

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

DJANIRA RODRIGUES NEGRÃO

Modificações estruturais da lignina causada por fungos

Piracicaba

2015

DJANIRA RODRIGUES NEGRÃO

Modificações estruturais da lignina causada por fungos

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

**Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear
na Agricultura da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Química na Agricultura e
no Ambiente**

**Orientadora: Prof^a Dr^a. Regina Teresa Rosim
Monteiro**

Piracicaba

2015

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Negrão, Djanira Rodrigues

Modificações estruturais da lignina causada por fungos / Djanira Rodrigues Negrão; orientadora Regina Teresa Rosim Monteiro. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

126 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Biodegradação 2. Cromatografia gasosa 3. Espalhamento de raios X a baixos ângulos 4. Espectrometria de massas 5. Fungos basidiomicetos 6. Lignina 7. Metabólitos
I. Título

CDU 547.992 : 630*8

*Aquela conversa amigável,
Aquele sorriso,
A ajuda ou simplesmente a vontade de ajudar,
As orações,
As críticas construtivas,
A compreensão que eu necessitava naquele momento de dificuldade,
O abraço,
A bênção da família,*

Dedico a todos que de alguma forma, estiveram comigo nesta jornada!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço do fundo do meu coração a todas as pessoas que conheci durante os seis anos de Pós-Graduação e, em especial, durante o período do Doutorado.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura e à Universidade de São Paulo pela oportunidade de participar do curso de Doutorado em Ciências.

Querida Professora Dr^a. Regina T. R. Monteiro, obrigada pelas oportunidades que tive sob sua orientação, pelo conhecimento compartilhado, pelo carinho e amizade.

Querido Tadeu, você que sempre apoiou, entendendo minhas fraquezas e exaltando minhas qualidades, pela ótima convivência, pelo carinho e amor de sempre... obrigada!!!

Pai e mãe, obrigada por sempre me apoiarem e pela educação que tanto contribuiu para eu chegar até aqui! Amo vocês!! Meus queridos irmãos Maisa, Maria, Alice e Élcio, agradeço por compreenderem quando eu não pude ir nas reuniões familiares... Meus queridos sobrinhos, Hiago, Taisa, José Victor, Matheus e Maiara, vocês moram no coração da tia...

Aos queridos Sr. Tadeu, Mary Neyde e Marina, muito obrigada pelo carinho de sempre, respeito e amizade!

Professor Dr. Alcides Lopes Leão, obrigada pela oportunidade de fazer parte do time DEFAIT e da Residuall, você sempre terá a minha gratidão!

Prof. Dr. Mario de Oliveira Neto, obrigada pelas oportunidades e por mostrar um novo mundo da ciência, e claro, pela amizade de sempre, irmão!

Aos Docentes do CENA/USP, que contribuíram com a minha formação, e aos funcionários do CENA, pela boa convivência, respeito e ajuda quando precisei, em especial aos funcionários da Pós-Graduação, Fábio, Neuda, Magali, Daiane. Agradeço também as funcionárias da Biblioteca, em especial, à Marília.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Aplicada, em especial ao Gleison (CP), Gislayne, Joyce, Luís Eduardo, João Paulo, Carlos, Vinícius, obrigada pela ajuda e agradável convivência.

Aos Professores que me ajudaram em algum momento do Doutorado e por quem guardo grande carinho, respeito e admiração: Prof. Dr. Antonio C. Maringoni, Dr^a. Camila Caldana, Prof. Dr. Cláudio A. Sansígolo, Prof. Dr. Edson L. Furtado, Prof. Dr. Eduardo Bagagli, Prof. Dr. Fábio M. Squina, Prof. Dr. Fernando Broetto, Prof^a Dr^a. Marli T. A. Minhoni, Prof^a Dr^a. Márcia Chaves, Prof^a. M^a Renata T. A. Minhoni, Prof^a. Dr^a. Renate K. Sakate, Prof. Dr. Willian de Melo Silva.

Agradeço pela cordialidade e respeito aos docentes e funcionários do Departamento de Proteção Vegetal, do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, da Faculdade de Ciências Agrônômicas e aos Docentes e funcionários do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu.

Dear Professor Sain Mohini thank you for being my advisor at UofT, and providing me all the knowledge, teaching more than simple science. Thank you Dr. Robert Jeng (Faculty of Forestry, UofT) for your help and being so friendly ever time.

Prof. Dr. Raimundo S. Passos, obrigada por me ajudar nas análises estatísticas! Sua ajuda enriquece meu trabalho e a sua alegria transformou as reuniões em tardes muito agradáveis!!!

Daniele Chiarelli, obrigada pelos conselhos, pelas risadas, conversas demoradas e até pelas vezes que nos perdemos, que foi divertido no final.

Lívia Brenelli, obrigada pela amizade, respeito e por enriquecer meu trabalho!!

Cesar A. Gandim e Otávio Dias, meus companheiros da RAU! Muito obrigada pela ajuda e amizade!!!

Maria Peres, Karol Dória, Juliana Westerich, Lucivane Gonçalves, Paula Leite, Maysa Pavani e Ligia Linardi, Juliana Cruz, obrigada pela amizade e por compartilhar conhecimentos.

Hans Garcia, obrigada pela ajuda com a biologia molecular e Fernanda Mandeli pela cordialidade e disposição em ajudar com as purificações da lignina.

Queridos João, Janaína e Viviane, vocês sempre serão minha família do Canadá!!

Prof. Dr. Paulo Noronha e Larisa B. Arruda, obrigada pela ajuda nas análises de FTIR.

Obrigada, Prof^a. Dr^a. Adriana Z. Kronka ao permitir utilizar o laboratório de microbiologia.

Agradeço aos amigos e amigas da FCA/UNESP Botucatu, do Laboratório Residual, Funcionários de Docentes do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia. Em especial: Luís, Humberto, Carol, Giovana, Jéssica, Juliana, Raquel.

Agradeço à Lwarcel Celulose pela doação do licor negro utilizado neste trabalho e ao pesquisador Leandro Moreira pela especial atenção.

Agradeço à Universidade do Sagrado Coração (Bauru-SP) pela disponibilidade de uso do Laboratório de Engenharia Ambiental para as análises de DBO.

Agradeço o Prof. Dr. Wanius Garcia (UFABC/Santo André-SP) pela cordialidade e ajuda.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de estudos (Processo n. 2013/15747-4).

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudos no início do doutorado e pela bolsa de doutorado sanduíche, concedida pelo programa CAPES/DEFAIT (Projeto n. 001/11).

Agradeço ao Centro de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), pela oportunidade de usar as dependências do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE).

***“Digo, o real não está na saída nem na chegada:
ele se dispõe para a gente é no meio da travessia”***

João Guimarães Rosa

RESUMO

NEGRÃO, D. R. **Modificações estruturais da lignina causada por fungos**. 2015. 126 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

O licor negro, cuja composição majoritária é de lignina, é o principal subproduto gerado após a obtenção de polpa celulósica. Este polímero natural é caracterizado pela elevada massa molecular (MM) e composição aromática. Processos físico-químicos são empregados na fragmentação da lignina com o objetivo de obter compostos aromáticos, cuja fonte não renovável é oriunda de derivados do petróleo. A biodegradação da lignina, causada pela ação de enzimas ligninolíticas fúngicas pode prover compostos aromáticos de baixo peso molecular, como fenóis e antioxidantes, utilizados em diversos segmentos industriais. O objetivo deste trabalho foi estudar a modificação estrutural da lignina causada por fungos basidiomicetos coletados de mata nativa e campos de reflorestamento de eucalipto. Os ensaios de biodegradação foram inicialmente conduzidos utilizando-se 10 espécies de fungos, cultivados em duas concentrações de licor negro (10% e 15%, v/v). No ensaio com licor menos concentrado, utilizaram-se 10 espécies, e no ensaio com licor 15% utilizou-se somente a espécie *Pycnoporus sanguineus*. As análises realizadas para o estudo da modificação estrutural da lignina foram: espectroscopia na região do infravermelho (FTIR/ATR), cromatografia líquida de gel filtração e espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). *P. sanguineus* e espécies de fungos do gênero *Trametes* possuem elevada capacidade de consumir a lignina presente no licor 10%, após 14 dias. A atividade de enzimas ligninolíticas de *P. sanguineus* foi investigada nas duas concentrações de licor. No licor 10%, observou-se elevada atividade das enzimas ligninolíticas manganês peroxidase (MnP), lacase e peroxidases; somente a MnP foi detectada com maior atividade no licor 15%. Análises de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) indicaram que o licor negro 10% biodegradado por *P. sanguineus* possui elevada carga de DBO, sendo tóxico a *Daphia magna* e *Hydra attenuata*. Análises de metabólitos produzidos pelos fungos no licor negro 10% por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) indicaram, principalmente, a produção de açúcares e álcoois em concentrações não muito diferentes dos seus respectivos controles. Embora os fungos sejam capazes de reduzir a massa molecular da lignina presente no licor negro, compostos derivados da sua fragmentação podem sofrer reações de condensação ou repolimerização, contribuindo, eventualmente, para elevar sua massa molecular.

Palavras-chave: Fungos basidiomicetos. Licor negro kraft. Lignina. Biodegradação.

ABSTRACT

NEGRÃO, D. R. **Modification of lignin structure caused by fungi**. 2015. 126 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

Black liquor which the bulk content is lignin, is the main product generated after obtaining cellulose pulp. This natural polymer is characterized by high molecular weight (MW) and aromatic compounds. Physical-chemical processes can be employed to fragment lignin and to produce aromatic compounds to replace those from non-renewable sources such as petroleum. Biodegradation of lignin can provide low molecular weight compounds, such as phenols and antioxidants, which may be employed in various industrial processes. The aim of this work was to investigate the structural modification of lignin caused by basidiomycetes fungi, obtained from native forest and *Eucalyptus* fields. The biodegradation assay was done with 10 fungi species cultivated with two concentrations of black liquor (10% and 15%, v/v). The assay with 10% liquor, 10 species of basidiomycete fungi were used, and in the assay with 15% liquor, it was used only *Pycnoporus sanguineus*. The analyses carried out to determine the structural modification of lignin were: infrared spectroscopy (FTIR/ATR), liquid chromatography gel filtration and small angle X-ray scattering (SAXS). *P. sanguineus* and fungi of *Trametes* genera had high capacity to consume the lignin content in the 10% liquor, after 14 days of cultivation. After that, *P. sanguineus* was selected for assays of ligninolytic enzymes activities in the two liquor concentrations. High activities of manganese peroxidase (MnP), laccase and peroxidase were detected in the 10% liquor, whereas in the concentration of 15% only high MnP activity was detected. Biochemical Oxygen Demand, analysis (BOD) indicated that the biodegraded liquor had high BOD load, and it was toxic to *Daphia magna* and *Hydra attenuata*. Metabolites produced by the fungi in the liquor 10% were analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), which indicated mainly the production of sugars and alcohols in concentrations not far from their respective controls. Although the fungus is able to decrease molecular weight of lignin, its fragments derivatives can undergo condensation or repolymerization reactions, contributing, eventually, to increase its molecular weight.

Keywords: Basidiomycetes fungi. Kraft black liquor. Lignin. Biodegradation.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2. OBJETIVOS..... | 19 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| 3.1 Os constituintes da biomassa vegetal | 19 |
| 3.2 Celulose e hemicelulose – os açúcares da parede celular..... | 20 |
| 3.3 Ligninas e suas múltiplas funções | 21 |
| 3.3.1 Definição e funções | 21 |
| 3.3.2 Constituição química..... | 22 |
| 3.3.3 Grupos funcionais..... | 26 |
| 3.4 Isolamento de ligninas | 27 |
| 3.4.1 Presença de carboidratos | 28 |
| 3.5 Processo kraft e a obtenção não intencional da lignina..... | 29 |
| 3.5.1 Licor negro | 29 |
| 3.5.2 Lignina kraft | 29 |
| 3.6 Processos de fragmentação da lignina | 30 |
| 3.6.1 Processos físico-químicos | 30 |
| 3.6.2 Processos enzimáticos | 32 |
| 3.7 Aplicações biotecnológicas de fungos ligninolíticos..... | 34 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 37 |
| 4.1 Licor negro: origem e preparo | 37 |
| 4.2 Preparo de meio de cultura contendo licor negro..... | 37 |
| 4.3 Coleta, isolamento e preservação de isolados fúngicos..... | 38 |
| 4.4 Identificação molecular de isolados | 39 |
| 4.5 Preparo de inóculo | 41 |
| 4.5.1 Inóculo para o meio de cultura sólido | 41 |
| 4.5.2 Inóculo para o meio de cultura líquido..... | 41 |
| 4.6 Seleção dos fungos | 41 |
| 4.6.1 Crescimento micelial em meio sólido em cinco temperaturas | 42 |
| 4.6.2 Crescimento micelial em meio sólido contendo licor negro | 43 |
| 4.7 Ensaio de biodegradação do licor negro em meio líquido..... | 43 |
| 4.7.1 Biodegradação do licor com espécies de fungos..... | 43 |
| 4.7.2 Biodegradação do licor negro por <i>Pycnoporus sanguineus</i> | 44 |

| | |
|--|-----|
| 4.8 Atividade enzimática..... | 45 |
| 4.9 Análises do licor negro biodegradado..... | 47 |
| 4.9.1 Cromatografia em fase gasosa acoplado a detector de espectrômetro de massa | 47 |
| 4.9.2 Demanda Bioquímica de Oxigênio | 48 |
| 4.9.3 Ensaio de Toxicidade com organismos aquáticos | 49 |
| 4.9.3.1 <i>Hydra attenuata</i> | 49 |
| 4.9.3.2 <i>Daphnia magna</i> | 50 |
| 4.10 Recuperação da lignina do licor negro..... | 51 |
| 4.11 Análises da lignina..... | 52 |
| 4.11.1 Cromatografia líquida de gel de filtração | 52 |
| 4.11.2 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo..... | 53 |
| 4.11.3 Espectrometria na região do infravermelho | 54 |
| 5 RESULTADOS e DISCUSSÃO..... | 57 |
| 5.1 Identificação molecular de isolados de fungos basidiomicetos | 57 |
| 5.2 Crescimento micelial..... | 58 |
| 5.2.1 Meio de cultura sólido contendo serragem | 58 |
| 5.2.2. Meio de cultura sólido contendo licor negro | 62 |
| 5.3 Análises do licor negro | 66 |
| 5.3.1 Principais aspectos do licor negro biodegradado..... | 68 |
| 5.3.2 Análises de metabólitos produzidos por fungos no licor negro..... | 73 |
| 5.3.3. Atividade enzimática..... | 75 |
| 5.3.4 Ensaio de toxicidade..... | 78 |
| 5.3.5 Demanda Bioquímica de Oxigênio | 79 |
| 5.4 Análises da lignina modificada por fungos..... | 81 |
| 5.4.1 Cromatografia líquida de gel filtração | 81 |
| 5.4.2 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo..... | 87 |
| 5.4.3 Espectrometria na região do infravermelho | 94 |
| 6 CONCLUSÕES | 103 |
| REFERÊNCIAS..... | 104 |
| APÊNDICES..... | 115 |

1 INTRODUÇÃO

A maioria das indústrias de polpa celulósica no mundo é construída para utilizar o processo Kraft. Esse processo é escolhido porque resulta em polpa celulósica de melhor qualidade e, não menos importante, porque permite a recuperação dos produtos químicos utilizados durante a polpação. Contudo, em relação à geração de resíduos, o processo Kraft apresenta certas desvantagens, como a cor escura do licor negro e seu odor extremamente desagradável (DYER, 2004).

O licor negro é o principal resíduo gerado após o processamento da polpa celulósica. Sua composição pode variar com o tipo, idade e parte da madeira utilizada, e do processo empregado para a polpação (PILÓ-VELOSO, 1993). A lignina é a maior fração constituinte do licor negro, a qual possui elevada massa molecular e estrutura química ainda não completamente definida (GOSSELINK et al., 2004). Outros componentes, tais como compostos fenólicos, resinas, ácidos graxos, taninos, cromóforos e clorolignina também estão presentes. Em geral, o licor possui alcalino, em torno de pH 14,0, elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) (CHANDRA; ABHISHEK, 2011).

As empresas de papel e celulose não consideram o licor negro como um resíduo sem finalidade, mas sim como um subproduto, uma vez que a energia oriunda da sua queima é capaz de suprir toda a demanda energética da indústria (DYER, 2004, GOSSELINK, 2004). Porém, uma vez que o processo de produção de energia envolve a combustão de lignina, seus derivados potencialmente úteis na indústria química são perdidos. Além disso, essa prática contribui para o aumento das emissões de gases de efeito estufa (AZADI et al., 2013).

Aproximadamente 90% do conteúdo total de lignina presente no licor negro podem ser recuperados através de diferentes métodos (Da RE; PAPINUTTI, 2011). Entretanto, apenas 1 a 2% de lignina recuperada é empregada para a obtenção de uma ampla gama de produtos especiais (LORA; GLASSER, 2002). O restante do conteúdo orgânico presente no licor negro é queimado na indústria geradora. As ligninas comerciais são disponíveis como coprodutos dos processos de polpação, sendo a lignina Kraft e os lignosulfonatos os principais derivados (RAQUEZ et al., 2010).

Do ponto de vista químico, ligninas são consideradas polifenóis complexos e sua estrutura possui locais de alta reatividade que podem ser modificadas através de uma série de reações químicas e biológicas (SÁNCHEZ, 2009). No entanto, o maior desafio é modificar sua estrutura e, ao mesmo tempo, manter sua integridade e propriedades químicas. Ligninas

de diversas fontes lignocelulósicas vêm sendo modificadas e utilizadas como biocompósitos nos mais diversos segmentos industriais. Preparo de compósitos reforçados (PAIVA; FROLLINI, 2006), incorporação em cerâmicas (CERRUTT et al., 2012), composição de baterias (MILCZARECK; INGANAS, 2012), e antioxidantes para borrachas (POUTEAU et al., 2005) são exemplos de emprego de ligninas no segmento industrial de materiais *bio-based*.

Embora a transformação química da lignina seja uma rica fonte de produtos de elevado valor agregados, a modificação enzimática surge como uma alternativa menos poluente que pode acessar uma gama de químicos de origem renovável (SÁNCHEZ, 2009). Nesse sentido, a manipulação de microrganismos como forma de fragmentar a complexa estrutura da lignina tem se mostrado promissora em diversos processos biotecnológicos (AZADI et al., 2013). Os fungos de podridão branca são principais microrganismos estudados no que diz respeito à degradação da lignina, por serem capazes de mineralizá-la até CO₂ e água.

A habilidade de degradação da lignina por fungos de podridão branca é muito variável entre as espécies (BLANCHETTE, 1984), e os mecanismos bioquímicos fundamentais para tais processos ainda não são completamente elucidados (MELO; AZEVEDO, 2008). Contudo, sabe-se que a biodegradação da lignina é resultado da produção extracelular de diversos tipos de enzimas redutoras ou oxidativas, que são inespecíficas devido à heterogeneidade química e muitos tipos de ligações C-O e C-C (HATAKKA; HAMMEL, 2010). As enzimas extracelulares envolvidas na degradação da lignina são as peroxidases e lacases (EC 1.10.3.2.). As peroxidases incluem: (1) lignina peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14), (2) manganês peroxidase (MnP, “Mn-dependente de peroxidase”, EC 1.11.1.13), e (3) peroxidases versáteis (VP, EC 1.11.1.16) (HATAKKA, 1994; MARTÍNEZ, 2002).

A pesquisa com microrganismos hábeis em crescer no licor negro é de interesse industrial, pois possibilita valorizar economicamente um subproduto que tem como principal destino a queima. Esse estudo tem grande importância nos avanços biotecnológicos pela busca de compostos químicos oriundos de fontes renováveis e gerados através de processos biológicos. Este trabalho relata o cultivo de fungos basidiomicetos em licor negro visando à fragmentação enzimática da lignina, e análise da sua estrutura molecular após a biodegradação.

2 OBJETIVOS

- Selecionar fungos basidiomicetos isolados de mata nativa e campos de reflorestamento de *Eucalyptus* spp., pela capacidade de se desenvolver em licor negro.
- Analisar a estrutura da lignina modificada enzimaticamente.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Os constituintes da biomassa vegetal

Desde os primórdios da humanidade, as plantas lignocelulósicas têm contribuído para a permanência dos povos em determinados locais, como fonte de alimentos através da agricultura, como matéria-prima para a construção civil e como uma das mais importantes fontes de combustíveis. Dessa forma, a necessidade de se utilizar completamente todos os componentes da biomassa vegetal contribui para um melhor aproveitamento do uso da terra e produção de alimentos. Ao mesmo tempo, os resíduos podem ser reaproveitados como fonte renovável de energia e outros tipos de matéria-prima, de forma a reduzir nossa dependência aos derivados de petróleo (HARRINGTON et al., 2012).

Em termos de estrutura, a parede celular da célula vegetal é formada pela parede primária, parede secundária externa (S1), parede secundária média (S2) e parede secundária interna (S3), conforme representado na Figura 1. Essas camadas são compostas por microfibrilas celulósicas, orientadas no espaço de forma definida, e protegidas em uma matriz composta de lignina e de hemicelulose (BLANCHETTE, 1991).

Os principais constituintes químicos da parede celular vegetal são a celulose, hemicelulose e lignina. Celulose e hemicelulose são macromoléculas constituídas de açúcares, enquanto que a lignina é um polímero aromático sintetizado de precursores fenilpropanóides (PEREZ et al., 2002; CARVALHO et al., 2009).

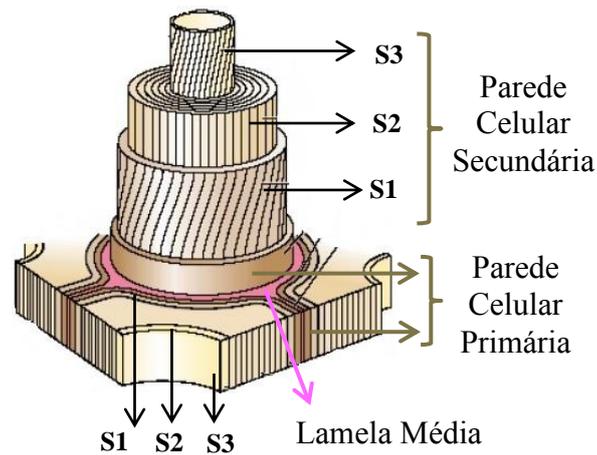


Figura 1 - Esquema representativo das paredes primária e secundária (adaptado de Conti, 2007).

3.2 Celulose e hemicelulose – os açúcares da parede celular

A celulose é um polissacarídeo linear formado por unidades do monossacarídeo β -D-glucose, unidas entre si através de ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4) que originam um polímero linear. A denominação β refere-se à formação de outro carbono quiral (assimétrico) na molécula de glucose, e o prefixo D se refere à atividade óptica dessa substância (CARVALHO et al., 2009).

A molécula de celulose pertence à função química dos carboidratos ou, mais precisamente, a dos glicídios, cuja classificação pode ser dividida em monossacarídeos (aldoses e cetoses), glicosídeos e polissacarídeos (oligossacarídeos e polissacarídeos propriamente ditos). Os glicosídeos podem ser completamente hidrolisados, produzindo monossacarídeos e substâncias pertencentes a outras classes de compostos químicos; após a hidrólise dos polissacarídeos apenas monossacarídeos são produzidos. Análises de raios-x mostraram que as fibras são constituídas de regiões cristalinas (altamente ordenadas), com maior resistência à tração e alongamento, e as regiões amorfas (desordenadas), muito menos resistente comparado à primeira (KOGA, 1988).

O termo hemicelulose é utilizado coletivamente para denominar grupos distintos de polissacarídeos de baixa massa molar que estão intimamente associados à celulose. As hemiceluloses são polímeros constituídos por açúcares do tipo pentoses (xilose e arabinose) e/ou hexoses (glucose, manose e galactose), além de ácidos urônicos e grupos acetila (KOGA, 1988; CARVALHO et al., 2009).

As hemiceluloses isoladas das madeiras são misturas complexas de polissacarídeos, e este termo não designa um composto definido, mas sim uma classe de compostos poliméricos, cada um com sua propriedade particular. Como características principais, citam-se a ausência de cristalinidade e configuração irregular e ramificada, propriedades que contribuem para a absorção de água, intumescimento e o aumento da flexibilidade das fibras. Assim como ocorre com a celulose e lignina, o teor e a proporção dos diferentes componentes encontrados nas hemiceluloses variam de acordo com a parte da planta, tecido, idade e até mesmo entre indivíduos da mesma espécie (KOGA, 1988; CARVALHO et al., 2009).

3.3 Ligninas e suas múltiplas funções

3.3.1 Definição e funções

O maior evento no desenvolvimento de plantas terrestres é a lignificação da parede celular. Uma das adaptações mais importantes desenvolvidas ao longo da existência das plantas na superfície da terra foi a produção de componentes fenilpropanóides, cuja função é de proteger as células contra a dessecação, temperaturas elevadas, exposição à luz UV e ataque microbiano. A habilidade de depositar ligninas fenilpropanóides na parede celular permitiu a adaptação e a permanência das plantas como seres vivos no planeta (WENG; CHAPPLE, 2010). Entretanto, a composição e quantidade de ligninas são altamente variáveis de acordo com a parte da planta, tecidos, idade, entre diferentes espécies e até mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie. A lignina é o segundo componente mais abundante na madeira, ocorrendo entre 15 a 35% do seu peso (SARKANEN; HERGERT, 1971; HARRINGTON et al., 2012).

Muitos genes que participam da biossíntese e deposição das ligninas vêm sendo caracterizados, através de fatores transcricionais e do sequenciamento de genomas, que permitiu descobrir novos genes envolvidos na formação da parede secundária de espécies arbóreas (BOERJAN et al., 2003; GRIMA-PETTENATI et al., 2012) e de gramíneas (HARRINGTON et al., 2012). A partir de estudos de lignina recombinante em coníferas (gimnospermas), alguns dados evidenciam que a biossíntese de monolignóis e a lignificação em espécies de folhosas (angiospermas) e gimnospermas ocorrem de forma paralela. Certas similaridades, entretanto, não são totalmente surpreendentes, uma vez que o processo evolutivo das plantas terrestres dependia também da produção de lignina (WENG; CHAPPLE, 2010; WAGNER et al., 2012).

Sarkanen e Ludwig (1971) denominam o termo “ligninas” ao invés de “lignina”, baseado na polimerização de monolignóis, os quais se diferem pelo número de metoxilações sobre seu anel aromático. Portanto, as ligninas são moléculas complexas e altamente variáveis e, aparentemente, sua síntese é influenciada por fatores ambientais, idade da planta e tipo celular (PILATE et al., 2012). Ligninas são definidas como macromoléculas ou polímeros de natureza aromática (material polifenólico) e amorfa (sem estrutura definida), derivado a partir da polimerização dehidrogenativa (significa que a reação é iniciada por enzimas) de três monômeros fenilpropanóides precursores, os álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (GRIMA-PETTENATI et al., 2012; HARRINGTON et al., 2012).

Uma das principais funções das ligninas é conferir rigidez à parede celular e atuar como agente permanente de ligação entre as células. Devido à sua característica hidrofóbica, as ligninas também atuam no intrincado transporte interno de água, nutrientes e metabólitos por impedir a permeabilidade de água dos tecidos condutores do xilema. As ligninas presentes nas paredes celulares sempre estão associadas com as hemiceluloses, através de interações físicas e de ligações covalentes (SARKANEN, 1971; KOGA, 1988; SALIBA et al., 2001).

As ligninas são polímeros aromáticos complexos e heterogêneos, conferindo elevada resistência à degradação. Tecidos lignificados também são resistentes ao ataque microbiano, impedindo ou dificultando a penetração de enzimas e o acesso aos carboidratos, celulose e hemicelulose. Portanto, além da função essencial de prover integridade à estrutura da madeira, as ligninas protegem-na contra danos bióticos e abióticos. Este é o motivo pelo qual a lignificação ocorre rapidamente em tecidos injuriados, impedindo a entrada de microrganismos e insetos (ORTH et al., 1993; PÉREZ et al., 2002). Alguns fatores decisivos que governam a degradação das ligninas são a quantidade e o tipo de ligninas (G, S) presentes nas árvores (BLANCHETTE, 1991).

De acordo com Blanchette (1995), além da constituição química das ligninas, o tipo da célula, diferente em cada tecido presente no caule, ramos, folhas, e das camadas depositadas na parede celular (S1, S2 e S3) influenciaram o tipo e a extensão da degradação causada por fungos de podridão branca e podridão marrom.

3.3.2 Constituição química

A nomenclatura química da lignina fundamenta-se na unidade básica fenilpropanóide (C_6-C_3 ou C_9), conforme demonstrado na Figura 2. Essa estrutura consiste em um anel

aromático (estrutura fenólica C_6) ligado a uma cadeia alifática (linear) de três átomos de carbono (C_3 , segmento propanóide).

Na estrutura fenilpropanóide, os carbonos do anel fenólico são identificados com números arábicos, no sentido horário (iniciando-se a partir do carbono da ramificação da cadeia lateral). Os carbonos da cadeia alifática são identificados com as letras gregas α , que corresponde ao carbono ligado ao anel benzílico, β e γ , seguindo na ordem sequencial. Os carbonos da cadeia alifática são unidos por ligações éter (C-O-C) e carbono-carbono (C-C) (SARKANEN; ERGERT, 1971; FUKUSHIMA; HATFIELD, 2003; MUNK et al., 2015).

A lignina é formada a partir da polimerização de três monômeros fenilpropanóides (C_9), que variam entre si apenas na metoxilação dos carbonos 3 e 5. Esses monômeros são os álcoois *p*-cumarílico (não possui grupamentos metoxílicos), coniferílico (possui metoxilação no C_3) e sinapílico (possui metoxilação no C_3 e C_5) (Figura 2).

Os três álcoois precursores originam as unidades básicas de lignina: o álcool tipo *p*-cumarílico dará origem às ligninas do tipo *p*-hidroxifenila (H), o álcool coniferílico dará origem às ligninas denominadas tipo guaiacila (G) e o álcool sinapílico às ligninas do tipo siringila (S) (Figura 2) (SARKANEN; HERGERT, 1971; GRIMA-PETTENATI et al., 2012, HARRINGTON et al., 2012).

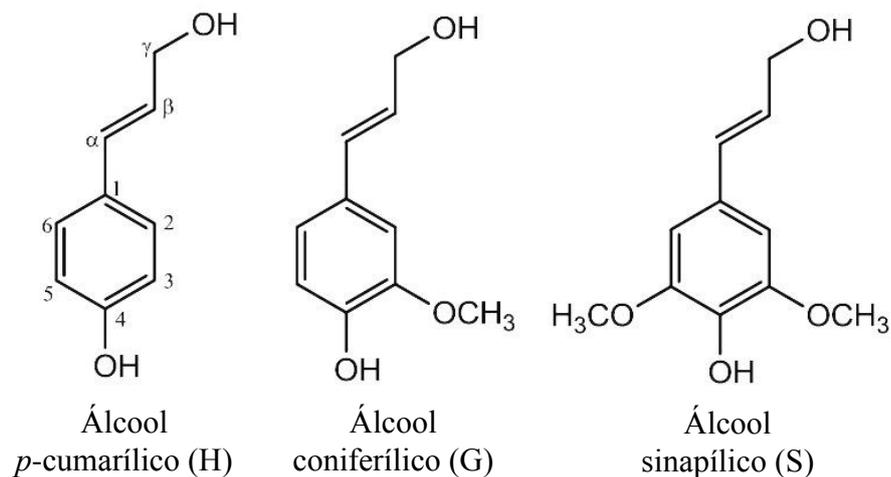


Figura 2 - Álcoois precursores das unidades fenilpropanóides da lignina, *p*- hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S) (Adaptado de Munk et al., 2015).

Dependendo da espécie vegetal, a presença e a concentração das unidades de ligninas são bastante variáveis. No geral, madeiras de coníferas (gimnospermas) são compostas com aproximadamente 95% de unidades de lignina guaiacila (G), e o restante é constituído de unidades H e traços de unidades S. Madeiras de folhosas (angiospermas) possuem uma combinação de unidades de ligninas dos tipos G-S, prevalecendo ligninas do tipo S (HIGUCHI, 1981; CARVALHO et al., 2009).

Em angiospermas, a lignina do tipo S é predominante nas fibras, enquanto que os vasos são ricos em lignina do tipo G; sua composição também é variável entre os tecidos, como por exemplo, as ligninas da lamela média que têm tipicamente uma proporção mais baixa de S-G comparada às ligninas da parede secundária (MARTÍNEZ et al., 2005). Em coníferas, a composição da lignina pode variar de acordo com o tipo de tecido. Por exemplo, elevada relação de unidades de ligninas tipo H-G são encontradas na madeira de compressão, formadas em resposta à força gravitacional (WAGNER et al., 2012).

Os monômeros unem-se entre si por diferentes tipos de ligações químicas: ligações éter (C-O-C), C-C, entre cadeias alifáticas C₃ com duas unidades (β - β' , α - β' , α - α'), entre cadeias alifáticas e anéis aromáticos (β -5', β -1', α -1'), entre carbonos de núcleo aromático (5-5'), além de ligações etéricas, envolvendo cadeias alifáticas e anéis aromáticos (α -O-4', β -O-4'), ou apenas a presença de cadeias alifáticas (α - γ'), conforme alguns exemplos representados na Figura 3 (PILO-VELOSO, 1993; FARAVELLI et al., 2010).

Ligações éter nas posições α e β são os grupos funcionais mais abundantes na cadeia de lado propanóide. Entretanto, as formas mais frequentes de acoplamento entre as unidades ocorrem através das ligações β -O-4, com proporções variáveis entre as plantas lenhosas e não lenhosas (AZADI et al., 2013).

As unidades fenilpropano ligadas de forma trifuncional às unidades adjacentes representam sítios de ramificações que são a origem da estrutura tridimensional característica das ligninas (LIN; DENCE, 1992). A elevada heterogeneidade das ligações covalentes entre as subunidades de lignina aliada à sua ligação com os polissacarídeos da parede celular (desde a gênese celular até a sua apoptose) dificulta a obtenção de ligninas intactas e purificadas, prejudicando sua completa caracterização química (CARPITA et al., 1993).

Em virtude de ainda não haver uma metodologia disponível que permita o isolamento quantitativo e qualitativo de lignina em sua forma natural, ou intacta, sua massa molecular (MM) ainda não é conhecida. Durante o processo de isolamento, a lignina é degradada em fragmentos de tamanhos variáveis. Essa propriedade denomina-se

polidispersividade, medida comumente utilizada como a relação da massa molecular e o valor médio da massa molecular (M_n) de todos os fragmentos constituintes, descrita como MM/M_n .

Valores da massa molecular de ligninas podem variar na faixa de 10^2 a 10^6 KDa refletindo a fonte da lignina assim como o processo de isolamento, grau de purificação e formas de fracionamento e, não menos importante, o método de medida (AZADI et al., 2013). A princípio, a massa molecular de lignossulfonatos é de aproximadamente 10^2 a 10^4 KDa (GORING, 1971), enquanto que ligninas kraft possuem valores menores, em torno de 10^2 KDa. No geral, ligninas de folhosas tendem a possuírem menor massa molecular em comparação às ligninas de coníferas (SARKANEN, 1971; GORING, 1971).

