**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium*
sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**

Cristiane Cipola Fasanella

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2008**

Cristiane Cipola Fasanella
Bióloga

**Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium*
sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**

Orientadora:

Prof^a. Dra. **REGINA TERESA ROSIM MONTEIRO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2008**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Fasanella, Cristiane Cipola

Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em
bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente / Cristiane Cipola Fasanella. - -
Piracicaba, 2008.
80 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. *Aspergillus* 2. Bagaços - Tratamento químico 3. Cana-de-açúcar 4. Enzimas 5. Lignina
6. *Penicillium* I. Título

CDD 576.11925
F248a

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

DEDICO

Aos meus pais, Angelo e Waldirlene pelo apoio, carinho e confiança e ao meu filho, Fellipe. Dedico também em memória do meu avô Pedro Cipola, que apesar de não estar mais aqui entre nós, tenho certeza que estaria orgulhoso de me ver chegar aonde cheguei.

OFEREÇO

Aos meus pais, ao meu filho, à minha irmã e aos meus guias espirituais por estarem sempre ao meu lado me ajudando a tomar decisões corretas.

Agradecimentos

À Professora Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro pela orientação, dedicação ao meu trabalho, carinho e acolhimento durante esses dois anos.

Ao CNPQ pela bolsa concedida.

Ao CENA pelo acolhimento em seus laboratórios, biblioteca e serviços de informática.

Ao Curso de pós-graduação em Agronomia, área Microbiologia Agrícola pela oportunidade.

Aos meus pais por terem me apoiado e confiado em mim e na minha capacidade esses 2 anos e principalmente por terem cuidado e educado meu filho com tanto amor e carinho enquanto estive aqui desenvolvendo as atividades do mestrado.

Ao Professor Dr. Nelson Massola pela ajuda na identificação de uma das linhagens fúngicas utilizadas no trabalho.

À Professora Dra. Neusa Nogueira, à Mônica Rossi e à Professora Dra. Célia pela ajuda e dedicação no desenvolvimento da microscopia eletrônica dos.

À técnica Rosângela pela ajuda nas tardes e manhãs concedidas a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório: Geórgia, Tâmara, Laise, Vivian, Majú, Mário, Luiz Fernando, Gabriela e Rita, por estarem sempre presentes e por terem proporcionado um ambiente delicioso de trabalho com ótimo humor e boas risadas.

Ao amigo Luiz Fernando Romanholo Ferreira pela paciência e acompanhamento mesmo aos sábados e domingos ajudando no laboratório e nas leituras das enzimas sempre que necessário.

À amiga Georgia pela amizade, por ajudar sempre que precisei estando sempre de prontidão quando preciso e pelos papos durante o café.

Às “Codornas” (Laura, Lilian e Júlia) – amigas as quais eu não seria tão feliz aqui se elas não fizessem parte da minha vida. Amigas as quais foram de imensa importância pela minha estabilidade em Piracicaba e por proporcionarem momentos definitivamente inesquecíveis.

Aos meus amigos de Vargem – Lícia, Jô, Milena, Olívia, Tiaguinho e Fábio pela força no início do mestrado e pelo apoio neste período de tempo em que estive aqui em Piracicaba.

Aos meus professores de graduação – Maurício, Arthur e Eliana por terem sido excelentes professores e verdadeiros mestres, e principalmente pelo apoio em relação ao mestrado, pela

força para continuar na vida acadêmica e por confiarem na minha capacidade incentivando sempre a caminhar para frente.

Ao Fernando por ter sido um ótimo companheiro no ano de 2008, por mostrar um caminho que antes não acreditava mais existir, por se tornar alguém tão especial na minha vida, na vida dos meus familiares e principalmente na vida do meu filho. E agradeço também por ser paciente comigo ajudando em vários pontos no desenvolvimento da dissertação.

.

.

.

.

.

Muito Obrigada.

*"Cada vez ponho na essência anímica do meu sangue o
propósito impessoal de engrandecer a pátria e contribuir
para a evolução da humanidade"*

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 DESENVOLVIMENTO.....	16
2.1 Revisão Bibliográfica.....	16
2.1.1 Cana de açúcar.....	16
2.1.2 Organização e biodegradação de compostos lignocelulósicos.....	18
2.1.2.1 Celulose	19
2.1.2.2 Hemicelulose	20
2.1.2.3 Lignina.....	21
2.1.3 Fungos lignocelulósicos.....	23
2.1.3.1 <i>Aspergillus</i> sp.	25
2.1.3.2. <i>Penicillium</i> sp.	26
2.1.4 Enzimas ligninolíticas.....	27
2.1.4.1 Manganês peroxidase	28
2.1.4.2 Lacases	29
2.1.4.3 Peroxidases	30
2.1.5 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos.....	31
2.2 Material e Métodos.....	33
2.2.1 Linhagens fúngicas utilizadas.....	33
2.2.2 Manutenção das linhagens e condições de cultivo.....	33
2.2.3 Bagaço de cana-de-açúcar.....	33
2.2.4 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.....	34
2.2.5 Observação das alterações físicas do bagaço por microscopia.....	34
2.2.5.1 Preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura.....	35
2.2.6 Avaliação do desenvolvimento fúngico sobre o bagaço pré-tratado quimicamente..	35
2.2.7 Preparo das amostras para microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	36

2.2.8 Determinação da atividade enzimática dos fungos desenvolvidos sobre bagaço de cana-de-açúcar.....	36
2.2.8.1 Determinação da atividade da lacase.....	37
2.2.8.2 Determinação da atividade da manganês peroxidase.....	37
2.2.9 Determinação dos teores de lignina, celulose e hemicelulose.....	38
2.2.10 Análise estatística.....	38
2.3 Resultados e Discussão.....	39
2.3.1 Visualização da estrutura do bagaço tratado química e biologicamente.....	39
2.3.1.1 Efeito dos tratamentos químicos evidenciados por microscopia eletrônica de varredura.....	39
2.3.1.2 Colonização fúngica observada por microscopia eletrônica de varredura.....	44
2.3.1.3 Colonização fúngica sobre o bagaço de cana-de-açúcar observado por microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão.....	45
2.3.2 Análise dos teores de lignina, celulose e hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar.....	48
2.3.3 Resultados da atividade enzimática.....	49
2.3.3.1 Atividade das enzimas lacase e MnP produzida pelo fungo <i>A. nige</i>	50
2.3.3.2 Atividade das enzimas lacase e MnP produzidas pelo fungo <i>Penicillium</i> sp.....	52
2.3.3.3 Observações gerais dos resultados das atividades enzimáticas.....	55
3 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS.....	78

RESUMO

Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente

A cana-de-açúcar é uma das matérias primas para a produção de açúcar e álcool. Durante o processo de produção, é gerado como subproduto (ou resíduo) o bagaço, que possui várias aplicações, entre elas a geração de energia, fertilizantes, produção de combustíveis e ração animal. O bagaço da cana-de-açúcar é composto principalmente por materiais lignocelulósicos, possuindo como constituintes principais a celulose, a hemicelulose e a lignina. A lignina é um dos materiais mais recalcitrantes na natureza e, conseqüentemente, dificulta o acesso de enzimas aos carboidratos fermentáveis, reduzindo a eficiência da degradação da celulose e da fermentação. Uma das vias de degradação da lignina ocorre através da ação de enzimas produzidas por fungos de degradação branca, marrom e macia. Essas enzimas são capazes de degradar e expor a celulose e a hemicelulose, que, por sua vez são prontamente utilizadas por outros microrganismos. Para que isso ocorra, esses fungos promovem um processo de oxidação de compostos fenólicos e não fenólicos da molécula de lignina por meio de enzimas ligninolíticas extracelulares entre elas a lacase e a manganês peroxidase (MnP), em baixa velocidade, porém com grande eficiência. O presente trabalho tem como objetivo avaliar diferentes tratamentos químicos alcalinos (NaOH e $\text{Ca}(\text{OH})_2$) e biológicos (*Penicillium* sp. e *Aspergillus niger*) por microscopia óptica, eletrônica de transmissão e de varredura com o intuito de promover uma alteração física na estrutura da fibra do bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados foram avaliados pelas técnicas de microscopia demonstrando que a ação dos tratamentos químicos, principalmente do NaOH + $\text{Ca}(\text{OH})_2$, provocou uma eficiente desestruturação das fibras em comparação aos outros tratamentos. Em relação às atividades enzimáticas, o pré-tratamento do bagaço com NaOH + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ associado ao *A. niger* mostrou ser mais eficiente para a produção de lacase. Já para a atividade enzimática de MnP, o tratamento controle (bagaço autoclavado) foi o que apresentou maior eficiência. Para *Penicillium* sp., a atividade enzimática da lacase não apresentou diferença significativa entre os pré-tratamentos bagaço autoclavado e NaOH + $\text{Ca}(\text{OH})_2$, no entanto, quando comparados aos pré-tratamentos com NaOH e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ foram os mais eficientes para a produção dessa enzima. Para a enzima MnP, o pré-tratamento associado às duas bases foi mais eficiente.

Palavras-chave: Enzimas ligninolíticas, Pré-tratamento alcalino, Bagaço de cana-de-açúcar, *Aspergillus niger*; *Penicillium* sp.

ABSTRACT

The action of lignolytic enzymes produced by *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp in chemically treated sugarcane bagasse

Sugarcane is one of the raw materials used for sugar and alcohol production. During the production process, bagasse is generated as a subproduct (or residue), which has a large range of application, as electric power generation, fertilizers, combustible production and animal feeding. Sugarcane bagasse is mainly composed by lignocellulosic material, containing as main component cellulose, hemicelluloses and lignin. Lignin is one of the most recalcitrant naturally found molecules, and, consequently, hardens the access of enzymes to fermentable carbohydrates, decreasing the efficiency of cellulose degradation and fermentation. One of the lignin degradation pathways occurs throughout the action of enzymes produced by white-rot, brown and soft-rot fungi. These enzymes are able to degrade lignin, exposing cellulose and hemicelluloses, which get available for other microorganisms. In order to perform this process, these fungi promote an oxidation process of phenolic and non-phenolic compounds of the lignin molecule, by the lignolytic extracellular enzymes. Among them are the enzymes laccase and manganese peroxidase (MnP), which have a slow rate activity, however of high efficiency. The present work has as objective to evaluate different alkaline chemical (NaOH and $\text{Ca}(\text{OH})_2$) and biological (*Penicillium* sp. and *Aspergillus niger*) treatments by optic microscopy, scanning electron microscopy and transmission electronic microscopy to promote alteration on the physical structure of the sugarcane bagasse fiber. The results were evaluated by the microscopy technique, showing that the activity of the chemical treatments, in special of NaOH + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ promoted an efficient loss of structure of fibers in comparison to the other treatments. In respect to the enzymatic activity, the bagasse pre-treated with NaOH + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ in association with *A. Niger* showed to be more efficient for laccase production. Meanwhile, for the MnP enzymatic activity, the control treatment (only autoclaved bagasse) was that presented the highest efficiency. For *Penicillium* sp., the laccase enzymatic activity did not present any significant difference among the pre-treatments autoclaved bagasse (control) and NaOH + $\text{Ca}(\text{OH})_2$. However, when compared to the pre-treatments with NaOH and $\text{Ca}(\text{OH})_2$, they were more efficient for the production of the referred enzyme. For MnP, the pre-treatments associated to both alkalis had an increased efficiency.

Keywords: Ligninolytic enzymes; Pre-treatments; Sugarcane bagasse; *Aspergillus niger*; *Penicillium* sp.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Conidióforo de *Aspergillus ochraceus* e terminologia das estruturas usadas na classificação e identificação dos *Aspergillus*. Visíveis nas figuras as métulas (células estéreis), fiálides (células conidiogénicas) e conídio (esporos assexuais)...25
- Figura 2 - Conidióforos de *Penicillium* com penicilli do tipo mais simples (penicillus monovérticilado vesiculado de *P. glabrum*) e complexo (penicillus terverticilado de estipe liso de *P. brevicompactum*).27
- Figura 3 - Estrutura do bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento químico ou biológico.....40
- Figura 4 - Estrutura do bagaço de cana de açúcar tratado quimicamente com as bases NaOH e Ca(OH)_2 conjuntamente.....40
- Figura 5 – Estrutura do bagaço de cana de açúcar tratado quimicamente com NaOH41
- Figura 6 – Estrutura do bagaço de cana de açúcar tratado quimicamente com Ca(OH)_2 41
- Figura 7 - Observação da colonização do fungo *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento (a, b) e pré-tratado quimicamente com NaOH juntamente com Ca(OH)_2 (c, d, e).....44
- Figura 8 - Microscopia óptica com aumento de 400X mostrando a colonização de *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento químico (a) e pré-tratado quimicamente com NaOH + Ca(OH)_2 (b)45
- Figura 9 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando a colonização de *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimicamente com NaOH e Ca(OH)_2 . ..46

- Figura 10 – Atividade da enzima lacase (U/L) produzida pelo fungo *A. niger* inoculado em bagaço de cana-de-açúcar submetidos a tratamentos com NaOH, Ca(OH)₂, NaOH + Ca(OH)₂ e controle (bagaço sem tratamento) no período de 15 dias51
- Figura 11 - Atividade da enzima MnP (U/L) produzida pelo fungo *A. niger* inoculado em bagaço de cana-de-açúcar submetidos a tratamentos com NaOH, Ca(OH)₂, NaOH + Ca(OH)₂ e controle (bagaço sem tratamento) no período de 15 dias52
- Figura 12 - Atividade da enzima lacase (U/L) produzida pelo fungo *Penicillium* sp. inoculado em bagaço de cana-de-açúcar submetidos a tratamentos com NaOH, Ca(OH)₂, NaOH + Ca(OH)₂ e controle (bagaço sem tratamento) no período de 15 dias.....53
- Figura 13 - Atividade da enzima MnP (U/L) produzida pelo fungo *Penicillium* sp. inoculado em bagaço de cana-de-açúcar submetidos a tratamentos com NaOH, Ca(OH)₂, NaOH + Ca(OH)₂ e controle (bagaço sem tratamento) no período de 15 dias.....54

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar sem e com pré-tratamento alcalino em porcentagem da matéria seca.....	49
---	----

1 INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar ocupa uma área de 5,82 milhões de hectares no Brasil, onde tem grande importância devido à sua múltipla utilidade, podendo ser empregada “*in natura*”, sob a forma de forragem, para alimentação animal, ou como matéria-prima para a fabricação de rapadura, melado, aguardente, açúcar e álcool. Na produção de açúcar e álcool, esta cultura gera subprodutos ou resíduos como o bagaço, palha, melaço, torta de filtro e vinhaça, os quais têm grande importância econômica. O bagaço, por exemplo, tem sido utilizado como combustíveis, biomassa, veículo para ração animal, dentre outros.

Nos últimos anos, ocorreu um crescente interesse em se utilizar o bagaço como biomassa para produção de energia, gerando eletricidade e açúcares fermentáveis. Esta nova área de aplicação do bagaço surge como uma solução alternativa para o problema da diminuição progressiva das reservas de combustíveis derivados do petróleo. Assim, um processo biotecnológico eficiente e economicamente viável se faz necessário para esta utilização.

