



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA - CCT



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS
LABORATÓRIO DE ENGENHARIA BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE COPOS DESCARTÁVEIS DE
POLIPROPILENO (PP) E PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E
LIGNINOLÍTICAS POR *PSILOCYBE CASTANELLA* (CCIBt 2781) NA
FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA**

LAHYANA RAFAELLA DE FREITAS CUNHA

CAMPINA GRANDE

2014

LAHYANA RAFAELLA DE FREITAS CUNHA

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE COPOS DESCARTÁVEIS DE
POLIPROPILENO (PP) E PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E
LIGNINOLÍTICAS POR *PSILOCYBE CASTANELLA* (CCIBt 2781) NA
FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA**

Orientadora: Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira

CAMPINA GRANDE

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

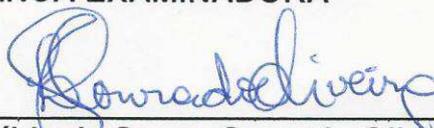
- C972a Cunha, Lahyana Rafaella de Freitas.
Avaliação da biodegradação de copos descartáveis de polipropileno (PP) e produção de enzimas celulolíticas e ligninolíticas por *psilocybe castanella* (CCIBt2781) na fermentação semissólida / Lahyana Rafaella de Freitas Cunha. – Campina Grande, 2014.
122 f. : il. color.
- Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2014.
- "Orientação: Prof.ª Dr.ª Líbia de Sousa Conrado Oliveira".
- Referências.
1. Polipropileno – Engenharia de Processos. 2. Fermentação Semissólida. 3. Lacase. 4. CMCAs. 5. Resíduos Agroindustriais. I. Oliveira, Líbia de Sousa Conrado. II. Título.
- CDU 658.511.3:678.742.3(043)

LAHYANA RAFAELLA DE FREITAS CUNHA

AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE COPOS DESCARTÁVEIS DE
POLIPROPILENO (PP) E PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E
LIGNINOLÍTICAS POR *PSILOCYBE CASTANELLA* (CCIBt 2781) NA
FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA

Avaliação em 22 / 08 / 2014

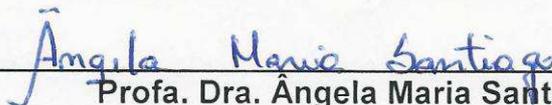
BANCA EXAMINADORA



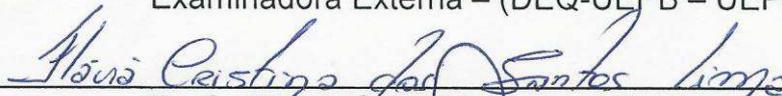
Profa. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira
Orientadora – (UAEQ/UFCG)



Profa. Dra. Glauciane Danusa Coelho
Examinadora Interna – (UATEC/CDSA/UFCG)



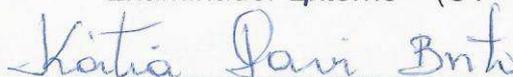
Profa. Dra. Ângela Maria Santiago
Examinadora Externa – (DEQ-UEPB – UEPB)



Profa. Dra. Flávia Cristina dos Santos Lima
Examinadora Externa – (IFPE - Campus Belo Jardim)



Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva
Examinador Externo – (CT - UFPB)



Profa. Dra. Kátia Davi Brito
Examinadora Externa – (IFPB - Campus Campina Grande)

Aos meus pais Laélio Cunha de Sousa e Liduina Freitas de Paiva Cunha e ao meu esposo Evandson de Moura Leite Fernandes por todo amor e confiança que sempre tiveram em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar pelo caminho do bem e por ser a força maior que rege a minha vida.

A minha família, Laélío, Liduina, Evandson, Liélío, Lauren, Lucas, Ceci, Jacy, tios, tias, primos e primas, pelo amor e por acreditarem que sou capaz de conquistar os meus sonhos.

A minha orientadora Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira, pela atenção, orientação, confiança e apoio.

A Dra. Glauciane Danusa Coelho pela co-orientação, amizade e pelas palavras de incentivo que teve em todos os momentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) na pessoa do seu coordenador Dr. Antônio Gilson Barbosa de Lima.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

A Patrícia, Kátia e Ângela, amigas e companheiras durante esses quatro anos de trabalho, obrigada pelo carinho e pelos momentos inesquecíveis que passamos juntas.

Aos meus amigos da Faculdade Maurício de Nassau, Alexandra, Ana, Danúbia, Fábio, Geovane, Suzana, Fernando, Arthur, Adriana, Silvana, Daniela, Luciana, Valeska, Abrahão, Clara e Cristiane pelos momentos de descontração e pela amizade que levarei sempre comigo.

A família do meu marido, que considero como minha família também, Evandro, Fátima, Júnior, Ivanna, Lara, Lisandro, Raul e Monalisa por todo carinho e companheirismo.

Ao funcionário Sr. Jardes pela ajuda sempre que precisava.

Aos alunos de graduação, Bárbara, Beatriz, Ravena, Isa, Paloma e Neto pelo auxílio e apoio no desenvolvimento dos experimentos. Em especial, a aluna Bárbara pelo companheirismo e apoio prestado em muitos momentos dessa pesquisa.

Aos colegas do laboratório de Engenharia Bioquímica da UFCG, Patrícia, Kátia, Ângela, Simone, Siumara, Carlos Bispo, Ezenildo, Flávia, Beatriz e Rebeca pela ajuda e contribuição para realização deste trabalho.

As amigas, Anne Gabriella, Gabriela Gondim, Juliana Paiva, Jucimeire, Thatyara, Juliana Bruna, Tenille, Aline Rocha, Aline Milena e Karenine que mesmo distantes me incentivavam e, quando nos encontrávamos, me faziam acreditar que tudo daria certo.

A banca examinadora, pela revisão e sugestões para melhoramento do trabalho.

Aos meus colegas de doutorado, em especial Kátia, João, Vandemberg, Lourenço e Marconni, pelos momentos felizes que passamos juntos.

A todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado, o meu muito obrigada.

RESUMO

CUNHA, L. R. F. Avaliação da biodegradação de copos descartáveis de polipropileno (PP) e produção de enzimas celulolíticas e ligninolíticas por *Psilocybe castanella* (CCIBt 2781) na fermentação semissólida. Tese de Doutorado, UFCG, Programa de Pós – Graduação em Engenharia de Processos. Área de concentração: Biotecnologia, Campina Grande/PB, Brasil.

Orientadora: Profa. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira

Uma das formas de remediar poluentes urbanos, como polímeros plásticos, é a utilização de processos biotecnológicos que exploram a capacidade de micro-organismos decompositores, produzirem enzimas na presença de substratos que possuem fontes indutoras adequadas, a exemplo de fungos do gênero Basidiomiceto em substratos como biomassas lignocelulósicas. O presente trabalho tem como objetivo estudar o potencial de substratos como a casca de coco verde, farinha de soja comercial, farelo da palha de milho verde e cana-de-açúcar na produção de lacase e CMCase por meio da fermentação semissólida (FES) utilizando o micro-organismo *Psilocybe castanella* (CCIBt 2781) como agente da fermentação, bem como, avaliar a degradação de pedaços de copos de polipropileno por esse basidiomiceto, sem e com interferência de mediadores orgânicos e inorgânicos. O fungo foi previamente crescido em ágar extrato de malte (MEA) 2% e inoculado em substratos a base de farelo de palha de milho verde com bagaço de cana-de-açúcar e bagaço da casca de coco verde com farinha de soja comercial nas proporções adequadas para se obter C/N 90 e com os mediadores, óleo vegetal, Tween 80 e azul brilhante de remazol (RBBR). Durante 60 dias de cultivo foram analisadas as atividades enzimáticas de lacase e carboximetilcelulase. A degradação causada pela ação microbiana nos polímeros plásticos foi analisada por medidas de perda de massa, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raio X (DRX). A maior atividade da lacase ocorreu em torno do 15º dia de fermentação ($95,67 \text{ UL}^{-1}$), contendo bagaço da casca de coco verde como fonte de carbono e soja como fonte de nitrogênio, sob ação dos mediadores tween e RBBR. Para o substrato a base de milho e cana, a maior atividade foi de $69,77 \text{ UL}^{-1}$ em 30 dias, utilizando tween como mediador. A maior produção de CMCase foi de 0,29 U/g, para o substrato a base de milho e cana e de 0,22 U/g no substrato contendo bagaço da casca de coco verde e farinha de soja comercial. Todas as amostras de PP submetidas à incubação nos dois substratos apresentaram alterações nas superfícies dos polímeros, indicadas por ranhuras, sulcos e furos, quando analisadas por MEV. Esses resultados mostram que a bioconversão dos resíduos utilizados nesse trabalho por meio da fermentação semissólida (FES) é uma forma viável de obtenção das enzimas lignocelulolíticas, além da relação positiva entre a degradação de polímeros sintéticos (PPs) e a atividade enzimática de lacase.

Palavras-chave: Fermentação semissólida. Lacase. CMCase. Polipropileno. Resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

CUNHA, L. R. F. Assessment of biodegradability of disposable cups polypropylene (PP) and production of enzymes ligninolytic and cellulolytic by *Psilocybe castanella* (CCIBt 2781) in semisolid fermentation.

One way to remedy urban pollutants such as plastic polymers, would be the use of biotechnological processes that exploit the ability of decomposing microorganisms produce enzymes in the presence of substrates that have appropriate inducing sources, like basidiomycete fungi of the genus substrates as lignocellulosic biomass. Therefore, the aim of this work was to study the potential of coconut husk and commercial soy flour, bran straw corn and cane sugar as substrates in the production of laccase and CMCase by semisolid fermentation (SSF) *Psilocybe castanella* (CCIBt 2781) microorganism as the fermentation agent, as well as to evaluate the degradation of pieces of polypropylene cups by this basidiomycete with and without interference from inorganic and organic mediators. The fungus was previously grown on malt extract agar (MEA) 2% and inoculated in substrates bran straw corn with crushed sugar cane bagasse and coconut husk with commercial soy flour in the proportions adequate to obtain C/N 90 and mediators, vegetable oil, Tween 80 and Remazol brilliant blue R (RBBR). During cultivation for 60 days were analyzed, the enzymatic activities of laccase and carboxymethylcellulase, besides the degradation of plastics by polymer mass loss, MEV and DRX. The highest activity of laccase occurred around the 15th day of fermentation (95.67 UL^{-1}), containing bagasse coconut husk as carbon source and soybean as nitrogen source, under the action of mediators tween and RBBR. To the substrate from corn and sugarcane, the highest activity was 69.77 UL^{-1} in 30 days, using tween as a mediator. The largest production of CMCase was 0.29 U/g , for the substrate from corn and sugarcane and 0.22 U/g substrate containing bagasse in the coconut husk and commercial soy flour. All samples analyzed by MEV and DRX were subjected to incubation with both substrates showed changes in the surfaces of polymers, indicated by grooves, grooves and holes. These results show that bioconversion of waste materials through this work semisolid fermentation (SSF) is a feasible way of obtaining the enzymes lignocellulolytic way, besides the positive relationship between the degradation of synthetic polymers (PP) and enzymatic activity.

Keywords: Solid-state fermentation. Laccase. CMCase. Polypropylene. Agroindustrial residues.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Produção mundial de plástico entre 1950 e 2010.....	27
Figura 2	Estruturas dos precursores majoritários da lignina.....	30
Figura 3	Ciclo catalítico da lacase.....	34
Figura 4	Modelo de transformação de substratos lignocelulósicos por enzimas ligninolíticas, fatores de mediação e radicais reativos.....	35
Figura 5	Matérias-primas agroindustriais.....	44
Figura 6	Quadrados de copo de Polipropileno – PP.....	50
Figura 7	Colônia de <i>Psilocybe castanella</i> CCIBt 2781 em MEA (2%), após 15 dias de incubação, a 25°C.....	52
Figura 8	Sistema de cultivo de <i>P. castanella</i> (Substrato, óleo, tween, RBBR e pedaços de PP).....	53
Figura 9	Etapas do processo de fermentação semissólida.....	57
Figura 10	Análise visual da descoloração do RBBR durante a fermentação semissólida.....	63
Figura 11	Efeito da adição dos mediadores na atividade de lacase durante 60 dias de fermentação no substrato 1.....	66
Figura 12	Atividade da lacase sem adição de mediadores e com todos os mediadores durante 60 dias de fermentação no substrato 1.....	66
Figura 13	Efeito da adição dos mediadores óleo e tween na atividade enzimática durante 60 dias de fermentação no substrato 1.....	67
Figura 14	Efeito da adição dos mediadores óleo/tween e RBBR na atividade enzimática durante 60 dias de fermentação no substrato 1.....	67
Figura 15	Efeito da adição dos mediadores óleo/RBBR e tween/RBBR na atividade enzimática durante 60 dias de fermentação no substrato 1.....	68
Figura 16	Superfície de resposta para atividade de lacase durante 15 dias de fermentação no substrato 1.....	69
Figura 17	Superfície de resposta para atividade de lacase durante 30 dias de fermentação no substrato 1.....	70
Figura 18	Superfície de resposta para atividade de lacase durante 45 dias de fermentação no substrato 1.....	70
Figura 19	Superfície de resposta para atividade de lacase durante 60 dias de fermentação no substrato 1.....	71
Figura 20	Efeito da adição dos mediadores na atividade da lacase durante 60 dias de fermentação no substrato 2.....	73
Figura 21	Atividade da lacase sem adição de mediadores e com todos os mediadores durante 60 dias de fermentação no substrato 2.....	74
Figura 22	Efeito da adição dos mediadores óleo e tween na atividade enzimática durante 60 dias de fermentação no substrato 2.....	74
Figura 23	Efeito da adição dos mediadores óleo/tween e RBBR na atividade enzimática durante 60 dias de fermentação no substrato 2.....	75

Figura 24	Efeito da adição dos mediadores óleo/RBBR e Tween/RBBR na atividade enzimática durante 60 dias de fermentação no substrato 2.....	75
Figura 25	Superfície de resposta para atividade de lacase durante 15 dias de fermentação no substrato 2.....	76
Figura 26	Superfície de resposta para atividade de lacase durante 30 dias de fermentação no substrato 2.....	77
Figura 27	Superfície de resposta para atividade de lacase durante 45 dias de fermentação no substrato 2.....	78
Figura 28	Superfície de resposta para atividade de lacase durante 60 dias de fermentação no substrato 2.....	79
Figura 29	Efeito da adição dos mediadores na atividade enzimática de CMCase durante 60 dias de fermentação no substrato 1.....	81
Figura 30	Atividade da CMCase sem adição de mediadores e com todos os mediadores durante 60 dias de fermentação no substrato 2.....	82
Figura 31	Efeito da adição dos mediadores óleo e Tween na atividade de CMCase durante 60 dias de fermentação no substrato 1.....	82
Figura 32	Efeito da adição dos mediadores óleo/Tween e RBBR na atividade de CMCase durante 60 dias de fermentação no substrato 1.....	83
Figura 33	Efeito da adição dos mediadores Óleo/RBBR e Tween/RBBR na atividade de CMCase durante 60 dias de fermentação no substrato 1.....	83
Figura 34	Efeito da adição dos mediadores na atividade enzimática de CMCase durante 60 dias de fermentação no substrato 2.....	85
Figura 35	Atividade da CMCase sem adição de mediadores e com todos os mediadores durante 60 dias de fermentação no substrato 2.....	86
Figura 36	Efeito da adição dos mediadores óleo e Tween na atividade de CMCase durante 60 dias de fermentação no substrato 2.....	86
Figura 37	Efeito da adição dos mediadores óleo/Tween e RBBR na atividade de CMCase durante 60 dias de fermentação no substrato 2.....	87
Figura 38	Efeito da adição dos mediadores Óleo/RBBR e Tween/RBBR na atividade de CMCase durante 60 dias de fermentação no substrato 2.....	87
Figura 39	Efeito do pH sobre a atividade da lacase de <i>Psilocybe castanella</i> (CCIBt 2781) durante 30 dias de fermentação no substrato 1.....	89
Figura 40	Efeito do pH sobre a atividade da lacase de <i>Psilocybe castanella</i> (CCIBt 2781) durante 15 dias de fermentação no substrato contendo 2.....	90
Figura 41	Estabilidade a diferentes valores de pH da lacase de <i>Psilocybe castanella</i> (CCIBt 2781) durante 30 dias de fermentação no substrato 1.....	90
Figura 42	Estabilidade a diferentes valores de pH da lacase de <i>Psilocybe castanella</i> (CCIBt 2781) durante 15 dias de fermentação no substrato 2.....	91
Figura 43	Efeito da temperatura sobre a atividade da lacase de <i>Psilocybe castanella</i> (CCIBt 2781) durante 30 dias de fermentação no substrato 1.....	92
Figura 44	Efeito da temperatura sobre a atividade da lacase de <i>Psilocybe castanella</i> (CCIBt 2781) durante 15 dias de fermentação no	

	substrato 2.....	93
Figura 45	Comparação entre as fotomicrografias obtidas a partir dos PPs do controle abiótico e do ensaio realizado até 15 dias de incubação para o substrato.....	95
Figura 46	Comparação entre as fotomicrografias obtidas a partir dos PPs do controle abiótico e do ensaio realizado até 30 dias de incubação para o substrato.....	96
Figura 47	Comparação entre as fotomicrografias obtidas a partir dos PPs do controle abiótico e do ensaio realizado até 45 dias de incubação para o substrato.....	96
Figura 48	Comparação entre as fotomicrografias obtidas a partir dos PPs do controle abiótico e do ensaio realizado até 60 dias de incubação para o substrato.....	97
Figura 49	Comparação entre as fotomicrografias obtidas a partir dos PPs do controle abiótico e do ensaio realizado até 15 dias de incubação para o substrato 2.....	97
Figura 50	Comparação entre as fotomicrografias obtidas a partir dos PPs do controle abiótico e do ensaio realizado até dias 30 de incubação para o substrato 2.....	98
Figura 51	Comparação entre as fotomicrografias obtidas a partir dos PPs do controle abiótico e do ensaio realizado até 45 dias de incubação para o substrato 2.....	98
Figura 52	Comparação entre as fotomicrografias obtidas a partir dos PPs do controle abiótico e do ensaio realizado até 60 dias de incubação para o substrato 2.....	99
Figura 53	Comparação entre as fotomicrografias obtidas a partir dos pellets do controle abiótico e do ensaio realizado após 60 dias de incubação.....	100
Figura 54	Comparação entre a DRX obtida a partir dos PPs do controle abiótico e do ensaio realizado até 30 dias de incubação no substrato 2.....	101
Figura 55	Comparação entre a DRX obtida a partir dos PPs do controle abiótico e do ensaio realizado até 30 dias de incubação no substrato 2.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição química do bagaço de cana-de-açúcar.....	22
Tabela 2	Caracterização físico-química da palha de milho.....	24
Tabela 3	Composição química do grão de soja.....	25
Tabela 4	Percentual mássico dos componentes constituintes das amostras secas e livres de extraíveis do bagaço de coco.....	27
Tabela 5	Valores de pH ótimo para lacases de basidiomicetos.....	41
Tabela 6	Planejamento fatorial – FSS.....	51
Tabela 7	Caracterização físico-química das matérias-primas.....	60
Tabela 8	Avaliação do crescimento do micro-organismo no substrato 1.....	63
Tabela 9	Avaliação do crescimento do micro-organismo no substrato 2.....	64
Tabela 10	Atividades de lacase obtidas no substrato 1.....	65
Tabela 11	Atividades de lacase obtidas no substrato 2.....	73
Tabela 12	Atividades de CMCase obtidas no substrato 1.....	81
Tabela 13	Atividades de CMCase obtidas no substrato 2.....	85
Tabela 14	Porcentagem de perda de massa molar dos PPs.....	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS - 2,2-Azinobis-(3-Ethyl Benzthiazoline-6-Sulphonate)
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR - Açúcares redutores
ASTM - American Society for Testing Materials
Aw - Atividade de água
BASF - Badische Anilin und Soda Fabrik
b.s - base seca
C – Carbono
C/N – Relação Carbono e Nitrogênio
CCIBT - Coleção de Cultura do Instituto de Botânica
CDSA - Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
Cl-DMB - cloro-dimetoxibenzeno
CMCase - Carboximetilcelulase
CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento
CP - Clorofenol
DCP - Diclorofenol
DMP - Dimetoxifenol
DNS - Ácido 3,5 – dinitro-salicílico
DRX – Difração de Raio X
EDS - Espectroscopia de Energia Dispersiva
EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO - Organizações das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FC - Fator de concentração
FSS – Fermentação semissólida
HAA - Ácido hidroxí antranílico
HBT - Hydroxybenzotriazole
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IAC - Instituto Agronômico de Campinas
ICIDCA - Instituto Cubano de Investigaciones de Los Derivados de La Canã de Azucar
LEB - Laboratório de Engenharia Bioquímica
LiP - Lignina peroxidases

MEA - Ágar extrato de malte
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
MnP - Mangânes peroxidases
Mton – Milhões de toneladas
m/v - massa por volume
N - Nitrogênio
PCP – Pentaclorofenol
PEAD - Polietileno de Alta Densidade
PEBD - Polietileno de Baixa Densidade
PET - poli(tereftalato de etileno)
PMMA - poli(metacrilato de metila)
PP - Polipropileno
PS - Poliestireno
PSW - Resíduos Sólidos de Plástico
PVC - poli(cloreto de vinila)
RBBR - Azul Brilhante de Remazol R
T - Temperatura
TCP - Triclorofenol
U - Umidade
UAEMa - Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais
UAEQ - Unidade Acadêmica de Engenharia Química
UFCG - Universidade Federal de Campina Grande-PB
U/g - Unidade de atividade por grama de meio
UI - Unidades internacionais
U kg⁻¹ - Unidade de atividade por quilograma
U L⁻¹ - Unidade de atividade por litro
UNICA - União da Agroindústria Canavieira de São Paulo
USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
UV - Ultravioleta
VA - Alcool Veratrílico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVO GERAL.....	20
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	21
2.1.1	Cana-de-açúcar	21
2.1.2	Milho verde	23
2.1.3	Soja	24
2.1.4	Coco verde	25
2.2	BIODEGRADAÇÃO DE PLÁSTICOS.....	27
2.3	BASIDIOMICETOS E A DEGRADAÇÃO DA LIGNINA.....	29
2.4	ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS.....	31
2.4.1	Lacases	32
2.5	ENZIMAS CELULOLÍTICAS.....	37
2.6	FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA.....	38
2.7	ESTADO DA ARTE.....	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO	44
3.2	MATÉRIA-PRIMA.....	44
3.3	TRATAMENTO DOS RESÍDUOS MATÉRIA-PRIMA.....	44
3.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS RESÍDUOS SECOS	45
3.4.1	Umidade	45
3.4.2	Cinzas	46
3.4.3	Determinação do Carbono Orgânico	46
3.4.4	Determinação de Nitrogênio total	47
3.4.5	Lignina	48
3.4.6	Celulose	48
3.4.7	Extrativos	49
3.5	AJUSTE DA RELAÇÃO C/N DOS RESÍDUOS E UMIDADE DE 70%.....	49
3.6	TRATAMENTO DOS COPOS PLÁSTICOS.....	50
3.7	PROCESSO FERMENTATIVO.....	51
3.7.1	Planejamento experimental	51
3.7.2	Micro-organismo	52
3.7.3	Inóculo	52
3.7.4	Preparação do sistema de cultivo	53
3.7.4.1	Sistema de cultivo.....	54
3.7.5	Análise qualitativa do crescimento microbiano	54
3.8	EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS	55
3.9	DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	55
3.9.1	Determinação da Lacase	55

3.9.2	Determinação da CMCase	56
3.10	DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO E ESTABILIDADE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA (LACASE).....	57
3.11	DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA (LACASE).....	58
3.12	DETERMINAÇÃO DA PERDA DE MASSA DO PP.....	58
3.13	ANÁLISE MORFOLÓGICA DO PP – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	58
3.14	DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	59
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS RESÍDUOS SECOS.....	60
4.2	PROCESSO FERMENTATIVO.....	62
4.2.1	Análise qualitativa do crescimento microbiano	62
4.3	ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	65
4.3.1	Lacase	65
4.3.2	CMCase	80
4.4	PH ÓTIMO E ESTABILIDADE DO PH DA LACASE.....	88
4.5	TEMPERATURA ÓTIMA DA LACASE.....	92
4.6	DETERMINAÇÃO DA PERDA DE MASSA DO PP.....	93
4.7	ANÁLISE MORFOLÓGICA DO PP – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	95
4.8	ANÁLISE DA CRISTALINIDADE DO PP POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX).....	101
5	CONCLUSÕES	103
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

1 INTRODUÇÃO

Os polímeros plásticos, nos últimos anos, estão sendo usados para substituir materiais tradicionais, como vidros, metais e fibras naturais, pois apresentam menores custos de produção, maior flexibilidade, diversidade, assepsia e possibilidade de reciclagem.

Nos últimos 50 anos, a indústria do plástico cresceu continuamente, passando a produção mundial de 1,5 milhão de toneladas em 1950 (década em que se iniciou o desenvolvimento comercial da indústria de poliolefinas - polietilenos e polipropilenos) para 265 milhões de toneladas em 2010 (PLASTICS EUROPE, 2011).

Quando depositados no ambiente, os plásticos chegam aos sistemas de coletas de esgoto resultando no seu entupimento e, conseqüentemente, em inundações locais. Ao serem depositados em lixões, os plásticos apresentam riscos pela queima indevida e incontrolada que pode resultar em emissões tóxicas na atmosfera (REDIFF, 2011).

Uma das formas de remediar esses poluentes urbanos seria a sua utilização em processos biotecnológicos que exploram a capacidade de micro-organismos decompositores, a exemplo de fungos do gênero Basidiomiceto, produzirem enzimas na presença de substratos, como resíduos agroindústriais, que contêm fontes indutoras adequadas, como biomassas lignocelulósicas.

Dentre os processos biotecnológicos usados para decomposição de matérias orgânicas pode-se citar a Fermentação semissólida (FSS) que é uma técnica viável e eficiente no aproveitamento de resíduos agroindustriais, os quais são materiais de baixo custo, alto valor nutricional e são utilizados como fonte de carbono e energia, necessários ao fungo para produção de enzima (PALMA, 2003; BON *et al.*, 2008).

Estudos sobre a composição de resíduos agroindustriais brasileiros têm sido realizados com o intuito de que estes sejam adequadamente aproveitados, objetivando a transformação da matéria-prima em bens úteis, sem danificar o ambiente, uma vez que podem ser convertidos em produtos comerciais de alto valor agregado. Além disso, fornecem meios adequados para o desenvolvimento de micro-organismos e enzimas relacionadas ao processo de biodegradação.

A abordagem geral da biorremediação é o de melhorar a capacidade de degradação natural dos micro-organismos nativos, para isso estão sendo

desenvolvidas tecnologias eficientes para biodegradação de polímeros sintéticos, como uma estratégia eficaz e econômica para remoção de diversos poluentes. Esses processos biotecnológicos exigem a aplicação de cepas adequadas e sua utilização em condições favoráveis para efetivar o seu potencial de degradação (KOLEKAR e KODAM, 2012).

Um dos métodos que podem ser usados como meio para proporcionar a biorremediação é a fermentação semissólida que apresenta vantagens como menor infra-estrutura e recursos humanos qualificados relativamente menores e por utilizar matérias-primas mais baratas para a produção enzimática (RAJEEV *et al.*, 2009). As lacases são enzimas que quando produzidas por via microbiana podem advir de substratos diversos, servindo assim para fins industriais e/ou de processos de biorremediação, pois apresentam estabilidade e falta aparente de inibição (MAJEAU *et al.*, 2010).

No processo de fermentação semissólida e biodegradação, os fungos apresentam uma melhor adaptação às condições ambientais, sendo assim, são mais interessantes para aplicação em sistemas de biodegradação quando comparados às bactérias, que tem seu crescimento limitado pelo ambiente em condições ambientais desfavoráveis. Ainda, o crescimento dos fungos (induzido quimiostaticamente em direção à fonte de carbono orgânico), por meio do alongamento e da ramificação das hifas, permite a colonização de grandes áreas, otimizando o contato do microrganismo com o substrato indutor e uma vez o meio contendo contaminantes pode aumentar sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, sua biodegradação (DUPONT *et al.*, 1997).

O fungo *Psilocybe castanella* utilizado neste trabalho é um basidiomiceto saprófito da família Strophariaceae e que ocorre em solo. Este fungo despertou interesse para estudos de degradação de xenobióticos e aplicação em processo de biorremediação de solo e biodegradação de polímeros sintéticos, pois apresentou rápido crescimento, tolerância a altas concentrações de organoclorados e capacidade de mineralizar hexaclorobenzeno (HCB) e pentaclorofenol (PCP) (Matheus *et al.* 2000, Machado *et al.* 2005).

Uma vez que, a quantidade de resíduos sólidos compostos por plásticos vem se acumulando de forma crescente, e que o sistema ligninolítico envolvido no processo de degradação de poluentes por fungos do gênero basidiomiceto é constituído por enzimas ligninolíticas (MOREIRA-NETO, 2006; COELHO, 2007;

BALLAMINUT, 2007), as quais são inespecíficas e apresentam alto potencial para degradar copos plásticos, tornou-se essencial a realização de estudos de biodegradação utilizando resíduos agroindustriais.

Nesse trabalho foram utilizados os resíduos secos, bagaço da casca de coco verde, bagaço de cana-de-açúcar e farelo da palha de milho verde, por diferentes motivos, tais como: Agregar valores aos resíduos industriais, evitar danos ao meio ambiente e utilizá-los como substratos para produção enzimática por fermentação semissólida. A farinha de soja comercial foi utilizada como fonte de nitrogênio para o crescimento do fungo *Psilocybe castanella* (CCIBt 2781).

1.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o potencial da casca de coco verde e farinha de soja comercial, farelo da palha de milho verde e bagaço de cana-de-açúcar como substratos na produção de lacase e CMCase por meio da fermentação semissólida (FES) utilizando o micro-organismo *Psilocybe castanella* (CCIBt 2781) como agente da fermentação, assim como, avaliar a degradação de pedaços de copos de polipropileno (PP) por esse basidiomiceto.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar os resíduos, bagaço da casca de coco verde, farinha de soja comercial, farelo da palha de milho verde e bagaço de cana-de-açúcar, quanto aos teores de umidade, cinzas, teor de carbono orgânico, nitrogênio total, lignina, extrativos e celulose;
- Acompanhar o crescimento do micro-organismo *Psilocybe castanella* (CCIBt 2781) em diferentes substratos;
- Avaliar a produção das enzimas lacase e CMCase e o efeito dos mediadores orgânicos e inorgânicos de forma isolada e conjunta na atividade enzimática, por meio da cinética de fermentação, promovida pela inoculação de *Psilocybe castanella* (CCIBt 2781) em diferentes substratos;
- Caracterizar o extrato enzimático, determinando a atividade da lacase, quanto ao pH e temperatura ótima e à estabilidade dessa enzima frente a variações de pH;
- Observar a capacidade da lacase em degradar copos plásticos, por meio da perda de massa e da mudança morfológica do polímero usando a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Difração de Raio X (DRX).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Os materiais lignocelulósicos representam a fração mais expressiva da biomassa vegetal, a maior fonte de compostos orgânicos da biosfera. São constituídos por três frações principais que, juntas, perfazem mais de 90% da massa seca total. São elas: celulose, hemicelulose e lignina (PANDEY *et al.*, 2000).

A celulose é um polissacarídeo estrutural derivado da β -glucose de fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$ e representa o constituinte mais abundante da parede vegetal. A hemicelulose é um heteropolissacarídeo formado por cadeias ramificadas, compostas de hexoses, pentoses, ácido urônico e açúcares menores, facilmente hidrolisáveis. Essa molécula representa o segundo maior componente dos resíduos lignocelulósicos, chegando até 40% do seu peso seco (RAJARATHNAM *et al.*, 1992). A lignina é uma macromolécula complexa, formada pela polimerização radicalar de unidades fenil-propano (álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico). Constitui a fração não polissacarídica mais abundante da lignocelulose (KUHAD *et al.*, 1997).

Nos últimos anos, processos biotecnológicos têm sido desenvolvidos para permitir a utilização de biomassas residuais de composição lignocelulósica abundantemente geradas nos setores agrícolas e florestais (PEREIRA *et al.*, 2008). Esses resíduos lignocelulósicos agroindustriais são matérias-primas de grande interesse industrial uma vez que podem ser utilizadas para produção de uma gama de produtos, além de reduzir os índices de lixo urbano gerados pelo processamento de materiais lignocelulósicos.

2.1.1 Cana-de-açúcar

Pertencente à família *Poaceae* (*Gramineae*), a cana-de-açúcar teve sua origem geográfica atribuída ao sudoeste Asiático, Java, Nova Guiné e a Índia. Inicialmente foi cultivada a espécie *Saccharum officinarum* L. e, com o passar do tempo, as cultivares desta espécie sofreram problemas de doenças e de adaptação ecológica, e foram substituídas pelos híbridos interespecíficos do gênero *Saccharum* (IAC, 1998).

Considera-se a cana-de-açúcar como uma das principais culturas cultivada em mais de 100 países, principalmente nas nações em desenvolvimento, embora cerca de três quartos da produção mundial esteja concentrada em oito países. O Brasil é o maior produtor mundial, seguido por Índia, China, Tailândia e Paquistão, sendo que o Brasil e a Índia respondem por metade da cana produzida no mundo (FAO, 2013).

Para a temporada 2013/14, a cultura da cana-de-açúcar continua em expansão. A previsão é que o Brasil tenha um acréscimo na área de cerca de 314 mil hectares, equivalendo a 3,7% em relação à safra 2012/13 (CONAB, 2013).

