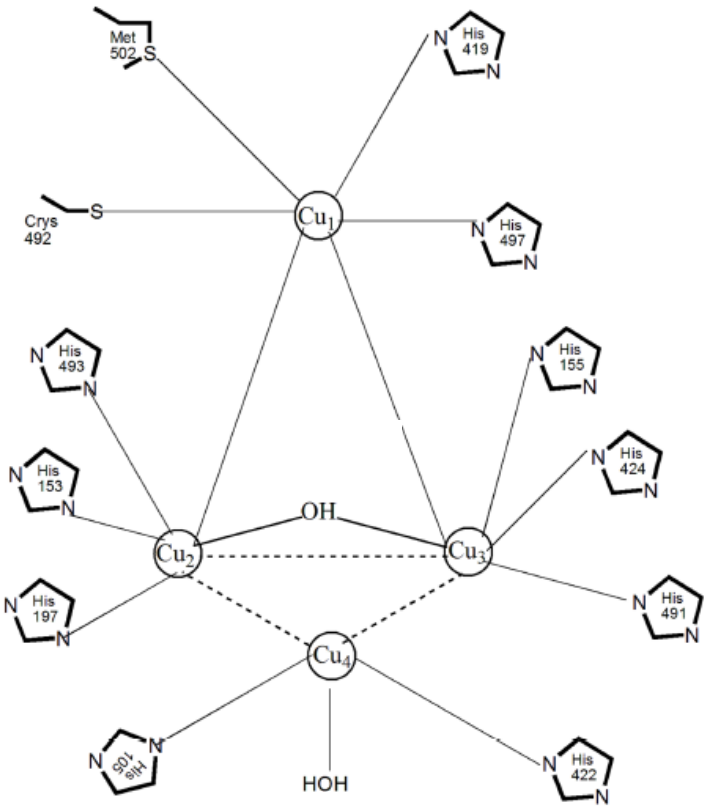
Christopher, Yao, Ji (2014) – adaptado pela autora

Através do seu potencial de oxidação é detectada sua atividade por espectrofotometria, visando que ela oxida substratos que na maioria das vezes são:

guaiacol, 2,6-dimetoxifenol (468 λ), siringaldazina ou o substrato não-fenólico ácido 2,2´-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico) (420λ) e emite uma coloração a qual é possível detectar no espectro (HOFER; SCHLOSSER, 1999)

A molécula de lacase, quando se encontra na forma de holoenzima ativa apresenta capacidade de acelerar reações de desmetilação, importantes em processos de biodegradação de cadeias poliméricas. A forma de uma holoenzima significa ser uma glicoproteína, ou seja, contem quatro átomos de cobre por monômero, ligado a três sítios ativos redox (figura 8) (PERALTA, SOUZA, BOER, 2004).

Figura 8 – Estrutura de coordenação da molécula de lacase



Christopher, Yao, Ji (2014) – adaptado pelo autor

A produção de lacase pode ser influenciada por alguns parâmetros, como por exemplo, o tipo e a concentração da fonte de carbono, nitrogênio, a presença ou ausência de indutores, pH, temperatura, dentre outros (STRONG E CLAUS, 2011).

Para o aumento na produção de lacases são utilizadas substâncias denominadas indutores, que podem ser compostos fenólicos ou aromáticos relacionados à lignina ou derivados da lignina. Um mesmo indutor em uma determinada espécie de fungo, pode aumentar a produção de lacase, mas em outras espécies, pode não causar nenhum efeito (LACERDA, 2015).

Agindo como uma enzima de “ataque” no processo da degradação da lignina, a lacase pode modificar a molécula para se obter produtos de valor agregado mostrando então a sua importante função (ZUCCA et al., 2011).

Alguns exemplos de fungos produtores de lacase são: *Agaricusbis porus, Botytis cinerea, Cerrana máxima, Coprinus cinereus, Coriolopsispolyzona, Lentinus tigrinus, Neurospora crassa, Trametes gálica, Trametes hirsuta, Trametes ochracea, Trametes versicolor, Trametes villosa, Phlebia radiata, Picnoporus cinnabarius, Pleurotus eryngii e Pleurotus ostreatus* (ALVES, 2010; GOCHEV e KRASTANOV, 2007; MOROZOVA et al., 2007).

2.3.2 Produção de lacase

Os estudos realizados por Baptista (2012) apontam que a produção da enzima lacase é afetada por diversos fatores e parâmetros, incluindo: o pH do meio, a presença de indutores, a disponibilidade de fontes de carbono, a composição do meio de cultura, o tempo de cultivo e a agitação.

A produção de lacase utilizando o processo de fermentação de enzimas pode ser classificada quanto à presença e/ou a ausência de água no meio de cultivo, sendo denominadas, respectivamente, como fermentação submersa, fermentação sólida ou fermentação em estado sólido (GERVAIS E MOLIN, 2003).

A fermentação submersa circunda pelo cultivo de microrganismo em meio liquido, onde neste contém concentrações de oxigênio adequado quando a operação é aeróbica. A fermentação em estado sólido ocorre na ausência de líquido e empregando um substrato inerte como suporte sólido (BRIJWANI, RIGDON, VADLANI, 2010).

A composição do meio de cultivo é um fator importante na produção da lacase, sendo a glicose um tipo de fonte de carbono utilizada para sua produção. (VALLE et al, 2012).

Garcia (2006) afirma que o meio de cultivo, se estático ou em constante agitação, resulta diferentes padrões de isoenzimas de lacase, influenciando diretamente na expressão gênica da mesma. A fonte de carbono é um fator de extrema importância para a produção de lacase (THURSTON, 1994).

O pH ótimo varia entre 4 e 9, porém, as enzimas são sensíveis a alterações de pH e são produzidas em maior quantidade quando estão próximas ao seu pH ótimo de atividade (MELO, MELO, ALVES, 2017). Contudo, o estudo realizado por Batista (2009) salienta que para lacases fúngicas o pH ótimo está entre 3 e 7.

O cobre é um micronutriente presente positivamente para a maioria dos organismos vivos, conhecido por estimular a produção de lacases (VISWANATH et al., 2008). No trabalho de Park et al (2015) para a espécie *P. Coccineus* do gênero *Pycnoporus*, a adição de 200µM cobre aumentou a produção de lacase de cinco linhagens analisadas.

Bettin e colaboradores (2014) destacam que as lacases de origem fúngica, a partir das suas diferentes rotas de biossíntese, podem ser classificadas como constitutivas ou induzidas.

Produzir lacase em meio sólido geralmente proporciona a obtenção de maiores atividades de enzima (ALEXANDRINO et al., 2007). A produção de lacase em meio líquido deve ocorrer conforme o fungo consome as fontes de carbono e de nitrogênio no meio de cultivo, contudo, a sua produção e a sua atividade enzimática pode ser maior com adições de indutores (BETTIN et al., 2014; PERALTA et al., 2004). Nos últimos anos diferentes indutores foram estudados, porém, não há um ótimo indutor de lacase comum a todos os fungos, ou seja, há uma variação de indutor para cada fungo (STRONG E CLAUS, 2011).

A utilização dos resíduos agroindustriais tem sido uma alternativa para ser usado como matrizes. A grande quantidade de atividades agrícolas em constante desenvolvimento tornam de fácil acesso esses resíduos para a pesquisa. Diversos processos têm sido desenvolvidos para que seja empregada a utilização de resíduos e transformando-os em compostos químicos. Contudo, a utilização de resíduos

agrícolas como substratos, além de ser um método econômico, também tem contribuído na resolução de problemas ambientais (ZANCAN; BARRETO, MENEZES; 2015).

KAHRAMAN, GURDAL (2002) aponta que a lacase apresenta baixa especificidade por substratos, assim, podem atuar sobre uma grande variedade de compostos e são utilizadas em várias aplicações biotecnológicas. A lacase extraída de um fungo do gênero *Ganoderma* foi a responsável por degradar corantes de um efluente simulado da indústria têxtil (MA et al. 2014).

2.4 BIODEGRADAÇÃO DA LIGNINA

Segundo Otsuka et. al (2003) a etapa mais importante do processo de degradação biológica da lignina é a clivagem da ligação arilglicerol β-aril éter, gerarando alguns metabólitos. Atualmente está sendo estudada essa clivagem de forma a aprofundar os mecanismos de ação enzimáticas neste processo.

Destaca-se que a biodegradação da lignina não gera apenas compostos fenólicos, mas uma variaedades de substâncias alifáticas (KHATAMI et al, 2019).

O trabalho de Eggert e colaboradores (1996) identificaram produtos da biotransformação de uma subestrutura de modelo sintético da lignina pela lacase produzida pelo fungo *Pycnoporus cinnabarinus*, na presença do mediador 3-hidroxiantranilato (3-HAA). Os autores utilizaram a cromatografia líquida de elta eficiência (CLAE) em coluna de C_{18} para separação dos compostos, que foram identificados com padrões analíticos.

Zhu e colaboradores (2017) realizaram um experimento promovendo a biodegradação da lignina pela bactéria *Bacillus ligniniphilus* L1, onde foram identificados 15 monômeros fenólicos, dentre eles: ácido vanílico, ácido fenilacético e ácido benzóico. A identificação foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (GC-MS).

O estudo realizado por Li e colaboradores (2019) mostrou os metabólitos produzidos através do tratamento de lignina alcalina por bactérias simbiontes de

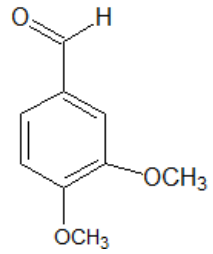
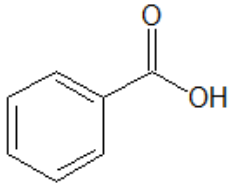
cupins. Através da analise por GC-MS foi possível observar a produção de uma variedade de metabólitos: ácido benzóico, ácido vanílico entre outros.

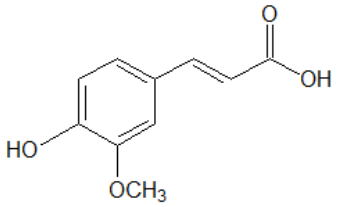
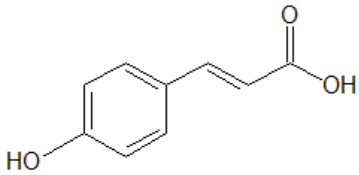
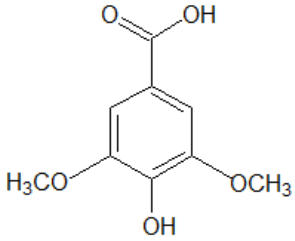
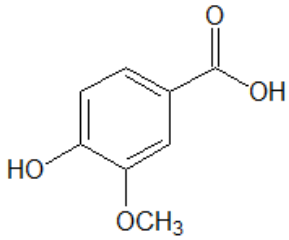
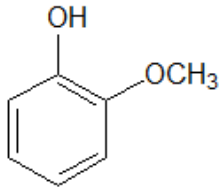
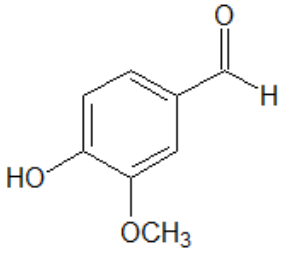
Wang, et al.; (2018) demonstraram que muitas cepas bacterianas são capazes de biodegradar a lignina. Analisaram por GC-MS, CLAE, FTIR e a ação das enzimas mostrou que o guaiacol e o dihidroxibenzeno foram os principais metabólitos intermediários da degradação do ácido vanilico e do ácido sérico, já o ácido *p*-hidroxibenzóico foi considerado como um metabólito intermediário importante para a degradação do ácido *p*-cumarico.

Para cada um dos possíveis metabólitos gerados existe uma aplicação diferente em diversos setores industriais, como por exemplo, o ácido benzóico possui um potencial para agente tuberculostático, podendo ser usado na indústria farmacêutica (RANDO et al., 2002). Já a vanilina, muito utilizada na indústria de alimento (ZHAO et al., 2018).

Os principais metabólitos que são capazes de se obter através da biotransformação da lignina (quadro 1) são os ácidos: benzóico, *p*-coumárico, siríngico, vanílico. Podendo gerar também o guaiacol e a vanilina (BUGG et al., 2011).

Quadro 1 - Alguns metabólitos da lignina, estruturas moleculares e aplicações

Metabólito	Aplicações	Estrutura molecular
3,4-dimetoxibenzaldeído	Substrato para produção de flavonas (NAIK; TILVE; KAMAT, 2014)	
Ácido benzoico	Potencial agente tuberculostático (RANDO et al., 2002)	

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

SHIRAISHI, 2019 – adaptado pelo autor

O produto do metabolismo dos organismos são os denominados metabólitos fúngico. O metabolismo primário é o processo metabólico essencial à função dos fungos em cultura pura. Enquanto o secundário é o responsável pelas outras

substâncias, como por exemplo, as toxinas e enzimas que são importantes no processo de biodegradação (GRIFFIN, 1993).

2.4.1 A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/ HPLC) na identificação de metabólitos da lignina

A CLAE é um método físico de separação, no qual misturas complexas são fracionadas pela distribuição em duas fases, sendo elas: fase móvel e fase estacionária. A fase estacionária encontra-se empacotada dentro de uma coluna. A fase móvel é a responsável por transportar a mistura diluída em um solvente. Os compostos de uma mistura adsorvem diferentemente na fase estacionária, eles migram em diferentes velocidades de forma que são separados ao passarem pela coluna (COLLINS et al. 1982; MCMURRY, 2009).

Através da técnica de CLAE é possível de separar compostos que podem ser identificados por comparação de seus tempos de retenção com os de padrões analíticos.(VECHIA et. al., 2016).

Quando se tem uma mistura de substâncias para serem separadas via CLAE, é necessário desenvolver um método que seja capaz de efetuar essa separação de forma efetiva. Um novo método analítico desenvolvido ou com adaptação necessita de um processo de avaliação para a sua eficiência, esse processo é denominado de validação. O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) define validação como comprovação. Nesse processo de validação os parâmetros analíticos de desempenho avaliados (características de desempenho) são: linearidade, precisão, exatidão, faixa linear, robustez, limite de detecção e limite de quantificação (ARAGÃO, VELOSO E ANDRADE, 2009). Os parâmetros estudados devem ser aplicados durante o método que esta sendo desenvolvido ou após as adaptações (ALVES et al., 2017). A validação de método produz resultados confiáveis, sendo de relevância que métodos validados são pré-requisitos para a certificação das análises e para o livre comércio internacional (CAMILO et al. 2008).

A técnica CLAE já foi muito utilizada para estudo de compostos derivados da lignina. O quadro 2 apresenta algumas metodologias encontradas na literatura utilizando a técnica para se obter metabólitos resultantes da biodegradação da lignina (DEVAPPA; RAKSHIT; DEKKER, 2015).

Quadro 2 - Metodologias de análise da lignina e seus metabólitos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Substrato	Eluente	Coluna	Referência
Lignina tratada por bactérias *Citrobacter*	Acetonitrila e água (70:30), isocrático	**C18** fase reversa (250 × 4.6 mm)	CHANDRA; BHARAGAVA (2013)
Lignina tratada por bactéria *Rhodococcus*	Água (0,1% TFA) e Metanol (0,1% TFA), gradiente	**C18** Zorbax Eclipse Plus (Agilente)	MYCROFT et al. (2015)
Lignina extraída de aspargos	Água (TFA 1mM) e Acetonitrila (TFA 1 mM), gradiente	"S Quiral" Spherisorb (25 x 4,6 mm)	JARAMILLO-CARMONA et al. (2008)

DORTE, 2019 – adaptado pelo autor

Dentre os metabólitos resultantes da biodegradação da lignina, a vanilina e o siringaldeído são substâncias importantes comercialmente, porém muitos compostos presentes na lignina ainda não foram descobertos, o que estimula mais estudos (DEVAPPA; RAKSHIT; DEKKER, 2015).