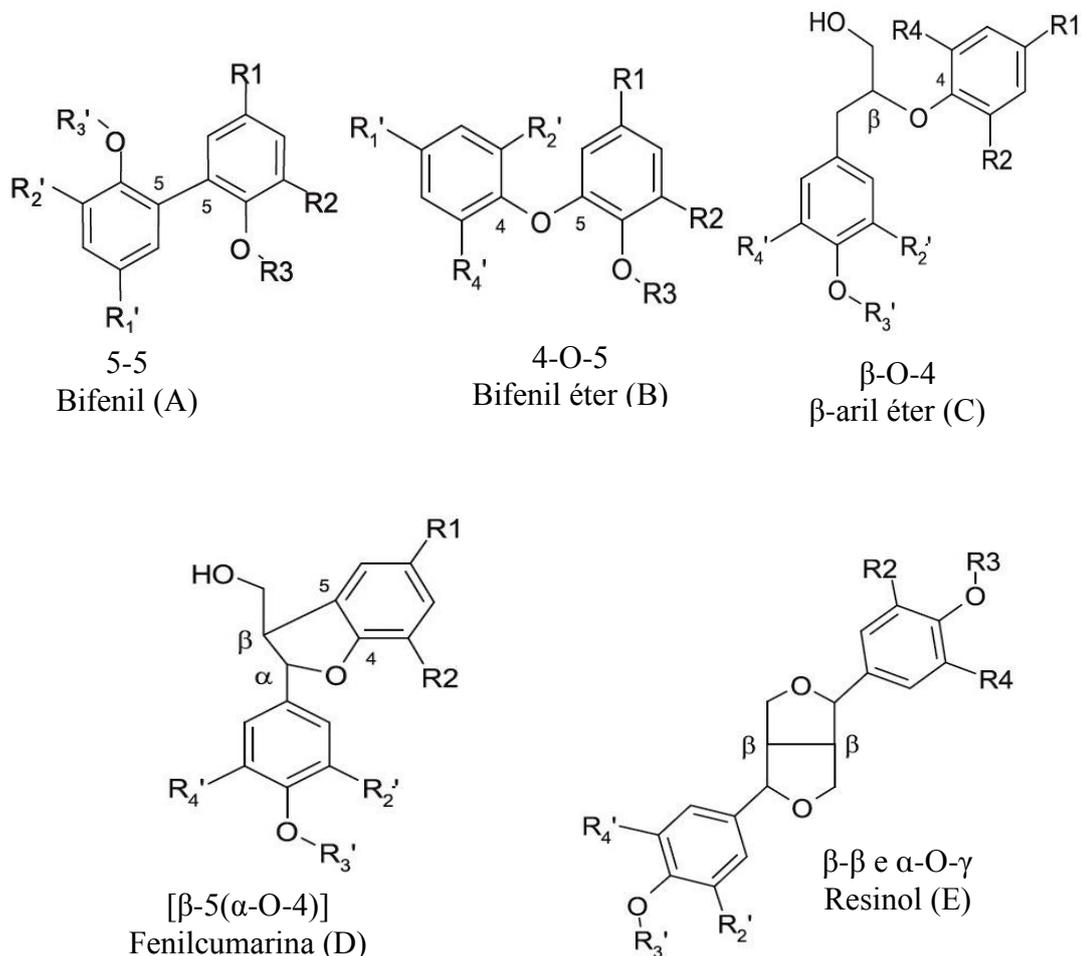


Figura 3 – Exemplos de ligações entre unidades fenilpropanóides e de subestruturas da lignina (adaptado de Faraveli et al., 2010). A) ligações entre carbonos dos núcleos; B) ligação etérica entre carbonos dos núcleos; C) ligações entre carbonos do núcleo aromático e da cadeia alifática; D) ligações entre carbonos do núcleo aromático e cadeia alifática e ligação etérica entre núcleo aromático e cadeia alifática; E) ligação etérica entre cadeia alifática.

3.3.3 Grupos funcionais

O processo de biossíntese da lignina consiste em reações de acoplamento de radicais, às vezes seguido pela adição de água ou de grupos hidroxila fenólica, levando à formação de um polímero que não possui ordem regular. Por este motivo, a lignina é considerada um composto fisicamente e quimicamente heterogêneo. Na literatura as estruturas podem ser representadas por ligninas de madeiras de “*spruce*” e “*beech*”. Essas estruturas são apenas ilustrações dos tipos e modos de ligações das ligninas, assim como os constituintes estruturais dos elementos e a proporção ocorrem nas ligninas (DENCE; LYN, 1992).

De acordo com o tipo da lignina, alguns grupos funcionais são mais abundantes: hidroxílicos fenólicos e alifáticos, éteres (benzílico não cíclico), álcool benzílico, carbonilas, metoxilas e carboxilas, além de unidades dos tipos siringila, guaiacila e *p*-hidroxifenila (SARKANEN; HERGERT, 1971; SALIBA et al., 2001). Alguns exemplos estão representados na Figura 4.

Dentre os grupos funcionais ligados ao esqueleto básico fenilpropanóide, os que possuem maior impacto na reatividade da lignina incluem os grupos hidroxila, hidroxila benzílico e carbonila. Embora pouco reativo, os grupos metoxila servem como uma função útil para chegar a uma medida aproximada do conteúdo fenilpropanóide de uma lignina em particular (DENCE; LYN, 1992).

A quantificação de grupos funcionais proporciona um conhecimento mais detalhado da macromolécula de lignina, fornecendo bases lógicas para propor os fragmentos de sua estrutura, os quais possuem elevada reatividade que resultam em vários tipos de reações químicas possíveis (ERIKSSON et al., 1990; PILÓ-VELOSO, 1993). Para o estudo e determinação de cada um desses grupos funcionais utilizam-se uma série de métodos químicos e físicos ou uma combinação de ambos, os quais englobam reações de degradação oxidativa com nitrobenzeno ou com permanganato de potássio-periodato de sódio e estudo dos produtos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

Métodos não destrutivos para a determinação de grupos funcionais incluem a absorção em espectrofotômetro no comprimento de onda UV e infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (^1H RMN, ^{13}C RMN), espectroscopia de ressonância de Spin eletrônico (ESR), espectrometria de massa (MS, GC-MS). Naturalmente ligados às ligninas, os carboidratos podem estar presentes como contaminantes e a correção dos dados deve ser feita se o teor do mesmo estiver acima de 5% (FENGEL; WENEGER, 1989; PILÓ-VELOSO, 1993; SALIBA et al., 2001).

O grupo metoxílico é considerado um grupo funcional característico de ligninas e seus derivados geralmente são resistentes em meio ácido e alcalino. Sua presença em duas das três unidades fenilpropanóides fundamentais da lignina faz com que seja parte da fórmula mínima das ligninas. A porcentagem de metoxilas em madeiras de coníferas varia de 12 a 16% enquanto que nas madeiras de folhosas, sua presença varia de 18 a 22%.

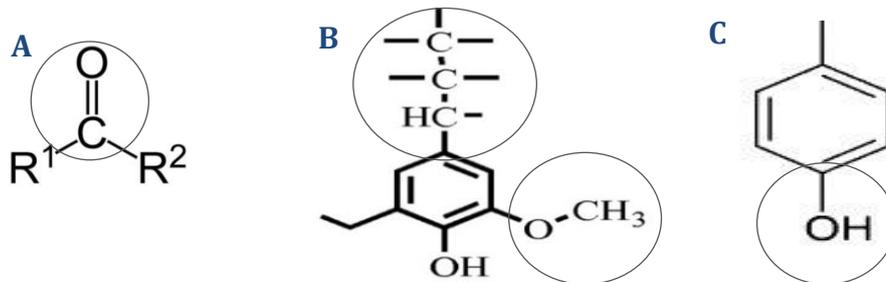


Figura 4 - Principais grupos funcionais presentes na lignina, destacados com círculo. A: carbonila; B: hidroxílico fenólico alifático (círculo superior) e metoxila (círculo inferior); C: hidroxílico fenólico (Adaptado de Faravelli et al., 2010).

O grupo hidroxila é o segundo grupo funcional mais estudado em ligninas presentes tanto na forma de hidroxilas fenólicas ou alifáticas. Enquanto que a maioria dos grupos de hidroxilas alifáticas tem relativamente baixa reatividade, as unidades contendo grupo hidroxila fenólico são mais suscetíveis a reações de clivagem, que compreendem a hidrólise de ligações éter α - β . Essa característica faz com que esse grupo seja mais reativo para modificações. O grupo funcional das carbonilas está presente em todos os tipos de ligninas, na forma não conjugada e conjugada, tendo grande importância nas reações de deslignificação (SALIBA et al., 2001; FENGEL; WENEGER, 1989).

3.4 Isolamento de ligninas

As técnicas para obtenção de ligninas e caracterização estrutural podem ser classificadas de acordo com o método: por extração, isolamento como resíduo e como derivados. Contudo, nenhum desses métodos permite obter a mesma lignina *in situ*, denominada de protoligninas, porque sempre existe uma interferência entre o procedimento e a estrutura da macromolécula (FENGEL; WENEGER, 1989).

No método por extração utiliza-se éter etílico e água e posteriormente etanol, com rendimento final entre 2 a 4%, sendo este tipo de lignina denominado lignina de Brauns ou

lignina nativa (CRAWFORD, 1981). O método de isolamento como resíduo consiste em remover inicialmente os extrativos da madeira. Subsequentemente, removem-se os polissacarídeos por extração com ácido mineral (H_2SO_4 72%) onde o resíduo final é denominado de lignina Klason (CRAWFORD, 1981).

O isolamento de lignina como derivado consiste na moagem da madeira em moinho de bolas, na presença ou ausência de tolueno, seguida de extração com mistura de dioxano ou acetona. A lignina obtida por este método é denominada de lignina de madeira moída (MWL – milled wood lignin) ou lignina de Bjorkman (PILÓ-VELOSO, 1993).

Finalmente, aqui será também exposto o processo kraft que, embora não seja um método criado para o isolamento de lignina com a finalidade de estudos da sua estrutura química, a lignina kraft é amplamente obtida na forma de resíduo, durante o processo de obtenção de polpa celulósica.

3.4.1 Presença de carboidratos

Na célula vegetal, a lignina está naturalmente ligada à hemicelulose (Figura 5) (SHISHIR et al., 2011). Embora, alguns processos de separação e/ou isolamento da lignina permitam que a mesma seja solubilizada, o mesmo ocorre com os carboidratos presentes na madeira, claramente de forma não desejada.

Celulose e hemicelulose também reagem com os íons hidroxila, culminando na presença de moléculas menores e solúveis no licor de cozimento. Esse fato faz com que a lignina isolada do licor negro contenha carboidratos, principalmente advindos da hidrólise das hemiceluloses, ligados à sua estrutura na forma de contaminantes (MIMMS et al., 1993).

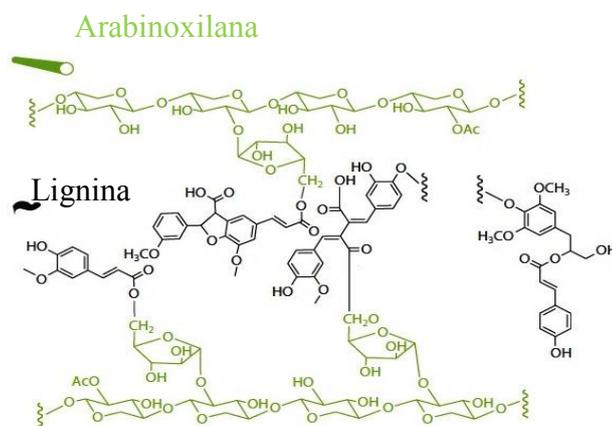


Figura 5 - Complexo lignina-carboidrato de ocorrência natural (adaptado de Ahishir et al., 2011).

3.5 Processo kraft e a obtenção não intencional da lignina

3.5.1 Licor negro

O licor negro recolhido após a lavagem da polpa contém normalmente 14 a 20% de sólidos e pH próximo a 12,0. Em torno de 65% do conteúdo sólido são compostos orgânicos, na sua maioria lignina, além de ácidos graxos, resina, carboidratos e outros componentes encontrados na madeira que foi utilizada. Quando a lignina é solubilizada em ambiente alcalino, sua coloração fica negra, cuja característica é denominada de licor negro. O conteúdo inorgânico (carbonatos, sulfetos etc) presente no licor negro provém do licor de cozimento (licor branco), que podem ser carbonato de sódio, tiosulfato de sódio, sulfito de sódio, hidrossulfito de sódio e sulfato de sódio (MIMMS et al., 1993).

Após o recolhimento do licor negro fraco, o próximo passo é evaporar o máximo possível de água, até o teor mínimo de 60% de sólidos, exigência que deve ser seguida para realizar com segurança a combustão do licor. Ao final desse processo, a concentração do conteúdo sólido do licor permanece em aproximadamente 70-80% e este é então denominado de licor forte. O restante da água recolhida na caldeira de combustão produz vapor proveniente da combustão de gases, de forma a reduzir o enxofre a sulfeto, proporcionando a recuperação dos sais inorgânicos (MIMMS et al., 1993).

3.5.2 Lignina kraft

A lignina é separada da madeira por diversos tipos de processos de polpação, onde o maior interesse é de se utilizar a celulose. Portanto, a lignina é o principal constituinte do licor negro produzido pelas indústrias de polpa celulósica e papel. Como destino, a lignina é queimada e, embora sua contribuição energética para a indústria geradora seja importante, esse processo contribui para as emissões de gases de efeito estufa na atmosfera. Ademais, seus derivados são fontes renováveis de combustíveis e de diversas classes de químicos substituintes aos derivados de petróleo (AZADI et al., 2013).

Mundialmente utilizado, o processo kraft de separação das frações lignocelulósicas tem como principal vantagem a elevada qualidade físico-mecânica da polpa celulósica. Adicionalmente, o eficiente sistema de recuperação de reagentes químicos e de energia contribui para a sua viabilidade econômica. Dentre as desvantagens, destaca-se o odor

extremamente desagradável do licor negro, e também da lignina recuperada, fato que impossibilita seu uso imediato em outras aplicações industriais (MIMMS et al., 1993).

O objetivo do processo kraft é separar quimicamente as fibras da madeira e dissolver a maior parte de lignina contida nas paredes das fibras e na lamela média. As reações da lignina durante o processo kraft são complexas e não completamente elucidadas, mas sabe-se que a lignina é fragmentada em moléculas menores, que não agem mais como o “cimento” sobre a estrutura da madeira. Para tanto, utilizam-se agentes químicos específicos que cozinham, sob elevada pressão e temperatura, o material lignocelulósico. O licor de cozimento no processo kraft é composto pelo hidróxido de sódio (NaOH) e sulfeto de sódio (Na_2S); estes reagentes são eletrólitos e, em solução aquosa, dissociam-se formando os íons OH^- , HS^- e S^{2-} , que aceleram a remoção da lignina. A reação química que atua entre o licor de cozimento e os componentes da madeira ocorre em pH em torno de 14,0 (MIMMS et al., 1993).

3.6 Processos de fragmentação da lignina

3.6.1 Processos físico-químicos

Embora a lignina como subproduto industrial seja parcialmente degradada, seu peso molecular ainda é elevado e, devido à sua natureza complexa, a obtenção de monômeros e dímeros frutos da sua fragmentação é uma tarefa desafiadora (YOSHIKAWA et al., 2013). Ligninas vêm sendo alvo de inúmeros processos de reações físico-químicas com a finalidade de construir sua estrutura química baseada em seus derivados de degradação. Além disso, sempre houve o interesse de utilizar industrialmente esses derivados (DENCE, 1971).

Alguns métodos descritos a seguir foram desenvolvidos a partir da década de 1920 na tentativa de construir uma fórmula química para a lignina, sendo que vários conceitos permanecem até os dias atuais (FREUDENBERG, 1959). Com o propósito de entender a estrutura da lignina, alguns métodos utilizados serão brevemente descritos.

A conversão do anel aromático para estruturas cíclicas não fenólicas ocorre com tratamento com oxidantes, tais como cloro, oxigênio e peróxido de oxigênio. Entretanto, a conversão do núcleo aromático é acompanhada pela perda de grupos metoxila, na forma de metanol. Entretanto, devido à sua elevada reatividade, há ocorrência de intermediários transitórios, numa série de reações que vão além de produtos finais. Em tratamentos oxidativos, os anéis aromáticos podem ser convertidos para outros derivados de estruturas

acíclicas; oxidações subsequentes transformam essas estruturas cíclicas e acíclicas em misturas de fragmentos de ácido mono e dicarboxílico. Como resultado, lignocelulósicos oxidados geralmente contêm fragmentos de ácido carboxílico ligados às cadeias (LIN; DENCE, 1992).

Modificações da cadeia lateral propanóide podem ser feitas com a clivagem de ligações éter (C-O-C) nas posições α e β . Normalmente esse tipo de reação ocorre em condições ácidas, formando álcoois correspondentes secundários, como α -éteres (FENGEL; WENEGER, 1989).

Clivagem de ligações β -éter nas unidades fenólicas e não fenólicas ocorrem em meio alcalino sob elevada temperatura, que é justamente o que ocorre no processo kraft de polpação. A clivagem de uma ligação éter α e β é um passo vital no processo de polpação alcalina e geralmente é a responsável pela fragmentação e dissolução da lignina. Finalmente, a adição de bissulfeto na solução alcalina aumenta a taxa de extensão da clivagem β -aril nas unidades fenólicas (MIMMS et al., 1993).

Em condições apropriadas, o lado propanóide da cadeia pode sofrer ruptura em três possíveis sítios 1- α , α - β ou β - γ , gerando três possíveis situações: sítios de três, dois ou um fragmento de carbono, respectivamente. Esse tipo de fragmentação pode ocorrer em processos de branqueamento da polpa e também em processos microbianos. Os principais fragmentos gerados são aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos (KIRK; FARREL, 1987).

Outros tipos de modificações químicas são reações de substituição que ocorrem pelo ataque de um reagente no núcleo do carbono benzílico. A conversão de um álcool benzil ou éter para um grupo sulfônico ácido é essencial na solubilização da lignina no processo sulfito. Processos como hidrogenação podem culminar na eliminação de grupos etilenos e carbonila, os quais podem contribuir como agente cromóforo durante os processos de polpação. Como consequência, reações que envolvem a formação e eliminação de grupos funcionais de múltiplas ligações podem influenciar significativamente a cor residual na polpa branqueada ou não (KIRK; FARREL, 1987).

Atualmente, outros métodos de produção de fenóis a partir da lignina têm sido estudados. Solvólises, incluindo hidrólises, hidrogenólises, pirólises e oxidações alcalinas podem ser empregadas para obter fenóis (ZAKZESKI et al., 2010, PANDEY; KIM, 2011). Fracionamentos de ligninas com explosão a vapor em um sistema água-etanol indicaram que a solubilidade da lignina aumentou quando fracionada em compostos de baixo peso molecular (WANG; CHEN, 2013). De modo similar, Yoshikawa et al. (2013) descrevem um novo

método de obtenção de fenóis derivados da lignina utilizando compostos catalíticos e autoclavagem da lignina em solução contendo água e butanol.

Métodos de fracionamento da lignina com solventes também produzem derivados como monômeros a oligômeros (GOSSELINK et al., 2012). Após processos de fracionamento com solventes orgânicos, Li et al. (2012) observaram que frações de lignina extraídas com etilacetato possuíam materiais homogêneos de baixo peso molecular, enquanto que ao utilizar acetona, a mistura apresentava materiais de médio e alto peso molecular.

Como exemplo de processamentos termoquímicos de despolimerização da lignina, os principais métodos estudados são a pirólise (termólise), gaseificação, hidrogenólise, oxidação química e a hidrólise em condições supercríticas. O óleo pirolítico e o syngas são os produtos primários obtidos da pirólise e gaseificação da lignina; neste caso, o principal problema é a elevada quantidade de carvão produzida. O tratamento térmico (com pressão de gás hidrogênio) que converte em combustíveis os derivados de lignina como fenóis parece ser promissor (PANDEY; KIM, 2011).

As reações aqui apresentadas podem ou não representar o que realmente ocorre durante a fragmentação de cada tipo de lignina. Assim sendo, a falta de conhecimento sobre a estrutura da lignina e de métodos analíticos adequados capazes de caracterizar as ligninas poliméricas são os maiores obstáculos que impedem a valorização da lignina. Sem dúvida, estes são os maiores desafios a serem superados de forma a solucionar os problemas fundamentais que envolvem a caracterização da lignina (LIN; DENCE, 1992).

3.6.2 Processos enzimáticos

Abordagens sobre a biodegradação da lignina se iniciaram para decifrar sua estrutura química (FREUDENBERG, 1959). Conseqüentemente, novas oportunidades surgiram a partir desse conhecimento que visam à utilização de compostos químicos aromáticos, derivados de um polímero de origem renovável, em substituição aos compostos aromáticos derivados de origem fóssil (RIBBONS, 1987).

Na literatura é possível encontrar muitas sugestões de processos de desenvolvimento industrial para a conversão de resíduos lignocelulósicos em produtos comerciais. Todavia, muitos processos ainda não são viáveis economicamente, particularmente aqueles envolvendo microrganismos como agentes de bioconversão (CRAWFORD, 1981). Isso se deve pela complexidade da transformação/degradação da biomassa, exigindo a definição de uma taxa de concentração de enzimas para um determinado substrato, considerando também a adsorção

improdutiva (DYK; PLETSCHE, 2012). Portanto, a compreensão de processos e reações que envolvem enzimas é de fundamental importância para a valorização da lignina *via* processos biológicos.

Processos enzimáticos envolvendo modificações de lignina industrial têm recebido atenção pelo custo sustentável e de custo relativamente menor comparado aos processos físico-químicos. Ainda, o cenário crescente consumidores que procuram produtos saudáveis e de origem renovável tem contribuído para alavancar pesquisas nessa área (SENA-MARTINS, 2008). Entretanto, várias barreiras devem ser superadas para que processos dessa natureza sejam economicamente viáveis (AZADI et al., 2013). Como exemplo, cita-se a ocorrência de reações indesejáveis, como processos de adsorção entre lignina-enzimas, reprimindo reações subsequentes e causando a inutilização das enzimas (LAI et al., 2013).

Apesar das dificuldades, reações enzimáticas também podem ser efetivamente empregadas para a transformação de lignocelulósicos (HOFRICHTER, 2002). Nesse cenário, importantes progressos vêm sendo obtidos no que diz respeito ao desenvolvimento de produtos de elevado valor agregado de origem renovável e ambientalmente sustentável. Bioprocessos de conversão da lignina têm como principal agente as enzimas oxidativas, que são produzidas por fungos de podridão branca (SENA-MARTINS, 2008).

Na indústria baseada em produtos florestais, várias aplicações enzimáticas têm sido propostas, como biopolpação e branqueamento com enzimas (MOLDES; VIDAL, 2011). Copolímeros, ou polímeros formados por diferentes monômeros, têm sido fabricados utilizando lignina, cresol e a enzima “horseradish” peroxidase (HRP), que catalisa a polimerização. Os produtos gerados dessa reação podem substituir resinas fenólicas convencionais, adesivos, agentes ligantes e dispersantes poliméricos.

O tratamento de lignina com polifenoloxidase resultou no aumento de grupos hidroxila e carbonila, fazendo da lignina um poderoso agente quelante que pode ser usado para remover metais pesados de efluentes (GOLÇALVES; BENAR, 2001). Outras aplicações utilizando lacases incluem a produção de agentes intermediários para produzir reagentes altamente reativos e gerar papéis a prova d'água e plásticos termosensíveis (HUTTERMAN et al., 2001).

No que diz respeito ao uso de microrganismos que possam ser diretamente empregados na biotransformação da biomassa lignocelulósica, encontram-se os fungos e as bactérias. Existe uma variedade de microrganismos capazes de degradar ligninas e, dentre estes, os fungos têm recebido grande atenção devido ao seu sistema lignocelulolítico (KLEIN; PASCHKE, 2004).

3.7 Aplicações biotecnológicas de fungos ligninolíticos

Embora algumas espécies do filo Ascomycota sejam capazes de degradar com eficiência materiais lignocelulósicos, os fungos pertencentes ao filo Basidiomycota são os mais hábeis em removerem a lignina e, por este motivo, são os mais estudados (ALEXOPOULOS et al., 1996). Segundo Blanchette (2000), os fungos podem ser classificados de acordo com a capacidade de degradar os componentes da madeira.

Os fungos de podridão branca recebem essa denominação porque, ao degradarem a madeira, removem a lignina deixando-a com aspecto quebradiço e esbranquiçado, devido à presença predominante de celulose (BLANCHETTE, 2000). Em resposta ao processo evolutivo, esses fungos adquiriram a capacidade de degradar madeira de angiospermas à madeira de gimnospermas. Isso se deve à composição química da lignina que, nas folhosas, é do tipo guaiacila-siringuila, enquanto que nas coníferas a lignina é do tipo guaiacila (LEWIS; YAMAMOTO, 1990). Por esse motivo, a presença de fungos de podridão branca é praticamente unânime em campos de reflorestamento de eucalipto (ALONSO et al., 2007).

Até a década de 1980, a maioria dos estudos com fungos apodrecedores da madeira era condicionada à sua durabilidade, principalmente por ser matéria-prima importante na construção civil. Com a definição dos mecanismos bioquímicos que envolvem a degradação da lignina (TIEN; KIRK, 1983), vários estudos vêm sendo realizados na busca de compostos de baixo peso molecular gerados da sua fragmentação por enzimas ligninolíticas (LARA et al., 2003; XIONG et al., 2007; ARUN; EYINI, 2011). Nesse panorama, fungos de podridão branca são muito promissores em processos biotecnológicos (LEWIS; YAMAMOTO, 1990; KLEIN; PASCHKE, 2004; DAVIS; SELLO, 2010; MELO; AZEVEDO, 2008).

Entretanto, o uso de enzimas em larga escala pode se tornar inviável pelo elevado valor comercial (KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012). Nesse sentido, processos biológicos que envolvem o cultivo de microrganismos diretamente no substrato pode ser uma alternativa econômica e ambientalmente correta (CHEN et al., 2012). Sabe-se que a capacidade de degradação da lignina é muito variável entre espécies e mesmo entre indivíduos da mesma espécie (MELO; AZEVEDO, 2008). Por este motivo, pesquisas com microrganismos coletados de locais não explorados devem ser encorajados, investigando a melhor forma de usufruir ao máximo o potencial desses microrganismos.

Diante desse potencial, encontra-se a lignina, a principal fonte renovável de compostos aromáticos, cuja importância representa um relevante pilar para as biorrefinarias. Atualmente, os produtos “verdes” ou *green based* têm ganhado cada vez mais espaço e atenção econômica

no cenário mundial. Uma das principais estratégias para obter produtos ou matéria-prima de origem renovável é depolimerizar a lignina através de reações de oxidação enzimática (DASHTBAN et al., 2010; PANDEY; KIM, 2011).

Para que modificações enzimáticas da lignina ocorram, sabe-se que quatro enzimas fúngicas, as enzimas ligninolíticas ou ligninases, têm elevado potencial: lignina peroxidases (LiPs), manganês peroxidases (MnPs), peroxidases versáteis (VPs) e lacases (Lac) (POLEGIONI et al., 2015). Lacases usam oxigênio molecular como aceptor de elétrons enquanto que as peroxidases utilizam peróxido de hidrogênio como substrato (MARTÍNEZ, 2002). As ligninases clivam partes da lignina, liberando compostos de menor massa molecular que, por sua vez, induzem a secreção de outras enzimas e assim sucessivamente até que o polímero seja completamente consumido (DASHTBAN et al., 2010).

Contudo, vale ressaltar que poucos fungos são hábeis em produzirem LiP, MnP e Lac concomitantemente e a maioria dos fungos não produz LiPs. Nerud e Misurcova (1996) dividiram os fungos de podridão branca em quatro grupos, baseando-se na produção de enzimas: (1) LiP-MnP-Lac; (2) MnP-Lac; (3) LiP-MnP; (4) Lac.

O sucesso para aplicações industriais da lignina depende de modificações que realçam a sua reatividade, reduz sua heterogeneidade, melhora propriedades de dispersão entre outras características físico-químicas. O uso de enzimas oxidoreduções (lacases e peroxidases) tem sido considerado como forma de explorar o máximo das ligninas na síntese de vários polímeros funcionais (NYANHONGO et al., 2011).

Algumas espécies de fungos basidiomicetos demonstram potencial biotecnológico pela produção de ligninases. A primeira espécie a ser estudada pela produção de ligninases foi *Phanerochaete chrysosporium* (TIEN; KIRK, 1983). Após essa descoberta, outras espécies têm sido cada vez mais estudadas, as quais podem ser agrupadas em gêneros como *Trametes*, *Pleurotus*, *Pycnoporus*, *Ganoderma* entre outros (ZHAO et al., 2008; SAAT et al., 2014; NEGRÃO et al., 2014).

A modificação de material lignocelulósico por fungos pode ser feita, basicamente, de duas formas: cultivo direto dos fungos no substrato ou tratamento com coquetel de enzimas comerciais, com a concentração bem conhecida. Exemplos de cultivo direto de fungos para obter um subproduto modificado ou outro diferente do original, citam-se a produção de bebidas alcoólicas (vinho, cerveja), combustível (etanol), comida (pão, cogumelos) e medicamentos (penicilina, vitaminas, hormônios) (KAVANAGH, 2011). Portanto, a biotransformação de um determinado componente vegetal ou lignocelulósico pela ação direta

do microrganismo é bastante utilizada desde os primórdios da humanidade e tem sido comprovada cientificamente ao longo dos anos (SÁNCHEZ, 2009).

No presente trabalho, optou-se em avaliar a biotransformação da lignina através do cultivo de fungos basidiomicetos no licor negro. Esta escolha foi baseada na literatura e no conhecimento adquirido pela rotina do laboratório de Ecologia Aplicada (CENA/USP) e por trabalhos publicados (FERREIRA et al., 2011; DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2006; NEGRÃO et al., 2014; NEGRÃO et al., 2015). Utilizando esta metodologia, os fungos ficam em contato direto com o substrato e as ligninases são secretadas de acordo com a presença de determinado derivado da lignina, sendo que a concentração destes e a atividades das enzimas variam com o tempo. Por este motivo, alguns ensaios foram realizados levando-se em consideração o tempo de exposição do licor negro ao fungo e de que maneira esse fator influenciou nos eventos de depolimerização da lignina mediada por processos enzimáticos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios e análises foram realizados no laboratório de Ecologia Aplicada do CENA/USP, laboratório de Resíduos Sólidos e Compósitos do Departamento de Biotecnologia e Bioprocessos da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA-UNESP), Botucatu/SP; Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE); Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), sendo que os dois últimos locais fazem parte do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas/SP.

4.1 Licor negro: origem e preparo

O licor negro fraco foi doado pela empresa Lwarcel S/A, situada no município de Lençóis Paulista/SP, em Fevereiro de 2014. As principais características físico-químicas do licor negro foram: licor fraco, com conteúdo orgânico entre 15-20%, proveniente do cozimento alcalino da madeira de *Eucalyptus* spp. pelo processo kraft, pH 14,0, cor escura, odor desagradável (comparável à ovo podre).

Análises da composição química quantitativa de macro e microelementos foram realizadas por espectrofotometria de emissão ótica em plasma induzido (ICP), e espectrofotometria de absorção atômica (EAA). O objetivo das análises foi conhecer a concentração de certos elementos potencialmente tóxicos aos fungos, possibilitando determinar as concentrações de licor negro empregadas nos ensaios de biodegradação.

4.2 Preparo de meio de cultura contendo licor negro

A solução contendo licor negro utilizada nos ensaios de biodegradação foi preparada conforme segue:

- ✓ Licor negro na concentração 10%: diluíram-se 100 mL do licor negro em 900 mL de água destilada, 10 g L⁻¹ de dextrose. Para o preparo do meio de cultura sólido adicionaram-se 12 g L⁻¹ de ágar.
- ✓ Licor negro na concentração 15%: diluíram-se 150 mL de licor negro em 850 mL de água destilada, 5 g L⁻¹ de dextrose.

Após as diluições, ajustou-se a solução em pH 4,9 - 5,0 com uma solução de H₂SO₄ 3 molar. Após, adicionou-se dextrose e a solução foi autoclavada a 120°C, durante 15 minutos.

4.3 Coleta, isolamento e preservação de isolados fúngicos

Coletaram-se exemplares de fungos macroscópicos (basidiomas) de mata nativa e de áreas de reflorestamento de *Eucalyptus* spp. de quatro municípios paulistas. Durante a coleta, cada exemplar foi colocado em um saco de papel, protegido de injúrias mecânicas. No laboratório, os exemplares foram organizados numa bancada e cada um recebeu um código com duas ou três letras, referenciando a cidade ou local da coleta, e dois números que correspondem à ordem de isolamento após as coletas, conforme demonstrado na Figura 6. Isolados “BT” correspondem a coletas feitas na cidade de Botucatu-SP, “BFT” em Bofete, “ED” na Fazenda Experimental da FCA-UNESP, Botucatu, “Jau” em Jaú, e “ITA” na Estação Experimental da Esalq em Itatinga. Os isolados ED e ITA foram coletados em floresta nativa, ou floresta não plantada, e os demais foram coletados em áreas de florestas plantadas de *Eucalyptus* spp. recém cortadas.

O método de isolamento dos fungos após todas as coletas foi feito de duas formas:

A) método direto: quando se utiliza cogumelos carnosos, retirando-se assepticamente fragmentos do interior do píleo e colocando-os diretamente na superfície do meio de cultura.

B) método indireto: quando se utiliza cogumelos não carnosos ou “orelhas de pau”, obtendo-se uma fração do cogumelo. A assepsia é feita em solução de hipoclorito de sódio (1%, 30 segundos), depois em solução de álcool 70% (60 minutos), banho em água destilada autoclavada, e plaqueamento na superfície do meio de cultura.

Os meios de cultura serragem-dextrose-ágar (SDA) e batata-dextrose-ágar (BDA) foram utilizados para isolamento e purificação dos fungos, respectivamente. O meio BDA é rotineiramente usado em laboratórios de micologia e, pelo fato de ser muito rico em carboidratos, foi utilizado após a obtenção de culturas puras dos fungos. O meio SDA é feito à base de serragem de *Eucalyptus* spp. enriquecida (SE) com farelos de soja, milho e carbonato de cálcio (proporção 41:1:1:1). O preparo da SE teve a umidade ajustada entre 60-65% e em seguida foi esterilizada por autoclavagem durante 4 horas (EIRA; MINHONI, 1997).

Para a composição do meio SDA, 80 g de SE são fervidos em um litro de água destilada durante 30 min. Para o preparo do meio SDA, filtra-se a água da fervura, e adicionam-se 12 g L⁻¹ de ágar e 10 g L⁻¹ de dextrose; a esterilização é feita em autoclave (120°C, 15 min).

Todas as culturas foram consideradas puras após duas repicagens sucessivas dos fungos em meio BDA, quando apresentaram crescimento uniforme e livre de contaminantes.

Após o isolamento e purificação, os fungos foram preservados em água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1964).



Figura 6 – Exemplos de basidiomas coletados de mata nativa, com seus respectivos códigos de identificação, que foram utilizados para o isolamento e obtenção de culturas puras de fungos basidiomicetos.

4.4 Identificação molecular de isolados

O protocolo de extração do DNA dos isolados de fungos basidiomicetos foi feito de acordo com a metodologia de Graser et al. (1999). Inicialmente, os isolados BT-10, BT-21, BT-25, BT-27, BT-28, BT-31, BT-32, BT-40, Jau-3 e ED-1 foram cultivados em meio Sabouraud ágar durante uma semana, a 27°C. Para a extração do DNA, removeu-se a superfície do meio contendo micélio livre de meio de cultura. Os passos para a extração são descritos a seguir:

1. Pulverização do micélio em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido;
2. Suspensão do pó de micélio obtido em 1 mL do tampão de extração (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1.4 M de cloreto de sódio, 30 mM EDTA, 2% CTAB, 2% mercaptoetanol).