A cana-de-açúcar é constituída por 70% de biomassa (palha e bagaço) e compostos inorgânicos. Enquanto que a parcela referente ao caldo (30%) já é amplamente explorada e de forma competitiva tanto em produtividade como em qualidade e custos de produção, a fração referente à biomassa recentemente passou a ser mais bem explorada (UNICA, 2004; MORIYA, 2006; SANTOS *et al.*, 2011).

O bagaço da cana-de-açúcar é um material lignocelulósico fibroso composto por celulose, polioses e lignina, como principais componentes macromoleculares que se obtêm após a moagem da cana-de-açúcar. Apesar do uso secundário de bagaço de cana por várias indústrias estima-se que o excedente de bagaço atinja cerca de 20% do total de bagaço gerado, o que equivaleria a uma sobra anual de 15 milhões de toneladas de bagaço (ICIDCA, 1990; TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Na Tabela 1 encontra-se a composição química do bagaço de cana-de-açúcar com pequenas variações em função da variedade da cana empregada, da localização geográfica e dos locais de cultivo (ICIDCA, 1990).

Tabela 1: Composição química do bagaço de cana-de-açúcar.

Componentes	%
Celulose	41 a 44
Lignina	20 a 22
Polioses	25 a 27
Extrativos e substâncias minerais	10

Fonte: ICIDCA (1990).

Devido à grande quantidade de resíduos gerados pela agroindústria da cana de açúcar faz-se necessário demonstrar as vantagens existentes no desenvolvimento de novas tecnologias para obter produtos, como enzimas, a partir do bagaço da cana de açúcar.

2.1.2 Milho verde

O milho é uma planta pertencente à família *Poaceae*, subfamília *Panicoideae*, gênero *Zea*, sendo o nome científico da espécie *Zea mays* (L.). É uma espécie de produção anual com ampla adaptação a diferentes condições de ambiente (PERRY, 2006).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, perdendo apenas para os Estados Unidos e a China. O estudo das projeções de produção do cereal, realizado pela Assessoria de Gestão Estratégica do Mapa (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), indica aumento de 19,11 milhões de toneladas entre a safra de 2008/2009 e 2019/2020 (BRASIL, 2013).

Em 2013 houve uma safra recorde de milho no Brasil de 79.966,6 mil toneladas, representando uma evolução de 9,6% em relação à obtida no ano de 2012 (CONAB, 2013). Entretanto, o aumento da safra eleva a quantidade de resíduos agroindustriais oriundos do milho. Esses resíduos são na maioria das vezes descartados ou subutilizados, e estudos de seus potenciais biotecnológicos são ainda escassos. Neste caso é de fundamental importância o desenvolvimento de pesquisas em biotecnologia na cultura do milho no Brasil, possibilitando o aumento da produtividade e valor agregado aos resíduos desse cereal.

A palha de milho, atualmente, é destinada apenas para a produção de cigarros, embalagens de doces, artesanato de cestaria e de bonecas. Apesar da cultura do milho ter grande importância no agronegócio brasileiro, com produção anual de cerca de 35 milhões de toneladas, e as possibilidades de melhoria na qualidade deste material (MARCONCINI et al., 2008).

Os carboidratos na palha encontram-se principalmente na forma estrutural (parede celular), com uma aparente ausência de carboidratos não estruturais que representam o conteúdo celular (açúcares solúveis) e reservas de energia (amido) (GIVEN e MOSS, 1995). A parede celular medida pela fibra em detergente neutro (FDN) ocupa a maior proporção (cerca de 80%) da matéria seca dos componentes

químicos da palha. Esta fração é constituída por celulose, hemicelulose e lignina (QUEIROZ et al., 1998; TOLERA e SUNDSTOL, 2000).

Na Tabela 2 encontra-se a composição química da palha de milho.

Tabela 2: Caracterização físico-química da palha de milho.

Componentes	%
Lignina solúvel	5,35
Lignina insolúvel	8,79
Lignina total	14,14
Holocelulose	57,49
Celulose	41,18
Extrativos	28,53
Cinzas	1,52
Umidade	12,96

Fonte: SALAZAR *et al.* (2005)

O conteúdo de proteína bruta da palha de milho é baixo, chegando aos níveis de aproximadamente 3% na matéria seca (QUEIROZ *et al.*, 1998). Já o teor dos minerais é marginal, apresentando valores de 0,3% e 0,14% para o cálcio e fósforo, respectivamente (TOLERA e SUNDSTOL, 2000).

2.1.3 Soja

A soja pertence à divisão Angiospermae, classe Dicotyledoneae, família Fabaceae, Gênero *Glycine*, espécie *Glycine max* (L). Tem características herbácea, anual, ereta, entre 60 e 90 cm de altura, caule ramificado, esverdeado e piloso (CASTRO e KLUGE, 1999).

Glycine max é uma das mais importantes oleaginosas cultivadas e comercializadas no mundo, devido principalmente à sua grande importância na economia. O grão *in natura* e seus derivados são importante alternativa para alimentação humana e animal em função de seu elevado teor de proteínas (TOLEDO *et al.*, 2007).

A cultura da soja ganha cada vez mais importância na agricultura mundial, sendo o Brasil o segundo maior produtor, atrás apenas dos EUA. De todas as

culturas agrícolas brasileiras essa foi a que mais cresceu nas últimas três décadas, correspondendo a 49% da área plantada em grãos do país. O aumento da produtividade está associado aos avanços tecnológicos, ao manejo e eficiência dos produtores (BRASIL, 2013).

A soja é um grão rico em proteínas, fibras, óleo, importante fonte de minerais (sódio, potássio, fósforo, ferro, magnésio, zinco e cálcio) e vitaminas, como tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), ácido nicotínico e ácido ascórbico.

As modificações físico-químicas e o processamento da soja dão origem a diferentes matérias-primas como farinhas de soja, extratos hidrossolúveis e proteínas texturizadas que podem ser utilizados na produção de alimentos que fazem parte da dieta ocidental (GENOVESE e LAJOLO, 2002).

Na Tabela 3 é apresentada a análise química do grão de soja, onde se pode observar a alta porcentagem de proteínas. Essa fração proteica pode ser utilizada para produção de vários produtos biotecnológicos, dentre eles podemos citar a produção de enzimas por micro-organismos que necessitam de uma fonte de nitrogênio, já que a mesma atua como fonte de nitrogênio para o crescimento microbiano.

TABELA 3 - Composição química do grão de soja.

Componentes	%
Proteínas	40
Lipídios	20
Carboidratos	34
Minerais	5

Fonte: EMBRAPA (2014).

2.1.4 Coco verde

O coqueiro (*Cocos nucifera*) é uma das frutíferas mais difundidas naturalmente no globo terrestre, ocorrendo em praticamente todos os continentes. Em virtude da capacidade de dispersão e adaptabilidade, seu cultivo e sua utilização se dão de forma expressiva em todo o mundo, com os mais variados produtos, tanto de forma *in natura* quanto industrializada (MARTINS e JUNIOR, 2011).

Cerca de 80% da área plantada com coqueiro situa-se na Ásia (Índia, Filipinas, Indonésia, Sri Lanka e Tailândia) e o restante distribuída entre África, América Latina, Oceania e Caribe (FONTES e WANDERLEY, 2010).

O coqueiro foi introduzido no Brasil em meados de 1950 através do Estado da Bahia. Atualmente, o país é o quarto maior produtor mundial com uma produção aproximada de 2,8 milhões de toneladas, em uma área colhida de 287 mil ha de coqueiros. Esta condição de destaque do Brasil no cenário mundial de produção de coco se sobressai ainda mais quando se compara aos países da América do Sul, região na qual a produção brasileira é responsável por mais de 80% (MARTINS e JUNIOR, 2011).

Os principais produtos do coco que derivam de sua fruta são: a água de coco, obtida dos frutos não maduros; a fibra, utilizada para a produção de tapetes, colchões, pincéis, vassouras e bolsas; a casca de coco, utilizada para fazer diferentes utensílios como canecas, colheres, vasos, etc., assim como para fazer carvão ativado de alta qualidade (PINO, 2005).

O rejeito da indústria convencional do coco maduro pode ser usado como combustível para caldeiras, ou na manufatura de cordoalha, tapetes, estofamentos e capachos. No entanto, a alta umidade (cerca de 85%) e as características da fibra do coco imaturo reduzem seu aproveitamento em relação a casca do coco maduro (MURRAY, 2001).

A casca de coco verde, subproduto do uso e da industrialização da água de coco, é depositada em lixões e às margens de estradas. É um material de difícil decomposição levando mais de 8 anos para se decompor. Portanto, a utilização da casca do coco verde processada, além da importância econômica, é também importante do ponto de vista ambiental, já que 80% a 85% do peso bruto do coco verde é considerado lixo (ROSA *et al.*, 2001).

De acordo com Rodrigues *et al.* (2008), a casca de coco verde é considerada um resíduo lignocelulósico, podendo ser utilizada em processos fermentativos, para produção de celulases e enzimas ligninolíticas. Neste caso, a produção de enzimas, seria uma alternativa vantajosa para os campos econômico e ambiental.

A Tabela 4 mostra o percentual mássico dos componentes constituintes das amostras secas e livres de extraíveis do bagaço de coco.

Tabela 4 - Percentual mássico dos componentes constituintes das amostras secas e livres de extraíveis do bagaço de coco.

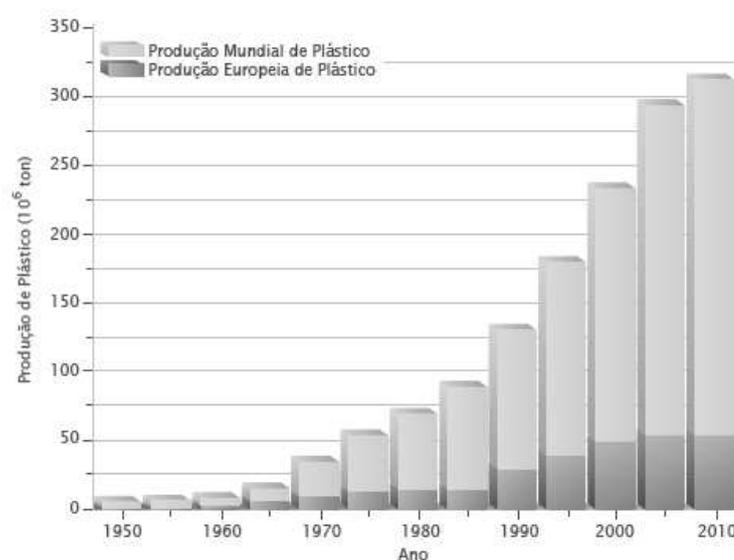
Componente	Bagaço de coco
Glicose	21,28 ± 1,72
Lignina Total	43,71 ± 0,50
Cinzas	2,27 ± 0,18
Pectina	0,82 ± 0,15

Fonte: Adaptado de GUEDES (2010)

2.2 BIODEGRADAÇÃO DE PLÁSTICOS

Nos últimos 50 anos, a indústria do plástico teve um crescimento de aproximadamente 9% ao ano, o que mostra a Figura 1. Em 2010, o maior produtor mundial de plásticos passou a ser a China, com uma produção de aproximadamente 62,2 Mton. Em segundo e terceiro lugares estavam, respectivamente, a União Europeia (57 Mton de plásticos) e a América do Norte (54,3 Mton) (PLASTICS EUROPE, 2011). No Brasil, a produção de plásticos aumentou aproximadamente 33% nos últimos dez anos, acompanhada de um aumento no consumo bastante similar (35%) (ABIPLAST, 2013).

Figura 1 - Produção mundial de plástico entre 1950 e 2010



Fonte: PLASTICS EUROPE (2011).

Devido à alta produção e consumo nos últimos anos, os plásticos são considerados os grandes vilões ambientais, pois podem demorar séculos para se degradar e ocupam grande parte do volume dos aterros sanitários, interferindo de forma negativa nos processos de compostagem e de estabilização biológica. Além disso, os resíduos poliméricos quando descartados em lugares inadequados, como lixões, rios, encostas, etc., causam impacto ainda maior ao meio ambiente (SPINACÉ e PAOLI, 2005).

O acúmulo indevido de polímeros sintéticos também atinge ambientes marinhos causando inúmeros problemas, como a ingestão de sacos plásticos por tartarugas marinhas e baleias, ingestão de tampas de garrafas plásticas por aves marinhas, morte de focas por ingestão de plásticos provenientes de embalagens, dentre outros (CONTATO *et al.*, 2003).

Visando remediar a concentração de plásticos no meio ambiente têm sido utilizados processos biotecnológicos através da produção de enzimas por micro-organismos. Dentre esses processos, a biodegradação tem atraído interesse público, como uma estratégia eficaz e econômica para remoção de diversos poluentes (MAJEAU *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, a enzima lacase ganhou aplicação em vários campos da indústria, como têxteis, de papel e celulose, e alimentos. Recentemente, também é utilizada em biossensores, células de biocombustível, e agente de biorremediação para limpar herbicidas, pesticidas e certos explosivos no solo. Além disso, essas enzimas têm recebido atenção de pesquisadores devido à sua capacidade para biodegradação de compostos fenólicos altamente recalcitrantes considerados poluentes ambientais (COUTO e HERRERA, 2006; SHRADDHA *et al.*, 2011).

A biodegradação dos plásticos é, geralmente, um processo heterogêneo devido à insolubilidade em água e do tamanho das moléculas dos polímeros. Os micro-organismos atacam os polímeros por meio da excreção de enzimas extracelulares despolimerizantes (MULLER, 2006). Os efeitos esperados quanto ao crescimento microbiano em polímeros sintéticos são: ataque da superfície do polímero, descoloração e perda de transparência. Estes efeitos estão associados à umidade e mudanças no pH provocadas pela excreção de metabólitos (ASTM G21-90, 1990).

2.3 BASIDIOMICETOS E A DEGRADAÇÃO DA LIGNINA

Os fungos basidiomicetos, em sua maioria, utilizam-se de compostos da madeira para nutrição. Entre os basidiomicetos degradadores de madeira são conhecidos dois grupos:

- 1) Fungos causadores da podridão parda, que degradam principalmente celulose e hemicelulose. Os organismos desse grupo deixam a madeira com aspecto amorfo e desintegrado ao final do processo de degradação, restando apenas moléculas de lignina modificada de coloração parda.
- 2) Fungos causadores da podridão branca apresentam sistemas enzimáticos capazes de utilizar fontes complexas de carbono, degradando celulose, hemicelulose e lignina, além de deixar a madeira com aspecto esponjoso, fibroso ou laminado e com cor esbranquiçada, o que caracteriza o nome do grupo.

Durante a evolução, apenas os fungos basidiomicetos causadores da podridão branca na madeira conseguiram desenvolver um mecanismo capaz de degradar eficientemente a lignina, chamados lignocelulolíticos. Esses organismos são providos de um sistema enzimático capaz de transformar fontes complexas de carbono, como a lignina, em água e gás carbônico, o que os torna os organismos mais eficientes na degradação da lignina, sendo importantes no ciclo do carbono (WESENBERG *et al.*, 2003).

Segundo Wessels (1994), os basidiomicetos ligninolíticos secretam enzimas que convertem os polímeros externos em moléculas menores, que são assimiladas e utilizadas como nutrientes. A secreção de proteínas parece ocorrer durante o crescimento apical das hifas, sendo liberadas pela parede celular recém sintetizada.

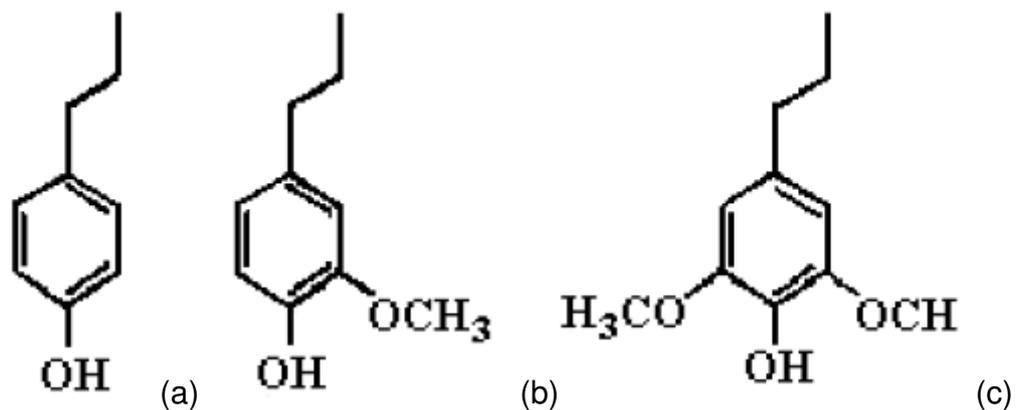
Ao lado de outros micro-organismos, os basidiomicetos ligninolíticos atuam na decomposição da matéria orgânica, dinamizando a ciclagem de nutrientes e regulando o equilíbrio energético dos ecossistemas terrestres (TUOMELA, 2002).

As enzimas extracelulares formadas pelos basidiomicetos na degradação da lignina promovem abstração de elétrons do substrato, levando à formação de espécies radicais, as quais atuam na despolimerização da lignina e de uma série de compostos tóxicos e recalcitrantes (FABBRINI *et al.*, 2002, SHAH e NERUD, 2002, MIKOLASCH e SCHAUER, 2009).

A lignina é o segundo polímero natural mais abundante no planeta, ficando atrás apenas da celulose. Esse biopolímero aromático heterogêneo constitui de 20-30% da parede celular vegetal. A lignina é também o polímero natural mais rico em anéis aromáticos, representando cerca de 40% da energia solar estocada nos vegetais. Este polímero confere rigidez à parede celular e aos tecidos das plantas vasculares, e está envolvida no transporte de água em plantas superiores, além de formar uma barreira contra o ataque microbiano, pois protege os polissacarídeos facilmente assimiláveis (HOFRICHTER, 2002).

A Figura 2 mostra as estruturas dos precursores majoritários da lignina que são: (a) álcool cumarílico, (b) álcool coniferílico e (c) álcool sinapílico.

Figura 2 – Estruturas dos precursores majoritários da lignina



Fonte: KIRK (1971).

A degradação da lignina e de poluentes orgânicos por fungos basidiomicetos constitui um processo oxidativo, extracelular e relativamente inespecífico, que ocorre em função da ação coordenada de uma série de enzimas do grupo das oxidoreduções, representadas principalmente por lacases, manganês peroxidases, lignina peroxidases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio e de compostos metabólitos intermediários de baixa massa molecular (KIRK e FARRELL 1987, VARES *et al.*, 1995; LEONOWICZ *et al.*, 1999; MAYER e STAPLES, 2002; SUGIURA *et al.*, 2003).

A atividade das enzimas ligninolíticas produzidas por estes fungos podem ser determinadas através de espectrofotometria UV/VIS, em reação em que acompanha

a formação de produto oxidado pela enzima. Os resultados são expressos pela Lei de Lambert-Beer em unidades enzimáticas (U), onde 1U é a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de produto por minuto sob condições definidas. Os substratos enzimáticos mais utilizados para a determinação das atividades de lacases, lignina peroxidases (LiP) e manganês peroxidases (MnP) são o ABTS, o álcool veratrílico e o vermelho de fenol, respectivamente (KUWAHARA *et al.*, 1984; TIEN e KIRK, 1984; BOURBONNAIS e PAICE, 1988). Estes métodos são simples, versáteis, muito sensíveis e de baixo custo.

2.4 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

As enzimas ligninolíticas fúngicas são excretadas e atuam na oxidação dos substratos em ambientes externos às células. Essas enzimas são produzidas durante o metabolismo secundário, visto que a oxidação da lignina, bem como de compostos poluentes, não fornece energia para o fungo (HOFRICHTER, 2002).

Segundo Barr e Aust (1994) a natureza inespecífica do sistema enzimático dos fungos causadores de podridão branca permite que esses organismos degradem a lignina, bem como uma grande variedade de compostos químicos estruturalmente diferentes, até sua mineralização, sendo que o nível de degradação intensifica-se a partir do contato dos fungos com os poluentes. No entanto, este contato geralmente não ocorre originalmente em ambientes contaminados, já que estes fungos estão presentes principalmente em madeira e, com menor frequência, no solo e na água. A inespecificidade dos mecanismos de degradação por basidiomicetos pode oferecer as seguintes vantagens para os processos de biorremediação (MATHEUS e MACHADO, 2002):

Como o sistema enzimático responsável pela degradação é extracelular, pode atuar em substratos insolúveis ou complexados ao solo;

- 1) A inespecificidade do complexo enzimático permite a sua utilização para uma ampla variedade de poluentes orgânicos e para misturas deles;
- 2) O sistema enzimático não precisa ser induzido pela presença da lignina ou do composto poluente;
- 3) Materiais lignocelulósicos podem ser usados como fonte de carbono, o que confere uma vantagem econômica ao uso desse grupo de fungos;

Em alguns casos, tem-se verificado a expressão de enzimas ligninolíticas, peroxidases e fenoloxidasas, sob depleção de carbono ou nitrogênio (KIRK e

FARREL, 1987). Alguns fungos produzem tanto peroxidases quanto fenoloxidasas, enquanto outros produzem apenas uma classe enzimática, sendo que na maioria das espécies fúngicas, estas enzimas são expressas como isoenzimas (ROTHSCHILD *et al.*, 2002; WESENBERG *et al.*, 2003).

De acordo com Poiting (2001), as principais enzimas ligninolíticas produzidas por fungos de degradação branca envolvidos na degradação da lignina são Lignina peroxidases (LiP), Mangânes peroxidases (MnP) e Lacase.

Hoje, sabe-se que as enzimas LiPs e MnPs são comumente encontradas em fungos que degradam a lignina. Essas enzimas foram descobertas no meio extracelular em que *Phanerochaete chrysosporium* foi cultivado sob condições de limitação de nitrogênio. LiPs catalizam diversas reações de oxidação, todas elas dependentes de H₂O₂. O princípio de funcionamento das MnPs é oxidar Mn²⁺ a Mn³⁺ usando H₂O₂ como oxidante. Essas duas enzimas possuem o grupo prostético heme (Fe-protoporfirina IX).

2.4.1 Lacases

Segundo Galhaup *et al.* (2002) a primeira referência da ocorrência de lacases em fungos foi feita provavelmente em 1897. A lacase foi descrita pela primeira vez por Yoshida em 1883, sendo, portanto, uma das primeiras enzimas já descritas (SHLEEV *et al.*, 2005, RODGERS *et al.*, 2009).

As lacases são glicoproteínas monoméricas, diméricas ou tetraméricas com quatro átomos de cobre por monômero, localizados no sítio catalítico. Apresentam um papel multifuncional na natureza, sendo amplamente difundidas entre plantas superiores, alguns insetos, bactérias e fungos e estão envolvidas em várias funções fisiológicas. Em tecidos lenhosos esta enzima está envolvida na síntese da lignina. Alguns autores acreditam que lacases sejam responsáveis pela pigmentação em *Aspergillus nidulans* e *A. fumigatus*, bem como, pela morfogênese do fungo comestível *Lentinula edodes* (MAYER e STAPLES, 2002). No patógeno humano *Cryptococcus neoformans*, a lacase fortemente ligada à parede celular pode contribuir para a resistência a fungicidas (ZHU *et al.*, 2001). Em fungos basidiomicetos, as lacases fazem parte do mecanismo enzimático que possibilita a degradação da lignina e de compostos relacionados a ela (LI *et al.*, 1999).

Diferentemente das peroxidases, as Lacases requerem uma molécula de oxigênio como co-substrato. As Lacases possuem uma ampla variedade de substratos, característica atualmente explorada em aplicações industriais e processos de biorremediação (ASGHER *et al.*, 2008, LUNDELL *et al.*, 2010).

Estas enzimas são capazes de catalisar a oxidação de vários compostos aromáticos, principalmente fenóis, com a concomitante redução do oxigênio à água (RODGERS *et al.*, 2009; DURÁN *et al.*, 2002; POZDNYAKOVA *et al.*, 2006). São glicoproteínas constituídas de carboidratos como hexosamina, glicose, manose, galactose, fucose e arabinose, e possuem cobre no sítio ativo, em geral quatro átomos por molécula, mas este número pode variar de dois a quatro (YAROLOV *et al.*, 1994). Podem ser encontradas intra, extracelularmente (DEKKER e BARBOSA, 2001; SAPARRAT *et al.*, 2002) ou associadas à parede celular (ZHU *et al.*, 2001).

Comumente, as lacases fúngicas extracelulares apresentam de 10 a 25% de glicosilação, entretanto já foram detectados níveis de glicosilação de 32% e 44% para lacases de *Corioloopsis fulvocinnerea* (SHLEEV *et al.*, 2005) e *Pleurotus pulmonarius* (De SOUZA e PERALTA, 2003), respectivamente. Todavia, baixo conteúdo de glicosilação foi verificado para lacase I e lacase II de *Pleurotus eryngii*, 7% e 1%, respectivamente. A glicosilação das lacases é importante para que estas sejam protegidas contra a ação proteolítica (BALDRIAN, 2006).

Estudando lacases de fungos, Baldrian (2006) verificou que o pH ótimo de reação, tendo ABTS como substrato, estava na faixa ácida (abaixo de 4), enquanto que para substratos como o DMP (2,6 dimetoxifenol), guaicol e seringaldazina as lacases exibiam valores mais altos, entre 4 e 7. Já a temperatura ótima de reação dessas enzimas estava na faixa de 50 °C a 70 °C, sendo que em poucos casos as lacases apresentaram temperatura ótima abaixo de 45°C.

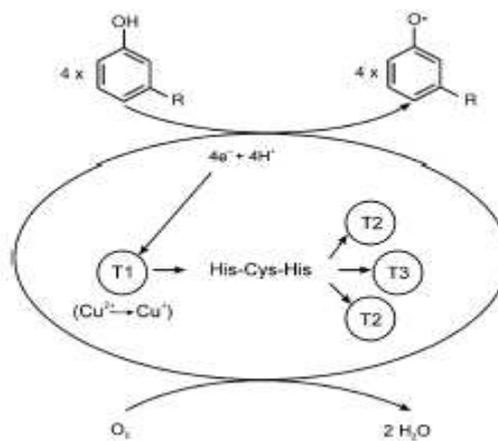
Os íons de cobre das lacases são distribuídos entre diferentes sítios de ligação, sendo classificados em três tipos: Cobre tipo 1, 2 e 3 (T1, T2 e T3, respectivamente), que se diferenciam pelas propriedades características. As propriedades de cada um dos sítios de cobre conferem a eles um importante papel no mecanismo catalítico da enzima (DURÁN e ESPOSITO, 2000).

O sítio de cobre T1 fornece a cor azul à proteína e contém um único íon de cobre, o qual apresenta forte absorção a 600 nm. Os sítios de cobre T1 e T2 estão envolvidos na captura e/ou transferência de elétrons. Os sítios T2 e T3 formam um

aglomerado trinuclear que é responsável pela ligação e redução do oxigênio (SHAH e NERUD, 2002, RODGERS *et al.*, 2009).

No ciclo catalítico das lacases verifica-se que os substratos fenólicos são oxidados pelo sítio de cobre T1 e os elétrons extraídos são transferidos por meio de uma seqüência fortemente conservada do tripeptídeo His-Cys-His, aos sítios T2 e T3, onde o oxigênio, molecular é reduzido à água conforme apresentado na Figura 3 (BALDRIAN, 2006).

Figura 3: Ciclo catalítico da lacase



Fonte: BALDRIAN (2006)

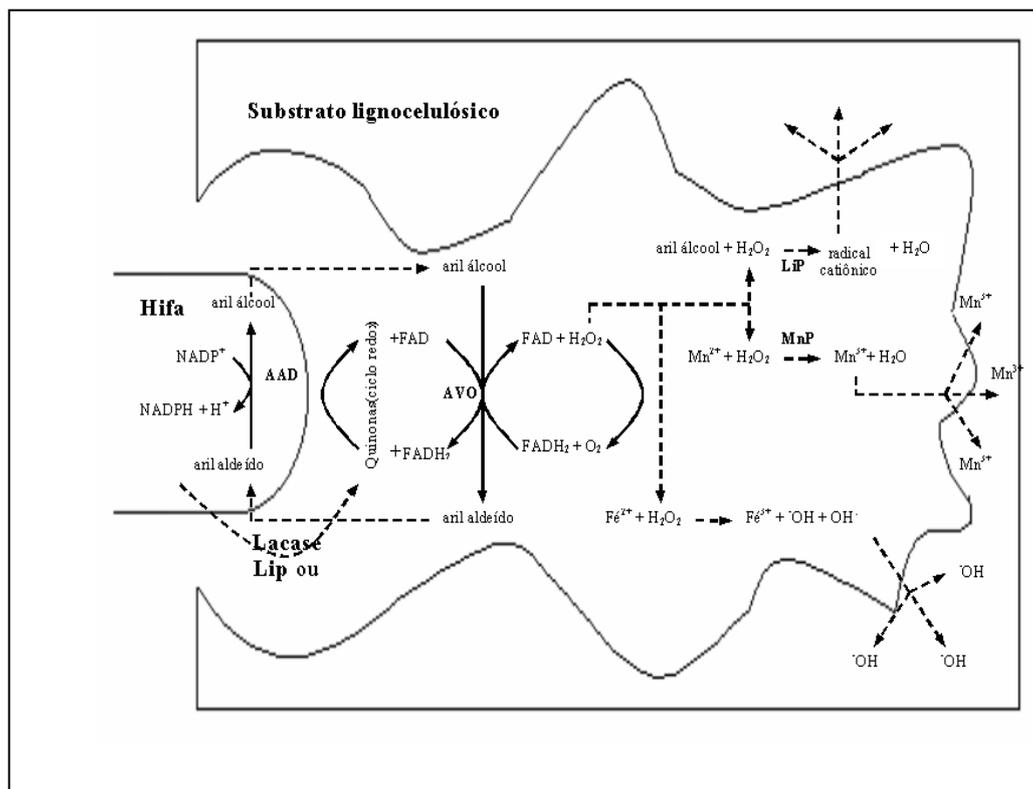
As lacases não conseguem oxidar estruturas não fenólicas da lignina por causa do seu baixo potencial redox. Contudo, uma lacase de *Trametes versicolor* foi capaz de oxidar álcool veratrílico e dímeros não fenólicos de lignina na presença de 2,2-azinobis-(3-ethyl benzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS), substância que atuou como mediador redox da lacase. Depois da oxidação do ABTS a radicais catiônicos, o mediador pode oxidar substâncias com alto potencial redox como os compostos não fenólicos da lignina, os quais representam cerca de 90% da matriz da lignina e não são atacados pela lacase na ausência de mediadores (BOURBONNAIS e PAICE, 1990). O interesse para aplicação biotecnológica das lacases aumentou a partir da descoberta da sua habilidade de oxidar substratos de alto potencial redox na presença de mediadores, uma vez que o uso de mediadores permite a oxidação de uma variedade de compostos poluentes (MARTINEZ *et al.*, 2005).

Apesar de existirem muitas pesquisas sobre a fisiologia das enzimas ligninolíticas, o mecanismo de degradação da lignina, tal como da oxidação de

compostos poluentes, não está completamente entendido. A dificuldade de compreensão da degradação desses compostos relaciona-se à complexidade do processo de biodegradação, que além das enzimas ligninolíticas pode ser afetado por outros sistemas enzimáticos e também por fatores não enzimáticos, entre os quais pode-se citar os cofatores de baixas massas moleculares que servem como mediadores de óxido-redução – mediadores redox (MESTER e TIEN, 2000), os níveis de H_2O_2 e os radicais hidroxilas produzidos pelos fungos (HAMMEL *et al.*, 2002, SHAH e NERUD, 2002).

Na Figura 4 estão apresentados de forma esquemática os fatores envolvidos na degradação da lignina por fungos basidiomicetos.

Figura 4: Modelo de transformação de substratos lignocelulósicos por enzimas ligninolíticas, fatores de mediação e radicais reativos.



Fonte: Modificado de LEONOWICZ *et al.* (1999)

Os mediadores redox são produzidos como resultado do metabolismo secundário dos basidiomicetos e iniciam o processo de degradação da lignina, atuando como mensageiros das enzimas. O mediador é oxidado pela enzima e se difunde no substrato oxidando-o. Em seguida, o mediador retorna à sua condição

inicial. O mediador oxidado conta com um mecanismo de oxidação não disponível para a enzima (FABBRINI *et al.*, 2002), visto que esta é tão grande que não consegue penetrar na madeira (JUNG *et al.*, 2002). Assim, as células fúngicas produzem mediadores que são excretados para o meio extracelular antes das enzimas e que, conseqüentemente, participam da oxidação da lignina.

Entre os mediadores naturais pode-se citar o álcool veratrílico, oxalato, malonato, fumarato, ácido 3-hidroxi antranílico (3-HAA) (LEONOWICZ *et al.*, 1999) e 2-cloro-1,4-dimetoxibenzeno (2Cl-1,4DMB) (WESENBERG *et al.*, 2003). Além dos mediadores naturais, é possível notar na literatura a importância de mediadores sintéticos, dentre os quais se destacam o 2,2'-azino bis- (3 ethylbenzenthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 1-hydroxybenzotriazole (HBT) e ácido violúrico (WESENBERG *et al.*, 2003).

A lacase em conjunto com mediadores torna-se capaz de degradar também estruturas não fenólicas da lignina (BOURBONNAIS *et al.*, 1996, CALL e MUCKE, 1997). Vários metabólitos fúngicos com função de mediadores da lacase foram isolados, entre eles pode-se citar o ácido 3-hidroxiantranílico que foi o primeiro mediador descrito para a lacase (EGGERT *et al.*, 1996).