2.5 PLANEJAMENTO FATORIAL: FUNDAMENTOS E CONCEITOS BÁSICOS

O planejamento fatorial é uma técnica bastante utilizada quando se tem duas ou mais variáveis independentes. Destaca-se por permitir avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais (PERALTA-ZAMORA et al., 2005).

Para a otimização do trabalho experimental utiliza-se procedimentos multivariados, sendo um deles o planejamento fatorial que tem por base os experimentos para determinar a influência das variáveis sobre as respostas desejadas; a teoria estatística auxilia na tomada de informações confiáveis diminuindo o viés do estudo, para a sua utilização é necessário o conhecimento prévio dos programas computacionais e da metodologia deste planejamento, para realizar de forma correta (COSTA, M.C. B.; 2011).

Como conhecimento básico deve-se saber que o fator representa cada variável do sistema em estudo, o nível mostra as condições de operação dos fatores de controle sendo analisadas nos experimentos, sendo identificados por (+) quando nível superior e (-) quando o nível é inferior.

Este planejamento consiste em realizar, por meio de exemplos práticos, uma discussão da interação das variáveis, avaliando-se a partir de um menor número de experimentos os seus efeitos. As repetições de experimentos são indispensáveis para uma efetiva resposta e para qualidade do estudo utilizando a metodologia somada ao equipamento. Os ensaios e replicas são realizados de forma aleatória, para não provocar distorções estatísticas e nem interferir nos resultados obtidos e efeitos calculados. Com os avanços tecnológicos a pesquisa científica necessita de ferramentas estatísticas para trabalhar com os dados e informações que sejam confiáveis. Principalmente na aquisição de parâmetros experimentais, pois é imprescindível para o trabalho cientifico. Os resultados podem ser apresentados em superfícies de resposta, destacando a região dos fatores que conduz a uma resposta ótima (CUNICO, M. W. M. et al, 2008).

Conceição et. al., (2017) explica que modelos matemáticos têm sido utilizados para explicar respostas de reações bioquímicas, pois muitas vezes as interações de parâmetros que influenciam as reações podem ser avaliados com uma redução de números de ensaios utilizando um planejamento fatorial.

Uma técnica estatística eficaz para investigar processos complexos é a metodologia de superfície de resposta e é bastante utilizada em otimização da produção de lacase para diversas espécies de fungos (SACCHETTO et al, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Selecionar dentre três cepas fúngicas a melhor produtora de lacase. Otimizar a produção de lacase pelo fungo selecionado e avaliar alguns produtos da degradação da lignina.

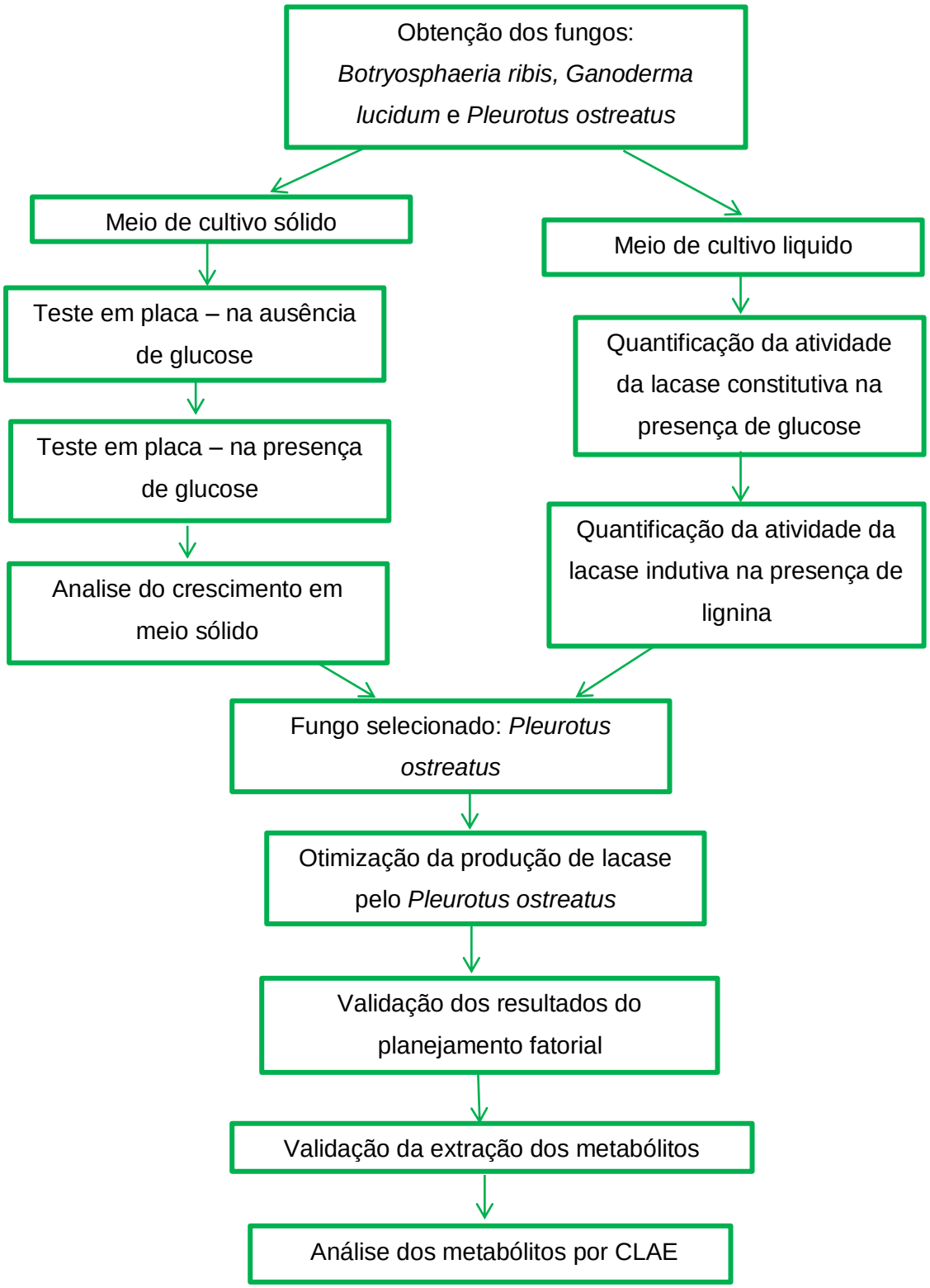
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o crescimento dos fungos: *Botryosphaeria ribis, Ganoderma lucidum e Pleurotus ostreatus*, em meio sólido, na ausência e presença de glucose como fonte de carbono.
- Comparar a produção de lacase em meio líquido dos três fungos, previamente citados, após cultivo em meio líquido presença de lignina, sem e com glucose como fonte de carbono.
- Otimizar a produção de lacase pelo fungo selecionado através de um planejamento fatorial, avaliando as variáveis: concentração de lignina, concentração de extrato de levedura e tempo de cultivo.
- Validar o processo de extração dos compostos químicos utilizando-se os padrões analíticos: álcool vanílinico, ácido seríngico, 2,6 dimetoxibenzóico, *p*-coumárico, ácido ferrúlico, veratraldeído e ácido benzóico.
- Analisar alguns metabólitos provenientes da degradação da lignina por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4 METODOLOGIA

Um esquema das etapas desenvolvidas neste trabalho está apresentado na figura 9.

Figura 9 – Fluxograma geral das etapas desenvolvidas no trabalho



Fonte: Autoria própria

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os padrões analíticos dos compostos 2,6-dimetoxibenzóico, ácido benzoico, ácido *p*-coumárico, ácido siríngico, ácido vanílico, veratraldeído e lignina, bem como o ABTS e DMP foram obtidos da Sigma-Aldrich. O padrão analítico de ácido ferúlico foi obtido da European Pharmacopoeia. Extrato de levedura e o Agar batata dextrose foram obtidos da Acumedia.

4.2 OBTENÇÃO DOS FUNGOS

Os microrganismos estudados foram cedidos. O *Botryosphaeria ribis* foi cedido pela ESALQ de Piracicaba/SP*, Ganoderma lucidum* pela professora Dra. Suely Obara (UEL – Departamento de Bioquímica) e *Pleurotus ostreatus* pelo professor Dr. Raul Gomes (UEL – Departamento de Tecnologia de Alimentos).

4.3 CULTIVO EM MEIO SÓLIDO

4.3.1 Crescimento fúngico em meio sólido contendo lignina na ausência de glucose.

Os fungos obtidos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo BDA (batata, ágar e dextrose). Na estufa incubadora, no escuro, e a 28°C o *B. ribis* permaneceu por 5 dias*, G. lucidum* por 7 dias e o *P. ostreatus* por 12 dias.

Posteriormente, um disco de 5 mm de diâmetro foi inoculado em placas de Petri contendo 20 mL de meio sólido, contendo meio mínimo de sais de Vogel (VOGEL, 1956), 1,5% (m/v) de ágar e 0,5% (m/v) de lignina. Um controle foi realizado contendo disco de micélio fúngico no meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956) e 1,5% (m/v) de ágar, sem adição de lignina.

A incubação foi realizada em estufa incubadora a 28°C, por 7 dias.

4.3.2 Crescimento fúngico em meio sólido contendo lignina na presença de glucose.

Um disco contendo 5 mm de diâmetro foi inoculado em placas de Petri contendo 20 mL de meio sólido, contendo meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956),

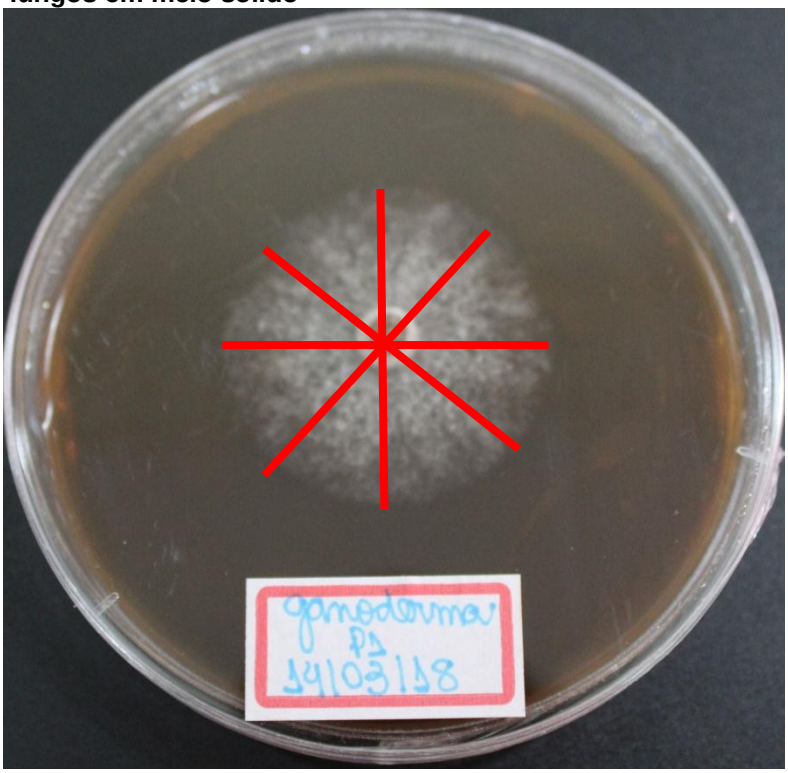
1,5% (m/v) de ágar, 0,5% (m/v) de lignina e 1% (m/v) de glucose. Um controle foi incubado paralelamente contendo a mesma composição, sem a adição de lignina. A incubação foi realizada em estufa incubadora a 28°C, por 7 dias.

4.4 COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO DOS TRÊS FUNGOS EM MEIO SÓLIDO

4.4.1 Avaliação do crescimento dos fungos

O crescimento dos microrganismos foi avaliado diariamente durante 7 dias, utilizando-se uma régua para medir o crescimento da colônia. O resultado constitui a média das quatros determinações, conforme mostra a figura 10.

Figura 10 – Determinação do diâmetro da colônia fúngica nos experimentos da avaliação do crescimento dos fungos em meio sólido



Fonte: Autoria própria

4.4.2 Taxa de inibição

Depois de determinadas às respectivas médias dos diâmetros das colônias dos três microrganismos avaliados, dos cultivos em meio sólido contendo lignina

com glucose e sem glucose, estes valores foram comparados com os dos cultivos controles (sem lignina).

Com as médias aritméticas das medidas, pode-se obter a taxa de inibição (%) representada pela equação 1 (FRIGAS, 2002; TARIQ et. al, 2010).

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

4.4.3 Modificações de coloração do meio de cultivo sólido contendo lignina

Foi analisada visualmente por um período de 7 dias a possível existência de modificação na coloração do meio, seja para mais clara ou até mesmo para uma mais escura próximo ao halo de crescimento.

4.5 CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO PARA A PRODUÇÃO DA ENZIMA LACASE

4.5.1 Comparação da lacase constitutiva pelos fungos *B. ribis, G. lucidum e P. ostreatus*

Os fungos foram transferidos para placas de Petri contendo BDA, mantidas a 28°C, até que as placas estivessem completamente cobertas pelas hifas.

Para se obter a lacase constitutiva produzidas pelos fungos: *B. ribis, G. lucidum e P. ostreatus*, foram inoculados 4 discos de 0,5 mm contendo micélio fúngico em frascos de Erlenmeyers contendo 25 mL de meio de cultivo composto por meio mínimo de Vogel, 1% (m/v) de extrato de levedura e 1% (m/v) de glucose e incubados em agitador orbital à 180 rpm, por um período de 5 dias a 28°C. Os cultivos foram realizados em duplicatas e paralelamente com os respectivos controles (sem microrganismo).

Após o 5° dia os cultivos foram interrompidos vertendo o meio para um tubo Falcon, de 50 mL, centrifugados a 4°C, 8000 RPM por 15 minutos. Posteriormente, foram filtrados sob-banho de gelo, para obter o extrato livre de células o qual foi utilizado para quantificar a atividade enzimática, descrita no item 4.6.

4.5.2 Comparação da produção de lacase na presença de lignina

Os fungos foram transferidos para placas de Petri contendo BDA em estufa incubadora, no escuro, e a 28°C, até que as placas estivessem totalmente coberta pelas hifas.

Para se obter a lacase indutiva produzidas pelos fungos: *B. ribis, G. lucidum e P. ostreatus*, foram inoculados 4 discos de 0,5 mm contendo micélio fúngico em frascos de Erlenmeyers contendo 25 mL de meio de cultivo composto por meio mínimo de Vogel, 1% (m/v) de extrato de levedura, 1% (m/v) de glucose e 0,5% (m/v) de lignina e incubados em agitador orbital à 180 rpm, por um período de 5 dias a 28°C. Os cultivos foram realizadas em duplicatas e paralelamente com os respectivos controles (sem microrganismo).

Após o 5° dia os cultivos foram interrompidos vertendo o meio para um tubo Falcon, de 50 mL, centrifugados a 4°C, 8000 RPM por 15 minutos. Posteriormente, foram filtrados sob-banho de gelo, para obter o extrato livre de células o qual foi utilizado para quantificar a atividade enzimática, descrita no item 4.6.

4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LACASE

A quantificação da atividade da enzima lacase foi semelhante à de Barbosa, Dekker e Hardy (1996). Foram utilizados dois substratos, ABTS e DMP. O experimento foi realizado em tubos de ensaios contendo água destilada, substrato, solução tampão citrato-fosfato e extrato livre de células (ELC), onde os tubos de ensaio totalizavam 1 mL de solução. Para ABTS as quantidades dos reagentes utilizadas estão descritas na tabela 2 e para o DMP na tabela 3. O R representa a amostra, sendo que a leitura foi realizada em duplicata e paralelamente, foram realizados os controles do ELC (C_1) e do substrato (C_2).