O bagaço de cana-de-açúcar é composto principalmente por materiais lignocelulósicos possuindo como constituintes principais: celulose, hemicelulose e lignina. Esses compostos, principalmente a lignina, é um dos materiais mais recalcitrantes na natureza e de difícil e prolongada degradação por ser um polímero tridimensional, composto de vários anéis aromáticos estavelmente ligados. Como consequência da ação antropológica no processo de produção e transformação desses materiais, hoje existe um grande acúmulo de resíduos lignocelulósicos. Com isso, pesquisas vêm sendo realizadas, em grande número, buscando o seu melhor reaproveitamento, sendo considerados os custos, o tempo e a eficiência dos processos existentes na reciclagem. Alguns dos processos de conversão de resíduos lignocelulósicos às formas úteis de energia incluem a aplicação de álcalis, hidrólise ácida, hidrotermólise e tratamentos biológicos – os quais se destacam por serem mais econômicos e específicos que os processos químicos. O maior problema enfrentado hoje na bioconversão dos resíduos lignocelulósicos a partir de sua forma natural é a inacessibilidade aos polímeros de carboidratos, devido à estreita associação destes com a lignina, que atua como uma barreira física.

A degradação da lignina ocorre pelos fungos de degradação branca, marrom e macia, os quais são capazes de degradá-la expondo a celulose e hemicelulose, que por sua vez são prontamente utilizadas por outros microrganismos. Esses fungos são—taxonomicamente diversos, sendo a maioria deles pertencentes à subdivisão Basidiomicetos (fungos de degradação branca e parda). Outros fungos capazes de promover esta degradação inicial são da classe dos Ascomicetos, também conhecidos como fungos anamórficos (fungos de degradação macia). Nestes últimos, a degradação ocorre em velocidades mais baixas. A atividade ligninolítica, decorre de um grupo de enzimas responsáveis pelo processo de oxidação de compostos fenólicos e não fenólicos da molécula de lignina, genericamente chamadas de ligninases, entre as quais estão as lacases, as várias formas de peroxidases (manganês peroxidase e lignina peroxidase). A combinação das enzimas manganês peroxidase e lacase ou lignina peroxidase, compõem o sistema enzimático mínimo necessário para a degradação da lignina.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a alteração da estrutura física da fibra do bagaço de cana-de-açúcar por meio de microscopia óptica, eletrônica de varredura (MEV) e eletrônica de transmissão (MET) após aplicação de diferentes tratamentos químicos alcalinos (NaOH e Ca(OH)_2), utilizados separados e conjuntamente e, biológicos: *Penicillium* sp. e *Aspergillus niger*). para inferir a ação do desenvolvimentos desses fungos sobre esses tratamentos químicos, avaliando a produção de enzimas ligninolíticas das linhagens.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Cana de açúcar

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. Estima-se que a safra 2007/2008 seja de 420 milhões de toneladas (UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO – ÚNICA, 2008). A região Centro-Sul possui a maior produção (85%), destacando-se os estados de São Paulo (60%), Paraná (8%), Minas Gerais (5%), Mato Grosso (4%), Goiás (3%) e Mato Grosso do Sul (2%) (RIPOLI; RIPOLI, 2004). Cerca de 55% da produção canavieira é destinada à fabricação de álcool (18,5 milhões de m³) e o restante para produção de açúcar (25 milhões de toneladas). Esta cultura chega a movimentar R\$ 36 bilhões/ano, o que representa 3,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional (FNP – CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2007).

A cana é cultivada em uma área de 5,82 milhões de hectares no território, sendo a produção processada por 320 usinas (FNP – CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2007) e 67 destilarias (ÚNICA, 2008). Além da produção de açúcar e álcool, a cultura gera subprodutos como o bagaço, palha, melaço, torta de filtro e vinhaça.

Segundo Nogueira e Venturini Filho (2005), a cana é uma gramínea, cultivada em regiões tropicais e subtropicais, apresentando a propriedade de sintetizar e armazenar significativa quantidade de sacarose em seus tecidos de reserva. A planta é composta por duas partes: uma subterrânea (rizomas e raízes) e outra aérea (colmo, folhas e flores). O colmo é constituído de nós e entrenós (ou internódios, ou gomos, ou meritalos). Possui um sistema com duas fases, a fase sólida, também chamada de fibra, constituída por celulose, lignina e hemicelulose e, a fase líquida cujo caldo contém substâncias orgânicas e 90% de sacarose. A função do colmo é de suportar a parte aérea, conduzir água e nutrientes do solo para as folhas onde os açúcares são sintetizados, transportar estes carboidratos para as outras partes da planta e armazenar sacarose e outras substâncias.

A composição química do colmo é influenciada pelo clima, propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, tipo de cultivo empregado, variedade, estágio de maturação e idade da planta, sendo que a variação desta composição ocorre quantitativamente. Qualitativamente, é semelhante em todas as variedades, sendo constituída de água ($\pm 70\%$), matéria orgânica ($\pm 25\%$) e matéria mineral ($\pm 0,5\%$). Estes constituintes não se encontram nas mesmas proporções nas diferentes partes do colmo (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005).

Depois de colhida, a cana é transportada para a indústria, onde é lavada, picada e seu caldo é extraído. O caldo passa por peneiras e tratamento químico para regular o pH. Em seguida, é aquecido a 105°C , passando depois pelo processo de purificação para a retirada de resíduos. Posteriormente é decantado e por meio da evaporação ele é concentrado, recebendo o nome de xarope. Para a produção de açúcar, o xarope passa pelo processo de cristalização por cozimento ou por resfriamento. Dos cristalizadores, o açúcar passa para a fase de centrifugação e, em seguida, pela secagem. Para a obtenção do álcool, o caldo é fermentado, em tanques, obtendo-se teor alcoólico de 7 a 10%, passando a se chamar vinho. O vinho é então resfriado e centrifugado para separar as leveduras, passando, em seguida, para as colunas de destilação. O álcool resultante é o hidratado, a 96°GL . O anidro passa por outro processo de desidratação para chegar a $99,7^{\circ}\text{GL}$. (ÚNICA, 2008).

Produzido na proporção de 280 kg t^{-1} de cana, o bagaço é constituído por celulose ($\pm 45\%$), hemicelulose ($\pm 25\%$) e lignina ($\pm 20\%$), com pequenas quantidades de outros compostos. O bagaço é oriundo da moagem do material vegetal e é composto por fibras e resíduos de caldo. A palha é encontrada na superfície da área plantada após a colheita e neste resíduo encontram-se folhas, ponteiros, colmos e raízes. As fibras destes materiais são constituídas por celulose, hemicelulose e lignina.

Embora o bagaço possa ser utilizado para geração de energia ou como suplemento animal, ainda há um grande excedente que pode ser utilizado para produção de diversos bens da sociedade. Algumas alternativas para sua utilização como matéria prima são a produção de etanol, papel e celulose, revestimentos acústicos, madeira prensada, forragem para agricultura, álcool, alcalóides e enzimas (CARVALHO, et al., 2002; CARVALHO, 2005; CUNHA et al., 2005; LÂCORTE, 1986; PANDEY et al., 2000; SILVA et al., 2000; SILVA et al., 2001; SILVA et al., 2005).

A biotecnologia tem sido bastante explorada nos últimos anos para obtenção de inúmeros produtos de interesse econômico e social. Os processos biotecnológicos têm se mostrado promissores e com inúmeras vantagens em relação aos processos convencionais (CUNHA et al., 2005). Segundo Du Toit et al. (1984), o aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar como fonte de substratos para a utilização em processos biotecnológicos é uma alternativa atrativa e promissora, considerando-se o elevado teor de carboidratos presentes nessa biomassa.

2.1.2 Organização e biodegradação de compostos lignocelulósicos

A velocidade no qual os compostos lignocelulósicos são decompostos na natureza é bastante variável e depende das condições de umidade e temperatura às quais são expostos, bem como da biodiversidade fúngica do local. Assim, a decomposição completa de um fragmento de material lignocelulósico pode demandar meses ou vários anos, principalmente se esses se encontrarem em condições frias e secas (LEVY, 1987).

Durante a decomposição de compostos lignocelulósicos por fungos, seus componentes dependem de um efetivo e progressivo processo de despolimerização da lignina que dá origem a compostos de baixa massa molar susceptíveis ao metabolismo intracelular dos fungos. Assim são susceptíveis ao transporte pela parede celular e no interior da célula ocorre a despolimerização em dióxido de carbono e água. Isso ocorre por meio da ação de uma série de enzimas e compostos de baixa massa molecular extracelulares (onde o início da degradação ocorre necessariamente de forma extracelular). Algumas das aplicações potenciais dos microorganismos e enzimas que degradam a lignina incluem a polpação, branqueamento de polpas, liberação de carboidratos, conversão desses componentes em rações animais e tratamentos de resíduos derivados de lignina. (AGOSIN et al., 1990; FERRAZ et al., 2000a; HAEMMERLI et al., 1988;; ERIKSSON, 1990; ORIARAN et al., 1990; ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; FERRAZ, 2004).

Enquanto os processos de degradação de celulose e hemicelulose são de natureza hidrolítica e ocorrem com relativa facilidade, a degradação da lignina representa um processo oxidativo complexo, não específico e estritamente dependente das condições do meio de cultivo do organismo (WOOD; GARCIA-CAMPAYO 1994).

Para iniciar a degradação dos materiais lignocelulósicos, os fungos promovem a penetração de suas hifas no lúmen das células vegetais. Essas hifas têm por finalidade a produção de grande diversidade de metabólitos extracelulares, os quais atuam na degradação da parede celular vegetal (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Segundo Puri (1984) e Fan et al. (1987) a dificuldade de converter os materiais lignocelulósicos é atribuída às características morfológicas existentes entre os três principais componentes da parede celular das plantas. Estruturas microfibrilares de celulose encontram-se embebidas em uma matrix composta por hemicelulose e lignina, cuja função estrutural é de agir como barreira natural à degradação enzimática e/ou microbiana. A compreensão da complexidade estrutural desses materiais requer o conhecimento das características e propriedades de cada um dos seus componentes, os quais serão descritos a seguir.

2.1.2.1 Celulose

A celulose é um polímero linear formado por unidades de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas β (1 $\rightarrow$ 4), formando cadeias longas e paralelas, insolúvel em água e possui massa molecular que varia entre 50 mil e 2,5 milhões de Dalton, dependendo da sua origem. É composta por unidades monoméricas de celobiose, a qual é formada pela junção de duas moléculas de glicose seguida da eliminação da água através das hidroxilas ligadas ao carbono 1 e 4 (FENGEL; WEGENER, 1989). Segundo Leschine (1995), a celulose é considerada o biopolímero mais abundante do ambiente terrestre. A cada ano mais de 10¹¹ toneladas de CO₂ são fixadas por meio da fotossíntese derivada de material vegetal, e metade desse material consiste em celulose.

Em sua estrutura supramolecular a celulose apresenta regiões altamente ordenadas (regiões cristalinas) estabilizadas por numerosas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, áreas menos ordenadas ou amorfas, onde as cadeias apresentam uma orientação randomizada. A proporção da parte cristalina é normalmente expressa em porcentagem (índice de cristalinidade ou CrI) e depende da origem e processo de obtenção da celulose. A propriedade semicristalina da celulose é um dos fatores que dificulta a sua degradação. Vários autores têm sugerido que a celulose amorfa, devido a sua maior área

superficial, é mais suscetível à hidrólise enzimática do que a forma ordenada ou cristalina (FAN et al., 1987).

A celulose nativa cristalina é constituída por duas fases alomórficas: a celulose I α (triclínica) e a celulose I β (monoclínica), sendo que cada espécie vegetal apresenta uma composição característica entre estas duas fases. Diferenças no arranjo de ligações de hidrogênio, que determinam as suas respectivas estruturas supramoleculares resultam em agregados de diferente estabilidade química que apresentam diferentes propriedades físico-mecânicas (ÅKERHOLM et al., 2004).

Devido à linearidade do esqueleto celulósico, cadeias adjacentes formam um conjunto de agregados insolúveis em água de vários comprimentos e larguras, denominadas fibrilas elementares (D'ALMEIDA, 1988). De acordo com Fengel e Wegner (1989), diversas fibrilas elementares, com uma espessura média de 3,5 nm, se associam uma com as outras formando cristalitos de celulose cujas dimensões dependem da origem e do tratamento da amostra. Posteriormente, quatro desses agregados cristalinos se unem através de uma monocamada de hemicelulose, gerando estruturas de 25 nm que são envolvidas por uma matriz amorfa de hemicelulose e protolignina. O composto natural que resulta dessa associação é chamado de microfibrila de celulose. A quebra da celulose ocorre por meio de processos que agem em conjunto sobre um composto complexo de celulose unida à lignina e hemicelulose. A ação combinada de enzimas extracelulares com especificidade complementar é essencial para sua degradação (BERGUIN; AUBERT, 1994).

2.1.2.2 Hemicelulose

As hemiceluloses compreendem um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados, que se ligam, firmemente entre si e à superfície das microfibrilas de celulose, cobrindo-as e mantendo ligações cruzadas, via pontes de hidrogênio, em uma rede complexa. Quimicamente, as hemiceluloses são compostas de uma série de heteropolissacarídeos não-amiláceos e não-celulósicos formados por vários resíduos de açúcares como D-xilose, D-manose, D-arabinose e D-galactose, dentre outros, e por seus ácidos urônicos. Estes açúcares estão ligados entre si, por ligações glicosídicas β -1,4, formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de resíduo, a partir da qual surgem ramificações laterais de

cadeias curtas de outros açúcares. As hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas e concentram-se, principalmente, nas camadas primárias e secundárias, onde estão intimamente associadas à celulose e lignina (ASPINALL, 1980; WOODWARD, 1984; FENGEL; WEGENER, 1989; SJÖSTRÖM, 1992; DA SILVA et al., 1997).

São estruturalmente mais parecidas com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura de ramificações e cadeias laterais interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (RAMOS, 2003).

As cadeias de hemiceluloses podem ser constituídas por apenas uma unidade monossacarídica, como é o caso das xilanas, ou por duas ou mais unidades, como no caso das 4-*O*-metil-glucuronoxilanas, xiloglucanas ou arabinoxilanas (FENGEL; WEGENER, 1989). A natureza química das hemiceluloses varia, nas plantas, em relação ao tipo de tecido vegetal e espécie a que pertencem. Em geral, as hemiceluloses participam nas madeiras em 20 a 30% da composição total, enquanto que, nas gramíneas, estes valores podem variar de 20 a 40% (SJÖSTRÖM, 1992).

2.1.2.3 Lignina

A lignina é um constituinte da parede celular de todas as plantas vasculares, sendo considerada uma macromolécula constituída de unidades de fenilpropano, apresentando uma conformação tridimensional e amorfa, representando de 20% a 30% do total dos lignocelulósicos. É um dos biopolímeros mais abundantes na biosfera, sendo uma parte considerável do carbono fixado por fotossíntese. Devido à estreita associação entre celulose, hemicelulose e lignina, esses compostos não estão uniformemente distribuídos na parede celular das plantas. A parede secundária contém alta quantidade de celulose, enquanto a lamela média possui maior quantidade de lignina. Entretanto, todos estes três compostos podem ser encontrados em todas as camadas da parede celular vegetal. Em função do mecanismo de biossíntese da lignina, o acoplamento das unidades de fenilpropano ocorre de maneira irregular e não repetitiva. Vários tipos de ligação entre as unidades de fenilpropano

são observados como: β -O-4 e α -O-4 (50 a 65%), β -5 (6 a 15%), β -1 (9 a 15%), 5-5 (2 a 9%) e β - β (2 a 5%) (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; TUOMELA 2002).

Do ponto de vista químico, a lignina é um composto heterogêneo, de alto peso molecular, de estrutura irregular, altamente insolúvel e recalcitrante. Este biopolímero é formado pela polimerização oxidativa de três precursores fenilpropanóides monoméricos: álcool sináplico (propanol siringil), álcool coniferílico (propanol guaiacil) e álcool cumarílico (propanol *p*hidroxifenil), unidos entre si, e com os polissacarídeos da parede celular, por ligações éter e carbono-carbono. A proporção destes monômeros pode variar entre espécies de plantas, sendo as ligações β O-4 as mais freqüentes (JEFFRIES 1994, HOFRICHTER 2002, ÖNNERUD et al., 2002).