3. Três ciclos de congelamento e descongelamento.
4. Adição 100 µL de proteinase K (concentração final 50 µL mL), seguido de incubação a 60°C por 90 minutos.
5. Centrifugação das amostras por 5 min a 13 000 xg, adição de um volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) ao sobrenadante, homogeneização no vórtex, centrifugação por 15 minutos.
6. Remoção das fases superiores e repetição do procedimento quatro vezes; no último procedimento adicionou-se 1 volume de clorofórmio.
7. Precipitação do DNA com 1/10 volume de acetato de sódio (4,2 molar, pH 5,2) e 1 mL de álcool isopropílico frio.
8. Incubação por 16h (overnight) a -20°C. Após, centrifugação da solução de DNA por 10 min e remoção do sobrenadante.
9. Lavagem do DNA em álcool 70% e secagem ao ambiente.
10. Suspensão do pellet de DNA em 50 µL de 1x de tampão Tris-EDTA (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0).
11. Adição de RNase (concentração final 100 µL mL) por 15 min a 37°C; seguido de inativação da enzima a 65°C por 5 minutos.
12. Conservação do DNA a - 20°C.
13. Purificação das amostras utilizando EXOSAP-IT® (Affymetrix).
14. Preparo da PCR, utilizando goTaq (Promega) em um termociclador Veriti (Applied Biosystems, com as etapas: inicial de 94°C, 4 minutos; 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C. Etapa final de 10 minutos a 72°C.
15. Confirmação do DNA amplificado foi feito 1,5% em gel de Agarose.
16. Sequenciamento das amostras pela região ribossomal nuclear ITS1-5.8s e ITS2, utilizando os primers ITS4 e ITS/5, pelo método Sanger em um 3500 Analyzer (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante.
17. As sequências obtidas foram analisadas pela ferramenta BLAST, utilizando a biblioteca do NCBI.

4.5 Preparo do inóculo

4.5.1 Inóculo para o meio de cultura sólido

O inóculo utilizado para os meios de culturas sólidos foi preparado a partir do pré-cultivo dos fungos em placas de Petri contendo meio BDA, incubados a 26°C, durante cinco dias. A inoculação dos meios de cultura foi feita depositando-se um disco de BDA colonizado (ϕ 0,7 cm) no centro da placa de Petri (90 x 15 mm), contendo o meio de cultura.

4.5.2 Inóculo para o meio de cultura líquido

Além da composição heterogênea e elevada concentração de sais (sódio e potássio), o licor negro (na forma líquida) não favorece o cultivo de fungos basidiomicetos. Para contornar esse problema, é necessário cultivá-los em um suporte físico, para sustentar o micélio, e com agitação orbital, para favorecer a sua oxigenação. Por este motivo, neste estudo cultivaram-se os fungos em serragem de *Eucalyptus* spp. enriquecida (SE) com farelos (EIRA; MINHONI, 1997).

Para o preparo do inóculo, adicionaram-se 2 g de SE e 2 mL de uma solução contendo 10% de licor negro em frascos Erlenmeyer de 150 mL de capacidade. Os frascos foram fechados com tampão de algodão e gaze, papel alumínio e autoclavados a 121°C durante 15 min.

A SE foi inoculada com um disco de BDA colonizado, seguindo-se de incubação a 30°C durante 14 dias. Após sete dias, adicionaram-se 2 mL de solução contendo 10% de licor, para manter a umidade do substrato e estimular o metabolismo de enzimas ligninolíticas.

4.6 Seleção dos fungos

Pelo fato de existirem muitas espécies coletadas e para não subestimar o potencial biotecnológico de cada fungo, optou-se em realizar três etapas de seleção que consistiram em: a) cultivo dos isolados em BDA para selecionar fungos de micélio vigoroso e cultivo de 19 isolados em meio SDA em seis temperaturas; b) cultivo de 16 isolados em meio sólido contendo licor negro 10%; c) cultivo de 10 isolados em licor negro em estado líquido.

4.6.1 Crescimento micelial em meio sólido em cinco temperaturas

Após a purificação, a primeira etapa de seleção consistiu em cultivar os fungos em placas de Petri (90 x 15 mm), contendo o meio de cultura BDA, a 27°C, durante dez dias. A avaliação deu-se somente pela observação do vigor do micélio e velocidade de crescimento no meio de cultura.

Em sequência, 19 isolados foram cultivados em meio SDA, incubando-os a 23, 25, 27, 29 e 34°C. O objetivo desta etapa foi excluir fungos de crescimento lento e de baixo vigor micelial, além de identificar a melhor temperatura de incubação para cada isolado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis repetições.

Para as medidas de crescimento micelial, marcaram-se na face externa da base das placas duas linhas centrais, perpendiculares entre si. O crescimento micelial medido diariamente acompanhou essas linhas, durante sete dias, ou finalizando as leituras num período menor, até que o micélio colonizasse 80 mm.

Foi calculada a velocidade média de crescimento dos fungos nas placas, para cada repetição, considerando-se as seguintes situações: 1) o fungo cresce até atingir 80 mm (diâmetro da placa). A velocidade média é calculada dividindo-se a variação de crescimento (80 mm) pela variação do tempo observado (Δt menor ou igual a sete dias); 2) o fungo cresce menos que 80 mm no período de sete dias, assim a velocidade média é calculada pela razão entre a variação do crescimento observado em sete dias.

Foi realizada análise estatística descritiva dos resultados, considerando-se a média das velocidades máximas de crescimento dos fungos, distinta em cada temperatura utilizada (23, 25, 27, 29 e 34°C). Após, as médias da velocidade de crescimento micelial das espécies foram organizadas em ordem decrescente gerando um ranking (1ª a 19ª posição), de acordo com a temperatura. Neste ranking, cada espécie recebeu um valor numérico respectivo à sua posição em cada temperatura, e a soma de cada valor corresponde à sua posição de acordo com a temperatura resultou em um número. Este número, por sua vez, é agora independente do fator temperatura, sendo em seguida organizado de forma crescente, onde as espécies com números menores receberam as primeiras posições; este método traduz que, quanto menores forem esses valores, mais rápido foi o crescimento micelial de uma espécie na faixa de temperatura utilizada.

Deve-se considerar que essa ordenação é puramente matemática sem levar em consideração técnicas estatísticas de comparação de médias, que não foi possível fazer devido ao volume de dados, pelo experimento ter delineamento fatorial.

4.6.2 Crescimento micelial em meio sólido contendo licor negro

A segunda etapa de seleção consistiu do cultivo de 24 isolados. Destes, 16 isolados foram selecionados no final da etapa anterior e oito isolados foram obtidos posteriormente. Optou-se estudar adicionalmente esses isolados em meio de cultura por apresentarem boas características fisiológicas, como rápido crescimento micelial em meio de cultura e vigor.

Os ingredientes para o meio de cultura estão descritos na sessão 4.3. Após a inoculação nas placas de Petri contendo o meio de cultura, os fungos foram incubados a 27°C durante 14 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições.

A avaliação consistiu da medida de crescimento micelial (mm) feita no 14º dia, em duas posições perpendiculares entre si, tomadas na base externa da placa de Petri com auxílio de um paquímetro digital. A remoção da cor do meio de cultura foi avaliada pela presença (positivo) ou ausência (negativo) de halo de descoloração na área de crescimento ativo do micélio.

O crescimento micelial foi analisado estatisticamente pelo modelo linear generalizado, com distribuição de probabilidade gama e função de ligação logarítmica, segundo espécies. As comparações entre as médias de tratamentos (espécies) foram feitas pelo teste de Tukey-Kramer.

4.7 Ensaio de biodegradação do licor negro em meio líquido

Dois ensaios de biodegradação do licor negro foram realizados para se verificar a modificação estrutural da lignina, sendo o primeiro ensaio realizado com 10 espécies de fungos e o segundo ensaio realizado com uma espécie de fungo.

4.7.1 Biodegradação do licor com espécies de fungos

Nesta fase, os isolados BT-10, BT-21, BT-25, BT-27, BT-28, BT-31, BT-32 BT-40, ED-1 e Jau-3 foram selecionados pelo crescimento e produção de halo de descoloração no meio sólido contendo 10% de licor negro. Além desse parâmetro, os ensaios de crescimento micelial contribuíram para definir a temperatura de incubação dos fungos no licor negro em meio líquido. Observou-se que a grande parte dos isolados teve maior velocidade média de crescimento entre 27 e 29°C.

O licor negro foi preparado na concentração 10% e 100 mL foram fracionados em frascos de Duran de 200 mL de capacidade, e autoclavados (120°C/15 min). Após o resfriamento, a solução foi transferida assepticamente para frascos Erlenmeyer contendo a SE previamente colonizada pelos fungos. Os frascos foram acomodados em uma incubadora de bancada com agitação orbital ajustada em 180 r.p.m. (rotações por minuto), a 28°C, durante 14 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em triplicata. O tratamento controle foi preparado com SE não inoculada, mantida nas mesmas condições da SE inoculada.

No final do período de incubação, o pH das amostras foi aferido; alíquotas de 2 mL do sobrenadante de cada tratamento foram reservadas em microtubos graduados, e mantidos em geladeira para posteriores análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC/MS). O restante do sobrenadante foi acidificado com solução a 3 molar de H₂SO₄ e fracionado em tubos de fundo cônico para centrifugação de 50 mL de capacidade.

As amostras foram mantidas em repouso no escuro, durante três dias, para a condensação da lignina insolúvel e precipitação no fundo do frasco. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (10 minutos/10.000 r.p.m.). As frações de lignina retidas no fundo dos frascos foram secas em estufa com circulação forçada de ar (60°C/48 h), pulverizadas em almofariz de ágata, e mantidas no escuro em temperatura ambiente.

4.7.2 Biodegradação do licor negro por *Pycnoporus sanguineus*

Após finalizar o primeiro ensaio de biodegradação do licor negro, verificou-se que todos os 10 isolados se desenvolveram no licor negro pelo aspecto da serragem inoculada, que possuía micélio bem desenvolvido e com aparência viscosa. Entretanto, optou-se em utilizar somente o isolado Jau-3, pertencente à espécie *Pycnoporus sanguineus*, para as etapas posteriores. Esta escolha prevaleceu em virtude da necessidade de reduzir o número de amostras para dedicarmos mais tempo com análises laboriosas e estudar mais parâmetros do processo biológico que envolve a fragmentação da lignina. No final do ensaio de biodegradação, verificou-se também que o fungo consumiu grande parte da lignina insolúvel em pH 3,0, comparando-se aos demais tratamentos. Isso significa que o isolado Jau-3 possui elevada capacidade de degradar a lignina, mesmo estando disponível em solução, condição adversa para fungos basidiomicetos. No Brasil, esta espécie é cosmopolita e estudos devem ser dedicados quanto a sua capacidade de degradação da lignina.

Diante do exposto, conduziram-se dois ensaios de biodegradação do licor, utilizando-se nas concentrações 10 e 15%. O inóculo foi preparado conforme descrito na seção 4.5.2 e o licor negro conforme descrito na sessão acima. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, preparado em triplicata. O tratamento controle foi preparado com SE não inoculada e avaliado juntamente com frascos contendo licor inoculado.

As condições de avaliação empregadas foram:

a) ensaio com licor na concentração 10%: leitura da atividade das enzimas ligninolíticas lacase, peroxidase e manganês peroxidase, e recuperação de lignina entre o 7^o e 13^o dias após a inoculação;

b) ensaio com licor na concentração 15%: leitura da atividade enzimática e recuperação da lignina biodegradada entre o 2^o e 13^o dias. Neste ensaio, avaliou-se também a produção de biomassa, durante o crescimento fúngico na serragem. Após a filtragem, a serragem foi seca em estufa com circulação forçada de ar (105°C), até peso constante.

4.8 Atividade enzimática

Os ensaios de atividade enzimática conduzidos em licor negro foram feitos utilizando-se amostras em triplicata. O extrato bruto enzimático foi obtido após dupla filtragem em papel filtro qualitativo, separando-se a serragem inoculada do licor biodegradado ou não (controle), com auxílio de bomba a vácuo.

A atividade da lacase (EC1.10.3.2) foi determinada usando uma mistura contendo 300 µL de tampão citrato-fosfato 0,05 molar (pH 5,0) 100 µL de siringaldazina (0,1%), 60 µL da solução enzimática bruta e 540 µL de água ultrapura autoclavada. A oxidação da siringaldazina foi medida monitorando-se o aumento da absorbância a 525 nm após 10 minutos de reação. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de siringaldazina por minuto, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $6,5 \times 10^4$ /mol/cm para a siringaldazina oxidada (SZKLARZ et al., 1989).

A atividade da peroxidase (EC 1.11.1.7) foi determinada utilizando-se 200 µL de tampão citrato-fosfato 0,05M (pH 5,0), 100 µL de solução contendo H₂O₂, 100 µL de solução contendo siringaldazina, 60 µL da solução enzimática bruta e 540 µL de água ultrapura autoclavada. A oxidação da siringaldazina foi medida monitorando-se o aumento da absorbância a 460 nm após 10 minutos de reação. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de siringaldazina por

minuto, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,94 \times 10^4$ /mol/cm para a siringaldazina oxidada.

A atividade da manganês peroxidase (MnP - EC1.11.1.13) foi determinada avaliando-se a oxidação do vermelho de fenol ($\epsilon_{610} = 4460 \text{ mol cm}^{-1}$) na presença de manganês de H_2O_2 . A mistura da reação foi composta de 100 μL de tampão lactato de sódio ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$), 50 μL de solução contendo MnSO_4 ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$), 50 μL de H_2O_2 em tampão succinato de sódio ($0,2 \text{ molar L}^{-1}$, pH 4,5), 200 μL de albumina bovina (0,5%), 540 μL de água ultrapura autoclavada, 60 μL de extrato enzimático bruto. A reação foi iniciada pela adição de 100 μL de vermelho de fenol (0,1%) e a absorbância foi medida a 610 nm. Após 10 minutos adicionou-se 40 μL de NaOH (0,1 molar), que paralisa a reação. Uma unidade de atividade de MnP foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de Mn^{+3} por minuto, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $4,46 \times 10^4$ /mol/cm (KUWAHARA et al., 1984, GLEN et al., 1986).

As atividades das enzimas ligninolíticas lacase, peroxidase e MnP foram expressas em unidades de enzima por litro de caldo enzimático (UI L^{-1}). A amostra controle para todas as atividades enzimáticas foi o extrato bruto enzimático fervido por 30 minutos.

O cálculo da atividade enzimática foi feito de acordo com a expressão abaixo:

$$\text{UI L} = \frac{\Delta \text{Abs}}{\epsilon \times R \times t} \times 10^6$$

Onde:

UI L: Unidade Internacional ($\mu\text{mol min}^{-1}$)

ΔAbs : absorbância ($\text{Abs}_{\text{final}} - \text{Abs}_{\text{inicial}}$).

ϵ : coeficiente de absorção molar.

R: quantidade de solução da amostra.

t: tempo de reação em minutos.

Coefficientes de absorção molar:

$$\epsilon_{525 \text{ nm}} = 65000/\text{mol/cm}$$

$$\epsilon_{460 \text{ nm}} = 29400/\text{mol/cm}$$

$$\epsilon_{610 \text{ nm}} = 44600/\text{mol/cm}$$

4.9 Análises do licor negro biodegradado

4.9.1 Cromatografia em fase gasosa acoplado a detector de espectrômetro de massa

As análises dos compostos de baixo peso molecular gerados após a biodegradação do licor negro por cromatografia em fase gasosa acoplado a detector de espectrômetro de massa GC/MS foram realizadas no Laboratório Nacional de Ciência Tecnologia do Bioetanol (CTBE/CNPEM).

A técnica de cromatografia em fase gasosa permite separar uma mistura heterogênea em componentes individuais, sendo o eluente da separação ionizado na fonte de íons do espectrômetro de massas. Na espectrometria de massas, se estuda a matéria pela formação de íons em fase gasosa e posteriormente, sua caracterização pela massa, carga, estrutura ou propriedades físico-químicas (VESSECCHI et al., 2011).

O sobrenadante do licor negro biodegradado ou não (amostras controle) foi recolhido ao final do ensaio de biodegradação, antes da acidificação. Até o momento das análises, as amostras foram mantidas refrigeradas a 4°C.

Para a extração dos metabólitos, 100 µL de licor negro biodegradado foi extraído em 1 mL de uma mistura refrigerada (-15°C) de metanol:água, conforme Giavalisco et al. (2011). Em seguida, 100 µL da fase orgânica foi seco e derivatizado (ROESSNER et al., 2001) e 1 µL das amostras derivatizadas foram analisadas em um Combi-PAL auto sampler (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Germany) acoplado com um cromatógrafo gasoso (Agilent 7890) e a um espectrômetro de massas Leco Pegasus 2 TOF (LECO, St. Joseph, MI, USA).

Os cromatogramas foram exportados a partir do software Leco Chroma TOF (versão 3.25) para o software R. O pico de retenção, tempo de alinhamento de retenção e a biblioteca de padrões foram analisados utilizando o software Target Search R-package (CUADROS-INOSTROZA et al., 2009).

Os metabólitos foram quantificados pelo pico de intensidade de uma massa pré-selecionada e conhecida. As intensidades dos metabólitos foram normalizados dividindo-se pelo peso seco, seguido da soma do cromatograma de íons totais (*total ion chromatogram*, TIC), e transformado em escala log 2. A análise dos dados foi descritiva aplicando-se um cluster hierárquico, que dá uma noção sobre as similaridades entres os tratamentos. O TIC é obtido pela somatória da intensidade de íons em cada um dos espectros de massa, de uma série adquirida em função do tempo de retenção cromatográfico (VESSECCHI et al., 2011).

4.9.2 Demanda Bioquímica de Oxigênio

A DBO representa o potencial de matéria orgânica biodegradável nas águas naturais e em efluentes industriais. O que se “mede” de fato nesta análise é a concentração de oxigênio dissolvido antes e depois do período de incubação de cinco dias a 20°C, com bactérias.

O oxigênio dissolvido é o elemento principal no metabolismo dos microrganismos aeróbios que habitam as águas naturais ou os reatores para tratamento biológico de esgotos. Nas águas naturais, o oxigênio é indispensável também para outros seres vivos, especialmente os peixes, onde a maioria das espécies não resiste a concentrações de oxigênio dissolvido na água inferiores a 4,0 mg L⁻¹. Portanto, a DBO é um parâmetro de extrema relevância na legislação de classificação das águas naturais, bem como na composição de índices de qualidade de águas (IQAs). No IQA utilizado no Estado de São Paulo pela CETESB, a concentração de oxigênio dissolvido é um parâmetro que recebe uma das maiores ponderações.

A Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) de amostras de licor negro 15% biodegradado por *P. sanguineus* durante 14 dias foi realizada analisando-se antes e após a recuperação da lignina em pH 3,0. Previamente às análises de DBO, ajustou-se o pH das amostras sem lignina (acidificadas) para pH 5,0 com uma solução de ácido cítrico 1 molar ou solução de NaOH 0,1 molar.

Utilizou-se semente para DBO composta por culturas microbianas específicas para prover um amplo espectro de microrganismos, capazes de atuar em diferentes tipos de efluentes, denominada de “semente”. A quantidade de semente para DBO recomendada pelo fabricante (Bio-Limp Brasil) foi de 1 mg mL⁻¹, e seu preparo constitui a diluição em água destilada, seguido de aeração por 2 horas, seguido de 15 minutos de repouso. A água destilada utilizada para a diluição das amostras de licor sem semente foi aerada pelo mesmo tempo.

10 mL das amostras de licor negro dos tratamentos foram diluídos em 422 mL de água destilada aerada. O volume total foi transferido para o frasco de DBO, adicionando-se 2 mL da semente em cada frasco, 5 gotas de inibidor de nitrificação, 2 g de tartarato de amônio e cinco perolas de NaOH, que ficou localizada num recipiente de borracha, junto ao orifício do frasco.

Os frascos foram fechados e levados para incubação a 20 °C, durante cinco dias, conforme a norma NBR. As leituras da quantidade de DBO foram tomadas diariamente pelo medidor de DBO.

4.9.3 Ensaios de toxicidade com organismos aquáticos

A toxicologia tem como principais objetivos identificar os riscos associados a uma determinada substância e determinar, em quais condições de exposição, esses riscos são induzidos. Os testes de toxicidade são ensaios laboratoriais que, quando realizados sob condições experimentais específicas e controlados, podem estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos) em organismos e microrganismos aquáticos e terrestres, células entre outros. Nesses ensaios, organismos-testes são expostos a diferentes concentrações da substância (s) e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados (COSTA; OLIVI, 2008).

Na interpretação dos resultados dos testes de toxicidade é importante lembrar que, quanto menores forem os valores obtidos, maior será a toxicidade da amostra. Isso se deve uma vez que os valores numéricos de toxicidade aguda e crônica, expressos em CL_{50} (%) exprimem uma relação inversa à toxicidade. Desta forma, os resultados encontrados se referem à concentração da amostra necessária para afetar 50% dos organismos utilizados nos testes (COSTA; OLIVI, 2008).

O objetivo deste ensaio é avaliar se o cultivo do basidiomiceto *P. sanguineus* no licor negro diminui ou aumenta sua toxicidade à *H. attenuata* e *D. magna*. Além disso, espera-se conhecer se a presença de lignina (insolúvel em pH 3,0) interfere ou não na mortalidade dos organismos aquáticos. A condução deste ensaio foi baseada na possibilidade de descarte, em ambiente aquático e/ou lagoa de tratamento de efluentes, do sobrenadante que resta após a recuperação da lignina. O preparo e manutenção dos organismos testes serão descritos a seguir.

Para os ensaios utilizaram-se amostras de licor biodegradado e não biodegradado (controle), antes e após a recuperação da lignina, constituindo quatro tratamentos. As amostras foram diluídas nas concentrações de 3,125%, 6,25%, 12,5% e 25%, utilizando como controle negativo o meio de cultura.

4.9.3.1 *Hydra attenuata*

As culturas de *H. attenuata* foram iniciadas a partir de indivíduos adultos e cultivados segundo a metodologia recomendada por Trotier et al. (1997), utilizando-se meio de cultura para *H. attenuata*. Este meio é preparado com 0,147 g L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O e 0,11 g L⁻¹ de Tampão TES (N-tris (hidroximetil) metil 1-2 aminoetanosulfônico), dissolvidos em água

destilada e pH 7,0. As culturas foram depositadas em cristalizadores (recipientes circulares de 20 cm de diâmetro e 10 cm de altura), contendo 700 mL do meio de cultivo, e incubadas a 22°C, e 12 h de fotoperíodo.

A alimentação das culturas de *H. attenuata* foi conduzida três vezes por semana com *Artemia salina* (camarões brine). Os crustáceos foram obtidos após eclosão em solução contendo 14 g L⁻¹ de NaCl, dissolvidos em água destilada, e mantidas sob aeração e iluminação contínua durante 24 h, a 22°C. Após 2 h do fornecimento do alimento, o meio de cultivo contendo *H. attenuata* alimentada foi trocado para a retirada do excesso de alimento e dos exoesqueletos de *A. salina* regurgitados.

Para cada concentração mencionada, conduziu-se o ensaio em placas de poliestireno contendo três *H. attenuata* saudáveis e sem brotos imersas em 4 mL da amostra, em triplicata. O período do teste foi de 96 h de exposição, com observações realizadas a cada 24 h, com auxílio de uma lupa (Leica, modelo Zoom 2000). Os efeitos avaliados foram somente de mortalidade e as estimativas de CL₅₀ foram calculadas baseando-se no número de indivíduos mortos.

4.9.3.2 *Daphnia magna*

A metodologia utilizada para o cultivo de *D. magna* foi a ABNT NBR 12.713 (2004). Para a manutenção das culturas, 30 fêmeas foram depositadas em cristalizadores de vidro com capacidade de um litro, contendo 700 mL de meio de cultivo. Para o preparo de um litro de meio cultivo utilizaram-se os reagentes descritos na Tabela 1; o pH do meio de cultivo foi ajustado com soluções de HCl e NaOH, e em seguida foi submetido à aeração durante 48 h.

Tabela 1 - Reagentes utilizados para o preparo de um litro do meio de cultivo para *Daphnia magna*.

| Solução-estoque | Reagentes | Quantidade (g) |
|-----------------|--------------------------------------|----------------|
| Solução 1 | CaSO ₄ .2H ₂ O | 1,5 |
| Solução 2 | KCl | 0,2 |
| | NaHCO ₃ | 4,8 |
| | MgSO ₄ .7H ₂ O | 6,1 |

A alimentação de *D. magna* foi realizada três vezes por semana com uma suspensão da alga *R. subcapitata*, na concentração de 5 x 10⁶ células para cada organismo de *D. magna*, e também uma solução de fermento biológico e ração para trutas, ambos na concentração

de 5 g L⁻¹, dissolvidos em água destilada. As soluções de fermento e ração foram aeradas previamente durante sete dias e depois filtradas em peneira de 45 µm. Durante os períodos de manutenção das culturas na semana, retiraram-se filhotes e restos de alimentação.

Os testes foram realizados utilizando-se grupos de cinco neonatos com 24 h de idade, colocados em copos de polietileno, contendo 28 mL de amostra diluídas nas concentrações mencionadas na sessão 4.9.3, durante um período de 48 h. Para cada concentração, conduziram-se os testes em triplicata, realizando também o controle negativo, em meio de cultivo. Após 48 h observou-se o número de organismos mortos em cada tratamento.

4.10 Recuperação da lignina do licor negro

No momento da coleta, o licor negro possui pH 14,0. A recuperação da lignina pode ser obtida por diversas metodologias, mas a acidificação do licor é um dos métodos mais utilizados. A precipitação da lignina se inicia com a mudança do pH, momento que ela passa do estado solúvel para o estado sólido. A partir do pH 9,0 pouca quantidade de lignina sólida por ser recuperada, entretanto, o pH 3,0 é ideal para se obter maior quantidade de lignina insolúvel em pH ácido.

Neste estudo, a recuperação ácida da lignina foi baseada na Patente de Abacherli e Doppenberg (1998), que propõe o aquecimento do licor negro entre 60-70°C, e adição gradual de uma solução de ácido sulfúrico (3 molar), até atingir pH 3,0-2,5.

Após a precipitação, a lignina foi seca em estufa com circulação forçada de ar a 60°C durante 48 h para posteriores análises. O mesmo método de acidificação foi utilizado para recuperar a lignina presente no licor negro biodegradado, porém sem aquecimento.

O teor de cinzas foi determinado a partir de ligninas obtidas em pH 5,0 e 3,0. Para tanto, pesaram-se 500 g lignina em cadinhos de porcelana (previamente secos em estufa a 60°C durante 12 horas e pesados), levados à mufla, e mantidos numa rampa de três temperaturas, que compreenderam: 1 hora a 200°C, 1 h a 400°C e 2 h a 800°C. Após o resfriamento, os cadinhos foram transferidos para um dessecador de vidro contendo sílica, permanecendo durante 2 h e em seguida, pesados.

4.11 Análises da lignina

4.11.1 Cromatografia líquida de gel de filtração

As análises de cromatografia líquida de gel de filtração (CGF) foram realizadas no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas/SP.

O principal objetivo desta análise foi preparar as amostras para posteriores análises por SAXS, tópico que será detalhado adiante (sessão 4.11.2). As amostras de lignina biodegradada (recuperadas após a biodegradação do licor negro pelos fungos) e não biodegradada (tratamentos controle) foram submetidas à cromatografia de gel filtração para remover possíveis fragmentos de proteínas produzidas pelos fungos e que permaneceram às frações de lignina após a recuperação ácida.

As frações de lignina foram preparadas conforme a metodologia a seguir: pesagem (50 mg) em microtubos; solubilização em 1 mL de solução de NaOH 0,1 molar; agitação durante 37°C em Termo Mixer durante 30 minutos; centrifugação (14.000 r.p.m.), durante 5 minutos. A fração solúvel foi injetada na coluna e eluída com NaOH 0,1 molar, na taxa de 0,3 mL min⁻¹, sob temperatura ambiente. As análises foram realizadas empregando-se a coluna de gel filtração Superdex 30 pepgrade (70 cm x 0,6 cm), em um sistema AKTA[®] equipado com detector UV (280 nm) e com um sistema de bombas automatizadas.

Durante cromatografia, as primeiras frações possuem moléculas de maior massa molecular, sendo também mais concentradas pela presença de anéis aromáticos, detectados pela luz UV. Portanto, as primeiras frações recolhidas após a cromatografia foram utilizadas para as análises de SAXS. Cada fração coletada teve o volume aproximado de 2 mL.

A cromatografia também permitiu obter a massa molar média (MM) de frações de lignina, biodegradada ou não. Para a construção da curva de calibração, as proteínas ciclosporina (massa molecular = 1202,61 g mol⁻¹), riboflavina (376,36 g mol⁻¹) e os compostos fenólicos sal sódico do ácido dissulfônico (492,46 g mol⁻¹), hidroquinona (110,11 g mol⁻¹), ácido cinâmico (192,17 g mol⁻¹) foram empregados. Os parâmetros utilizados para o cálculo foram: massa molecular dos compostos químicos, volume da eluição, volume da coluna e o volume morto da coluna (este último determinado com o composto *blue dextran*); o solvente utilizado foi solução de NaOH (0,1 molar), com fluxo de 0,5 mL min⁻¹, a 20°C.

4.11.2 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

As análises de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (small angle X-ray, SAXS) foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), localizado no Centro de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas/SP.

SAXS é uma técnica amplamente usada para caracterização estrutural de nanopartículas em solução (GLATTER; KRATKY, 1982). Particularmente, a técnica possibilita o acesso às características como forma, tamanho e distribuição de tamanhos de macromoléculas em um estado próximo à sua forma natural.

A maior parte dos estudos de caracterização química e física da lignina ocorre em solução alcalina (pH 12,0), geralmente utilizando-se NaOH como principal solubilizante. Pelo fato de a lignina ser um polímero de elevada massa molar e muito reativa, é necessário aguardar um período de estabilização da molécula após dissolvê-la em solução aquosa, podendo, em alguns casos, variar em até sete dias (MAZIERO et al., 2012). Nesse sentido, o conhecimento do comportamento da lignina em solução alcalina garantirá maior acurácia dos dados no momento das análises. Portanto, a estabilização da lignina em relação ao seu tempo de solubilização em solução de NaOH (pH 12,0), foi estudada utilizando ligninas recuperadas do licor negro (não biodegradado) em pH 3,0 e pH 5,0, durante 10 dias.

Para o estudo de estabilização de lignina, prepararam-se as amostras conforme segue: secagem das ligninas em estufa com circulação de ar a 50°C durante três dias, transferência para dessecadores durante 24 h. Cinco miligramas de lignina foram transferidos para microtubos graduados de 1,5 mL e diariamente adicionou-se 1 mL de solução de NaOH 0,1 M em cada tubo, agitando-os vigorosamente por 1 minuto, e mantidos no escuro. No total, prepararam-se amostras para serem diluídas durante 10 dias, em duplicata.

As frações de ligninas obtidas após a biodegradação do licor negro também foram analisadas. Contudo, em estudos preliminares com SAXS demonstrou que as ligninas biodegradadas por fungos estavam “contaminadas” com fragmentos de proteínas, cuja presença exerce forte atração sobre a mica, um dos componentes do porta-amostra utilizado na linha SAXS 2. Por este motivo, recorreu-se à técnica de cromatografia líquida de gel filtração que permitiu separar esses “contaminantes” das frações de lignina biodegradada.

Todas as medidas foram feitas na linha D02A-SAXS-2 do LNLS/CNPEM. As amostras foram analisadas em duplicata e as intensidades do espalhamento de raios-X a baixo ângulo foram coletadas usando raios-X monocromático, com comprimento de onda de $\lambda = 1,55 \text{ \AA}$. Os padrões de raios-X foram registrados com um detector bidimensional CCD

(MarResearch, USA). A distância das amostras ao detector foi ajustada em 1000 mm, resultando num intervalo de espalhamento de $0,14 \text{ nm}^{-1} < q < 3,4 \text{ nm}^{-1}$, onde q é a magnitude do vetor de espalhamento, definido como $q = 4\pi \sin\theta / \lambda$ (2θ é o ângulo do espalhamento).

Somente as amostras de lignina biodegradada por fungos foram analisadas em duas distâncias do porta-amostra até o detector, com o objetivo de aumentar o intervalo do vetor de espalhamento. Sendo assim, as distâncias do porta-amostra até o detector foram ajustadas para 1000 mm e 2000 mm, resultando em um intervalo do vetor de espalhamento variando de $0,07 \text{ nm}^{-1} < q < 3,15 \text{ nm}^{-1}$.

As curvas experimentais de SAXS foram corrigidas e normalizadas pela intensidade do feixe incidente, absorção das amostras e concentração das ligninas. Os ruídos experimentais (espalhamentos parasitas) foram subtraídos da intensidade total de espalhamento. As curvas obtidas experimentalmente em diferentes distâncias foram escalonadas e unidas usando o programa Primus do pacote ATSAS (KONAREV et al., 2003).

Para as medidas de SAXS, o solvente e as ligninas foram injetados dentro da célula do porta-amostra, contendo duas micas com 1mm de distância entre elas, que se mantém constante a 25°C. Para cada amostra, dois frames de 300 segundos foram registrados para avaliar o dano da radiação sobre a amostra e estabilidade do feixe.

As curvas do espalhamento das amostras foram subtraídas das curvas de espalhamento da solução de NaOH utilizada nas diluições. A integração dos padrões de SAXS foi realizada usando o software Fit2D (HAMMERSLEY, 1997), e as curvas foram normalizadas para a concentração equivalente de lignina. O ajuste das análises e os parâmetros estruturais foram determinados usando o programa SASFIT (KOHLBRECHER; BRESSLER, 2006).

4.11.3 Espectrometria na região do infravermelho

A espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared spectroscopy, FTIR), em modo ATR (Attenuated total reflectance), pode ser aplicada em várias áreas de análises química onde elevada sensibilidade é necessária. Esse tipo de análise constitui uma forma rápida de verificar as mudanças que ocorrem na estrutura química da lignina, como por exemplo, após ação enzimática de fungos. Além disso, com pequena quantidade de amostra é possível obter resultados muito confiáveis.

As análises foram realizadas no Departamento de Física, Campus da UNESP/Bauru, em um espectrofotômetro Bruker, Modelo Vertex 70 (Alemanha), equipado com cristal de diamante como a interface entre a amostra e a energia IV. As amostras foram coletadas na faixa de 3997 a 400 cm^{-1} , em modo de reflectância total atenuada (attenuated total reflectance, ATR), utilizado com uma resolução de 4 cm^{-1} .

Frações de ligninas biodegradadas pelos isolados BT-21, BT-25, BT-27, BT-28, BT-31, BT-32, BT-40, ED-1 e por *P. sanguineus* foram utilizadas. As Figuras dos espectros foram geradas utilizando o Software Origin8 (OriginLab, Northampton, MA).

Os espectros de absorvância foram analisados pela técnica de componentes principais (Principal Component Analysis, PCA). A análise de PCA é uma técnica estatística multivariada que tem como objetivo a redução da dimensionalidade, através de construção de combinações lineares ótimas das variáveis de reflectância, segundo os comprimentos de onda. Esta técnica tem como base a maximização da variância, de modo que essas variáveis (componentes principais) não estejam correlacionadas entre si (JOHNSON; WICHERN, 2007).

Para o estudo da lignina biodegradada pelas espécies, foram feitas seis subdivisões da banda total de números de ondas (3997 a 400 cm^{-1}), conforme descrita na Tabela 2. As divisões das bandas foram feitas baseadas nas assinaturas espectrais relacionadas às ligações existentes que identificam a molécula de lignina na região do infravermelho.