Tabela 2: Quantidade de reagente para atividade enzimática com substrato ABTS (50mm)

Componentes:	R1	R2	C1	C2
Água (µL)	775	775	825	800
Tampão pH 3 (µL)	150	150	150	150
Substrato (µL)	50	50	-	50
Enzima (µL)	25	25	25	-

Fonte: Autoria própria

Tabela 3: Quantidade de reagente para atividade enzimática com substrato DMP (10mm)

Componentes:	R1	R2	C1	C2
Água (µL)	725	725	825	750
Tampão pH 5 (µL)	150	150	150	150
Substrato (µL)	100	100	-	100
Enzima (µL)	25	25	25	-

Fonte: Autoria própria

Essa solução foi aquecida em banho maria em temperaturas distintas para cada fungo estudado, conforme demostrado no quadro 3, durante o intervalo de 5 minutos. Posteriormente, fez-se a leitura da absorbância em um espectrofotômetro UV-VIS no comprimento de onda (λ) 420 nm para ABTS (BOURBONNAIS; PAICE, 1990) e λ= 468 para DMP (MARTINEZ et al., 2009).

Quadro 3: Temperatura necessária para cada fungo produzir a enzima para converter um substrato em produto.

Fungo	Temperatura
B. ribis	50 °C
G. lucidum	37 °C
P. ostreatus	45 °C

Fonte: Autoria própria

Assim, a atividade enzimática presente no extrato é dada por U/mL. A unidade de lacase foi definida como o numero de µmols do substrato (ABTS/ DMP) oxidado por minuto por mL, onde se determina através da equação 2 (YADA JUNIOR, 2016; SACCHETTO et al., 2018):

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

Onde U/mL corresponde a unidade de lacase por mL de substrato, AT é a absorbância da amostra, AC1 é a absorbância de C1, AC2 é a absorbância de C2, t é o tempo de incubação (em minutos), V é o volume de enzima empregado nos ensaios, Fd é o fator de diluição da solução enzimática quando necessário, e ε é o coeficiente de extinção molar do substrato (para o ABTS, ε = 36.000 mol^{-1} cm^{-1} e para o DMP, ε = 10.000 mol^{-1} cm^{-1}).

4.7 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE UTILIZANDO-SE PLANEJAMENTO FATORIAL

Para a otimização das condições de cultivo, o fungo *P. ostreatus* foi cultivado em BDA por 10 dias, a 28° C. Posteriormente, quatro discos de 5 mm de diâmetro contendo o micélio dos fungos foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio nutriente mínimo de Vogel com glucose (1%), variações na concentração de extrato de levedura (0 até 4,0%), lignina (0 até 0,5%) e tempo de cultivo (4 até 10 dias), conforme quadro 4. As culturas foram incubadas a 28 °C num agitador rotativo a 180 rpm.

Posteriormente, os cultivos foram interrompidos de acordo com os dias estipulados, de maneira que se verteu o meio para um tubo de plástico de 50 mL, centrifugou a 4°C, 8000 rpm por 15 minutos. Após esta etapa, foi filtrado em banho de gelo, obtendo o extrato livre de células. Este foi utilizado para realização da quantificação da atividade enzimática com os dois substratos ABTS e DMP, conforme descrito no item 4.6.

Os dados acima descritos compõem o planejamento fatorial 3^3, incompleto, Box-Behnken, de três variáveis, com 15 ensaios experimentais, realizados em triplicata. Análises estatísticas, incluindo o gráfico de Pareto e curvas de resposta foram obtidos a partir do programa computacional Statistica10.0.

Quadro 4 – Condições no planejamento fatorial para quantificação da atividade de lacase pelo substrato ABTS e DMP

Variáveis			
Experimento	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
X1 – Lignina (%)	0	0,25	0,5
X2 – Extrato de levedura (%)	0	2	4
X3 – Tempo (d)	4	7	10

Fonte: Autoria própria

Um novo experimento para otimização foi realizado, onde quatro discos de 5 mm de diâmetro contendo o micélio dos fungos foram transferidos para frascos de erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio nutriente mínimo de Vogel com glucose (1%), variações na concentração de extrato de levedura (3 até 5,0%), lignina (0,5 até 2%) e tempo de cultivo fixo 10 dias, conforme quadro 5. As culturas foram incubadas a 28 °C num agitador rotativo a 180 rpm.

Os dados acima descritos compõem o planejamento fatorial 3^2, metodologia Box-Behnken, de duas variáveis originando-se 9 ensaios experimentais, realizados em triplicata e o ponto central foi realizado 3 vezes, o que originou 12 ensaios. Análises estatísticas, incluindo o gráfico de Pareto e curvas de resposta foram obtidos a partir do programa computacional Statistica10.0.

Quadro 5 - Condições no planejamento fatorial para quantificação da atividade de lacase pelo substrato DMP

Variáveis		
Experimento	X_1	X_2
1	-1	-1
2	-1	0
3	-1	+1
4	0	-1
5	0	+1
6	+1	-1
7	+1	0
8	+1	+1
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

Fatores	Valores Reais		
	-1	0	+1
X1 – Lignina (%)	0,5	1,25	2,0
X2 – Extrato de levedura (%)	3,0	4,0	5,0

Fonte: Autoria própria

4.8 VALIDAÇÃO DO RESULTADO OBTIDO PELO PLANEJAMENTO FATORIAL

A confirmação do método foi realizada com a produção da enzima na melhor concentração de lignina e de extrato de levedura. Essa etapa baseou-se em um cultivo liquido de 25 mL, onde continha 4 discos de micélio fúngico em frascos de Erlenmeyers de 125 mL, meio nutriente mínimo de Vogel, 1% (m/v) de glucose e extrato de levedura, lignina nas concentrações estabelecidas no teste de otimização.

Para a confirmação do valor real, foi interrompido o cultivo vertendo o meio para um tubo de plástico de 50 mL, centrifugou-se a 4°C, 8000 RPM por 15 minutos. Após esta etapa, o cultivo foi filtrado em banho de gelo, para que se obtivesse o extrato livre de células e assim quantificar a atividade enzimática, conforme descrito no item 4.6 para confirmar a produção ótima de lacase do fungo *P. ostreatus.*

4.9 EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DA LIGNINA

4.9.1 Preparo dos padrões analíticos

Foram preparados os seguintes padrões analíticos: 2,6-dimetoxibenzóico, ácido benzóico, ácido *p*-coumárico, ácido siríngico, ácido vanílico, veratraldeído e ácido ferúlico, em tubos tipo eppendorfs pela diluição de 1,00 mg de cada padrão em 1,0 mL de Metanol grau cromatográfico. Posteriormente, foram filtrados em filtros de seringa com porosidade de 0,45 µm, armazenados em tubos *vial* e denominados de solução “mãe”. Cada solução dos padrões preparados foi diluída em uma proporção 1:5 para posterior análise via CLAE.

Para estudo simultâneo dos padrões, foi preparado um mix com cada uma das 7 soluções "mãe". Em um *vial* adicionou-se 0,1 mL de cada solução “mãe” e 0,3 mL de metanol, totalizando 1 mL de solução. Assim, a concentração de cada padrão passou a ser de 0,1 mg/mL.

4.9.2 Extração partição liquído-liquído

Foram submetidos à extração líquido-líquido, amostras produzidas de acordo com as condições descritas no tem 4.8, sendo elas:

1. Amostra real, obtida a partir de cultivos nas condições ótimas (25 mL de meio nutriente mínimo de Vogel, 0,875% (m/v) de lignina, 4,5% (m/v) de extrato de levedura e 1% (m/v) de glucose). Esta amostra foi obtida em duplicata para teste de extração com e sem ácido.
2. Controle - Amostras de controle biótico sem lignina (meio de cultivo sem lignina)
3. Branco - Amostras de controle abiótico com lignina (apenas meio de cultivo)

O extrato livre de células (ítem 4.6) de cada uma das 3 amostras acima descritas, foi extraído por partição liquido-líquido com o solvente acetato de etila (1:1) e posteriormente seco em rotaevaporador. Para tal, 25mL de acetato de etila foi adicionado à 25mL do extrato, em funil de separação de 125mL. Foram

realizadas 3 extrações com 10 agitações manuais cada. Após cada adição de solvente, o funil foi deixado em descanso por 2 minutos e coletada a fração inferior.

Uma das duplicatas da amostra 1 (amostra real) foi acidificada (pH 1-2) utilizando ácido clorídrico, HCl (40%) (Jokela et al.,1985) e posteriormente extraído por partição liquido–liquido com acetato de etila, conforme descrito acima.

As amostras obtidas foram submetidas à análise por CLAE conforme o item 4.10.

4.9.3 Validação da extração

A validação da extração foi realizada para a amostra 1 (Amostra real) com e sem ácido e para a amostra 3 (Branco: Amostras de controle abiótico com lignina - meio de cultivo e lignina).

Ao extrato livre de células dessas amostras, foram adicionados 3 concentrações (0,05; 0,10; 0,15 mg/mL) do mix de padrões preparados conforme descrito no item 4.9.1.

Após 10 minutos da adição dos padrões extraiu-se o meio por partição liquido-líquido usando solvente acetato de etila (1:1) conforme descrito no item 4.9.2.

A porcentagem de extração foi calculada levando-se em consideração a amostra real e o controle, de acordo com a equação 3.

3

$$\% \text{ de extração} = (\text{Amostra real} - \text{Branco}) * 100.$$

Isso foi realizado para que fosse possível estudar a ação real do fungo na biotransformação da lignina.

As amostras obtidas foram submetidas à análise por CLAE conforme o item

4.10 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DOS METABÓLITOS PROVENIENTE DA BIODEGRADAÇÃO DA LIGNINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Para análise dos metabólitos provenientes da biodegradação da lignina por CLAE, foi necessário inicialmente encontrar um método eficiente para a separação dos 7 padrões estudados: álcool vanílinico, ácido seríngico, 2,6 dimetoxibenzóico, *p*-

coumarico, ácido ferúlico, veratraldeído e ácido benzóico, preparados conforme o item 4.9.1.

Para o estudo foi utilizado um equipamento UHPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific), com detecção por DAD (arranjo de diodos), e *software* Chromeleon, pertencente ao Departamento de Química da UTFPR Londrina.

A coluna cromatográfica utilizada foi a C18 Phenomenex de fase reversa, com dimensões de 250 x 4,6 mm. A fase móvel foi composta por: solução A, acetonitrila grau HPLC e solução B, água com 1µMol de ácido trifluoracético (TFA).

O volume de amostra injetado foi de 20 µL, ao fluxo de 1mL/min. Foi realizado um gradiente com a fase móvel, conforme descrito no quadro 6. O tempo total de análise foi de 50 minutos por amostra. Foi programado em cada corrida um tempo adicional de 10 minutos para que fosse possível uma limpeza da coluna e para que as condições originais do gradiente fossem reestabelecidas.

Os compostos foram caracterizados pelos seus espectros na região do ultravioleta, com comprimentos de onda de 220, 272, 289 e 309 nm.

Quadro 6 – Método gradiente desenvolvido para análise dos metabólitos proveniente da biodegradação da lignina

Tempo (min)	Solução A (Acetonitrila)	Solução B (TFA + Água)
0	20	80
20	20	80
30	30	70
40	40	60
50	50	50
55	45	55
56	40	60
60	20	80

Fonte: Autoria própria

4.10.1 Curva de calibração

Para a construção da curva de calibração foram preparadas 4 concentrações diferentes do mix de padrões, a partir da solução "mãe", sendo essas concentrações: 0,005; 0,05; 0,01; 0,10 mg/mL. As curvas foram injetadas conforme condições acima descritas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do crescimento micelial

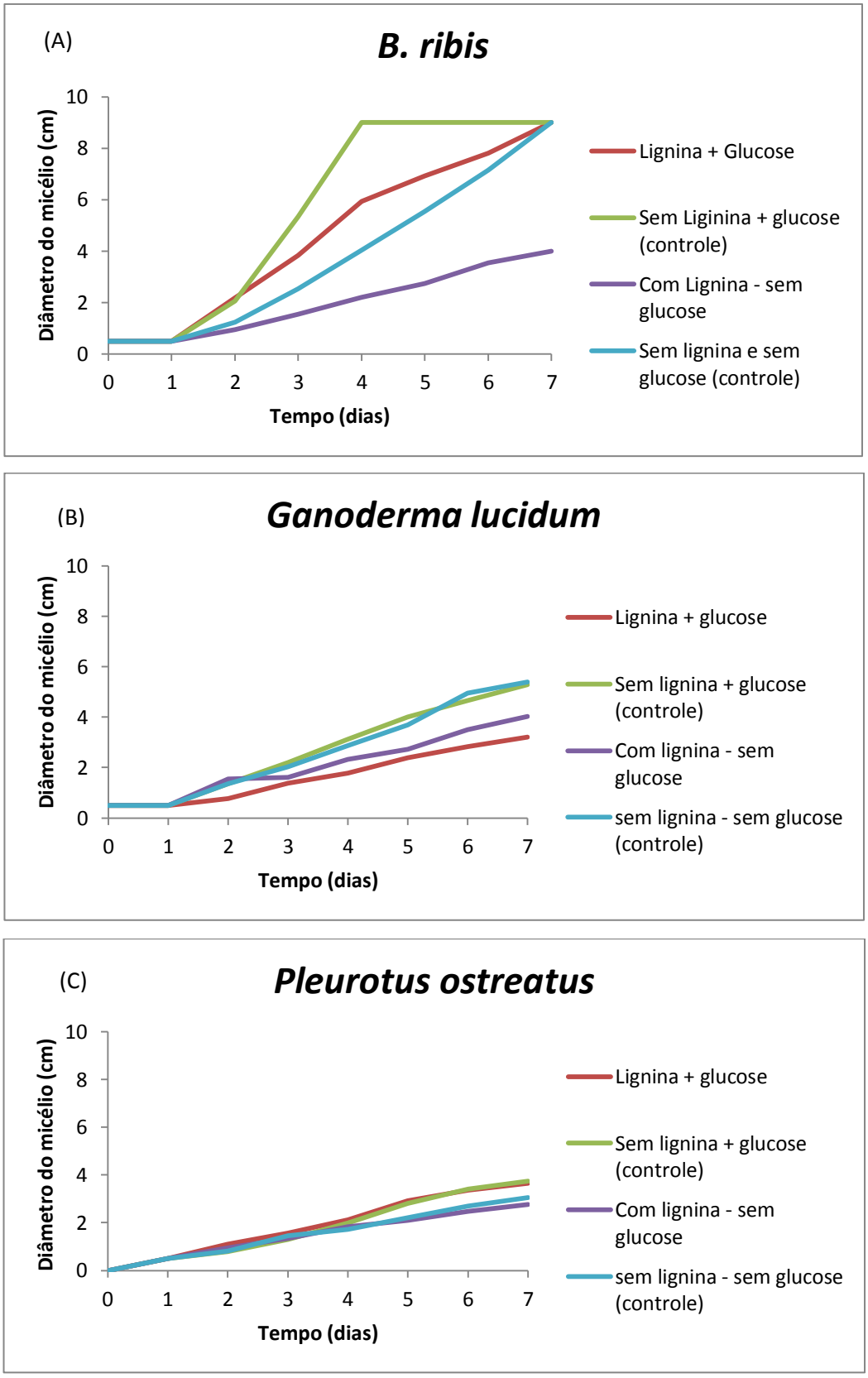
A análise do crescimento micelial foi realizada através das médias, em centímetros, diárias do desenvolvimento do halo dos 3 fungos estudados: *B. ribis, G. lucidum e P. ostreatus.* Essa analise foi realizada com dois tipos de meio de cultivo: um apresentava-se glucose enquanto o outro obtinha a ausência de glucose.