As funções biológicas da lignina são: (1) Fornecer suporte estrutural à parede secundária de plantas vasculares. A parede celular lignificada pode ser vista como um complexo, com microfibrilas de celulose e hemicelulose, e a lignina como uma “matriz plástica” conferindo resistência ao material lignocelulósico; (2) Tornar a parede celular vegetal hidrofóbica, permitindo o desenvolvimento eficiente dos tecidos para transporte de água em plantas vasculares; (3) Conferir resistência contra ataques microbianos (ÖNNERUD et al., 2002).

Apesar de vários dos seus aspectos necessitarem ainda serem investigados, a degradação da lignina pode ser entendida como um processo multienzimático por reação não específica, resultante da ação coordenada de uma série de enzimas ligninolíticas intra e extracelulares (grupo das oxidoredutases - representadas por peroxidases, lacases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio e de metabólitos intermediários de baixa massa molecular) as quais, desestabilizam as ligações da macromolécula, causando assim seu colapso (LEONOWICZ et al., 1999; FUJIAN et al., 2001; SHAN; NERUD 2002; CANTARELLA et al., 2003).

A lignina, obtida por extração alcalina a partir da explosão a vapor, pode fornecer uma série de compostos fenólicos de interesse comercial, como o siringaldeído e o *p* hidroxibenzaldeído, assim como a vanilina (essência de baunilha), que é produzida por oxidação dos produtos de sua hidrólise alcalina. De um modo geral, fenóis derivados da lignina podem ser convertidos à éteres de arila e usados como aditivos para gasolina, enquanto que solventes e ácidos orgânicos podem ser dela produzidos por craqueamento e

dealquilação. De forma análoga, a lignina pode ser igualmente utilizada como matéria-prima para a produção de resinas fenólicas e poliuretanas. Dependendo da reatividade da lignina obtida pelo pré-tratamento, este material insolúvel pode ser transformado em um polímero orgânico com boas propriedades em solução aquosa, abrindo assim uma nova perspectiva para a aplicação destes materiais como surfactantes aniônicos (FERRAREZI, 1996; MATHIAS, 1993).

2.1.3 Fungos lignocelulósicos

Fungos são organismos heterotróficos (decompositores de matéria orgânica ou parasitas) que crescem rapidamente e formam filamentos celulares microscópicos denominados hifas, cujo conjunto constitui uma espécie de tecido próprio dos fungos, o micélio, responsáveis por todas as funções vegetativas do organismo. A obtenção de alimento é realizada por absorção através das paredes das células, sendo que os elementos nutritivos devem estar na forma de solução. O micélio segrega enzimas especiais que atuam sobre as substâncias, ocorrendo liquefação, como é o caso dos fungos ligninolíticos. Em outras situações, o micélio emite órgãos chamados haustórios, que penetram no tecido dos organismos hospedeiros, absorvendo o alimento (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Os fungos secretam uma grande diversidade de eficientes enzimas no ambiente que são utilizadas para auxiliar sua nutrição (BENNETT, 1998), desta maneira são responsáveis pela deterioração de vários materiais naturais, refinados ou processados. Nas últimas décadas, a utilização dos fungos filamentosos e seus metabólitos nos processos de biorremediação vêm crescendo, em virtude do alto potencial degradativo, biossortivo (metais pesados e corantes) e dos mecanismos de resistência em condições ambientais adversas. A degradação de compostos fenólicos tem uma estreita relação com a decomposição da lignina, sendo assim muitas das técnicas aplicadas para seleção de microrganismos ligninolíticos podem ser utilizadas para triagem de organismos degradadores de compostos fenólicos, e vice-versa. Dentre estas técnicas, podem ser citadas aquelas que utilizam o desaparecimento ou a mudança de cor do meio de cultura inoculado com microrganismos a serem testados, para assim quantificar ou detectar a atividade enzimática. Esta técnica permite que muitos microrganismos de uma coleção e/ou isolados de um determinado ambiente sejam

selecionados rapidamente (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). O interesse na pesquisa de enzimas lignocelulolíticas fundamenta-se na utilização destas na reciclagem de resíduos da agricultura e/ou rejeitos urbanos (VASSILEV et al., 1994) e também no tratamento de solos e efluentes diversos (DURÁN; ESPOSITO, 2000). Estas enzimas possuem vantagens na remediação de diversos tipos de contaminantes, por não possuírem alta especificidade com os substratos, uma vez que a estrutura da lignina apresenta diversos modelos (GOLDSTEIN, 1981; BUMPUS et al., 1985; MESTER; TIEN, 2000; HOFRICHTER, 2002; CONCEIÇÃO et al., 2005).

Os organismos mais eficientes na biodegradação de materiais lignocelulósicos na natureza são os fungos de decomposição branca (white-rot-fungi – degradam todos os componentes da madeira) e os de decomposição parda (brown-rot-fungi – degradam principalmente polissacarídeos). A grande maioria desses organismos pertence à classe Basidiomycota, sendo que os ascomicetos e fungos mitospóricos normalmente são classificados como fungos de decomposição branda (soft-rot-fungi), que também possuem a capacidade de degradar a lignina e polissacarídeos, porém em baixa velocidade. A utilização do termo “degradação” refere-se não só a completa decomposição da lignina em CO₂ e água, bem como às diversas modificações ou bioalterações produzidas na molécula. A maioria dos fungos produtores de enzimas necessárias à degradação de materiais lignocelulósicos pertencem aos grupos Ascomycetes, Deuteromycetes e Basidiomycetes. O crescimento desses fungos diminui em condições de carência de nitrogênio e de carbono, e as atividades ligninolíticas aparecem como uma forma metabólica secundária (FERRAZ et al., 1991; FERRAZ; DURÁN, 1995; KIRK; CULLEN, 1998; RODRIGUEZ et al., 1997; ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Esses organismos são encontrados no solo, colonizando vegetais, raízes e resíduos, com importante função de reciclagem de nutrientes e possuem habilidade para desenvolverem-se em qualquer substância orgânica, fazendo uso de substratos variados. As fontes de carbono como polissacarídeos, lignina, glicose, manose, frutose, óleos e ácidos orgânicos são importantes fornecedoras de energia para a atividade metabólica dos fungos. (AGUIAR; MENEZES, 2000; MODA et al., 2005).

2.1.3.1 *Aspergillus* sp.

O gênero *Aspergillus* é considerado como um fungo ascomiceto degradante primário da celulose e lignina, além de ocorrer espécies promotoras de grande patogenicidade em plantas e animais. A palavra *Aspergillus* em latim significa: globo perfurado que contém uma esponja ou pincel usado para aspergir água benta, (KLICH; PITT, 1988). O gênero *Aspergillus* caracteriza-se pela produção de esporos assexuais se dar em uma estrutura chamada aspergillum (designação que se dá à parte superior da estrutura, ou seja, o conjunto da vesícula e das células reprodutivas especializadas que contém) que é especializada e característica do gênero. Eles possuem uma estrutura denominada conidióforo que é constituído pelo aspergillum e pelo estipe (SERRA, 2005).

Figura 1 - Conidióforo de *Aspergillus ochraceus* e terminologia das estruturas usadas na classificação e identificação dos *Aspergillus*. Visíveis nas figuras as métulas (células estéreis), fiálides (células conidiogénicas) e conídio (esporos assexuais) (escala de 10 μ m). Extraído de Serra (2005)

Embora a maioria dos gêneros *Aspergillus* seja saprófita, alguns são parasitas de insetos, plantas e animais, incluindo o homem. Algumas espécies produzem potentes toxinas, enquanto outras são igualmente significantes como agentes de biodeterioração, economicamente importantes para fabricação de alimentos fermentados, como fontes de enzimas ou em produção química (RIZZATTI et al., 2004).

2.1.3.2 *Penicillium sp.*

O gênero *Penicillium* é composto por espécies pouco exigentes nutricionalmente, capazes de crescer em qualquer ambiente com uma fonte de sais minerais e qualquer fonte de carbono exceto as mais complexas, numa gama vasta de condições físico-químicas. Muitas espécies são psicrofílas, capazes de crescer a temperaturas abaixo de 0°C, mas algumas espécies são capazes de crescer até 40°C (KLICH; PITT, 1988). Eles apresentam hifas septadas e os conidióforos na forma de pincéis. Seus esporos assexuados produzem uma estrutura típica do gênero designada de penicillus (pl. penicilli, que em latim significa pincel). Os conídios nascem em cadeias produzidas pelas fiálides. As fiálides estão em verticilos no estipe, e assentam nele diretamente ou com a intervenção de células de suporte especializadas conhecidas por metulae e rami (Figura 2). O penicillus é toda a estrutura suportada pelo estipe. O conjunto do penicillus e do estipe designa-se por conidióforo. Os conídios são regra geral de cor verde, as fiálides têm pescoços curtos e paredes lisas. (TORTORA et al., 2000).

Figura 2 - Conidióforos de *Penicillium* com penicilli do tipo mais simples (penicillus monoverticilado vesiculoso de *P. glabrum*, direita) e complexo (penicillus terverticilado de estipe liso de *P. brevicompactum*, esquerda) (barra de escala de 10 µm). Extraído de Serra (2005)

2.1.4 Enzimas ligninolíticas

Enzimas são biocatalisadores; em outras palavras, são proteínas produzidas pelas células com finalidade de acelerar as reações químicas do metabolismo. Elas são bastante específicas quanto à sua função e, sendo assim, podem ser encontrados diversos tipos de enzimas biossintetizadas para catalisar os diferentes tipos de reações bioquímicas (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Vários parâmetros de cultivo afetam a produção e a atividade das enzimas ligninolíticas por fungos: disponibilidade de oxigênio, fonte e concentração de carbono e nitrogênio, microelementos, pH e temperatura (VAN DER MERWE, 2002).

A maioria das enzimas pode ser inibida por certas substâncias químicas. Por meio do estudo combinado de pH e temperaturas ótimos e a ação de determinados inibidores enzimáticos é possível identificar qual ou quais enzimas ligninolíticas estão presentes. Além

disso, a presença de alguns metais no ambiente pode influenciar a atividade das enzimas ligninolíticas (JOHANNES; MAJCHERCZYK, 2000).

2.1.4.1 Manganês Peroxidase

A MnP é uma glicoproteína com Fe protoporfirínico IX como grupo prostético, dependente de H_2O_2 para sua atividade. A oxidação de lignina é dependente da disponibilidade de íons de manganês (BROWN et al., 1991).

Essa enzima é muito semelhante à lignina peroxidase, sendo também extracelular, glicosilada, massa molar de 45-47 kDa (HOFRICHTER, 2002).

O ciclo catalítico da MnP é iniciado pela ligação de H_2O_2 ou um outro peróxido orgânico ao ferro nativo da enzima, formando um complexo ferro-peróxido. A quebra subsequente da ligação O-O do peróxido requer a transferência de 2 elétrons do grupo heme da enzima, que resulta na formação de um radical complexo Fe^{4+} -oxo porfirina (MnP-I). Com a quebra da ligação dos oxigênios, uma molécula de água é liberada. Uma redução seguinte acontece formando o complexo MnP-II (Fe^{4+} -oxo porfirina não radicalar). Um íon Mn^{2+} age como doador de 1 elétron para esse complexo intermediário e é oxidado à Mn^{3+} . A redução da MnP-II acontece de maneira similar e outro Mn^{3+} é formado de um Mn^{2+} , levando assim à geração da forma original da enzima, liberando uma segunda molécula de água (HOFRICHTER, 2002). O Mn^{3+} formado é estabilizado por ácidos orgânicos, tais como ácido oxálico, e age como um agente oxi redutor difuso, de baixo peso molecular, que ataca moléculas orgânicas inespecificamente pela subtração de um elétron (GOLD; ALIC, 1993).

Descobertas recentes sobre o papel de MnP na degradação da lignina permite a adoção dos conceitos de KIRK; FARRELL (1987), em que a degradação da lignina constitui um processo de “combustão enzimática” extracelular. Este conceito tem sido adotado por muitos microbiologistas que estudam a decomposição da madeira, e este conceito tem sido usado para descrever a despolimerização de lignina de alta massa molecular pela atuação inespecífica das enzimas ligninolíticas (HOFRICHER et al., 1998).

2.1.4.2 Lacases

Até recentemente a lacase era estabelecida somente em eucariotos (fungos, plantas superiores e insetos), mas agora há evidência de sua distribuição em procariotos, e a primeira estrutura cristalina de uma lacase bacteriana foi obtida. Em plantas, lacases estão envolvidas na lignificação. Em fungos, além da degradação de lignina, lacases parecem estar envolvidas na esporulação, produção de pigmentos e patogenicidade de plantas (YAYER et al., 1996, ENGUITA et al., 2003, CLAUS, 2004).

Devido à capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, lacases fúngicas estão recebendo grande atenção em várias aplicações industriais como deslignificação, produção de etanol, modificação de fibras da madeira, clareamento de corantes, síntese de produtos químicos/medicinais e remediação de solos e águas contaminadas. Pesquisas recentes têm sido intensas e muito tem sido elucidado sobre a diversidade de lacases e suas utilidades (SCHNEIDER et al., 1999, DURÁN et al., 2002, MAYER; STAPLES, 2002).

Filogeneticamente, lacases são membros da família de proteínas multi-cobres, que incluem ascorbato oxidase, ceruloplasmina e bilirrubina oxidases. Lacases geralmente são codificadas por uma família de genes. A expressão destes genes pode ser constitutiva ou indutiva. Conseqüentemente, em diferentes fungos, a produção desta enzima pode ser acentuada sob condições de cultura apropriadas (KLONOWSKA et al., 2002, MAYER; STAPLES, 2002, CLAUS, 2004). A produção de lacase é afetada por muitos fatores durante o desenvolvimento fúngico, como a composição do meio de cultura (relação carbono e nitrogênio), pH, temperatura, taxa de aeração, etc (KAHRAMAN; GURDAL, 2002).

Lacases são proteínas globulares contendo entre 10-25% de carboidrato *N*-ligado e elas podem ter estruturas monoméricas, diméricas ou multiméricas, compreendendo subunidades de 45 à 80 kDa, dependendo da espécie e isoforma. Fungos ligninolíticos freqüentemente expressam múltiplos genes de lacase, codificando isoenzimas com alta similaridade na estrutura primária, mas diferentes características físico-químicas (BROWN et al., 2002). Não há dúvidas que as propriedades bioquímicas e físico-químicas de lacase (atividade, estabilidade, pH e temperatura ótimos, etc.) fornecem muitas informações iniciais importantes para estudos básicos e para a aplicação de lacases na biotecnologia (MOUGIN et

al., 2003, SHLEEV et al., 2004). Algumas características de lacases como, massa molecular, pH ótimo de atividade e substrato específico são extremamente diversos (MAYER; STAPLES, 2002).

A atividade de lacases *in vivo* ou com enzimas purificadas é determinada principalmente por testes espectrofotométricos utilizando substratos fenólicos ou não-fenólicos, pelo monitoramento da coloração dos produtos de oxidação. A maioria dos testes utiliza guaiacol, 2,6-dimetoxifenol, siringaldazina ou o substrato não-fenólico ácido 2,2'-azino bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico) (ABTS). Uma das vantagens em utilizar ABTS é sua alta estabilidade em solução. Além disso, substratos fenólicos utilizados em muitos testes enzimáticos podem ser oxidados por reações não-enzimáticas (HOFER; SCHLOSSER, 1999, JOHANNES; MAJCHERCZYK, 2000).