Com o objetivo de verificar o efeito das espécies sobre a biodegradação da lignina nos componentes principais (prin1 e prin2), foi ajustado um modelo linear generalizado com distribuição de probabilidade gama e função de ligação logarítmica. As comparações entre as médias de tratamentos (composto por espécies de fungos) foram feitas pelo teste de Tukey-Kramer. Foi utilizado o programa estatístico SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, v.9, 2015), licenciado pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Tabela 2 - Bandas de números de onda (cm^{-1}) do espectro de Fourier utilizadas na técnica de componentes principais para a absorbância das amostras de lignina recuperada de licor negro biodegradado.

| Banda | Numero de ondas (cm^{-1}) | Número de observações |
|-------|--------------------------------------|-----------------------|
| 1 | 400,00 a 3.997,94 | 1893 |
| 2 | 400,00 a 700,00 | 158 |
| 3 | 800,00 a 1.000,00 | 106 |
| 4 | 1.000,00 a 1.500,00 | 262 |
| 5 | 1.600,00 a 2.000,00 | 211 |
| 6 | 3.000,00 a 3.500,00 | 262 |

Com o objetivo de verificar o efeito do tempo da biodegradação do licor negro por *P. sanguineus* em relação ao licor não biodegradado nos componentes principais (prin1 e prin2), foi ajustado um modelo linear generalizado com distribuição de probabilidade gama e função de ligação logarítmica. As comparações entre as médias de tratamentos (composto por espécies de fungos) foram feitas pelo teste de Tukey-Kramer. Foi utilizado o programa estatístico SAS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação molecular de isolados de fungos basidiomicetos

A relação dos exemplares de fungos macroscópicos obtidos durante as coletas, e as espécies identificadas pelo sequenciamento da região Ribossomal nuclear ITS1 e ITS2 estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Relação de isolados coletados em floresta nativa e áreas de reflorestamento de *Eucalyptus* spp. de acordo com o local de coleta (letras) e ordem de isolamento (números), e identificados* pela região Ribossomal nuclear ITS1 e ITS2.

| Código | Espécie | Código | Espécie |
|--------|--------------------------------|--------|--------------------------------|
| BT-1 | <i>Stereum hirsutum</i> * | BT-32 | <i>Pleurotus</i> sp. |
| BT-10 | <i>Trametes villosa</i> * | BT-33 | <i>Pleurotus</i> sp. |
| BT-11 | <i>Pycnoporus sanguineus</i> * | BT-35 | <i>Pleurotus</i> sp. |
| BT-12 | <i>Pycnoporus</i> sp. | BT-40 | <i>Trametes villosa</i> * |
| BT-13 | <i>Pycnoporus</i> sp. | BT-42 | <i>Pycnoporus</i> sp. |
| BT-20 | <i>Pleurotus</i> sp. | BT-48 | <i>Lenzites</i> sp. |
| BT-21 | <i>Pleurotus</i> sp. | BFT-34 | <i>Polyporus</i> sp. |
| BT-23 | <i>Xylaria venosula</i> | BFT-35 | <i>Lentinus bertieri</i> * |
| BT-25 | <i>Pleurotus djamor</i> * | ED-1 | <i>Pleurotus</i> sp. |
| BT-26 | <i>Pleurotus ostreatus</i> * | ED-20 | <i>Gymmophilus</i> sp. |
| BT-27 | <i>Schizophyllum commune</i> * | ED-30 | <i>Fomes fasciatus</i> * |
| BT-28 | <i>Flammulina velutipes</i> * | ED-31 | <i>Fomes</i> sp. |
| BT-29 | <i>Ganoderma</i> sp. | ITA-2 | Não determinado |
| BT-31 | <i>Pleurotus sapidus</i> * | Jau-3 | <i>Pycnoporus sanguineus</i> * |

A Figura 7 ilustra a amplificação do DNA em gel de Agarose dos isolados de fungos basidiomicetos coletados de mata nativa e campos de reflorestamento de *Eucalyptus* spp. Os demais isolados foram identificados até o nível de gênero, através de fotos, com auxílio de livros específicos de identificação macroscópica de fungos.

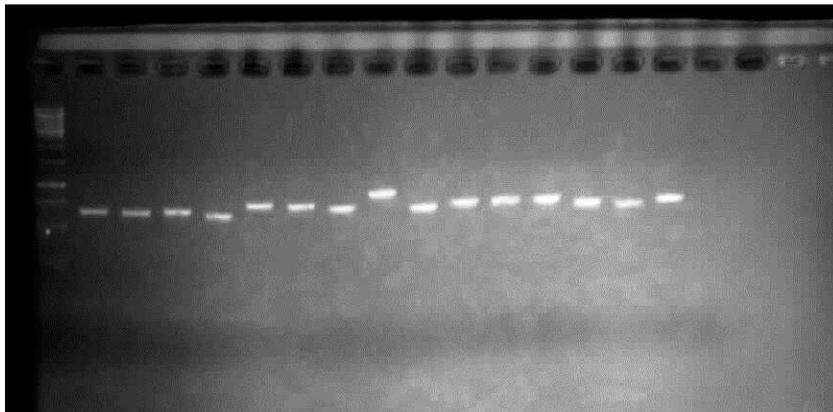


Figura 7 – Amplificação, em gel de Agarose, do DNA de isolados de fungos basidiomicetos coletados em mata nativa e campos de reflorestamento de *Eucalyptus* spp., na seguinte ordem, da esquerda para a direita: BT-1 (*Stereum hirsutum*), BT-10 (*Trametes villosa*), BT-11 (*Pycnoporus sanguineus*), BT-23 (*Xylaria venosula*), BT-25 (*Pleurotus djamor*), BT-26 (*Pleurotus ostreatus*), BT-27 (*Schizophyllum commune*), BT-28 (*Flamulinna velutipes*), BT-40 (*Trametes vilosa*), BT-32 (*Pleurotus* sp.), BT-31 (*Pleurotus sapidus*), BFT-35 (*Lentinus bertieri*), Jau-3 (*Pycnoporus sanguineus*), ED-1 (não identificado), ED-30 (*Fomes fasciatus*), BT-21 (não amplificado).

5.2 Crescimento micelial

5.2.1 Meio de cultura sólido contendo serragem

A velocidade máxima de crescimento micelial de 19 espécies de fungos basidiomicetos variou de acordo com a temperatura de incubação. Com base nas médias das velocidades máximas de crescimento em relação à temperatura de incubação (Tabela 4), a Tabela 5 foi construída ordenando, de forma decrescente, as médias. Desse modo, a Tabela 5 ilustra o ranking de ordenação das médias das velocidades máximas de crescimento micelial. Tomando como exemplo o isolado BT-10 (*T. villosa*), verifica-se que seu crescimento micelial é mais veloz a 23 e 25°C, ocupando as primeiras posições do ranking; com o aumento da temperatura, seu crescimento micelial começa a ficar mais lento, ocupando a 3ª posição do ranking a 27 e 34°C, respectivamente.

Considerando o ranking de ordenação das médias de velocidade máxima de crescimento micelial na Tabela 5, a soma desses valores permitiu construir a Tabela 6, que

indica quais espécies não têm a velocidade de crescimento micelial afetada na faixa de temperatura utilizada neste estudo. A velocidade do crescimento micelial dos isolados BT-10, BT-40, BFT-34, BT-11 e BFT-35 foi aparentemente constante em todas as temperaturas utilizadas. Entretanto, para a maioria dos fungos, o aumento progressivo da temperatura resultou em maior velocidade de crescimento micelial, e a faixa de temperatura que permitiu crescimento micelial mais veloz está entre 27 e 29°C.

Alguns fungos são diretamente influenciados por uma temperatura específica, que pode propiciar rápido crescimento micelial, como foi o caso dos isolados BFT-34 e BT-42 a 34°C e do isolado BT-13 a 29°C. Os isolados BT-10, BT-12 e BFT-35 crescem mais rapidamente a 34°C e os isolados de *Pleurotus* sp. (BT-20, BT-25, BT-26, BT-31, BT-32) são negativamente afetados nesta temperatura. Esses isolados apresentaram micélio não vigoroso e desuniforme, com aparência muito diferente de quando é cultivado a 27°C.

Estudos de crescimento micelial em uma ampla faixa de temperatura são de grande importância na aplicação biotecnológica dos fungos, pois possibilita manuseá-los numa condição que proporciona maior taxa de crescimento e colonização do substrato. De acordo com Dalsenter et al. (2005), crescimento não é apenas uma simples reação, mas uma série de reações químicas que ocorrem coordenadamente em um sistema coberto com esquemas de controle que podem responder diretamente ao aumento da temperatura.

Muitas reações no metabolismo de fungos filamentosos são dependentes da temperatura e, encontrar a temperatura ótima de crescimento, é o primeiro passo para ter sucesso em biotecnologia (PLAZA et al., 2003). A temperatura é o segundo fator mais importante a ser considerado, que influencia diretamente o crescimento (SCHUBERT et al., 2010). No geral, o aumento da temperatura resulta em rápida produção de micélio (biomassa), consequentemente contribuindo para a atividade enzimática de fungos podridão branca (WELLS; BODDY, 1995; DONELLY; BODDY, 1997) assim como determinar o progresso da biodegradação dos componentes da madeira (BRISCHKE; RAPP, 2008).

De acordo com os resultados observados, a faixa de temperatura entre 27-29°C favoreceu crescimento micelial rápido e uniforme entre os isolados, pois possibilitou que 87% dos fungos crescessem 80 mm em até sete dias. Contudo, os isolados mais promissores para os estudos subsequentes foram aqueles que cresceram rapidamente em um curto período de tempo, nesse caso, quatro dias.

Os isolados que apresentam rápido crescimento micelial em menor tempo a 27°C foram BT-10, BT-11, BT-12, BT-40, Jau-3, BFT-34 e BFT-35.

Tabela 4 – Médias das velocidades máximas de crescimento micelial de 19 espécies de fungos cultivados em meio de cultura sólido preparado com serragem de eucalipto e dextrose, e incubados em cinco temperaturas

| Isolados | Temperaturas (°C) | | | | |
|-------------------------------|-------------------|------|------|------|------|
| | 23 | 25 | 27 | 29 | 34 |
| <i>Polyporus</i> sp. (BFT-34) | 11,4 | 14,0 | 16,0 | 16,5 | 20,0 |
| <i>L. bertieri</i> (BFT-35) | 11,4 | 13,3 | 16,5 | 16,0 | 20,0 |
| <i>T. villosa</i> (BT-10) | 16,0 | 16,0 | 16,0 | 16,0 | 20,0 |
| <i>P. sanguineus</i> (BT-12) | 13,1 | 13,3 | 16,0 | 16,0 | 20,0 |
| <i>Pycnoporus</i> sp. (BT-42) | 11,4 | 13,3 | 13,1 | 16,0 | 20,0 |
| <i>T. villosa</i> (BT-40) | 13,3 | 16,0 | 16,5 | 17,0 | 18,0 |
| <i>Pycnoporus</i> sp. (BT-11) | 13,3 | 13,3 | 16,0 | 16,0 | 16,5 |
| <i>Pycnoporus</i> sp. (BT-13) | 12,6 | 12,1 | 13,3 | 16,0 | 16,0 |
| <i>P. sanguineus</i> (Jau-3) | 12,6 | 12,1 | 13,3 | 16,0 | 16,0 |
| <i>S. commune</i> (BT-27) | 8,9 | 13,3 | 13,1 | 16,0 | 16,0 |
| <i>P. sapidus</i> (BT-31) | 10,1 | 10,9 | 12,9 | 11,4 | 10,4 |
| <i>Pleurotus</i> sp. (BT-32) | 13,3 | 13,3 | 13,3 | 13,7 | 9,5 |
| <i>Fomes</i> sp. (ED-31) | 5,4 | 6,7 | 9,0 | 9,0 | 9,3 |
| <i>Pleurotus</i> sp. (BT-20) | 13,3 | 13,3 | 14,3 | 14,0 | 9,2 |
| <i>F. fasciatus</i> (ED-30) | 5,3 | 6,6 | 8,5 | 8,9 | 9,2 |
| <i>P. djamor</i> (BT-25) | 9,2 | 12,5 | 11,5 | 8,5 | 7,7 |
| <i>P. ostreatus</i> (BT-26) | 11,4 | 11,4 | 11,4 | 12,1 | 5,0 |
| <i>Pleurotus</i> sp. (BT-21) | 9,5 | 12,6 | 12,1 | 13,3 | 4,0 |
| <i>Pleurotus</i> sp. (ED-1) | 9,9 | 10,3 | - | - | 3,3 |

Tabela 5 - Ranking de ordenação das médias de velocidade máxima de crescimento micelial de 19 espécies de fungos relativo à temperatura de incubação. As primeiras posições no ranking indicam maiores médias das velocidades de crescimento micelial.

| Ordenação | Temperaturas (°C) | | | | |
|-----------------|-------------------|--------|--------|--------|--------|
| | 23 | 25 | 27 | 29 | 34 |
| 1 ^o | BT-10 | BT-10 | BT-40 | BT-40 | BFT-34 |
| 2 ^o | BT-11 | BT-40 | BFT-35 | BFT-34 | BFT-35 |
| 3 ^o | BT-32 | BFT-34 | BT-10 | BFT-35 | BT-10 |
| 4 ^o | BT-40 | BT-11 | BFT-34 | BT-10 | BT-12 |
| 5 ^o | BT-20 | BT-32 | BT-11 | BT-11 | BT-42 |
| 6 ^o | BT-12 | BT-20 | BT-12 | BT-12 | BT-40 |
| 7 ^o | BT-13 | BT-12 | BT-20 | BT-13 | BT-11 |
| 8 ^o | Jau-3 | BFT-35 | BT-32 | Jau-3 | BT-13 |
| 9 ^o | BFT-34 | BT-42 | BT-13 | BT-42 | Jau-3 |
| 10 ^o | BFT-35 | BT-27 | Jau-3 | BT-27 | BT-27 |
| 11 ^o | BT-26 | BT-21 | BT-42 | BT-20 | BT-31 |
| 12 ^o | BT-42 | BT-25 | BT-27 | BT-32 | BT-32 |
| 13 ^o | BT-31 | BT-13 | BT-31 | BT-21 | ED-31 |
| 14 ^o | ED-1 | Jau-3 | BT-21 | BT-26 | BT-20 |
| 15 ^o | BT-21 | BT-26 | BT-25 | BT-31 | ED-30 |
| 16 ^o | BT-25 | BT-31 | BT-26 | ED-31 | BT-25 |
| 17 ^o | BT-27 | ED-1 | ED-31 | ED-30 | BT-26 |
| 18 ^o | ED-31 | ED-31 | ED-30 | BT-25 | BT-21 |
| 19 ^o | ED-30 | ED-30 | ED-1 | ED-1 | ED-1 |

Fungos cultivados em meio sólido preparado com serragem de eucalipto e dextrose.

Tabela 6 – Soma dos valores atribuídos à posição no ranking de ordenação das médias de velocidade máxima de crescimento micelial de 19 espécies de fungos basidiomicetos

| Ordenação | Espécies | Soma da ordenação |
|-----------|-------------------------------|-------------------|
| 1º | <i>T. villosa</i> (BT-10) | 12 |
| 2º | <i>T. villosa</i> (BT-40) | 14 |
| 3º | <i>Polyporus</i> sp. (BFT-34) | 19 |
| 4º | <i>P. sanguineus</i> (BT-11) | 23 |
| 5º | <i>L. bertieri</i> (BFT-35) | 25 |
| 6º | <i>Pycnoporus</i> sp. (BT-12) | 29 |
| 7º | <i>Pleurotus</i> sp. (BT-32) | 40 |
| 8º | <i>Pleurotus</i> sp. (BT-20) | 43 |
| 9º | <i>Pycnoporus</i> sp. (BT-13) | 44 |
| 10º | <i>P. sanguineus</i> (Jau-3) | 49 |
| 11º | <i>S. commune</i> (BT-27) | 59 |
| 12º | <i>Pycnoporus</i> sp. (BT-42) | 66 |
| 13º | <i>P. sapidus</i> (BT-31) | 68 |
| 14º | <i>Pleurotus</i> sp. (BT-21) | 71 |
| 15º | <i>P. ostreatus</i> (BT-26) | 73 |
| 16º | <i>P. djamor</i> (BT-25) | 77 |
| 17º | <i>Fomes</i> sp. ED-31 | 82 |
| 18º | <i>Pleurotus</i> sp. (ED-1) | 88 |
| 19º | <i>F. fasciatus</i> (ED-30) | 88 |

5.2.2. Meio de cultura sólido contendo licor negro

As médias de crescimento micelial e descoloração do meio sólido contendo licor negro estão descritos na Tabela 7. Somente o isolado ED-20 não cresceu no meio licor negro-ágar, e 62% dos isolados produziram halo de descoloração ao redor das colônias em crescimento, após 14 dias de incubação. A presença de halo de descoloração indica que há secreção de enzimas no meio de cultura e, conseqüentemente, a degradação da lignina e cromóforos, que são compostos que contribuem com a coloração negra do licor. A presença de halo está ilustrada na Figura 8-A; a Figura 8-B ilustra a variação do aspecto miceliano dentre as espécies.

Quatro isolados do gênero *Pleurotus* (BT-25, BT-21, ED-1, BT-32) apresentaram as maiores taxas de crescimento micelial e vigor, sendo também positivos para a produção de halo de descoloração ao redor da colônia. Em relação aos isolados do gênero *Pycnoporus*, somente Jau-3 e BT-42 foram positivos para a formação de halo de descoloração no meio sólido.

O agrupamento das espécies foi feito em ordem decrescente, a partir da média do diâmetro miceliano desenvolvido no meio de cultura (Tabela 7). A análise estatística das médias de crescimento micelial indica a existência de oito grupos, sendo que cada grupo é representado por letras iguais na coluna.

Todos os fungos necessitam de pequenas quantidades de metais para seu metabolismo, reprodução e diferenciação, sendo que a necessidade nutricional desses elementos é muito variável entre as espécies (GRIFFIN, 1993). Quando em elevadas concentrações, metais essenciais podem interagir com as células e serem acumulados em resposta a mecanismos físico-químicos. Portanto, elevadas concentrações de certos componentes, que ora são utilizados como nutrientes, influenciam negativamente o desenvolvimento miceliano (GADD, 1992).

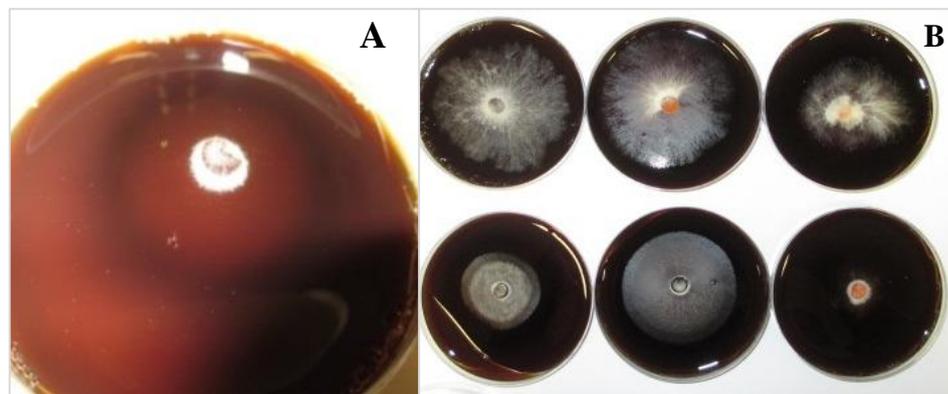


Figura 8 - Ilustração do halo de descoloração da espécie *Pleurotus* sp. (BT-33) cultivado em meio de cultura sólido contendo 10% de licor negro (A). Aspectos micelianos produzidos por seis espécies de fungos basidiomicetos em meio contendo 10% de licor negro, após 14 dias de incubação a 27°C

Tabela 7 - Diâmetro médio (desvio padrão entre parênteses) do crescimento micelial de 16 espécies de fungos basidiomicetos, cultivados em placas de Petri contendo meio sólido preparado com 10% de licor negro e ágar, e reação positiva ou negativa para a formação de halo de descoloração ao redor das colônias em crescimento, após 14 dias de incubação a 27°C.

| Espécie | Diâmetro | Descoloração |
|--|------------------------|--------------|
| BT-25 (<i>Pleurotus djamor</i>) | 57,84 (3,77) a | + |
| BT-21 (<i>Pleurotus</i> sp.) | 51,33 (5,05) a b | + |
| ED-1 (<i>Pleurotus</i> sp.) | 50,35 (5,74) a b c | + |
| BT-32 (<i>Pleurotus</i> sp.) | 42,97 (4,41) b c d | + |
| BT-27 (<i>Schizophyllum commune</i>) | 41,50 (11,51) b c d e | - |
| BT-11 (<i>Pycnoporus sanguineus</i>) | 40,28 (7,28) b c d e f | - |
| BT-31 (<i>Pleurotus sapidus</i>) | 38,26 (5,72) d e f g | + |
| BT-20 (<i>Pleurotus</i> sp.) | 36,52 (4,57) d e f g h | + |
| BT-26 (<i>Pleurotus ostreatus</i>) | 33,35 (3,69) d e f g h | + |
| BT-33 (<i>Pleurotus</i> sp.) | 31,28 (2,17) f g h | + |
| BT-40 (<i>Trametes villosa</i>) | 31,05 (3,88) g h | + |
| BT-12 (<i>Pycnoporus</i> sp.) | 29,60 (2,45) h | - |
| BT-28 (<i>Flamulina velutipes</i>) | 29,58 (0,39) h | - |
| Jau-3 (<i>P. sanguineus</i>) | 29,37 (2,12) h | + |
| BT-29 (<i>Ganoderma</i> sp.) | 29,18 (1,38) h | - |
| BT-13 (<i>P. sanguineus</i>) | 29,13 (0,39) h | |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste Tukey-Kramer.

O licor negro kraft possui composição heterogênea, que inclui elevada quantidade de metais e não metais e baixa concentração de nitrogênio (CARDOSO et al., 2009). Essa combinação pode ter influenciado o crescimento insatisfatório (micélio sem vigor) da maioria dos fungos em meio de cultura sólido. Além da presença de sais, vários compostos presentes nos extrativos, que são uma barreira natural contra o ataque microbiano, também podem ser deletérios a algumas espécies de fungos (KIRKER et al., 2013).

Da-Re e Papinutti (2011) cultivaram fungos basidiomicetos dos gêneros *Pycnoporus*, *Trametes* e *Phanerochaete* em meio de cultura contendo 0,5% de licor negro observaram que os fungos não cresceram após 30 dias de incubação. Subsequentemente, os autores submeteram o licor negro à dialise, para remover sais e somente dessa forma observaram crescimento e descoloração do meio de cultura.

No presente estudo, verificou-se que alguns fungos desenvolveram micélio visível após três dias de incubação no meio de cultura contendo licor negro “*in natura*” (sem diálise ou outro tipo de tratamento) na concentração 10% (v/v). Isso significa que os fungos coletados demonstram potencial para aplicações biotecnológicas por crescerem em um substrato de características físico-químicas muito diferentes de um substrato lignocelulósico comumente encontrado em florestas.

Em alguns casos, a adição de elevada quantidade de açúcar também pode atrasar o crescimento micelial até que o carboidrato seja completamente consumido. Wu et al. (2005) observaram que *P. ostreatus* consumiu mais rapidamente a lignina ao adicionar 1 g L⁻¹ de glicose ao invés de 10 g L⁻¹. Nesse caso, a degradação da lignina se iniciou após 15 dias de cultivo do fungo, quando também ocorre a produção de enzimas ligninolíticas (GALHAUP et al., 2002).

Baseado nos resultados obtidos no ensaio de crescimento micelial e descoloração do LN em estado sólido, os isolados Jau-3, BT-10, BT-40, BT-31, BT-21, ED-1, BT-27, BT-28 e BT-32 foram selecionados para os ensaios subsequentes de degradação do licor em estado líquido. Embora os isolados BT-27 e BT-28 não tenham formado halo de descoloração no licor após 14 dias, esses fungos foram selecionados para se verificar se em estado líquido seu comportamento seria idêntico.

5.3 Análises do licor negro

Os resultados dos elementos químicos analisados por espectrometria de força atômica estão dispostos na Tabela 8. Os teores de potássio e sódio presentes no licor negro “in natura” foram 55 e 34% maiores em relação à lignina precipitada do licor negro em pH 3,0. Essa observação mostra que parte desses sais são lixiviados durante o processo de precipitação da lignina. Os teores de ferro e enxofre da lignina precipitada foram, respectivamente, três e sete vezes maiores em comparação aos teores detectados no licor negro. O teor de cinzas totais da lignina precipitada em pH 3,0 foi 8,3%.

Os teores de metais e outros elementos analisados por espectrofotometria de emissão ótica em plasma induzido (ICP) estão dispostos na Tabela 9. A concentração de todos os elementos analisados foi maior na lignina precipitada, resultado da concentração desses elementos na lignina. Os teores de C, H, e N presentes no licor negro “in natura” estão descritos na Tabela 10, valores similares ao encontrado por Cardoso et al. (2009).

Os teores e elementos químicos presentes no licor negro sugerem que certos componentes encontrados em elevada quantidade podem ser tóxicos aos fungos. Embora seja muito importante para o metabolismo fúngico, tais como atividade enzimática, metabolismo de carboidratos e no balanço iônico, a quantidade de potássio detectado no licor negro é muito elevada a ponto de inibir ou atrasar o crescimento dos fungos (GRIFFIN, 1993), como foi observado no meio sólido. Outros elementos como o sódio, por exemplo, também interferem e fragilizam o desenvolvimento dos fungos no licor negro, mas que podem ser removidos através de dialise para o cultivo de fungos (Da-RE; PAPINUTTI 2011).

Diante dessa observação, um dos maiores desafios deste projeto foi cultivar fungos em concentrações de licor negro acima de 15%, com o objetivo de recuperar maior quantidade de lignina biotransformada. Pela metodologia aqui utilizada, não foi possível cultivar os fungos concentrações de licor negro kraft acima dessa concentração.

Tabela 8 - Teores de elementos químicos presentes no licor negro e na lignina precipitada em pH 3,0 e analisados por espectrometria de força atômica

| Matéria-prima | Elementos analisados | | | | | | | | |
|--------------------|----------------------|----|----|-------|-------|------|------|------|------|
| | K | Ca | Mg | Na | S | Cu | Fe | Mn | Zn |
| Licor negro (mg/L) | 1975 | 42 | 18 | 39688 | 5675 | 0,38 | 3,25 | 8,38 | 0,50 |
| Lignina (mg/Kg) | 875 | 39 | 12 | 25913 | 39151 | 0,25 | 7,38 | 0,50 | 0,75 |

Tabela 9 - Teores de elementos químicos presentes no licor negro, antes e após digestão em ácido sulfúrico e na lignina precipitada em pH 3,0, e analisados por espectrofotometria de emissão ótica em plasma induzido (ICP)

| Composto | Elementos | | | | | | | | | |
|---------------------------------|-----------|------|-----|-----|------|------|-------|-------|-----|-------|
| | As | Ba | Cd | Pb | Co | Cr | Hg | Mo | Ni | Se |
| Licor digerido ^a | <212 | 810 | <8 | <13 | <25 | 57 | <625 | 5744 | <50 | <500 |
| Licor não digerido ^a | 318 | 630 | <6 | 102 | <20 | 163 | <500 | 5764 | 80 | <400 |
| Lignina ^b | <1400 | 3171 | <50 | <84 | <166 | 1640 | <4165 | 44562 | 798 | <3332 |

Legenda: a = $\mu\text{g Kg}^{-1}$, b = $\mu\text{g L}^{-1}$

Tabela 10 - Teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio presente no licor negro

| Matéria-prima | Elementos químicos (%) | | |
|---------------|------------------------|------|------|
| | C | H | N |
| Licor negro | 26,27 | 5,35 | 0,11 |

Dentre os elementos carbono, hidrogênio, oxigênio, enxofre e magnésio, o carbono é o mais requerido, por ser responsável pela constituição primária do organismo. Embora os demais elementos também sejam de vital importância para o metabolismo fúngico, os mesmos são requeridos em menor quantidade (GRIFFIN, 1993).

5.3.1 Principais aspectos do licor negro biodegradado

A Figura 9 (A-E) ilustra a sequência completa do ensaio de biodegradação do licor negro. Na Figura 9 E observa-se uma camada mucilaginosa na serragem inoculada com o isolado Jau-3, indicando bom desenvolvimento micelial, que não é observada na serragem não inoculada (Figura 9 D).

No final do ensaio de biodegradação do licor negro, observa-se que o fungo reduziu a cor do licor, comparado ao licor não biodegradado (Figuras 10 A e B). As Figuras 10 C e D ilustram o licor negro biodegradado e não biodegradado após a precipitação ácida da lignina (fração escura no fundo do frasco). As Figuras 10 E e F ilustram a fração final de lignina obtida após secagem.

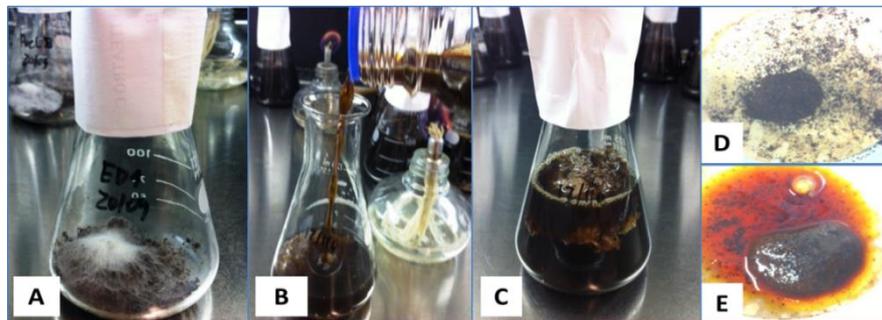


Figura 9 - Sequência do ensaio de biodegradação do licor negro: A = Serragem de *Eucalyptus* spp. (SE) inoculada com o isolado Jau-3, após 14 dias de incubação a 30°C; B-C = inoculação do licor negro; D = SE não inoculada (controle); E = SE inoculada com o isolado Jau-3, após 13 dias

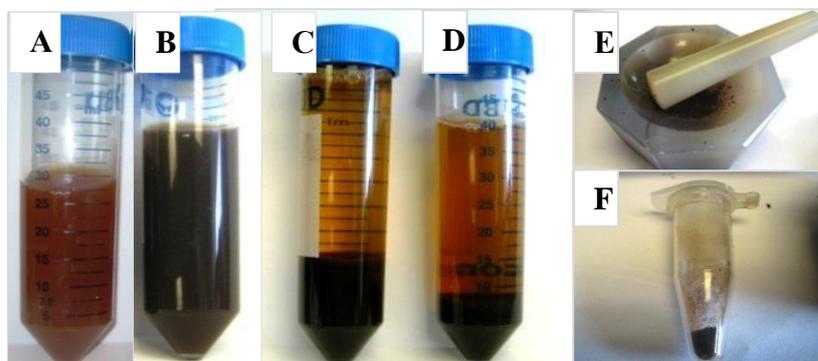


Figura 10 - Licor negro biodegradado por *Pycnoporus sanguineus* (A) e não biodegradado (B), após 13 dias de incubação; (C e D) licor negro em pH 3,0 não biodegradado (C) e biodegradado (D), a fração escura é a lignina precipitada; E e F: pulverização da fração de lignina obtida após secagem (60°C) e armazenamento, respectivamente

Durante o crescimento, os fungos modificaram o pH do licor, principalmente quando utilizado na concentração 10% (Tabela 11). Variações no pH do licor negro ocorreram dada às necessidades individuais do fungo, visto que a mudança do meio onde cresce é resultado do seu metabolismo ativo (GRIFFIN, 1993). A análise estatística indicou a existência de quatro grupos que não diferem estatisticamente entre si.

Tabela 11 - Médias (desvio padrão entre parênteses), do pH de licor negro na concentração 10%, após 14 dias de biodegradação a 28°C, por nove espécies de fungos basidiomicetos

| Espécies | Média | |
|------------------------------|-------------|----|
| <i>F. velutipes</i> (BT-28) | 7,00 (0,19) | a |
| <i>S. commune</i> (BT-27) | 6,60 (0,44) | ab |
| <i>Pleurotus</i> sp. (BT-21) | 6,51 (0,02) | bc |
| <i>Pleurotus</i> sp. (ED-1) | 6,07 (0,07) | cd |
| <i>P. sapidus</i> (BT-31) | 6,05 (0,23) | d |
| <i>T. villosa</i> (BT-10) | 6,04 (0,03) | d |
| <i>P. djamor</i> (BT-25) | 5,92 (0,05) | d |
| <i>T. villosa</i> (BT-40) | 5,83 (0,03) | d |
| <i>P. sanguineus</i> (Jau-3) | 5,51 (0,10) | d |
| Controle | 5,74 (0,07) | d |

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey-Kramer

As espécies utilizadas no ensaio de biodegradação do licor negro 10% em estado líquido cresceram satisfatoriamente, com exceção do isolado BT-21. O licor negro que recebeu este isolado teve aparência viscosa e com o mesmo odor característico da solução no início do ensaio. Quanto aos outros tratamentos, após três dias da inoculação, uma redução gradativa do odor desagradável do licor pôde ser sentida e, após 14 dias, percebeu-se um odor levemente adocicado.

Durante os ensaios de biodegradação do licor negro, pela espécie *P. sanguineus*, nas concentrações 10 e 15%, o pH das amostras foi aferido após filtragem e antes das leituras das atividades enzimáticas. Nas Tabelas 12 e 13 encontram-se as médias das medidas de pH durante de 12 e 13 dias, respectivamente.

Na Tabela 12, verifica-se que houve diferença estatística entre o licor biodegradado com o licor não biodegradado (controle), para todos os períodos avaliados.

Tabela 12 - Médias diárias (desvio padrão entre parênteses) do pH de licor negro (concentração 10%, biodegradado por *Pycnoporus sanguineus* (Jau-3), durante 12 dias de incubação a 30°C

| Tempo | | Tratamentos | | |
|-------|-------------|-------------|-------------|----|
| Dias | Fungo | | Controle | |
| 7 | 5,32 (0,05) | aA | 6,06 (0,01) | bA |
| 8 | 5,25 (0,05) | aA | 6,01 (0,01) | bA |
| 9 | 5,21 (0,07) | aAB | 5,84 (0,01) | bB |
| 10 | 5,17 (0,13) | aB | 6,03 (0,01) | bA |
| 11 | 5,10 (0,06) | aB | 6,04 (0,03) | bA |
| 12 | 4,91 (0,03) | aC | 6,14 (0,02) | bA |

Médias seguidas de mesma letra minúscula (maiúscula) na linha (coluna) não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey-Kramer

Tabela 13 - Médias diárias (desvio padrão entre parênteses) do pH de licor negro na concentração 15%, biodegradado por *Pycnoporus sanguineus* (Jau-3), durante 13 dias de incubação a 30°C

| Tempo | | Tratamentos | | |
|-------|----------------------|-------------|-------------|----|
| Dias | <i>P. sanguineus</i> | | Controle | |
| 5 | 5,56 (0,01) | aA | 5,71 (0,06) | aA |
| 6 | 5,37 (0,16) | bB | 5,73 (0,04) | bA |
| 9 | 5,25 (0,02) | aCD | 5,79 (0,06) | bA |
| 10 | 5,23 (0,06) | aD | 5,84 (0,04) | bA |
| 11 | 5,13 (0,04) | aD | 5,86 (0,01) | bA |
| 12 | 5,00 (0,04) | aE | 5,69 (0,01) | bA |
| 13 | 4,99 (0,03) | aE | 5,70 (0,00) | bA |

Médias seguidas de mesma letra minúscula (maiúscula) na linha (coluna) não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey-Kramer

Na Tabela 13, não se observa diferença estatística entre os tratamentos com o controle apenas no primeiro dia de avaliação. Entretanto, observa-se redução gradual do pH de acordo com os dias.

Neste ensaio, avaliou-se também a produção de biomassa durante o crescimento dos fungos na serragem, ou inóculo utilizado, conforme descrito na Tabela 14. Nos 5º e 6º dias houve redução gradual da massa da serragem. Nesse caso, além de servir como suporte físico, a serragem também foi fonte de nutrientes para o fungo crescer no licor negro. Resultados similares foram observados por Zou et al. (2015), que verificaram produção de metanol por *F. velutipes* ao suplementarem, com serragem, a lignina em solução aquosa. Os autores verificaram que o fungo não se desenvolveu quando foi oferecido lignina como único substrato. No último dia verifica-se que o fungo reduziu a massa da serragem, comparado ao controle.