O meio de cultivo que apresentava glucose continha-se duas fontes de carbono para o desenvolvimento do fungo, sendo a glucose e a presença de lignina, já o meio com a ausência de glucose apresentava somente a lignina, ou seja, uma única fonte de carbono disponível. A figura 11 apresenta o desenvolvimento dos fungos durante os 7 dias estudados, nos dois meios de cultivos e uma comparação de crescimento com o controle, cujo meio não apresentava a variável de estudo (lignina).Pode-se observar que os fungos estudados apresentaram comportamentos diferentes.

O fungo *B. ribis* apresentou um crescimento mais rápido, nos dois meios de cultivos, comparados com os demais fungos estudados. Apresentou um crescimento de 4 cm no 7° dia na ausência de glucose, sendo mais rápido em meio de cultivo contendo duas fontes de carbono (glucose e lignina) alcançando 9 cm no 7° dia. O controle, contendo ausência de lignina e glucose, cresceu no 6° dia 9 cm, contudo no controle, meio com ausência de lignina, foi o que apresentou um maior crescimento, ocupando a placa por um todo (9 cm) no 4° dia de crescimento, comparado com os meios de cultivos estudados.

O fungo *G. lucidum* apresentou um crescimento semelhante entre os meios estudados. Indicando um melhor crescimento sendo de 4,01cm no 7° dia com uma única fonte de carbono (lignina), na presença de duas atingiu 3,20cm no 7° dia, sendo que cresceu 20% a menos. Já comparado com os controles, estes se desenvolveram melhor. No controle com glucose obteve 5,27 cm no 7° dia, sem glucose obteve 5,4 cm. Podendo indicar que o fungo teve uma maior afinidade com o meio de cultivo contendo somente lignina.

Figura 11 – Comparação do crescimento da colônia fúngica dos fungos (A) *B. ribis,* (B) *G. Lucidum* e (C) *P. ostratus* durante 7 dias.

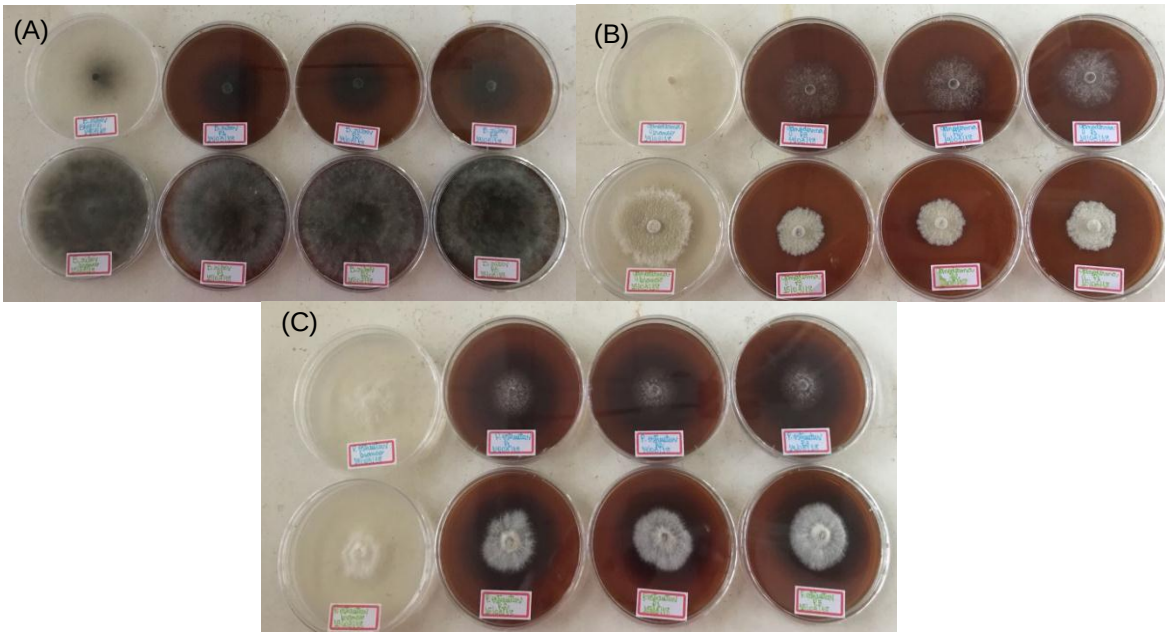


Fonte: Autoria própria

Os três fungos estudados cresceram em todos os meios de cultivo, mas é possível notar que a presença de glucose apresenta-se importância para o melhor desenvolvimento dos fungos *B.ribis* e *P.ostreatus*, isso sugere que o fungo necessita de uma fonte de carbono de mais fácil acesso para se desenvolver inicialmente e se expandir, usufruindo posteriormente da fonte mais complexa, como a lignina.

A presença de glucose também torna, visivelmente, os fungos mais densos, conforme a figura 12.

Figura 12 – Comparação do micélio em meio de cultivo contendo (A) glucose e (B) ausencia glucose, para os fungos (a) *B. ribis*; (b) *G.lucidum*; (c) *P. ostreatus*



Fonte: Autoria própria

5. 2 ANÁLISE DA TAXA DE INIBIÇÃO

A taxa de inibição foi calculada comparando-se o diâmetro micelial do tratamento com o do controle (o controle de ambos os testes não apresentam lignina). A porcentagem de inibição, esta descrito na tabela 4. Os 3 fungos apresentaram taxa de inibição bem distintas, ou seja, onde o *B. ribis* cresceu de forma mais rápida, atingindo 9 cm no 7° dia (com glucose), 4 cm no 7° dia (sem glucose) e o *P. ostreatus* de forma mais lenta atingido 3,64 cm (com glucose) e 2,76 cm (sem glucose).

Tabela 4 – Comparação da taxa de inibição dos fungos *B. ribis*; (b) *G.lucidum*; (c) *P. ostreatus* no meio de cultivo com presença de glucose e ausência de glucose.

Média do crescimento da colônia fúngica no cultivo com ausência de glucose e presença de lignina			
	Média (cm)*	Controle (cm) sem glucose e sem lignina	% de inibição
B. ribis	4,00 (± 0,19)	9,0 (± 0,0)	55,55
Ganoderma	4,01 (± 0,01)	5,4 (± 0,0)	25,74
P. ostreatus	2,76 (± 0,01)	3,05 (± 0,0)	19,34
Média do crescimento da colônia fúngica no cultivo contendo glucose e lignina			
	Média (cm)*	Controle (cm) com glucose e sem lignina	% de inibição
B. ribis	9,00 (± 0,0)	9,00 (± 0,0)	0,00
Ganoderma	3,20 (± 0,12)	5,27 (± 0,0)	39,27
P. ostreatus	3,64 (± 0,13)	3,75 (± 0,0)	2,90

*média do crescimento da colônia fúngica no 7° dia.

Fonte: Autoria própria

Com os valores da taxa de inibição apresentadas na tabela 4 pode-se observar que os fungos cresceram mais no meio de cultivo contendo duas fontes de carbono, como por exemplo, o *B. ribis* não apresentou porcentagem de inibição, ou seja, ele cresceu ate que ocupasse a placa por um todo (100%) enquanto o *P. ostreatus* cresceu 97,1%, ou seja, inibiu pouco.

Segundo Birolli et. at. (2014), fungos que não apresentam taxa de inibição possuem uma facilidade de crescimento em meio de cultivo contendo lignina, o que indica que esses microrganismos apresentam capacidade de quebrar a matriz ligninolitica.

Já no meio de cultivo contendo somente uma fonte de carbono (lignina) os fungos tiveram uma maior taxa de inibição, ou seja, apresentaram um menor crescimento o que pode indicar que algo estava deficiente no meio de cultivo.

A taxa de crescimento é o inverso da de inibição, ou seja, aquele microrganismo que mais inibi menos cresce.

Através desses cálculos é possível observar que a glucose passa a ser essencial para o melhor desenvolvimento inicial do fungo, pois no experimento na presença de glucose todos os fungos estudados: *B.ribis, G. lucidum, P. ostreatus* obtiveram uma menor taxa de inibição, sendo 0%; 39,27% e 2,9% respectivamente e

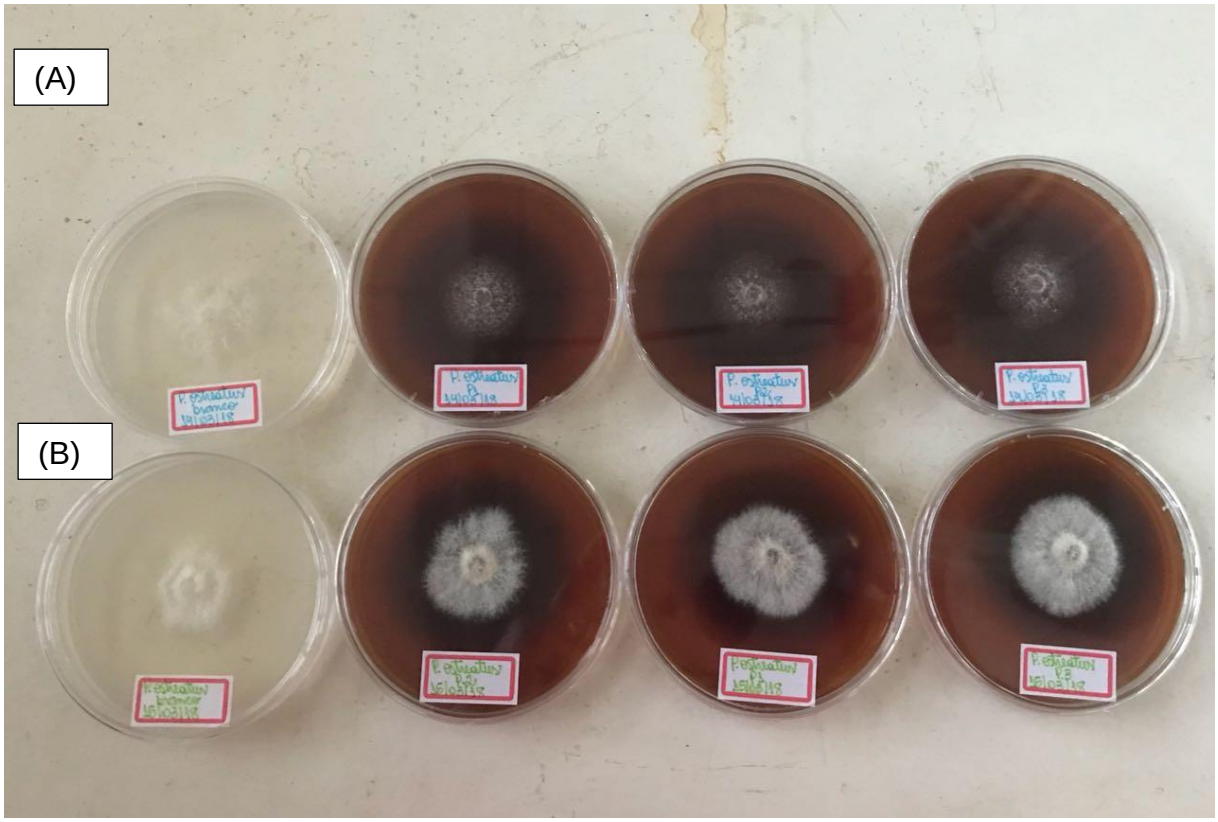
por tanto uma maior taxa de crescimento sendo: 100%, 60,93% e 97% respectivamente.

5.3 ANÁLISE DAS MODIFICAÇÕES NO MEIO SÓLIDO

Dentre os fungos estudados o *P.ostreatus* modificou a coloração inicial de ambos meios de cultivo (figura 13). O microrganismo produziu um halo de coloração vermelho escuro, apenas nas placas dos cultivos, exceto no controle, o que pode ser um indicativo da biotranformação da lignina. Esse halo começa a ser observado no 4° dia de crescimento e assim a cada dia havia a progressão e se tornava mais nítido a coloração escura.

Segundo EASTWOOD et al. (2011) essa mudança de coloração pode ser resultante de pigmentos da lignina ou então metabolitos do polímero.

Figura 13 – Formação do halo de coloração vermelho escuro pelo fungo *P. ostreatus* (A) na ausência de glucose; (B) na presença de glucose.



Fonte: Autoria própria

5.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE INDUTIVA E CONSTITUTIVA

A atividade da enzima lacase foi realizada com os fungos *B.ribis, G.lucidum* e *P.ostreatus* para que se pudesse escolher o melhor produtor de lacase na presença de lignina. Para isso foi realizado o teste de lacase constitutiva, ou seja, para que pudéssemos ter o valor de lacase produzida pelo fungo sem indutor e o teste para lacase indutiva, visando obter um maior valor de atividade enzimática na presença da lignina. O uso de indutor na produção de lacase é para que aumente a produção da mesma (LACERDA, 2015).

A atividade da enzima foi calculada no 5° dia de cultivo e foi analisada na presença de dois substratos, sendo eles: ABTS e DMP, conforme a tabela 5.

Tabela 5 – Atividade enzimática da enzima lacase (A) constitutiva e (B) indutiva dos fungos *B. ribis*, *G. lucidum*, *P. ostreatus.*

	(A) Lacase contitutiva – Ausência de lignina		(B) Lacase indutiva – Presença de lignina	
Microganismo	ABTS (U/mL)	DMP (U/mL)	ABTS (U/mL)	DMP (U/mL)
B. ribis	0,14	0,05	0,00	0,00
G. lucidum	0,00	0,00	0,00	0,00
P. ostreatus	3,90	1,20	4,90	1,90

Fonte: Autoria própria

Na presença do substrato ABTS houve uma maior quantificação da enzima do que na presença do substrato DMP, tanto na presença do indutor ou não.

No substrato ABTS, o fungo *B. ribis* produz 0,14 U/mL de lacase constitutiva e na presença da lignina não foi possível produzir nessas condições de estudo. Nesse caso o indutor pode ter inibido a produção. Já o fungo *G. lucidum* nessas condições de estudo não produziu lacase. O *P. ostreatus* produziu 3,9 U/mL de lacase constitutiva e houve um aumento dessa produção com a presença do indutor, ou seja, produziu 4,9 U/mL.

Para o substrato DMP o único fungo que apresentou atividade de lacase significativa foi o *P.ostreatus*, sendo 1,2 U/mL de lacase constitutiva e 1,9 U/mL de lacase indutiva.

O fungo *P. ostreatus* foi selecionado para as demais análise devido ter se desenvolvido 97,1%, apresentando uma modificação na coloração do meio de cultivo e na atividade enzimática com indução.

5.5 AVALIAÇÃO DA LIGNINA COMO AGENTE INDUTOR DE LACASE PARA O *Pleurotus ostreatus* NA PRESEÇA DE LIGNINA

A produção da atividade de lacase foi otimizada para o fungo *P. ostreatus* com base na metodologia de superfície de respostas usando concentrações diferentes de extrato de levedura (0; 2 e 4%) lignina (0; 0,25 e 0,5%) e tempo de incubação (4; 7 e 10 dias). As atividades de lacase utilizando-se como substratos ABTS e DMP. Os resultados estão apresentados na tabela 6. A otimização foi realizada para que se pudesse obter a melhor condição de se produzir o pico máximo de lacase na presença do indutor, a lignina.