Lacases são enzimas excepcionalmente versáteis, catalisando reações com diferentes substratos, alguns destes recalcitrantes. São enzimas de ampla distribuição ocorrendo em todos os domínios dos seres vivos. Contudo, muitos estudos são necessários para melhor compreender sua importância fisiológica e sua utilização em processos biotecnológicos (CLAUS, 2004).

2.1.4.3 Peroxidases

Esta família de enzimas é assim chamada porque depende do peróxido de hidrogênio para se tornar ativa. Elas são hemoproteínas, as quais catalisam reações na presença de peróxido de hidrogênio e são responsáveis pela fragmentação inicial do polímero de lignina. Essa enzima é uma glicoproteína globular com massa molecular de 42000 g mol^{-1} , que possuem uma parte protéica (apoenzima) de aproximadamente $34\,000 \text{ g mol}^{-1}$ e o restante é composto pelo grupo prostético (tipo *heme*) que contém o cofator ligado fortemente ao sítio ativo da enzima (KERSTEN; KIRK, 1987; WILBERG, 2003).

Em um ciclo normal, a forma férrica da enzima é oxidada por peróxido de hidrogênio ao radical oxi-ferril, conhecido como composto I. Este composto é então reduzido pela transferência de um elétron do substrato (ex: lignina) para a forma conhecida como composto II. Uma subsequente transferência de elétron de uma molécula de substrato para enzima faz

com que esta retorne a sua forma inicial. O composto III refere-se à forma inativa da enzima (NICELL et al., 1993).

A enzima peroxidase é conhecida por sua capacidade de remoção de grupamentos fenólicos e aminas aromáticas de soluções aquosas e também de descoloração de efluentes da indústria têxtil (DURÁN, 2003).

O papel das peroxidases de origem microbiológica na polimerização de ácidos fenólicos é reconhecidamente o de transformação de substâncias aleloquímicas em substâncias húmicas estáveis e não tóxicas (ADLER et al., 1994).

Na indústria de papel e celulose a peroxidase é empregada na etapa de branqueamento da polpa e no tratamento de seus efluentes. Na indústria têxtil é utilizada para melhorar o branqueamento em lavanderias e inibir a transferência de cor durante a lavagem. Também na indústria têxtil, é empregada para a remoção do excesso de corante da água de lavagem de tecidos tingidos (DURÁN, 2003).

2.1.5 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

Vários métodos de pré-tratamento de biomassas vegetais lignocelulósicas têm sido sugeridos ao longo das duas últimas décadas. Estes podem ser divididos em métodos físicos, químicos, biológicos ou combinações destes. Os métodos físicos (e.g. peletização, moagem) convertem a biomassa em pós finos, incrementando a superfície específica da celulose, de modo que a hidrólise da mesma ocorre com relativa facilidade. A maior desvantagem associada a este método consiste no elevado consumo energético. No caso do bagaço, pode-se considerar que a moagem da cana configura uma operação de pré-tratamento da fibra. Uma hidrólise ácida da fração sólida em condições moderadas converte os fragmentos celulósicos em glicose. Em que pese sua relativa simplicidade operacional, a pirólise da biomassa lignocelulósica apresenta reduzida eficiência global, em função de elevadas perdas sacarídicas, reduzida seletividade em glicose, além da formação de compostos inibidores de fermentação. Os processos físico-químicos de pré-tratamento utilizando ácido diluído, vapor de alta pressão ou água quente possibilitam a remoção seletiva das hemiceluloses, produzindo soluções sacarídicas (pré-hidrolisados) com elevado teor de pentoses e reduzido teor de lignina. Processos alcalinos tendem a promover maior dissolução da lignina e menor

solubilização/fragmentação das hemiceluloses. Embora muitos métodos de pré-tratamento tenham sido experimentados ao longo dos últimos anos, constata-se a crescente necessidade em desenvolver alternativas tecnológicas eficientes em termos de custo global e competitividade econômica. Basicamente, extrações seletivas de componentes não-celulósicos (lignina e hemiceluloses) utilizando-se álcalis ou ácidos têm sido obtidas a custos relativamente razoáveis. Em particular, pré-tratamentos utilizando vapor água, ácido sulfúrico diluído, amônia e hidróxido de cálcio têm emergido dentre as opções mais promissoras (BAUDEL, 2006).

Os processos alcalinos de pré-tratamento geralmente utilizam condições moderadas de operação, em termos de temperaturas e pressões, em comparação aos sistemas ácidos. O principal efeito desse tipo de pré-tratamento consiste na remoção da lignina da biomassa, promovendo maior reatividade da fibra. O álcali (geralmente soda ou cal) tende a causar um “inchamento” (“*swelling*”) da biomassa, de modo que a cristalinidade da celulose decresce, enquanto ocorre um incremento da superfície específica de contato e da porosidade da mesma. Evidencia-se uma cisão das ligações lignina-carboidrato, além da fragmentação da estrutura da lignina. Em alguns casos, o pré-tratamento pode ser conduzido à temperatura ambiente, porém demanda tempos reacionais elevados, da ordem de horas ou mesmo dias. Uma vez que os processos alcalinos promovem uma intensa deslignificação da biomassa, tais sistemas devem ser preferencialmente utilizados no pré-tratamento de materiais com reduzido teor de lignina (e.g. resíduos agro-industriais), com vistas à minimização da quantidade da mesma, presente no hidrolisado. O pré-tratamento do bagaço utilizando hidróxido de cálcio apresenta vantagens em termos de custo do reagente, segurança do processo e possibilidade de recuperar o álcali sob a forma de carbonato de cálcio mediante reação com o dióxido de carbono produzido na etapa de fermentação alcoólica. O carbonato pode, em seguida, ser convertido em hidróxido através de técnicas convencionais estabelecidas na indústria. A adição de oxigênio ou ar tende a promover uma remoção da lignina da ordem de 80%. Entretanto, tais processos produzem hidrolisados com elevado teor de lignina, demandando a utilização de sistemas de separação lignina-carboidrato, de modo a recuperar hemiceluloses (BAUDEL, 2006).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Linhagens fúngicas utilizadas

As duas linhagens utilizadas, *Penicillium* sp. e *Aspergillus niger* foram isoladas de solo contaminado por borra de petróleo no município de Paulínia (SP) e preservadas pelo método Castellani pelo pesquisador Eduardo Moraes do laboratório de Microbiologia Aplicada UNESP – Rio Claro no ano de 2005.

2.2.2 Manutenção das linhagens e condições de cultivo

As linhagens fúngicas (*Aspergillus niger* e *Penicillium* sp.) foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura sólido BDA (ágar-batata-dextrose), incubadas em estufa por um período de sete a oito dias com temperatura de 27°C ($\pm$ 3°C). Para preservação das linhagens foi mantido o método Castellani (CASTELLANI, 1967). Para a realização deste método, após o crescimento das linhagens (3/4 do diâmetro da placa), discos de meio de cultura contendo micélio e esporos foram transferidos para frascos de vidro contendo 10 mL de água destilada previamente esterilizados. Os frascos foram fechados com tampa de borracha, selados com tampa de metal e estocados à temperatura ambiente.

O preparo dos inóculos dos fungos para os experimentos foi em BDA, com um período de incubação de oito dias, utilizando como inóculo discos de 5 mm de diâmetros contendo meio e a borda da cultura crescida em placas de Petri (Item 2.2.6).

2.2.3 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado da safra 2006-2007 foi doado pela usina Cosan (Unidade Costa Pinto), no município de Piracicaba, SP. O mesmo foi seco ao ar livre, na sombra e estocado em saco plástico até o uso.

Antes de iniciar os tratamentos o bagaço foi submetido à secagem, em estufa com temperatura de 60°C durante 24 horas. Posteriormente, alíquotas de 5 g de bagaço seco e

desidratado foram separadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL de capacidade, adicionados 40 mL de água destilada e 2 g de farelo de soja.

2.2.4 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

As alíquotas de bagaço foram submetidas ao tratamento químico alcalino. Para isto, foram preparadas soluções de hidróxido de sódio (4%) e hidróxido de cálcio (4%), que foram aplicadas ao bagaço na proporção de 1:5, p/v. No total foram realizados quatro tratamentos: i) bagaço sem tratamento (controle); ii) bagaço com solução NaOH 4%; iii) bagaço com solução $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 4%; iv) bagaço com solução NaOH 4% e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 4%.

Os frascos contendo o bagaço e as soluções utilizadas foram então submetidos à autoclavagem (121°C, 1 atm por 20 minutos). O material foi incubado por 12 horas para permitir a ação dos agentes químicos sobre a estrutura do bagaço. Após este período, as amostras foram lavadas com 100 mL de água destilada previamente esterilizada e neutralizadas. A neutralização foi realizada por meio da adição de 0,9 mL de ácido sulfúrico (0,5 M) nos frascos contendo $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e 0,9 mL de ácido clorídrico (1 M) nos tratamentos com NaOH obtendo um pH 6,0, uma vez que para alcançar um bom desenvolvimento das linhagens fúngicas é necessário pH entre 5,5 e 6,5.

2.2.5 Observação das alterações físicas do bagaço por microscopia

Os efeitos dos tratamentos alcalinos no bagaço de cana-de-açúcar foram observados em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tais observações foi feita uma preparação no bagaço tratado quimicamente e biologicamente.

2.2.5.1 Preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada com amostras de bagaço obtidas nos quatro tratamentos (controle, tratamento básico com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e NaOH, e combinado $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + NaOH), como descritos no item 2.2.4 acima. Para isso, as amostras

foram submetidas à secagem em estufa com temperatura de 60°C por um período de 48 horas e então preparadas para a MEV seguindo a metodologia descrita por Dellamatrice et al. (2005). A observação das estruturas foi feita de maneira direta, eliminando os passos de fixação e desidratação. As amostras foram apenas colocadas sobre “stubs” e posteriormente cobertas com ouro. Após este preparo as amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura.

Em relação aos processos químicos tratados com *Penicillium* sp., foi realizado primeiro toda a preparação química e, posterior a neutralização a linhagem foi inoculada. Após incubação por 15 dias as amostras foram preparadas para a microscopia eletrônica.

As amostras foram fixadas em solução contendo glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, CaCl_2 0,001 M e tampão cacodilato de sódio 0,05 M, por um período de 24 horas. Em seguida as amostras foram lavadas três vezes em tampão cacodilato 0,1 M por 20 minutos. As amostras então, foram tratadas com solução OsO_4 (1%) por 1 hora a 4°C. Em seguida, foi feita a desidratação em banhos sucessivos de 20 minutos em soluções de etanol nas concentrações crescentes de 35, 50, 60, 75, 85 e 90% e três vezes em acetona 100% por 20 minutos. Após a secagem do material em ponto crítico, as amostras foram colocadas sobre “stubs” e cobertas com ouro na espessura de 200 nm e levadas para observação ao microscópio eletrônico.

2.2.6 Avaliação do desenvolvimento fúngico sobre o bagaço pré-tratado quimicamente

A determinação do efeito dos tratamentos químicos sobre o desenvolvimento dos fungos foi feito por meio da inoculação de discos de 5 mm de diâmetro sobre amostras de bagaço obtidas dos quatro tratamentos (controle, tratamento básico com Ca(OH)_2 e NaOH, e combinado Ca(OH)_2 + NaOH) conforme descritos no item 2.2.4.

As amostras foram incubadas a temperatura ambiente durante o período de 15 dias, nos quais a leitura da produção enzimática foi realizada diariamente, como descrito posteriormente. Como em cada dia um frasco foi utilizado para a análise, no total 15 frascos de cada tratamento foram preparados para cada tratamento.

Adicionalmente à avaliação da atividade enzimática, amostras de bagaço que apresentaram desenvolvimento fúngico foram submetidas à análise por meio de microscopia eletrônica de transmissão.

2.2.7 Preparo das amostras para microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a análise de MET, a metodologia seguida também foi a mesma descrita por Dellamatrice et al. (2005); onde as amostras foram fixadas em tampão cacodilato (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, 0,001 M de CaCl_2 e 0,05 M de tampão cacodilato de sódio, a pH 7,2) durante 3 horas. Após esta incubação inicial foram feitas três transferências dos materiais, com incubação em cada uma delas de 15 minutos em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Posteriormente o material foi fixado em OsO_4 (1%) no mesmo tampão por 2 horas a 4°C. O material foi lavado três vezes por 5 minutos em solução salina (NaCl 0,9%) e corado utilizando solução de acetato de uranila (2,5%) por 16 horas a 4°C. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série de concentrações de acetona nas concentrações de 25, 50, 75%, 90% (2 vezes), 100% (3 vezes), sendo a imersão de 10 minutos em cada diluição, com exceção da acetona pura, onde a imersão foi feita por 20 min. Após a desidratação, o material foi embebido em resina *spurr* nas concentrações crescentes de resina/acetona 1:1, 2:1 e resina pura, sendo posteriormente emblocado por 48 horas à 60°C em estufa. As secções foram cortadas em ultramicrotomo e os cortes foram corados utilizando acetato de uranila 2,5% por 10 minutos e citrato de chumbo por 6 minutos.

2.2.8 Determinação da atividade enzimática dos fungos desenvolvidos sobre bagaço de cana-de-açúcar

Esta análise foi feita em amostras de todos os tratamentos químicos inoculados com as linhagens fúngicas classificadas como *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. Em cada um destes fungos e dentro de cada tratamento, a cada dia durante a incubação, foram estimadas as atividades das enzimas ligninolíticas: lacase e Mn peroxidase.

Em cada amostragem, a quantidade de 40 mL de água destilada esterilizada foi adicionada ao frasco de cultivo dos fungos. O material foi homogeneizado por 30 minutos sob agitação de 180 rpm e filtrado em papel de filtro (Whatman Nº 1) com auxílio de bomba a vácuo. O sobrenadante foi coletado e posteriormente utilizado para quantificação das atividades enzimáticas.

Em cada determinação, a atividade enzimática foi realizada por meio de espectrofotômetro modelo FENTO, em triplicata.

2.2.8.1 Determinação da atividade da lacase

A atividade enzimática da lacase foi determinada segundo Szklarz et al. (1989); empregando-se siringaldazina como substrato enzimático. A mistura da reação foi composta de 0,6 mL do sobrenadante (obtido através da filtração), 0,3 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0) e 0,1 mL de siringaldazina (0,1% em etanol). A oxidação da siringaldazina à quinona foi realizada no tempo zero (assim que a siringaldazina foi colocada) e após 10 minutos, seguidos de leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 525 nm. Os valores de absorbância obtidos nas amostras foram utilizados para estimar a atividade enzimática (em U/L).

2.2.8.2 Determinação da atividade da manganês peroxidase

A atividade enzimática da manganês peroxidase foi determinada segundo Lundell et al. (1990) e Khindaria et al. (1994). Para isto, foi preparada para cada amostra uma mistura contendo 0,5 mL de sobrenadante (obtido da filtração), 0,05 mL de MnSO_4 , 0,05 mL de lactato de sódio 0,25 M, 0,1 mL de H_2O_2 0,2 M em tampão succinato de sódio (pH 4,5), 0,2 mL de albumina bovina 0,5%, e 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1 %. Foi realizada a leitura em espectrofotômetro e após 10 minutos a reação foi interrompida pela adição de 0,04 mL de NaOH 2,0 N, e submetida novamente a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 610 nm. Os valores de absorbância obtidos nas amostras foram utilizados para estimar a atividade enzimática (em U/L).