Tabela 14 - Médias diárias (desvio padrão entre parênteses) da serragem de *Eucalyptus* spp., inoculada com *Pycnoporus sanguineus* (Jau-30), após a deposição do licor negro 15%), e a produção de biomassa ou redução da massa (g), durante 13 dias de incubação a 30°C

| Tempo | Tratamentos | | | |
|-------|-------------|-------|-------------|----|
| | Dias | Fungo | Controle | |
| 5 | 1,21 (0,09) | aA | 1,48 (0,00) | bA |
| 6 | 1,20 (0,12) | aA | 1,47 (0,08) | bA |
| 9 | 1,29 (0,04) | aA | 1,45 (0,05) | aA |
| 10 | 1,20 (0,10) | aA | 1,22 (0,08) | aA |
| 11 | 1,24 (0,02) | aA | 1,30 (0,06) | aA |
| 12 | 1,18 (0,07) | aA | 1,41 (0,00) | aA |
| 13 | 1,08 (0,17) | aB | 1,31 (0,13) | bA |

Médias seguidas de mesma letra minúscula (maiúscula) na linha (coluna) não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey-Kramer

O licor negro possui elevada quantidade de sais e outros elementos, que podem ser utilizados pelos fungos, resultando em crescimento micelial. Aliado ao substrato lignocelulósico, a presença de alguns elementos, como o zinco, potássio, magnésio, manganês e cobre contribuiu para o crescimento fúngico e produção de enzimas. Além destes, o manganês é um elemento essencial que atua como cofator da enzima manganês peroxidase e lignina peroxidase, e o cobre faz parte da constituição da lacase (HARVEY; THURSTON, 2001), enzimas responsáveis pela degradação e consumo energético da serragem.

Considerando que concentrações elevadas de nitrogênio estimulam a degradação de polissacarídeos enquanto que baixos níveis estimulam a degradação da lignina, por fungos de podridão branca (BLANCHETTE, 1984; KÜES; LIU, 2000), a baixa quantidade de nitrogênio no licor negro contribuiu para a produção de enzimas ligninolíticas.

No presente estudo, observou-se que os isolados Jau-3, BT-10 e BT-40 consumiram grande parte da lignina insolúvel em pH 3,0 (aproximadamente 1 g de lignina foi recuperado do licor negro biodegradado de cada tratamento), enquanto que nos tratamentos que receberam os isolados BT-21e BT-31, aproximadamente 3 g de lignina foram recuperados.

Além de contribuir para a produção de enzimas ligninolíticas, o potássio também é requerido para o balanço iônico, e o enxofre é um elemento essencial para a produção de aminoácidos e vitaminas; molibdênio é utilizado para o metabolismo do nitrato e produção de vitamina B12 (WALKER; WHITE, 2011).

Outros casos de biodegradação do licor negro são descritos na literatura, mas na maioria dos estudos a concentração do licor negro utilizado sempre foi menor do que a concentração empregada neste estudo. Fonseca et al. (2015) observaram redução de 20% da quantidade de lignina presente em licor negro proveniente de pinus, ao cultivarem o basidiomiceto *Phlebia brevispora*, isolado de floresta tropical. Os autores verificaram também que o ajuste do pH entre 4,5 e 4,8 e temperatura de incubação entre 70-75°C foram condições ótimas para isolar isoenzimas de lacase. Ortega-Clemente et al. (2009) cultivaram *Trametes versicolor*, imobilizado em madeira de carvalho, no licor negro após tratamento anaeróbio; após 90 dias, o tratamento combinado resultou na redução de 69% e 54% da cor e da quantidade de derivados de lignina, respectivamente.

Alguns isolados são capazes de crescer no licor negro sem adição de outros nutrientes, tais como dextrose e/ou vitaminas e em concentrações mais elevadas de licor. Lara et al. (2003) cultivaram *Trametes elegans* em solução contendo 33% de licor negro em pH 6, 7, e 8,0 analisando posteriormente a absorbância da lignina na faixa entre 200 a 600 nm. Os autores verificaram que o tratamento fúngico reduziu a absorção da lignina em 280 nm principalmente em pH 6,0, resultado da produção de enzimas ligninolíticas.

5.3.2 Análises de metabólitos produzidos por fungos no licor negro

Os cromatogramas de íons totais obtidos do licor negro biodegradado por fungos, analisados por GC/MS estão dispostos nos Apêndices C e D. Encontram-se divisões com linhas negras que correspondem aos grupos formados no *cluster* hierárquico, conforme ilustrado na Figura 11. Em sua maioria, açúcares e ácidos orgânicos foram os principais metabólitos detectados. Dentre os ácidos orgânicos, está o lactato, que é composto de função mista de ácido carboxílico e álcool; outros ácidos dicarbolílicos incluem o fumarato ou malato, possivelmente produzidos durante a biodegradação da lignina.

O açúcar psicose, considerado raro, foi detectado em todas as amostras de licor não biodegradadas. Contudo, maior quantidade desse açúcar foi detectada no licor biodegradado pela espécie *Trametes versicolor* (BT-10 e BT-40). Este caso foi o único que mais chamou atenção, em que ocorreu aumento da concentração de um composto presente no licor biodegradado em relação ao controle.

Para contribuir com o crescimento dos fungos, adicionaram-se 10 g L⁻¹ de dextrose. O tratamento que recebeu o fungo BT-10 consumiu toda a glicose presente em solução. Outros compostos, detectados no tratamento controle, e totalmente consumidos por alguns fungos foram o citrato (BT-27, BT-31, BT-32), e o pantotenato (BT-10, BT-40, Jau-3, BT-25, BT-32, ED-1).

O método de *cluster* hierárquico ilustra a formação de grupos de acordo com os metabólitos presentes no licor negro. Com o propósito de melhor compreender a formação dos grupos, observam-se quatro linhas de corte no cluster, baseando-se na altura da raiz. Todo agrupamento formado abaixo da linha de corte é respeitado. Tomando como exemplo a nota de corte 3 (na posição 8), detectam-se cinco formações: grupo 1 (BT-31 e C1a), grupo 2 (BT-10 e BT-40), grupo 3 (C2, Jau-3³, Jau-3⁴, BT-21), grupo 4 (C1c, BT-25, BT-31, BT-27, BT-28), grupo 5 (BT-32, ED-1). Na nota de corte 1 e 2 observa-se a formação de 11 e 7 grupos, respectivamente. Na nota de corte 2, chamamos a atenção para a formação do grupo contendo Jau-3 e seu respectivo controle, BT-10 e BT-40 que pertencem à mesma espécie e duas espécies de *Pleurotus* (BT-32 e ED-1).

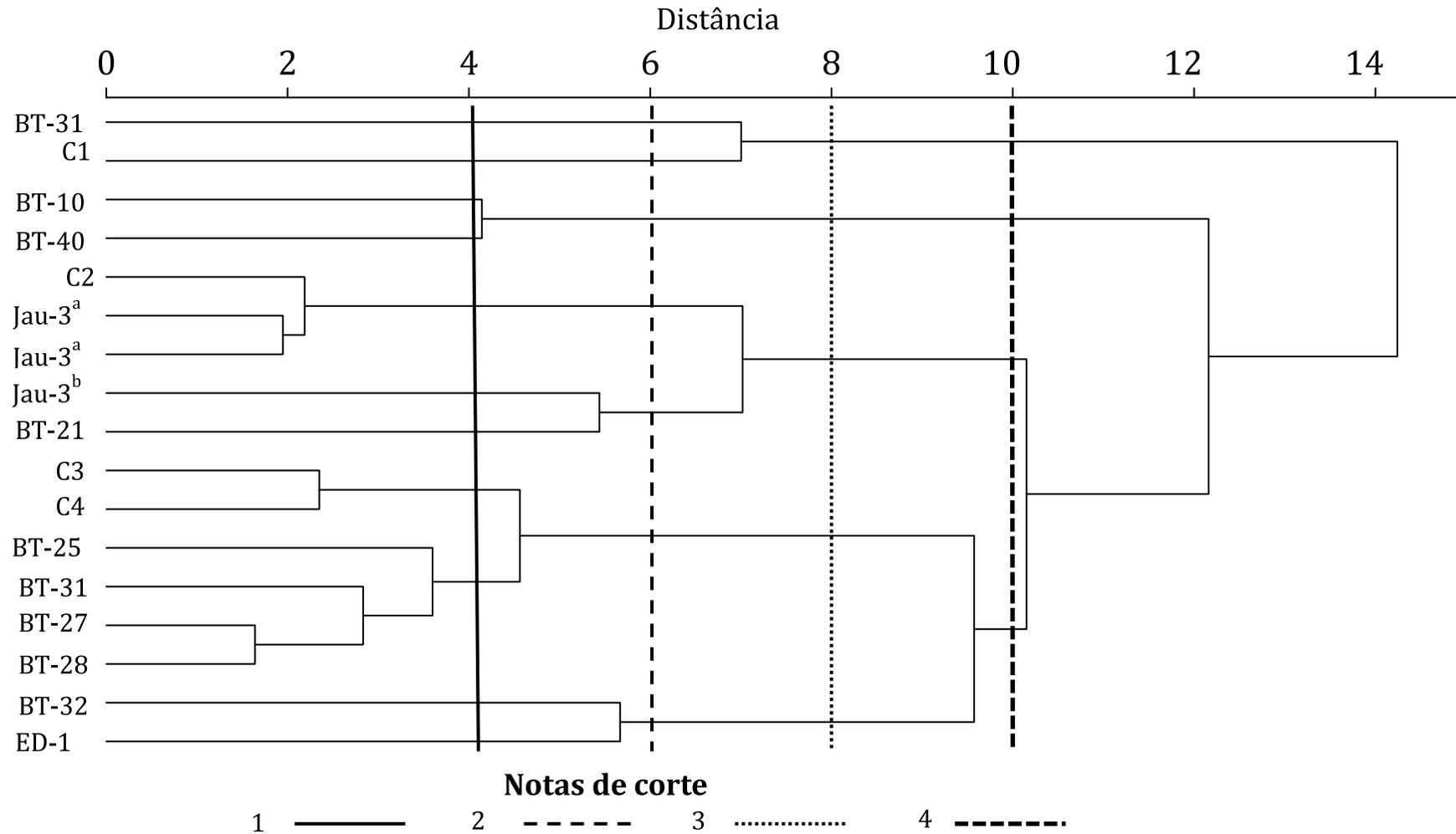


Figura 11 - Cluster hierárquico dos metabólitos detectados por GC/MS e produzidos por fungos basidiomicetos no licor negro (concentração 10%) durante o período máximo de 17 dias. C1, C2, C3, C4 = amostras controle (licor negro, concentração 10%, não biodegradado). Jau-3^a e Jau-3^b = licor negro (concentração 10%,) biodegradado por *P. sanguineus* (Jau-3) após 14 e 17 dias, respectivamente

A análise de metabólitos é bastante complexa e muito variável de acordo com o período de exposição do fungo. Neste estudo, variou-se somente o dia de exposição do fungo no licor, que é o caso do tratamento Jau-3³ e Jau-3⁴, amostras obtidas no 14^o e 17^o dias de biodegradação do licor, respectivamente.

Na literatura, raros são os trabalhos que indicam análises de licor negro biodegradado por GC/MS, e a maioria é com bactérias. Raj et al. (2007a; 2007b) verificaram a formação de vários compostos aromáticos de baixa massa molecular ao cultivarem espécies de *Bacillus* sp. em licor negro. Chandra e Abhishek (2011) também verificaram a presença de alguns compostos clorofenólicos gerados após a degradação do licor negro por isolados de *Citrobacter*, que por sua vez reduziram 60% da quantidade de lignina presente no licor.

No presente estudo, não foram detectados compostos aromáticos, possivelmente resultado do método de extração dos metabólitos, que pode variar de acordo com a metodologia.

5.3.3 Atividade enzimática

As atividades das enzimas ligninolíticas produzidas por *P. sanguineus* (Jau-3) durante o crescimento no licor negro (concentração 10%) foram realizadas entre o 7^o e 13^o dias após a inoculação. As leituras das atividades enzimáticas do mesmo fungo, produzidas no licor negro na concentração 15%, foram realizadas entre o 5^o e 13^o dias.

A atividade enzimática é determinada através do monitoramento da mudança de cor causada pela reação entre o iniciador da reação (siringaldazina ou vermelho de fenol) e o extrato enzimático bruto que contém a enzima específica (lacase, peroxidase, manganês peroxidase), após 10 minutos.

A Figura 12 ilustra a atividade enzimática de *P. sanguineus* durante o crescimento no licor negro na concentração 10%. No primeiro dia de leitura, detectou-se somente a atividade da lacase e peroxidase. No 10^o dia, o basidiomiceto produziu concomitantemente lacase, peroxidase e manganês peroxidase (MnP), com atividades similares. Entretanto, neste dia, detectou-se a maior atividade da MnP (20 UI L⁻¹). As enzimas lacase e peroxidase foram detectadas com maior atividade no 13^o dia de incubação.

No ensaio de biodegradação do licor na concentração 15%, a atividade da lacase e peroxidase foi menor (Figura 13) quando comparado à atividade enzimática no licor negro na concentração 10%. Na concentração 15%, detectou-se maior atividade da lacase no 9^o dia (5,4 UI L⁻¹), e a atividade da MnP oscilou bastante.

Leituras das atividades das enzimas ligninolíticas produzidas no licor negro nas duas concentrações por *P. sanguineus* permitem aperfeiçoar o processo de biodegradação de lignina. Na literatura praticamente não existem trabalhos relatando o cultivo de fungos diretamente no licor negro, ao menos que se promova a dessalinização (LARA et al., 2003; DA RE; PAPINUTTI, 2011; CHANDRA et al., 2011).

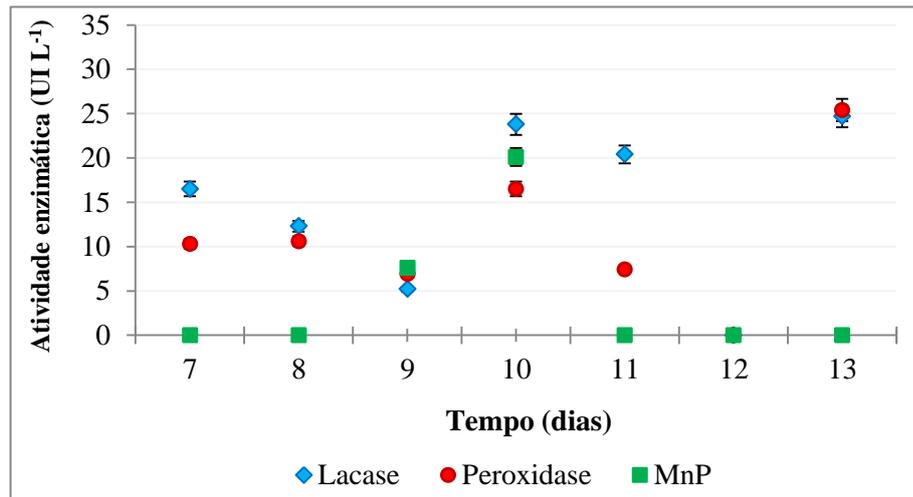


Figura 12 - Atividade enzimática de *Pycnoporus sanguineus* (Jau-3), cultivado em licor negro na concentração de 10%, a 30°C durante 13 dias.

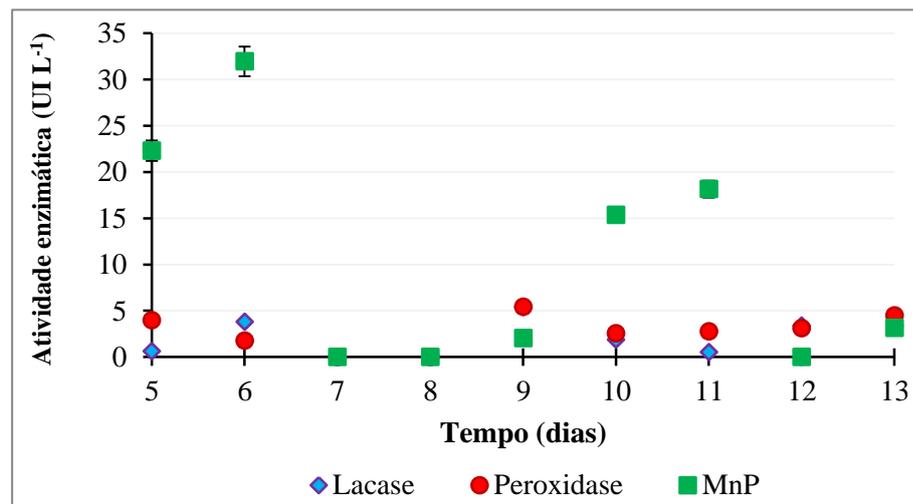


Figura 13 - Atividade enzimática de *Pycnoporus sanguineus* (Jau-3), cultivado em licor negro na concentração de 15%, a 30°C durante 13 dias.

O cultivo dos fungos utilizados no presente estudo foi possível nas seguintes condições: crescimento prévio do fungo em substrato lignocelulósico com alguma fonte de nitrogênio em baixa concentração (neste estudo utilizou-se inóculo preparado em serragem de eucalipto enriquecido com farelos de soja); ajuste do pH do licor sempre abaixo de 5,0; temperatura constante, incubação sob agitação. A inexistência de alguns desses parâmetros sempre resultou em não crescimento fúngico. Portanto, realizar ensaios de biodegradação do licor negro não é algo trivial, exige conhecimento sobre as necessidades nutricionais e fisiológicas de microrganismos.

Saat et al. (2014) estudaram certas características fisiológicas de *P. sanguineus* quando cultivado em meio específico para a produção de lacases e observaram que o pH e agitação são dois parâmetros chave para o obter elevada produção da lacase. Ao incubar com agitação a 170 r.p.m., os autores observaram maior produção de lacase, devido à maior transferência de oxigênio ao fungo, mas agitação excessiva (250 r.p.m.) causa fratura do micélio devido à intensa força hidrodinâmica com o frasco. No presente estudo, o crescimento fúngico em licor negro também só foi possível utilizando serragem, pois este tipo de substrato serve como suporte físico e, possivelmente como fonte alternativa de nutrientes (ZOU et al., 2015).

Em relação ao parâmetro nutricional, a heterogeneidade química do licor negro permite cultivar microrganismos sem a adição de elementos tais como fosfato de potássio, sulfato de cobre, sulfato de manganês, comumente utilizados em meios de cultivo para fungos (BARRAT et al., 1965). Entretanto, a dextrose contribuiu para o desenvolvimento do fungo no licor, visto que a adição de 10 g L^{-1} favoreceu a produção de enzimas ligninolíticas no licor negro na concentração 10%. Nesse sentido, a oxidação da glicose permite a produção de peróxido de hidrogênio, que é responsável pela atividade da peroxidase (ELISASHVILI; KACHLISHVILI, 2009).

Cultivado em meio líquido contendo batata-dextrose, o basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* produziu pellets que foram inoculados no licor negro proveniente de algodão na concentração 15%, adicionado de dextrose e tiamina e incubado em reator aerado durante 48 dias. No 10º dia, o fungo produziu somente lacase em elevada quantidade (460 UI L^{-1}) dentre as enzimas ligninolíticas avaliadas pelos autores, quando também verificaram inibição da lacase ao aumentar a concentração do licor (ZHAO et al., 2008). Ortega-Clemente et al. (2009) cultivaram *Trametes versicolor* em biorreator durante 90 dias e detectaram a presença de MnP e lacase durante todo o período do ensaio, sem adicionar outras fontes de carbono senão licor negro.

O uso de fungos basidiomicetos em estudo que visam à degradação da lignina é de grande interesse biotecnológico. O Brasil possui grande biodiversidade de fungos potencialmente úteis em processos biotecnológicos e estudos sobre a capacidade de produção de enzimas ligninolíticas desses isolados deve ser sempre encorajada. Como exemplo, Okino et al. (2000) coletaram 116 espécies de basidiomicetos de floresta tropical e observaram que aproximadamente 97% dos isolados produziam lacase e peroxidases. Nesse sentido, a busca por novos isolados que possam ser empregados nas diversas propostas que a biotecnologia oferece avanços científicos e econômicos para o país.

5.3.4 Ensaios de toxicidade

Independentemente do tipo da amostra, biodegradada ou não, todas se mostraram altamente tóxicas para os microrganismos aquáticos *Hydra attenuata* e *Daphnia magna* (Tabela 15).

Tabela 15 - Concentrações (%) letais (CL₅₀) para *Hydra attenuata* e *Daphnia magna* expostas por 96 h e 48h, respectivamente, ao licor negro, biodegradado por *Pycnoporus sanguineus* durante 15 dias, e determinadas pelo Programa PriProbit

| Tratamentos | Microrganismos | |
|---|----------------|----------------|
| | <i>Hydra</i> | <i>Daphnia</i> |
| Licor biodegradado com lignina ^a | 6,65 | 12,21 |
| Controle ^a | 6,35 | 11,89 |
| Licor biodegradado sem lignina ^b | 12,31 | 15,91 |
| Controle ^b | 9,58 | 12,72 |

a: licor negro (concentração 15%), biodegradado e não biodegradado (controle), antes da recuperação da lignina insolúvel em pH 3,0

b: licor negro (concentração 15%), biodegradado e respectivo controle, após a recuperação da lignina insolúvel em pH 3,0

Para a *H. attenuata*, a exposição ao licor negro biodegradado com lignina apresentou toxicidade igual ao controle. O tratamento com licor biodegradado sem lignina reduziu aproximadamente 50% a toxicidade em relação ao tratamento de licor biodegradado com lignina, e menor toxicidade com relação ao seu controle. Para a *Daphnia* as mesmas amostras tiveram o mesmo efeito em relação à diminuição da toxicidade, respectivamente.

No presente estudo, o licor negro foi exposto ao basidiomiceto *P. sanguineus* durante 15 dias. Estima-se que os produtos gerados da fragmentação da lignina e de outros compostos presentes no licor (ácidos orgânicos, compostos aromáticos de baixa massa molecular) podem ter sido a causa da toxicidade aos organismos padronizados. Dependendo do tempo de biodegradação e do organismo testado, compostos intermediários de degradação de baixa massa molar podem ser mais tóxicos do que o componente original, que possui elevada massa molecular (PESSALA et al., 2009). Após o tratamento químico e biológico do licor negro, Paasivirta et al. (2005) estimaram que o estireno e furfural, gerados após a degradação de carboidratos e da lignina, respectivamente, foram a causa da toxicidade em bioensaios.

A presença de compostos de elevada massa molecular também pode ser tóxica a organismos (HIGASHI, 1992). Verificamos no presente estudo que o licor negro biodegradado com lignina foi mais tóxico à *H. attenuata* em comparação ao licor sem a lignina, enquanto que *D. magna* foi mais tolerante ao mesmo tipo de amostra.

Entretanto, relatos também apontam que compostos de baixa massa molar oriundos da degradação da lignina por fungos basidiomicetos têm propriedades benéficas na forma de antioxidantes e protetores celulares (YOSHIOKA et al., 2012, MATSUHISA et al., 2015). Fungos também podem ser utilizados como bioindicadores de compostos fenólicos tóxicos (GUIRAUD et al., 1994).

Casos de detoxificação de resíduos contendo esses tipos de compostos de baixa massa molecular têm sido relatados com grande sucesso na literatura, utilizando fungos basidiomicetos. Tratamentos de efluentes de indústrias de óleo de oliva com *Pleurotus ostreatus* (MARTIRANI et al., 1995), redução da cor e toxicidade de vinhaça de cana-de-açúcar com *P. sajor-caju* (FERREIRA et al., 2011), redução da cor e toxicidade de efluentes têxteis com linhagens de *Pleurotus* e com cianobactérias (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2006), são alguns exemplos promissores de biorremediação.

5.3.5 Demanda bioquímica de oxigênio

A concentração da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) das amostras de licor biodegradado com lignina foi aproximadamente 50% menor em comparação ao seu respectivo controle (Tabela 16). Por outro lado, a DBO de amostras de licor biodegradado sem lignina é aproximadamente 90% mais elevada em relação ao licor biodegradado com a presença de lignina insolúvel em pH 3,0. Uma explicação para esses parâmetros serem tão elevados deve-

se à presença de lignina solúvel e outros compostos orgânicos gerados após sua fragmentação, além de metabólitos do fungo que foram consumidos pelas bactérias inoculadas.

Confrontando esses dados aos resultados observados nos ensaios de toxicidade, verifica-se que o licor negro biodegradado seria um potencial poluente, se descartado inapropriadamente em corpos d'água. Desta forma, são necessários mais estudos em relação à perda de toxicidade. A elevada concentração de DBO é causada pela presença de compostos de baixo peso molecular. Entretanto, muitos desses compostos, incluindo fenóis substituídos, aminas, ácido benzoico podem induzir a síntese da lacase por algumas espécies de fungos, que não a produzem na ausência destes indutores (YAROPOLOV et al., 1994).

Tabela 16 - Leitura da Demanda Bioquímica de Oxigênio (mg/L) de amostras de licor negro biodegradado por *Pycnoporus sanguineus*, antes e após a recuperação da lignina em pH 3,0

| Tratamento | Tempo de leituras (dias) | | | | | Média |
|---|--------------------------|------|------|------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Licor biodegradado com lignina ^a | 932 | 1398 | 2447 | 3146 | 3728 | 3262 |
| Controle com lignina ^a | 1049 | 2447 | 3612 | 4893 | 5825 | 5708 |
| Licor biodegradado sem lignina ^b | 932 | 3262 | 5670 | 7611 | 9165 | 10951 |
| Controle sem lignina ^b | 699 | 3495 | 6291 | 8388 | 10019 | 11650 |

a. Licor biodegradado ou não (controle), antes da recuperação da lignina

b. Licor biodegradado ou não (controle) após a recuperação da lignina

A redução da DBO também depende do tipo de tratamento biológico, que pode ser combinado com outros tipos de tratamentos físicos ou químicos. A redução da quantidade de lignina solúvel presente no licor negro, causa da elevada concentração de DBO, pode ser efetivamente reduzida com o cultivo direto de fungos no licor negro (FONSECA et al., 2015). Ortega-Clemente et al. (2009) observaram redução de 32% da demanda química de oxigênio (DQO) após cultivar no licor negro o basidiomiceto *Trametes versicolor*, imobilizado em madeira de carvalho, após tratamento anaeróbico e posteriormente cultivando o fungo em reator aeróbico.

Conforme verificado por Hoa e Man (2006), bactérias redutoras de sulfato reduziram em torno de 88% da DQO pelo tratamento do licor negro com bactérias redutoras de enxofre. Redução da DBO do licor negro também foi observada após o cultivo de bactérias no próprio licor (CHANDRA; ABHISHEK, 2011).

Nesse sentido, outros parâmetros devem ser conduzidos para se estimar condições que permitam expor os fungos ao licor negro, tais como concentração, tempo, temperatura, pH e, acima de tudo, a espécie de fungo.

5.4 Análises da lignina modificada por fungos

5.4.1 Cromatografia líquida de gel filtração

Baseado nos resultados obtidos descritos na Tabela 17, as menores massas moleculares médias (MM) de ligninas, obtidas na primeira fração após a cromatografia, foram recuperadas dos tratamentos que receberam os fungos *F. velutipes* e *T. versicolor* (BT-28 e BT-40).

As maiores MM de lignina foram observadas nas frações dos tratamentos com *T. villosa* (BT-10) e *Pleurotus* sp. (BT-21). Após a cromatografia, a segunda fração de lignina biodegradada por *T. villosa* (BT-40) teve a menor MM em relação aos demais tratamentos. A fração de lignina recuperada do licor negro, concentração 15%, biodegradado por *P. sanguineus* teve maior MM em relação ao respectivo controle. Processos de despolimerização de lignina durante a fragmentação enzimática podem gerar compostos de menor massa molecular. Entretanto, eventos de repolimerização causados por lacases podem gerar compostos de elevada massa molecular em períodos muito curtos de tempo, sob condições controladas, de 30 minutos (ROCHA et al., 2014) a 24 horas (MATTINEN et al., 2008).

Essa variação também pode ser verificada com as MM das amostras de lignina biodegradada por *P. sanguineus* após 3, 7, 9, 11 e 14 dias. Nesse caso, fica claro que a lignina sofreu processos de fragmentação, mas sofre repolimerização. Devido à elevada reatividade da lignina, não é possível prever o que irá acontecer durante sua fragmentação que, ora são produzidos compostos de baixa massa molar, ora são repolimerizados, resultando em elevada massa molar (ZOU et al., 2015).

Enzimas ligninolíticas, como a lacase, iniciam processos de fragmentação da lignina com a oxidação de grupos fenólicos em radicais estáveis, que subsequentemente sofrem acoplamento de radical-radical através de ligações C-C e éter-carbono. Essas novas ligações podem se conectar a frações menores e também à moléculas maiores, causando o aumento da massa molecular. Todo esse processo pode ocorrer sem necessariamente destruir a constituição principal da composição aromática (GOUVEIA et al., 2012).

Tabela 17 - Massa molar média de frações de ligninas recuperadas de licor negro biodegradado por espécies de fungos basidiomicetos, obtidas após cromatografia de gel filtração utilizando coluna Superdex 30 pepgrade

| Isolados | 1ª Fração | | 2ª Fração | | 3ª Fração | |
|--|-----------|--------|-----------|--------|-----------|-------|
| | mL | Da | mL | Da | mL | Da |
| <i>T. villosa</i> (BT-10 ^a) | 49,8 | 1111,5 | 53,7 | 994,3 | 55,04 | 955,2 |
| <i>Pleurotus</i> sp. (BT-21 ^a) | 50,1 | 1101,5 | 51,2 | 1066,6 | - | - |
| <i>P. djamor</i> (BT-25 ^a) | 50,3 | 915,4 | 58,2 | 735,9 | - | - |
| <i>F. velutipes</i> (BT-28 ^a) | 51,7 | 881,2 | 54,2 | 822,5 | 58,4 | 731,1 |
| <i>P. sapidus</i> (BT-31 ^a) | 49,7 | 931,7 | 52,1 | 872,5 | - | - |
| <i>Pleurotus</i> sp. (BT-32 ^a) | 50,9 | 900,3 | 58,7 | 724,9 | 63,4 | 637,6 |
| <i>T. villosa</i> (BT-40 ^a) | 51,3 | 892,1 | 61,5 | 671,2 | 62,3 | 657,8 |
| <i>Pleurotus</i> sp. (ED-1 ^a) | 48,5 | 963,4 | 54,6 | 813,1 | 62,6 | 651,3 |
| <i>P. sanguineus</i> (Jau-3 ^b) | 47,4 | 992,9 | 50,1 | 921,4 | 55,2 | 804,0 |
| <i>P. sanguineus</i> (Jau-3 ^c) | 48,8 | 954,7 | 49,9 | 925,8 | 57,4 | 753,2 |
| <i>P. sanguineus</i> (Jau-3 ^d) | 48,5 | 962,8 | 50,4 | 913,3 | - | - |
| <i>P. sanguineus</i> (Jau-3 ^e) | 49,1 | 946,8 | 50,1 | 922,2 | - | - |
| <i>P. sanguineus</i> (Jau-3 ^f) | 47,5 | 989,4 | 50,5 | 910,2 | - | - |
| <i>P. sanguineus</i> (Jau-3 ^g) | 48,9 | 951,1 | 50,5 | 910,2 | 54,8 | 808,4 |
| Lignina ^h | 48,9 | 1097,1 | 49,9 | 925,8 | 57,4 | 753,2 |
| Lignina ⁱ | 51,1 | 896,7 | 54,7 | 809,9 | 59,8 | 704,1 |
| Lignina ^j | 49,9 | 926,3 | 51,8 | 878,8 | 65,3 | 604,9 |

a = cultivado em licor negro de concentração 10% (v/v)

b = cultivado em licor negro de concentração 15%

c, d, e, f, g = cultivado em licor negro de concentração 10%. Ligninas analisadas após 3, 7, 9, 11 e 14 dias de biodegradação

h = lignina recuperada de licor negro de concentração 10%, não biodegradado

i = lignina recuperada de licor negro de concentração 15%, não biodegradado

j = lignina obtida em pH 3,0, não biodegradada e não autoclavada

Os perfis cromatográficos das frações de lignina recuperadas de licor negro 10%, biodegradado por nove espécies de fungos estão ilustrados nas Figuras 14 e 15, e os cromatogramas obtidos das frações de ligninas biodegradadas por *P. sanguineus* (Jau-3) estão ilustrados na Figura 16.

Em todas as Figuras, existe a ilustração de setas, indicando quais frações (1^a, 2^a e 3^a) foram analisadas por SAXS, e que possuem massa molecular média calculada e disposta na Tabela 17.

Na Figura 15, verifica-se certa similaridade nos perfis cromatográficos das ligninas biodegradadas por *T. villosa* (BT-10) e *P. sanguineus* (Jau-3), principalmente sobre a presença de dois grandes picos detectados após 90 min de eluição. Este pico, entretanto, não é observado nos tratamentos que incluem o isolado ED-1, BT-25 e BT-40 (Figura 14).

Na Figura 16, estão ilustrados os cromatogramas das ligninas recuperadas de licor negro (concentração 10%), biodegradadas por *P. sanguineus* (Jau-3). Observa-se estreitamento do perfil cromatográfico ilustrado nas Figuras 16 B-C-D, assim como os perfis das ligninas autoclavadas e da lignina não autoclavada, recuperadas em pH 3,0. A Figura 16 F ilustra as frações recolhidas e a análise em triplicata de ligninas biodegradadas por *P. sanguineus*, após 14 dias.

Os resultados indicam claramente que cada espécie degrada ou modifica a lignina durante seu crescimento em licor negro. O perfil das amostras de lignina biodegradadas é bastante diferente da lignina não biodegradada e não autoclavada, havendo, portanto, uma redução de massa molar da lignina durante o processo de esterilização do licor negro.

Atualmente, compostos de baixa massa molar derivados de lignina são de grande interesse industrial pelas propriedades antioxidantes (GARCÍA et al., 2010), os quais podem ser obtidos, após a cromatografia, à partir da 3^a fração. Técnicas de cromatografia são bastante eficientes e muito utilizadas para conhecer a distribuição da massa molecular de ligninas (LEISOLA et al., 1983, NEGRÃO et al., 2015).