Tabela 6: Condições e resultados obtidos no planejamento fatorial para quantificação da atividade de lacase pelo substrato ABTS e DMP

Variáveis				Respostas	
Experimento		X_2	X_3	ABTS	DMP
1	-1	-1	0	0,113	0,067
2	+1	-1	0	0,316	1,26
3	-1	+1	0	1,58	0,04
4	+1	+1	0	1,2	1,7
5	-1	0	-1	2,24	0,97
6	+1	0	-1	2,42	1,85
7	-1	0	+1	3,76	1,05
8	+1	0	+1	3,63	2,75
9	0	-1	-1	0,31	0,64
10	0	+1	-1	0,81	0,68
11	0	-1	+1	0,14	0,29
12	0	+1	+1	6,49	4,45
13	0	0	0	0,22	0,16
14	0	0	0	0,20	0,16
15	0	0	0	0,22	0,25

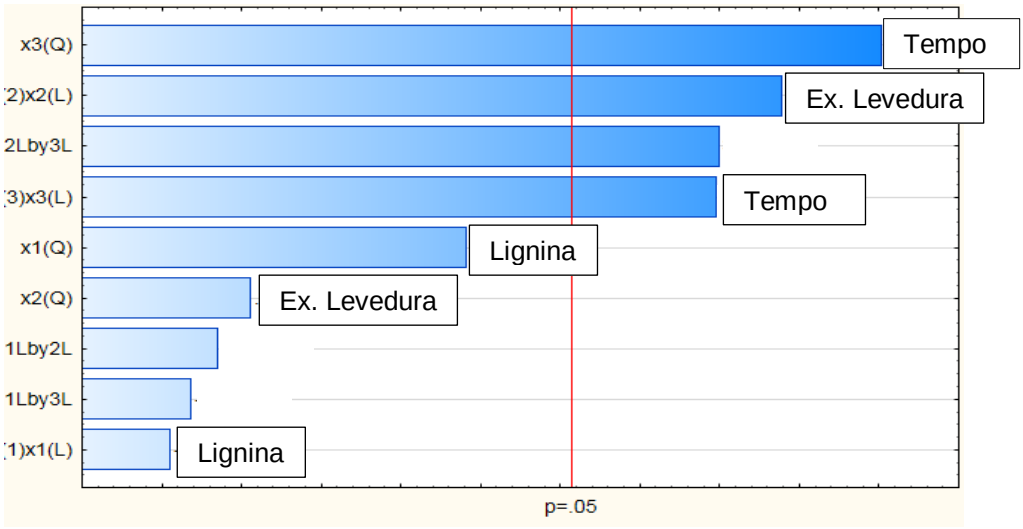
Fatores	Valores Reais		
	-1	0	+1
X1 – Lignina (%)	0	0,25	0,5
X2 – Extrato de levedura (%)	0	2	4
X3 – Tempo (d)	4	7	10

Fonte: Autoria própria

Os resultados apresentados no gráfico de Pareto (figura 14 e 15) mostram a importância relativa de cada variáveis estudada. Quando a lacase foi determinada com o substrato ABTS, com um nível de confiança de 95%, observou-se que a variável X1 (lignina) não foi significativa. O extrato de levedura foi o fator mais importante seguido do tempo de cultivo.

O tempo de cultivo foi a variável que mais influenciou na produção de lacase, seguido do extrato de levedura. A lignina foi a variável que menos influenciou na produção da mesma.

Figura 14 – Gráfico de Paretos para o substrato ABTS com as três variáveis estudadas e ilustrando o nível de significância para cada uma.

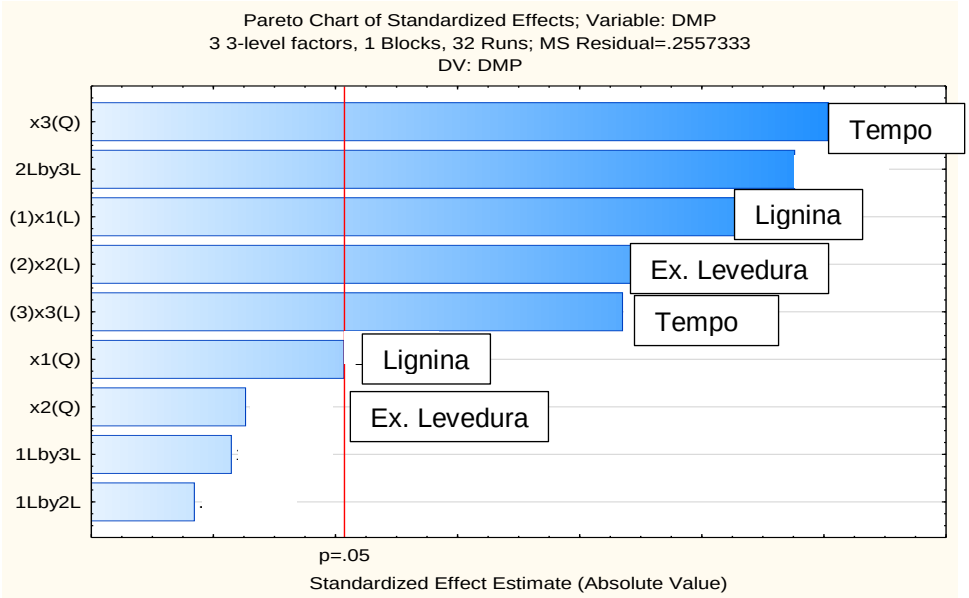


Fonte: Programa computacional Statistica10.0 – adaptado pelo autor

A figura 15 mostra o gráfico de Paretos para o substrato DMP. O nível de confiança é o mesmo do ABTS, 95%.

Para o substrato DMP observou-se que todas as variáveis estudadas são importantes para a produção da enzima.

Figura 15 – Gráfico de Pareto referente aos resultados da produção de lacase determinada pelo substrato DMP com as três variáveis estudadas e ilustrando o nível de significância para cada uma



Fonte: Programa computacional Statistica10.0 – adaptado pelo autor

Devido à interação entre tempo de incubação e lignina estar abaixo do nível de confiança e todas as demais variáveis de estudo serem significativas, originou-se um novo estudo para o substrato DPM, sendo este para confirmar se a lignina induzia a produção de lacase.

Um novo estudo foi realizado somente para o substrato DMP e com duas variáveis. As variáveis foram lignina e extrato de levedura, conforme tabela 7. O tempo de incubação nesse planejamento passou a ser fixo em dez dias, devido à baixa interação com a lignina no estudo anterior.

Tabela 7: Condições e resultados obtidos no planejamento fatorial para quantificação da atividade de lacase pelo substrato DMP

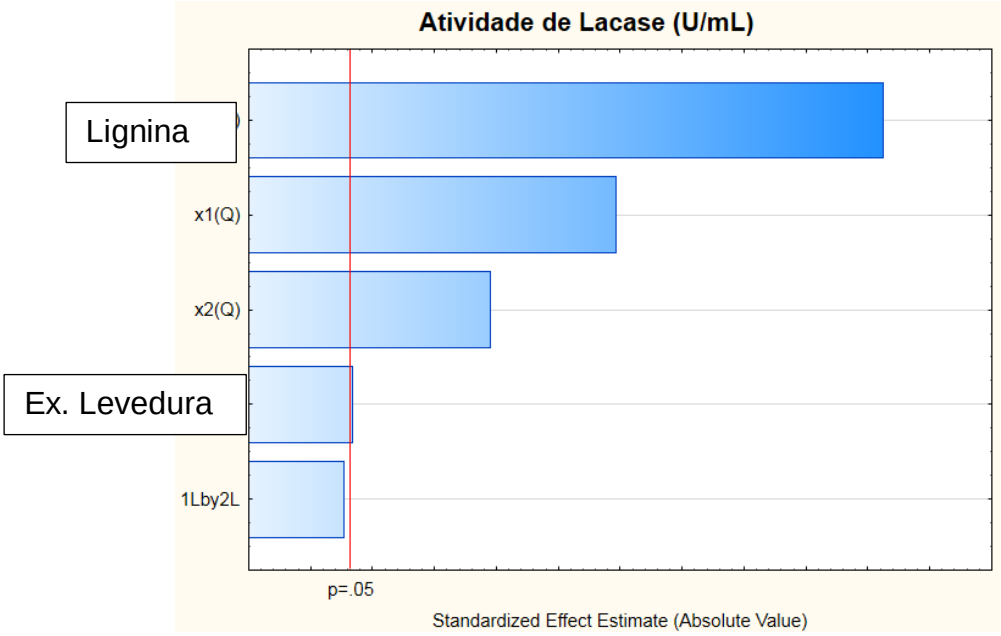
Variáveis			Respostas
Experimento	X_1	X_2	DMP (U/mL)
1	-1	-1	4,6
2	-1	0	5
3	-1	+1	5,1
4	0	-1	3,1
5	0	+1	3,5
6	+1	-1	0,14
7	+1	0	0,18
8	+1	+1	0,2
9	0	0	5,4
10	0	0	5,6
11	0	0	5,6
12	0	0	5,7

Fatores	Valores Reais		
	-1	0	+1
X1 – Lignina (%)	0,5	1,25	2,0
X2 – Extrato de levedura (%)	3,0	4,0	5,0

Fonte: Autoria própria

Através dos experimentos realizados pode-se notar que o ponto central (experimento de 9 a 12) foi os que deram maior produção de lacase. Originou-se um gráfico de Pareto (figura 16) para que pudesse analisar a importância relativa das variáveis.

Figura 16 – Gráfico de Paretos para DPM com as duas variáveis estudadas e ilustrando o nível de significância para cada uma.



Fonte: Programa computacional Statistica10.0 – adaptado pelo autor

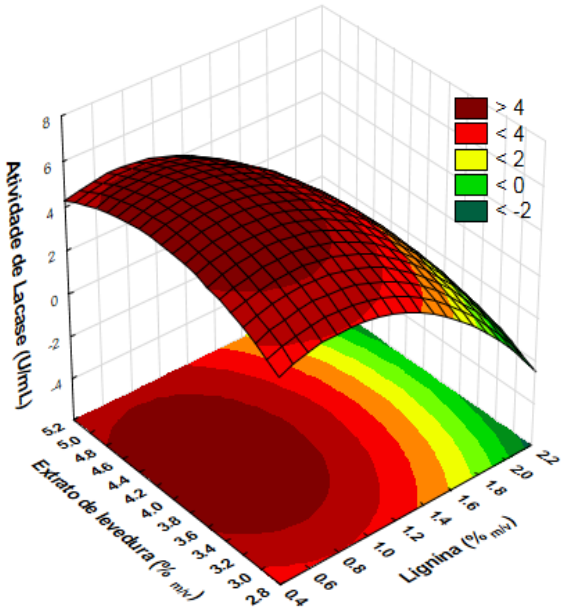
Com essa nova condição de estudo, foi possível observar que a lignina é o fator mais significativo para produção de lacase, ou seja, ela induz a produção de lacase, quando a atividade foi determinada pelo substrato DMP.

Na análise dos dois substratos (ABTS, DMP) nas mesmas condições, foi possível notar a produção de enzima, gerando uma possível indicação da produção de isoenzimas de lacase pelo fungo estudado. Portando para o substrato DMP uma das variáveis de estudo, a lignina, induziu a produção de enzima lacase, mostrando que essas enzimas podem ter afinidade especificas por determinados substratos, ABTS, DMP, guaiacol, dentre outros. Conforme relatos de Viswanath e colaboradores (2008), a produção de isoenzimas de lacase é comum em fungos ligninolíticos.

Tunes et al. (2011) descreve isoenzimas como variações de uma dada enzima dentro de um organismo, que apresentam uma mesma especificidade de substrato.

Foi possível obter a superfície de resposta (figura 17) para o substrato DMP, onde se se estima a máxima atividade de lacase em 5,73 U/mL.

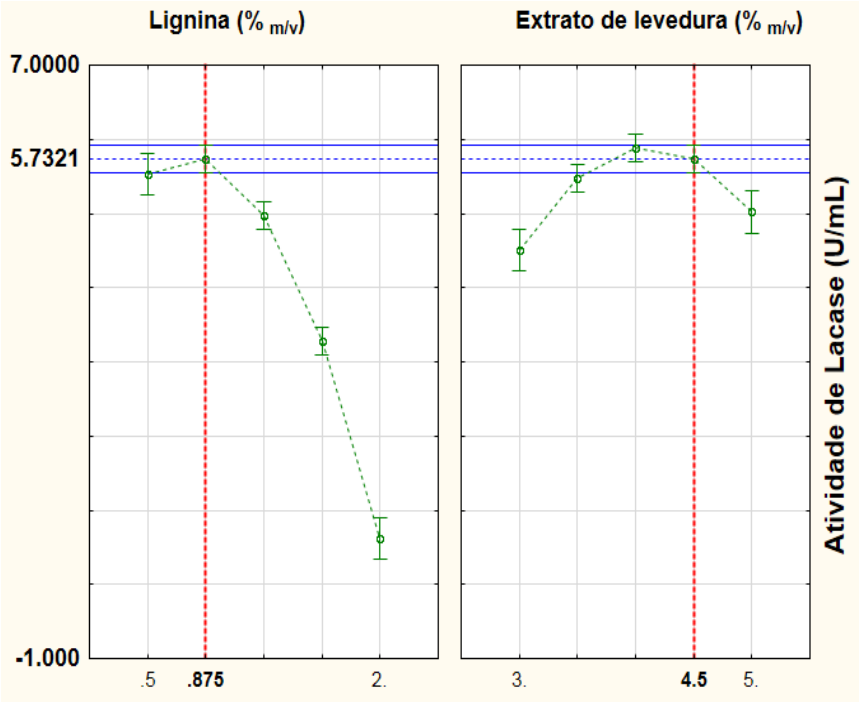
Figura 17 – Gráfico de superfície de resposta com duas variáveis, sendo lignina e extrato de levedura.



Fonte: Programa computacional Statistica10.0 – adaptado pelo autor

Para se obter a maior produção de lacase ficou definido as seguintes condições: 0,875 de lignina, 4,5% de extrato de levedura e 10 dias de cultivo a 180 RPM, conforme monstra na figura 18.

Figura 18 – Melhor cocentração dos componentes do meio de cultivo para a produção ótima de lacase



5.6 VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

Após obter a concentração ideal para a maior produção da enzima lacase, foi realizado laboratorial para que se confirmem as concentrações. Estas concentrações são: 4,5% de extrato de levedura e 0,875% para lignina e um tempo fixo de 10 dias. A atividade enzimática produzida foi de 5,68 (±0,03), demonstrando que as concentrações das variáveis são de confiança.