2.2.9 Determinação dos teores de lignina, celulose e hemicelulose

Com o intuito de verificar a eficiência dos pré-tratamentos químicos, foram determinados os teores de lignina, celulose e hemicelulose presentes nas seguintes amostras:

- Bagaço seco *in natura*;
- Bagaço seco com farelo de soja e água destilada colocados em autoclave durante 20 min a 1 atm (121°C);
- Bagaço seco pré-tratado com 4% de solução de hidróxido de cálcio e neutralizado com 0,9 ml de ácido sulfúrico;
- Bagaço seco pré-tratado com 4% de solução de hidróxido de sódio e neutralizado com 0,9 mL de ácido clorídrico;
- Bagaço seco pré-tratado com 4% de solução de hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio e neutralizado com 0,9 mL de ácido clorídrico.

As análises foram realizadas no Instituto de Zootecnia, localizado na cidade de Nova Odessa, São Paulo, de acordo com as metodologias propostas por Goering e Van Soest (1970), Silva (1998) e Van Soest (1963).

2.2.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas com o programa Estat sendo realizada uma comparação de médias com análise de variância 5%, e o experimento foi baseado como sendo um delineamento fatorial 4 x 15 em blocos casualizados com três repetições.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Visualização da estrutura do bagaço tratado química e biologicamente

2.3.1.1 Efeitos dos tratamentos químicos evidenciados por microscopia eletrônica de varredura

Na análise da superfície do bagaço exposto aos diferentes tratamentos químicos foi possível verificar as diferenças estruturais da fibra. Na Figura 3, onde se encontra a fibra do bagaço não tratada, observa-se claramente a disposição das fibras perfeitamente intactas sem nenhuma alteração ou ruptura da parede celular. Já nas Figuras 4, 5 e 6 onde foram realizados os tratamentos químicos, é possível notar alterações na estrutura das fibras do bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 3 - Estrutura do bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento químico ou biológico. Os aumentos e barras de comparação de medidas estão apresentados em cada figura

Figura 4 - Estrutura do bagaço de cana de açúcar tratado quimicamente com as bases NaOH e Ca(OH)_2 conjuntamente. Os aumentos e barras de comparação de medidas estão apresentados em cada figura

Quando foi aplicado o tratamento químico com hidróxido de sódio juntamente com o hidróxido de cálcio, foi possível notar mudanças na área superficial da fibra, evidenciada pela

presença de parede celular estratificada, ou seja, em várias camadas (Figura 4 a, b). Adicionalmente, nota-se a quebra na estrutura das fibras, indicando a desestruturação da lignina e perda da consistência fibrilar.

Figura 5 - Estrutura do bagaço de cana de açúcar tratado quimicamente com NaOH. Os aumentos e barras de comparação de medidas estão apresentados em cada figura

Comparando este tratamento com aqueles quando os hidróxidos foram utilizados separadamente, é possível observar que o tratamento químico com hidróxido de sódio (Figura 5 a, b, c) causou mudanças na área superficial da fibra, porém com menor intensidade àquelas observadas no tratamento conjunto dos hidróxidos. Nota-se também neste tratamento, uma pequena quebra nas fibras com pouca estratificação.

Figura 6 - Estrutura do bagaço de cana de açúcar tratado quimicamente com Ca(OH)_2 . Os aumentos e barras de comparação de medidas estão apresentados em cada figura

Considerando-se o tratamento realizado apenas com hidróxido de cálcio, este segue o mesmo padrão do tratamento com apenas hidróxido de sódio, ou seja, uma pequena quebra na estrutura da fibra com pouca estratificação (Figura 6 a, b, c). No entanto, neste tratamento a quebra estrutural da fibra é ligeiramente menor do que a observada no tratamento com NaOH, o que é descrito na literatura por Ferreira et al. (2006) Esses autores afirmam que o tratamento com NaOH além de remover impurezas e tornar a superfície da fibra mais rugosa retira

parcialmente a lignina da fibra e solubiliza a hemicelulose deixando a celulose mais expostas ao ataque enzimático.

O fato de a hemicelulose ser solubilizada em meio alcalino é comprovado na literatura pelos autores Bledzki et al. (1999), Caraschi (1997), Campana Filho et al. (1997) e Tita et al. (2002).

A extração de hemiceluloses e lignina por soluções alcalinas provocam modificações na composição química das fibras e como consequência a parede celular parece estratificada, ou seja, com várias camadas. As mudanças químicas começam a ser significativas quando se realiza tratamento com soluções mais concentradas e desta forma a parede celular sofre severas alterações estruturais (TRIANA et al., 1990).

Segundo Tita et al. (2002), o tratamento com NaOH é capaz de promover a extração de hemicelulose e lignina, alterando as propriedades mecânicas das fibras.

As fotos de microscopia eletrônica de varredura indicam a existência de uma superfície porosa da fibra que sofre ataque dos agentes químicos a que foram submetidos, promovendo a retirada de cera das fibras, aumentando assim sua porosidade, e isto é evidenciado quando se compara o material “in natura” (Figura 3) com os demais materiais tratados quimicamente (Figura 4, 5 e 6).

O caráter altamente recalcitrante da lignocelulose nativa pode ser sensivelmente atenuado pela explosão a vapor. A modificação estrutural, observada na parede celular lignocelulósica em decorrência do pré-tratamento deixa um resíduo celulósico fibroso do qual a lignina pode ser facilmente extraída com álcali, etanol ou solventes orgânicos (FOCHER et al., 1988; RAMOS et al., 1992a, 1992b). O efeito da explosão a vapor sobre a organização estrutural da celulose aumenta consideravelmente sua área superficial e, por conseguinte, sua susceptibilidade à hidrólise ácida e/ou enzimática (BAUDEL, 2006). Devido a esses dados encontrados em literatura, como já foi citado em material e métodos, foi aplicado além do pré-tratamento químico, um pré-tratamento em autoclave (121°C, 1 atm por 20 minutos), com o intuito de “simular” o pré-tratamento a vapor, fazendo com que aumentasse a modificação estrutural da fibra para que o álcali pudesse agir na fibra de lignina.

O pré-tratamento a vapor causa redução do tamanho das partículas, abertura dos microporos e aumento da área superficial do material. Estas alterações na estrutura são

responsáveis pela melhora do ataque enzimático (MICHALOWCZ et al., 1991; GALBE et al., 2002).

A lignina, obtida por extração alcalina a partir da explosão a vapor, pode fornecer uma série de compostos fenólicos de interesse comercial, como o siringaldeído e o p hidroxibenzaldeído, assim como a vanilina (essência de baunilha), que é produzida por oxidação dos produtos de sua hidrólise alcalina (MATHIAS, 1993).

A lignina pré tratada a vapor tem aplicação como aditivo na produção de compensados para construção civil e pode ainda ser utilizada na produção de formulações de liberação controlada de pesticidas, como alternativa às formulações convencionais de agroquímicos (COTTERILL et al., 1996).

Embora diversas técnicas de pré-tratamento sejam potencialmente aplicáveis ao bagaço de cana, torna-se particularmente difícil realizar estudos comparativos com base nos dados da literatura em virtude das diferenças nas metodologias de pesquisa, nas características físicas do material, bem como nos métodos de preparação da matéria prima. Entretanto, salienta-se a importância de se aperfeiçoar o conhecimento acerca das diferenças entre os diversos tipos de pré-tratamento, bem como do efeito de cada processo sobre as demais operações. Tal medida pode facilitar a seleção dos equipamentos e seqüências operacionais do sistema integrado, ademais de reduzir riscos associados à implementação do processo em escala industrial, bem como identificar oportunidades de melhoria ao longo do sistema integrado, conduzindo a uma otimização da eficiência operacional e minimizando os custos globais de produção de etanol (BAUDEL, 2006).

A impregnação adequada da biomassa lignocelulósica consiste em um parâmetro operacional de significativa importância para a eficiência do tratamento químico de qualquer biomassa lignocelulósica. O bagaço de cana possui elevada capacidade de absorção de líquidos, bem como reduzida “dureza”. Além disso, a elevada umidade do bagaço proveniente das moendas (45- 50%) facilita a impregnação desta biomassa com soluções ácidas e alcalinas. Este aspecto é de fundamental importância com respeito à eficiência do pré-tratamento hidrolítico ácido e/ou alacalino (BAUDEL, 2006).

2.3.1.2 Colonização fúngica observada por microscopia eletrônica de varredura

Considerando o tratamento biológico, realizado por meio da inoculação de fungo *Penicillium* sp. no bagaço não tratado e tratado com NaOH + Ca(OH)₂, foi possível observar o desenvolvimento do fungo sobre estes substratos. As imagens de microscopia evidenciam o desenvolvimento fúngico sobre a biomassa do bagaço da cana. Pode-se sugerir desta maneira, que o fungo utiliza os compostos presentes neste substrato para seu desenvolvimento. Vale ressaltar que não foi possível observar alterações na estrutura do bagaço devido ao desenvolvimento do fungo sobre essa superfície (Figuras 7).

Figura 7 - Observação da colonização do fungo *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento (a e b) e quimicamente pré-tratado com NaOH juntamente com Ca(OH)₂ (c, d, e). Os aumentos e barras de comparação de medidas estão apresentados em cada figura

No entanto, se compararmos os padrões de crescimento dos fungos sobre o bagaço do tratamento controle com o tratado quimicamente, podemos inferir sobre a disponibilidade de nutrientes. Enquanto que no tratamento controle, o crescimento aéreo (Figura 7 a, b), no tratamento do bagaço com NaOH + Ca(OH)₂, o fungo apresenta crescimento com penetração na estrutura da fibra (Figura 7 c, d, e). Estes resultados mostram que o pré-tratamento químico

além de desestruturar a fibra do bagaço de cana-de-açúcar, a torna mais suscetível à colonização fúngica, que é um passo essencial na degradação total do bagaço.

2.3.1.3 Colonização fúngica sobre o bagaço da cana-de-açúcar observado por microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão

Amostras de bagaço também foram utilizadas para análises de microscopia óptica e de transmissão, com a intenção de comprovar a penetração do fungo no interior das células que compõem estruturalmente o bagaço da cana-de-açúcar. Estas análises foram feitas para complementar as observações feitas por microscopia de varredura, onde apenas a área externa das amostras foi avaliada. As imagens de microscopia óptica evidenciam por meio da observação de pontos no interior das células, que o fungo avaliado desenvolve-se sobre o bagaço e penetra nas células em busca de compostos nutricionais (Figura 8).

Figura 8 - Microscopia óptica com aumento de 400X mostrando a colonização de *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento químico (a) e pré-tratado quimicamente com NaOH + Ca(OH)₂ (b). As barras de comparação de medidas estão apresentadas em cada figura

A confirmação deste comportamento do fungo foi obtida com as imagens de microscopia eletrônica de transmissão, onde foi possível observar estruturas fúngicas na área interior das células (Figura 9 a, b, c, d). Estes resultados permitem inferir que o fungo avaliado tem a capacidade de penetrar nas células do bagaço, possivelmente por meio da

liberação de enzimas ligninolíticas. Considerando que isto ocorra, a degradação da estrutura do bagaço está relacionada à atividade do fungo, que penetra nas células e utiliza os compostos intracelulares, que são moléculas de fácil metabolismo, para seu desenvolvimento e reprodução. Este maior desenvolvimento do fungo no espaço intracelular é evidenciado pela maior frequência de visualização deste neste nicho. (Figura 9 a, b, c). Nota-se também a colonização do fungo no espaço intercelular (Figura 9 d).

Figura 9 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando a colonização de *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimicamente com NaOH + Ca(OH)₂. As setas indicam as estruturas fúngicas observadas. Os aumentos e barras de comparação de medidas estão apresentados em cada figura

A biodegradação dos materiais lignocelulósicos por fungos é atribuída à ação de uma série de enzimas e compostos de baixa massa molar extracelulares. A degradação é considerada como necessariamente de forma extracelular, uma vez que os componentes dos

lignocelulósicos devem ser inicialmente despolimerizados até compostos menores que são susceptíveis ao transporte pela parede celular e ao metabolismo intracelular dos fungos envolvidos (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Em termos microscópicos, quando o fungo é colocado em contato com um material lignocelulósico, pode-se observar a ação dos fungos degradadores desses materiais (Figura 7 a, b). Essa degradação ocorre por meio de da penetração de suas hifas na fibra do bagaço de cana-de-açúcar (Figura 7d). De acordo com Esposito e Azevedo (2004), as hifas quando estão instaladas no material lignocelulósico produzem uma grande diversidade de metabólitos extracelulares que, então, atuam degradando a parede celular vegetal.

Do ponto de vista microscópico, é possível diferenciar dois modos principais de degradação do material lignocelulósico: o primeiro envolve uma “escamação” da parede celular no sentido lúmem-lamela média, levando à diminuição progressiva e irregular da parede celular; o outro modo de degradação que tem sido observado em fungos seletivos para a degradação de lignina, envolve a remoção de lignina e polioses sem a simultânea erosão da parede celular. Nesses casos, a parede celular, apesar de degradada, mantém a sua forma original. Os distintos mecanismos de degradação envolvidos em cada caso têm sido objeto de muitos estudos, e um aspecto a ser considerado é o modo de ação das enzimas extracelulares sobre o complexo lignocelulósico (ESPOSITO ; AZEVEDO, 2004). Porém, vários trabalhos têm demonstrado que enzimas lignocelulolíticas não penetram na parede celular vegetal intacta (FLOUNOY et al., 1993; SREBOTNIK et al., 1988). Com isso, a degradação enzimática dos componentes da parede celular não poderia justificar o modelo ataque não-erosivo que foi descrito anteriormente. Ou seja, se as enzimas responsáveis pela degradação dos componentes lignocelulósicos não podem penetrar na parede celular vegetal, somente um processo de “escamação” da parede celular pode ser efetivo no processo de biodegradação.

Mas, de acordo com os resultados apresentados nesse trabalho, pode-se dizer que houve os dois tipos de degradação. Na Figura 8a e 8b onde se têm a microscopia óptica, é possível notar que não houve ataque progressivo da parede celular pelo fungo *Penicillium* sp., já que as paredes da célula do bagaço de cana-de-açúcar parecem estar intactas sem nenhuma erosão irregular, e mesmo assim é possível notar a presença do mesmo dentro da célula.

Blachete et al. (1997), demonstraram que *Ceriporiopsis subvermispora* (um dos fungos mais seletivos já descritos para a degradação da lignina) causa alterações estruturais

significativas na lignina presente na parede celular e na lamela média, mesmo antes de a parede celular vegetal ser permeável a proteínas do tamanho da insulina. Dessa forma, vários trabalhos têm proposto que alguns compostos de baixa massa molar poderiam atuar nos estágios iniciais da biodegradação dos compostos lignocelulósicos. Esses compostos deveriam apresentar atividade degradativa, mas são pequenos o suficiente para penetrar no complexo celular vegetal, e ou para degradar os componentes lá existentes e, com isso, desestruturar a parede celular a ponto de permitir a penetração de enzimas oxidativas e hidrolíticas.

Na Figura 9c é possível notar que a parede celular não está intacta, ou seja, apresenta-se desestruturada e dentro dessa, ocorre a presença do fungo *Penicillium* sp., onde pode-se inferir que esteja acontecendo o processo de “escamação” da parede celular por ação do tratamento químico alcalino NaOH + Ca(OH)₂ juntamente com ação das enzimas ligninolíticas produzidas pelo fungo.

2.3.2 Análise dos teores de lignina, celulose e hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar

As análises dos teores de celulose, lignina e hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar “*in natura*” e pré-tratado com soluções alcalinas mostrou que tanto as soluções alcalinas juntamente com autoclave, como somente o aquecimento e a alta pressão gerados pela autoclave ocasionou uma diminuição nesses teores (Tabela 1) Em relação ao controle (bagaço “*in natura*”) os tratamentos apresentaram diminuição no teor da fração de celulose em ordem decrescente na seguinte ordem: bagaço + autoclave diminuiu 1,35 vezes, seguido do bagaço + Ca(OH)₂ + autoclave que diminuiu 1,29 vezes, seguido do bagaço + NaOH + autoclave, que por sua vez diminuiu 1,12 vezes e para finalizar, seguido do pré-tratamento conjunto com as duas bases + autoclave que diminuiu 1,08 vezes.