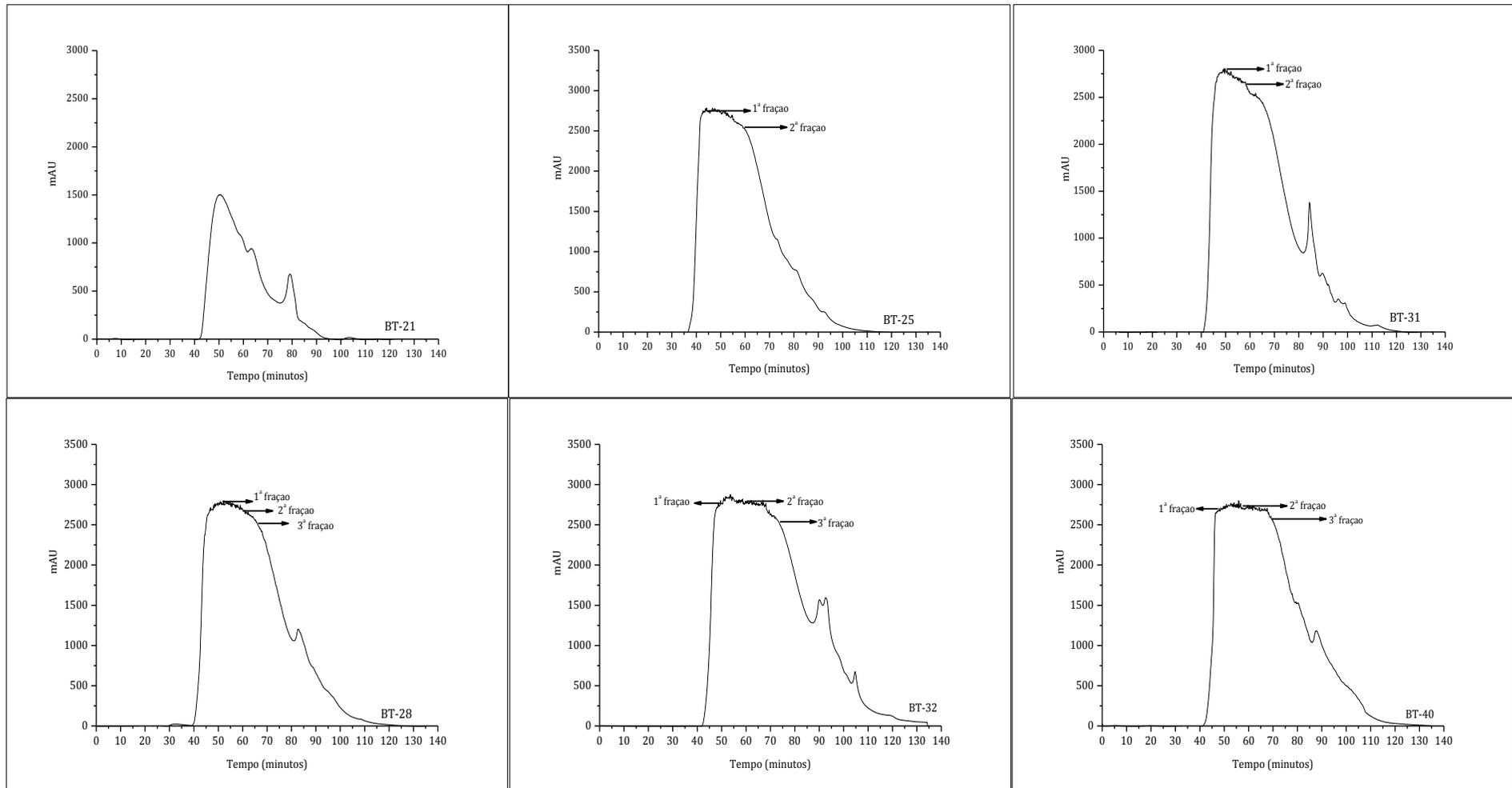


Figura 14 - Perfis obtidos após cromatografia de gel filtração das frações de ligninas obtidas de licor negro (concentração 10%) biodegradado pelas espécies de fungos *Pleurotus* sp. (BT-21), *Pleurotus djamor* (BT-25), *Pleurotus sapidus* (BT-31), *Flammulina velutipes* (BT-28), *Pleurotus* sp. (BT-32), *Trametes villosa* (BT-40), após 14 dias de incubação a 28°C. As indicações de 1ª, 2ª e 3ª frações correspondem às frações que também foram analisadas por SAXS

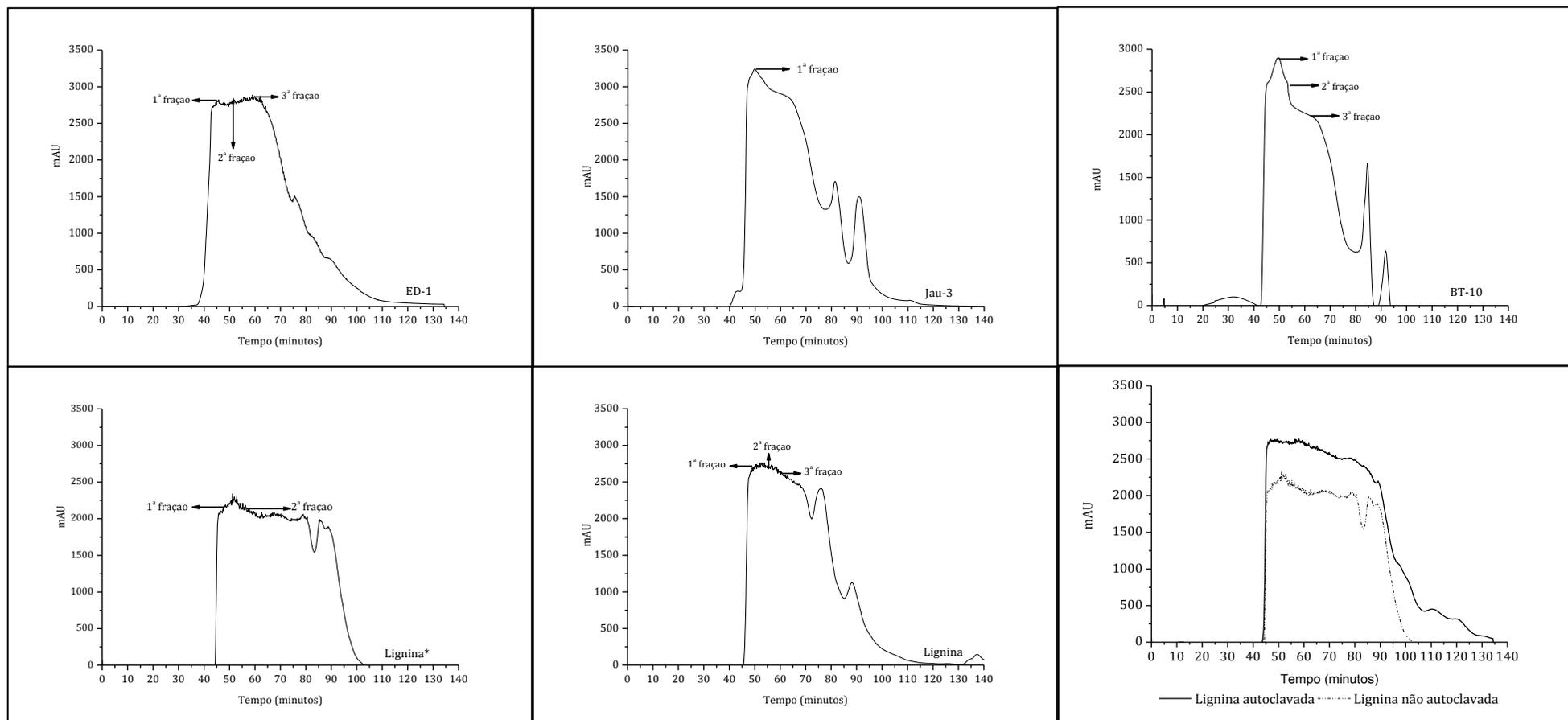


Figura 15 – Perfis obtidos após cromatografia de gel filtração das frações de ligninas obtidas de licor negro (concentração 10%) biodegradado pelas espécies de fungos *Pleurotus* sp. (ED-1), *Pycnoporus sanguineus* (Jau-3), e *Trametes villosa* (BT-10), após 14 dias de incubação a 28°C, e de lignina não biodegradada, sendo não autoclavada* e autoclavada. As indicações de 1ª, 2ª e 3ª frações correspondem às frações que também foram analisadas por SAXS

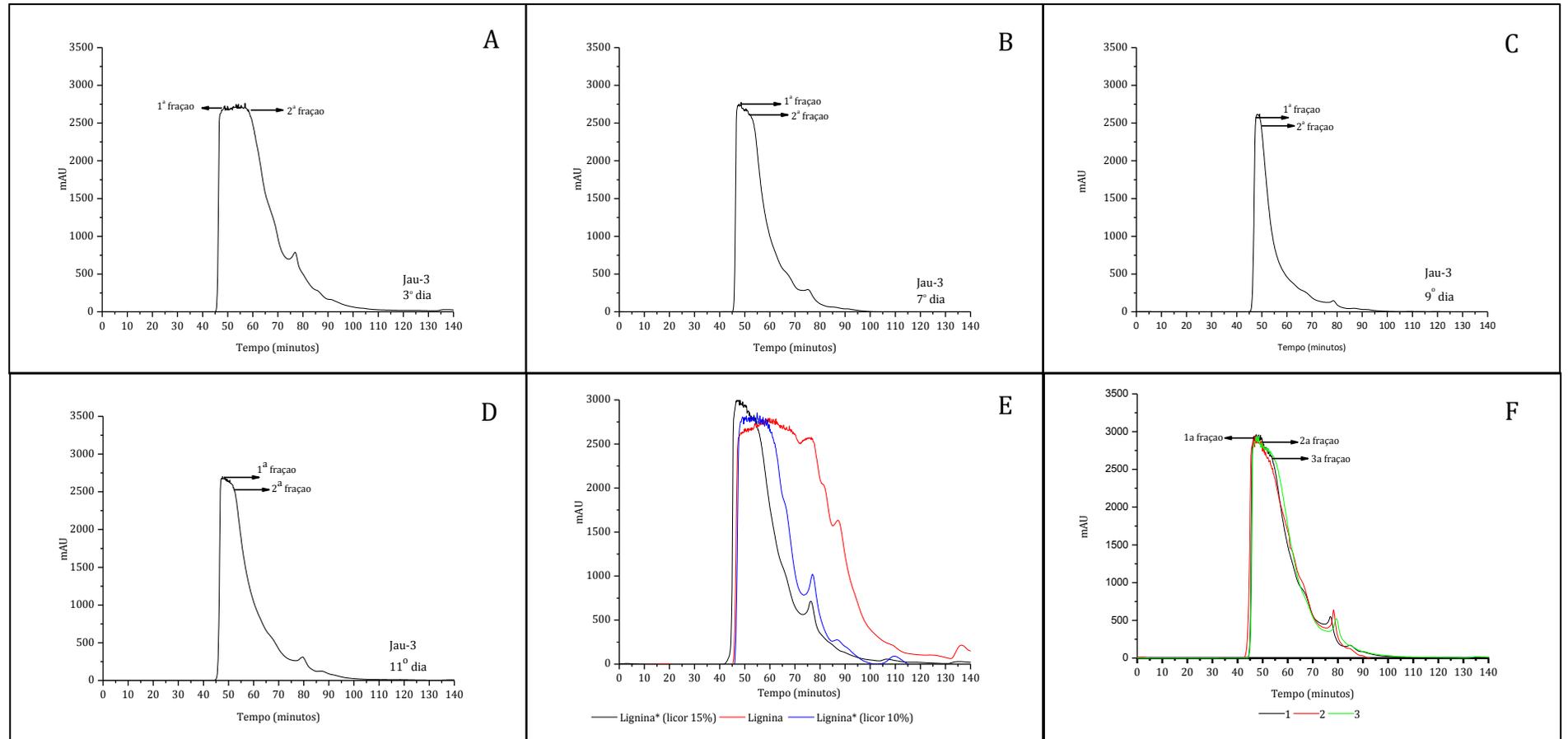


Figura 16 - Perfis obtidos após cromatografia de gel filtração das frações de ligninas obtidas de licor negro (concentração 10%) biodegradado por *Pycnoporus sanguineus* (Jau-3), após três (A), sete (B), nove (C), onze (D) e catorze dias (F) de incubação a 30°C, e de ligninas não biodegradadas, autoclavada e não autoclavada*. As indicações de 1^a, 2^a e 3^a frações correspondem às frações que também foram analisadas por SAXS

5.4.2 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

Para a modelagem das ligninas a partir das curvas de SAXS assumimos que o sistema estudado possuía duas populações, consistindo de moléculas isoladas de ligninas de baixa massa molecular (1º nível), e um “cluster” molecular formado por agregados fractais (2º nível), envoltos por um solvente de densidade eletrônica homogênea.

A Figura 17 representa esquematicamente as duas populações de tamanhos diferentes, presentes em solução. Também foi assumido que a forma das moléculas isoladas de lignina é bem descrita por discos de diferentes larguras e uma distribuição radial caracterizada por uma distribuição lognormal.

Na curva de espalhamento, moléculas grandes têm tendência de aumento na intensidade de espalhamento na região de baixo q (2º nível) correspondendo à maior presença de agregados fractais, ou agregação de moléculas, enquanto que o perfil da curva de espalhamento na região de alto q corresponde à contribuição das ligninas de baixa massa molecular (1º nível).

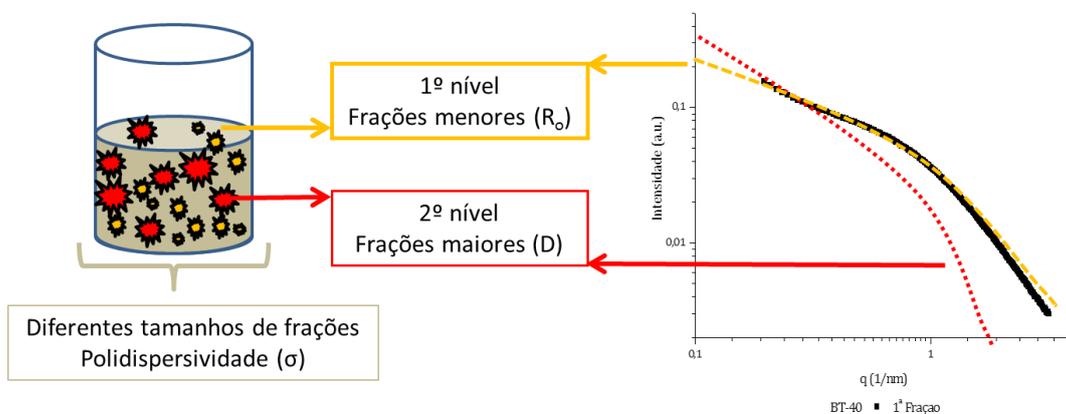


Figura 17 - Representação esquemática das duas populações de lignina e suas contribuições para o espalhamento de raios-X.

Primeiramente foi realizado um estudo de estabilidade da solução de lignina após períodos de diluição em solução de NaOH. As análises indicaram que existe um comportamento de estabilização molecular entre o sétimo e oitavo dias após a diluição. A região inicial das curvas de ligninas próximas ao eixo y , nas Figuras 18 A e B, são proporcionais às massas moleculares dos agregados da lignina. A inclinação mostra o aumento do complexo fractal dessas moléculas.

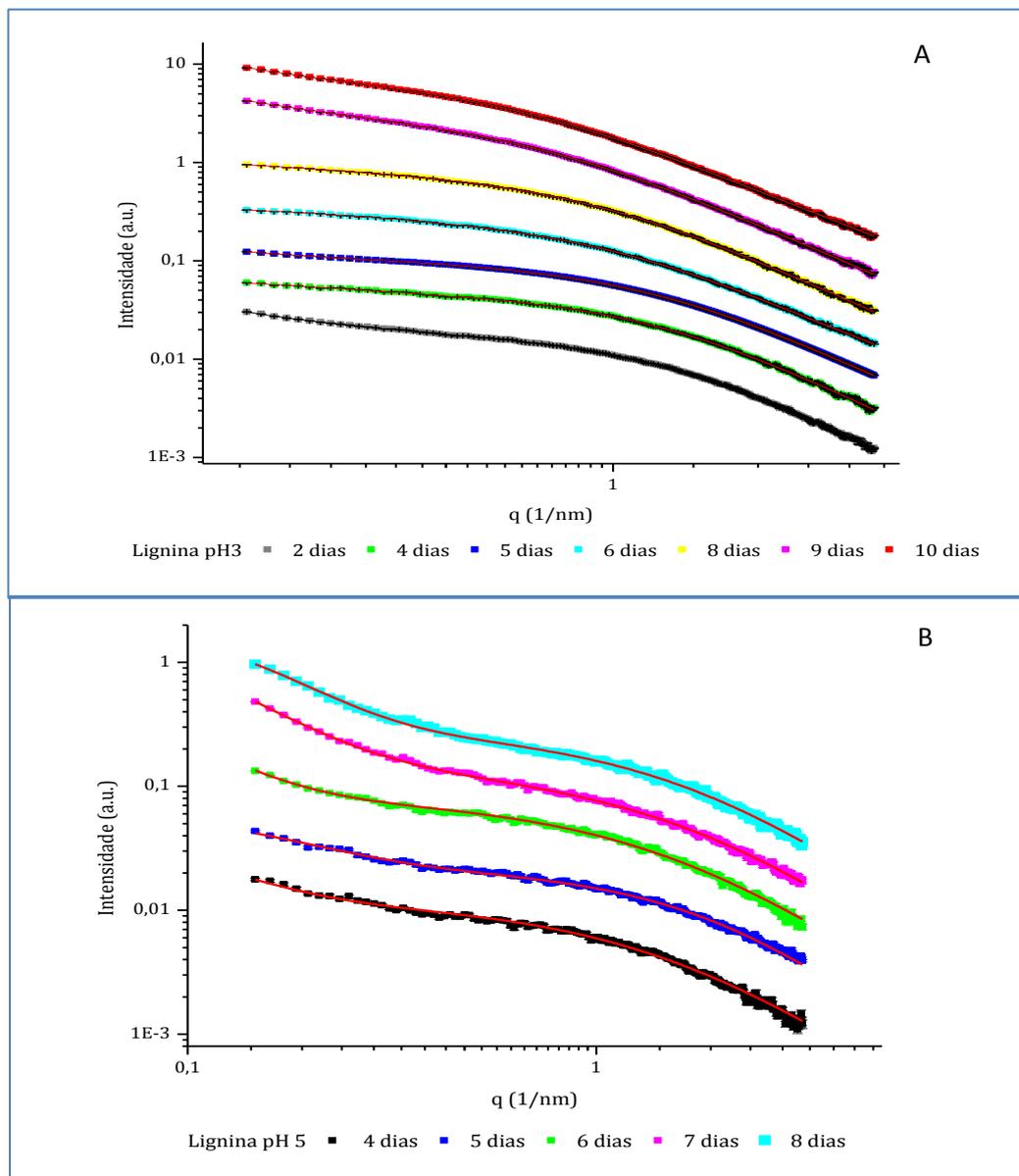


Figura 18 - Ajuste dos dados de espalhamento de raios-X a baixo ângulo pelo programa SASfit, apresentando as curvas de ligninas obtidas em pH 3,0 (A) e pH 5,0 (B), e diluídas ao longo de 10 dias e 8 dias, respectivamente, em NaOH.

A estabilização é caracterizada pelo aumento da massa molecular, quando algumas estruturas sofrem condensação e repolimerização (CRAWFORD, 1981). Os resultados geram informações sobre o tamanho, forma e ordem fractal da lignina de acordo com o tempo e diferentes padrões são observados na ordem fractal das ligninas, devido aos eventos químicos que ocorrem durante o período amostrado. Devido à similaridade entre as curvas das amostras do sétimo e oitavo dias (Figura 18 B) observa-se que ocorre a estabilização dos agregados fractais de lignina, conforme também verificado por Maziero et al. (2012).

Baseando-se nos resultados observados na Tabela 18, a estabilização molecular da lignina é resultado do aumento da massa molecular, após uma semana de diluição. Os valores de R_0 (raio dos cilindros), σ (dispersão em torno do R_0), e D_m (dimensão fractal), foram maiores nos últimos dias de avaliação. A polidispersividade também aumentou de acordo com o tempo de diluição. O parâmetro χ^2 é a discrepância relativa entre o ajuste teórico/experimental, sendo que o ajuste entre duas curvas idênticas teria um χ^2 igual a 1.

Importante ressaltar que, na lignina obtida em pH 3,0, a estabilização molecular é mais lenta, quando a estabilização se inicia no oitavo dia.

Tabela 18 - Parâmetros usados no ajuste dos dados obtidos através de espalhamento de raios-X a baixo ângulo de lignina obtida em pH 3,0

| Lignina pH 3 | | | | | | | | |
|---------------------|------------|------------------|------|------|------|------|------|------|
| Contribuições | Parâmetros | Dias de diluição | | | | | | |
| | | 2 | 4 | 5 | 6 | 8 | 9 | 10 |
| 1º nível | R_0 | 1,22 | 1,20 | 1,13 | 1,28 | 1,47 | 1,58 | 1,54 |
| | σ | 0,29 | 0,33 | 0,35 | 0,37 | 0,37 | 0,43 | 0,46 |
| 2º nível | D_m | 2,05 | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,09 | 2,90 | 2,90 |
| | χ^2 | 2,88 | 3,61 | 3,90 | 4,18 | 2,45 | 2,69 | 4,93 |

| Lignina pH 5 | | | | | | |
|---------------------|------------|------------------|------|------|------|------|
| Contribuições | Parâmetros | Dias de diluição | | | | |
| | | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 1º nível | R_0 | 0,44 | 0,52 | 0,70 | 0,70 | 0,73 |
| | σ | 0,57 | 0,53 | 0,45 | 0,60 | 0,60 |
| 2º nível | D_m | 2,66 | 2,79 | 2,80 | 2,80 | 2,80 |
| | χ^2 | 3,52 | 2,95 | 2,76 | 2,87 | 2,80 |

Após a verificação da influência do tempo sobre a estabilidade das amostras de lignina obtidas em pH 3,0 e 5,0, determinou-se o período de sete dias de repouso de ligninas biodegradadas por fungos. As ligninas analisadas por SAXS foram obtidas a partir dos primeiros três picos coletados após a passagem pela coluna Superdex 30®, sendo as amostras mantidas em repouso, no escuro, após a cromatografia. Os picos analisados estão indicados com setas nos cromatogramas, conforme mencionado anteriormente.

A descrição dos resultados obtidos das análises por SAXS das ligninas recuperadas após a biodegradação do licor negro, por espécies de fungos, está disposta na Tabela 19.

Tabela 19 - Parâmetros obtidos após análises de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) de frações de lignina recuperada de licor negro biodegradado por fungos basidiomicetos, e obtidas após cromatografia de gel filtração

| Isolados | Frações ^a | Contribuições | | | | |
|---------------------------------|----------------------|----------------|------|------|----------------|---------------------------|
| | | 1º nível | | | 2º nível | Ajuste geral ^b |
| | | R ₀ | σ | L | D _m | X ² |
| <i>T. villosa</i> (BT-10) | 1 | 1,58 | 0,35 | 0,72 | 2,94 | 5,95 |
| | 2 | 1,27 | 0,38 | 0,73 | 2,59 | 3,95 |
| | 3 | 0,41 | 0,59 | 0,53 | 2,94 | 4,04 |
| <i>Pleurotus</i> sp. (BT-21) | 1 | 1,31 | 0,30 | 0,67 | 2,83 | 6,64 |
| | 2 | 1,05 | 0,28 | 0,37 | 2,95 | 2,46 |
| <i>P. djamor</i> (BT-25) | 1 | 1,46 | 0,40 | 0,80 | 2,14 | 7,24 |
| | 2 | 1,48 | 0,36 | 0,59 | 2,21 | 8,83 |
| <i>F. velutipes</i> (BT-28) | 1 | 1,66 | 0,34 | 0,79 | 1,89 | 9,08 |
| | 2 | 1,39 | 0,41 | 0,66 | 2,39 | 8,54 |
| | 3 | 1,20 | 0,40 | 0,85 | 1,46 | 5,29 |
| <i>P. sapidus</i> (BT-31) | 1 | 1,36 | 0,39 | 0,12 | 2,20 | 8,21 |
| | 2 | 1,40 | 0,37 | 0,45 | 2,25 | 7,24 |
| <i>Pleurotus</i> sp. (BT-32) | 1 | 1,59 | 0,34 | 0,89 | 2,10 | 7,97 |
| | 2 | 1,27 | 0,41 | 0,93 | 2,26 | 5,85 |
| | 3 | 0,99 | 0,49 | 1,18 | 2,53 | 5,35 |
| <i>T. villosa</i> (BT-40) | 1 | 1,38 | 0,37 | 0,68 | 1,92 | 6,34 |
| | 2 | 1,40 | 0,39 | 0,50 | 2,51 | 4,45 |
| | 3 | 1,24 | 0,39 | 0,67 | 2,17 | 5,09 |
| <i>Pleurotus</i> sp. (ED-1) | 1 | 1,40 | 0,39 | 0,65 | 2,13 | 5,13 |
| | 2 | 1,45 | 0,36 | 0,85 | 2,19 | 5,27 |
| | 3 | 1,33 | 0,37 | 0,80 | 1,86 | 5,28 |
| <i>P. sanguineus</i> (Jau-3) | 1 | 1,19 | 0,37 | 0,59 | 2,32 | 3,13 |
| Lignina autoclavada | 1 | 1,24 | 0,32 | 1,15 | 1,46 | 7,51 |
| | 2 | 1,05 | 0,32 | 0,63 | 2,16 | 5,24 |
| | 3 | 1,27 | 0,13 | - | 1,79 | 7,88 |
| Lignina não autoclavada | 1 | 1,02 | 0,19 | - | 2,77 | 6,42 |
| | 2 | 0,90 | 0,32 | 0,61 | 2,13 | 4,88 |

^a frações coletadas após a purificação por GPC pelo sistema AKTA®; ^b ajuste geral das curvas obtidas pela análise dos dados de SAXS pelo programa SASFit. R₀ = raio dos cilindros; σ = dispersão em torno de R₀; L = largura dos discos, D_m = dimensão fractal dos agregados; X² = ajuste geral

Os parâmetros relevantes determinados a partir do melhor ajuste foram o raio médio (R₀), a polidispersividade em torno dos valores de R₀ (σ), e a largura dos discos (L), todos relacionados ao 1º nível.

As Figuras 19 e 20 ilustram os ajustes dos dados obtidos feitos pelo software SASfit. Analisando os parâmetros obtidos observamos uma tendência na diminuição do R_0 das ligninas de baixo peso molecular, nas últimas frações coletadas após a purificação, resultado coerente com o procedimento realizado e comentado nos resultados de cromatografia.

Observa-se que as primeiras frações analisadas de lignina biodegradada pelos isolados BT-28 e Jau-3 tiveram os maiores e menores valores de R_0 , respectivamente. A polidispersividade (σ) aparentemente tende a se manter constante nas diferentes frações de cada amostra, sendo o menor valor observado no tratamento com BT-21.

Do 2^o nível, foi possível obter a dimensão fractal dos agregados de lignina (D_m). O raio de giro dos agregados (relacionado ao tamanho) não pôde ser obtido, por limitações experimentais. Para a determinação confiável de tal parâmetro seria necessário acessarmos intervalos menores de q . A qualidade dos ajustes é evidenciada por baixos valores de χ^2 .

O procedimento de esterilização modificou o tamanho das amostras. Na lignina autoclavada, a 2^a fração possuiu moléculas maiores enquanto que a 3^a fração havia pequenos fractais. Na lignina não autoclavada, obtida em pH 3,0, as duas frações são bem distintas, onde a 1^a fração é composta de agregados maiores enquanto que a 2^a fração possui moléculas menores.

Nas amostras que tiveram as três frações coletadas somente a lignina do tratamento com BT-10 teve a segunda fração com D_m menores que a primeira fração. A 3^a fração de ligninas biodegradadas pelos isolados BT-21, BT-25, BT-31 e Jau-3 não foram analisadas por SAXS, devido à baixa concentração presente nessas frações e, portanto, não detectada por raios-X.

Os resultados obtidos pela técnica de SAXS contribuíram para o entendimento de mudanças estruturais que ocorrem na lignina durante a exposição de fungos no licor negro e no tratamento térmico para a esterilização. Na literatura, raros são os trabalhos que estudam a estrutura da lignina por esta técnica.

Vainio et al. (2004) realizaram estudos sobre a estrutura da lignina, onde conseguiram identificar com relativa acurácia a dimensão fractal de ligninas sólidas, enquanto que o raio de giro da lignina se mostrou em formato alongado, quando em solução de NaOH. Os autores verificaram que o tamanho das partículas em solução tem aproximadamente o mesmo tamanho dos poros nos agregados fractais quando a lignina está sólida. Em outro estudo, Vainio et al. (2008) investigaram características reológicas de lignosulfonatos em solução alcalina, indicando que a lignina possuía forma compacta, cuja propriedade contribui à viscosidade.

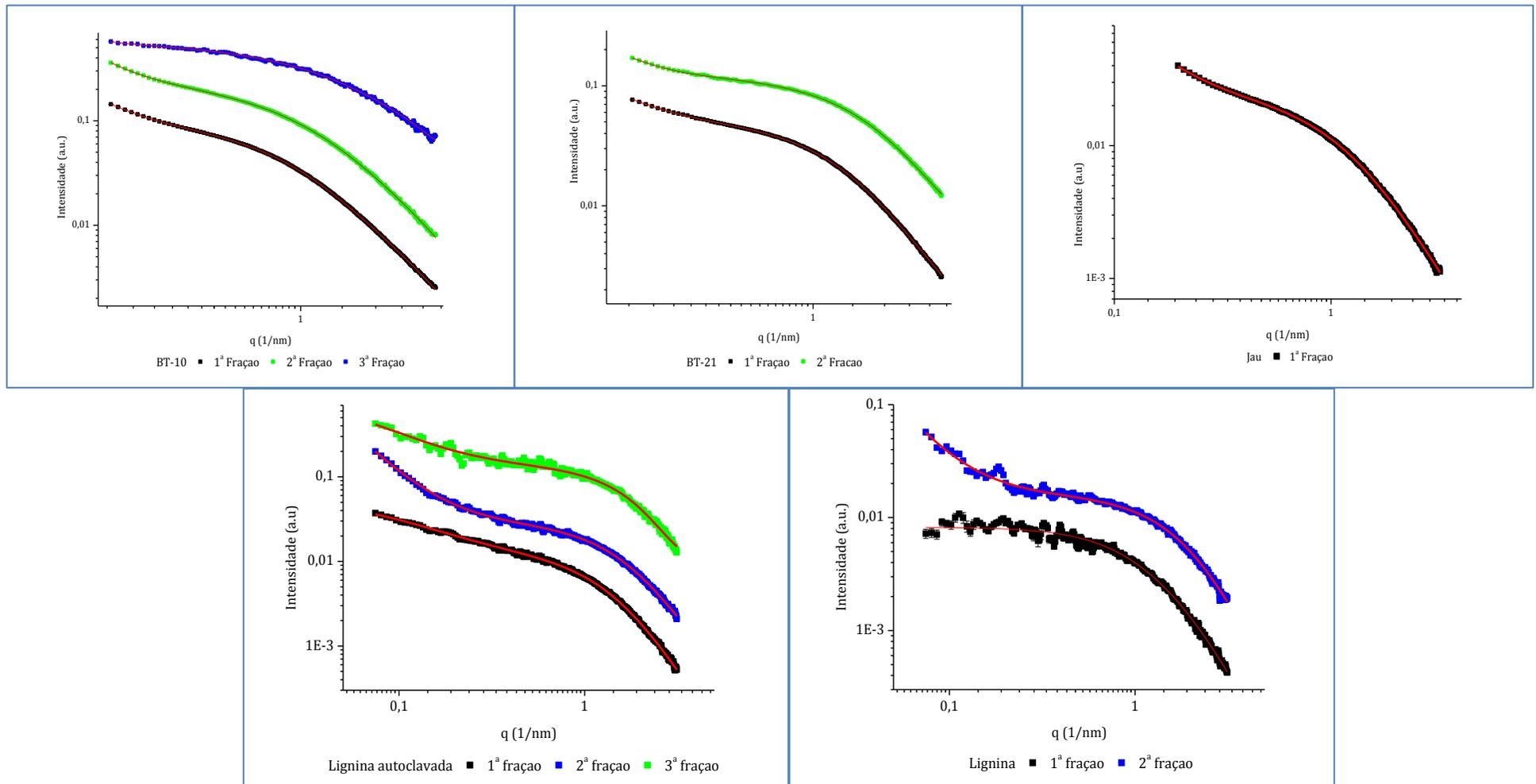


Figura 19 - Curvas de espalhamento obtidas experimentalmente de frações de ligninas biodegradadas pelos fungos *Trametes villosa* (BT-10), *Pleurotus* sp. (BT-21), e *Pycnoporus sanguineus* (Jau-3), e de ligninas não biodegradadas, autoclavada e não autoclavada, após a cromatografia de gel filtração

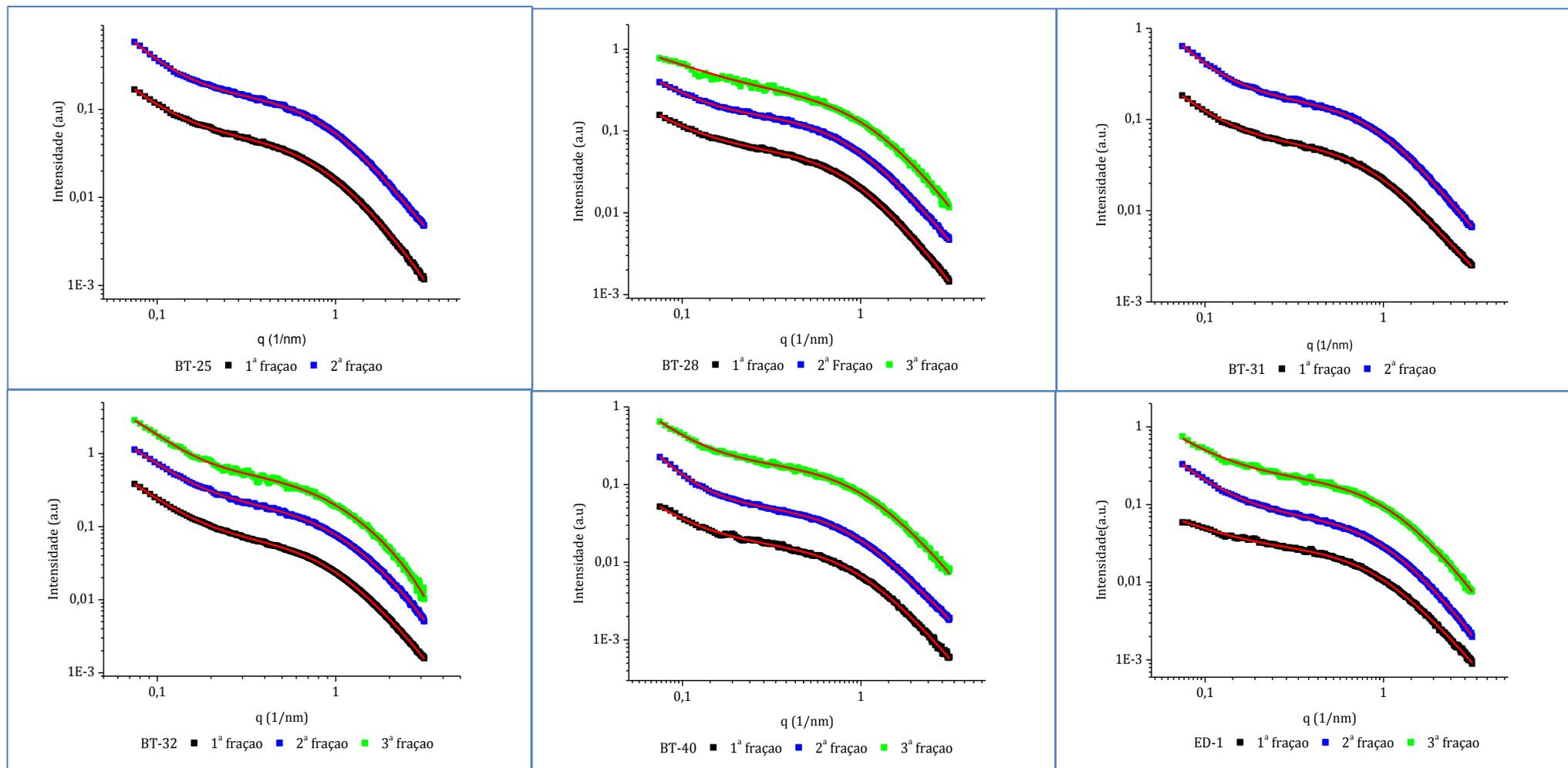


Figura 20 - Curvas de espalhamento obtidas experimentalmente de frações de ligninas biodegradadas pelos fungos *Pleurotus djamor* (BT-25), *Flammulina velutipes* (BT-28), *Pleurotus sapidus* (BT-31), *Pleurotus* sp. (BT-32), *Trametes villosa* (BT-40) e *Pleurotus* sp. (ED-1), após a cromatografia de gel filtração

5.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho

Na Figura 21, encontram-se os espectros de ligninas biodegradadas por oito espécies de fungos. Na Figura 22, encontram-se os espectros de ligninas de duas concentrações de licor negro biodegradado por *P. sanguineus*, e obtidas em diferentes períodos. Na Tabela 20 encontram-se atribuições aos picos de absorção do infravermelho em ligninas.