5.7 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CLAE

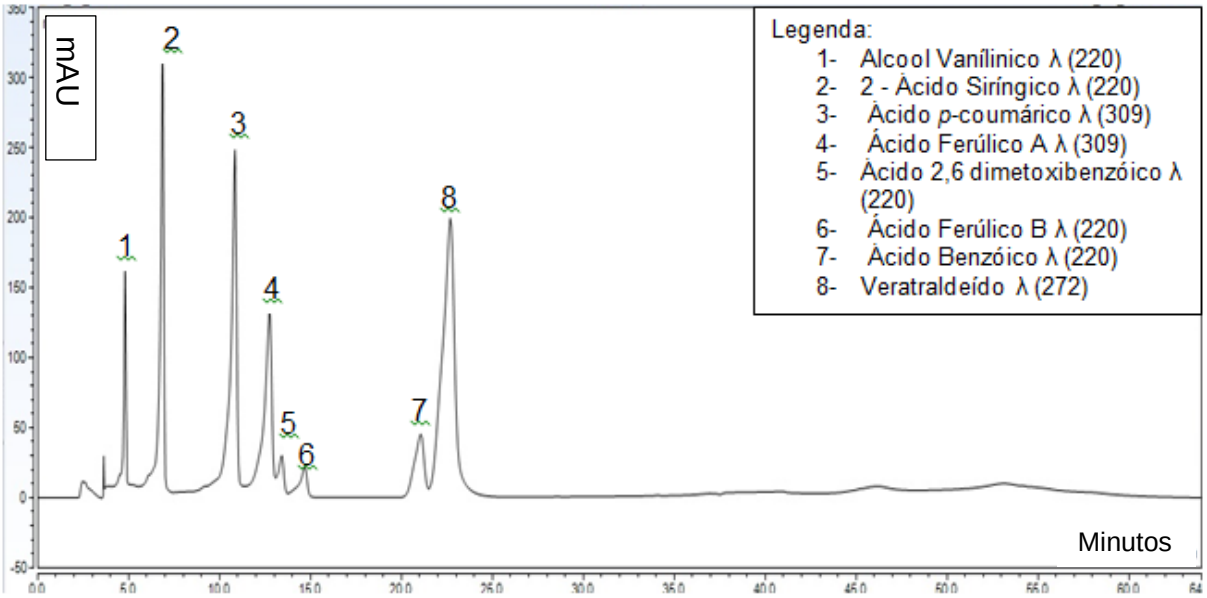
As condições cromatográficas escolhidas mostraram-se adequadas para identificar os possíveis metabólitos provenientes da biotrasnformação da lignina. Os padrões analíticos, descritos no quadro 7, são possíveis metabólitos formados da degradação da lignina. Uma solução contendo os 8 padrões foi analisada conforme a figura 15. Com a análise foi possível obter o tempo de retenção de cada padrão, assim como a área e o melhor comprimento de onda, indicando que não houve uma coeluição de outro composto.

Quadro 7 – Tempo de retenção e área para cada padrão na condição estudada.

Padrões	Tempo de retenção	Área
Alcool Vanílinico λ (220)	4,807	19,23
Ácido Siríngico λ (220)	6,867	70,77
p-coumárico λ (309)	10,840	124,96
2,6 dimetoxibenzóico λ (220)	13,417	9,43
Ácido Ferúlico A λ (309)	12,747	89,16
Ácido Ferúlico B λ (220)	14,683	8,99
Ácido Benzóico λ (220)	21,057	28,5
Veratraldeído λ (272)	22,690	136,84

Fonte: Autoria própria

Figura 19 – Cromatograma com o mix de padrões dos possíveis metabólitos da biotransformação da lignina: Álcool Vanilítico, Ácido Siríngico, Ácido *p*-coumárico, Ácido Ferúlico A e B, Ácido 2,6 dimetoxibenzóico, Ácido Benzóico e Veratraldeído.



Fonte: Autoria própria

5.8 CURVA DE CALIBRAÇÃO

A curva de calibração é de suma importância para avaliar a linearidade do método, a qual foi avaliada a partir de 4 concentrações diferentes, para os 7 padrões analíticos estudados. As concentrações foram: 0,005; 0,01; 0,05; 0,10 mg/mL.

Na tabela 8 estão indicados os comprimentos de onda que resultaram em uma maior absorbância para cada um dos padrões.

O coeficiente de correlação (R^2) da curva analítica, que é uma maneira de medir a qualidade do ajuste linear, foi considerado bom (tabela 8), pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais (FILHO et al. , 2011).

Tabela 8 – Resultado da curva de calibração para os padrões estudados, coeficiente de correlação e equação da reta, individual.

Padrão analítico	λ (nm)	Equação da reta	R^2
Ác. 2,6-dimetilbenz.	220	$y = 0{,}0018x - 0{,}0006$	0,9959
Ácido Benzoico	220	$y = 0{,}0005x - 0{,}0003$	0,9976
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
Ácido Siríngico	220	$y = 0{,}0006x - 0{,}0002$	0,9977
Ácido Vanílico	220	$y = 0{,}0016x - 0{,}0016$	0,9968
Ácido *p*-coumárico	309	$y = 0{,}0005x + 0{,}0008$	0,9989
Veratraldeído	272	$y = 0{,}0006x - 0{,}00009$	0,9981

Fonte: Autoria própria

Todos os valores do estudo encontram-se de acordo com o que a ANVISA recomenda, ou seja, os coeficientes maior ou igual a 0,99, portanto considera-se linear.

A análise individual do padrão ácido Ferúlico indicou a presença de dois picos (T.R. 12,747 min e T.R. 14,683 min). Isso pode indicar uma possível degradação do padrão e resultante formação de seus monômeros. Por este motivo, neste trabalho indicamos os dois picos como Ferúlico A (12,747 min) e Ferúlico B (14,683 min).

5.9. ENSAIO DE RECUPERAÇÃO

O estudo de recuperação dos 7 padrões analíticos (sigma), foi realizado após adição de um mix contendo os mesmos em três diferentes concentrações (0,05; 0,10; 0,15 mg/mL), ao extrato livre de células, seguindo com a extração por partição liquido-líquido com o solvente acetato de etila (1:1).

Foram analisadas a amostra 1 (Amostra real) com e sem ácido e a amostra 3 (Branco: Amostras de controle abiótico com lignina - meio de cultivo e lignina). A amostra sem ácido foi nomeada como A e a amostra com ácido foi nomeada como B. O percentual de recuperação dos padrões foi calculado pela equação 2 e os resultados apresentados no quadro 8. Os valores foram calculados através do *software* Chromeleon.

Quadro 8 – Ensaio de Recuperação em três concentrações (0,05; 0,10; 0,15 mg/mL) de mix de padrões analíticos* nas amostra real sem ácido (A) e com ácido (B)

	% recuperação Amostra A**			% recuperação Amostra B***		
Padrões*	[0,05mg/mL]	[0,10 mg/mL]	[0,15 mg/mL]	[0,05mg/mL]	[0,10 mg/mL]	[0,15 mg/mL]
Álcool Vanílinico λ (220)	*	*	2,73 (±0,01)	*	58 (±1,2)	60,93 (±0,8)
Ácido Siríngico λ (220)	*	*	*	*	*	*
p-coumárico λ (309)	*	*	*	*	*	*
2,6 dimetoxibenzóico λ (220)	23,06 (±0,1)	29,3 (±0,2)	24,68 (±0,3)	94,2(±1,0)	10,45 (±0,3)	*
Ácido Ferúlico A λ (309)	*	*	*	*	*	*
Ácido Ferúlico B λ (220)	0	5,86 (±0,1)	20,88 (±0,2)	*	*	68 (±2,3)
Ácido Benzóico λ (220)	9,2 (±0,12)	7,5 (±0,1)	7,2(±0,2)	*	*	1,13 (±0,1)
Veratraldeído λ (272)	41,46 (±0,3)	43,15 (±0,2)	45,11(±0,3)	9,6 (±0,2)	7,0 (±0,1)	6,46 (±0,05)

**Amostra A - Amostra real sem acidificar
***Amostra B – Amostra real acidificada
Fonte: Autoria própria

Os resultados do quadro 8 indicam que a acidificação da amostra não alterou a quantidade de compostos extraídos. Para ambas amostras, com e sem ácido, foram recuperados apenas 5 dos 7 padrões adicionados, sendo eles álcool vanilínico, ácido 2,6 dimetoxibenzóico, ácido ferúlico B, ácido benzóico e veratraldeído.

O ensaio em meio acido resultou em uma emulsão muito difícil de ser separada, o que provavelmente prejudicou a extração eficiente dos padrões. O resultado para a menor concentração estudada do ácido 2,6 dimetoxibenzóico não parece correto, podendo ter sido influenciado por algum fator desconhecido.

Para a amostra sem a presença do ácido, observa-se uma melhor recuperação mesmo para baixas concentrações (de 9,2 a 41,46 mg/mL). Para a concentração intermediária a recuperação variou entre 5,86 a 43,15 mg/mL e para a maior concentração a variação foi de 2,73 a 45,11 mg/mL. A melhor recuperação foi obtida para o composto veratraldeído.

5.10 ANÁLISE DA LIGNINA

A lignina (sigma) utilizada para o preparo da amostra real foi também estudada separadamente. Para tal, foi dissolvida em metanol (70 MeOH:30 H_2O) e analisada por CLAE. Foram analisados os cromatogramas nos 3 comprimentos de onda (220, 272 e 309 nm) que resultaram em uma maior absorbância para os padrões estudados (conforme tabela 9). Em 220 nm foi possível observar a formação de 27 picos. em 272 nm observou-se 18 picos e em 309 nm, 17 picos. Os resultados estão no tabela 9.

Nenhum dos tempos de retenção dos padrões estudados foram coincidentes com o obtidos para a lignina. Isso indica que os monômeros estudados (álcool vanilínico, ácido 2,6 dimetoxibenzóico, ácido ferúlico, ácido benzóico e veratraldeído, ácido siríngico, ácido para-coumárico) não estavam originalmente presentes na lignina.

Tabela 9 – Análise da lignina: tempo de retenção (min) e área de cada pico (mAu/min) em 3 comprimentos de onda (220, 272 e 309)

PICOS	λ220		λ272		λ309	
-	TR	AREA (mAU/min)	TR	AREA(mAU/min)	TR	AREA
1	2,047	0,6199	2,517	0,1213	2,517	0,1938
2	2,227	0,2491	2,653	0,1935	2,653	0,1371
3	2,660	1,1498	3,283	0,6363	2,793	0,0831
4	2,833	0,0244	3,570	0,9558	3,283	0,2946
5	3,280	3,5806	4,007	0,1073	3,570	0,9616
6	3,507	0,1169	4,403	0,2346	3,997	0,0849
7	3,573	0,8667	4,650	0,5093	4,703	0,3271
8	4,010	0,3082	4,907	0,1430	4,913	0,2186
9	4,207	0,1198	5,217	0,8198	5,220	0,1573
10	4,420	1,4858	5,407	0,1000	5,513	0,1081
11	4,650	0,5649	5,903	0,2142	5,907	0,1523

12	7,763	0,0846	6,270	1,0662	6,267	0,9911
13	4,917	0,0525	6,917	1,3256	6,910	0,4651
14	5,217	5,2111	9,673	0,1493	7,183	0,1053
15	5,713	0,4265	9,980	0,2604	11,480	2,4419
16	5,897	0,1989	11,480	2,2609	13,250	0,6639
17	6,267	2,7241	13,247	0,8250	19,853	0,4642
18	6,917	3,4147	17,620	0,3310		
19	7,310	0,6478				
20	7,840	1,5598				
21	9,660	0,5011				
22	9,987	0,4043				
23	10,523	0,4498				
24	11,480	2,7775				
25	13,250	1,1603				
26	19,907	0,3281				
27	20,443	0,2326				

Fonte: Autoria própria

5.11 ANÁLISE DOS POSSÍVEIS METABÓLITOS

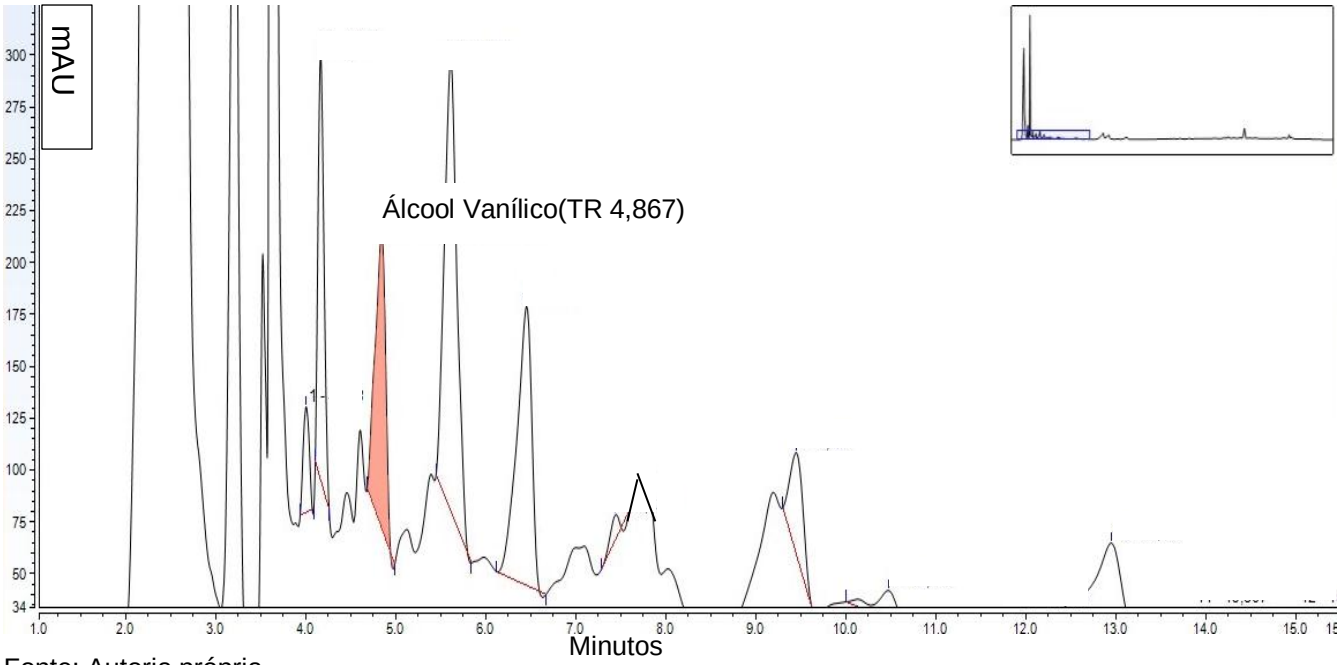
Para a análise da influência do fungo estudado na biotransformação da lignin e formação de possíveis metabólitos, optou-se pela extração da mesma sem a presença de ácido, uma vez os resultados do ensaio de recuperação foram mais expressivos.

A tabela 10 mostra os tempos de retenção e área (mAU/min) dos possíveis metabólitos de biodegradação da lignina formados pela ação do fungo, nos comprimentos de onda 220, 272, 309 nm.

No comprimento de onda 220 nm foi possível observar 9 picos (TR: 4,163; 4,487; 12,96; 18,2; 19,34; 22,887; 43,227; 45,6; 46,36) presentes somente na amostra. Esses picos não aparecem nem no meio de cultivo (controle) e nem na lignina (branco) e podem indicar a biotransformação da lignina, sendo possíveis metabólitos. Entretanto, nenhum desses picos teve tempo de retenção coincidente com os dos padrões estudados.