Entre os mediadores sintéticos destaca-se o ABTS 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), descrito como um bom mediador redox, que favorece o ataque a compostos não fenólicos da lignina. Em adição a esses mediadores, o corante azul brilhante de remazol R (RBBR) também auxilia em reações de deslignificação por lacase (BOURBONNAIS *et al.*, 1996).

A adição de detergentes, como o Tween-20 e o Tween- 80, também podem estimular a produção de lacases (POINTING *et al.*, 2000). Esses surfactantes não-iônicos têm sido utilizados para aumentar a viabilidade das reações entre as enzimas e seus respectivos substratos. O Tween estimula a secreção de proteínas em micro-organismos, além de alterar a morfologia e a superfície da parede celular de fungos (POZDNYAKOVA *et al.*, 2004).

As lacases apresentam grande número de aplicações biotecnológicas, incluindo processamento de vinho e sucos, delignificação e biobranqueamento de polpa kraft, descoloração de corantes têxteis, tratamento de resíduos líquidos, aumento da digestibilidade de materiais lignocelulósicos e também biorremediação de solos (COUTO e HERRERA, 2006).

Nos últimos anos, trabalhos sobre lacases têm sido publicados devido ao envolvimento dessas enzimas em processos de biorremediação e pelo potencial destas para o desenvolvimento de biosensores (GOMES e REBELO, 2003; SHLEEV *et al.*, 2005) e de cátodos de hidrogênio em células de combustível (SHLEEV *et al.*, 2005).

2.5 ENZIMAS CELULOLÍTICAS

As celulases são enzimas responsáveis pela hidrólise da ligação β -1,4-glicosídica da cadeia da celulose, que é o principal componente da parede celular da biomassa vegetal. Os principais obstáculos à exploração em potencial da celulase são rendimento, estabilidade, especificidade e custos de produção (MD *et al.*, 2008).

De acordo com Gilkes *et al.* (1991), as enzimas endoglicanases, exoglucanases e beta-glicosidases fazem parte do grupo das celulases e são descritas como um grupo complexo de enzimas com ação sinérgica.

As Endoglicanases são enzimas que agem na região interna da fibra de celulose catalisam a hidrólise interna de ligações β -1,4-D-glicosídicas da celulose. Podem hidrolisar também ligações β -1,4 em D-glicanas que contenham ligações β -1,3. As endoglicanases são também conhecidas como celulases, endo β -1,4 glicanases e carboximetilcelulases. Seu substrato natural é a celulose e xiloglicana, apresentando especificidade variável sobre carboximetilcelulose (CMC), Avicel (celulose cristalina), β glicana e xilana (GILKES *et al.*, 1991).

A exoglicanase conhecida também como celulose beta-1,4-celobiosidase, celobiohidrolase, β -1,4 celobiohidrolase ou Avicelase. Agem nas extremidades das fibras de celulose e liberam unidades de glicose (livres) ou celobiose das extremidades não redutoras das cadeias (GILKES *et al.*, 1991).

A β beta-glicosidase conhecida como gentobiase, celobiase e amígdalase, catalisa a hidrólise de resíduos β -D-glicose terminais não redutores, liberando unidades de β -D-glicose. Apresenta ampla especificidade por β -D-glicosídeos, podendo hidrolisar também β -D-galactosídeos, α -L-arabinosídeos, β -D-xilosídeos e β -D-fucosídeos (GILKES *et al.*, 1991).

As celulases são utilizadas em diversas aplicações industriais. Na indústria têxtil são usadas no clareamento e amaciamento das fibras têxteis, também são utilizadas como aditivo no preparo de enzimas digestivas, como componente de

detergentes, no tratamento de águas residuais, na indústria de alimentos para aumentar o rendimento da extração de amido e óleos vegetais e como aditivos de ração animal, aumentando a digestibilidade das fibras da parede celular vegetal (BHAT e BHAT, 1997).

A partir de 1980, as celulasas foram introduzidas na indústria têxtil e de detergentes, passando a ser um importante componente do mercado mundial de enzimas, e vêm sendo usadas também, muito eficientemente, em detergentes enzimáticos biodegradáveis (MITIDIERI *et al.*, 2002).

O interesse por essas enzimas tem aumentado muito devido a sua utilização no processo de produção de etanol a partir de resíduos vegetais como bagaço e palha de cana, talos, sabugo e palha de milho, cascas de arroz e demais grãos, além de restos de madeiras, os chamados materiais lignocelulósicos. Apesar dessa potencialidade, essas enzimas apresentam limitações tecnológicas como alto custo e baixa produtividade, porém para aperfeiçoar o uso dessas enzimas, as pesquisas e aplicações das celulasas estão em contínuo desenvolvimento.

Podem-se apontar como novos campos de pesquisas a seleção de novos micro-organismos celulolíticos a partir de técnicas avançadas de engenharia genética (MIURA *et al.*, 2004). Além disso, Meyer *et al.* (2009) indicam o uso de enzimas auxiliares como as xilanases e as feruloil esterase para a completa hidrólise da polpa celulósica (celulose + hemicelulose).

2.6 FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA

A fermentação semissólida (FSS) consiste em um único processo, no qual o micro-organismo cresce sobre partículas na matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) está a um nível de água que assegura o crescimento e o metabolismo das células e não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (PANDEY *et al.*, 2000).

A FES é um processo bastante promissor na produção de vários produtos, inclusive enzimas. Dentre as vantagens desse processo, podemos citar: simplicidade dos meios de cultivo (necessita normalmente do ingrediente principal e de água para umedecê-lo); requer menor espaço e energia; minimiza os riscos de contaminação microbiana, devido ao baixo teor de umidade do meio; gera menor volume de efluentes; o crescimento celular ocorre em condições mais parecidas com

as dos habitats naturais; possibilidade de utilizar como substratos resíduos agrícolas ou agroindustriais como fonte de carbono e energia, além de permitir ao fungo produzir um complexo natural de enzimas, ao invés de produzir apenas uma enzima (BON *et al.*, 2008).

A síntese microbiana de enzimas em um sistema de fermentação semissólida incluem os seguintes fatores: seleção de um substrato satisfatório com porosidade e partículas de tamanhos adequados para facilitar a acessibilidade e a penetração do organismo no substrato; micro-organismos adequados, onde os mais utilizados são os fungos filamentosos, devido as suas características fisiológicas, bioquímicas e enzimológicas; pré-tratamento do substrato para que seja capaz de absorver fontes nutricionais de carboidratos, nitrogênios e sais minerais, necessários para o crescimento microbiano; umidade e Atividade de água (A_w) do substrato; temperatura da fermentação; período de cultivo; manutenção de uniformidade do sistema de cultivo e taxa de consumo de oxigênio (RAIMBAULT, 1998; PANDEY *et al.*, 1999; PANDEY *et al.*, 2000).

2.7 ESTADO DA ARTE

Diversos resíduos agrícolas lignocelulósicos existentes no Brasil têm sido utilizados para produção de enzimas, tais como palhas, cascas de frutas, sabugo de milho, bagaço de cana-de-açúcar, e outros de natureza orgânica.

Segundo Oliveira (2010), o resíduo da casca de coco verde utilizado como fonte alternativa para produção de celulasas se revelou como ótimo substrato indutor, pois de acordo com os resultados obtidos para atividade enzimática que foi de $1,26 \pm 0,09$ U/g pode-se afirmar que a linhagem isolada (CZ01) da casca do coco é boa produtora de celulasas quando comparadas com as linhagens *Trichoderma polysporum*, *T. viride*, *T. reesei* NRRL 11460 e *Aspergillus niger* NRRL 2001. O critério de seleção da melhor atividade produtora de celulasas foi baseada na quantificação da atividade enzimática obtida a partir de fermentação semissólida e submersa. A linhagem CZ01 cresceu facilmente em substrato semissólido lignificado, além de apresentar elevada atividade no extrato enzimático bruto, quando comparada com outros produtores enzimáticos.

Pandey *et al.* (2012) estudaram a degradação de bagaço de cana-de-açúcar por *Pleurotus citrinus pileatus* e observaram que esse fungo degradou lignina,

celulose e hemicelulose, além de verificar a correlação positiva entre a biodegradação dos resíduos em termos de perda de lignina, celulose e hemicelulose com a atividade das enzimas celulasas, xilanase, lacase e polifenol oxidase. Verificaram também que o teor de carbono do bagaço de cana diminuiu enquanto, o conteúdo de nitrogênio aumentou durante a degradação dos resíduos.

Vários autores têm mostrado o potencial de resíduos agrícolas para produção de celulasas. Segundo Maurya *et al.* (2012), o fungo *Trichoderma reesei* NCIM 992 tem a capacidade de produzir celulase a partir de diferentes materiais lignocelulósicos por fermentação semissólida (FES). Diferentes parâmetros (pH, temperatura, teor de umidade, dentre outros fatores) foram analisados nesse estudo, onde a produção máxima de celulase foi de 2,63 U ml⁻¹ utilizando farelo de trigo como substrato. As condições ideais para produção dessa enzima foram: umidade inicial de 70%, pH inicial do meio 5.0 e temperatura de 30°C.

Victor *et al.* (2003) obtiveram 0,0743, 0,0573 e 0,0502 U/mL de celulase dentro de 120h de fermentação quando serragem, bagaço de cana e sabugo de milho, respectivamente, foram utilizadas como substratos a partir de uma cepa de *Aspergillus flavus*. Lopes *et al.* (2008), estudando a produção de celulase por *Trichoderma* sp. T676 por fermentação semissólida com bagaço de cana-de-açúcar, encontraram uma atividade enzimática de 0,042 U/mL em 72 horas de fermentação.

Segundo Gutierrez-Correa e Tengerdy (1997) o bagaço de cana, em cultura mista de *Trichoderma reesei* LMUC4 e *Aspergillus phoenicis*, induziu a produção de celulase total atingindo 13,4 U/g, após 120 horas de incubação a 30°C. Já Rodriguez-Zúñig *et al.* (2011) encontraram valor mais baixo 0,3 U/g de CMCase obtida em 72h a partir do mesmo resíduo, utilizando *Aspergillus niger*.

Guimarães e Conrado (2011) ao estudar a produção de enzimas celulolíticas por fermentação semissólida em bagaço de caju deslignificado, obtiveram atividade de CMCase igual a 0,73 U/g usando o *Trichoderma* sp. Campos (2011) ao realizar fermentação semissólida com bagaço de caju para produção de celulasas utilizando condições otimizadas com fungo filamentoso *Trichoderma* sp, obteve valores de atividade enzimática expressa em CMCase, que foi de 0,77 U/g.

Muito esforço tem sido gasto para tentar reduzir os custos de produção de lacases produzidas por linhagens selvagens de fungos filamentosos através do seu crescimento em biorreatores. Isto tem sido alcançado por meio da otimização das condições de crescimento ajustando os parâmetros ambientais, como temperatura e

pH (RODGERS et al, 2009). Segundo Shraddha *et al.* (2011), o valor de pH ótimo varia de acordo com o substrato. A Tabela 5 mostra alguns trabalhos com diferentes valores de pH ótimo para lacases de basidiomicetos.

Tabela 5: Valores de pH ótimo para lacases de basidiomicetos.

Fonte de lacase	Substrato para Atividade	pH ótimo	Referência
<i>Coriolus hirsutus</i>	ABTS	2,5	Shin e Lee (2000)
	DMF	4	
<i>Coriolopsis rígida</i>	ABTS	2,5	Saparrat <i>et al.</i> (2002)
	DMF	3	
<i>Lentinus tigrinus</i>	DMF	3	Lechner e Papinutti (2006)
Linhagem I-4 (família Chaetomiaceae)	Siringaldazina	7	Saito <i>et al.</i> (2003)
Linhagem UD4	ABTS	4	Jordaan <i>et al.</i> (2004)
	Guaiacol	6	
	DMAB-MBTH	6	
	Ácido siríngico	4,5	
<i>Peniophora sp.</i>	Guaiacol	4	Niku-Paavola <i>et al.</i> (2004)
<i>Phellinus ribis</i>	DMF	4-6	Min <i>et al.</i> (2001)
	ABTS	5	
	siringaldazina	6	
<i>Pleurotus ostreatus</i> D1	ABTS	4	Pozdnyakova <i>et al.</i> (2004)
	DMF	4	
	Siringaldazina	7	
<i>Polyporus pinsitus</i>	ABTS	3	Heinzkill <i>et al.</i> (1998)
<i>Psilocybe castanella</i> CCB444	ABTS	2,5	Coelho <i>et al.</i> (2005)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	ABTS	2,4	Ryan <i>et al.</i> (2003)
<i>Trametes trogii</i>	ABTS	2	Zouari-Mechichi <i>et al.</i> (2006)
	DMF	2,5	
<i>Trametes versicolor</i>	ABTS	5,5	Brown <i>et al.</i> (2002)

Fonte: MOREIRA-NETO (2006)

A faixa de temperatura ideal para produção de lacase encontra-se entre 25°C e 30°C, segundo Shraddha *et al.*, 2011. Farnet *et al.* (2000) descobriram que a pré-incubação de enzimas a 40°C e 50°C torna a atividade de lacase muito maior. Nyanhongo *et al.* (2002) demonstraram que a lacase produzida por *T. modesta* era totalmente ativa a 50°C e era muito estável em 40°C, mas sua atividade diminuiu para 120 minutos à temperatura mais elevada (60°C).

Silvério *et al.* (2012) compararam a produção de lacase pelas espécies *Peniophora cinerea* e *Trametes versicolor* utilizando como suporte para o crescimento dos micro-organismos uma fibra sintética comercial e incubação de 30 dias a temperatura de 28°C. Foi verificado nas atividades analisadas a cada cinco dias de fermentação que *P. cinerea* (3.500 U/L) superou a produção dessa enzima por *T. versicolor* livre (800 U/L).

Visando reduzir a quantidade de resíduos da cana-de-açúcar produzidos atualmente pela agroindústria brasileira, Ferreira *et al.* (2011) sugeriram a utilização do bagaço de cana-de-açúcar como substrato para avaliação da atividade ligninocelulolítica de fungos isolados da serrapilheira da Caatinga. Observaram nesse trabalho que a linhagem fúngica isolada apresentou as seguintes atividades enzimáticas: Lignina Peroxidase (4,9046 U.L⁻¹), Lacase (54,9148 U.L⁻¹), Endoglucanase (4,4966 U.L⁻¹), β-glicosidase (5,1494 U.L⁻¹) sendo que não foi verificada nenhuma atividade para as enzimas Manganês Peroxidase e Xilanase.

Regina *et al.* (2012) avaliaram as linhagens de *Pleurotus sp.*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus Eryngii* na produção de lacase, utilizando como substrato, extrato líquido de sabugo de milho e em meio sólido à base de sabugo de milho, sem adicionar outras fontes de nutrientes. Foi verificado nesse trabalho que a linhagem de *Pleurotus ostreatus* produziu os maiores títulos de lacase no meio líquido (1,2 U L⁻¹) e também no sólido (~ 2,8 U kg⁻¹) dentre as três linhagens avaliadas.

Souza e Rosado (2009) avaliaram a utilização de fungos basidiomicetos em biodegradação de efluentes têxteis e verificaram a importância desses micro-organismos no tratamento biológico. Nesse trabalho foram destacados os fungos basidiomicetos de podridão branca (White-rot fungi), produtores de enzimas ligninolíticas, como as enzimas Lignina Peroxidase (LiPs), manganês peroxidase (MnPs) e lacases.

Zhao *et al.* (2010) analisaram a aplicação da lacase produzida por fungos de podridão branca (*polyporus*) para remover Dicloro-difenil-tricloroetano no solo. Os resultados mostraram que a lacase pode efetivamente degradar dicloro-difenil-tricloroetano e que os resíduos de quase todos os componentes de dicloro-difenil-tricloroetano em solos tratados com lacase diminuiu rapidamente durante os primeiros 15 dias e, em seguida, foi mantida a um nível estável durante os 10 dias

seguintes. Em solos com diferentes dosagens de lacase, os resíduos totais de dicloro-difenil-tricloroetano diminuíram, cerca de, 21-32%, 29-45%, 35-51% e 36-51% após 5, 10, 15 e 25 dias de incubação, respectivamente.

A lacase produzida pelo fungo de podridão branca *Trametes pubescens* CBS 696.94 foi analisada na biodegradação de uma mistura de 2-clorofenol (2-CP), 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCP) e pentaclorofenol (PCP). A atividade dessa enzima foi determinada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando 2,2 3-etilbenzotiazolina-6, ABTS e siringaldazina. A biodegradação de 100%, 99%, 82,1% e 41,1% para os 2-CP, 2,4-DCP, 2,4,6-TCP e PCP, respectivamente, foi observado após 4 horas de reação. Com estes resultados mostrou-se a viabilidade de um extrato bruto enzimático de lacase para a redução da concentração e toxicidade de clorofenóis (GAITAN *et al.*, 2011).

Gutiérrez-Soto *et al.* (2011) estudaram a degradação de corantes sintéticos pelo fungo de podridão branca, *Trametes maxima* CU1, associado a produção de lacase. Para isso, foi utilizada como metodologia a fermentação submersa e para purificação enzimática, ultrafiltração e cromatografia de coluna Sephadex G - 200. A utilização desta enzima em águas residuais mostrou o potencial de reparação significativo quando analisados nove corantes têxteis, pertencentes a cinco classes químicas diferentes (monoazo, diazo, triazo, tetrakisazóicos e antraquinônicos). Os resultados mostraram que houve descoloração de 67% na mistura dos nove corantes (concentração total de 450 ppm) em 24 horas com atividade de lacase de 10 UI.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Unidade Acadêmica de Engenharia Química (UAEQ) da Universidade Federal de Campina Grande-PB (UFCG) e no Laboratório de Microbiologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido – CDSA, em Sumé.

3.2 MATÉRIA-PRIMA

A Figura 5 mostra as matérias-primas utilizadas como substratos para realização dos experimentos. O farelo da palha de milho verde, bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de coco verde foram adquiridos nas cidades de Campina Grande-PB e Martins-RN, por meio de comerciantes que tratavam esses resíduos como lixo urbano. A farinha de soja comercial foi utilizada como fonte de nitrogênio para o crescimento do micro-organismo.

Figura 5: Matérias-primas agroindustriais



Foto: Laboratório de Engenharia Bioquímica - LEB, UFCG (2013).

3.3 TRATAMENTO DOS RESÍDUOS

As matérias-primas foram transportadas para o laboratório, lavadas em água clorada a 2,5%, enxaguadas com água corrente e pesadas. Em seguida, todas as matérias-primas, com exceção da farinha de soja comercial foram trituradas em liquidificador industrial ou forrageira, pesadas e colocadas em bandejas de alumínio

em estufa com circulação forçada de ar a temperatura de $55\pm 2^{\circ}\text{C}$ até massa constante. Após a secagem, foram moídas em moinho de facas da marca TECNAL. Em seguida foram homogeneizadas e submetidas à técnica do quarteamento para a retirada de aproximadamente 150g para a realização da caracterização físico-química. O restante das matérias-primas foram armazenadas em recipientes hermeticamente fechados à temperatura ambiente e denominadas de resíduos secos.

3.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS RESÍDUOS SECOS

Foram realizadas em triplicata para cada resíduo as seguintes análises físico-químicas: Umidade, cinzas, carbono orgânico, nitrogênio total, lignina, extrativos e celulose.

3.4.1 Umidade

Foram pesadas 2g de cada resíduo seco em cápsulas de porcelana previamente taradas. As cápsulas contendo as amostras foram colocadas na estufa a 105°C até peso constante. Em seguida foram resfriadas em dessecador até alcançar a temperatura ambiente e pesadas em balança analítica (BRASIL, 2005). A umidade, expressa em base úmida, foi calculada pela Equação 1.

$$U (\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

U: umidade em base úmida;

m_i : massa inicial das amostras (g);

m_f : massa final das amostras (g).

3.4.2 Cinzas

Para a determinação das cinzas, foi utilizada a metodologia descrita em Brasil (2005). Foram colocados cadinhos de porcelana vazios na mufla a 550°C por duas horas. Após este período, os cadinhos foram transferidos para um dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesados. Em cada um dos cadinhos, foi colocado 2g da amostra que foi incinerada na mufla a 550°C, por cinco horas ou até apresentarem coloração ligeiramente acinzentadas. Os cadinhos foram novamente deixados em dessecador para esfriar até atingir a temperatura ambiente e, em seguida, pesados. A porcentagem de cinzas das amostras foi calculada pela Equação 2.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{mf}{mi} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

mf : massa final das amostras (g);

mi: massa inicial das amostras (g).

3.4.3 Determinação do Carbono Orgânico

Para que a relação C/N 90 fosse alcançada, foi feita a determinação de carbono orgânico, segundo o método de Brasil (2005), onde inicialmente calculou-se a umidade e as cinzas dos resíduos secos.

O teor de carbono orgânico foi calculado utilizando-se a seguinte expressão:

$$\% \text{ CO} = \frac{\% \text{ MO}}{f} \quad (3)$$

Onde, %MO = teor de matéria orgânica, determinado por:

$$\% \text{ MO} = \frac{(M1 - M2)}{M1} \times 100 \quad (4)$$

M1 = %U= amostra úmida (g)

M2 = %C = massa após queima a 550°C (g)

f: fator de conversão de C para matéria orgânica 1,724 (face ao conceito de que o teor de C da matéria orgânica do solo é igual a 58%).

3.4.4 Determinação de Nitrogênio total

O teor de nitrogênio foi determinado pelo método semi-micro Kjeldahl, por espectrofotometria UV-visível a 410 nm, segundo o método descrito em Le Poidevin e Robinson (1964). Foram pesados 0,1 gramas das amostras e transferidas para tubos de ensaios. Em seguida foram acrescentados 50 mg de sulfato de sódio, 7 a 10 gotas de sulfato de cobre a 5% e 5 mL de ácido sulfúrico PA. Os tubos foram levados à placa digestora para serem aquecidos gradativamente até a temperatura de 350°C. Em seguida foram deixados nesta temperatura até que a solução apresentasse coloração verde claro. Após resfriamento das amostras digeridas, o conteúdo dos tubos foi transferido com o auxílio de água destilada para balões volumétricos de 100 mL os quais foram aferidos. Dos balões de 100 mL, foram retirados 1mL das amostras e colocados em outros balões volumétricos de 50 mL, nos quais foram adicionados 1 mL de hidróxido de sódio a 10%, 1 mL de silicato de sódio a 20% e 2 mL do reativo de Nessler. Os balões volumétricos de 50 mL foram aferidos com água destilada e deixados em repouso por 30 minutos. Após esse período foram realizadas as leituras em espectrofotômetro num comprimento de onda de 410 nm. Paralelamente foram feitas amostras em branco sem colocar 0,1 gramas das amostras. O teor de nitrogênio total (%) das amostras foi calculado através da Equação 5.

$$\%N = (ABS_{Amostra} - ABS_{Branco}) \times F_c \quad (5)$$

Onde:

$ABS_{Amostra}$: Leitura da absorbância da amostra;

ABS_{Branco} : Leitura da absorbância do branco;

F_c : valor do fator da curva.

3.4.5 Lignina

O teor de lignina dos resíduos foi determinado seguindo a metodologia descrita por Milagres *et al.* (1994). Para o desenvolvimento da metodologia, pesou-se 10 g da amostra, sendo envolto em papel de filtro e deixado num sistema de banho, utilizando ciclo-propano e álcool etílico, por aproximadamente 6 horas. Em seguida, os resíduos foram secos em estufa durante 24 horas. Das amostras lavadas e secas, foi pesado 2 g e posto em um erlenmeyer de 250 mL adicionando 15 mL de H₂SO₄ (72%), mantendo-o sob agitação durante 2 horas. Após esse tempo a pasta negra foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 1 litro de um sistema de refluxo, utilizando 560 mL de água destilada e deixando refluxar por 4 horas. A lignina insolúvel (LI) foi filtrada empregando um cadinho de Gush, com kitassato, acoplado a uma bomba de vácuo, sendo posteriormente seca e pesada. A lignina solúvel (LS) foi determinada medindo-se a absorbância nos comprimentos de onda de 280 e 215 nm do filtrado e o cálculo é feito com base na Equação 6.

$$L_I \text{ (g/L)} = \frac{4,53 (\text{Absorbância}_{215\text{nm}} - \text{Absorbância}_{245\text{nm}})}{300} \quad (6)$$

O teor de lignina total nas amostras analisadas é determinada pela soma da lignina insolúvel, após transformação de unidade de concentração para unidade de massa, e lignina solúvel, como mostrado na Equação 7.

$$L_T \text{ (g)} = L_I + L_S \quad (7)$$

3.4.6 Celulose

O teor de celulose contido nos resíduos foi determinado conforme a metodologia descrita por XU *et al.* (2006). Para o desenvolvimento da metodologia, isolou-se a celulose dos resíduos utilizando-se uma mistura de ácido acético a 80% com ácido nítrico a 70% na proporção de 10:1 (v/v). As amostras foram digeridas por 20 minutos em uma manta aquecedora à temperatura de 110 a 120°C sendo

adicionado hidróxido de sódio para precipitação da celulose. O precipitado foi separado e determinado gravimetricamente como celulose total (FENGEL e WEGENER, 1989).

3.4.7 Extrativos

O teor de extrativos contidos nos resíduos foi determinado empregando um aparelho de Soxhlet, sendo utilizados 5 g de amostra e 200 mL de etanol-ciclohexano a uma proporção 1:2 (v/v). As partículas foram acondicionadas em um cartucho confeccionado com papel de filtro e colocadas dentro do Soxhlet. O solvente foi colocado em um balão de 250 mL, de massa seca conhecida, e o material foi extraído por 6 horas. Após o banho, o material foi levado à estufa até atingir massa constante. Por diferença de massa obteve-se o valor de extrativos em gramas e dividindo-se pela massa da amostra analisada, obtém-se o teor de extrativos em percentual.

3.5 AJUSTE DA RELAÇÃO C/N DOS RESÍDUOS E UMIDADE DE 70%

A relação C/N 90 e umidade de 70% foi utilizada nesse trabalho depois de verificar em estudos anteriores, o papel positivo desses fatores com a produção da enzima lacase e a comprovada influência na degradação de poluentes por fungos de podridão branca (LAMAR e WHITE, 2001; MATHEUS E BONONI, 2002; MATHEUS, 2003; BALLAMINUT, 2007).

Para ajustar a relação C/N para 90, as quantidades de cada componente da mistura foram calculadas através da equação 8 (Adaptado de EMBRAPA, 2001):

$$\text{PRMC} = \frac{(90 \times \text{Nn}) - \text{Cn}}{\text{Cc} - (90 \times \text{Nc})}$$

(8)

PMRC = Partes de Material Rico em Carbono;

Nn = Teor de N do material rico em nitrogênio;

Cn = Teor de carbono (C) do material rico em N;

Cc = Teor de carbono do material rico em C;

Nc = Teor de N do material rico em C.

A umidade inicial do meio foi ajustada para 70% (base úmida) pela adição de um volume definido de água destilada, determinado através do balanço de massa, levando-se em consideração que a densidade da água é igual a 1 g/cm³, calculada seguindo a Equação 9.

$$V_{AA} \text{ (g/cm}^3\text{)} = m_{AA} = \frac{m_i(U_2 - U_1)}{1 - U_2} \quad (9)$$

Onde, V_{AA} = volume de água a ser adicionada ao meio;

m_i = massa do meio a ser umidificado;

U_1 = umidade do meio;

U_2 = umidade do meio desejada.

3.6 TRATAMENTO DOS COPOS PLÁSTICOS

Foram utilizados pedaços de copos descartáveis de polipropileno (PP) cortados na forma de quadrados (1x1cm). Para cada frasco de cultivo foram inseridos dois pedaços de PP. A Figura 6 mostra os polímeros sintéticos utilizados.

Figura 6: Quadrados de copo de Polipropileno - PP



Foto: Laboratório de Engenharia Bioquímica - LEB, UFCG (2013).

As amostras de PP foram pesadas e desinfetadas para eliminação de contaminantes microbianos. Este procedimento foi realizado seguindo um protocolo

desenvolvido e validado pela American Society for Testing Materials (ASTM G22-76, 1990). Os polímeros foram acondicionados em pequenos envelopes, confeccionados com gaze e identificados. Foram colocados em um béquer contendo 1 L de solução desinfetante universal (1L de água destilada, 14,0 mL de detergente Tween 80 e 20 mL de hipoclorito de sódio) e deixados à temperatura ambiente durante 60 minutos, agitando-se ocasionalmente com um bastão de vidro estéril. Em seguida, com o auxílio de uma pinça estéril, o material foi removido e transferido para um béquer com água destilada esterilizada onde permaneceu em temperatura ambiente por 60 minutos. Em seguida, os mesmos foram transferidos para outro béquer com solução etanol 70% por 30 minutos à temperatura ambiente. Por fim, as amostras foram colocadas assepticamente num recipiente estéril e fechado à temperatura ambiente para secagem por um período de 12 dias.

3.7 PROCESSO FERMENTATIVO

3.7.1 Planejamento experimental

O planejamento experimental foi realizado de acordo com a quantidade de variáveis estudadas. Para o processo de fermentação semissólida (FSS) o planejamento experimental consistiu em um delineamento fatorial do tipo 2³.

Foram realizados 8 ensaios utilizando os seguintes mediadores: óleo vegetal, Tween 80 e Azul Brilhante de Remazol (RBBR) 2%. Os extratos enzimáticos obtidos de cada ensaio foram utilizados para avaliar: crescimento microbiano, atividade de lacase, atividade de CMCase, percentual de perda de massa do PP.

A Tabela 6 mostra o planejamento fatorial do tipo 2³.

Tabela 6 - Planejamento fatorial – FSS

VARIÁVEIS	ÓLEO	TWEEN 80	RBBR
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Os resultados foram analisados utilizando-se as técnicas de planejamento experimental com ajuda do software STATISTICA (Statsoft, v.7.0).

3.7.2 Micro-organismo

O fungo basidiomiceto *Psilocybe castanella* (CCIBt 2781) que foi utilizado nesse trabalho pertence a coleção de cultura do Instituto de Botânica de São Paulo. Este fungo foi selecionado no projeto “Avaliação de fungos para biorremediação de solos contaminados com resíduos organoclorados”, desenvolvido mediante convênio entre o Instituto de Botânica, da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo e a Rhodia do Brasil Ltda. O fungo foi mantido em meio ágar extrato de malte (MEA) 2% que continha 2% extrato de malte, 0,1% peptona, 2% glicose e 1,5% de ágar, a 4°C.

3.7.3 Inóculo

Para preparo do inóculo, o fungo *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 foi previamente crescido em placas de Petri contendo MEA 2%, a 25°C, até que o micélio colonizasse toda a placa. A Figura 7 mostra uma colônia de *P. castanella* após 15 dias de incubação a 28° C. Foi utilizada 1/6 da placa picada para inocular cada 20g de substrato sólido.

Figura 7: Colônia de *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 em MEA (2%), após 15 dias de incubação, a 25°C



Foto: Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB), UFCG, 2012

3.7.4 Preparação do sistema de cultivo

O farelo de palha de milho verde foi suplementado com bagaço de cana-de-açúcar (substrato 1) e o bagaço de coco verde foi suplementado com farinha de soja comercial (substrato 2) de modo a ajustar a relação C/N para 90. As amostras do substrato sólido foram acondicionadas em sacos de polipropileno e autoclavadas por 1h a 121°C.

Os experimentos foram realizados em 16 frascos de vidro com capacidade para 200 mL, sendo 8 ensaios contendo o substrato 1, e 8 ensaios contendo o substrato 2. Cada frasco continha 20g do substrato, 1/6 de placa do inóculo fúngico, 2 pedaços de polipropileno (PP), medindo 1cm² e mediadores enzimáticos nas proporções de 1 mL de RBBR, 1 mL de óleo vegetal e 0,1 mL de tween 80.

Os experimentos foram conduzidos à temperatura de 28°C e umidade de 70% controladas em câmara incubadora (modelo MA1415/780 Marconi). Os tempos de fermentações analisados foram 15, 30, 45, e 60 dias. A Figura 8 mostra um sistema de cultivo de *P. castanella* que foi preparado em câmara de fluxo laminar.

Figura 8: Sistema de cultivo de *P. castanella* (Substrato, óleo, tween, RBBR e pedaços de PP).



Foto: Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB), UFCG (2012).

3.7.4.1 Sistema de cultivo

a) Controle biótico

Foram utilizados sistemas de cultivos contendo apenas os substratos submetidos à fermentação semissólida inoculados com os micro-organismos, ou seja, não foram colocados os polímeros. Portanto, eliminou-se a interferência das características dos polímeros. Este controle foi realizado em duplicata, sendo dois frascos para cada período de incubação na temperatura de 28°C, durante 15, 30, 45 e 60 dias.

b) Controle abiótico

Foram utilizados sistemas de cultivos contendo os substratos submetidos à fermentação semissólida juntamente com os polímeros, ou seja, não foram inoculados com os micro-organismo evitando, desta forma, a sua interferência. Este controle foi realizado em duplicata, sendo dois frascos para cada período de incubação.

3.7.5 Análise qualitativa do crescimento microbiano

Através da observação visual, determinou-se quais dos substratos submetidos à fermentação semissólida, apresentaram maior desenvolvimento micelial. Os fungos foram observados e determinados de acordo com o padrão adaptado da ASTM (American Society for Testing Materials), Standard Methods G21-90 (1990), apresentando as seguintes faixas de crescimento:

(-) ausência de crescimento;

(+) pouco crescimento com turvação de pequenos fragmentos de micélio lançados no meio;

(++) moderado crescimento com surgimento de “pellet” fino na superfície do meio;

(+++) ótimo crescimento de massa micelial da metade a todo frasco.