Conforme ilustrado na Figura 21, as bandas de absorção dos espectros das frações de lignina dos tratamentos com BT-25, BT-27, BT-28 parecem ser similares ao espectro da lignina não autoclavada região 3400 cm^{-1} , que correspondente à presença de grupos hidroxílicos. Na região 1600 cm^{-1} , observa-se redução de picos de absorção nas amostras dos tratamentos com ED-1, BT-28 e BT-40 que correspondem a vibrações nos anéis aromáticos C=O. A região 1200 cm^{-1} corresponde à presença de guaiacila, detectada com menor absorção na lignina do tratamento com o isolado BT-31.

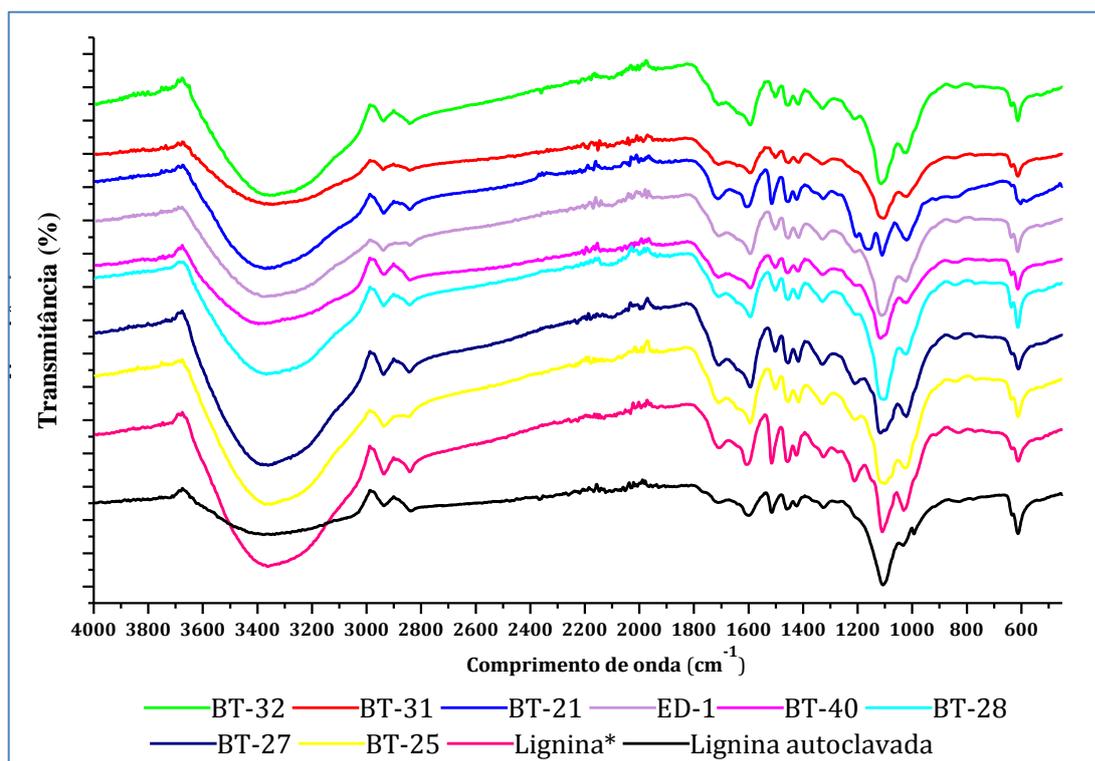


Figura 21 - Comparação de espectros da região do infravermelho (FTIR/ATR), de ligninas recuperadas de licor negro na concentração 10%, biodegradado por oito espécies de fungos, e de ligninas não biodegradadas, não autoclavada* e autoclavada.

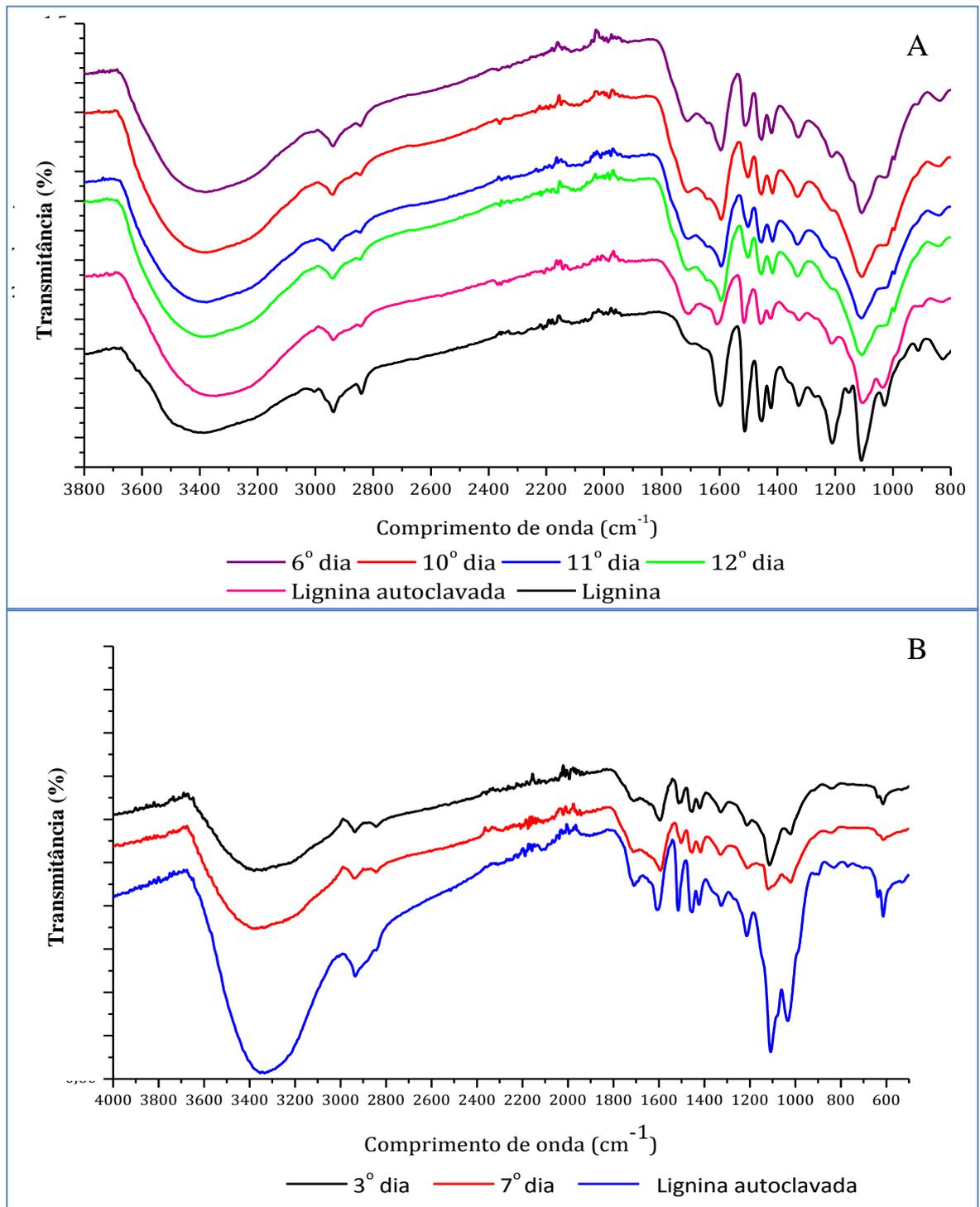


Figura 22 - Comparação de espectros da região do infravermelho (FTIR/ATR), de ligninas recuperadas de licor negro nas concentrações 15% (A) e 10% (B), biodegradado por *Pycnoporus sanguineus* (Jau-3) e de ligninas não biodegradadas, autoclavada e não autoclavada.

Tabela 20 – Principais atribuições dos picos de absorção do infravermelho em ligninas.

| Intensidade (cm ⁻¹) | Assinatura das ligações |
|---------------------------------|---|
| 2800 - 3000 | Alongamento de ligações C-H |
| 1703 - 1718 | Alongamento de C=O não conjugados |
| 1604 - 1596 | Vibrações de alongamento C-C no esqueleto aromático |
| 1660 - 1640 | Vibrações de anéis aromáticos, alongamentos C=O |
| 1595 e 1505 | Vibrações de anéis aromáticos em lignina |
| 1513 - 1507 | Vibrações de alongamento C-C no esqueleto aromático |
| 1458 - 1456 | C-H deformações nos grupos metil e metileno |
| 1375 | C-H deformações em polissacarídeos |
| 1260 | C-O vibrações em guaiacila |
| 1215 - 1208 | Alongamento em C-C, C-O, e C=O |
| 1127 - 1109 | Deformação aromática C-H no anel siringuila |
| 1047 - 1031 | Deformação em C-H aromático |
| 897 | Deformações em ligações C-H |

Tabela adaptada de GOUVEIA et al. (2012).

A comparação dos espectros das ligninas não autoclavada e autoclavada, na Figura 21 e 22, exhibe mudanças estruturais causadas pela autoclavagem. Entretanto, ao comparar o espectro da lignina autoclavada com a lignina não autoclavada verifica-se que algumas bandas “reaparecem” ou têm diferentes intensidades. Da mesma forma, os espectros das ligninas biodegradadas também apresentam modificações, principalmente nos comprimentos de onda 1000 cm⁻¹, 1200 cm⁻¹ e 1600 cm⁻¹. Essas regiões indicam deformações na estrutura aromática, e alongamento de ligações C-C, C-O e grupos carbonila (C=O). A presença deste último grupo pode aumentar através de reações mediadas por lacases (LAI et al., 2013).

Os resultados obtidos indicam que o fungo *P. sanguineus* modificou a lignina principalmente na região que corresponde aos anéis aromáticos. Contudo, verifica-se que essas mudanças ocorreram em maior extensão na lignina proveniente do licor negro na concentração 10%, biodegradado pelo fungo. Por outro lado, para o fungo modificar em maior extensão a lignina proveniente do licor na concentração 15%, seria necessário prolongar o período de exposição.

De acordo com os resultados aqui obtidos e também em estudos anteriores (NEGRÃO et al., 2015), o tempo de exposição é um parâmetro muito importante a ser considerado, porque eventos de condensação e polimerização podem acontecer em intervalos muito

pequenos. A mesma conclusão também tem sido interpretada por outros autores (GOUVEIA et al., 2012; ROCHA et al., 2014).

Em relação às análises de componentes principais (PCA), para o ensaio de biodegradação do licor com fungos, estudou-se apenas o primeiro componente principal (prin1), que acumulou, no mínimo, 93% da variância. Para o ensaio com licor 15%, biodegradado por *P. sanguineus*, o primeiro (prin1) e segundo componente principal (prin2) foram estudados pelo fato de haver mais um fator de estudo, que foi o tempo.

Análises de componentes principais (PCA), referentes aos espectros de FTIR das absorvâncias das ligninas degradadas por nove espécies de fungos foram realizadas dividindo-se o espectro total ($400\text{-}3997\text{ cm}^{-1}$) em cinco grupos, possibilitando maior entendimento das modificações que ocorreram na lignina e quais espécies acarretaram maiores modificações no polímero. A divisão dos grupos foi feita como segue: **1)** $400\text{ a }700\text{ cm}^{-1}$; **2)** $800\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$; **3)** $1000\text{ a }1500\text{ cm}^{-1}$; **4)** $1600\text{ a }2000\text{ cm}^{-1}$; **5)** $3000\text{ a }3500\text{ cm}^{-1}$.

Os detalhes das proporções de variância referentes aos autovalores e valores dos componentes principais prin1 dos espectros de lignina biodegradada por fungos estão no Apêndice C; médias, desvio padrão e comparação de médias estão descritos no Apêndice D.

A Figura 23 ilustra a análise do primeiro componente principal dos espectros de ligninas biodegradadas por fungos do comprimento de onda $400\text{ a }3997\text{ cm}^{-1}$. Verifica-se que a maioria dos tratamentos permanecem agrupados, com exceção dos tratamentos com *P. sanguineus* e pH 3,0. Contudo, baseando-se análise estatística das médias, tem-se a formação de seis subgrupos, sendo o mais numeroso aquele que inclui os espectros de ligninas biodegradadas pelos isolados BT-21, BT-27, BT-28, BT-32 e tratamento controle.

Para melhor entendimento dos resultados, preparou-se a Figura 24 com as médias do prin1 e a diferença significativa entre os tratamentos, dentro dos subgrupos formados em cada banda (dados numéricos no Apêndice D). Números negativos podem ocorrer porque são combinações lineares das reflectâncias.

No grupo 2 a região mais importante é próxima a 900 cm^{-1} , cujo comprimento de onde que informa sobre deformações em ligações C-H. O grupo 3 (Figura 24 D) compreende a banda entre $1000\text{ e }1500\text{ cm}^{-1}$, referindo-se à estrutura aromática da lignina, presença de carboidratos e grupos metil. Os tratamentos que receberam os fungos BT-31 (*P. sapidus*) e Jau-3 (*P. sanguineus*) diferem entre si e dos demais tratamentos. Essa modificação pode ser observada na Figura 21, pela deformação dos picos na região $1100, 1400\text{ e }1500\text{ cm}^{-1}$.

A Figura 24 E ilustra as diferenças estatísticas que ocorrem na banda entre 1600-2000 cm^{-1} . O tratamento que recebeu o fungo Jau-3 (*P. sanguineus*) novamente se diferencia estatisticamente dos demais tratamentos. Essa região corresponde à presença de vibrações do esqueleto aromático (1600 cm^{-1}), e grupos carbonila e ligações ésteres (WANG; CHEN et al., 201).

A região de banda entre 3000 a 3500 cm^{-1} (Figura 24 F) indica a presença de grupos hidroxila (ZHAO et al., 2008). Nessa região, encontram-se estatisticamente diferentes os espectros da lignina biodegradada pela espécie Jau-3 (*P. sanguineus*).

Os detalhes das proporções de variância referentes aos autovalores e valores dos componentes principais prin1 e prin2 dos espectros de lignina recuperada de licor negro na concentração 15%, biodegradado por *P. sanguineus* estão no Apêndice E; as médias, desvio padrão e comparação de médias estão descritos no Apêndice F a K, cujos valores numéricos foram utilizados para construir a Figura 25.

É aceito que, para reunir a variância dos resultados em apenas um componente principal, este deve incorporar no mínimo 93% da variância. De acordo com os resultados apresentados no Apêndice E, as bandas que correspondem ao espectro total entre 400-3997 cm^{-1} e o grupo 3 não incorporam a variância mínima de 93% e, portanto, apresentam-se os resultados do prin2.

Na Figura 25, observam-se diferenças estatísticas entre os dias de avaliação dentro de cada tratamento, mas não ocorre diferença estatística significativa entre os tratamentos com fungo e sem fungo. Diferença significativa só foi encontrada no 10º dia de avaliação, na região entre 1000 e 1500 cm^{-1} , que corresponde a vibrações do esqueleto aromático. Possivelmente, neste dia, o fungo conseguiu acessar a lignina para assimilação, quando também foi detectada maior atividade da enzima manganês peroxidase, embora menores atividades da lacase e peroxidase também tenham sido detectadas. Essa observação conduz que existe a relação entre a atividade de uma determinada enzima ligninolítica e a modificação da molécula de lignina, situação que merece ser estudada com maior profundidade e rigor.

As enzimas ligninolíticas produzidas por fungos basidiomicetos podem modificar a lignina em diferentes formas. Ligninas polimerizadas por lacases podem apresentar maiores quantidades de ligações carbonila (C=O) e maiores intensidades de absorção na região de vibração de anéis aromáticos (GOUVEIA et al., 2012; LAI et al., 2013). Entretanto, grupos carbonila são típicos de impurezas na lignina ou umidade (MATTINEN et al., 2008), e outros

grupos funcionais também podem ser detectados como novos picos no espectro FTIR, como as carboxilas (GENG; LI, 2002).

As análises de PCA dos números de onda obtidas de ligninas recuperadas de licor negro na concentração 15%, e inoculado com *P. sanguineus* mostraram que não houve modificação relevante da lignina. Essa situação pode ser resultante da elevada concentração de licor negro, curto período de exposição e baixa quantidade de dextrose (5 g L^{-1}). Quando o mesmo fungo foi cultivado em licor na concentração 10% e com maior quantidade de açúcar (10 g L^{-1}) observaram-se mudanças na estrutura química da lignina.

Além da modificação química da lignina propriamente dita, os metabólitos produzidos durante o crescimento do fungo podem se ligar aos compostos gerados após a degradação da lignina, cuja absorvância pode ser igual da lignina. Nesse sentido, mais investigações devem ser feitas para elucidar essas lacunas do conhecimento sobre biodegradação da lignina.

A partir do exposto, investigações podem ser sugeridas variando alguns parâmetros, tais como concentração de inóculo, do licor e de açúcar, como elementos fatoriais.

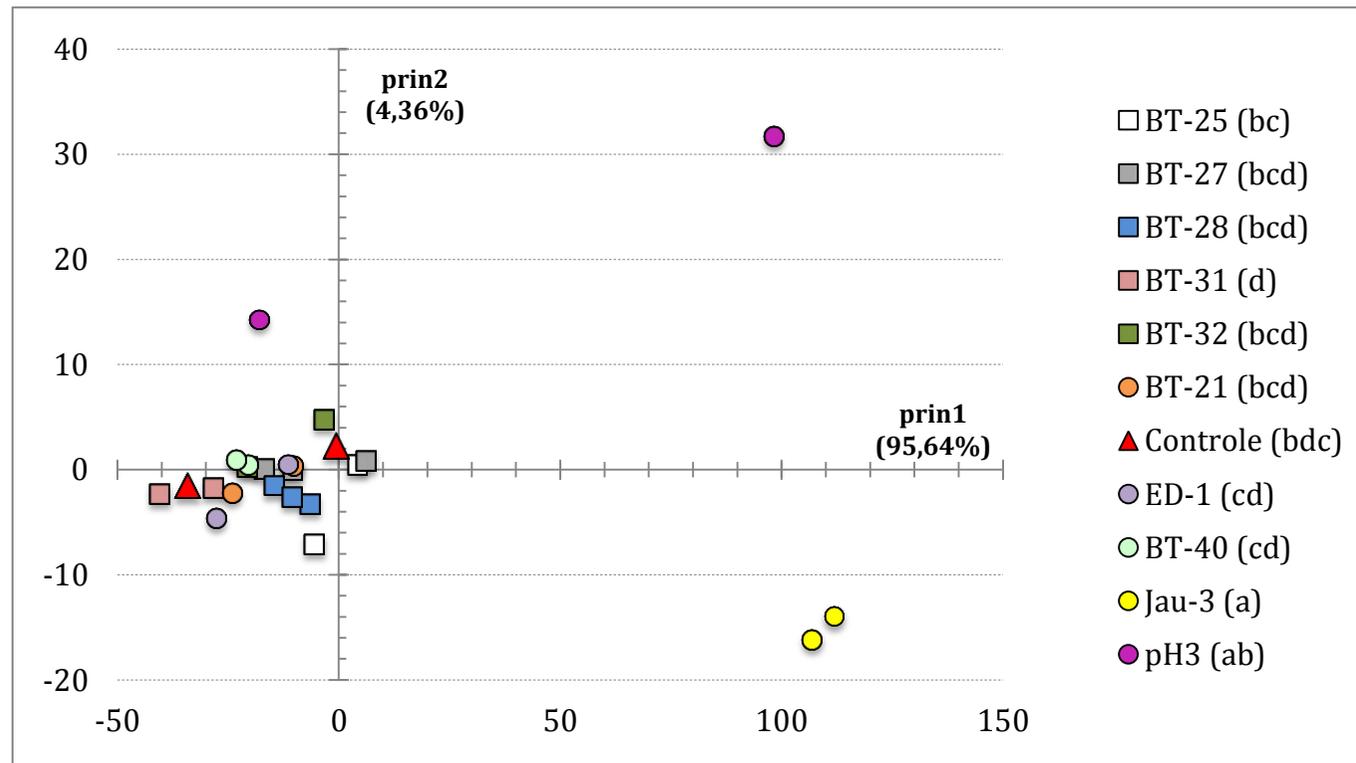


Figura 23 - Análises de componentes principais dos números de onda para a banda 400 a 3997 cm^{-1} referente ao espectro de FTIR das absorvâncias das amostras de lignina recuperada de licor negro (concentração 10%) biodegradado por nove espécies de fungos basidiomicetos. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey-Kramer

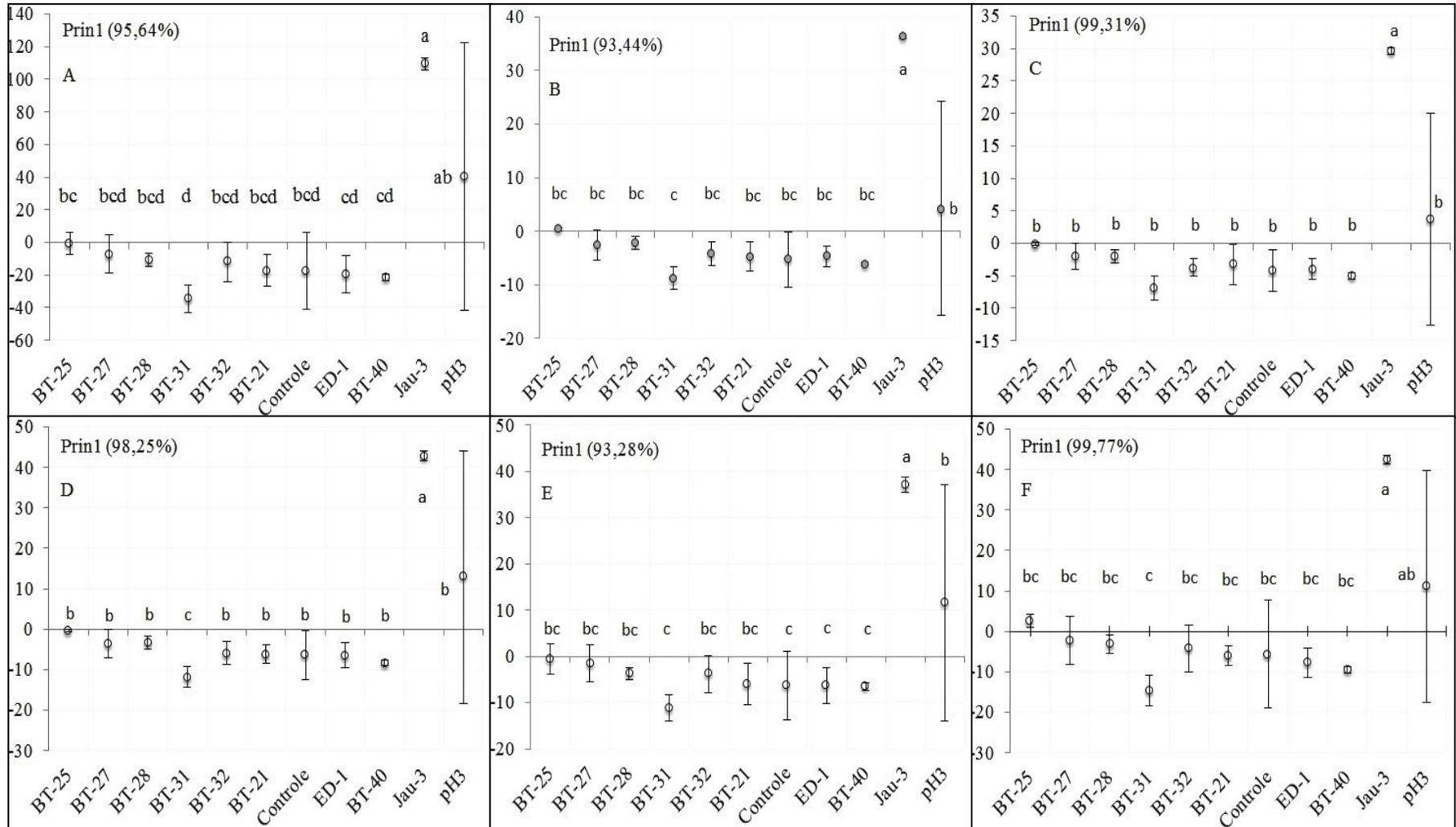


Figura 24 - Valores médios do primeiro componente principal (prin1) dos números de onda de ligninas recuperadas de licor negro biodegradado (concentração 10%), por espécies de fungos basidiomicetos, após 14 dias de incubação, referentes a seis grupos de bandas. As letras maiúsculas correspondem às divisões de bandas analisadas por PCA: A= banda 351 a 3997 cm^{-1} ; B = 400 a 700 cm^{-1} ; C = 800 a 1000 cm^{-1} ; D = 1000 a 1500 cm^{-1} ; E = 1600 a 2000 cm^{-1} ; F = 3000 a 3500 cm^{-1} . Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey-Kramer

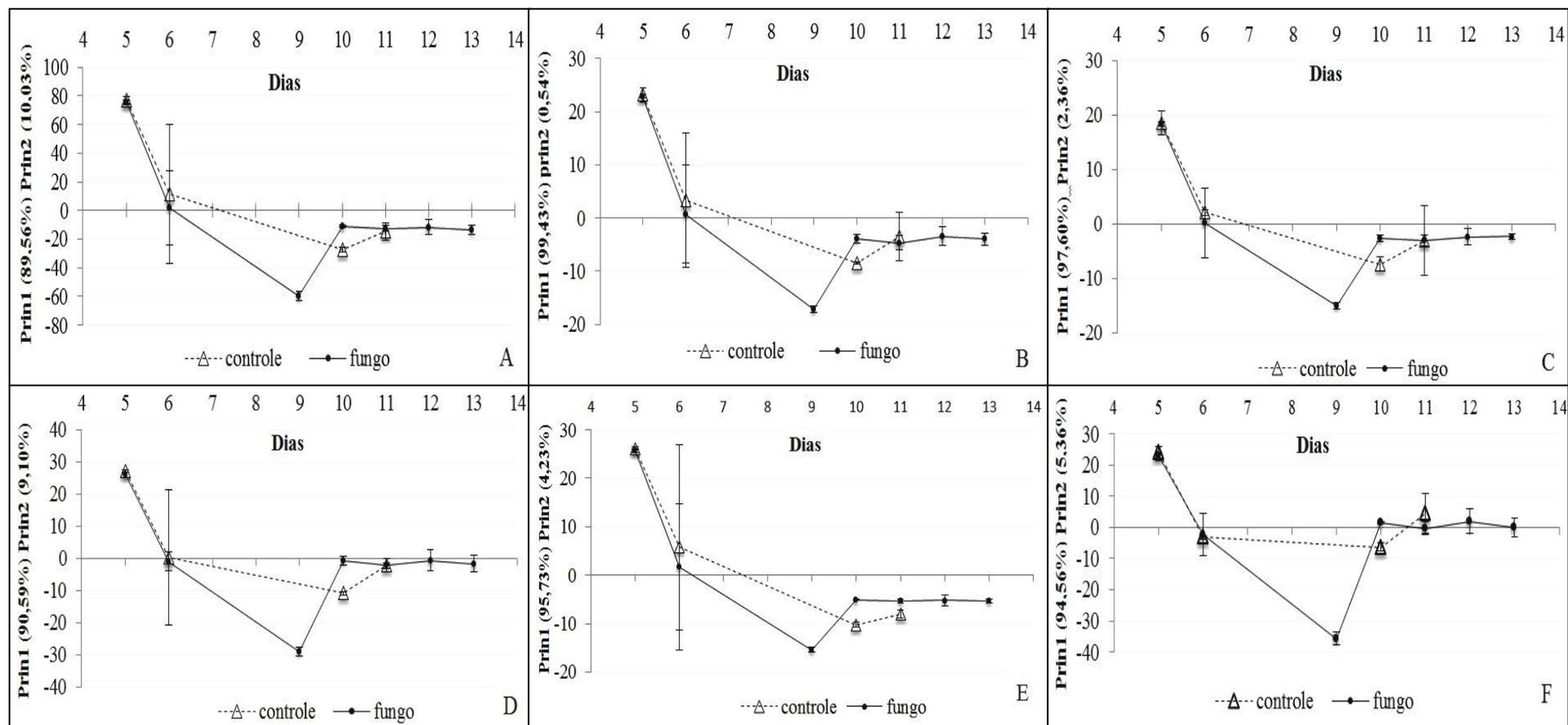


Figura 25 - Valores médios do primeiro (prin1) e segundo (prin2) componentes principais dos números de onda obtidos por FTIR/ATR de ligninas recuperadas de licor negro biodegradado (concentração 15%) por *Pycnoporus sanguineus* (Jau-3), após 14 dias de incubação. As letras correspondem às divisões de bandas analisadas por PCA: A= banda 400 a 3997 cm^{-1} ; B = 400 a 700 cm^{-1} ; C = 800 a 1000 cm^{-1} ; D = 1000 a 1500 cm^{-1} ; E = 1600 a 2000 cm^{-1} ; F = 3000 a 3500 cm^{-1} . Os valores médios dos componentes principais e a comparação de médias feita pelo teste de Tukey-Kramer estão disponível nos Apêndices E à K

6 CONCLUSÕES

Neste estudo, fungos basidiomicetos foram expostos ao licor negro, em duas concentrações, visando à fragmentação e/ou modificações da estrutura da lignina. Com base nos resultados, conclui-se que:

- Modificações estruturais da lignina podem ocorrer durante a biodegradação do licor negro mediada por fungos. Entretanto, essas modificações variam com as espécies de fungos utilizadas, sendo que as mesmas não se desenvolveram em concentrações de licor negro acima de 15%.
- A redução da massa molecular da lignina, mediada por enzimas ligninolíticas, pode ocorrer nos estágios iniciais de biodegradação do licor negro. Contudo, eventos de condensação e repolimerização atuam sobre a lignina e seus derivados, que podem sofrer, eventualmente, o aumento da massa molecular da macromolécula.
- Reações que reduzem ou contribuem para o aumento da massa molecular da lignina podem ocorrer em pequenos intervalos de tempo.

REFERÊNCIAS

ABÄCHERLI, A.; DOPPENBERG, F. **Method for preparing alkaline solutions containing aromatic polymers**. US6239198 B1, 20 Mar. 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR 12.713**: ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 2004. 16 p.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. 869 p.

ALONSO, S. K. et al. Isolamento e seleção de fungos causadores de podridão branca da madeira em florestas de *Eucalyptus* sp. com potencial de degradação de cepas e raízes. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 1, p. 145-155, 2007.

ARUN, A.; EYINI, M. Comparative studies on lignin and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by basidiomycetes fungi. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 102, n. 17, p. 8063-8070, 2011.

AZADI, P. et al. Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 21, n. 3, p. 506-523, 2013.

BARRAT, R. W.; JOHNSON, G. B.; OGATA, W. N. Wild type and mutants stocks of *Aspergillus nidulan*. **Genetics**, Bethesda, v. 52, n. 1, p. 233-246, 1965.

BENTIVENGA, G. et al. Singlet oxygen degradation of lignin: a GC-MS study on the residual products of the singlet oxygen degradation of a steam exploded lignin from beech. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Amsterdam, v. 128, p. 139-143, 1999.

BLANCHETTE, R. A. Screening wood decayed by white rot fungi for preferential ligninolytic degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 48, n. 3, p. 647-653, 1984.

BLANCHETTE, R. A. Delignification by wood-decay fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p. 381-398, 1991.

BLANCHETTE, R. A. Degradation of lignocellulose complex in wood. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, n. 1, p. 999-1010, 1995.

BLANCHETTE, R. A. A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Amsterdam, v. 46, p. 189-204, 2000.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 519-546, 2003.

BRISCHKE, C.; RAPP, A. O. Influence of wood moisture content and wood temperature on fungal decay in the field: observations in different micro-climates. **Wood Science and Technology**, New York, v. 42, p. 663-677, 2008.

CARDOSO, M. et al. Chemical composition and physical properties of black liquors and their effects on liquor recovery operation in Brazilian pulp mills. **Fuel**, Amsterdam, v. 88, p. 756-763, 2009.

CARVALHO, W. et al. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of the molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 3, p. 1-30, 1993.

CARVALHO, W. et al. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.

CASTELLANI, A. The “water cultivation” of pathogenic fungi. **Annales de la Societe Belge de Medicine Tropicale**, Antwerpen, Belgium, v. 44, n. 2, p. 217-220, 1964.

CERRUTTI, B. M. et al. Carboxymethyl lignin as stabilizing agent in aqueous ceramic suspensions. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 108-115, 2012.

CHANDRA, R.; ABHISHEK, A. Bacterial decolorization of black liquor in axenic and mixed condition and characterization of metabolites. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 22, n. 3, p. 603-611, 2011.

CHANDRA, R.; ABHISHEK, A.; SANKHWAR, M. Bacterial decolorization and detoxification of black liquor from rayon grade pulp manufacturing paper industry and detection of their metabolic products. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 102, n. 11, p. 6429-6436, 2011.

CHEN, Y. et al. Kraft lignin biodegradation by *Novosphingobium* sp. B-7 and analysis of the degradation process. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 123, p. 682-685, 2012.

COSTA, C. R.; OLIVI, P. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CRAWFORD, R. L.; ROBBINSON, L. E.; CHEH, A. M. ¹⁴C-labeled lignins as substrates for the study of lignin biodegradation and transformation. In: KIRK, T. K.; HIGUCHI, T.; CHANG, H.-M. (Ed.). **Lignin biodegradation: microbiology, chemistry, and potential applications**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1980. v.1, cap. 3, p. 61-76.

CUADROS-INOSTROZA, A. et al. TargetSearch - a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. **BMC Bioinformatics**, London, v. 10, p. 428, 2009.

DA RE, V.; PAPINUTTI, L. Black liquor decolorization by selected white-rot fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 165, p. 406-415, 2011.

DALSENTER, F. D. et al. A mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of microbial growth in solid-state culture. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 40, p. 801-807, 2005.

DASHTBAN, M. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Madinson, v. 1, p. 36-50, 2010.

DAVIS, J. R.; SELLO, J. K. Regulation of genes in *Streptomyces* bacteria required for catabolism of lignin-derived aromatic compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 86, n. 3, p. 921-929, 2010.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Toxicidade de resíduos têxteis tratados por microrganismos. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Itajaí, v. 1, n. 1, p. 63-66, 2006.

DENCE, C. W.; LIN, S. Y. Introduction. In: LIN, S. Y.; DENCE, C. W. (Ed.). **Methods in lignin chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. cap. 1.

DONNELLY, D. P.; BODDY, L. Development of mycelial systems of *Stropharia caerulea* and *Phanerochaete velutina* on soil: effect of temperature and water potential. **Mycological Research**, Manchester, v. 101, n. 6, p. 705-713, 1997.

DYER, T. J. **Elucidating the formation and chemistry of chromophores during kraft pulping**. 2004. 635 f. Thesis (Doctor) - Institute of Paper Science and Technology, University of Wisconsin, Stevens Point, Atlanta. 2004.

DYK, J. S. V.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, 2012.

EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. **Manual teórico-prático de cogumelos comestíveis**. Botucatu: FEPAF, 1997. 115 p.

ELISAHVILI, V.; KACHLISHVILI. Physiological regulation of lacase and manganese peroxidase production by white-rot *Basidiomycetes*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 144, n. 1, p. 37-42, 2009.

ERIKSSON, K.-E. L.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**. Berlin: Springer, 1990. 407 p.

FARAVELLI, T. et al. Detailed kinetic modelling of the thermal degradation of lignins. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 34, p. 290-301, 2010.