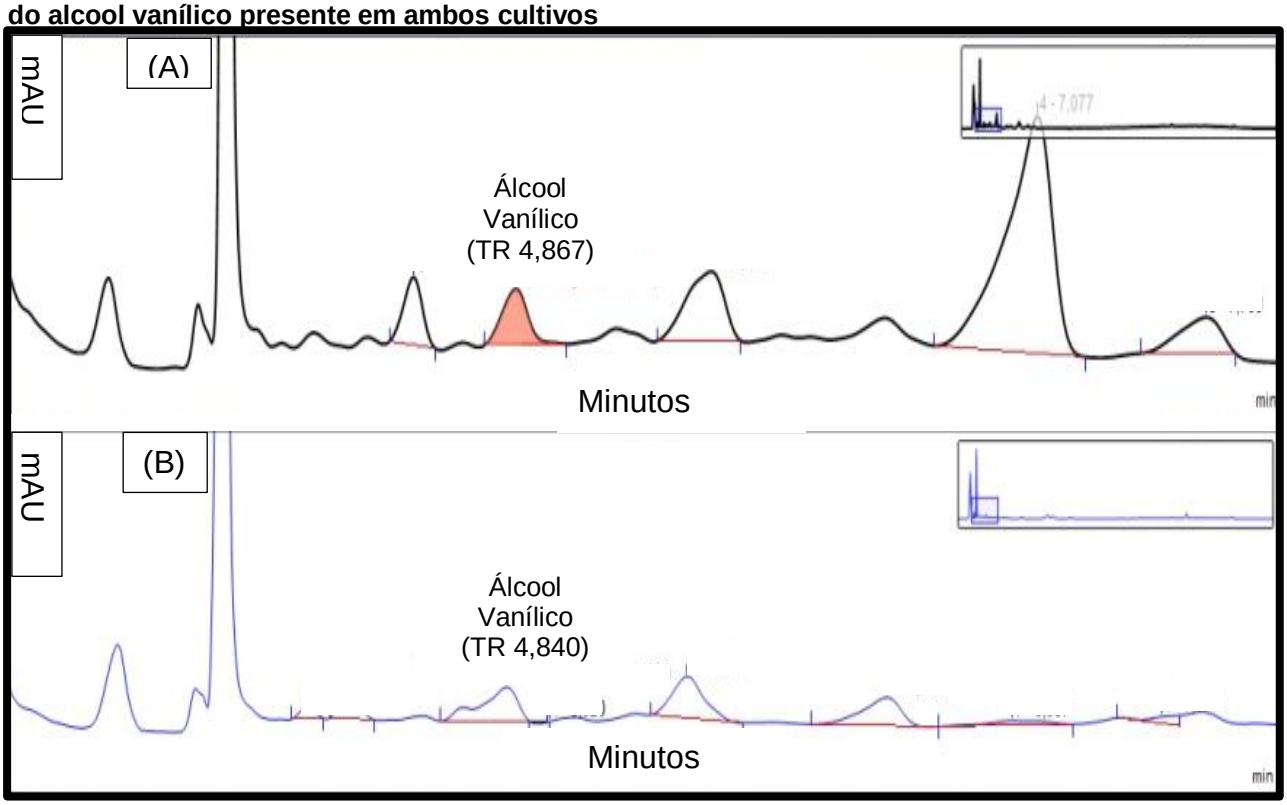
Em contrapartida, em 220 nm um pico apresentou tempo de retenção concordante à um dos padrões estudados - o álcool vanilíco, com tempo de retenção de 4,863 min. O pico, na amostra real, neste tempo de retenção apresentou-se com uma area de 24,8395 (±1,5) (mAU/min). Um pico com o mesmo tempo de retenção também pode ser observado em menor quantidade no branco (21,0325 ±3,6), e não foi observado no controle (meio de cultivo com ausencia de lignina). Assim, este pico do álcool vanilíco presente na amostra real e no branco possivelmente originou-se no processamento dos meios de cultivo, pondendo ser um indicativo que o fungo biotransformou a lignina na amostra real, dando origem á um pico do álcool vanilíco com área de 3,807 (mAU/min) maior do que a área apresentada no branco. Os cromatogramas que mostram este pico em destaque pode ser visto na figura 20 e 21.

Figura 20: Cromatograma da amostra real (fungo na presença de lignina), indicando o pico do álcool vanílico



Fonte: Autoria própria

Figura 21: Cromatograma do branco (A) e da amostra real (B) sobrepostos, indicando o pico do alcool vanílico presente em ambos cultivos



Fonte: Autoria própria

No comprimento de onda 272 nm houve a detecção de 14 picos, sendo que apenas 4 (TR:12,97; 18,203; 19,34; 46,38) foram encontrados apenas na amostra. Esses picos também não aparecem nem no meio de cultivo e nem na lignina (branco) e podem indicar a biotransformação da lignina, sendo possíveis metabólitos. Entretanto, nenhum dos 14 picos originados teve tempo de retenção coincidente com os dos padrões estudados.

Em 309 nm, foi possível a visualização de 48 picos. Dentre esses, 10 estão presentes somente na amostra, (T.R. 2,653; 4,163; 4,447; 5,053; 5,603; 9,447; 12,94; 35,92; 46,387; 48,583 min). Nenhum dos picos teve tempo de retenção coincidentes aos dos padrões estudados. No quadro 09 está demonstrando os picos encontrado nos comprimentos de onda 220,272 e 309.

Quadro 09 – Tempos de retenção e area (mAU/min) dos possíveis metabólitos de biodegradação da lignina formados pela ação do fungo, nos comprimentos de onda 220, 272, 309 nm.

220				272				309			
TR	Branco	Controle	Amostra	TR	Branco	Controle	Amostra	TR	Branco	Controle	Amostra
4,003		8,1368 (±2,5)	3,3924 (±0,5)	2,353	516,7415 (± 61,5)	529,3415 (± 113,9)	666,7977 (± 134,2)	1,947			
4,163			15,185 (±0,57)	3,517	10,4004 (±1,4)	17,8432 (±1,82)	8,0930 (± 1,3)	2,497		143,3833 (± 12,1)	
4,177		15,6324 (±3,7)		3,633	136,4437 (±17,6)	192,8543 (± 45,1)	190,5700 (± 30,9)	2,607	36,217 (± 1,4)		
4,43	18,2868 (±3,7)			4,74		4,2526		2,653			57,135 (± 8,4)
4,487			1,6756	6,43	13,7068 (± 2,3)	20,8816		3,64	9,6815 (± 2,5)	0,9135 (± 0,01)	52,658 (± 5,4)
4,743		40,5929 (±15,72)		7,077	55,7267 (± 9,8)			3,777	0,6706 (± 0,4)		
4,863	21,0325 (±3,6)		24,8395 (±1,5)	10,11		22,046 (± 4,7)		3,807		8,4995 (± 2,1)	
5,61		16,4209 (±2,1)	29,0958 (±4,1)	11,677	130,3601 (±26,6)			4,027	1,7245 (± 1,0)		
5,693	37,9454 (±5,1)			12,97			29,1224	4,163			8,6175 (± 3,0)
6,433		10,8313 (±6,11)	23,5791 (±1,58)	13,507	58,705 (± 10,4)			4,177			
7,077	148,101 (±25,9)			18,203			70,6761 (± 3,6)	4,193	1,5738 (± 2,1)	2,742 (± 0,2)	
7,797	24,0087 (±0,8)	15,5217 (±3,48)		19,34			65,7267 (± 8,5)	4,21		16,5953 (± 2,8)	
9,177	28,6341 (±5,01)	19,5648 (±5,4)		42,66		14,2621 (± 3,1)		4,447			0,4676 (± 0,01)

9,893	9,4602 (±1,6)			46,38			159,8791 (± 2,1)	4,6			
10,11		75,8994						4,74		3,7782 (± 0,6)	
11,683	154,5113 (±30,0)							5,053			1,1644 (± 0,2)
12,96			43,1327 (±15,3)					5,293	2,9683 (± 0,4)		
13,51	74,9243 (±12,3)							5,58	1,0178 (± 0,3)		
14,743	182,2483 (±6,7)							5,603			6,242 (± 1,0)
18,2			146,4285 (±24,5)					5,983	4,8895 (± 1,8)		
19,34			98,3075 (±21,3)					6,433		31,9625 (± 7,8)	
22,887			41,5982 (±4,31)					7,067	13,731 (± 3,8)		
32,47		18,886 (±2,5)						9,447			2,2851 (± 0,5)
33,557		13,8300 (±7,4)						10,11	9,0087 (± 1,2)		
43,227			8,7109 (±0,45)					11,68	158,33 (± 11,2)		
45,6			7,6954 (±0,64)					12,94		39,4875 (± 6,2)	17,283 (± 2,5)
46,36			89,8524 (±2,6)					13,51	59,172 (± 5,34)	8,8793 (± 3,1)	
								17,16	17,818 (± 3,0)		
								19,3	11,453 (± 2,1)		85,156 (± 8,1)

29,347			5,2301 (± 2,0)
30,343	3,3073 (± 0,4)		
31,983			
32,463	5,4828 (± 1,2)		
33,533	9,1049 (± 1,8)		2,4947 (± 0,5)
34,253	2,0178 (± 0,4)	1,7972 (± 0,4)	
35,143	4,9041 (± 0,2)		
35,92			2,9202 (± 0,1)
40,717			
42,627	8,6507 (± 2,5)		1,597 (± 0,2)
46,387			13,151 (± 2,6)
46,513	3,0526 (± 1,05)		
46,833	3,6249 (± 1,03)		1,4524 (± 0,3)
47,417	2,5531 (± 0,1)		
47,693			
48,583			0,7553 (± 0,01)
49,06	1,421 (± 0,1)		2,0506 (± 0,2)
49,81	3,9172 (± 0,4)		1,1822 (± 0,3)

50,187	1,8723 (± 0,3)		

Fonte: Autoria própria

6. CONCLUSÃO

O *Pleurotus ostreatus* foi selecionado como o melhor produtor de lacase na presença de lignina. O extrato de levedura seguido do tempo de cultivo foram as variáveis que mais influenciaram a produção de lacase determinada pelo ABTS. A lignina foi a principal variável que estimulou a produção desta polifenol oxidase utilizando-se o DMP como substrato. O ótimo da produção de lacase (5,73 U/mL) foi obtido utilizando-se 0,87 g% de lignina e 4,5 g% de extrato de levedura, em 10 dias de cultivo. Nas análises por CLAE houve o aparecimento de vários picos presentes na amostra que possivelmente são metabólitos da lignina. Entretanto, apenas um pico teve tempo de retenção semelhante à um dos padrões estudados: o álcool vanilinico. Isso indica que possivelmente o fungo foi capaz de biotransformar a lignina dando origem à esse composto.

REFERÊNCIAS

ABDELAZIZ, O. Y. et al. Biological Valorization of Low Molecular Weight Lignin. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1318–1346, dez. 2016.AGBOR, V. B. et al. Biomass Pretreatment: Fundamentals toward Application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675–685, nov. 2011.

ACEVEDO, F. et al. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by the Chilean White-Rot Fungus Anthracophyllum Discolor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, n. 1, p. 212–219, jan. 2011

ALCALDE, Miguel; BULTER, Thomas; ARNOLD, Francesh. Colorimetric Assays for Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungal Laccases - **Journal of Biomolecular Screening** Volume 7, Number 6, 2002.

ALEXANDRINO, A.M.; FARIA, H.G.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Reutilization of Orange waste for production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* Jack:Fr). **Cienc. Tecnol. Aliment,** vol 27, p. 364-368, 2007

ALVES, Alcione Aparecida de Almeida, RUIZ, Giselle Louise de Oliveira; SENS, Maurício Luiz, NONATO, Thyara Campos Martins.Validation of the analytical method in HPLC with post-column derivatization for the quantification of carbamates

ALVES, Fabiano. **Modelagem e Simulação de Biorreator Operando com Fungos *Trametes versicolor* para Produção de Enzima Lacase**. 2010. 80 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Paulo, São Caetano do Sul, 2010.

ARAGÃO, Nádia Machado de, VELOSO, Márcia Cristina da Cunha; ANDRADE, Jailson Bittencourt de. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. ***Quim. Nova,*** Vol. 32, No. 9, 2476-2481, 2009

ARO, T.; FATEHI, P. Production and Application of Lignosulfonates and Sulfonated Lignin. **ChemSusChem**, v. 10, n. 9, p. 1861–1877, 9 maio 2017.

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.

BAPTISTA, N. M. Q. ; SANTOS, A. C.; ARRUDA, F. V. F.; GUSMÃO N. B., Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos - **SCIENTIA PLENA** VOL. 8, NUM. 1 2012 pg.4

BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; HARDY, G. E. S. Veratryl Alcohol as an Inducer of Laccase by an Ascomycete, Botryosphaeria Sp., When Screened on the Polymeric Dye Poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 93–96, ago. 1996.

BASHTAN-KANDYBOVICH, I.; VENKATESAGOWDA, B..; BARBOSA, A.M., MALEK, L., DEKKER, R.F., Modification of kraft lignin by biological demethylation. **J FOR**. 2012;2:16–27.

BATAL, Ahmed I. El-; ELKENAWY, Nora M., YASSIN, Aymen S.; AMIN, Magdy A. Laccase production by Pleurotus ostreatus and its application in synthesis of gold nanoparticles. **Biotechnology Reports.** edição 5 (2015) 31–39.

BATISTA, F.L. **Produção de Lacase e Bioconversão de Flavonóides por *Pycnoporus sanguineus***. 2009. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, Goiás, Goiânia, 2009.

BENOCCI, Tiziano; AGUILAR-PONTES, Maria Victoria; ZHOU, Miaomiao; SEIBOTH, Bernhard; VRIES, Ronald P. de. Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. **Biotechnol Biofuels,** 2017, p.10:152.

BES, Káren. **Extração e caracterização da lignina proveniente da produção de etanol de 2a geração a partir de Arundo e Arroz.** 2015. 85f. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BETTIN, F.; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T. A.; SILVEIRA, M. M.; DILLON, A. J. P. Additive effects of CuSO4 and aromatic compounds on laccase production by Pleurotus sajor-caju PS2001 using sucrose as a carbon source**.** **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, Nº. 02, p. 335-346, 2014.

BIROLLI, W.G.; YAMAMOTO, K. Y.; OLIVEIRA, J.R.; NITSCHKE, M.; SELEGUIM, M.H.R.; PORTO, A.L.M. Biotransformation of dieldrin by the marine fungus *Penicillium miczynskii* CBMAI 930. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n.1, p. 39-43, 2014.

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

BRIJWANI, K.; RIGDON, A.; VADLANI, P. V. Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1–10, 2010.

BRUIJNINCX, Pieter; WECKHUYSEN, Bert; GRUTER, Gert-Jan Gruter; WESTENBROEK, Annita; SMEETS, Edith. **Lignin Valorisation – The importance of a full value chain approach**. Utrecht university. 2016

BRZONOVA, Ivana; ASINA, Fnu; ANDRIANOVA, Anastasia A.; KUBÁTOVÁ, Alena; SMOLIAKOVA, Irina P.; KOZLIAK, Evguenii I.; JI, Yun. **Fungal Biotransformation of Insoluble Kraft Lignin** into a Water Soluble Polymer, 2017.

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

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

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.

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.

CHRISTOPHER, L. P.; YAO, B.; JI, Y. Lignin Biodegradation with Laccase-Mediator Systems. **Frontiers in Energy Research**, v. 2, 31 mar. 2014

CLEMENTINO, L. S.; ROSADO, F. R. Cultivo submerso de *ganoderma lucidum* (curt. ex fr.) karst em diferentes meios de cultura. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, Maringá, v. 4, n. 1, p. 131-144, 2011.

COLLINS, C.H; MANFRETTI, J.F.; VALENTE, A. L. M.; McNAIR, H. M. O que é cromatografia de alta eficiência? (CLAE). **Química Nova**/ Abril 1963.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3–23, jan. 2005.

COLTURATO, Adimara Bentivoglio; FURTADO, Edson Luiz. **CONTROLE DE BOTRYOSPHAERIA RIBIS CAUSADOR DE SECA DE PONTEIRO EM CORYMBIA CITRIODORA, COM EXTRATOS VEGETAIS E FUNGICIDAS**. Summa phytopathol., Botucatu , v. 37, n. 3, p. 137-141, Sept. 2011.

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.

COSTA, Maria Carolina Burgos; ALMEIDA, Cláudio Romero Rodrigues de. A importância do ensino da ferramenta de planejamento fatorial para estudantes de engenharia. In: **XXXIX Congresso Brasileiro de Educação em Engenharia**. 2011

CUNICO, M. W. M. et al. PLANEJAMENTO FATORIAL: UMA FERRAMENTA ESTATÍSTICA VALIOSA PARA A DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS EMPREGADOS NA PESQUISA CIENTÍFICA. **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, 2008.

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

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

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

DOHERTY, William O.S.; MOUSAVIOUN, Payam; FELLOWS, Christopher M. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. **Industrial Crops and Products.** 2011. 259–276.

DORTE, Renato Pinheiro. **Investigação de fungos ligninolíticos na produção de lacase utilizando lignina Kraft e borra de café**. 2019. 91 folhas. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2019.