3.8 EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS

A extração do complexo enzimático foi realizada segundo o procedimento descrito por Moreira-Neto (2006). Em cada vidro foram adicionados 60 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8. Foram homogeneizados manualmente por 5 min, seguida de agitação em mesa agitadora a 120 rpm (TECNAL / TE -140) durante 1 hora. O extrato obtido foi filtrado em papel de filtro qualitativo e o sobrenadante recuperado e utilizado para determinação das atividades enzimáticas.

3.9 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Foram analisadas as seguintes enzimas: ligninolítica (lacase) e celulolítica (CMCase).

3.9.1 Determinação da lacase

A mistura de reação para determinação da atividade de lacase continha em 3mL: 750 µL de tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,0; 150 µL de água MilliQ; 300 µL de solução de ABTS 5 mM e 1800 µL de extrato enzimático, de acordo com Machado e Matheus (2006). Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1µMol de ABTS por minuto, sendo a atividade enzimática aqui expressa em UL⁻¹.

Os valores foram obtidos através de cálculos utilizando-se a Equação 10.

$$U/Litro = \frac{\Delta_{abs} \times 10^6}{\epsilon \times R \times t} \quad (10)$$

Onde:

Δ_{abs} = absorvância (final – inicial)

ϵ = absorção molar do ABTS ($\epsilon_{420} = 36\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

R = quantidade de extrato enzimático utilizado

t = tempo de reação utilizado

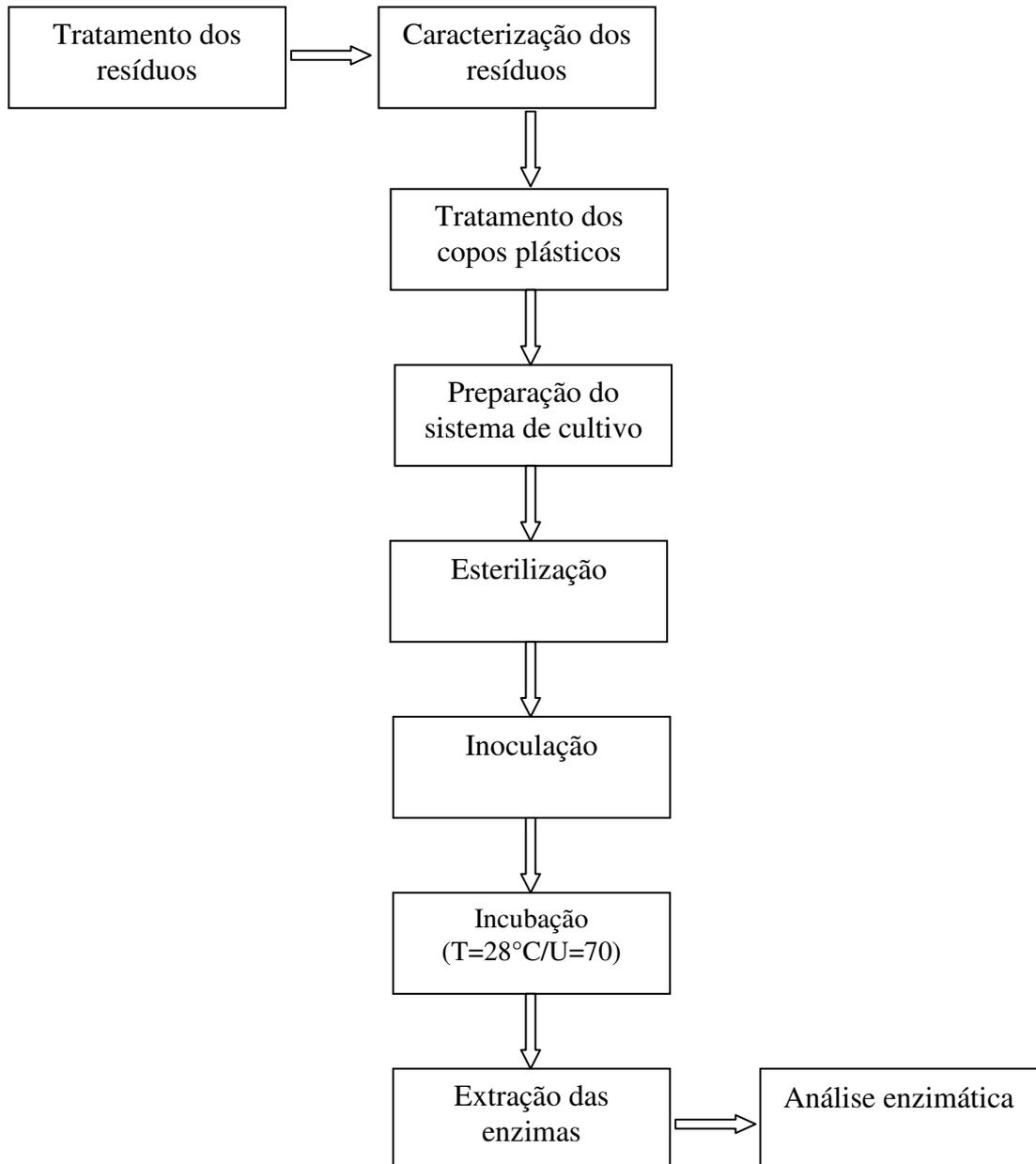
3.9.2 Determinação da CMCase

A atividade de carboximetilcelulases (CMCase) seguiu o procedimento descrito em Menezes (2009), que se baseia na capacidade do extrato enzimático em liberar açúcares redutores na presença de carboximetilcelulose devido à hidrólise da fonte de celulose em glicose. Para a análise, foi colocado em um tubo de ensaio 1mL do extrato enzimático com 1 mL de uma solução de carboximetilcelulose a 1% (m/v), preparada em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5,0, a uma temperatura de 50°C por exatos 60 minutos. Após esse tempo, foi retirado 1mL do tubo de ensaio e colocado em outro tubo de ensaio com 1 mL DNS para determinar a concentração de açúcares redutores que seguiu à metodologia de Miller (1959). Uma amostra em branco foi realizada para cada análise, e ao invés de colocar 1mL do extrato enzimático com 1 mL da solução de carboximetilcelulose, colocou-se 1 mL do extrato enzimático com 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5,0. Dessa forma, determinou-se a concentração de açúcares redutores do extrato enzimático sem a presença da carboximetilcelulose (AR sem CMC) e a concentração de açúcares redutores do extrato enzimático após incubação com a fonte de celulose (AR com CMC). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1μmol de glicose, por minuto, a 50°C e, neste trabalho, a atividade enzimática foi expressa U/g, conforme a Equação 11.

$$\text{CMCase (U/g)} = \frac{\text{AR}_{\text{Liberado}} \times 10^6}{180 \times 60} = \frac{(\text{AR}_{\text{Com CMC}} - \text{AR}_{\text{Sem CMC}}) \times 10^6}{180 \times 60} \quad (11)$$

A Figura 9 apresenta as etapas do processo de fermentação semissólida.

Figura 9 – Etapas dos processos empregados nesse trabalho.



3.10 DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO E ESTABILIDADE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA (LACASE)

O estudo da influência do pH na oxidação do ABTS pelo extrato enzimático foi conduzido com tampão citrato-fosfato (pH 2,5 a 10,0) e tampão acetato de sódio (pH

3,0 a 10,0) a 50 mM. As atividades enzimáticas foram determinadas como descrito na metodologia padrão, alterando-se apenas os valores de pH.

A estabilidade do extrato enzimático em função do pH foi determinada pela atividade enzimática residual, após pré-incubação do extrato enzimático em tampão citrato-fosfato 50 mM e acetato de sódio 50 mM (nos pH ótimo de atividade), durante 24 horas, à temperatura ambiente (metodologia adaptada de MOREIRA-NETO, 2006).

3.11 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA (LACASE)

A influência da temperatura na atividade enzimática do extrato bruto foi verificada na faixa de 25 à 80°C, empregando-se o pH ótimo (metodologia adaptada de MOREIRA-NETO, 2006).

3.12 DETERMINAÇÃO DA PERDA DE MASSA DO PP

As partículas de PP na forma de quadrados foram previamente pesados em balança analítica e em seguida colocadas em estufa a 50°C por 12 horas para determinação do crescimento de massa celular. A determinação da perda de massa dos polímeros foi baseada na metodologia ASTM D5247-92 (1992) que consiste em colocar as amostras em solução de NaOH 5 mol.L⁻¹ por aproximadamente 8 horas para retirada da massa microbiana e em seguida lavar em água corrente e manter em repouso durante 8 horas em água destilada. Após esse período, as amostras foram novamente colocadas em estufa a 50°C por 12 horas para determinação da perda de massa dos PP.

3.13 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO PP – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As amostras de PP foram preparadas para visualização morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de sua superfície, ausente de microrganismos, segundo adaptações do protocolo da ASTM G22-76 (1990).

A caracterização por MEV foi realizada em um Microscópio Eletrônico de Varredura fabricado pela Hitachi, modelo TM-1000, com aumentos de 500x e 3000x, profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30nm e energia fixa de 15kV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270Pa) acoplado com sistema para micro análise químico por Espectroscopia de Energia Dispersiva – EDS, instalado na Universidade Federal de Campina Grande, do Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO) na Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais (UAEMa).

As imagens obtidas foram capturadas pelo computador, acoplado ao MEV, e armazenadas para posterior análise da superfície do PP.

3.14 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Os difratogramas de raios-X das amostras foram obtidos pelo método do pó. Os ensaios foram realizados em difratômetro Shimadzu, modelo XRD 6000, com fonte de radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), obtida por 40kV em corrente de filamento de 30mA. As medidas foram realizadas com o passo de $0,02^\circ$ e em tempo de 0,6 segundo.

Os resultados obtidos na análise de DRX foram utilizados na determinação do espaçamento interplanar (d) e o parâmetro unitário para a rede hexagonal (a_0). O espaçamento interplanar (d_{100}) foi determinado para os índices de Miller (hkl) referente ao pico de reflexão (100) obtido no difratograma de raios-X, e este foi determinado conforme equação apresentada por Percharsky e Zavalij (2005) (Equação 12).

$$d_{100} = \frac{\lambda}{2\text{sen}\theta} \quad (12)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesse capítulo são apresentados os resultados e discussões, começando pela caracterização físico-química dos resíduos secos do bagaço da casca de coco verde, farinha de soja, bagaço de cana-de-açúcar e do farelo da palha de milho verde utilizados como substratos para fermentação semissólida, seguido da apresentação da análise qualitativa do crescimento microbiano nas duas misturas de substratos utilizadas nesse trabalho. Em seguida são mostradas a produção enzimática das enzimas (lacase e CMCase), a avaliação da estabilidade, temperatura e pH ótimos da lacase, e por fim os resultados da degradação dos polímeros plásticos.

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS RESÍDUOS SECOS

Na tabela 7 é apresentada a caracterização físico-química e seus respectivos desvios padrão dos resíduos secos quanto aos valores de umidade, cinzas, carbono, extrativos, lignina, holocelulose, alfa-celulose e hemicelulose. As análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 7 – Caracterização físico-química das matérias-primas.

Parâmetros analisados	Bagaço da casca de coco verde	Farinha de soja comercial	Bagaço de cana-de-açúcar	Farelo da palha de milho verde
Umidade (b.s.) (%)	10,64 (0,08)	-	8,11 (0,00)	8,44 (0,13)
Umidade (b.u.) (%)	9,62 (0,07)	4,97 (0,07)	7,8 (0,16)	7,78 (0,11)
Cinzas (%)	3,61 (0,12)	3,42 (0,74)	0,97 (0,08)	2,47 (0,06)
Teor de Carbono (%)	31,43	18,09	45	56,33
Teor de Nitrogênio (%)	0,27	7,2	0,23	0,4
Extrativos (%)	10.50 (0,08)	-	6,1 (0,17)	18,01 (0,37)
Lignina (%)	24.93 (0.53)	-	14,92 (0,00)	8,07 (0,36)
Holocelulose (%)	45.54 (0.61)	-	70,71 (1,09)	63,58 (1,14)
Alfa-celulose (%)	27.07 (0.51)	-	36,43 (0,69)	53,68 (2,06)
Hemicelulose	18.47	-	34,28	9,90

Observa-se que os valores obtidos para umidade do bagaço da casca de coco verde, farinha de soja comercial, bagaço da cana-de-açúcar e farelo da palha de milho verde estão abaixo de 15%, ou seja, dentro dos valores recomendados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), podendo ser armazenados sem risco de deterioração por micro-organismos.

Para o teor de cinzas, o bagaço da casca de coco verde foi o que apresentou o maior percentual de 3,61%, resultado que foi superior ao encontrado por Guedes (2010) de 2,27%. Para farinha de soja comercial o valor obtido de 3,42 foi inferior ao observado por Silva *et al.* (2012) que foi de 4,81%. O bagaço de cana-de-açúcar apresentou o percentual de 0,97%, resultado inferior aos relatados por Gouveia (2009) de 1,4% e ICIDCA (1990) de 2,6%. Para o farelo da palha de milho verde o percentual obtido de 2,47% foi superior ao encontrado por Salazar *et al.* (2005) que foi de 1,52%. As variações nos valores podem ser decorrentes da localização geográfica, locais do cultivo e da variedade do vegetal.

A produção da lacase é influenciada diretamente por alguns fatores durante o crescimento fúngico, dentre eles a relação carbono e nitrogênio presente no meio de cultivo (KAHRAMAN e GURDAL, 2002). Portanto, para a obtenção de produção de enzimas do complexo ligninolítico ajustou-se a relação carbono e nitrogênio para 90.

As porcentagens de carbono de 31,43% e nitrogênio de 0,27% obtidas para o bagaço da casca de coco verde foram diferentes das encontradas por Salazar e Leão (2006) de 45,39% e 0,19%, respectivamente, quando estudaram fibra de coco. Para farinha de soja comercial os teores de carbono e nitrogênio encontrados foram de 18,09% e 7,2%. O valor de carbono foi inferior ao encontrado por Eira (2014) 31,8% que utilizou farelo de soja, já a porcentagem 7,38% de nitrogênio foi semelhante. No bagaço de cana-de-açúcar obteve-se 45% de carbono e 0,23% de nitrogênio. Barbieri e Barcelos (2009) encontraram valor inferior para o carbono 37,81% e superior para o nitrogênio 1,07%, quando utilizaram o mesmo resíduo. No farelo de palha de milho verde as porcentagens de carbono e nitrogênio encontradas foram 56,33% e 0,4%, respectivamente. O valor de carbono foi inferior ao encontrado por Blanco (2014) de 96,75% e semelhante para o nitrogênio 0,48%, quando analisado o mesmo resíduo. Este autor representou o valor de carbono como sendo a porcentagem de matéria orgânica em base seca.

A porcentagem de extrativos presentes no bagaço de cana-de-açúcar de 6,1% foi igual a encontrada por Gouveia (2009), para o mesmo resíduo, e inferior

aos encontrados no bagaço da casca de coco verde de 10,50% e farelo da palha de milho verde de 18,01%, analisados nesse trabalho. Entretanto, Salazar *et al.* (2005) encontraram valores superiores de 28,53% ao trabalhar com palha de milho.

O percentual de lignina encontrado para o bagaço de cana-de-açúcar de 14,92% foi inferior ao encontrado por Gouveia (2009) que foi de 22,1%, para o mesmo resíduo agroindustrial. Guedes (2010) encontrou 43,71% de lignina ao caracterizar a composição química do bagaço da casca de coco, sendo esse resultado superior ao encontrado nesse trabalho que foi de 24,93%. Para o farelo da palha de milho verde o percentual de lignina encontrado foi de 8,07%, inferior ao observado por Salazar *et al.* (2005) de 14,14%.

O percentual médio de Holocelulose dos resíduos estudados nesse trabalho foi de 45,54% para o bagaço da casca de coco verde, 70,71% para o bagaço de cana-de-açúcar e 63,58% para o farelo da palha de milho verde, resultados superiores aos encontrados por Salazar *et al.* (2005) (57,49%), quando utilizaram também palha de milho.

4.2 PROCESSO FERMENTATIVO

Durante o período de incubação dos sistemas de cultivo verificou-se produção de lacase e CMCase, por *P. castanella* em fermentação semissólida. A atividade de lacase destacou-se em relação à CMCase.

4.2.1 Análise qualitativa do crescimento microbiano

No processo de fermentação semissólida foi observado que os substratos incubados à temperatura (28°C) e umidade (70%) constantes, durante 15, 30, 45 e 60 dias, apresentaram crescimento micelial já nos primeiros 15 dias de incubação, mantendo-se até os 60 dias.

A Tabela 8 mostra que no substrato 1 (farelo da palha de milho verde e bagaço de cana-de-açúcar) foi observado ótimo crescimento de massa micelial da metade a todo o frasco em todos os tempos analisados no processo fermentativo.

Tabela 8 - Avaliação do crescimento do micro-organismo no substrato 1.

Mediadores	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
<i>Sem mediadores</i>	+++	+++	+++	+++
<i>Óleo</i>	+++	+++	+++	+++
<i>Tween</i>	+++	+++	+++	+++
<i>óleo e tween</i>	+++	+++	+++	+++
<i>RBBR</i>	+++	+++	+++	+++
<i>óleo e RBBR</i>	+++	+++	+++	+++
<i>tween e RBBR</i>	+++	+++	+++	+++
<i>óleo, tween e RBBR</i>	+++	+++	+++	+++

(-) ausência de crescimento; (+) pouco crescimento com turvação de pequenos fragmentos de micélio lançados no meio; (++) moderado crescimento com surgimento de “pellet” fino na superfície do meio; (+++) ótimo crescimento de massa micelial da metade a todo frasco.

Aos 15 dias de fermentação, os frascos contendo RBBR já demonstraram uma significativa descoloração desse corante, o que pode ser observado na Figura 10.

Figura 10 – Análise visual da descoloração do RBBR durante a fermentação semissólida, aos 15 dias de fermentação.



Foto: Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB), UFCG (2013).

Esses resultados apontam certa influência do RBBR para produção de lacase e conseqüentemente degradação do PP, pois sabe-se que o RBBR auxilia em reações de deslignificação por lacase e que corresponde a um método simples e rápido para a seleção de fungos com atividade ligninolítica (BOURBONNAIS *et al.*, 1996; PASTI e CROWFORD, 1991).

Pode-se observar na Tabela 9 que no substrato 2 (bagaço da casca de coco verde e farinha de soja comercial), o desenvolvimento micelial atingiu a colonização máxima da superfície a partir dos primeiros 15 dias de incubação para todos os ensaios.

Tabela 9 - Avaliação do crescimento do micro-organismo no substrato 2.

Mediadores	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
<i>Sem mediadores</i>	+++	+++	+++	+++
<i>Óleo</i>	+++	+++	+++	+++
<i>tween</i>	+++	+++	+++	+++
<i>óleo e tween</i>	+++	+++	+++	+++
<i>RBBR</i>	+++	+++	+++	+++
<i>óleo e RBBR</i>	+++	+++	+++	+++
<i>tween e RBBR</i>	+++	+++	+++	+++
<i>óleo, tween e RBBR</i>	+++	+++	+++	+++

(-) ausência de crescimento; (+) pouco crescimento com turvação de pequenos fragmentos de micélio lançados no meio; (++) moderado crescimento com surgimento de “pellet” fino na superfície do meio; (+++) ótimo crescimento de massa micelial da metade a todo frasco.

Andrade *et al.* (2010) analisaram o crescimento micelial *in vitro* de cinco linhagens de *Agaricus bisporus*, um basidiomiceto lignolítico e submeteu esses micro-organismos a diferentes condições de temperatura. Foi verificado nesse estudo que as maiores médias de crescimento micelial ocorreram quando as linhagens foram submetidas à temperatura de 25°C, próxima à temperatura utilizada nesse trabalho que foi de 28°C.

Segundo Donini (2005), a variável massa miceliana apresenta variação considerável quando analisadas interações entre linhagens fúngicas, tempo de incubação e substratos diferentes. Este autor trabalhou com diferentes substratos como cana-de-açúcar, palha de soja, sabugo de milho e capim-elefante com ou sem suplementação de dextrose e verificou que cada linhagem apresentou crescimento superior às demais em um determinado tipo de substrato, porém o meio capim-elefante se sobressaiu em relação aos demais.

4.3 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

4.3.1 Lacase

Os resultados das atividades de lacase obtidas no substrato 1 estão exibidos na Tabela 10 e nas Figuras de 11 a 15, onde foram evidenciados valores médios de lacase inferiores aos encontrados no substrato 2, Tabela 11 e Figuras de 16 a 20.

Tabela 10 – Atividades de lacase (UL^{-1}) obtidas no substrato 1.

ÓLEO	TWEEN 80	RBBR	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
-1,00000	-1,00000	-1,00000	40,69	46,56	32,57	21,03
1,00000	-1,00000	-1,00000	30,45	12,87	13,83	12,11
-1,00000	1,00000	-1,00000	56,28	69,77	53,64	33,66
1,00000	1,00000	-1,00000	49,34	25,74	26,37	15,80
-1,00000	-1,00000	1,00000	47,89	26,38	29,99	12,35
1,00000	-1,00000	1,00000	22,04	31,78	12,33	6,29
-1,00000	1,00000	1,00000	54,33	52,13	37,27	14,67
1,00000	1,00000	1,00000	33,86	40,51	17,84	30,32
-1,00000	-1,00000	-1,00000	39,71	42,45	25,60	16,97
1,00000	-1,00000	-1,00000	33,66	16,02	15,96	10,55
-1,00000	1,00000	-1,00000	63,28	68,30	49,22	33,31
1,00000	1,00000	-1,00000	53,21	27,56	19,37	20,89
-1,00000	-1,00000	1,00000	50,56	27,24	20,69	14,88
1,00000	-1,00000	1,00000	26,18	33,77	11,62	5,83
-1,00000	1,00000	1,00000	43,10	66,31	33,75	17,14
1,00000	1,00000	1,00000	24,50	41,38	29,79	29,13

A maior atividade enzimática no substrato 1 foi de $69,77 UL^{-1}$, sendo obtida no período de 30 dias quando adicionado no sistema de cultivo o mediador tween. Esse resultado foi superior aos encontrados por Ferreira *et al.* (2011) de $54,91 UL^{-1}$ quando utilizaram bagaço de cana-de-açúcar como substrato para avaliação da atividade ligninocelulolítica de fungos isolados da serrapilheira da Caatinga. Regina *et al.* (2012) encontraram atividade de $1,2 UL^{-1}$ utilizando como substrato sabugo de milho. Outros trabalhos utilizando o sabugo de milho relataram valores superiores, como os citados por Okamoto, Yanagi e Sakai (2000), os quais obtiveram a produção de $130 U.L^{-1}$ de lacase por uma linhagem de *P. ostreatus* K16-2, no oitavo dia de cultivo. Mansur, Arias e Flärdh (2003) avaliaram a produção de lacase por outra linhagem de *P. ostreatus* e obtiveram máxima atividade no 5º dia de cultivo ($310 U.L^{-1}$).

Figura 11 - Efeito da adição dos mediadores na atividade de lacase durante 60 dias de fermentação no substrato 1

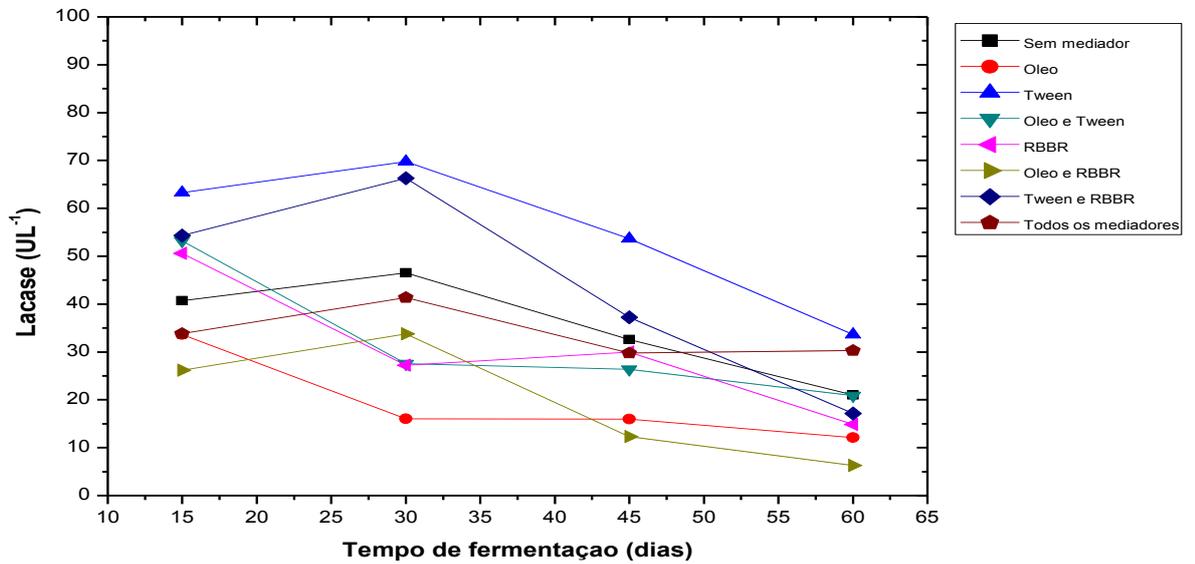


Figura 12 – Atividade da lacase sem adição de mediadores e com todos os mediadores durante 60 dias de fermentação no substrato 1.

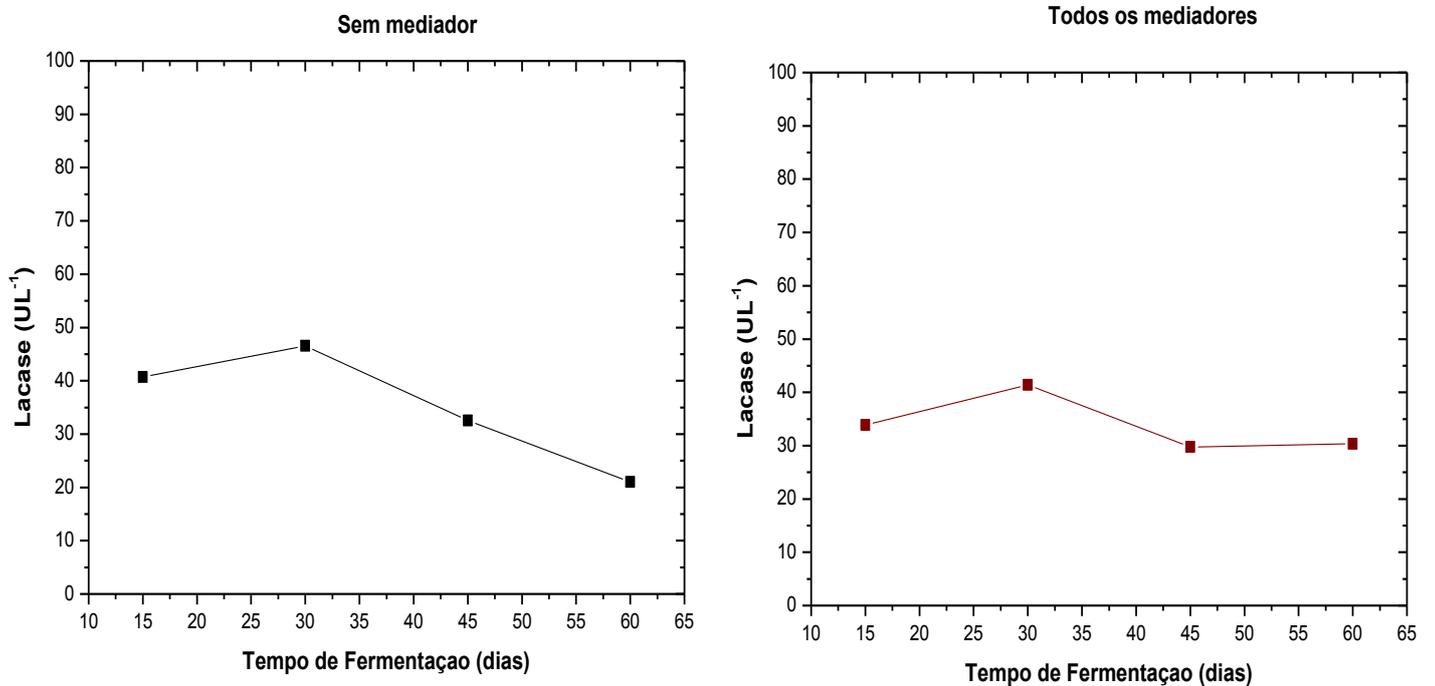


Figura 13: Efeito da adição dos mediadores óleo e tween na atividade enzimática durante 60 dias de fermentação no substrato 1.

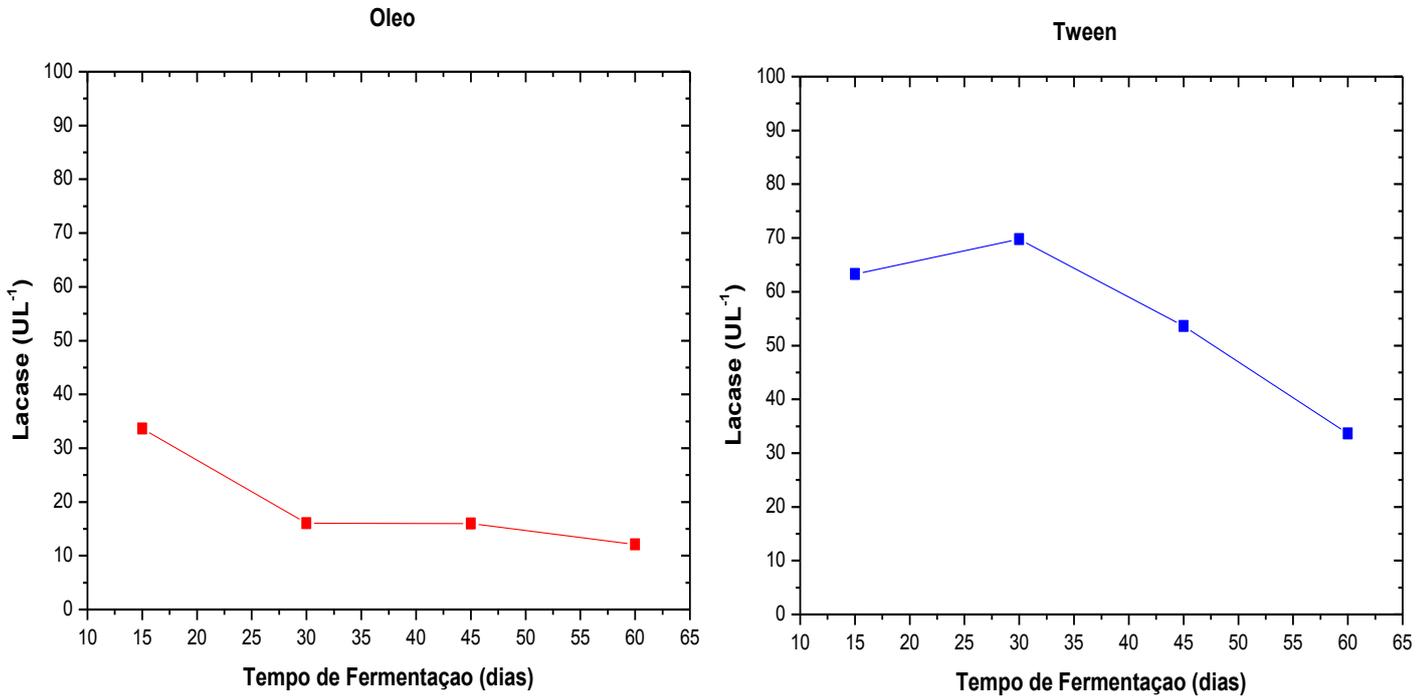


Figura 14: Efeito da adição dos mediadores óleo/tween e RBBR na atividade enzimática durante 60 dias de fermentação no substrato 1.