FENGEL, D.; WENEGER, G. **Wood chemistry: Ultrastructure: Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter. 1989.

FERREIRA, L. F. R. et al. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 132-137, 2011.

FONSECA, M. I. et al. Decolorization of Kraft liquor effluents and biochemical characterization of lacases from *Phlebia brevispora* BAFC 633. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Amsterdam, v. 104, p. 443-451, 2015.

FREUDENBERG, K. Biosynthesis and constitution of lignin. **Nature**, London, v. 183, p. 1152-1155, 1959.

FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Espectros de duas formas de lignina obtidos por ressonância magnética nuclear. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n.4, p. 505-511, 2003.

GADD, G. M. Metals and microorganisms: A problem of definition. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 100, p. 197-203, 1992.

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

GIAVALISCO, P. et al. Elemental formula annotation of polar and lipophilic metabolites using (13)C, (15)N and (34)S isotope labelling, in combination with high- resolution mass spectrometry. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 68, n. 2, p. 364-376, 2011.

GLATTER, O.; KRATKY, O. **Small Angle X-ray Scattering**. London: Academic Press, 1982.

GLEN, J. K.; AKILESWARAN, L.; GOLD, M. H. Mn (II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 251, p. 688-696, 1986.

GONÇALVES, A. R.; BENAR, P. Hydroxymethylation and oxidation of organosolv lignins and utilization of the products. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 79, n. 2, p. 103-111, 2001.

GOSELINK, R. J. A.; ABACHERLI, A.; SEMKE, H.; MALHERBE, R.; KAUPER, P.; NADIF, A.; Van DAMA, J. E. G. Analytical protocols for characterization of sulphur-free lignin. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 271-281, 2004.

GOSELINK, R. A. et al. Lignin depolymerisation in supercritical carbon dioxide/acetone/water fluid for the production of aromatic chemicals. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 106, p. 173-177, 2012.

GRASER, Y. et al. Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. **Medical Mycology**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 315-330, 1999.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2. ed. New York: Wiley-Liss, 1993. 458 p.

GRIMA-PETTENATI, J. et al. Transcriptional regulation of the lignin biosynthetic pathways revisited: new players and insights. **Advances in Botanical Research**, v. 61, p.173-218, 2012.

GUIRAUD, P. et al. Comparison of the toxicity of various lignin-related phenolic compounds toward selected fungi perfecti and fungi imperfecti. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 29-33, 1995.

HAMMERSLEY, A. P. **FIT 2D**: An introduction and overview. Grenoble: The European Synchrotron Radiation Facility, 1997. (ESRF Internal Report).

HARRINGTON, M. J. et al. Molecular biology of lignification in grasses. **Advances in Botanical Research**, London, v. 61, p. 77-112, 2012.

HARVEY, P. J.; THURSTON, C. F. Biochemistry of ligninolytic fungi. In: GADD, G. M. **Fungi in bioremediation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. 497 p.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi – production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 13, n. 2-3, p. 125-135, 1994.

HATAKKA, A.; HAMMEL, K. E. Fungal biodegradation of lignocelluloses. In: HOFRICHTER, M. (Ed.). **The Mycota X**. 2. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2010. p. 319-340. (Industrial Applications, 10).

HIGASHI, R. et al. A polar high molecular mass constituent of bleached kraft mill effluents is toxic to marine organisms. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 26, n. 12, p. 2313-2420, 1992.

HIGUCHI, T. Lignin structure and morphological distribution in plant cell walls. In: KIRK, T. K.; HIGUCHI, T.; CHANG, H.-M. (Ed.). **Lignin biodegradation: microbiology, chemistry and potential applications**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1981. v. 1, 241 p.

HOA, D. T.; MAN, T. D. Study on treatment of alkaline black liquor using sulphate reducing bacteria. **Advances in Natural Sciences**, Hanoi, v. 7, n. 2, p. 139-144, 2006.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 30, n. 4, p. 454-466, 2002.

HUTTERMANN, A.; MAI, C.; KHAZARIPOUR, A. Modification of lignin for the production of new compounded materials, **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 55, n. 4, p. 387-394, 2001.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. 6. ed. New York: Prentice-Hall, 2007.

KAVANAGH, K. Fungal fermentations systems and products. In: KAVANAGH, K. (Ed.). **Fungi: biology and applications**. 2. ed. Hoboken: Wiley, 2011. cap. 5, p. 125-146.

KIRKER, G. T. et al. The role of extractives in naturally durable wood species. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Amsterdam, v. 82, p. 53-58, 2013.

KLEIN, D. A.; PASCHKE, M. W. Filamentous fungi: the indeterminate lifestyle and microbial ecology. **Microbial Ecology**, New York, v. 47, n. 3, p. 224-235, 2004.

- KLEIN-MARCUSCHAMER, D. et al. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 109, n. 4, p. 1083-1087, 2012.
- KOGA, M. E. T. Matérias-primas fibrosas. In: PHILIPP, P.; D'ALMEIDA, M. L. O. (Org.). **Celulose e papel** – tecnologia da fabricação da pasta celulósica. 2. ed. São Paulo: IPT/SENAI, 1988. v. 1, p. 15-40.
- KOHLBRECHER, J.; BRESSLER, I. **Software package SASfit for fitting small-angle scattering curves**. Villigen PSI, Switzerland: Paul Scherrer Institut, 2006. Disponível em: <https://www.psi.ch/sinq/sansi/sasfit>.
- KONAREV, V. et al. PRIMUS - a Windows-PC based system for small-angle scattering data analysis. **Journal Applied of Crystallography**, Chester, v. 36, p. 1277-1282, 2003.
- KÜES, U., LIU, Y. Fruiting body production in basidiomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 54, p. 141-152, 2000.
- KUWAHARA, M. et al. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 169, n. 2, p. 247-250, 1984.
- LAI, C. et al. Effect of ABTS on the adsorption of *Trametes versicolor* lacase on alkali lignin. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Amsterdam, v. 82, p. 180-186, 2013.
- LARA, M. A. et al. Black liquor lignin biodegradation by *Trametes elegans*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Amsterdam, v. 52, n. 3, p. 167-173, 2003.
- LEWIS, N. G.; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 455,496, 1990.
- LI, M.-F. et al. Sequential solvent fractionation of heterogeneous bamboo organosolv lignin for value-added application. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v. 101, p. 18-25, 2012.
- LIN, M. Y. et al. Universality of fractal aggregates as probed by light scattering. **Proceeding of the Royal Society**, London, v. 423, p. 71-87, 1989.
- LIN, S. Y.; DENCE, C. W. (Ed.). **Methods in lignin chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 578 p.
- LORA, J. H.; GLASSER, W. G. Recent industrial applications of lignin: a sustainable alternative to nonrenewable materials. **Journal of Polymers and Environment**, New York, v. 10, n.1-2, p. 39-48, 2002.
- MARTÍNEZ, A. T. Molecular biology and structure function of lignin-degrading heme peroxidases. **Enzyme Microbiology and Technology**, Amsterdam, v. 30, n. 4, p. 425-444, 2002.

MARTÍNEZ, A. T. et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, Barcelona, v. 8, p. 195-204, 2005.

MARTIRANI, L. et al. Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Water Research**, Amsterdam, v. 30, n. 8, p. 1914-1918, 1996.

MATINEN, M.-L. et al. Lignin polymerization by laccase. **BioResources**, Raleigh, v. 3, n. 2, p. 549-565, 2008.

MATSUHISA, K. et al. Anti-HCV effect of *Lentinula edodes* mycelia solid cultures extracts and low-molecular-weight lignin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 462, n. 1, p. 52-57, 2015.

MAZIERO, P. et al. Structural features of lignin obtained at different alkaline oxidation conditions from sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Production**, Amsterdam, v. 35, p. 61-69, 2012.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Estratégias de isolamento de microrganismos envolvidos na degradação de xenobióticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. p. 199-216.

MILCZAREK, G.; INGANÄS, O. Renewable cathode materials from biopolymer/conjugated polymer interpenetrating networks. **Science**, Washington, DC, v. 335, n. 6075, p. 1468-1471, 2012.

MIMMS, A. et al. (Ed.). **Kraft pulping**: a compilation of notes. 2. ed. Peachtree Corners, GA: TAPPI Press, 1993. 181 p.

MOLDES, D.; VIDAL, T. New possibilities of kraft pulp biobleaching with lacase and sulfonated mediators. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 46, p. 656-660, 2011.

MUNK, L. et al. Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 33, p. 13-24, 2015.

NYANHONGO, G.S. et al. Enzymatic polymer functionalisation: advances in laccase and peroxidase derived lignocellulose functional polymers. In: NYANHONGO, G.S.; STEINER, W.; GÜBITZ, G.M. (Ed.). **Biofunctionalization of polymers and their applications**. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Berlin: Springer-Verlag, 2011. v.125, p. 47-68.

NECOCHEA R., et al. Phylogenetic and biochemical characterisation of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. **FEMS Microbiology Letters**, Hoboken, v. 244: 235-241, 2005.

NERUD, F.; MISURCOVA, Z. Distribution of ligninolytic enzymes in selected white rot fungi. **Folia Microbiologica**, Amsterdam, v. 41, p. 264-266, 1996.

OKINO, L. K. et al. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 16, p. 889-893, 2000.

ORTEGA-CLEMENTE, A. Fungal post-treatment of pulp mill effluents for the removal of recalcitrant pollutants. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 100, p. 1885-1894, 2009.

ORTH, A. B.; ROYSE, D. J.; TIEN, M. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-decaying fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 59, n. 12, p. 4017-4023, 1993.

PAASIVIRTA, J. et al. Multivariate statistics of the pyrolysis products of high molecular components in pulping wastewater to explain their toxicity. **Environmental Science and Pollution Research**, New York, v. 12, n. 6, p.375-380, 2005.

PAIVA, J. M. F.; FROLLINI, E. Unmodified and modified surface sisal fibers as reinforcement of phenolic and lignophenolic matrices composites: thermal analyses of fibers and composites. **Macromolecular Materials and Engineering**, Weinheim, v. 291, n. 4, p. 405-417, 2006.

PANDEY, M. P.; KIM, C. S. Lignin depolymerization and conversion: a review of thermochemical methods. **Chemical Engineering and Technology**, Weinheim, v. 34, p. 29-41, 2011.

PÉRES, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, Barcelona, v. 5, p. 53-63, 2002.

PESSALA, P. et al. Evaluation of biodegradation of nonylphenol ethoxylate and lignin by combining toxicity assessment and chemical characterization. **Chemosphere**, Oxford, v. 75, p. 1506-1511, 2009.

PILATE, G.; DEJARDIN, A.; LEPLÉ, J.-C. Field trials with lignin-modified transgenic trees. **Advances in Botanical Research**, London, v. 61, p. 1-36, 2012.

PILÓ-VELOSO, D. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Química Nova**, São Paulo, v. 16, n. 5, p. 435-448, 1993.

PLAZA, P. et al. Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 94, n. 4, p. 549-554, 2003.

POLLEGIONI, L.; TONIN, F.; ROSINI, E. Lignin-degrading enzymes. **FEBS Journal**, Hoboken, v. 282, p. 1190-1213, 2015.

POUTEAU, C.; CATHALA, B.; DOLE, P.; KUREK, B.; MONTIES, B. Structural modification of Kraft lignin after acid treatment: characterization of the apolar extracts and influence on the antioxidant properties in polypropylene. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 101-108, 2005.

RAJ, A. et al. Biodegradation of kraft-lignin by *Bacillus* sp. isolated from sludge of pulp and paper mill. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 18, p. 783-792, 2007.

RAJ, A. et al. Identification of low molecular weight aromatic compounds by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) from kraft lignin degradation by three *Bacillus* sp. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Amsterdam, v. 59, p. 292-296, 2007.

RAQUEZ, J. M. et al. Thermosetting (bio) materials derived from renewable resources: A critical review. **Progress in Polymer Science**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 487-509, 2010.

RIBBONS, D. W. Chemicals from lignin. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, London, v. 321, p. 485-494, 1987.

ROESSNER, U. et al. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. **Plant Cell**, Baltimore, v. 13, n. 1, p. 11-29, 2001.

RUIZ-DUEÑAS, F. J.; MARTÍNEZ, A. T. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrante polymer is efficiently recycled in nature and how we can advantage of this. **Microbial Biotechnology**, Hoboken, v. 2, n. 2, p. 164-177, 2009.

SAAT, M. N. et al. Modeling of growth and lacase production by *Pycnoporus sanguineus*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin, v. 37, p. 765-775, 2014.

SALIBA, E. O. S. et al. Ligninas – métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 917-928, 2001.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SARKANEN, K. V.; HERGERT, H. L. Classification and distribution. In: SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C. H. (Ed.). **Lignins: occurrence, formation, structure and reactions**. New York: Wiley-Interscience, 1971. p. 43-94.

SCHUBERT, M.; MOURAD, S.; SCHAWARZE, F. Radial basis function neural networks for modelling growth rates of the basidiomycetes *Physisporinus vitreus* and *Neolentinus lepideus*. **Applied Microbial and Cell Physiology**, New York, v. 85, p. 703-712, 2010.

SENA-MARTINS, G.; ALMEIDA-VARA, E.; DUARTE, J. C. Eco-friendly new products from enzymatically modified industrial lignins. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 27, n. 2, p. 189-195, 2008.

SCHMIDT, P. W. Small-angle scattering studies of disordered, porous and fractal systems. **Journal of Applied Crystallography**, Copenhagen, v. 24, p. 414-435, 1991.

SHISHIR, P. S. et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass fo fuels and chemicals. **Annual Reviews of Chemical and Biomolecular Engineering**, Palo Alto, v. 2, p. 121-145, 2011.

SZKLARZ, G. et al. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, Lancaster, v. 81, n. 2, p. 234-240, 1989.

TIEN, M.; KIRK, K. Lignin-degrading enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. **Science**, Washington, DC, v. 221, p. 661-663, 1983.

TROTTIER, S.; BLAISE, C.; KUSUI, T; JOHNSON, E. M. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based Hydra attenuate assay. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 12, p. 265-271, 1997.

VESSECCHI, R. et al. Nomenclaturas e espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 10, p. 1875-1887, 2011.

VAINIO, U. et al. Morphology of dry lignins and size and shape of dissolved kraft lignin particles by x-ray scattering. **Langmuir**, Washington, DC, v. 20, p. 9736-9744, 2004.

VAINIO, U. et al. Small-angle x-ray scattering and rheological characterization of aqueous lignosulfonate solutions. **Langmuir**, Washington, DC, v. 24, p. 7735-7743, 2008.

WAGNER, A.; DONALDSON, L.; RALPH, J. Lignification and lignin manipulations in conifers. **Advances in Botanical Research**, London, v. 61, p. 37075, 2012.

WALKER, G.M .; WHITE, N. A. Introduction to fungal physiology. In: KAVANAGH, K. **Fungi: biology and applications**. 2. ed. Hoboken: Wiley, 2011. cap. 2, p. 1-35.

WANG, G.; CHEN, H. Fractionation and characterization of lignin from steam-exploded corn stalk by sequential dissolution in ethanol-water solvent. **Separation and Purification Technology**, New York, v. 120, p. 402-409, 2013.

WELLS, J. M.; BODDY, L. Effect of temperature on wood decay and translocation of soil-derived phosphorus in mycelial cord systems. **New Phytologist**, London, v. 129, p. 289-297, 1995.

WENG, J. K.; CHAPPLE, C. The origin and evolution of lignin biosynthesis. **The New Phytologist**, London, v. 187, p. 273-285, 2010.

WU, J.; XIAO, Y.; YU, H. Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 96, n. 12, p. 1357-1363, 2005.

XIONG, Z. et al. Application of brown-rot basidiomycete *Fomitopsis* sp. IMER2 for biological treatment of black liquor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 104, n. 6, p. 446-450, 2007.

YAROLOV, A. I. et al. Laccase: Properties, catalytic mechanism and applicability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 49, p. 257-280, 1994.

YOSHIKAWA, T. et al. Production of phenols from lignin via depolymerisation and catalytic cracking. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v. 108, p. 69-75, 2013.

ZAKZESKI, J. et al. The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. **Chemicals Reviews**, Washington, DC, v. 110, p. 3552-3599, 2010.

ZHAO, L. H. et al. Decolorization of cotton pulp black liquor by *Pleurotus ostreatus* in a bubble-column reactor. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 80, p. 44-48, 2008.

ZOU, L. et al. Fungal demethylation of Kraft lignin. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 73-74, p. 44-50, 2015.

APÊNDICES

Apêndice A - Quantificação de massa** de compostos gerados por fungos basidiomicetos após períodos de cultivo no licor negro e analisados por cromatografia em fase gasosa acoplado a detector de espectrômetro de massa (GC/MS)

| Composto | IR* | QM** | BT-31 | C1 | BT-40 | BT-10 | C2 | Jau-3 ³ | Jau-3 ³ | Jau-3 ⁴ | BT-21 |
|--|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|
| Lactato | 189530,0 | 117,0 | 15,80 | 15,60 | 15,90 | 16,50 | 17,50 | 17,50 | 17,60 | 15,70 | 16,71 |
| Glicolato | 207470,0 | 177,0 | 13,60 | 13,50 | 13,60 | 12,20 | 15,00 | 15,30 | 15,80 | 12,80 | 14,42 |
| Glicerol | 293000,0 | 117,0 | 12,60 | 13,20 | 11,90 | 13,50 | 13,50 | 13,10 | 13,10 | 12,80 | 13,47 |
| Glicina | 325680,0 | 174,0 | 8,10 | 9,40 | 8,80 | 9,30 | 9,70 | 9,00 | 9,80 | 9,80 | 10,19 |
| Ortofosfato | 333340,0 | 299,0 | 13,80 | 13,10 | 14,30 | 15,00 | 14,50 | 14,50 | 14,30 | 14,90 | 13,62 |
| Benzoato | 348140,0 | 105,0 | 12,40 | 12,10 | 12,90 | 13,60 | 13,40 | 13,20 | 13,20 | 12,70 | 13,76 |
| C ₄ H ₄ O ₄ ^c | 372020,0 | 245,0 | 10,00 | 8,70 | 11,90 | 11,60 | 11,10 | 10,90 | 10,80 | 11,20 | 12,83 |
| Malato | 442310,0 | 233,0 | 11,00 | 10,60 | 11,90 | 12,40 | 12,50 | 12,70 | 12,80 | 12,10 | 12,20 |
| Asparagina | 550488,0 | 116,0 | 11,10 | 12,80 | 13,70 | 11,60 | 12,40 | 12,60 | 12,80 | 10,70 | 10,71 |
| Psicose | 573730,0 | 217,0 | 10,40 | 7,80 | 17,70 | 18,30 | 11,30 | 11,80 | 11,20 | 11,00 | 12,42 |
| C ₆ H ₁₂ O ₆ ^d | 586290,0 | 217,0 | 11,00 | 13,60 | 14,20 | 14,40 | 13,60 | 13,70 | 13,80 | 13,70 | 13,02 |
| C ₆ H ₁₂ O ₆ ^e | 587810,0 | 205,0 | 12,00 | 10,60 | 12,60 | 13,70 | 13,40 | 13,60 | 13,80 | 13,00 | 13,46 |
| Citrato | 593510,0 | 273,0 | 10,10 | 13,50 | 8,90 | 9,50 | 9,90 | 9,70 | 9,60 | 10,70 | 11,12 |
| Glicose | 599440,0 | 103,0 | 16,70 | 18,60 | 17,90 | NA | 17,70 | 17,90 | 17,50 | 18,80 | 17,96 |
| Pantotenato | 624765,0 | 117,0 | 15,90 | 14,90 | NA | NA | 9,70 | NA | NA | 11,90 | 11,86 |
| Ácido dehidroascórbico ^f | 625415,0 | 157,0 | 15,80 | 14,50 | 6,80 | NA | 9,10 | 10,20 | 10,00 | 12,50 | 12,35 |
| Ureidosuccinato | 627290,0 | 257,0 | 12,60 | 10,60 | 6,60 | NA | 6,90 | 7,10 | 7,40 | 8,00 | 8,08 |
| Gluconato ^h | 627390,0 | 333,0 | 18,30 | 16,30 | 7,60 | 7,60 | 10,10 | 11,20 | 11,10 | 13,60 | 13,51 |
| Estearato ⁱ | 771680,0 | 117,0 | 17,00 | 17,00 | 17,40 | 17,90 | 17,90 | 17,80 | 17,90 | 17,20 | 18,16 |
| Ácido octanóico | 839970,0 | 117,0 | 9,80 | 10,80 | 10,40 | 10,80 | 11,40 | 11,00 | 10,80 | 12,50 | 11,40 |

*Índice de retenção, C1 e C2: são amostras de licor não biodegradado obtidas durante os ensaios. Jau-3³ e Jau-3⁴ são amostras obtidas após 14 e 17 dias, respectivamente. A divisão por linhas negras corresponde a grupos formados pelo cluster hierárquico, pela nota de corte 2 (Figura 5)

Apêndice B - Quantificação de massa** de compostos gerados por fungos basidiomicetos após períodos de cultivo no licor negro e analisados por cromatografia em fase gasosa acoplado a detector de espectrômetro de massa (GC/MS)

| Composto | IR* | QM** | C3 | C4 | BT-25 | BT-31 | BT-27 | BT-28 | BT-32 | ED-1 |
|--|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Lactato | 189530,0 | 117,0 | 16,00 | 16,00 | 15,80 | 15,40 | 15,76 | 15,71 | 14,60 | 15,30 |
| Glicolato | 207470,0 | 177,0 | 13,60 | 13,50 | 13,20 | 12,90 | 13,32 | 13,49 | 12,40 | 13,00 |
| Glicerol | 293000,0 | 117,0 | 12,90 | 12,80 | 13,20 | 11,70 | 12,72 | 13,09 | 11,50 | 12,80 |
| Glicina | 325680,0 | 174,0 | 9,40 | 9,30 | 10,40 | 8,50 | 8,60 | 8,43 | 10,40 | 9,30 |
| Ortofosfato | 333340,0 | 299,0 | 13,20 | 13,40 | 13,10 | 13,90 | 13,90 | 13,26 | 15,50 | 14,40 |
| Benzoato | 348140,0 | 105,0 | 12,10 | 11,90 | 12,20 | 12,30 | 12,47 | 12,40 | 11,70 | 12,40 |
| C ₄ H ₄ O ₄ ^c | 372020,0 | 245,0 | 8,60 | 8,60 | 8,60 | 9,90 | 10,02 | 9,07 | 8,70 | 9,00 |
| Malato | 442310,0 | 233,0 | 11,10 | 11,00 | 10,80 | 11,00 | 11,28 | 11,17 | 13,00 | 11,50 |
| Asparagina (3TMS) | 550488,0 | 116,0 | 10,60 | 10,40 | 12,80 | 12,90 | 13,21 | 13,11 | 11,90 | 12,70 |
| Psicose | 573730,0 | 217,0 | 7,60 | 6,40 | 8,20 | 8,50 | 8,67 | 8,08 | 7,20 | 8,70 |
| C ₆ H ₁₂ O ₆ ^d | 586290,0 | 217,0 | 12,10 | 12,20 | 13,10 | 13,70 | 13,92 | 13,76 | 14,10 | 13,50 |
| C ₆ H ₁₂ O ₆ ^e | 587810,0 | 205,0 | 9,90 | 9,90 | 10,30 | 10,00 | 11,25 | 10,87 | 11,10 | 10,90 |
| Citrato | 593510,0 | 273,0 | 11,00 | 10,80 | 10,90 | NA | NA | 11,15 | NA | 10,90 |
| Glicose | 599440,0 | 103,0 | 19,00 | 19,10 | 19,00 | 19,10 | 19,00 | 19,02 | 18,40 | 19,00 |
| Pantotenato | 624765,0 | 117,0 | 8,60 | 8,60 | NA | 8,70 | 9,04 | 9,28 | NA | NA |
| Ácido dehidroascórbico ^f | 625415,0 | 157,0 | 6,50 | 7,40 | 7,70 | 7,40 | NA | NA | 8,30 | 8,20 |
| Ureidosuccinato | 627290,0 | 257,0 | 6,30 | 6,30 | NA | NA | NA | 5,71 | NA | 5,60 |
| Gluconato ^h | 627390,0 | 333,0 | 7,20 | 7,90 | 8,80 | 6,70 | 7,61 | 7,60 | 9,20 | 8,50 |
| Estearato ⁱ | 771680,0 | 117,0 | 16,90 | 16,70 | 17,00 | 16,80 | 16,98 | 16,96 | 16,10 | 17,00 |
| Ácido octanóico | 839970,0 | 117,0 | 9,50 | 9,50 | 10,60 | 9,80 | 10,17 | 9,89 | 15,60 | 13,10 |
| Sucrose | 841440,0 | 217,0 | 8,70 | 7,30 | 9,20 | 8,40 | 10,37 | NA | 17,60 | 14,70 |

*Índice de retenção, C1 e C2: são amostras de licor não biodegradado obtidas durante os ensaios. Jau-3³ e Jau-3⁴ são amostras obtidas após 14 e 17 dias, respectivamente. A divisão por linhas negras corresponde a grupos formados pelo cluster hierárquico, pela nota de corte 2 (Figura 5)

Apêndice C – Proporção da variância referente aos autovalores de ligninas biodegradadas por espécies de fungos

| Bandas (cm ⁻¹) | Componente principal | Proporção | Proporção acumulada |
|----------------------------|----------------------|-----------|---------------------|
| 400-3997 | Prin1 | 95,64 | 95,64 |
| | Prin2 | 4,36 | 100,00 |
| 400-700 | Prin1 | 99,45 | 99,45 |
| | Prin2 | 0,55 | 100,00 |
| 800-1000 | Prin1 | 99,31 | 99,31 |
| | Prin2 | 0,69 | 100,00 |
| 1000-1500 | Prin1 | 98,25 | 98,25 |
| | Prin2 | 1,75 | 100,00 |
| 1600-2000 | Prin1 | 93,24 | 93,24 |
| | Prin2 | 6,76 | 100,00 |
| 3000-3500 | Prin1 | 99,77 | 99,77 |
| | Prin2 | 0,23 | 100,00 |

Apêndice D - Valores médios do primeiro componente principal (prin1) de ligninas biodegradadas por fungos, segundo espécie de fungo e números de onda (cm^{-1}), de cinco subdivisões derivada da banda total 400 a 3997 cm^{-1}

| Fungo | Prin1 351 - 3997 | Prin1 400 - 700 | Prin1 800 - 1000 | Prin1 1000 - 1500 | Prin1 1600 - 2000 | Prin1 3000 - 3500 |
|----------|---------------------|--------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| BT-25 | -0,67 (6,87) bc | 0,41 (0,31) bc | -0,11 (0,29) b | -0,35 (0,36) b | -0,57 (3,35) bc | 2,52 (1,62) bc |
| BT-27 | -7,04 (11,81) bcd | -2,60 (2,82) bc | -2,05 (2,04) b | -3,64 (3,55) b | -1,55 (4,09) bc | -2,14 (5,90) bc |
| BT-28 | -10,56 (4,02) bcd | -2,17 (1,26) bc | -2,04 (0,96) b | -3,32 (1,51) b | -3,81 (1,29) bc | -3,17 2,35) bc |
| BT-31 | -34,45 (8,52) d | -8,76 (2,19) c | -6,85 (1,86) b | -11,69 (2,53) c | -11,12 (2,79) c | -14,65 (3,68) c |
| BT-32 | -11,99 (12,32) bcd | -4,21 (2,18) bc | -3,76 (1,34) b | -5,87 (2,83) b | -3,82 (1,29) bc | -4,34 (5,74) bc |
| BT-21 | -17,20 (9,87) bcd | -4,73 (2,73) bc | -3,28 (3,05) b | -6,14 (2,26) b | -5,95 (4,50) bc | -6,02 (2,39) bc |
| Controle | -17,49 (23,71) bcd | -5,32 (5,17) bc | -4,21 (3,24) b | -6,42 (6,05) b | -6,35 (7,47) c | -5,64 (13,33) bc |
| ED-1 | -19,54 (11,51) cd | -4,63 (1,91) bc | -3,97 (1,60) b | -6,49 (3,14) b | -6,29 (3,90) c | -7,84 (3,63) bc |
| BT-40 | -21,77 (1,97) cd | -6,10 (0,37) bc | -5,05 (0,47) b | -8,29 (0,68) b | -6,56 (0,81) c | -9,59 (0,82) bc |
| Jau-3 | 109,38 (3,54) a | 36,29 (0,35) a | 29,63 (0,48) a | 42,78 (1,14) a | 37,12 (1,59) a | 42,4 (1,15) a |
| pH 3 | 40,14 (83,17) ab | 4,20 (19,97) b | 3,72 (16,29) b | 12,90 (31,26) b | 11,57 (25,57) b | 11,11 (28,77) ab |

Apêndice E – Proporções da variância referentes aos autovalores de ligninas biodegradadas por *P. sanguineus* de acordo com tratamento e tempo

| Bandas (cm ⁻¹) | Componente principal | Proporção | Proporção acumulada |
|----------------------------|----------------------|-----------|---------------------|
| 400-3997 | Prin1 | 89,56 | 89,56 |
| | Prin2 | 10,03 | 99,60 |
| 400-700 | Prin1 | 99,43 | 99,43 |
| | Prin2 | 0,54 | 99,97 |
| 800-1000 | Prin1 | 97,60 | 97,60 |
| | Prin2 | 2,36 | 99,96 |
| 1000-1500 | Prin1 | 90,59 | 90,59 |
| | Prin2 | 9,10 | 99,69 |
| 1600-2000 | Prin1 | 95,73 | 95,73 |
| | Prin2 | 4,23 | 99,95 |
| 3000-3500 | Prin1 | 94,56 | 94,56 |
| | Prin2 | 5,36 | 99,92 |

Apêndice F - Médias (desvio padrão entre parênteses) do primeiro componente principal (prin1) dos números de ondas para as bandas entre 400-3997 cm^{-1} , referente ao espectro de FTIR da absorvância das amostras de ligninas recuperadas de licor negro concentração 15%, biodegradado por *Pycnopus sanguineus*

| Tempo (dias) | Controle | Fungo |
|--------------|------------------|------------------|
| 5 | 34,58 (-22,6) aA | 33,65 (21,78) aA |
| 6 | 3,28 (19,42) bA | 0,09 (11,68) aA |
| 9 | - | -30,90 (17,0) c |
| 10 | -12,48 (8,18) bA | -3,68 (4,47) bA |
| 11 | -4,68 (7,54) bA | -4,70 (4,63) bA |
| 12 | - | -3,61 (5,58) b |
| 13 | - | -4,60 (5,29) b |

Médias seguidas de mesma letra minúscula (maiúscula) na coluna (linha) não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo de Teste Tukey-Kramer

Apêndice G - Médias (desvio padrão entre parênteses) do primeiro componente principal (prin1) dos números de ondas para as bandas entre 400-700 cm^{-1} , referente ao espectro de FTIR da absorvância das amostras de ligninas recuperadas de licor negro concentração 15%, biodegradado por *Pycnopus sanguineus*

| Tempo (dias) | Controle | | Fungo | |
|--------------|----------|------------|--------|-----------|
| 5 | 23,16 | (0,49) aA | 22,88 | (0,36) aA |
| 6 | 3,35 | (15,25) bA | 0,67 | (9,22) bA |
| 9 | - | - | -17,16 | (0,54) c |
| 10 | -8,55 | (0,10) cA | -3,97 | (0,87) bA |
| 11 | -3,47 | (3,11) bcA | -4,66 | (1,38) bA |
| 12 | - | - | -3,45 | (1,76) b |
| 13 | - | - | -3,98 | (1,09) b |

Médias seguidas de mesma letra minúscula (maiúscula) na coluna (linha) não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo de Teste Tukey-Kramer

Apêndice H - Médias (desvio padrão entre parênteses) do primeiro componente principal (prin1) dos números de ondas para as bandas entre 800-1000 cm^{-1} , referente ao espectro de FTIR da absorbância das amostras de ligninas recuperadas de licor negro concentração 15%, biodegradado por *Pycnoporus sanguineus*

| Tempo (dias) | Controle | | Fungo | |
|--------------|----------|-----------|--------|-----------|
| 5 | 18,60 | (0,40) aA | 18,36 | (0,39) aA |
| 6 | 2,09 | (12,14) b | 0,20 | (6,41) b |
| 9 | - | - | -15,03 | (0,53) c |
| 10 | -7,35 | (0,02) bA | -2,68 | (0,63) bA |
| 11 | -3,04 | (2,45) bA | -3,06 | (0,96) bA |
| 12 | - | - | -2,35 | (1,46) b |
| 13 | - | - | -2,32 | (0,51) b |

Médias seguidas de mesma letra minúscula (maiúscula) na coluna (linha) não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo de Teste Tukey-Kramer

Apêndice I - Médias (desvio padrão entre parênteses) do primeiro componente principal (prin1) dos números de ondas para as bandas entre 1000-1500 cm^{-1} , referente ao espectro de FTIR da absorbância das amostras de ligninas recuperadas de licor negro concentração 15%, biodegradado por *Pycnoporus sanguineus*

| Tempo (dias) | Controle | | Fungo | |
|--------------|----------|------------|--------|-----------|
| 5 | 27,20 | (1,32) aA | 26,09 | (0,82) aA |
| 6 | 0,26 | (12,76) bA | -1,00 | (3,02) bA |
| 9 | - | - | -29,12 | (1,43) c |
| 10 | -10,90 | (0,20) bA | -0,90 | (1,39) bB |
| 11 | -2,20 | (4,50) bA | -2,17 | (2,05) bA |
| 12 | - | - | -0,73 | (3,24) b |
| 13 | - | - | -1,73 | (2,52) b |

Médias seguidas de mesma letra minúscula (maiúscula) na coluna (linha) não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo de Teste Tukey-Kramer

Apêndice J - Médias (desvio padrão entre parênteses) do primeiro componente principal (prin1) dos números de ondas para as bandas entre 1600-2000 cm^{-1} , referente ao espectro de FTIR da absorvância das amostras de ligninas recuperadas de licor negro concentração 15%, biodegradado por *Pycnoporus sanguineus*

| Tempo (dias) | Controle | | | Fungo | | |
|--------------|----------|---------|-----|--------|---------|-----|
| 5 | 26,16 | (0,37) | aA | 25,69 | (0,34) | aA |
| 6 | 5,75 | (21,18) | bA | 1,66 | (13,09) | bA |
| 9 | - | | | -15,39 | (0,56) | c |
| 10 | -10,22 | (0,51) | cA | -5,08 | (0,08) | bcA |
| 11 | -7,97 | (0,86) | bcA | -5,38 | (0,41) | bcA |
| 12 | - | | | -5,23 | (1,15) | bc |
| 13 | - | | | -5,42 | (0,43) | c |

Médias seguidas de mesma letra minúscula (maiúscula) na coluna (linha) não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo de Teste Tukey-Kramer

Apêndice K - Médias (desvio padrão entre parênteses) do primeiro componente principal (prin1) dos números de ondas para as bandas entre 3000-3500 cm^{-1} , referente ao espectro de FTIR da absorbância das amostras de ligninas recuperadas de licor negro concentração 15%, biodegradado por *Pycnoporus sanguineus*

| Tempo | Controle | | Fungo | |
|-------|----------|------------|--------|-----------|
| 5 | 23,83 | (2,18) aA | 22,75 | (1,30) aA |
| 6 | -3,22 | (0,49) bcA | -2,50 | (6,76) bA |
| 9 | - | - | -35,63 | (2,18) c |
| 10 | -6,37 | (1,28) cA | 1,35 | (0,45) bA |
| 11 | 4,51 | (6,36) bA | -0,30 | (2,07) bA |
| 12 | - | - | 1,87 | (3,95) b |
| 13 | - | - | -0,05 | (2,88) b |

Médias seguidas de mesma letra minúscula (maiúscula) na coluna (linha) não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo de Teste Tukey-Kramer