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

EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K.E. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. **FEBS Letters**, v. 407, p. 89-92, 1996.

ERGUN,Seyma Ozcirak; UREK, Raziye Ozturk. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using Pleurotus ostreatus. **Annals of Agrarian Science** 15, 273 - 277, 2017.

FERNANDEZ-FUEGO, Elena; CASTANERA, Raul; RUIZ-DUEÑAS, Francisco J., LÓPEZ- LUCENO, María F.; RAMÍREZ, Lucía; PISABARRO, Antonio G.; MARTÍNEZ, Angel T. Fungal Biotransformation of Insoluble Kraft Lignin into a Water Soluble Polymer. **Ind. Eng. Chem**. 2014, 56, 6103−6113

FERRAZ, A.L. **Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos.** In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. (Coord.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** 1 ed. Caxias do Sul: EDUCS. 2010, pp 213-242

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.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role ofwater in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.85-101, 2003.

GIARDINA, P.; PEZZELLA, C.; VANHULLE, S.; FARACO, V.; PISCITELLI, A.; SANNIA, G. **Laccases: a never-ending story.** Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, vol 67, nº 3, p.369-385.

GIESE, E.C. et a. 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.

GOCHEV, V.K.; KRASTANOV, A.I. Fungal laccases. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, vol 13, p. 75-83, 2007.

GONCALVES, Francisco José Teixeira et al. **Patogenicidade de espécies de *botryosphaeriaceae* endofíticas de plantas da caatinga do estado do ceará em manga e umbu-cajá**. Summa phytopathol. vol.42, n.1, 2016

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

GUGLIOTTA, A. M.; CAPELARI, M. Taxonomia de basidiomicetos. In: BONONI, V. L. R. **Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas.** São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, 1998. p 68-102.

GUPTA, A.; SHARMA, S.; SAHA, S.; WALIA, S. Yield and nutritional content of Pleurotus sajor caju on wheat straw supplemented with raw and detoxified mahua cake. **Food Chemistry**, v. 141, p.4231– 4239, 2013.

HAO REN, XIN DAI, HUAMIN ZHAI, ZHULAN LIU, SHIGETOSHI OMORI. comparison of bamboo native lignin and alkaline lignin modified by phase-separation method. **Cellulose chemistry and technology**. V. 49 (5-6), 429-438. 2013.

HELM, C. V.; LIMA, E. A. de; BOZA, A. P. O.; PINTO, F. de S.; TERZI, S. da C.; COURI, S. Avaliação de basidiomicetos do gênero anoderma quanto ao potencial de síntese de enzimas ignocelulolíticas. In: **CONGRESSO BRASILEIRO SOBRE FLORESTAS ENERGÉTICAS**, 1., 2009, Belo Horizonte. Anais. Colombo: Embrapa Florestas, 2009

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to Enhance the Digestibility of Lignocellulosic Biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10–18, jan. 2009.

HIRATSUKA, N. et al. Metabolic Mechanisms Involved in Hydroxylation Reactions of Diphenyl Compounds by the Lignin-Degrading Basidiomycete Phanerochaete Chrysosporium. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 3, p. 241–246, maio 2005.

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

HU, L. et al. Predicting Protein Phenotypes Based on Protein-Protein Interaction Network. **PloS One**, v. 6, n. 3, p. e17668, 10 mar. 2011.
in public water suppl. **Revista DAE** | núm. 212 | vol. 66 | Edição Especial 2018.

JARAMILLO-CARMONA et al. Characterization of Asparagus Lignin by HPLC. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 7, 2008.

JUNIOR, Nelson Libardi. **Estudo de Lacases Fúngicas para Degradação de Compostos Interferentes Endócrinos**. 2010. 140 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Santa Catarina, Joinville, 2010.

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. 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

KHATTAB, S. M. R.; WATANABE, T. Bioethanol From Sugarcane Bagasse: Status and Perspectives. In: **Bioethanol Production from Food Crops**. [s.l.] Elsevier, 2019.

KUMAR, A.; GAUTAM, A.; DUTT, D. Biotechnological Transformation of Lignocellulosic Biomass in to Industrial Products: An Overview. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 07, n. 03, p. 149–168, 2016.

KUNJADIA, Prashant D., SANGHVI, Gaurav V., KUNJADIA, Anju P., MUKHOPADHYAY, Pratap N., DAVES,Gaurav S. Role of ligninolytic enzymes of white rot fungi (*Pleurotus* spp.) grown with azo dyes. ***SpringerPlus**,* 5:1487, 2016.

LACERDA, Monike Fabiane Alves Ribeiro. **Degradação de Hormônio Sintético por Meio de Lacases Fúngicas Imobilizadas em Fibras de *Luffa cylindric***. 2015. 83 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente) – Escola de Engenharia Civil da Universidade Federal de Goiás, Goiás, Goiânia, 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.

LINO, Alessandro Guarino. Composição química e estrutural da lignin e lipideos do bagaço e palha da cana-de-açúcar. 108p. Programa de pós graduação em agroquímica – Tese (doutor e cientista) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2015.

LOMASCOLO, Anne; GIMBERT, Isabelle; RECORD, Eric; GEORIS, Jacques. Overproduction of Laccase by a Monokaryotic Strain of *Pycnoporus cinnabarinus* Using Ethanol as Inducer. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, 2003, p. 618-624.

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

MA, L. et al. Efficient decolorization and detoxification of the sulfonated azo dye Reactive Orange 16 and simulated textile wastewater containing Reactive Orange 16 by the white-rot fungus Ganoderma sp. En3 isolated from the forest of Tzu-chin Mountain in China. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 1–9, jan. 2014.

MADHAVI, V.; LELE, S. **Laccase: properties and applications.** Bioresources**,** 2009, vol 4, nº 4**,** p. 1694-1717.

MAGINA, S.; MARQUES, A. P.; EVTUGUIN, D. V. Study on the residual lignin in Eucalyptus globulus sulphite pulp. **Holzforschung**, v. 69, n. 5, 1 jan. 2015.

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.

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

MELO, Tiago Lira, MELO, Vanessa Assis, ALVES, Carlos Alberto, Produção de lacase utilizando planejamento fatorial em meios contendo resíduos agroindustriais - **ENGEVISTA,** V. 19, n.3, 2017 pg 10.

MENEZES, Cristiano Ragagnin de; BARRETO, Andressa Ribas. Biodegradação de Resíduos Lignocelulósicos por Fungos Basidiomicetos: Caracterização dos Resíduos e Estudo do Complexo Enzimático Fúngico. **Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas**, v. 19, n. 2, mai – ago, 2015, p. 1365-1391.

MENEZES, Cristiano Ragagnin de; SILVA, Isis Serrano; DURRANT, Lucia Regina. Sugarcane bagasse: Source for the production of ligninocelullolytic enzymes. **Revista Estudos Tecnológicos** - Vol. 5, n° 1:68-78 (jan/abr 2009) - ISSN 1808-7310

MOROZOVA, O.V.; SHUMAKOVICH, G.P.; SHLEEV, S.V.; YAROPOV, Y.I. Laccase-Mediator Systems and Their applications: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, vol 43, nº 5, 2007.

MUÑIZ, Graciela Inez Bolzon de; KLOCK, Umberto; HERNANDEZ, José Anzaldo; ANDRADE, Alan Sulato de. **Química da Madeira – 3ª edição revisada** – UFPR Setor de ciências agrárias, Engenharia e tecnologia florestal, 2005.

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.

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.

NULTSCH, Wilhelm. **Botânica Geral** – 10ª edição revisada, p. 23-43, 2005.

OTSUKA, Yuichiro; SONOKI, Tomonori; IKEDA, Seiichiro; KAJITA, Shinya; NAKAMURA, Masaya; KATAYAMA, Yoshihiro. Detection and characterization of a novel extracellular fungal enzyme that catalyzes the specific and hydrolytic cleavage of lignina guaiacylglycerol b-aryl ether linkages**. Eur. J. Biochem**. 270, 2353–2362 (2003).

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.

PANDEY, K. K., PITMAN, A. J. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. **Int Biodeterior Biodegradation** 52:151–160, 2003

PERALTA, R.M.; SOUZA, C.G.M.; BOER, C.G. **As principais oxidorredutases de uso industrial.** In: Said, S.; Pietro, R.C.L.R. (Coord.). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. 1 ed. Ribeirão Preto: Legis Summa. Pg 161-184, 2004.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v.10, n.2, p.106-110, 2005

POLLEGIONI, Loredano, TONIN, Fabio, ROSINI, Elena. Lignin-degrading enzymes **FEBS Journal** (2015).

QIN, H. et al. Magnetic core–shell-structured Fe_3O_4@CeO_2 as an efficient catalyst for catalytic wet peroxide oxidation of benzoic acid. **RSC Advances**, v. 8, n. 59, p. 33972–33979, 2018.

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.

RAVEN, Peter H.; EVERT, Ray F.; EICHHORN, Susan E. **Biologia Vegetal** – 6ª edição, p. 17-39, 2001.

REGALADO, V., RODRIGUEZ, A., PERESTELO, F., CARNICERO, A., DE LA FUENTE, G., FALCON, M. A. Lignin degradation and modification by the soil-inhabiting fungus Fusarium proliferatum. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 63:3716–8, 1997

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.

SALDANHA, Roze Lorraine. **Diversidade Genética de Isolados de *Botryosphaeria* e a Produção de Lacases, Pectinases e β-1,3-Glucanases**. 2006. 116 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Londrina, 2006.

SANTOS, Djalma A. P. et al**. ESTUDO QUÍMICO DO FUNGO GANODERMALUCIDUM**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23, 2000. Anais Eletrônicos. Disponível em:<http://www. sbq.org.br/ranteriores/23/resumos/0309/>. Acesso em: Julho 2019.

SANTOS, Nataliene Silva dos, RODRIGUES, John Kennedy Guedes, MENDONÇA, Ana Maria Gonçalves Duarte; Efeito da adição de lignina kraft proveniente da madeira de eucalipto na reologia do CAP 50/70 - **Revista Matéria,** v. 23 n. 3, 2018.

SCHUTYSER, W. et al. Chemicals from Lignin: An Interplay of Lignocellulose Fractionation, Depolymerisation, and Upgrading. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 3, p. 852–908, 2018

SHI, J.; CHINN, M.; SHARMASHIVAPPA, R. Microbial Pretreatment of Cotton Stalks by Solid State Cultivation of Phanerochaete Chrysosporium. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6556–6564, set. 2008.

SHIRAISHI, I. S. **Biodegradação da lignina Kraft:Otimização da produção de lacase pelo isolado fúngico JUMAD053 e análise dos produtos por CLAE**. 2019 Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2019.

SILVEIRA, Ronaldo Luiz Vaz de Arruda; GONÇALVES, Antônio Natal. Crescimento e estado nutricional de *eucalyptus citriodora* cultivado sob doses de boro e sua relação com a agressividade de *botryosphaeria ribis.* **SCIENTIA FORESTALIS** n. 53, p. 57-70, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

SITARZ, Anna K., MIKKELSEN, Jørn D., MEYER, Anne S. Structure, functionality and tuning up of laccases for lignocellulose and other industrial applications. **Critical Reviews in Biotechnology**. ISSN: 0738-8551, p. 1549-7801 (Online) 2016.

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

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry: fundamentals and applications**. 2nd ed ed. San Diego: Academic Press, 1993.

SOLARSKA, S.; MAY, T.; RODDICK, F.A.; LAWRIE, A.C. Isolation and screening of natural organic matter-degrading fungi. **Chemosphere**. 2009. 751–758.

STRONG, P,J.; CLAUS, H. Laccase: A review of its past and future in bioremediation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology,** vol 41, p. 373-434, 2011

SUKUMARAN, R. K.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K. Enzymes for Bioenergy. In: SUGATHAN, S.; PRADEEP, N. S.; ABDULHAMEED, S. (Ed.). **Bioresources and Bioprocess in Biotechnology**. Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 3–43.

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

TAKUR, Vijay Kumar; TAKUR, Manju Kumari. Recent advances in green hydrogels from lignin: a review. **International Journal of Biological Macromolecules.** 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.044.

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

Teixeira, M. B. D.; Oliveira, R. A.; Gatti, T. H.; Suarez, P. A. Z. O Papel: Uma Breve Revisão Histórica, Descrição da Tecnologia Industrial de Produção e Experimentos para Obtenção de Folhas Artesanais. ***Rev. Virtual Quim***., 2017, *9* (3), 1364-1380.

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

TOLEDO, Rômulo César Clemente Toledo. **Caracterização Física, Química, Bioquímica e Produtividade de Linhagens de *Agaricus brasiliensis***. 2008. 59 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Lavras, 2008.

TUNES, Lilian Madruga de; BADINELLI, Pablo Gerzson; BARROS, Antonio Carlos Souza Albuquerque; MENEGHELLO, Geri EduardO; AMARANTE, Luciano do Amarante. Influência dos diferentes períodos de colheita na expressão de isoenzimas em sementes de cevada. **Rev. Ceres, Viçosa**, v. 58, n.2, p. 178-184, mar/abr, 2011.

URBEN, Arailde F. et al. **PRODUÇÃO DE COGUMELOS POR MEIO DE TECNOLOGIA CHINESA MODIFICADA**. [S. l.]: Embrapa, 2001. (Recursos genéticos e biotecnologia).

UZAN, E.; NOUSIAINEN, P.; BALLAND, V.; SPILA, J.; PIUMI, F.; NAVARRO, D.; ASTHER, M.; RECORD, E.; LAMASCOLO, A. High Redox Potential Laccases From the Ligninolytic Fungi *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* Suitable for White Biotechnology: From Gene Cloning to Enzyme Characterization and Applications. **Journal of Applied Microbiology**, 2009, p. 2199–2213.

VALDEBENITO-SANHUEZA, Rosa M. et al . DETECÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA PODRIDÃO BRANCA DA MAÇÃ. **Fitopatol**. bras., Brasília , v. 30, n. 3, p. 217-223, 2005.

VALGINHAK, Débora A.; SANTA, Herta S. D. POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA PAPELEIRA COMO SUBSTRATOS PARA CULTIVO DE GANODERMA LUCIDUM (REISHI). **Revista Agrogeoambiental**, [S.l.], v. 10, n. 3, nov. 2018.

VALLE, Juliana Silveira do. **Produção, Identificação e Caracterização Molecular de Lacases de *Agaricus blazei* Obtidas por Fermentação de Resíduos Agroindustriais**. 2012. 171 p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Paraná, Curitiba, 2012

VECHIA,C.A.D.; MORAIS, B.; SCHONELL, A.P.; DIEL, K.A.P.; FAUST, C.; MENIN,C.; GOMES, D.B.; ROMAN, JUNIOR W.A. Isolamento químico e validação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência de quercitrina em *Solidago chilensi*s Meyen (Asteraceae) **Rev. Bras. Pl. Med**., Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.288-296, 2016.

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.

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

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

XU, Chunbao; FERDOSIAN, Fatemeh. **Conversion of Lignin into Bio-Based Chemicals and Materials**. Editora: Springer-Verlag GmbH Germany. 2017. ISSN 2196-6990 (electronic)

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.

ZANCAN, Luiza Rodrigues, BARRETO, Andressa Ribas, MENEZES, Cristiano Ragagnin de. Study of the fungal enzyme production by cultured in basidiomycetes lignocellulosic residues. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental** - Santa Maria, v. 19, n. 3, set-dez. 2015, p. 850-860 - Issn **:** 22361170

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.

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.

ZUCCA, P.; RESCIGNO, A.; OLIANAS, A.; MACCIONI, S.; SOLLAI, F. A.; SANJUST, E. Induction, purification, and characterization of a laccase isozyme from Pleurotus sajor-caju and the potential in decolorization of textile dyes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 216–222, 2011.