Com relação à fração lignina, a ordem foi: bagaço + tratamento conjunto com as duas bases + autoclave com uma diminuição de 1,72 vezes, seguido de bagaço + NaOH com uma diminuição de 1,26 vezes, seguido de bagaço + autoclave apresentando uma diminuição de 1,21 vezes e o tratamento bagaço + Ca(OH)₂ + autoclave não mostrou diferenças.

Os teores de hemicelulose encontrados seguem a seguinte ordem: indicam que o pré-tratamento bagaço + Ca(OH)₂ + NaOH + autoclave foi 4,4 vezes menor em relação ao

controle, 2,17 vezes menor para o pré-tratamento com NaOH + autoclave, 2,05 vezes menor em bagaço + Ca(OH)₂ + autoclave e 1,16 vezes menor para o pré-tratamento somente com autoclave.

Tabela 1 - Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar sem e com pré-tratamento, alcalino ou ácido em porcentagem da matéria seca

Amostras	Celulose (%)	Lignina (%)	Hemicelulose (%)
Bagaço “ <i>in natura</i> ”	54,55	10,44	26,75
Bagaço + autoclave	40,28	8,57	23,00
Bagaço + Ca(OH) ₂	42,06	10,68	13,00
Bagaço + NaOH	48,57	8,26	12,32
Bagaço + Ca(OH) ₂ + NaOH	50,28	6,06	6,08

A partir dos resultados apresentados é possível verificar que o pré-tratamento com bagaço + Ca(OH)₂ + NaOH + autoclave foi o mais eficiente comparado com os demais pré-tratamentos, ocasionando uma diminuição maior do teor de lignina (42%) e principalmente de hemicelulose (77%). A literatura já descreve que pré-tratamentos alcalinos ocasionam essa diminuição de hemicelulose, solubilizando-a (CARASCHI, 1997; CAMPANA FILHO et al., 1997; BLEDZKI et al., 1999; TITA et al., 2002). As soluções alcalinas possuem a capacidade de extração de hemiceluloses e lignina e assim, esse tipo de solução provoca modificações na composição química das fibras (TRIANA et al., 1990).

2.3.3 Resultados da atividade enzimática

A análise da atividade enzimática ligninolítica das linhagens de *A. niger* e *Penicilium* sp., inoculadas em bagaço de cana-de-açúcar previamente tratados com NaOH e Ca(OH)₂, permitiu observar o efeito dos tratamentos na dinâmica enzimática da degradação. Esta metodologia, de estimativa da produção enzimática ao longo do período de incubação, mostrou-se eficaz nos trabalhos previamente conduzidos por Kamida et al., 2004. Estes autores observaram que a produção enzimática de fungos desenvolvidos sobre substratos lignocelulósicos é variável ao longo do tempo. A amostragem realizada a cada 2 ou 3 dias, perdem em sensibilidade na detecção dos picos de produção enzimática. Dessa maneira, no

presente trabalho, as avaliações para a atividade de lacase e MnP foram realizadas diariamente durante o período avaliado, de 15 dias.

2.3.3.1 Atividade da enzima lacase e MnP produzidas pelo fungo *A. niger*

A atividade da enzima lacase produzida pelo fungo *A. niger* apresentou diferenças estatísticas (Anexo A) entre os tratamentos e durante o período de incubação ($p < 0,05$). No controle (bagaço sem tratamento), a atividade da enzima lacase apresentou um pequeno pico de produção somente no décimo terceiro dia de incubação. Com relação aos demais tratamentos, foram observados dois picos de produção da enzima, distribuídos em quatro períodos da incubação; o primeiro pico verificado ao sétimo dia ($\text{Ca(OH)}_2 + \text{NaOH}$), o segundo ao nono dia (Ca(OH)_2 e NaOH), o terceiro ao décimo terceiro dia de incubação (Ca(OH)_2 e $\text{Ca(OH)}_2 + \text{NaOH}$) e o quarto ao décimo quarto dia (NaOH) (Figura 10).

Considerando as diferenças entre tratamentos, pode-se observar que até o quinto dia de incubação todos os tratamentos não diferiram, apresentando perfis muito similares entre si, com baixa produção da enzima. A partir do sexto dia foi observado um aumento com maior atividade da produção enzimática no tratamento com $\text{NaOH} + \text{Ca(OH)}_2$. A análise estatística (Anexo A) mostrou que o tratamento com $\text{NaOH} + \text{Ca(OH)}_2$ evidencia uma maior atividade da enzima, não sendo observadas quedas nos picos até o valor zero entre os dias seis e 15 (Figura 10). As alterações neste tratamento podem indicar que distintos compostos atuam de forma diferente sobre a fibra, o que faz com que uma vez aplicados conjuntamente, (NaOH e Ca(OH)_2) atuem de maneira somatória na desestruturação da fibra de lignina do bagaço da cana-de-açúcar (Figura 10).

Figura 10 - Atividade da enzima lacase (U/L) produzida pelo fungo *A. niger* inoculado em bagaço de cana-de-açúcar submetido a tratamentos com NaOH, Ca(OH)₂, NaOH + Ca(OH)₂ e controle (bagaço sem tratamento), no período de 15 dias

Em relação à atividade de MnP produzida por *A. niger*, pôde-se também observar diferenças estatísticas (Anexo B) entre os diferentes tratamentos ($p < 0,05$). Para esta enzima, a menor atividade foi verificada no tratamento com as duas bases combinadas, onde as medidas se mantiveram próximas ao valor zero, exceto por um pequeno pico ao quarto dia.. Para os demais tratamentos, picos maiores de produção foram observados (Figura 11).

No tratamento controle, a curva da atividade da MnP foi gradual, começando com um pequeno pico a partir do quarto dia de incubação, seguindo praticamente constante até o sétimo dia, onde, a partir desse dia houve uma atividade crescente até atingir o pico de produção máxima no décimo dia de incubação, ocorrendo uma queda gradativa até o décimo quinto dia de incubação (Figura 11). Considerando os tratamentos com apenas uma base, um pico inicial de produção de MnP foi observado no quarto dia de incubação. Após este período, os valores para estes tratamentos variaram em intensidade, sendo que o material pré-tratado

com NaOH a atividade foi constante até o aumento ocorrido nos dias seis e sete de incubação. Analogamente, o tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ revelou um aumento na atividade de MnP, com a produção de dois picos, um aos cinco e outros aos nove dias de incubação.

Figura 11 - Atividade da enzima MnP (U/L) produzida pelo fungo *A. niger* inoculado em bagaço de cana-de-açúcar submetido a tratamentos com NaOH, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NaOH + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e controle (bagaço sem tratamento), no período de 15 dias

2.3.3.2 Atividade das enzimas lacase e MnP produzidas pelo fungo *Penicillium* sp.

A atividade de lacase do fungo *Penicillium* sp. diferiu estatisticamente (Anexo C) na maioria dos tratamentos ($p < 0,05$), com exceção dos tratamentos controle e o realizado com as duas bases conjuntamente. Nenhum dos tratamentos apresentou uma atividade gradativa de produção da enzima lacase. Na figura 12, é possível notar dois picos de atividade de lacase em todos os tratamentos, sendo os de maiores intensidades aqueles encontrados ao nono dia de incubação no tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$. e ao décimo quinto dia no tratamento controle.

Outros picos com menor intensidade também foram observados, como no oitavo dia para o tratamento com as bases conjuntas ($\text{NaOH} + \text{Ca}(\text{OH})_2$), no nono dia para a base NaOH e no décimo dia para o controle (Figura 12). Considerando os tratamentos, houve uma grande similaridade com o que foi observado em relação ao previamente descrito para *A. niger*. Essa similaridade se dá nos primeiros dias de incubação, onde ambos os fungos (*A. niger* e *Penicillium* sp.) praticamente não apresentaram atividade enzimática até o quinto dia de incubação (Figura 10).

Figura 12 - Atividade da enzima lacase (U/L) produzida pelo fungo *Penicillium* sp. inoculado em bagaço de cana-de-açúcar submetido a tratamentos com NaOH , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{NaOH} + \text{Ca}(\text{OH})_2$ e controle (bagaço sem tratamento), no período de 15 dias

Avaliando o perfil de atividade da MnP pelo fungo *Penicillium* sp., diferenças estatísticas (Anexo D) foram encontradas em relação a intensidade dos picos em todos os tratamentos ($p < 0,05$). A ordenação dos tratamentos não foi similar às demais quantificações enzimáticas, apresentando uma maior atividade no tratamento conjunto com as duas bases, onde foi possível notar um primeiro pico no segundo dia de incubação, seguido de quatro

picos maiores nos dias quatro, sete, 11 e 14 de incubação (Figura 13). Em relação aos demais tratamentos, um número maior de picos de atividade foi observado, porém todos de menor intensidade e variando dentro do período de incubação.

Comparando os perfis para a atividade de MnP observada para o *Penicillium* sp. em relação ao perfil encontrado para *A. niger* diferenças foram encontradas. Ambos apresentam vários picos de atividades desta enzima, mas para o fungo *Penicillium* sp., estes foram de maiores intensidades. Também contrariando as observações feitas para *A. niger*, o tratamento combinado com as duas bases diferiu dos demais, sendo que para o fungo *A. niger* esse tratamento foi o que apresentou menor atividade enzimática, com pequenos picos de atividade no quarto e no décimo terceiro dia de incubação. Isso mostra que o efeito da desestruturação da fibra de lignina na posterior atividade fúngica pode ser específico para cada isolado fúngico utilizado.

Figura 13 - Atividade da enzima MnP (U/L) produzida pelo fungo *Penicillium* sp. inoculado em bagaço de cana-de-açúcar submetido a tratamentos com NaOH, Ca(OH)₂, NaOH + Ca(OH)₂ e controle (bagaço sem tratamento), no período de 15 dias

2.3.3.3 Observações gerais dos resultados das atividades enzimáticas

O substrato lignocelulósico pode induzir a produção de MnP e de lacase sendo ambas enzimas descritas como de ação conjunta para a degradação da estrutura da lignina (SCHLOSSER et al., 1997, D'SOUZA et al., 1999, HOFRICHTER et al., 1999, RODRIGUEZ et al., 1999, PAPINUTTI et al. 2001; MOREIRA NETO, 2006). Dessa maneira, o resultado esperado para a análise realizada seria um período comum de observação dos picos das duas enzimas, iniciando-se com a lacase e posterior atividade da MnP. No entanto, isto foi parcialmente encontrado, tendo como primeiro a MnP e posteriormente o pico de lacase. Desta maneira, pode-se sugerir que o tratamento químico mimetize a ação da lacase sobre a estrutura da fibra, liberando vários compostos, dentre os quais os ativadores da MnP. Assim após um pico inicial apenas da MnP ocorre um segundo pico conjunto desta enzima com a lacase, que possivelmente está atuando na desestruturação da fibra de lignina exposta pelo tratamento químico.

Segundo a literatura consultada, as enzimas ligninolíticas podem ser inativadas por processos bióticos e/ou abióticos, como adsorção a matriz orgânica do substrato fúngico, acidez ou alcalinidade extrema, ou biodegradação por proteases (CHEFETZ et al., 1998, STASZCZAK et al., 2000, AHN et al., 2002). Gianfreda e Bollag (1994), estudando o comportamento de enzimas imobilizadas e não imobilizadas em solos, observaram que houve um decréscimo na atividade enzimática quando a quantidade de matéria orgânica era elevada. Os autores concluem que o efeito inibitório da atividade enzimática foi causado pela presença de constituintes orgânicos do solo, como substâncias húmicas e fúlvicas. Entretanto, substâncias húmicas podem ser geradas pela reação de lacases com compostos fenólicos durante a degradação do bagaço de cana-de-açúcar pelo fungo, contribuindo para perda da atividade e da estabilidade de enzimas ligninolíticas (CHEFETZ et al., 1998, AHN et al., 2002). Isso faz com que seja possível inferir que o tratamento químico juntamente com o o fungo inoculado no bagaço produza alguma substância húmica ou de caráter parecido fazendo com que a atividade da lacase seja baixa ou com pouca estabilidade.

Segundo Li et al. (1999), Staszczak et al. (2000), Palmieri et al. (2000), Bonomo et al. (2001), Ahn et al. (2002) e Keum e Li (2004), a instabilidade das enzimas ligninolíticas pode ser atribuída a vários fatores, como desnaturação por valores muito baixos de pH, degradação

por proteases desnaturação irreversível pela exposição prolongada a radicais produzidos pelas enzimas, inativação por substâncias húmicas e fúlvicas formadas durante a degradação de substratos lignocelulósicos.

A atividade de degradação da lignina é aumentada pela presença da lignina ou algum composto de baixo peso molecular derivado da lignina. A ativação inclui um aumento na oxidação e na taxa de produção de H_2O_2 (LEISOLA; FLETCHER, 1985) fazendo com que esse próprio H_2O_2 agora adicionado à mistura de reação promova uma inibição da atividade de lacase. O peróxido de hidrogênio age como um co-substrato que ativa a ação enzimática do radical da manganês peroxidase, contribuindo no ciclo catalítico das peroxidases, para oxidar a enzima nativa em um intermediário enzimático (MOREIRA NETO, 2006) e assim ocorrendo a ativação da enzima MnP, fazendo essa agir antes mesmo da lacase.

Outra justificativa possível para o pico inicial da MnP, seria uma resposta ao estresse causado nas células fúngicas devido a alta concentração de sais oriundas do processo de neutralização. Dessa forma, a formação excessiva de $CaSO_4$ e $NaCl$ poderia ativar a produção de compostos de resposta ao estresse, como o peróxido de hidrogênio, que serve como ativador da MnP. Dessa maneira, o pico de atividade desta enzima ocorreria independentemente da ação da lacase.

Nos organismos aeróbios as vantagens energéticas utilizando o oxigênio molecular como um oxidante terminal na respiração são significativas, entretanto, a presença do oxigênio no ambiente celular constitui-se numa ameaça constante às suas próprias estruturas e processos. Este fato ocorre devido à formação das ROS (espécies reativas de oxigênio) (MALLICK; MOHN, 2000), que podem se tornar altamente destrutivas para células e tecidos se sua produção não for estritamente controlada (RICE-EVANS et al., 1991). Espécies reativas de oxigênio (ROS) como os radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila (OH^-) e oxigênio "singlet" (1O_2) são um produto inevitável do metabolismo dos organismos aeróbios (ANGELOVA et al., 2000), e provocam "estresse oxidativo" devido à sua ação tóxica e mutagênica sobre as células (ANGELOVA et al., 2000; MALLICK; MOHN, 2000).

Como todo organismo aeróbio, os fungos também sofrem com os efeitos tóxicos do oxigênio molecular. As ROS causam danos nos componentes celulares oxidando os lipídios (BHATTACHARJEE, 1998), proteínas e ácidos nucleicos (ANGELOVA et al., 2000). Para

combatê-las, as células dos fungos possuem tanto defesas antioxidantes enzimáticas, como, catalases, peroxidases e superóxido dismutases (TEKCHANDANI, 1998; CALERA et al., 2000; NOVENTA-JORDÃO et al., 1999; ANGELOVA et al., 2000), como não enzimáticas (CALERA et al., 2000). A exposição dos microrganismos aeróbios aos mais variados fatores de estresse, tais como calor, agentes oxidantes, tratamento com drogas, raio X e radiação UV, vem sendo associada à indução na síntese de enzimas antioxidantes (ANGELOVA et al., 2000).