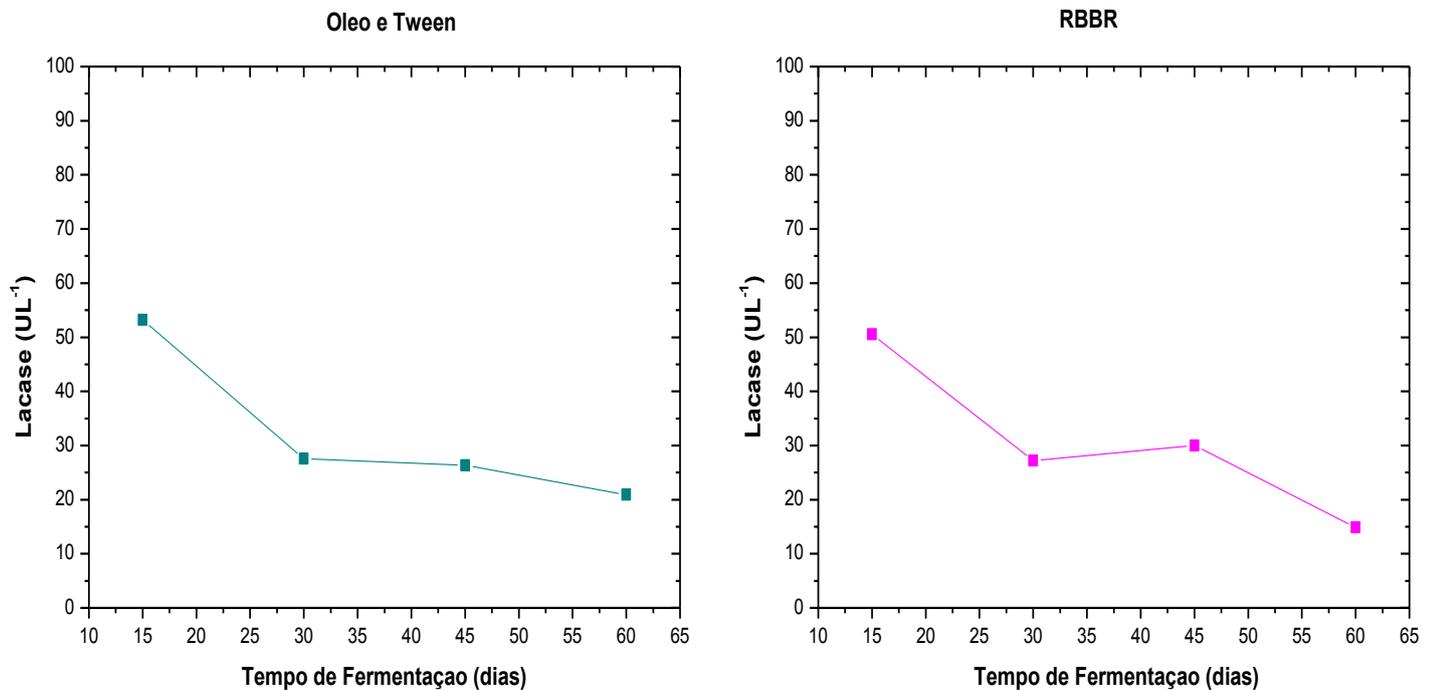
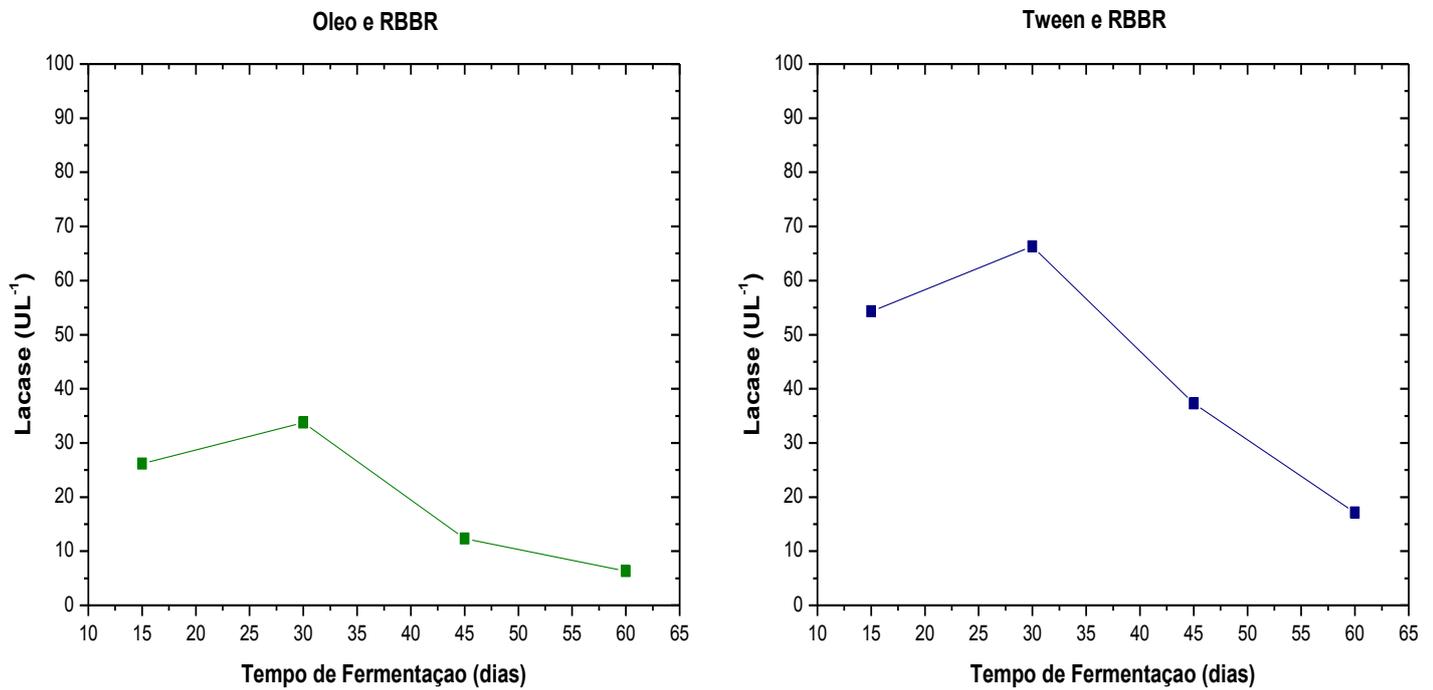
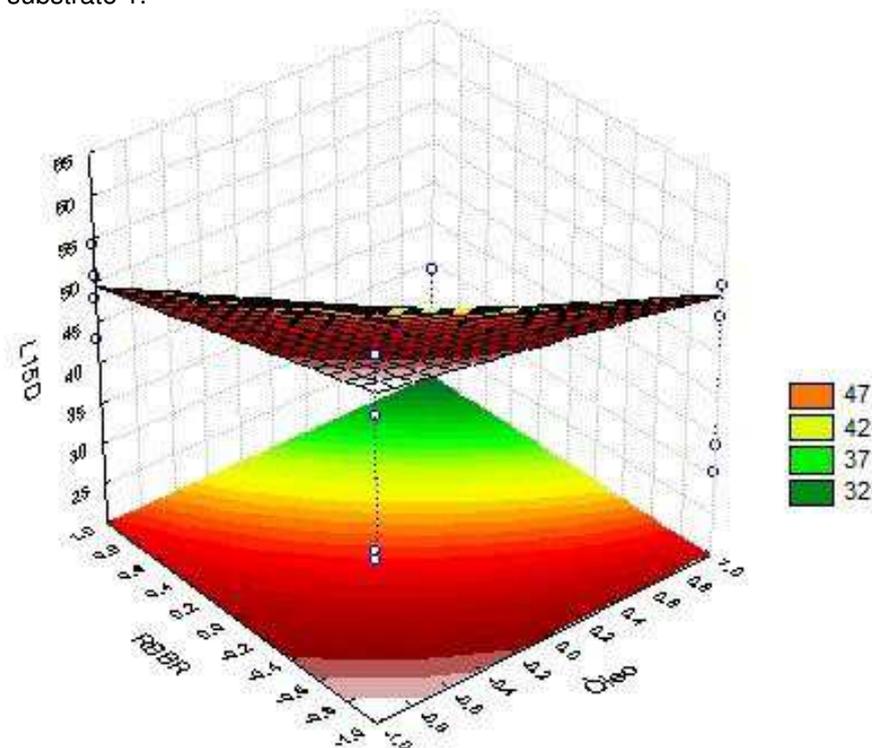


Figura 15: Efeito da adição dos mediadores óleo/RBBR e tween/RBBR na atividade enzimática durante 60 dias de fermentação no substrato 1.



A Figura 16 apresenta a superfície de resposta para atividade de lacase durante 15 dias de fermentação no substrato 1.

Figura 16 – Superfície de resposta para atividade de lacase durante 15 dias de fermentação no substrato 1.



O resultado estatístico demonstrou que no substrato 1, durante 15 dias de fermentação todos os mediadores produziram efeitos sobre atividade de lacase em nível de 95% de confiança, sendo o coeficiente de determinação foi de 93%. Pode-se observar que o tween influenciou positivamente na atividade de lacase, enquanto o óleo e o RBBR podem reduzir a atividade dessa enzima quando adicionados ao sistema de cultivo.

As interações entre os mediadores óleo-RBBR e tween-RBBR influenciaram negativamente na produção de lacase, enquanto a interação óleo-tween não apresentou efeito sobre essa enzima.

Com base nisso, o tween 80 foi fixado no nível + 1, óleo no nível -1 e RBBR no nível -1 e pode-se observar, nessas condições, valores de atividade de lacase acima de 45 UL^{-1} (Figura 16) .

Durante 30 e 45 dias de fermentação pode-se observar a influência positiva na atividade de lacase ao adicionar o mediador tween e influência negativa na presença do óleo. Já o RBBR não teve efeito para atividade dessa enzima, nesses períodos de incubação. Em nível de 95% de confiança, o coeficiente de variação foi de 97% para o ensaio de 30 dias e 92% para 45 dias de fermentação.

Para analisar a superfície de resposta desses dois ensaios, apresentadas nas Figuras 17 e 18, o tween 80 foi fixado no nível + 1, óleo no nível -1 e RBBR no nível -1 e pode-se observar, nessas condições, valores de atividade de lacase acima de 57 UL^{-1} , aos 30 dias, e acima de 35 UL^{-1} , aos 45 dias de fermentação.

Figura 17 – Superfície de resposta para atividade de lacase durante 30 dias de fermentação no substrato 1.

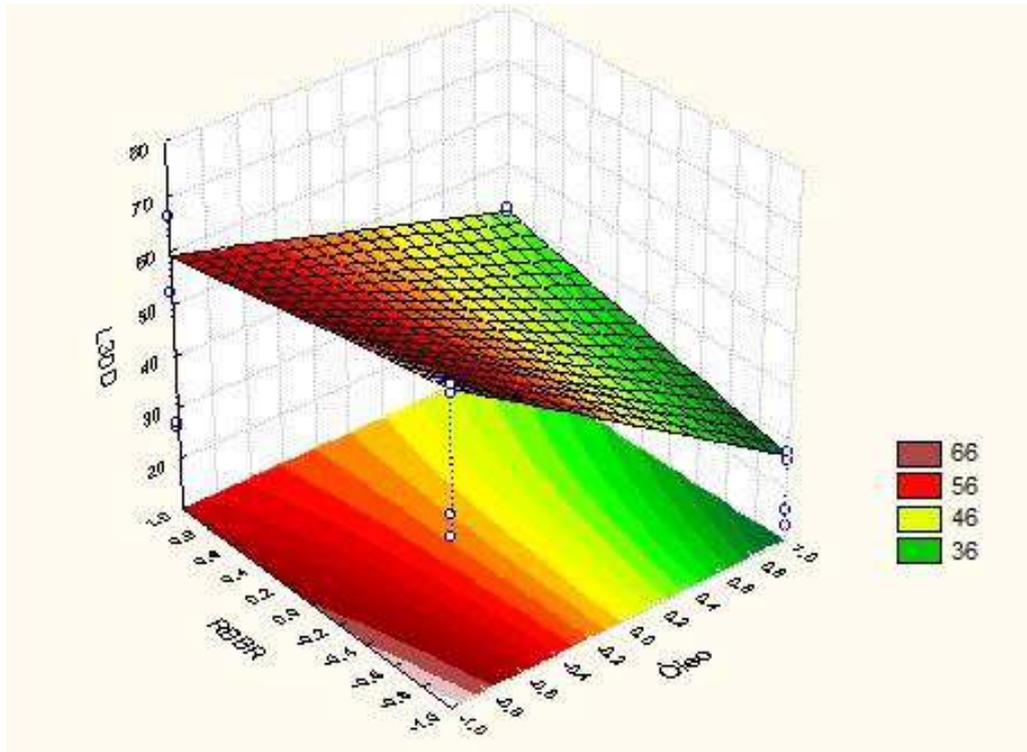
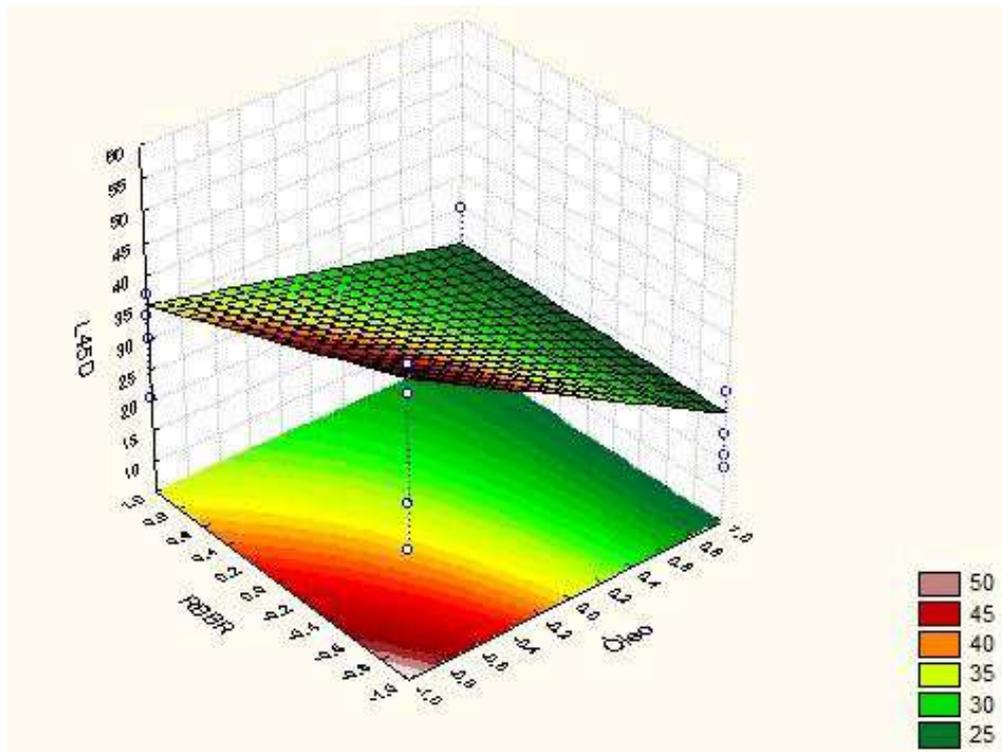


Figura 18 – Superfície de resposta para atividade de lacase durante 45 dias de fermentação no substrato 1.

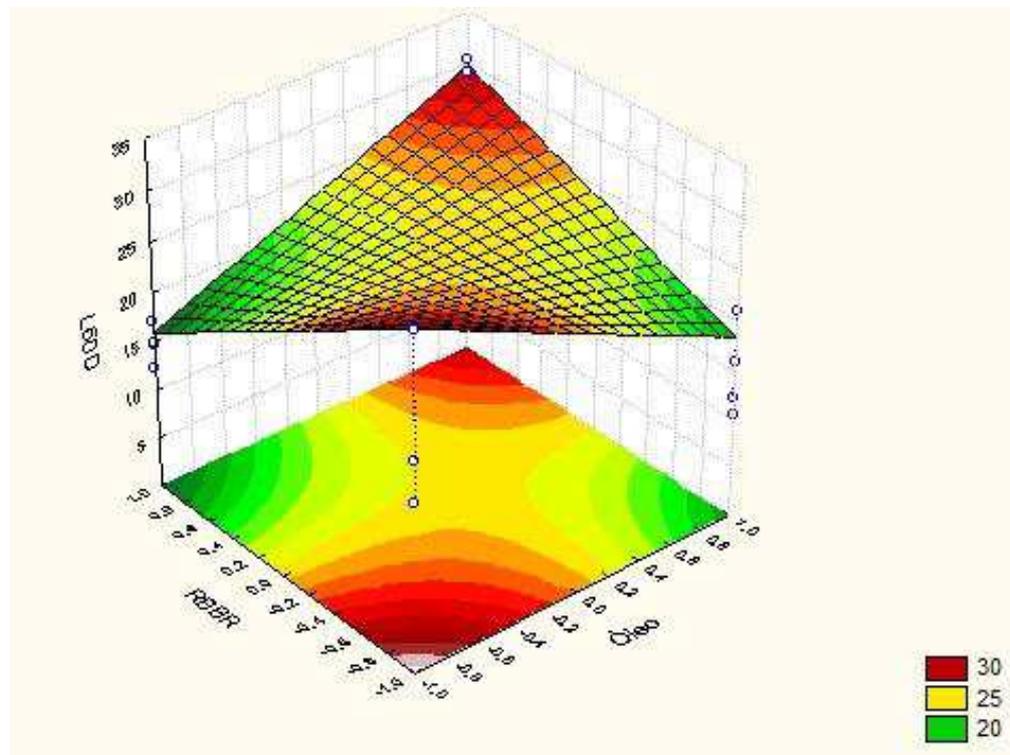


Na fermentação de 30 dias, a interação entre os mediadores óleo-tween influenciou negativamente na produção de lacase, enquanto a interação óleo-RBBR influenciou positivamente. Os mediadores tween-RBBR não apresentaram efeito sobre a atividade de lacase, quando adicionados no mesmo sistema de cultivo.

Aos 45 dias de fermentação, não foi verificado efeito na atividade de lacase, em relação à interação dos mediadores.

A Figura 19 mostra a superfície de resposta para atividade de lacase durante 60 dias.

Figura 19 – Superfície de resposta para atividade de lacase durante 60 dias de fermentação no substrato 1.



No período de 60 dias de fermentação, o coeficiente de variação foi de 98% e mostrou influência positiva para atividade de lacase ao utilizar tween como mediador, enquanto a adição de óleo e RBBR podem reduzir a atividade dessa enzima.

As interações entre os mediadores óleo-RBBR e óleo-tween influenciaram positivamente na produção de lacase, enquanto a interação tween-RBBR não apresentou efeito sobre essa enzima.

Aos 60 dias, observou-se atividade de 35 UL⁻¹, fixando tween 80 no nível +1 e óleo e RBBR no nível -1.

Nas Figuras 11 a 15 podemos observar que o perfil da atividade enzimática em relação ao tempo e adição de mediadores foi variado. Verificou-se que as maiores atividades ocorreram na presença dos mediadores tween e RBBR quando analisadas as atividades enzimáticas nas amostras contendo tween nos períodos de 15 dias (63,28 UL⁻¹) e 30 dias (69,77 UL⁻¹). Na amostra que continha tween e RBBR, no período de 30 dias foi obtida uma atividade de 66,31 UL⁻¹. Pode-se evidenciar que a utilização de tween e RBBR influenciaram na atividade enzimática, além de evidenciar que a descoloração do corante RBBR pode ser um excelente indicador dessa atividade. Segundo Moreira *et al.* (2001), a descoloração do RBBR é atribuída a algumas enzimas e dentre elas destaca-se a lacase.

Essa descoloração do RBBR foi evidenciada por Bourbonnais *et al.* (1996), onde mostraram que esse corante auxilia em reações de deslignificação por lacase, além de ser usado como substrato para o sistema degradador da lignina e determinar o começo do metabolismo secundário nos fungos ligninolíticos.

De acordo com Lestan *et al.* (1990), a adição de surfactantes pode aumentar a atividade ligninolítica até sua completa mineralização, através da geração de radicais livres, além de alterar a composição fosfolipídica e a permeabilidade das membranas celulares, facilitando as trocas entre a célula e o meio externo e, conseqüentemente, a ação das enzimas produzidas. Esse fato pode explicar a relação positiva entre a presença do surfactante tween e a produção da enzima lacase.

O tween tem sido descrito na literatura científica como um surfactante que pode aumentar a produção de diversas enzimas fúngicas. Por exemplo, Kuhad *et al.* (1994) constataram um aumento de 30% na produção de celulasas pelo *Fusarium oxysporum* na presença desse detergente.

A Tabela 11 e as Figuras 20 a 24 exibem o efeito da adição dos mediadores na atividade da lacase durante 60 dias de fermentação no substrato 2.

Tabela 11 – Atividades de lacase (UL^{-1}) obtidas no substrato 2.

ÓLEO	TWEEN 80	RBBR	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
-1,00000	-1,00000	-1,00000	67,43	50,53	40,41	38,40
1,00000	-1,00000	-1,00000	84,43	56,94	41,45	42,73
-1,00000	1,00000	-1,00000	66,55	70,33	43,17	32,77
1,00000	1,00000	-1,00000	59,82	41,81	47,68	36,90
-1,00000	-1,00000	1,00000	74,83	71,49	54,29	50,75
1,00000	-1,00000	1,00000	84,70	24,67	30,26	34,43
-1,00000	1,00000	1,00000	95,67	81,53	53,72	37,58
1,00000	1,00000	1,00000	68,76	47,19	26,42	22,12
-1,00000	-1,00000	-1,00000	64,84	56,41	43,78	33,25
1,00000	-1,00000	-1,00000	69,32	58,88	46,45	38,93
-1,00000	1,00000	-1,00000	84,65	70,43	51,58	28,45
1,00000	1,00000	-1,00000	54,10	41,70	41,59	41,98
-1,00000	-1,00000	1,00000	81,64	70,77	61,65	48,38
1,00000	-1,00000	1,00000	76,70	34,13	38,73	30,61
-1,00000	1,00000	1,00000	93,73	77,52	55,71	40,04
1,00000	1,00000	1,00000	68,18	45,67	27,57	20,56

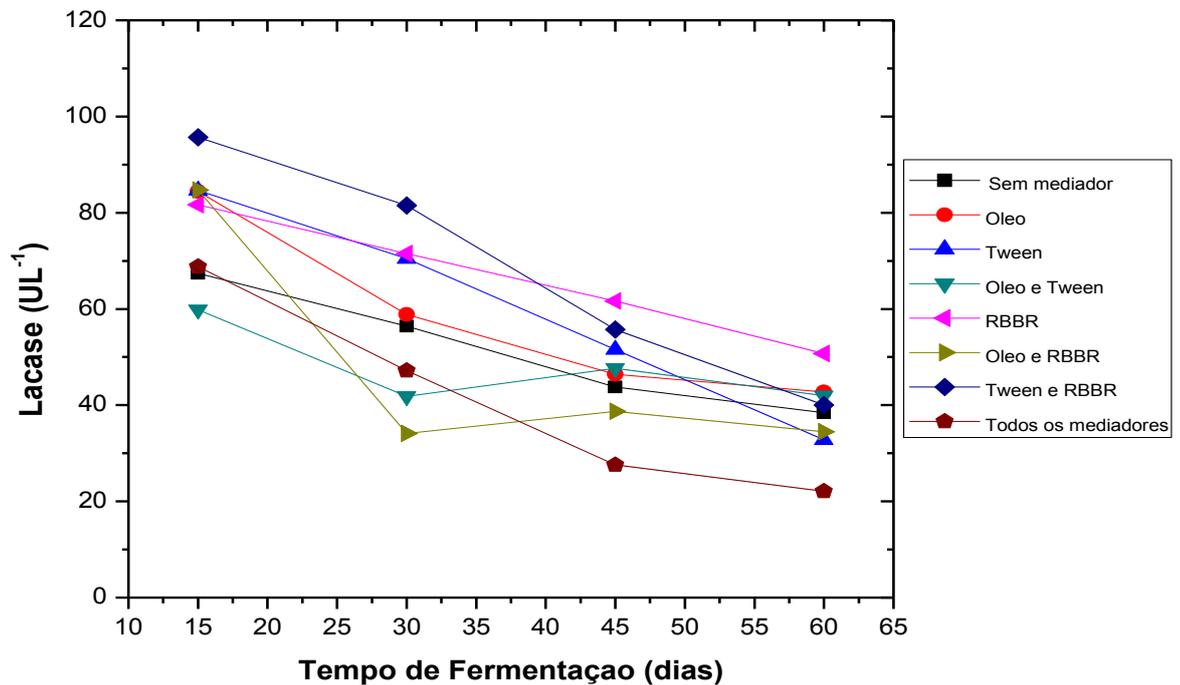
Figura 20 - Efeito da adição dos mediadores na atividade da lacase durante 60 dias de fermentação no substrato 2.

Figura 21 – Atividade da lacase sem adição de mediadores e com todos os mediadores durante 60 dias de fermentação no substrato 2.

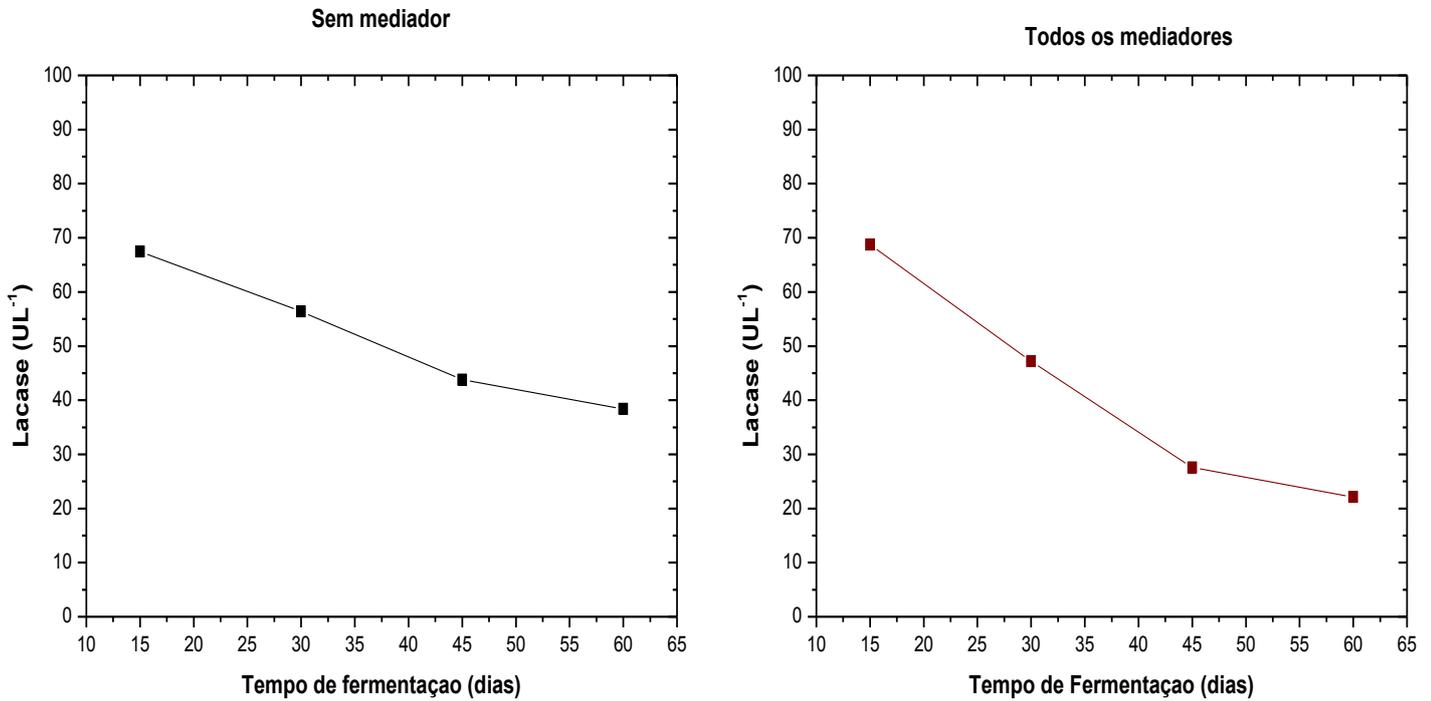


Figura 22: Efeito da adição dos mediadores óleo e tween na atividade enzimática durante 60 dias de fermentação no substrato 2.

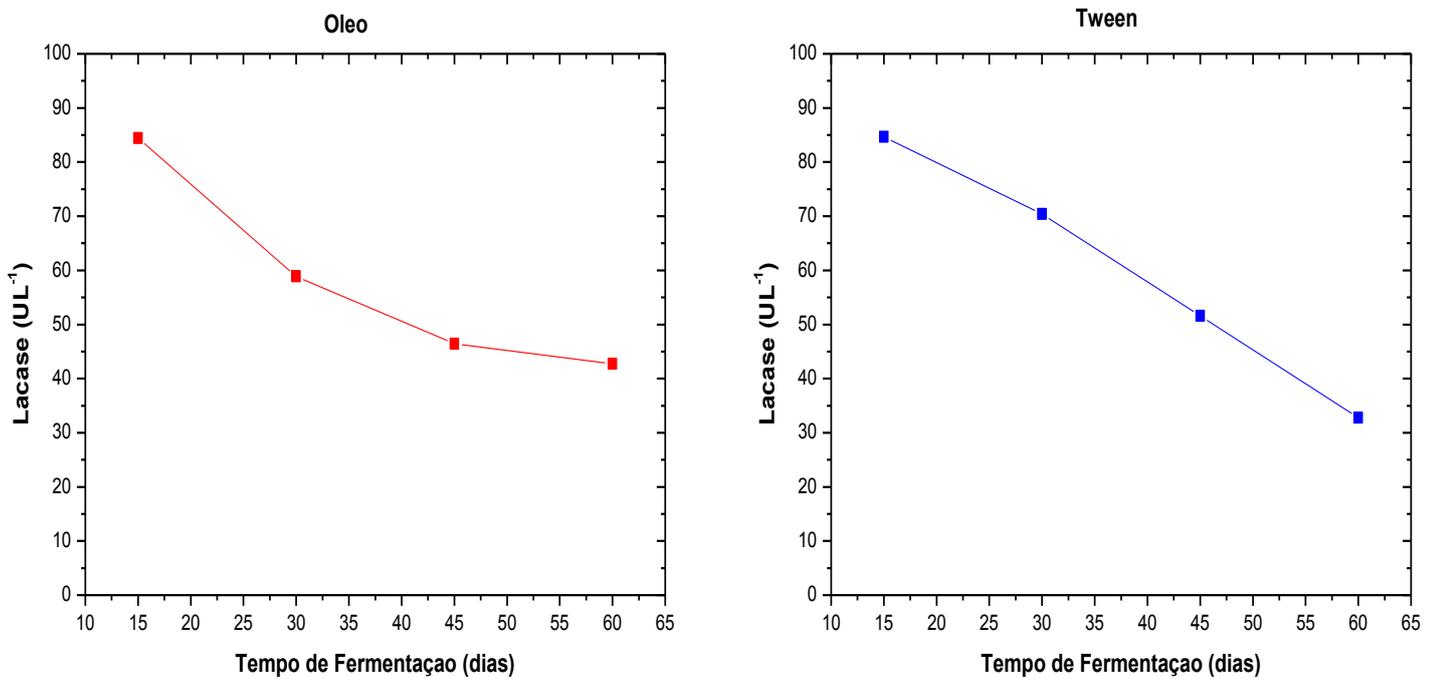


Figura 23: Efeito da adição dos mediadores óleo/tween e RBBR na atividade enzimática durante 60 dias de fermentação no substrato 2.

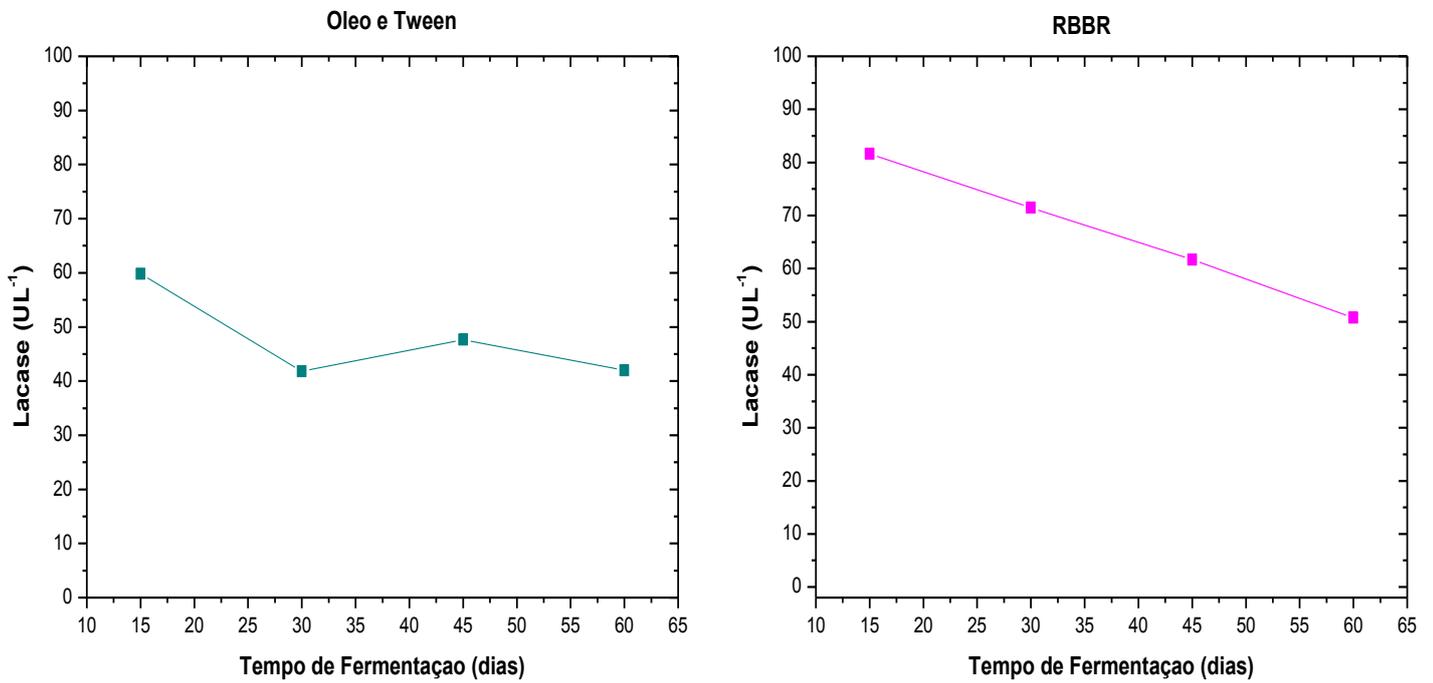
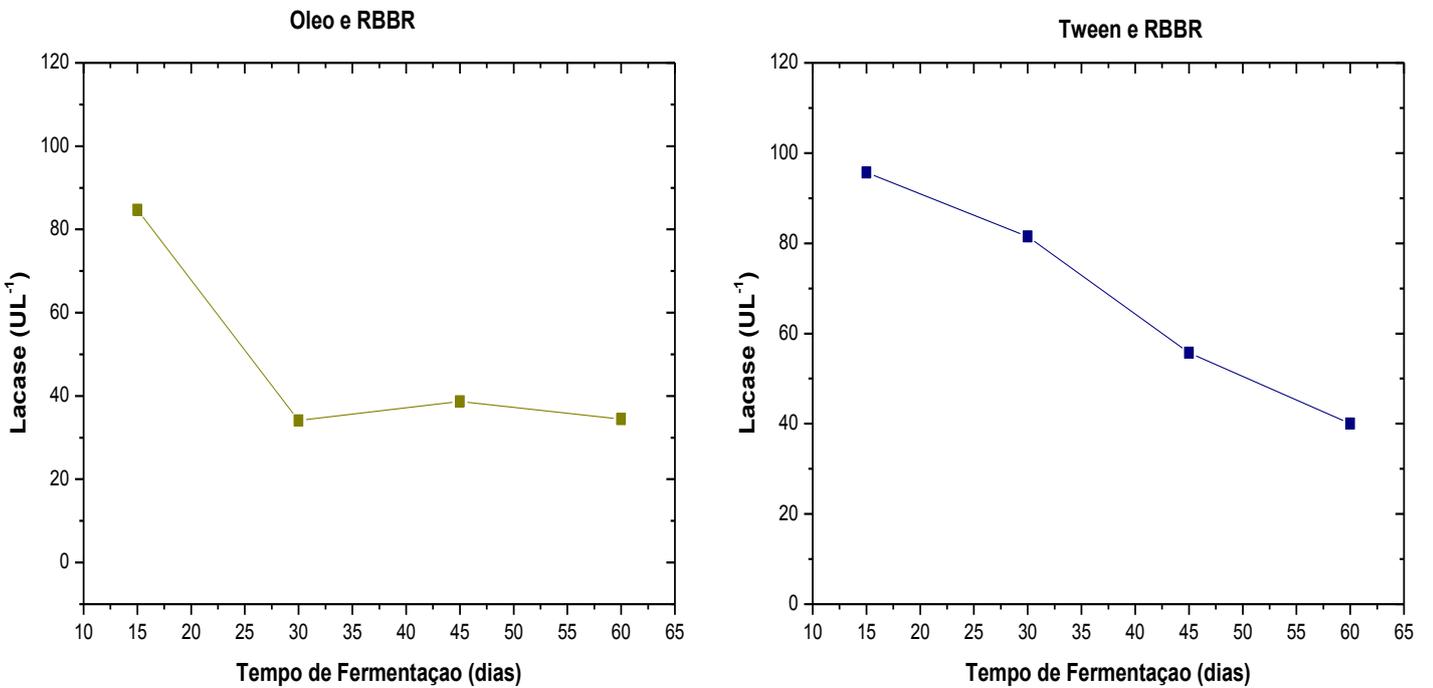


Figura 24: Efeito da adição dos mediadores óleo/RBBR e Tween/RBBR na atividade enzimática durante 60 dias de fermentação no substrato 2.