De acordo com essas informações descritas na literatura, pode-se inferir que a presença dos sais formados com o processo de lavagem e neutralização (CaSO_4 e NaCl) podem estressar o fungo, formando as espécies ativas de oxigênio (ROS) e assim o fungo foi induzido à produzir a MnP como resposta para combater as ROS (que pode ter formado o peróxido de hidrogênio), já que essas causa danos nos componentes celulares.

Adicionalmente, é possível notar nas Figuras 10, 12 e 13 que a atividade no controle das enzimas ligninolíticas (lacase e Mn peroxidase) foi mais baixa, contrariando os dados previamente descritos na literatura. Uma vez que o pré-tratamento alcalino tem como função desestruturar a fibra de lignina e solubilizar a hemicelulose a atividade no controle deveria ser maior, pois os fungos teriam que produzir maior quantidade de enzimas ligninolíticas para desestruturar tal fibra. Uma das explicações para esta observação seria a possibilidade da lignina não ser uma fonte primária de carbono e energia para os fungos. Dessa maneira, sua degradação via enzimática por fungos seria dependente da existência de uma fonte de carbono adicional, que funcionaria como um co-substrato de degradação (KIRK; SHIMADA, 1985; MOREIRA NETO, 2006).

Nos experimentos realizados, a adição de farelo de soja foi inicialmente realizada para ajustar a relação carbono: nitrogênio, permitindo o desenvolvimento fúngico. No entanto, este substrato conta com uma pequena quantidade de carbono, que pode ser utilizada pelos fungos como o co-substrato para degradação de estruturas mais complexas como a lignina. Porém, devido às diferenças encontradas entre o controle e os tratamentos, podemos sugerir que o tratamento químico resultou na liberação de outros compostos carbônicos, de mais fácil assimilação pelos fungos do que àqueles presentes no farelo de soja. Esta diferenciação na disponibilidade de carbono, pode ter resultado na diferenciação dos perfis enzimáticos encontrados nos diferentes tratamentos podendo ser explicado conforme Galhaup et al. (2002)

onde concluíram que a produção de lacases está na dependência tanto da fonte de carbono quanto na de nitrogênio. Como neste trabalho o farelo de soja foi usado para regular a relação carbono: nitrogênio, agindo também como um co-substrato, talvez isso possa explicar atividades enzimáticas mais baixas.

As enzimas produzidas por esses fungos são consideradas como extracelulares, mas segundo Szklarz et al. (1989), essas enzimas podem não ser somente extracelulares, encontrando-se ligadas à membrana celular, ou, serem intracelulares como descrito para *Lenzites trabea*. Segundo Lobarzenwski (1990), alguns fungos, são capazes de produzir peroxidases extras ou intracelulares, de acordo com a constituição do meio de cultura. O fungo por ele foi estudado (*T. versicolor*), foi colocado em contato com a lignina e a forma intracelular da enzima migrou para a parede celular, permanecendo em uma forma imobilizada.

É bom ressaltar também que a atividade da enzima depende da temperatura; conforme esta é elevada, a taxa de reação se torna maior. No entanto, à temperaturas elevadas, ocorre a desnaturação da proteína, evidenciada pela perda de atividade da enzima no meio. E também o fato de que a produção de enzimas ligninolíticas varia com o tempo de incubação do microorganismo (MACHADO, 1998).

Um vasto grupo de enzimas está relacionado à biodegradação da lignina; mas existem inúmeros trabalhos sendo realizados até hoje onde colocam em dúvidas a real participação de cada grupo dessas enzimas e a função exata que cada um desses grupos exerce no processo global de oxidação que leva a lignina até o dióxido de carbono e água. A maioria desses estudos provém de experimentos realizados com o basidiomiceto *P. chrysosporium* e por isso não se pode afirmar que o comportamento desse é igual para todos os organismos que podem também degradar a lignina. Os fungos de decomposição branda, por exemplo, são tão efetivos biodegradadores de materiais lignocelulósicos quanto os basidiomicetos, mas os degradam em velocidades bem mais baixas e por isso são menos estudados.

Em geral, a biodegradação da lignina a CO₂ e H₂O depende de um efetivo processo de despolimerização dessa macromolécula que dá origem a compostos de baixa massa molar susceptíveis ao metabolismo intracelular dos fungos (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Embora a diversidade de fungos decompositores de materiais lignocelulósicos seja grande, um número restrito de espécies têm sido estudados em detalhe. O modo de

degradação utilizado por cada fungo e a busca de um maior número de evidências que permitam generalizar os modelos de biodegradação atualmente estabelecidos ou a ser estabelecidos, têm sido bastante restritos (FERRAZ et al., 2000). Por exemplo, alguns dados obtidos com outros fungos de decomposição branca colocam em dúvida se o processo de biodegradação, principalmente da lignina, pode ser generalizado para outras espécies (KUHAD et al., 1997). Isso acaba gerando dúvidas em relação a qualquer linhagem fúngica que possa vir a ser estudada. Seria necessário, portanto um estudo particular de cada espécie partindo dos princípios e das informações necessárias que já se obteve de outras espécies.

3 CONCLUSÕES

- A combinação dos álcalis foi o pré-tratamento que ocasionou uma maior quebra na estrutura da fibra, apresentando uma maior estratificação, observada pela microscopia eletrônica de varredura, e ocasionando cerca de 77% da perda do teor de hemicelulose e 42% da lignina.
- O tratamento com NaOH mostrou ser capaz de remover impurezas e tornar a superfície da fibra mais rugosa, fazendo a retirada parcial da lignina e solubilizar mais de 50% da hemicelulose.
- O tratamento com o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ levou também a uma estratificação da fibra do bagaço de cana-de-açúcar, porém em menor extensão que o tratamento com NaOH não alterando o teor de lignina, mas sendo capaz de solubilizar metade do teor de hemicelulose.
- *A. niger* mostrou maior atividade da enzima lacase no pré-tratamento NaOH + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e maior eficiência da atividade de MnP no controle (bagaço + autoclave).
- *Penicillium* sp. apresentou atividade de lacase estatisticamente semelhante nos tratamentos com NaOH + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e bagaço + autoclave, sendo esses mais eficientes que os pré-tratamentos com NaOH e $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Para a enzima MnP a maior atividade foi observada com as bases combinadas (bagaço + (NaOH + $\text{Ca}(\text{OH})_2$)).
- As enzimas ligninolíticas juntamente com os pré-tratamentos alcalinos tiveram ação na degradação da parede celular do bagaço, mostrando que as enzimas são produzidas de maneira indutiva quando em contato com o substrato lignocelulósico + o álcali, permitindo a entrada das hifas no interior celular.

REFERÊNCIAS:

ADLER, P.R.; ARORA, R.; EL-GHAOUTH, A.; GLENN, D.M.; SOLAR, J.M. Bioremediation of phenolic compound from water with plant root surface peroxidases. **Journal Environmental Quality**, Madison, v. 23, p. 1113 – 1117, 1994.

AGOSIN, E.; BLANCHETTE, R.A.; SILVA, H.; LAPIERRE, C.; CEASE, K.R.; IBACH, E.; RABAD, A.R.; MUGA, P. Characterization of *Palo poderido*, a natural process of delignification in Wood. **Applied. Environmental. Microbioly**, Washington, v. 56, p. 65-74, 1990.

AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.J.B. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.

AHN, M.Y., DEC, J., KIM, J.E.; BOLLAG, J.M. Treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase. **Journal of Environmental Quality**, Madinson, v. 31, p. 1509-1515, 2002.

ÅKERHOLM, M.; HINTERSTOISSER, B.; SALMÉM, L. Characterization of the crystalline structure of cellulose using static and dynamic FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 339, p. 569-578, 2004.

AKHTAR, M.; BLANCHETTE, R. A.; MYERES, G.; KIRK, K. An overview of biomechanical pulping research. In: YOUNG, R.; AKHTAR, M (Ed.). **Enviromentally friendly technologies for the pulp and paper industry**, New York: Geography & Earth Science, p.309-383, 1998.

ANGELOVA, M.B.; PASHOVA, S.B.; SLOKOSKA, L.S. Comparison of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized *Aspergillus nidulans* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, p. 544-549, 2000.

ASPINALL, G.O. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: STUMPF P.K., CORN, E.E. (Ed.) **The biochemistry of plants a comprehensive treatise**, New York: Academic Press, chap. 12, p. 473-500, 1980.

BHATTACHARJEE, S. Membrane lipid peroxidation, free radical scavengers and ethylene evolution in *Amaranthus* as affected by lead and cadmium.

Biologia Plantarum, Praha, v. 40, n.1, p. 131-135, 1997.

BAUDEL, H.M. Pré-tratamento e hidrólise. In: WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE: HIDRÓLISE PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, PROJETO PROGRAMA DE PESQUISAS EM POLÍTICAS PÚBLICAS. 3., 2006, Campinas. **Palestra...** Campinas: UNICAMP, 2006. Disponível em:

<http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/Hidrolise%20Baudel%20Apresenta%E7%E3o.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2008.

BENNET, J.W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnolgy**, New Orleans, v. 66, p. 101-107, 1998.

BERGUIN, P.; AUBERT, J.P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiolgy Reviews**, London, v. 13, p. 25-58, 1994.

CANTARELLA, G., GALLI, C.; GENTILI, P. Free radical *versus* electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems: Catalytic or stoichiometric procedures. **Journal of Molecular Catalysis: Enzymatic**, Amsterdam, v. 22, p. 135-144, 2003.

BLEDZKI, A. K.; GASSAN, J. Composites reinforced with cellulose – based fibres, **Progress in Polymer Science**, Kassel, v. 24, p. 221-74, 1999.

BONOMO, R.P., CENNAMO, G., PURRELLO, R., SANTORO, A.M.; ZAPPALA, R. Comparison of three fungal laccases from *Rigidoporus lignosus* and *Pleurotus ostreatus*: correlation between conformation changes and catalytic activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 83, n. 1, p. 67-75, 2001.

BROWN, J.A., ALIC, M.; GOLD, M.H. Manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*: activation by manganese. **Journal of Bacteriology**, New York, v. 13, p. 4101-4106, 1991.

BUMPUS, J.A.; TIEN, M.; WRIGHT, D.; AUST, S.D. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungi. **Science**, Washington, v. 228, p. 1434-1436, 1985.

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

CALERA, J.A.; SÁNCHEZ-WEATHERBY, J.; LÓPES-MEDRANO, R.; LEAL, F. Distinctive properties of the catalase B of *Aspergillus nidulans*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 475, p. 117-120, 2000.

CARASCHI, J.C. **Estudo das relações estrutura/propriedades de carboximetilcelulose obtida por derivatização de polpa de bagaço de cana de- açúcar**. 1997. 188p. Tese (Doutorado em Química) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

CAMPANA FILHO, S.P.C.; FROLLINI, E.; CURVELO, A.A.S. Organosolv delignification of lignocellulosic materials: preparation and characterization of lignin and cellulose derivatives, **Polimeros: Ciência e Tecnologia**, Brasília, v. 12 p.163-78, 1997.

CHEFETZ, B., CHEN, Y.; HADAR, Y.. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 3175-3179, 1998.

CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. **Micron**, New York, v. 35, p. 93-96, 2004.

CONCEIÇÃO, D.M.; ANGELIS, D.A.; BIDOIA, E.D; ANGELIS, D.F. Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 99-106, 2005.

COTTERILL, J.V., R.M. WILKINS; SILVA, F.T. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agroindustriais **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 40, p. 133-142., 1996.

CUNHA, M.A.A.; SOLVA, S.S.; CARVALHO, W.; SANTOS, J.C. Uso de células imobilizadas em gel PVA: uma nova estratégia para produção biotecnológica de Xilitol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. **Ciências Agrárias**, Teresina, v. 26, p. 61-70, 2005.

D' SOUZA, T.M., MERRITT, C.S.; REDDY, C.A. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 12, p. 5307-5313, 1999.

DA SILVA, R.; FRANCO, C.M.L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: Revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 249 – 260, 1997.

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

DURÁN, N., ROSA, M.A., D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, n. 7, p. 907-931, 2000.

DURÁN, N. Applications of oxidative enzymes in waste treatment. **Wastewater Treatment Using Enzymes 2**, Trivandrum, v. 11, p. 41 -51, 2003.

D'ALMEIDA, M.L. O. Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: _____ **Celulose e Papel - Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica**, 2 ed. th, São Paulo: Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo, vol. 1, 1988,

DU TOIT, P.J.; OLIVIER, S.P.; VAN BILJON, P.L. Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates. 1. Characterization of bagasse with regard to monosaccharide, hemicellulose and amino acid composition. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 26, p. 1071-1078, 1984.

ENGUITA, F.J., MARTINS, L.O., HENRIQUES, A.O.; CARRONDO, M.A. Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 21, p. 19416-19425, 2003.

ERIKSSON, K.E. Biotechnology in the pulp and paper industry. **Wood Science Technology**, Heidelberg, v. 24, p. 79-101, 1990.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Ed. Educs, 2004.

FAN, L.T.; GHARPURAY, M.M.; LEE, Y.H. **Cellulose hydrolysis**. Berlin, v. 38, p. 22-27, 1987.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin. Ed. Walter de Gruyter, 1989.

FERRAREZI, J.D. **Adsorção de Cu(II) em lignina alcalina de trigo modificada quimicamente**. 1996. 111p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1996.

FERRAZ, A, BAEZA, J.; DURÁN, N. Softwood biodegradation by an ascomycete *Chrysonilia sitophila* (TFB 27441 strain). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 13, p. 86-91, 1991.

FERRAZ, A.; DURÁN, N. Lignin degradation during softwood decaying by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 6, p. 265-270, 1995.

FERRAZ, A.; CHRISTOV, L.; AKHTAR, M. Fungal pretreatment for organosolv pulping and dissolving pulp production. In: YOUNG, R.; AKHTAR, M. (Ed.). **Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry**. New York: Geography & Earth Science, 1998, p. 421-447.

FERRAZ, A.; PARRA, C.; FREER, J. BAEZA, J.; RODRÍGUEZ, J. Characterization of white zones produced on *Pinus radiata* wood chips *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispora*. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 16, p. 641-645, 2000.

FERREIRA, A.; HANNA, R. K.; LEBRÃO, G. W.; LEBRÃO, S. M. G.; NAGASHI, L.; SU, M. T.; VICENTINI T. **Avaliação de compósito de poliéster e fibra de cana de açúcar**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 17., 2006, Foz do Iguaçu. Resumo disponível em:
<http://www.metallum.com.br/17cbecimat/resumos/17Cbecimat-212-001.pdf>. Acesso em: 22 ago 2008.

FLOUNOY, D. S.; PAUL, J. A.; KIRK, T. K.; HIGHLEY, T. K.. Changes in the size and volume of pores in sweet gum during simultaneous rot by *Phanerochaete chrysosporium*. **Holzforschung**, Berlin, v. 47, p. 297-301, 1993.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Cana de açúcar. In._____. Agrianual 2007: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo, 2007.

FOCHER, B.; MARZETTI, A.; CRESCENZI, V. **Steam explosion techniques: fundamentals and industrial applications**. Amsterdam: Gordon and Breach, Reading, 1988, 413 p.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.59, p. 618-628, 2002

GALHAUP, C.; WAGNER, H.; HINTERSTOISSER, B.; HALTRICH, D. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 30, p. 529-536, 2002.

GIANFREDA, L.;BOLLAG, J.M. Effect of soils on the behavior of immobilized enzymes. **Soil Science. Society of America Journal**, Madison, v. 58, p. 1672-1681, 1994.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. **Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications)**. Washington: United States Department of Agriculture, 1970. 379 p. (Agriculture Handbook).

GOLD, M.H.; ALIC, M. Molecular Biology of the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbiological Reviews**. Washington, v. 57, n. 3, p. 605-622, 1993.

GOLDSTEIN, I.S. **Organic chemicals from biomass**. Boca Raton: CRC Press, 1981. 310p.

HAEMMERLI, S.D.; FIECHTER, A.; LEISOLA, M.S. A. Lignin biodegradation: new development. In: **INTERNATIONAL BIOTCHENOLOGY SYMPOSIUM**, 8., Paris, v. 2, p. 1030-1041, 1988.

HANKIN, L.; ANAGMOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, p. 597-607, 1975.

HOFRICHTER, M., VARES, T., SCHEIBNER, K., GALKIN, S., SIPILA, J.; HATAKKA, A. Mineralization and solubilization of synthetic lignin (DHP) by manganese peroxidases from *Nematoloma frowardii* and *Phlebia radiata*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 67, p. 217-228, 1998.

HOFRICHTER, M., VARES, T., KALSI, M., GALKIN, S., SCHEIBNER, K., FRITSCH, W.; HATAKKA, A. Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ^{14}C labelled lignin (14C-DHP) during solidstate fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 1864-1870, 1999.

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

HOFER, C.; SCHLOSSER, D. Novel enzymatic oxidation of Mn^{2+} to Mn^{3+} catalyzed by a fungal laccase. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 451, p. 186-190, 1999.

JEFFRIES, T.W. Biodegradation of lignin and hemicelluloses *In*: Ratledge, C. (Ed.). **Biochemistry of microbial degradation**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1994. 590 p.

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

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

KAMIDA, H.M.; DURRANT, L.R.; MONTEIRO, R.T.R.; ARMAS, E.D. biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005.

KERSTEN, P.J.; KIRK, T.K. Involvement of a new enzyme, gloxal oxidase in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, p. 2195-2202, 1987.

KEUM, Y.S.; LI, Q.X. Copper dissociation as a mechanism of fungal laccase denaturation by humic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 64, p. 588-592, 2004.

KIRK, T.K.; SHIMADA, M. Lignin biodegradation: The microorganisms involved and the physiology and biochemistry of degradation by white-rot fungi. *In*: HIGUCHI, T. (Ed.). **Biosynthesis and biodegradation of wood components**. San Diego: Academic Press, 1985. v. 21, p. 579- 605.

KIRK, T.K.; FARREL, R.L. Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 41, p. 465-505, 1987.

KIRK, T.K.; CULLEN, D. Enzimology and molecular genetics of wood degradation by white-rot-fungi. *In*: JOHN WILEY & SONS. **Enviromentally friendly technologies for the pulp and paper industry**, New York, p.273-308, 1998.

KLICH, M.A.; PITT, J.I. **A laboratory guide to common *Aspergillus* pecies and their teleomorphs**. North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1988.

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

LOBARZENWSKI, J. The characteristics and functions of the peroxidases from *Trametes versicolor* in lignin biotransformation. **Journal of Biotechnology**, Washington, v. 13, p.11-117, 1990.

LEISOLA, M.S.A.; FLETCHER, A. New trends in lignin biodegradation. In: MIZRAHI, A.; WEZEL, A.L. **Advances in biotechnological process 5**. New York: Alan R. Liss Inc., 1985. p.59-89.

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

LESCHINE, S. Cellulose degradation in anaerobic environments. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 399-426; 1995.

LEVI, B. F. The natural history of the degradation of Wood Phill. **Transactions of royal society of London**, London, v. 321, p. 423-433, 1987.

LI, K., XU, F.; ERIKSSON, K.E.L. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 6, p. 2654-2660, 1999.

MACHADO, K.M.G. **Biodegradação de Pentaclorofenol por fungos basidiomicetos lignocelulolíticos em solos contaminados com resíduos industriais**. 1998. 172p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Instituto de Biociências do campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

MALLICK, N.; MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 157, p. 183-193, 2000.

MATHIAS, A.L. **Produção de vanilina a partir de lenhina (Lignina): estudo cinético e do processo**. 1993. 327p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade do Porto, Porto, Portugal, 1993.

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

MELO, I.S; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: Embrapa – CNPMA, 2008. 440p.

MESTER, T.; TIEN, M. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. **International Biodeterioration Biodegradation**, Barking, v. 46, p. 51-59, 2000.

MICHALOWICZ, G., TOUSSAINT, B.E; VIGNON, M.R. Ultrastructural changes in poplar cell wall during steam explosion treatment. **Holzforschung**, Berlin, v. 45, p. 175-179, 1991.

MODA, E.M., HORII, J., SPOTO, M.H.F. Edible mushroom *Pleurotus sajor caju* production on washed and supplemented sugar cane bagasse. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 62, n. 2, p. 127-132, 2005.

MOREIRA NETO, S.L. **Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**. 2006. 110 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.

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

NICELL, J.A; BEWTRA, J.K, BISWAS, N.; TAYLOR, E. Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater. **Water Research**, New York, v. 27, p. 1629 – 1639, 1993.

NOGUEIRA, A.M.P.; VENTURINI FILHO W.G. **Aguardente de cana**. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2005.

NOVENTA-JORDÃO, M.A.; COUTO, R.M.; GOLDMAN, M.H.; AGUIRRE, J.; IYER, S.; CAPLAN, A.; TERENCE, H.F.; GOLDMAN, G.H. Catalase activity is necessary for heat-shock recovery in *Aspergillus nidulans* germlings. **Microbiology**, New York, v. 145, p. 3229-3234, 1999.

O NOVO CICLO DA CANA: Estudo sobre a competitividade do sistema agroindustrial da cana-de-açúcar e prospecção de novos empreendimentos. Brasília: IEL/NC SEBRAE, 2005. 344p.

ÖNNERUD, H., ZHANG, L., GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. Polymerization of monolignols by redox shuttle – mediated enzymatic oxidation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 1953-1962, 2002.

ORIARAN, T.P.; LABOSKY, P. Jr.; BLANKENHORN, P.R. Kraft pulp and papermaking properties of *Phanerochaete chrysosporium* degrade aspen. **TAPPI**, Atlanta, v. 73, n. 7, p. 147-152, 1990.

PALMIERI, G., GIARDINA, P., BIANCO, C., FONTANELLA, B.; SANNIA, G. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 920-924, 2000.

PAPINUTTI, V.L.; DIORIO, L.A.; FORCHIASSIN, F. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 30, p. 157-160, 2001.

PÉRIÉ, F.H.; GOLD, M.H. Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 2240-2245, 1991

PURI, V.P. Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, New York, v. 26, p. 1219-1222, 1984.

RAMOS, L.P.; BREUIL, C.; SADDLER, J.N. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 34, n. 35, p. 37-48, 1992a.

RAMOS, L.P.; BREUIL, C.; KUSHNER, D.N.; SADDLER, J.N. **Holzforschung**, Berlim, v. 46, p.149-154, 1992b.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials **Química Nova**, São Paulo, v. 26, p. 863-871, 2003.

RICE-EVANS, C.A.; DIPLOCK, A.T.; SYMONS, M.C.R. Techniques in free radical research. In: BURDON, R.H.; VAN KNIPPENBERG, P.H. (Ed.). **Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology**. Amsterdam: Elsevier, 1991. v. 22, 291p.

RIPOLI, T.C.C.; RIPOLI, M.L.C. O setor sucroalcooleiro no Brasil. In:_____ **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. Piracicaba: Barros e Marques Editoração Eletrônica, 2004. 302p.

RIZZATTI, A.C.S. **Propriedades regulatórias e funcionais do sistema xilanolítico do fungo *Aspergillus phoenicis***. 2004. 148 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

RODRÍGEZ, J.; FERRAZ, A.; NOGUEIRA, R.P.; FREER, J.; ESPOSITO, E.; DURÁN, N. Lignin biodegradation by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. **Applied. Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 62, p. 233-242, 1997.

RODRÍGUEZ E, PICKARD, M.A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. **Current Microbiology**, New York, v. 38, p. 27-32, 1999.

SANTOS, LG. **Resposta técnica**: Porto Alegre; SENAI/RS, 2005.

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

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

SERRA, R.M.A. **Microflora das uvas portuguesas e seu potencial para contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A**. 2005. 212 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia da Universidade do Minho de Portugal, 2005.

SHAN, V.; NERUD, F. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 857-870, 2002.

SHLEEV, S.V., MOROZOVA, O.V., NIKITINA, O.V., GORSHINA, E.S., RUSINOVA, T.V., SEREZHENKOV, V.A., BURBAEV, D.S., GAZARYAN, I.; YAROLOV, A. Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. **Biochimie**, Paris, v. 86, p. 693-703, 2004.

SILVA, V.L.M.M.; GOMES, W.C.; ALSINA, O.L.S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 2, p. 27-32, 2007.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: Impr. Univ. UFV, 1998, 166p.

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry fundamentals and applications**. 2. ed. Th.. Boca Raton: Academic Press, 1992.

SREBOTNIK, E.; MESSNER, K.; FOISNER, R. Ultrastructural localization of ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* by imunogold labeling. **Current Microbiology**, New York, v. 16, p. 221-227, 1988.

STASZCZAK, M., ZDUNEK, E.; LEONOWICZ, A. Studies on the role of proteases in the whiterot fungus *Trametes versicolor*: effect of PMSF and chloroquine on ligninolytic enzyme activity. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 40, p. 51-63, 2000.

SZKLARZ, G.D., ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, New York, v. 81, n. 2, p. 234-240, 1989.

SREBOTINK, E.; JENSEN, K.; KAWAI, S.; HAMMEL, K. Evidence that *Ceriporiopsis subvermispora* degrades nonphenolic lignin structure by a one-electron-oxidation mechanism. **Applied and Environmental Microbiology**, Saint Paul, v. 63, p. 4435-4440, 1997.

TEKCHANDANI, S.; GURUPRASAD, K.N. Modulation of a guaiacol peroxidase inhibitor by UV-B in cucumber cotyledons. **Plant Science**, Columbus, v. 136, p. 131-137, 1998.

TITA, S. P. S.; PAIVA, J. M. F.; FROLLINI, E. Resistência ao impacto e outras propriedades de compósitos lignocelulósicos: matrizes termofixas fenólicas reforçadas com fibras de bagaço de cana-de-açúcar. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Paulo, v. 12, n. 4, p. 228-239, 2002

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

TRIANA, O.; LEONARD, M.; SAAVEDRA, F.; FERNÁNDEZ, N.; GÁLVEZ, G.; PEÑA, E. **Atlas del Bagazo de la Caña de Azúcar**, México: Elsevier, 1990.

TUOMELA, M. **Degradation of lignin and other ¹⁴C-labelled compounds in compost and soil with an emphasis on white-rot fungi**. 2002. 70 p. Dissertação (Mestrado em Química e Microbiologia) - University of Helsinki, Helsinki, 2002.

UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIERA DE SÃO PAULO – ÚNICA. Disponível em <http://www.portalunica.com.br>. Acesso em: 15 set. 2008.

VAN DER MERWE, J.J. Production of laccase by the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*. 2002. 125 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - University of the Free State, Bloemfontein, 2002.

VAN SOEST, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous feed II. A rapid method for determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of Official Agriculture Chemistry**, London, v. 46, n. 5, p. 829-35, 1963.

VASSILEV, N.; BACA, M. T.; VASSILEVA, M. Plant lignocellulose and decomposition by fungi: from nature to industrial use. **The Mycologist**, Cambridge, v. 8, p. 113-114, 1994.

VIEIRA, R.G.P.; RODRIGUES FILHO, G.; de ASSUNÇÃO, R.M.N.; MEIRELES, C.S.; VIEIRA, J.G.; OLIVEIRA, G.S. Synthesis and characterization of methylcellulose from sugar cane bagasse cellulose. **Carbohydrate Polymers**, Barking, n. 67, p. 182-189, 2007.

VITTI, D.M.S.S.; DEL MASTRO, N.L.; KIKUCHI, O.K.; NOGUEIRA, N.L. Irradiação de resíduos fibrosos com feixes de elétrons: efeitos na composição química e digestibilidade. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 2, p. 159-171, 1998.

WILBERG, K.Q. **Oxidação de compostos fenólicos em solução aquosa com enzima peroxidase de extratos vegetais**. 2003. 268 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2003.

WOODWARD, J. Xylanases: functions, properties and applications. In: _____. **Introduction to topics in enzyme and fermentation biotechnology**. Berlin: Ellis Horwood, 1983. chap. 2, p. 9 – 30, 1984.

WOOD, T.M.; GARCIA-CAMPAYO, V. Enzymes and mechanisms involved in microbial cellulolysis *In*: Ratledge, C. (Ed.). **Biochemistry of microbial degradation.**, Netherlands: Kluwer academic publishers, 1994. 590 p.

YAYER, D.S., XU, F., GOLIGHTLY, E.J., BROWN, K.M., BROWN, S.H., REY, M.W., SCHNEIDER, P., HALKIER, T., MONDORF, K.; DALBOGE, H. Purification, Characterization, Molecular Cloning, and Expression of Two Laccase Genes from the White Rot Basidiomycete *Trametes villosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 3, p. 834-841, 1996.

ZENI, G.; PENDRAK, I.P. **Bionconversão de celulose em proteína utilizando a levedura *Cândida utilis* e o fungo *Pleurotus ostreatus***. Ponta Grossa: Universidade Federal Tecnológica do Paraná, 2006. 58p

ANEXOS

ANEXO A – Teste de Tukey (5%) realizado para a enzima lacase produzida pelo fungo *Aspergillus niger* para as médias dos diferentes tratamentos

DMS (TUKEY)	= .1021	
Tratamento	Média	
NaOH +. Ca(OH) ₂	2.7211	A
NaOH	2.5394	B
Ca(OH) ₂	2.1504	C
Controle	1.7342	D

* Os dados foram transformados por $\sqrt{(x+1)}$ para ser realizada a análise estatística. Médias seguidas por letras diferentes diferem do Teste de Tukey ao nível de 5% de significância

ANEXO B – Teste de Tukey (5%) realizado para a enzima MnP produzida pelo fungo *Aspergillus niger* para as médias dos diferentes tratamentos

DMS (TUKEY)	= .0739	
Tratamento	Média	
Controle	2.9512	A
Ca(OH) ₂	2.8718	B
NaOH	1.8997	C
NaOH +. Ca(OH) ₂	1.5636	D

* Os dados foram transformados por $\sqrt{(x+1)}$ para ser realizada a análise estatística. Médias seguidas por letras diferentes diferem do Teste de Tukey ao nível de 5% de significância

ANEXO C – Teste de Tukey (5%) realizado para a enzima lacase produzida pelo fungo *Penicillium* sp. para as médias dos diferentes tratamentos

DMS (TUKEY)	= .0389	
Tratamento	Média	
Controle	2.7097	A
NaOH +. Ca(OH) ₂	2.6790	A
Ca(OH) ₂	2.0948	B
NaOH	1.6313	C

* Os dados foram transformados por $\sqrt{(x+1)}$ para ser realizada a análise estatística. Médias seguidas por letras diferentes diferem do Teste de Tukey ao nível de 5% de significância

ANEXO D – Teste de Tukey (5%) realizado para a enzima MnP produzida pelo fungo *Penicillium* sp. para as médias dos diferentes tratamentos

DMS (TUKEY)	= .0462	
Tratamento	Média	
NaOH +. Ca(OH) ₂	2.9721	A
Ca(OH) ₂	2.3481	B
Controle	2.0506	C
NaOH	1.9538	D

* Os dados foram transformados por $\sqrt{(x+1)}$ para ser realizada a análise estatística. Médias seguidas por letras diferentes diferem do Teste de Tukey ao nível de 5% de significância