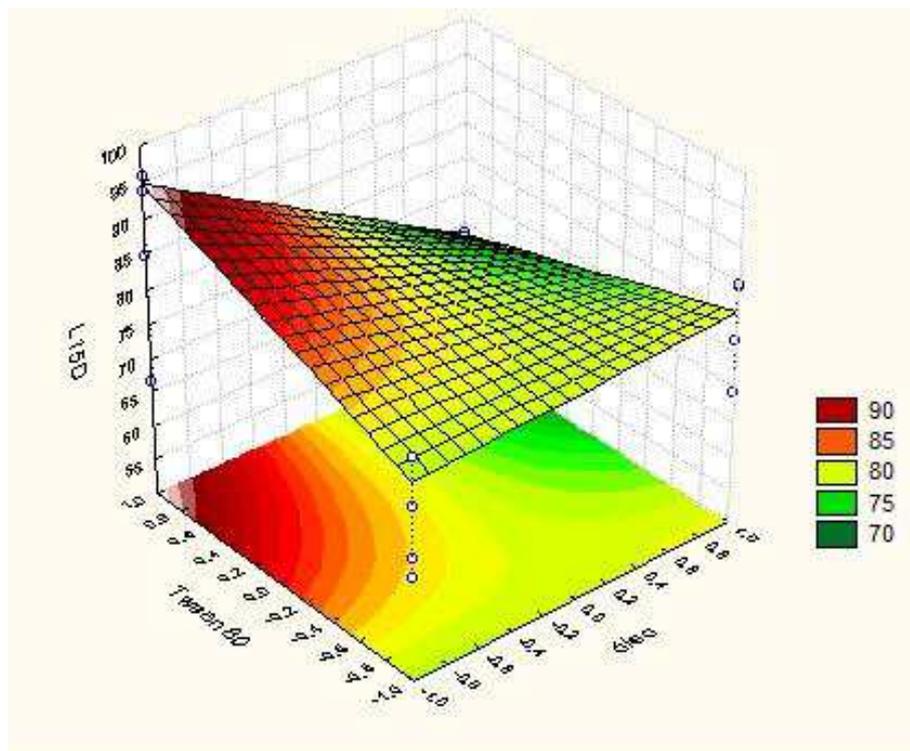


No substrato 2, durante 15 dias de fermentação pode-se observar a influência positiva na atividade de lacase ao adicionar o mediador RBBR e influência negativa na presença do óleo. Já o tween não teve efeito para atividade dessa enzima, nesse tempo de incubação. Em nível de 95% de confiança, o coeficiente de variação foi de 83%.

Observou-se relação negativa na interação óleo/tween, porém não foi verificado efeito na atividade de lacase na interação entre óleo/RBBR e tween/RBBR.

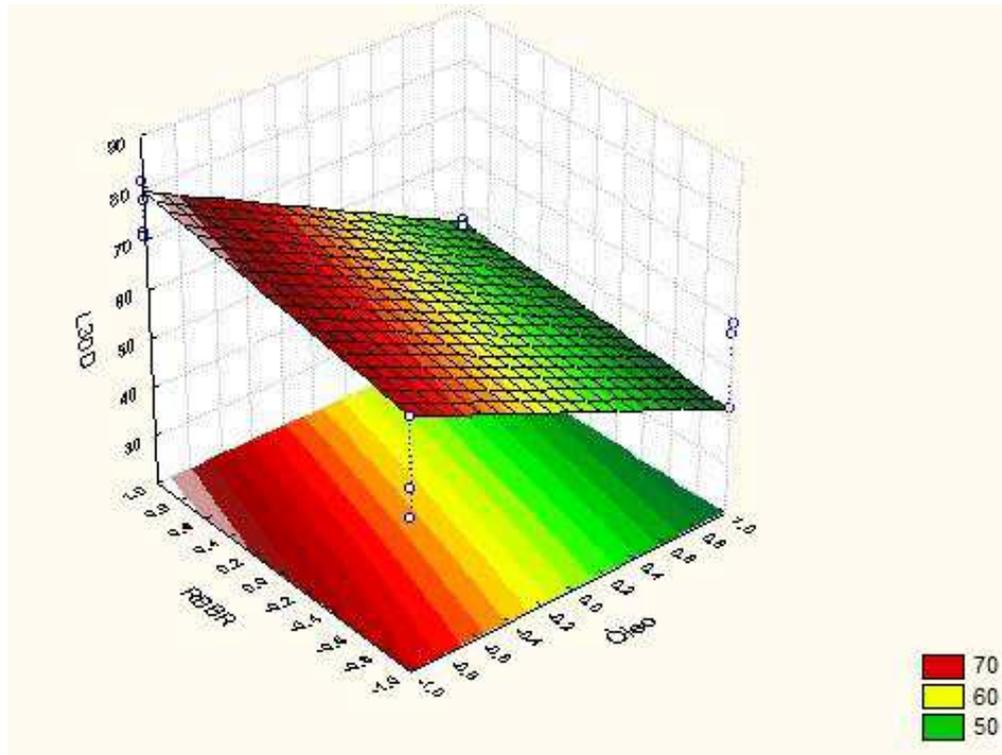
Com base nesses resultados, foram fixados RBBR e tween no nível +1 e óleo no nível -1 para se obter a superfície de resposta, a qual pode ser visualizada na Figura 25, em que a atividade foi em média 95 UL^{-1} .

Figura 25 – Superfície de resposta para atividade de lacase durante 15 dias de fermentação no substrato 2.



A Figura 26 mostra a superfície de resposta para atividade de lacase durante 30 dias, onde foram fixados tween e RBBR no nível +1 e óleo no nível -1.

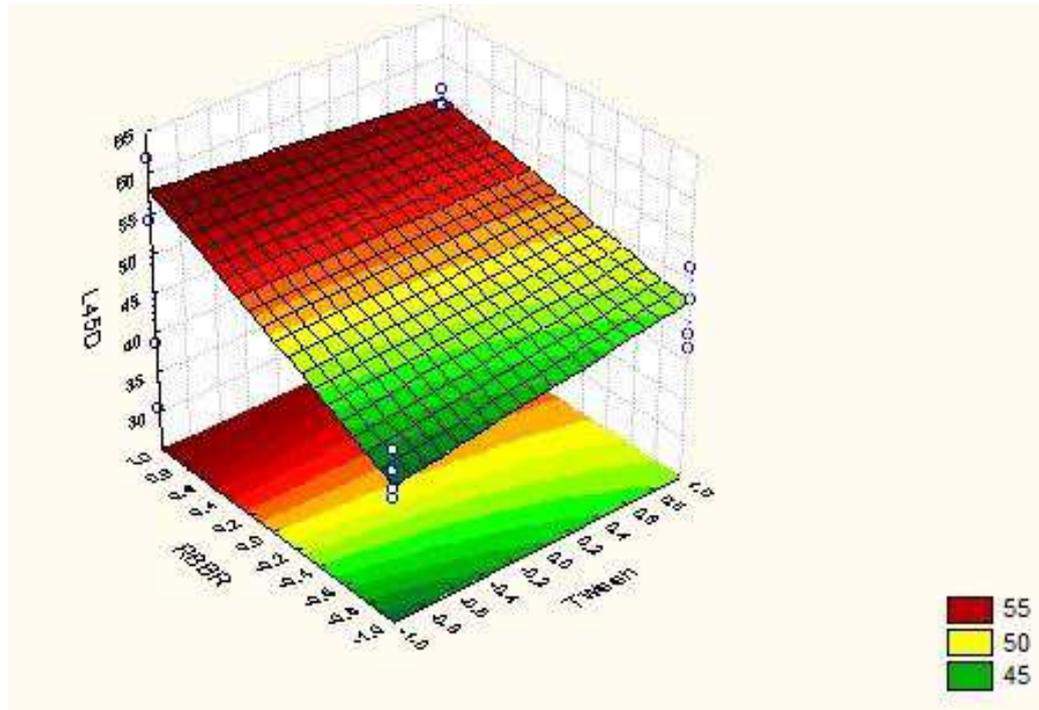
Figura 26 – Superfície de resposta para atividade de lacase durante 30 dias de fermentação no substrato 2.



Durante 30 dias, o tween influenciou positivamente na atividade da lacase, enquanto o óleo influenciou de maneira negativa na produção dessa enzima. Não foi verificada influência do RBBR. Em nível de 95% de confiança, o coeficiente de variação foi de 98% e a atividade foi em média 80 UL^{-1} .

A Figura 27 mostra a superfície de resposta para atividade de lacase durante 45 dias. Os mediadores tween e RBBR foram fixados no nível +1 e óleo no nível -1, como mostra a Figura 27.

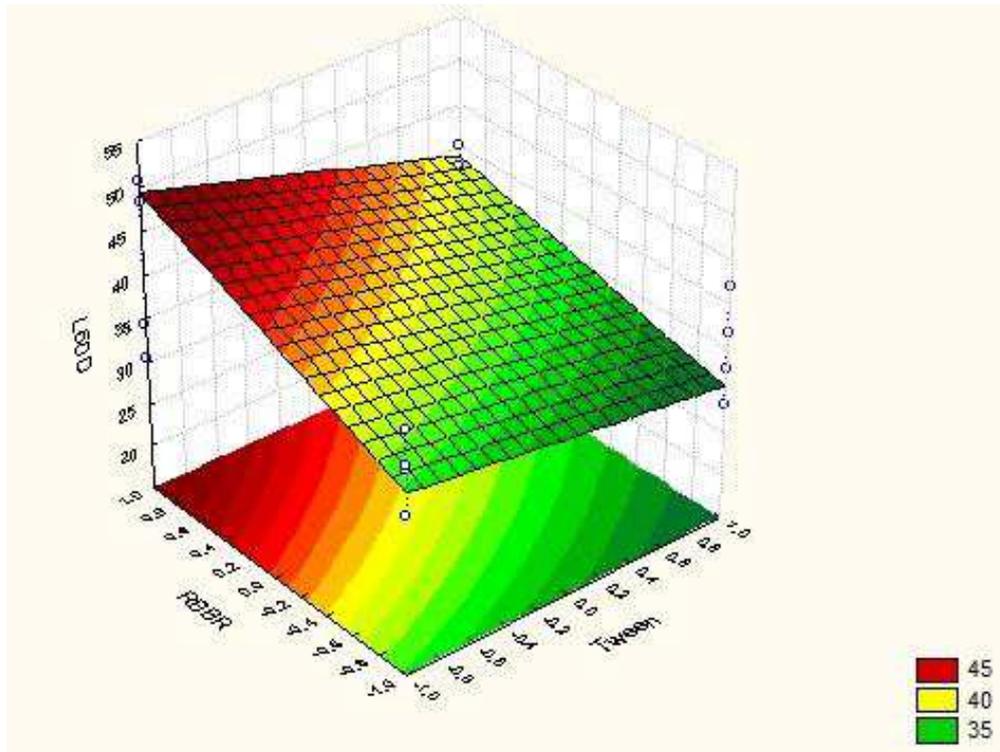
Figura 27 – Superfície de resposta para atividade de lacase durante 45 dias de fermentação no substrato 2.



O óleo influenciou negativamente a atividade de lacase, no tempo de fermentação de 45 dias. Já os mediadores tween e RBBR não apresentaram efeito sobre a atividade desta enzima. Em nível de 95% de confiança, o coeficiente de variação foi de 95% e atividade de lacase acima de 55 UL^{-1} .

Para analisar a superfície de resposta para atividade de lacase durante 60 dias de fermentação, o tween e o RBBR foram fixados no nível +1 e o óleo no nível -1, obtendo-se atividade de lacase de 50 UL^{-1} , como mostra a Figura 28.

Figura 28 - Superfície de resposta para atividade de lacase durante 60 dias de fermentação no substrato 2.



Durante 60 dias de fermentação, óleo e tween influenciaram negativamente na atividade de lacase, enquanto RBBR não apresentou efeito na atividade de fermentação, nesse tempo de cultivo.

As interações entre os mediadores óleo/RBBR e tween/RBBR foram negativas, em relação à atividade de lacase nesse tempo de ensaio.

Pode-se verificar que na fermentação com o substrato 2, os tratamentos analisados mostraram uma tendência de redução da atividade de lacase com o tempo, a partir de 30 dias, observando-se as maiores atividades nos primeiros 15 dias de incubação.

Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Ballaminut (2007), que verificou as maiores atividades enzimáticas ligninolíticas, nos primeiros 20 dias de incubação ao utilizar o basidiomiceto *L. crinitus*, quando cultivado em bagaço de cana-de-açúcar suplementado com farinha de soja e amido solúvel utilizando a mesma relação do presente trabalho, C/N 90.

Ballaminut e Matheus (2006) em estudo com *L. crinitus* e *P.castanella*, cultivados também em bagaço de cana-de-açúcar suplementado, observaram

maiores atividades enzimáticas na primeira quinzena de incubação para ambos os fungos.

Vikineswary *et al.* (2006) em um estudo com *Pycnoporus sanguineus*, cultivado em substratos sólidos diferentes, também observaram atividade de lacase na primeira quinzena de incubação, em todos os substratos testados.

A atividade máxima obtida no substrato 2 foi de $95,67 \text{ U L}^{-1}$ utilizando tween e RBBR. Esses resultados foram superiores aos encontrados por Couto e Sanromán (2005) de $333,280 \text{ nkat/L}$ ou $19,997 \text{ U L}^{-1}$, onde nesse estudo foi utilizado como substrato polpa de coco para produção de lacase pelo fungo *Trametes hirsuta*.

Karim e Annuar (2009) avaliaram a produção de lacase pelo fungo de podridão branca *Pycnoporus sanguineus* e seu crescimento em função de diferentes indutores no bagaço de coco. Nesse trabalho a atividade de lacase foi detectada após 36 horas de fermentação, com atividade máxima verificada de $2,85 \pm 0,05 \text{ U L}^{-1}$ obtida em 48 horas.

Ferreira *et al.* (2011) utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato para avaliação da atividade ligninocelulolítica de fungos isolados da serrapilheira da Caatinga observaram atividade de lacase de $54,91 \text{ UL}^{-1}$.

Silvério *et al.* (2012) encontraram valores muito altos de lacase utilizando os micro-organismos *P. cinerea* (3.500 U/L) e *T. versicolor* livre (800 U/L), que tiveram como substrato para o processo fermentativo uma fibra sintética comercial.

4.3.2 Atividade da enzima CMCCase

A Tabela 12 e as Figuras 29 a 33 mostram o efeito da adição dos mediadores na atividade enzimática de CMCCase durante 60 dias de fermentação no substrato 1.

Tabela 12 – Atividades de CMCase (U/g) obtidas no substrato 1.

ÓLEO	TWEEN 80	RBBR	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
-1,00000	-1,00000	-1,00000	0,23	0,11	0,21	0,15
1,00000	-1,00000	-1,00000	0,07	0,20	0,11	0,13
-1,00000	1,00000	-1,00000	0,04	0,18	0,20	0,13
1,00000	1,00000	-1,00000	0,17	0,14	0,18	0,17
-1,00000	-1,00000	1,00000	0,11	0,14	0,29	0,13
1,00000	-1,00000	1,00000	0,16	0,13	0,15	0,12
-1,00000	1,00000	1,00000	0,14	0,20	0,23	0,22
1,00000	1,00000	1,00000	0,08	0,17	0,10	0,12
-1,00000	-1,00000	-1,00000	0,23	0,10	0,20	0,12
1,00000	-1,00000	-1,00000	0,05	0,16	0,08	0,11
-1,00000	1,00000	-1,00000	0,04	0,16	0,22	0,13
1,00000	1,00000	-1,00000	0,11	0,03	0,13	0,12
-1,00000	-1,00000	1,00000	0,08	0,18	0,24	0,14
1,00000	-1,00000	1,00000	0,13	0,11	0,13	0,10
-1,00000	1,00000	1,00000	0,15	0,20	0,20	0,21
1,00000	1,00000	1,00000	0,08	0,18	0,05	0,13

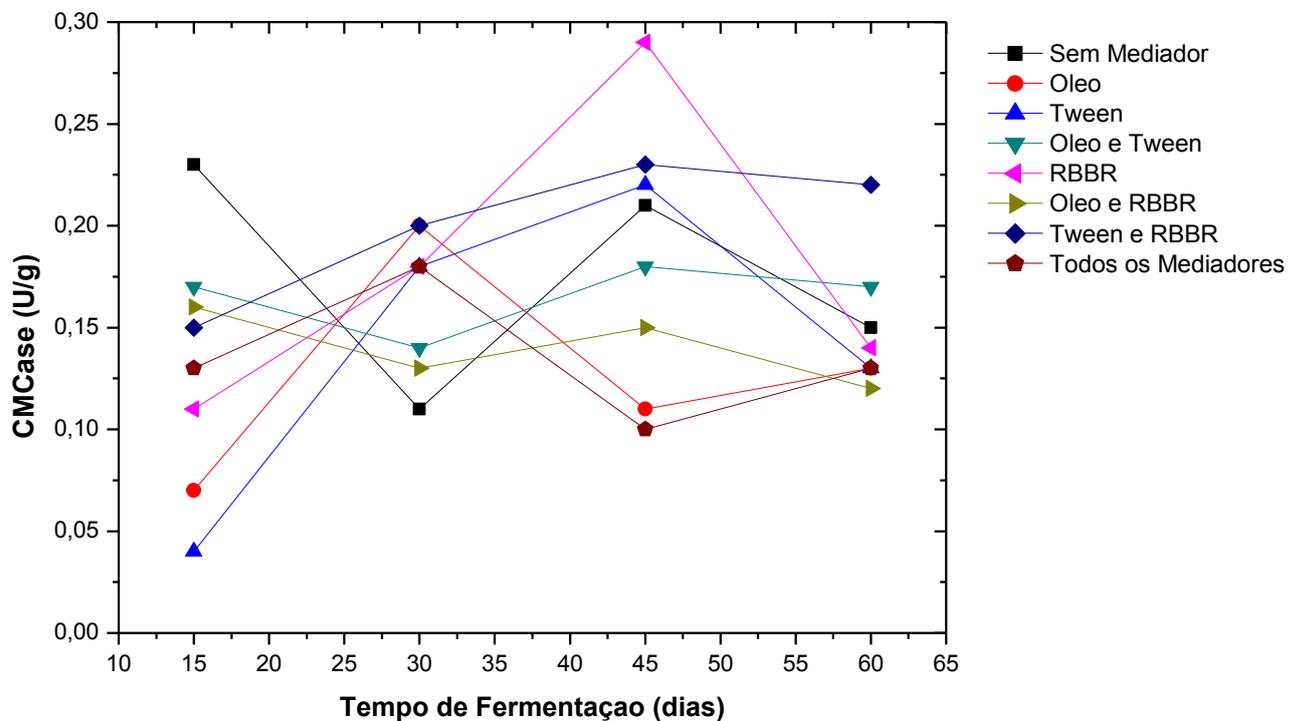
Figura 29: Efeito da adição dos mediadores na atividade enzimática de CMCase durante 60 dias de fermentação no substrato 1.

Figura 30: Atividade da CMCase sem adição de mediadores e com todos os mediadores durante 60 dias de fermentação no substrato 1.

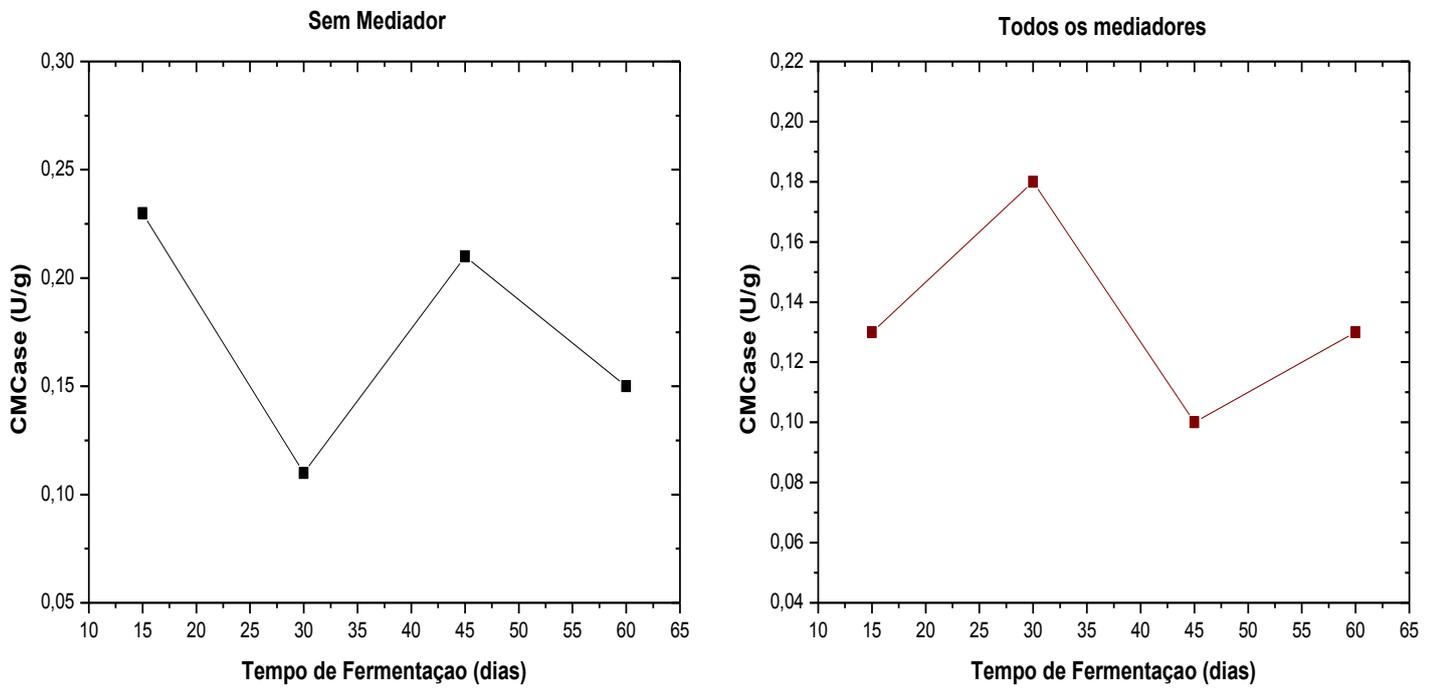


Figura 31: Efeito da adição dos mediadores óleo e Tween na atividade de CMCase durante 60 dias de fermentação no substrato 1.

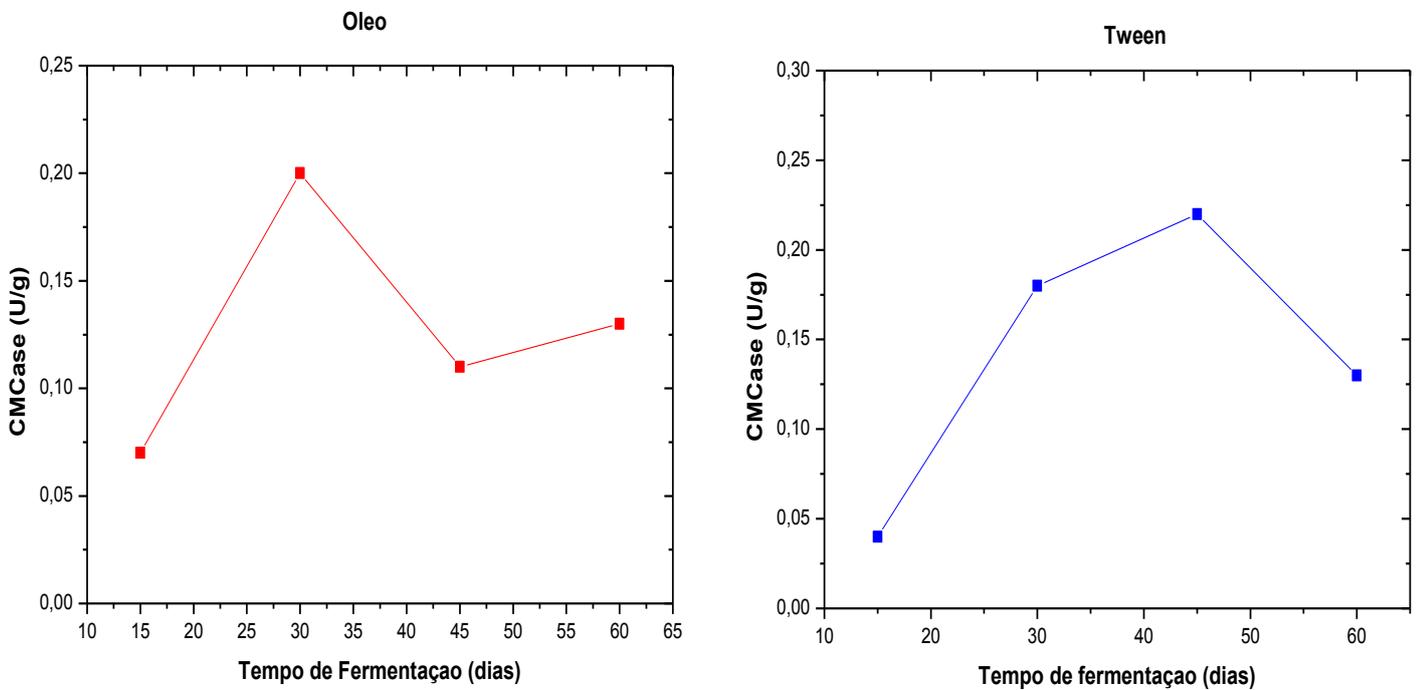


Figura 32: Efeito da adição dos mediadores óleo/Tween e RBBR na atividade de CMCase durante 60 dias de fermentação no substrato 1.

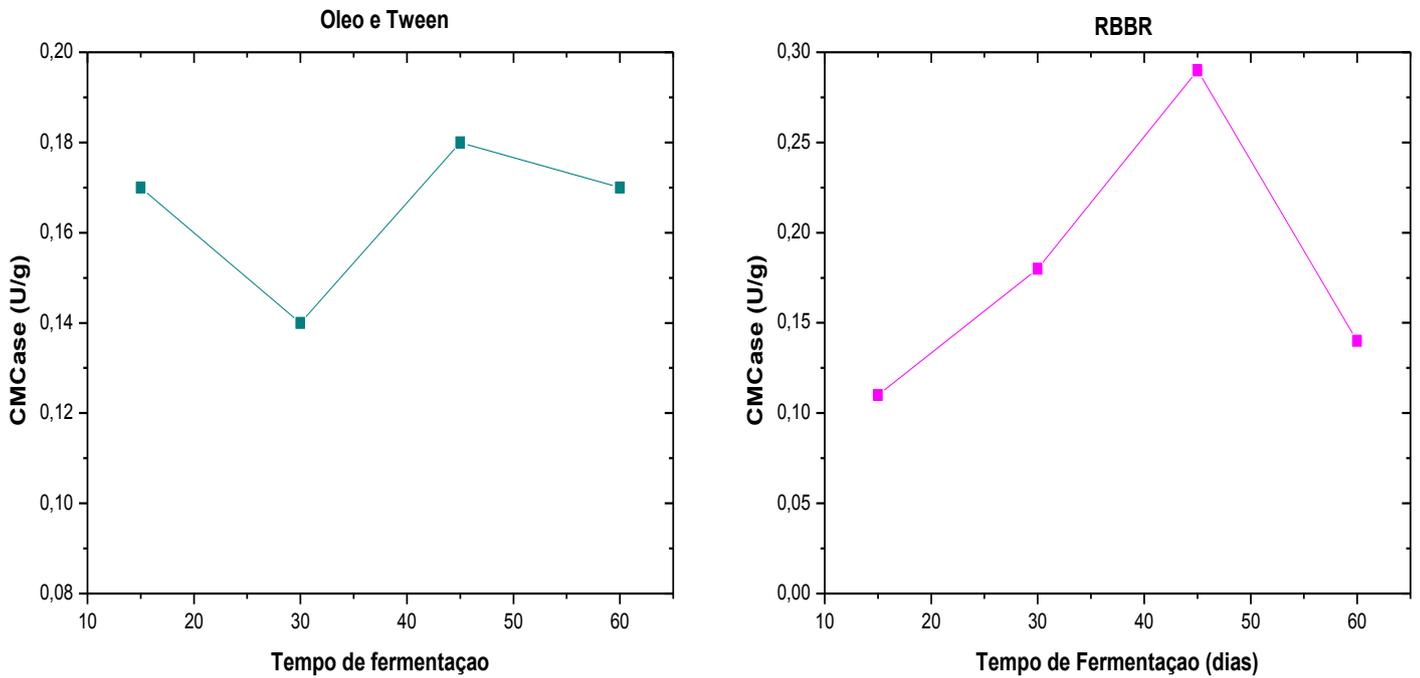
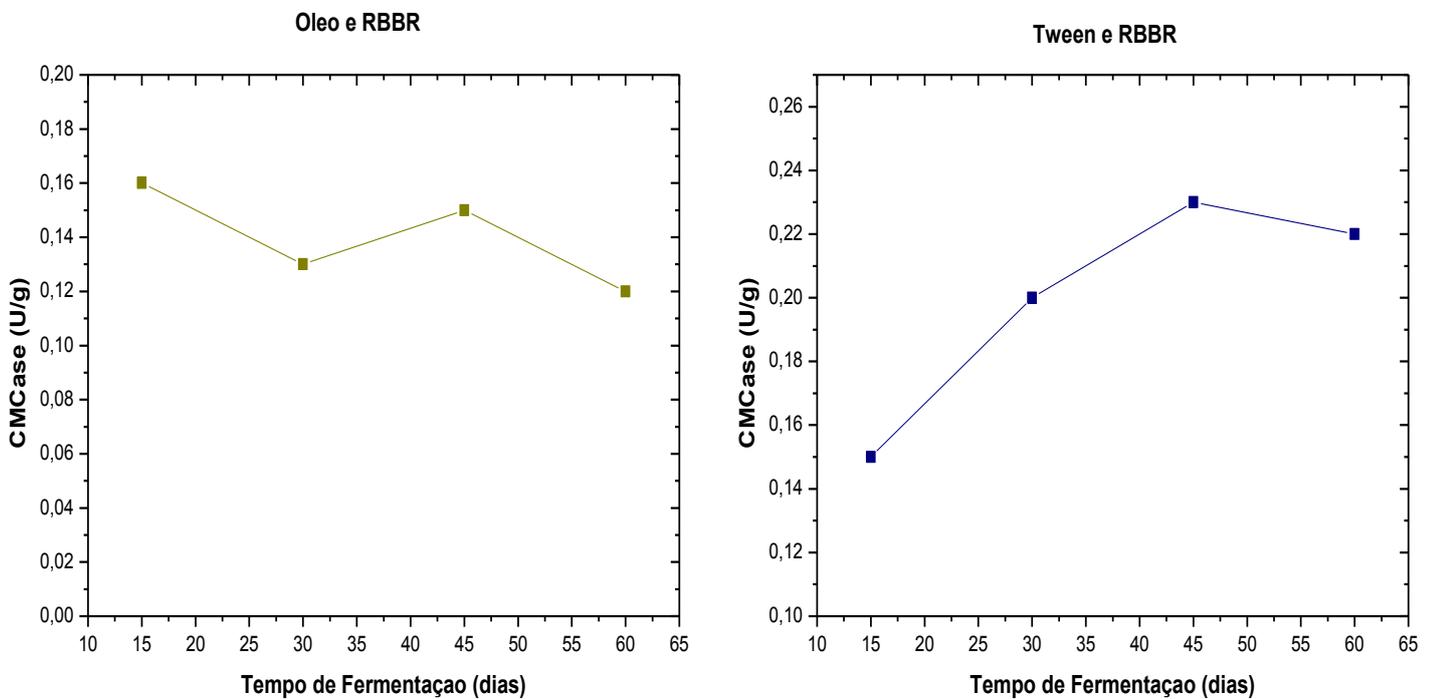


Figura 33: Efeito da adição dos mediadores Óleo/RBBR e Tween/RBBR na atividade de CMCase durante 60 dias de fermentação no substrato 1.



O perfil da atividade de CMCase foi variado tanto em relação a adição de mediadores quanto ao tempo de fermentação. No tratamento sem mediadores a

maior atividade obtida foi de 0,23 U/g com 15 dias de fermentação. Com adição de óleo, o pico máximo de atividade foi com 30 dias de 0,20 U/g. Utilizando como mediador tween a maior atividade obtida foi de 0,22 U/g aos 45 dias. No tratamento contendo óleo e tween, a atividade máxima atingida foi 0,18 U/g aos 45 dias de incubação. Com adição do mediador RBBR foi verificada atividade máxima de 0,29 U/g aos 45 dias. Com óleo e RBBR a atividade máxima de 0,16 U/g foi atingida já aos 15 dias. Para o tratamento contendo tween e RBBR a maior atividade de 0,23 U/g foi obtida com 45 dias. Com todos os mediadores a atividade máxima foi de 0,18 U/g com 30 dias de fermentação.

Os tempos de 15 e 30 dias não foram estatisticamente significativos para atividade de CMCase, em relação à adição de mediadores.

Durante 45 dias de fermentação o óleo influenciou de maneira negativa na atividade de CMCase, já o tween e RBBR não influenciaram na atividade dessa enzima.

No tempo de 60 dias, o tween influenciou positivamente na atividade de CMCase, o óleo influenciou negativamente e o RBBR não teve influência na atividade dessa enzima.

O maior valor de CMCase (0,29 U/g) obtida nesse trabalho foi inferior aos encontrados por Amorim (2010) que atingiu a atividade máxima de 1,896 U/g com 18 horas de fermentação trabalhando com o fungo *Trichoderma* sp. em substrato com bagaço de caju e por Rodríguez-Zúñiga *et al.* (2011) que trabalharam com resíduo de cana-de-açúcar e obtiveram atividade de 0,3 U/g, utilizando *Aspergillus niger*.

A Tabela 13 e as Figuras 34 a 38 mostram o efeito da adição dos mediadores na atividade enzimática de CMCase durante 60 dias de fermentação no substrato 2.

Tabela 13 – Atividades de CMCase obtidas no substrato 2.

ÓLEO	TWEEN 80	RBBR	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
-1,00000	-1,00000	-1,00000	0,12	0,11	0,14	0,22
1,00000	-1,00000	-1,00000	0,05	0,02	0,01	0
-1,00000	1,00000	-1,00000	0,13	0,05	0,12	0,14
1,00000	1,00000	-1,00000	0,05	0,16	0,03	0,05
-1,00000	-1,00000	1,00000	0,15	0,09	0,09	0,14
1,00000	-1,00000	1,00000	0,12	0,02	0,04	0,01
-1,00000	1,00000	1,00000	0,13	0,13	0,13	0,10
1,00000	1,00000	1,00000	0,05	0,02	0	0,12
-1,00000	-1,00000	-1,00000	0,13	0,11	0,13	0,14
1,00000	-1,00000	-1,00000	0,1	0	0,02	0,01
-1,00000	1,00000	-1,00000	0,15	0,1	0,07	0,10
1,00000	1,00000	-1,00000	0,05	0,07	0,02	0,04
-1,00000	-1,00000	1,00000	0,16	0,13	0,10	0,18
1,00000	-1,00000	1,00000	0,01	0,08	0	0
-1,00000	1,00000	1,00000	0,12	0,10	0,1	0,11
1,00000	1,00000	1,00000	0,03	0	0,01	0,04

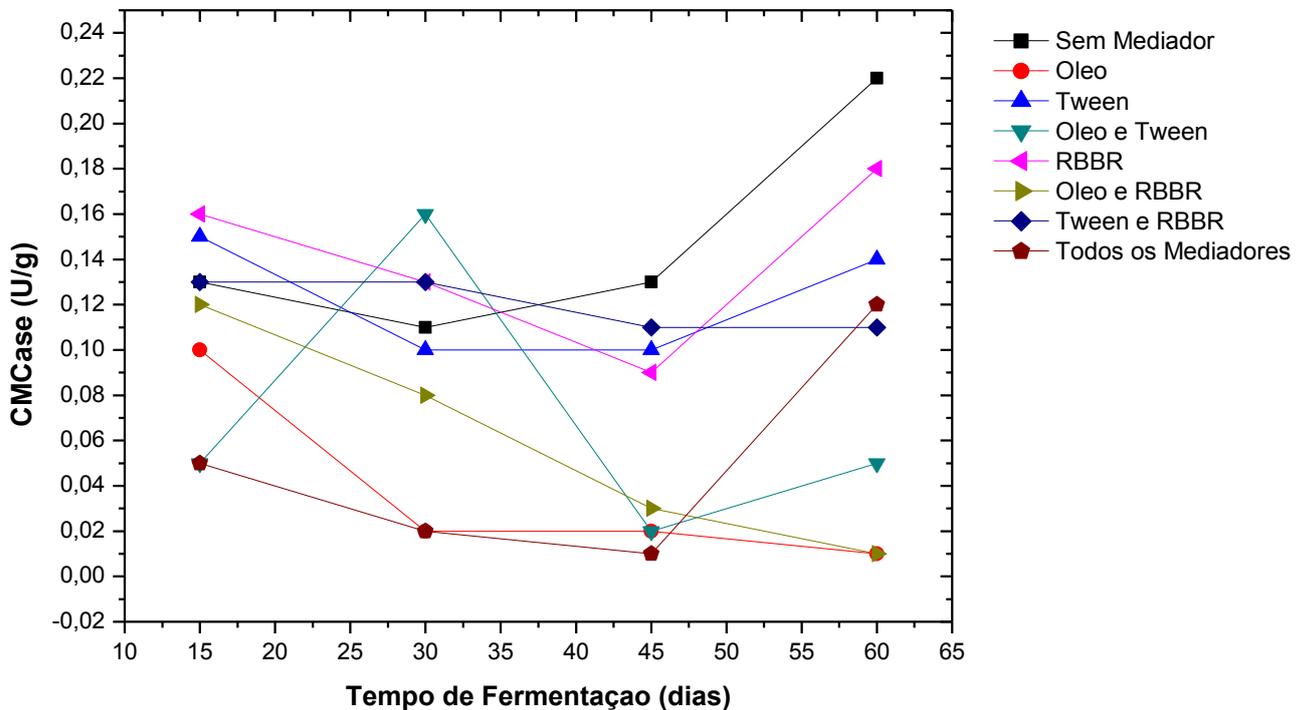
Figura 34: Efeito da adição dos mediadores na atividade enzimática de CMCase durante 60 dias de fermentação no substrato 2.

Figura 35: Atividade da CMCase sem adição de mediadores e com todos os mediadores durante 60 dias de fermentação no substrato 2.

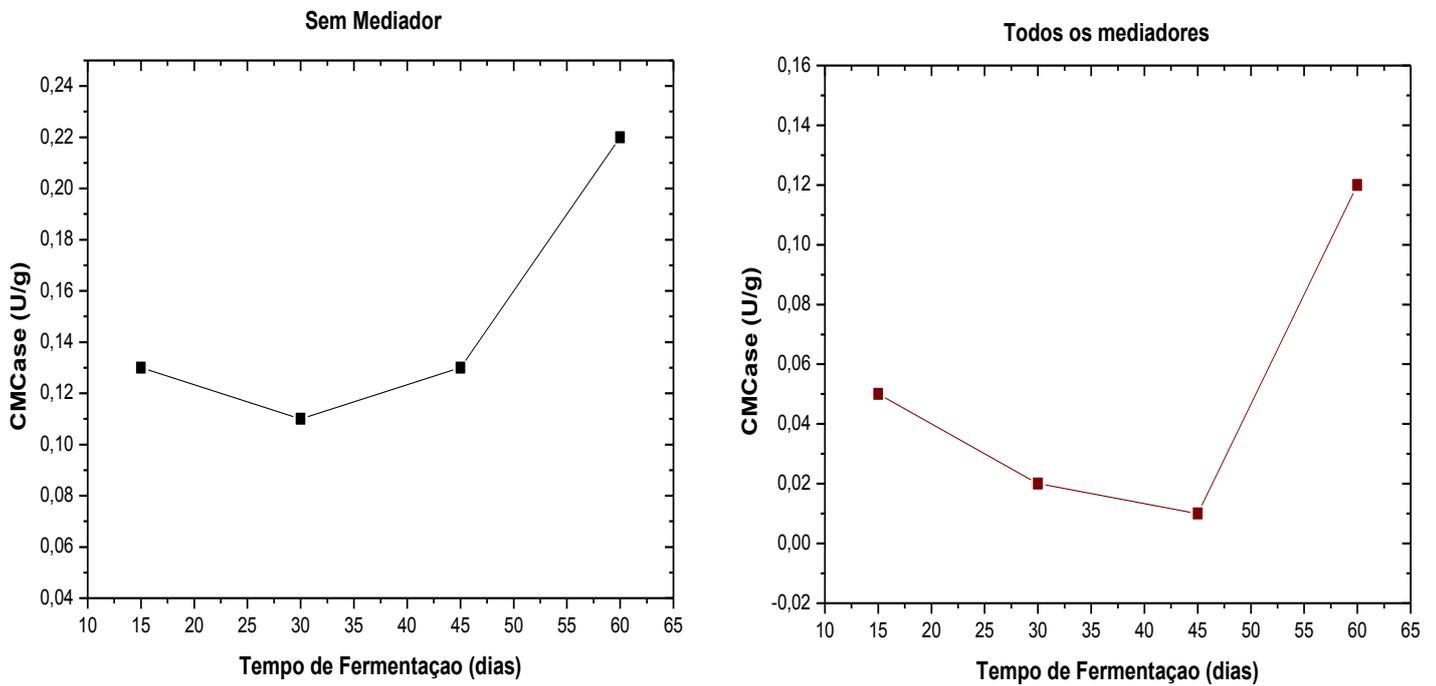


Figura 36: Efeito da adição dos mediadores óleo e Tween na atividade de CMCase durante 60 dias de fermentação no substrato 2.

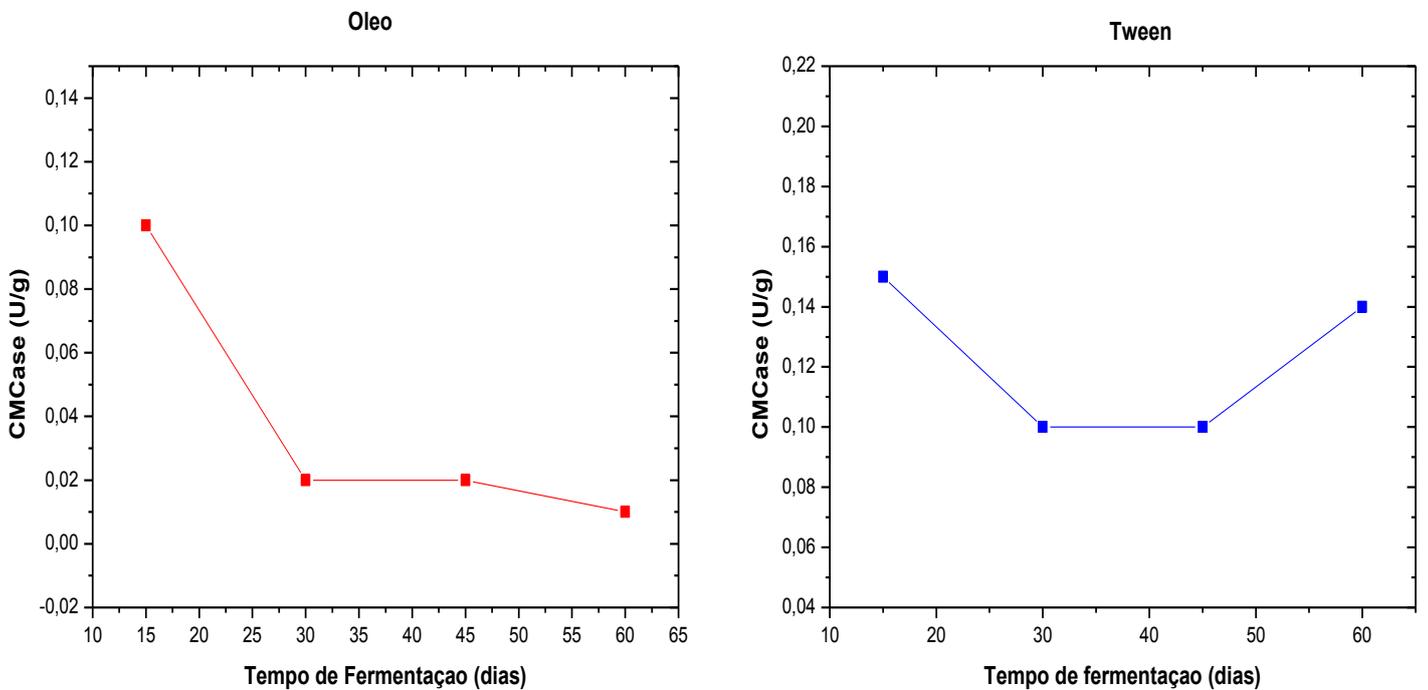


Figura 37: Efeito da adição dos mediadores óleo/Tween e RBBR na atividade de CMCase durante 60 dias de fermentação no substrato 2.

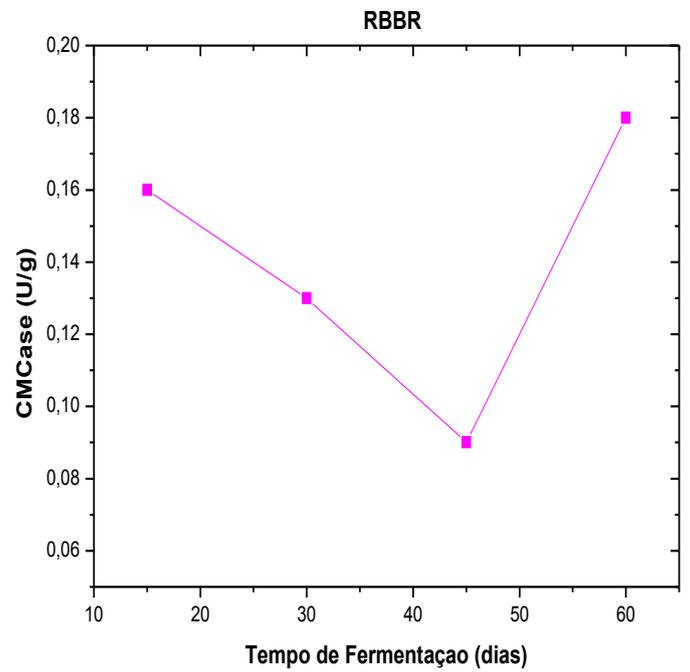
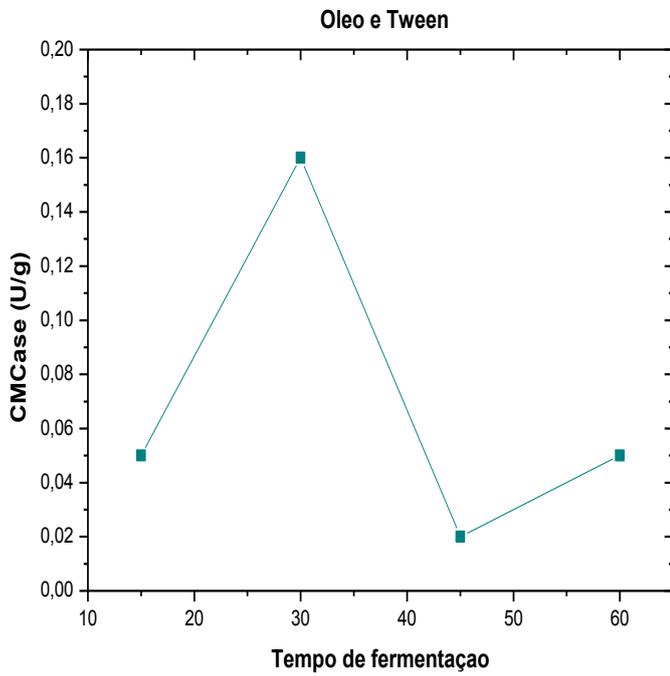
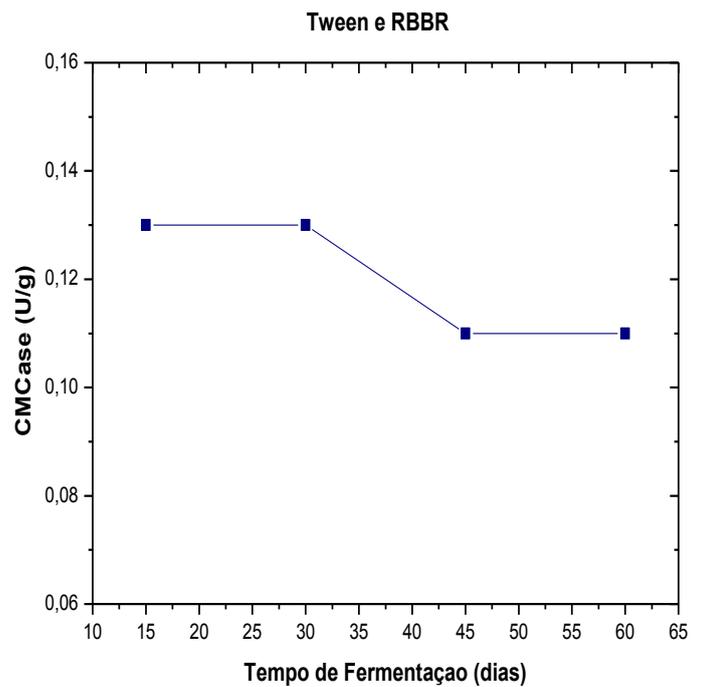
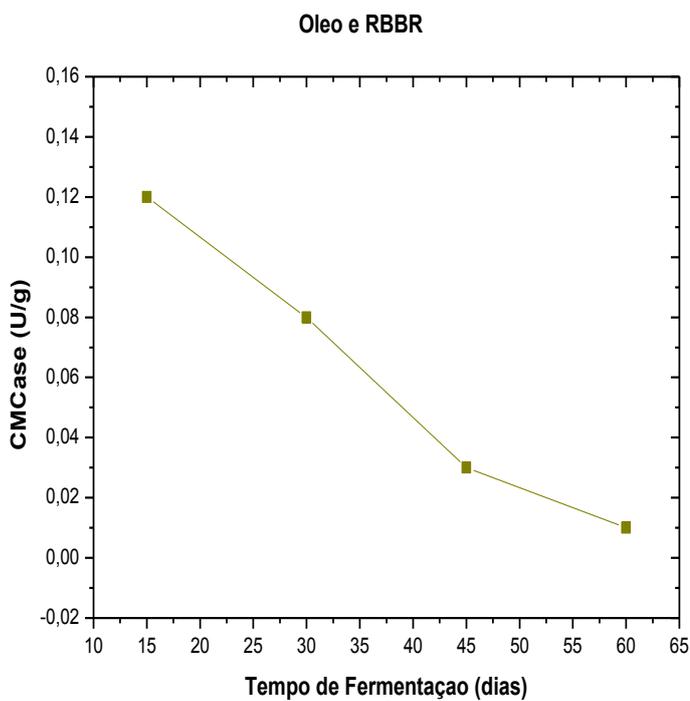


Figura 38: Efeito da adição dos mediadores Óleo/RBBR e Tween/RBBR na atividade de CMCase durante 60 dias de fermentação no substrato 2.



Durante todos os tempos de fermentação foi observado influência negativa do óleo na atividade de CMCase, enquanto para tween e RBBR não foi verificado efeito para atividade dessa enzima. Os coeficientes de variação foram de 76%, 55%, 89% e 88%, para os dias 15, 30, 45 e 60 dias de fermentação, respectivamente.

As atividades médias de CMCase no substrato 2 foram inferiores as encontradas no substrato 1, apresentando atividade máxima de 0,22 U/g aos 60 dias de incubação sem adição de mediadores.

Oliveira (2010) afirmou que a linhagem isolada (CZ01) da casca do coco é boa produtora de celulases quando comparadas com as linhagens *Trichoderma polysporum*, *T. viride*, *T. reesei* NRRL 11460 e *Aspergillus niger* NRRL 2001, obtendo atividade enzimática de $1,26 \pm 0,09$ U/g.

Lins (2012), em estudo de produção de celulases com bagaço de pedúnculo do caju utilizando *Trichoderma reesei* LCB 48, obteve atividade de 0,37 U/g.

Segundo Maurya et al. (2012), o fungo *Trichoderma reesei* NCIM 992 tem a capacidade de produzir celulase a partir de diferentes materiais lignocelulósicos por fermentação semissólida (FSS). A produção máxima de celulase foi de $2,63 \text{ U ml}^{-1}$ utilizando farelo de trigo como substrato.

Gutierrez-Correa e Tengerdy (1997) constataram que o bagaço de cana, em cultura mista de *Trichoderma reesei* LMUC4 e *Aspergillus phoenicis*, induziu a produção de celulase total atingindo 13,4 U/g, após 120 horas de incubação a 30°C. Já Rodriguez-Zúñiga et al. (2011) encontraram valor mais baixo 0,3 U/g de CMCase obtida em 72 h a partir do mesmo resíduo, utilizando *Aspergillus niger*.

Guimarães e Conrado (2011) obtiveram produção de CMCase igual a 0,73 U/g usando o *Trichoderma* sp em bagaço de caju deslignificado. Campos (2011) ao realizar fermentação semi-sólida com bagaço de caju utilizando o fungo filamentosso *Trichoderma* sp, obteve valores de atividade enzimática expressa em CMCase, que foi de 0,77 U/g.

4.4 PH ÓTIMO E ESTABILIDADE DO PH DA LACASE

Para avaliar o pH ótimo e estabilidade do pH da lacase foram utilizados os ensaios que apresentaram a maior atividade de lacase para os dois tipos de substratos usados nesse trabalho. No substrato 1, o ensaio utilizado foi o que continha o mediador tween aos 30 dias de fermentação. Para o substrato 2, o ensaio

utilizado apresentava os mediadores tween e RBBR com tempo de fermentação de 15 dias. O pH que apresentou a maior atividade enzimática foi utilizado para determinação do efeito da temperatura sobre a atividade da lacase.

As Figuras 39 a 40 mostram o efeito do pH e a estabilidade a diferentes valores de pH sobre a atividade da lacase de *Psilocybe castanella* (CCIBt 2781). O pH ótimo e a estabilidade foram determinados em tampão citrato-fosfato nos valores de pH entre 2,5 a 10,0. Ambos os testes tiveram ABTS (2,2-Azinobis-3-Ethyl Benzothiazoline-6-Sulphonate) como substrato.

Figura 39: Efeito do pH sobre a atividade da lacase de *Psilocybe castanella* (CCIBt 2781) durante 30 dias de fermentação no substrato 1.

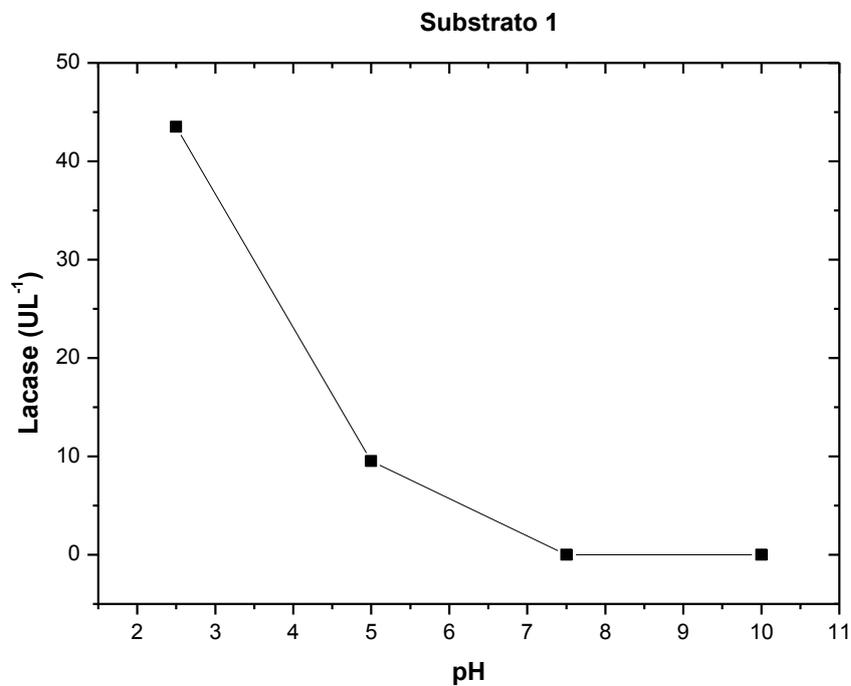


Figura 40: Efeito do pH sobre a atividade da lacase de *Psilocybe castanella* (CCIBt 2781) durante 15 dias de fermentação no substrato contendo 2.

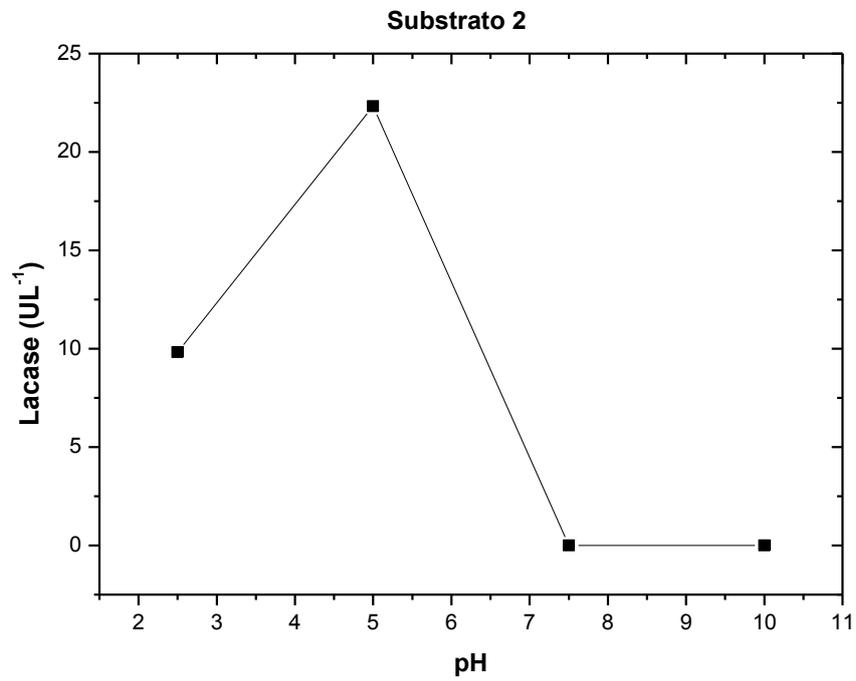


Figura 41: Estabilidade a diferentes valores de pH da lacase de *Psilocybe castanella* (CCIBt 2781) durante 30 dias de fermentação no substrato 1.

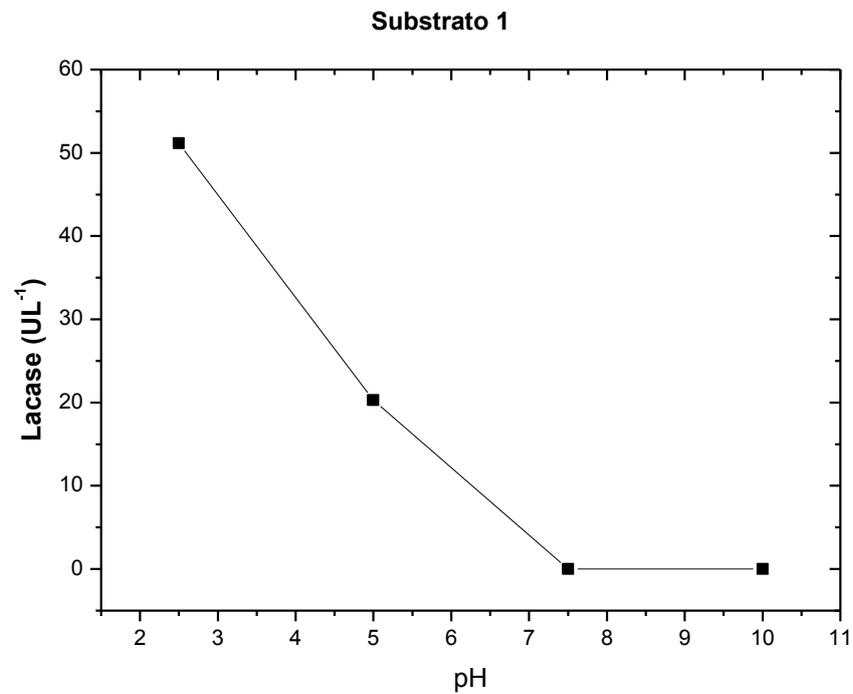
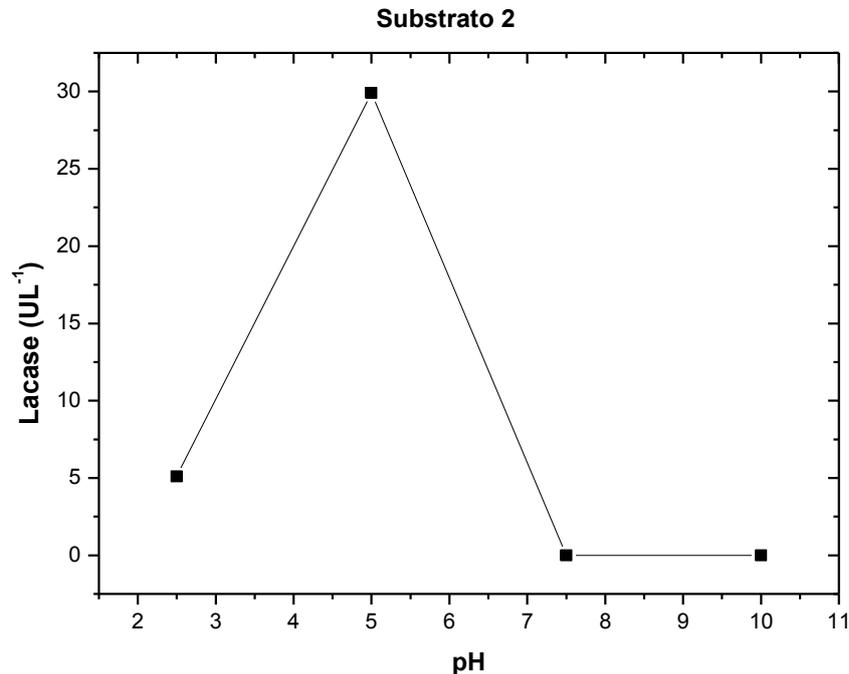


Figura 42: Estabilidade a diferentes valores de pH da lacase de *Psilocybe castanella* (CCIBt 2781) durante 15 dias de fermentação no substrato 2.



De acordo com as Figuras 39 a 42 pode-se observar que a maior atividade enzimática para o ensaio contendo farelo da palha de milho verde e bagaço da cana-de-açúcar foi obtida quando utilizado pH 2,5, apresentando uma atividade de 43,50 UL⁻¹ e estabilidade do pH de 51,16 UL⁻¹. O mesmo pH foi encontrado pelos autores Shin e Lee (2000) utilizando o fungo *Coriolus hirsutus*, Saparrat *et al.* (2002) que trabalhou com o micro-organismo *Corioloopsis rígida* e Coelho *et al.* (2005) que utilizaram o fungo *Psilocybe castanella* CCB444.

Em pH 5,0, o pH ótimo e estabilidade do pH obtidos foram de 9,52 UL⁻¹ e 20,31 UL⁻¹, respectivamente. Para o pH 7,5 e 10,0 não foram obtidas atividades de lacase.

No substrato 2, o pH 5,0 apresentou a melhor atividade e estabilidade de lacase, com 22,32 UL⁻¹ e 29,91 UL⁻¹, respectivamente.

No pH 2,5 a atividade encontrada foi de 9,82 UL⁻¹ e a estabilidade do pH de 5,09 UL⁻¹. Para o pH 7,5 e 10,0 não foram verificadas atividades. Esse mesmo valor de pH foi encontrado pelos autores Heinzkill *et al* (1998) que tiveram como micro-organismo o fungo *Coprinus friesii*, Min *et al* (2001) com a espécie *Phellinus ribis*.

A explicação para diferença encontrada nos valores de pH e estabilidade do pH nos dois substratos analisados pode estar no fato de que os basidiomicetos

ligninolíticos produtores de lacases secretam isoenzimas com diferenças na estabilidade e nas propriedades catalíticas e, ainda que, o pH ótimo de lacase é altamente dependente do substrato utilizado para determinação da atividade (MOROSHI, 1991; SALAS *et al.*, 1995).

Quando o ABTS é utilizado como substrato para lacase, o pH ótimo é mais ácido e são encontrados valores ótimos na faixa entre o pH 3 e 5. O pH ótimo de lacases varia com a espécie de organismo avaliada. Assim, como observado para *P. castanella*, lacases de muitos basidiomicetos apresentam o pH ótimo na região ácida, próximo a 3,0 (MOREIRA-NETO, 2006).

4.5 TEMPERATURA ÓTIMA DA LACASE

As Figuras 43 e 44 mostram o efeito da temperatura sobre a atividade da lacase de *Psilocybe castanella* (CCIBt 2781). A temperatura ótima foi verificada na faixa de 25°C a 80°C, tendo ABTS como substrato. A influência da temperatura foi avaliada em tampão citrato-fosfato pH 2,5 para o ensaio contendo farelo da palha de milho verde e bagaço de cana-de-açúcar com atividade máxima de 52,67 UL⁻¹ a temperatura de 50°C. No ensaio contendo bagaço da casca de coco verde e farinha de soja comercial, a atividade de lacase foi avaliada em tampão citrato-fosfato pH 5,0 com atividade máxima de 24,34 UL⁻¹, também a temperatura de 50°C.

Figura 43: Efeito da temperatura sobre a atividade da lacase de *Psilocybe castanella* (CCIBt 2781) durante 30 dias de fermentação no substrato 1.

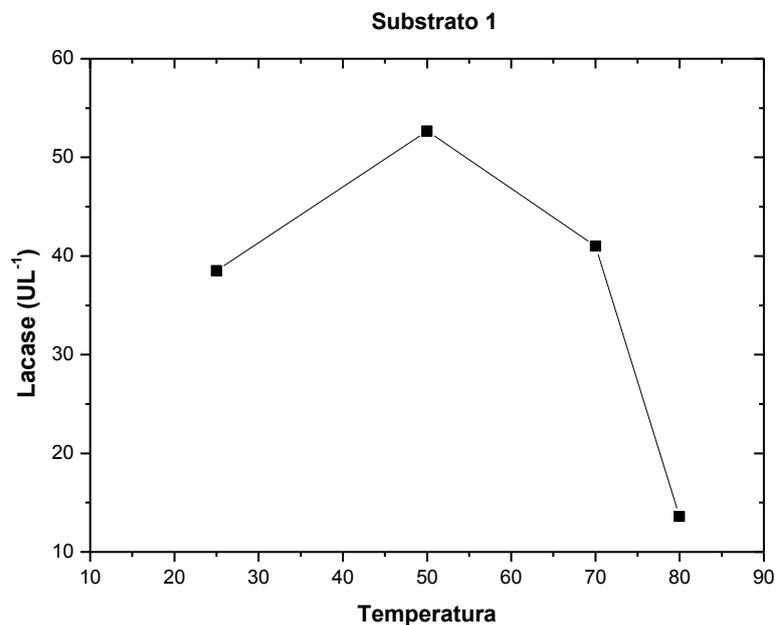
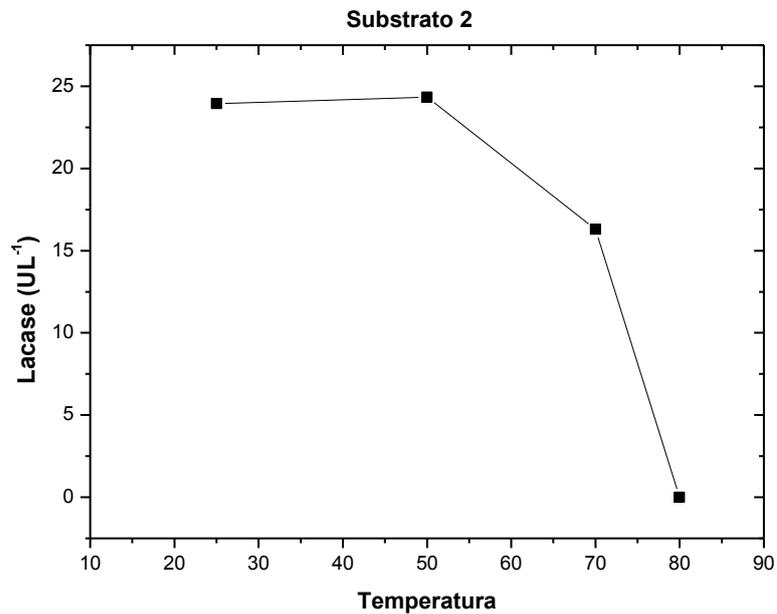


Figura 44: Efeito da temperatura sobre a atividade da lacase de *Psilocybe castanella* (CCIBt 2781) durante 15 dias de fermentação no substrato 2.



O aumento da temperatura de reação promoveu aumento na atividade de lacase até 50°C, isso deve ter ocorrido devido ao aumento de agitação das moléculas com aumento da frequência das colisões entre substrato e enzima. Acima da temperatura ótima de atividade de uma enzima, no entanto, a velocidade de reação diminui, provavelmente devido à desnaturação da enzima pelo calor (HARPER *et al.*, 1982).

A temperatura ótima de 50°C, encontrada nesse trabalho, foi semelhante à observada por Xiao *et al.* (2003) que estudou a atividade de lacase pelo fungo *Trametes* sp.

4.6 DETERMINAÇÃO DA PERDA DE MASSA DO PP

De acordo com as análises realizadas para determinar a perda de massa do polímero PP, observou-se uma pequena, porém considerável alteração em sua massa após incubação. Provavelmente atribui-se este fato a boa estabilidade que estes apresentam aos processos degradativos.

A utilização de *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 apresentou resultados mais satisfatórios de degradação quando foi utilizado o substrato contendo bagaço da casca de coco verde e farinha de soja comercial, além de indicar uma relação

positiva entre perda de massa do PP e produção da enzima lacase, visto que as maiores atividades dessa enzima foram verificadas ao utilizar esse substrato.

Na Tabela 14 é apresentada a porcentagem de perda de massa dos polímeros no substrato 2.

Tabela 14 – Porcentagem de perda de massa molar dos PPs.

Substratos	Mediadores	Perda de massa (%)			
		15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Bagaço da casca de coco verde e farinha de soja comercial	Sem mediadores	7,51	5,62	9,03	1,28
	Óleo	6,02	9,77	7,73	11,56
	Tween	10	9,79	6,29	0
	Óleo/tween	1,45	9,15	5,98	0,68
	RBBR	11,49	11,64	5,26	4,79
	Óleo/RBBR	1,77	12,07	3,55	2,80
	Tween/RBBR	7,25	10,26	10,81	11,32
Todos os mediadores	5,62	11,25	1,32	9,09	

Lee *et al.* (1991) verificaram que micro-organismos ligninolíticos foram capazes de degradar componentes oxidados de polietileno observando-se reduções de massa molecular deste polímero. Os efeitos esperados quanto ao crescimento microbiano em polímeros sintéticos são ataque da superfície do polímero, descoloração e perda da transparência (ASTM G21-90, 1990).

A determinação da perda de massa é um método comumente aplicado e relativamente sensível para determinar mudanças causadas pelo ataque microbiano nos polímeros, porém observar a degradação de um polímero é difícil, pois este fenômeno pode ocorrer sem que haja necessariamente a perda de massa do polímero, mas alterações na molécula do polímero (SCOTT e GILEAD, 1995).

Desta forma, a metodologia de pesagem pode ser considerada útil para triagem inicial dos ensaios, porém torna-se evidente a necessidade de outras ferramentas com maior precisão e sensibilidade para avaliar a degradação de um polímero.

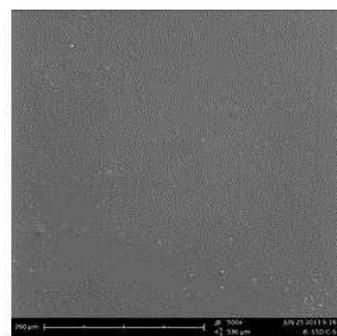
4.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO PP – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura do polímero foi realizada para analisar se a superfície sofreu alguma modificação. Para isso, foram utilizados os polímeros que estavam presentes nos sistemas de cultivos que apresentaram os melhores resultados da produção enzimática, visando confirmar a correlação entre a atividade enzimática e degradação dos polímeros.

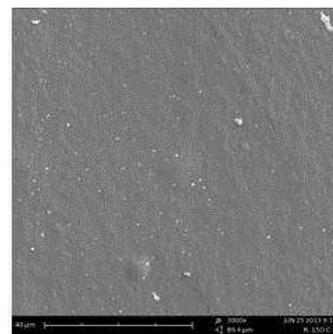
A análise também foi realizada no controle abiótico que continha substrato submetido à fermentação semissólida, polímeros sintéticos e ausência de micro-organismos no meio de cultivo.

As Figuras 45 a 52 apresentam as fotomicrografias com aumentos de 500x e 3000x dos PPs incubados na condição de controle abiótico, bem como das amostras incubadas durante fermentação semissólida nos dois substratos, nos períodos de 15, 30, 45 e 60 dias. Com base na análise dessas imagens foi possível identificar as alterações sofridas nas superfícies dos polímeros, como mostram as setas.

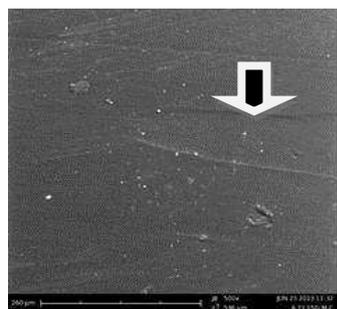
Figura 45: Comparação entre as fotomicrografias obtidas a partir dos PPs do controle abiótico e do ensaio realizado até 15 dias de incubação para o substrato 1.



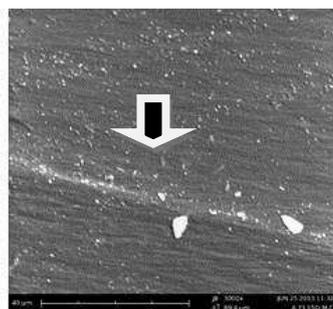
Controle abiótico 15 dias – 500x.



Controle abiótico 15 dias – 3000x.

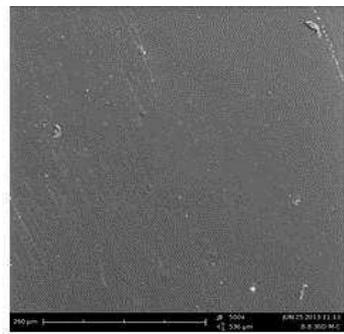


Amostra 15 dias – 500x.

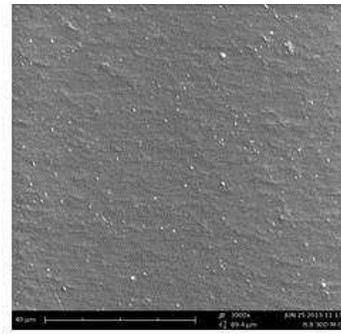


Amostra 15 dias – 3000x.

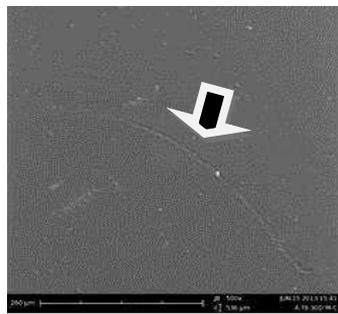
Figura 46: Comparação entre as fotomicrografias obtidas a partir dos PPs do controle abiótico e do ensaio realizado até 30 dias de incubação para o substrato 1.



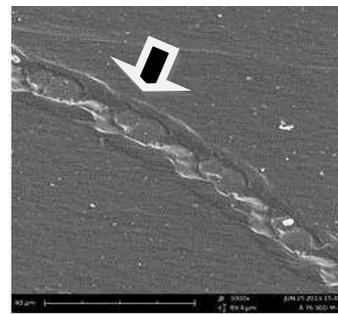
Controle abiótico 30 dias – 500x.



Controle abiótico 30 dias – 3000x.

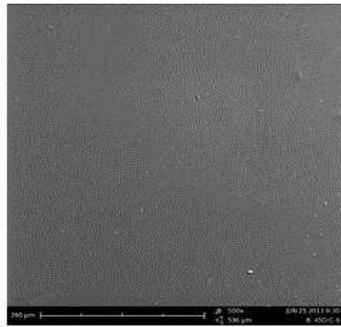


Amostra 30 dias – 500x.

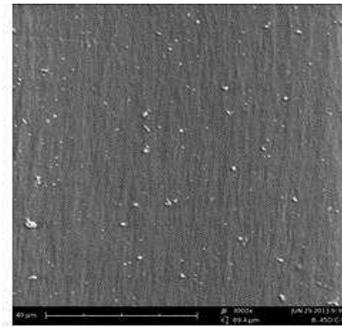


Amostra 30 dias – 3000x.

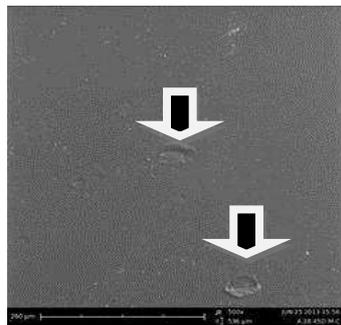
Figura 47: Comparação entre as fotomicrografias obtidas a partir dos PPs do controle abiótico e do ensaio realizado até 45 dias de incubação para o substrato 1.



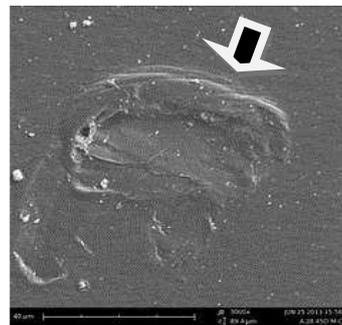
Controle abiótico 45 dias – 500x.



Controle abiótico 45 dias – 3000x.



Amostra 45 dias – 500x.



Amostra 45 dias – 3000x.

Figura 48: Comparação entre as fotomicrografias obtidas a partir dos PPs do controle abiótico e do ensaio realizado até 60 dias de incubação para o substrato 1.

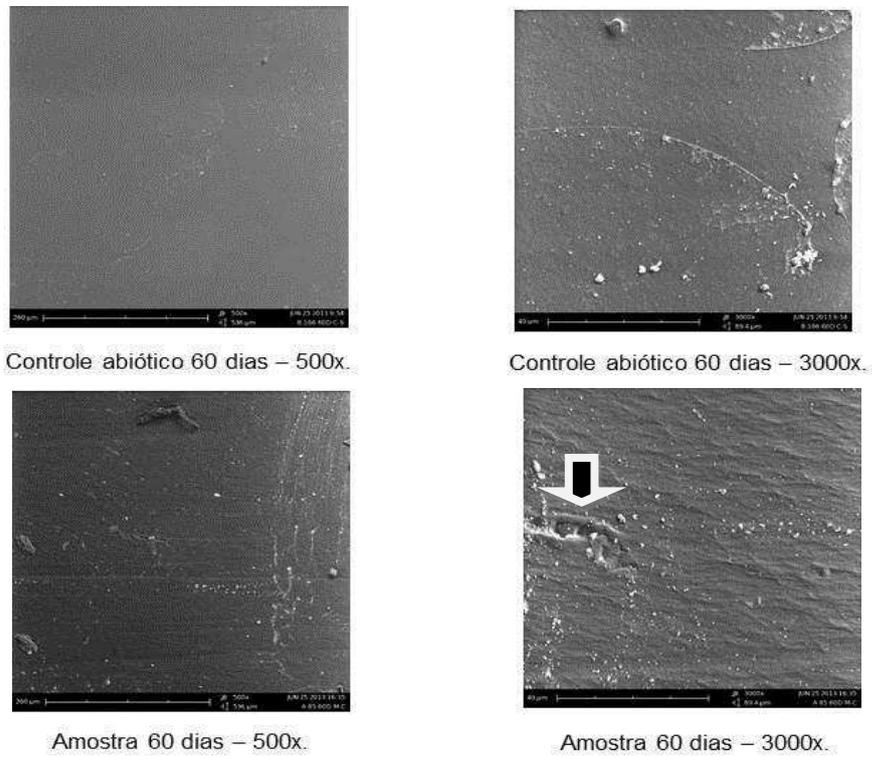


Figura 49: Comparação entre as fotomicrografias obtidas a partir dos PPs do controle abiótico e do ensaio realizado até 15 dias de incubação para o substrato 2.

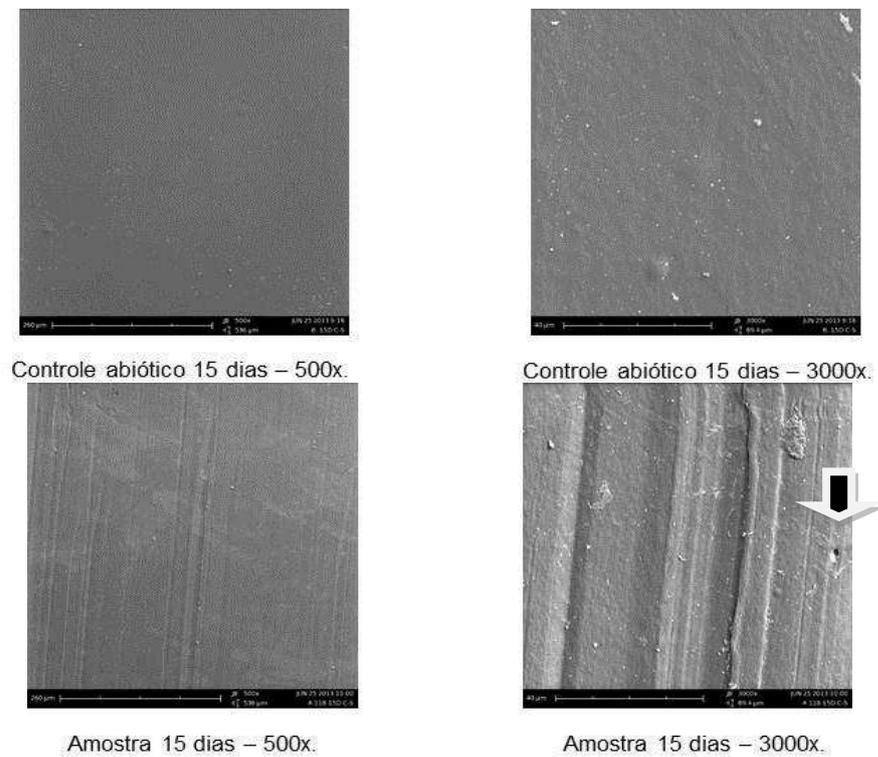


Figura 50: Comparação entre as fotomicrografias obtidas a partir dos PPs do controle abiótico e do ensaio realizado até dias 30 de incubação para o substrato 2.

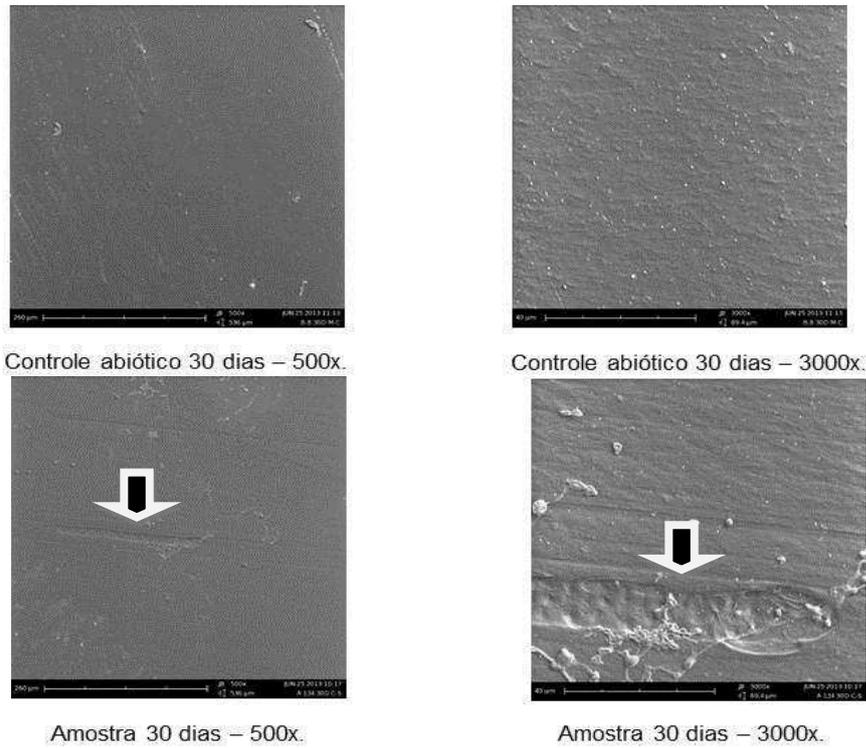


Figura 51: Comparação entre as fotomicrografias obtidas a partir dos PPs do controle abiótico e do ensaio realizado até 45 dias de incubação para o substrato 2.

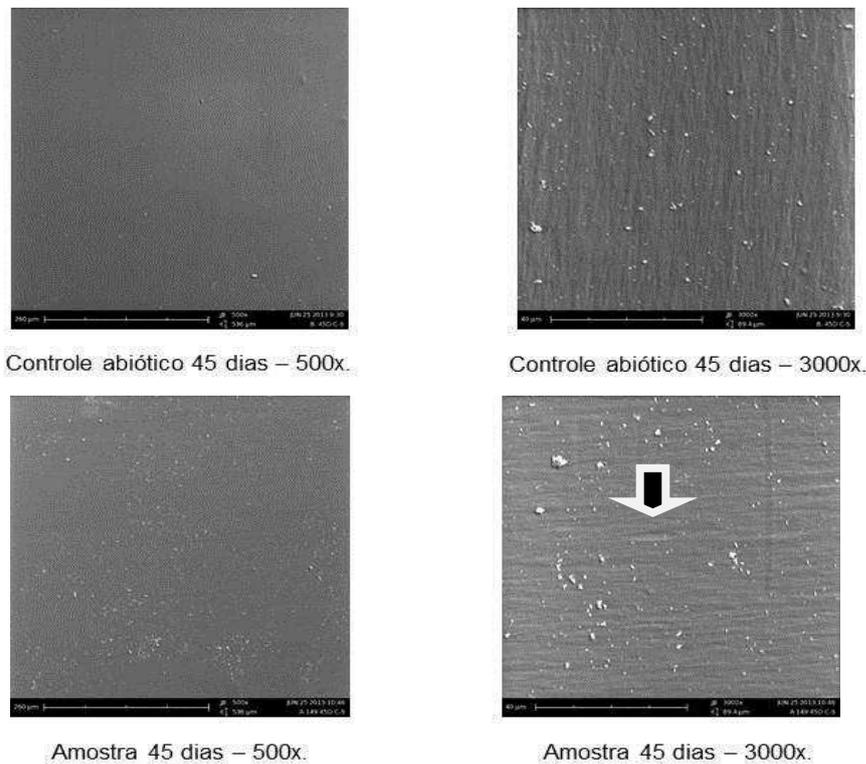
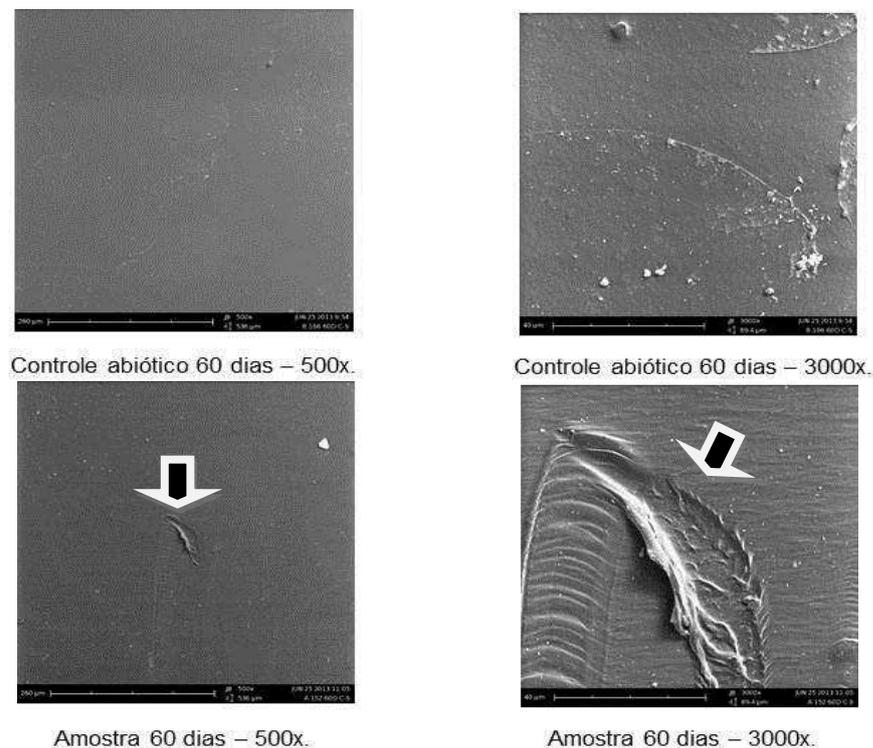


Figura 52: Comparação entre as fotomicrografias obtidas a partir dos PPs do controle abiótico e do ensaio realizado até 60 dias de incubação para o substrato 2.



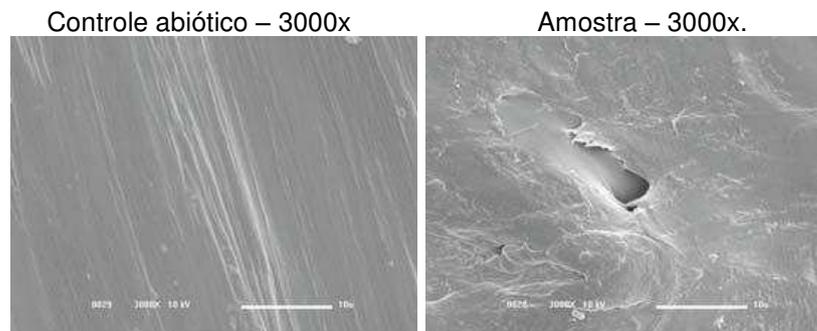
Todas as amostras analisadas que foram submetidas à incubação com os dois substratos apresentaram alterações nas superfícies dos polímeros, indicadas por ranhuras e sulcos como pode ser observado nas Figuras 45 a 52. Embora seja possível observar alterações sutis nas superfícies dos polímeros incubados em condição controle (controles abióticos 15 a 60 dias), é nítida a maior intensidade de degradação observada nos ensaios em que houve a fermentação por *P. castanella* (amostras 15 a 60 dias).

Os pontos e as manchas brancas na superfície das amostras podem ser de resíduos que restaram após a lavagem dos mesmos, ou algum outro material aderido ou depositado durante a fermentação. Estes não foram associados a nenhum indício de biodegradação.

As modificações nas superfícies dos PPs visualizadas nas figuras 45 a 52 podem ser comparadas as fotomicrografias encontradas no trabalho de Silva (2009), onde foram analisadas alterações nas superfícies de pellets de PET (Polietileno Tereftalato), submetidas à fermentação semissólida e incubadas com a linhagem *Pleurotus 001*.

A Figura 53 mostra as fotomicrografias de pellets de PET encontradas no trabalho de Silva (2009

Figura 53: Comparação entre as fotomicrografias obtidas a partir dos pellets do controle abiótico e do ensaio realizado após 60 dias de incubação.



Fonte: Silva (2009)

Faria e Franchetti (2010) obtiveram resultados semelhantes ao analisar PPs que passaram pelo processo de biodegradação por micro-organismos presentes nas águas do rio Atibaia. As amostras e os controles abióticos, analisadas por MEV, mostraram diferenças bem nítidas na morfologia da sua superfície, onde foi possível observar furos, traços e marcas profundas na superfície das amostras que passaram pelo processo de fermentação. Segundo Faria e Franchetti (2010), a alteração da superfície, devido à ação microbiana nos PPs intensificam a colonização dos mesmos por micro-organismos, expondo o polímero ao contato com enzimas.

Estudos mostraram a capacidade da lacase em oxidar muitas substâncias recalcitrantes como: estruturas relacionadas à lignina (BOURBONNAIS *et al.*, 1996), compostos organofosforados (AMITAI *et al.*, 1998) e corantes aromáticos (WESENBERG *et al.*, 2003).

Durán *et al.* (2002) relataram que a grande variedade de substratos oxidados por lacases na presença de mediadores específicos e a capacidade de lacases fúngicas de degradar compostos aromáticos recalcitrantes com elevado potencial redox fornecem a esta classe de enzimas um grande valor para desenvolvimento de tecnologias ambientalmente seguras nos processos industriais de papel e polpa, assim como na biorremediação de solos e efluentes industriais.

Matheus *et al.* (2003) mostraram que durante o crescimento de *P. castanella* em solo, o pH do sistema de cultivo encontrava-se na região ácida, próximo a 4,0 e que a elevada estabilidade destas enzimas ligninolíticas na faixa de pH próximo a 4,0 pode ser considerada um aspecto favorável para aplicação de *P. castanella* em processos de biorremediação. Esse fato pode ser comparado aos resultados encontrados no presente trabalho, indicando que a estabilidade do pH da lacase na

faixa de 2,5 a 5,0 pode ter contribuído para o processo de degradação dos polímeros sintéticos (PPs).

4.8 ANÁLISE DA CRISTALINIDADE DO PP POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

Para analisar a cristalinidade dos polímeros foram utilizadas amostras que apresentaram as maiores perdas de massa. Com base nisso, foram analisados os ensaios que continham bagaço da casca de coco verde e farinha de soja comercial com 30 dias de fermentação.

As Figuras 54 e 55 mostram a comparação entre a DRX obtida a partir dos PPs do controle abiótico, que não passaram pelo processo de fermentação semissólida, e do ensaio realizado até 15 dias de incubação das amostras 134 e 143 que tinham como substrato bagaço da casca de coco verde e farinha de soja comercial, além dos mediadores tween e RBBR. Nesse ensaio foi obtida a maior atividade enzimática de lacase.

Figura 54: Comparação entre a DRX obtida a partir dos PPs do controle abiótico e do ensaio realizado até 15 dias de incubação no substrato 2 (amostra 134).

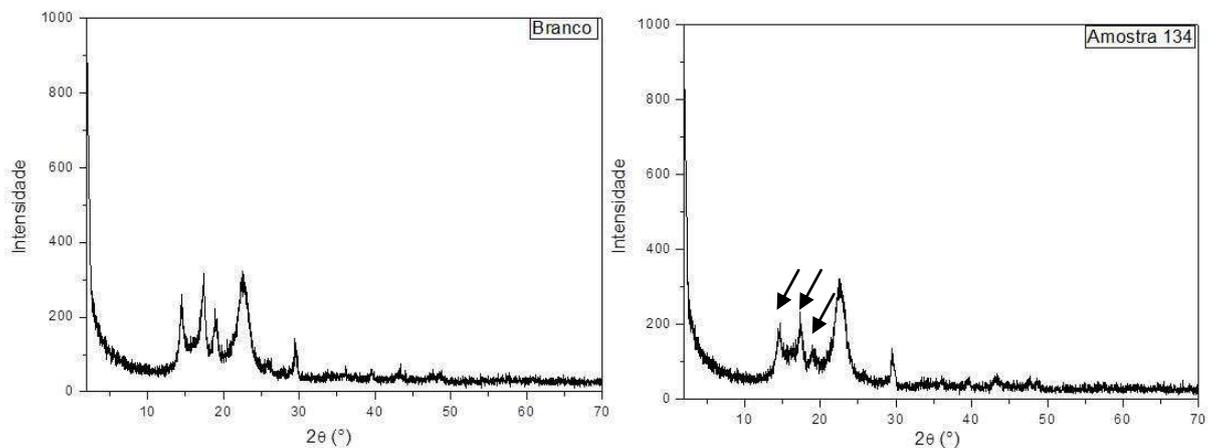
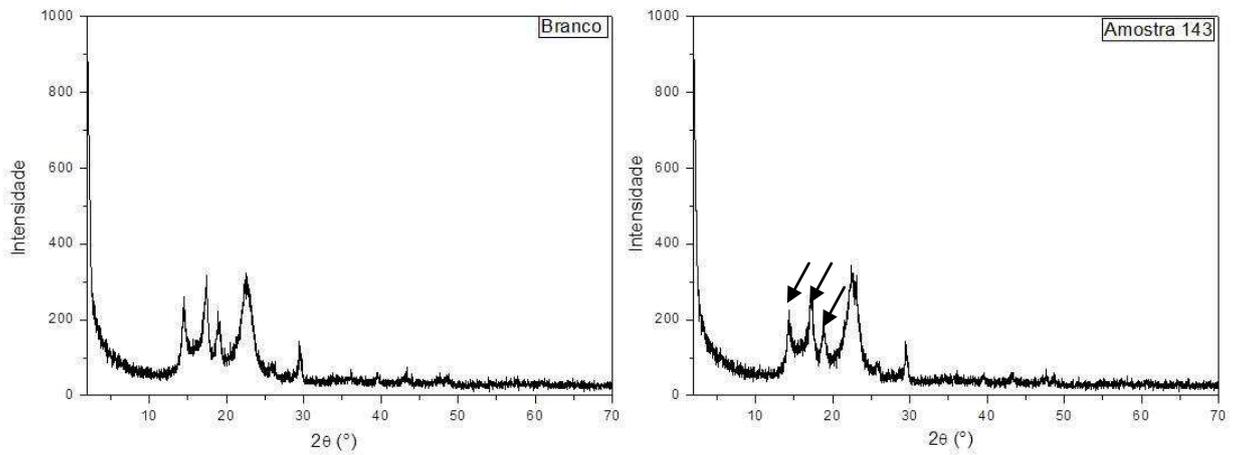


Figura 55: Comparação entre a DRX obtida a partir dos PPs do controle abiótico e do ensaio realizado até 15 dias de incubação no substrato 2 (amostra 143).



Foi possível observar uma redução na intensidade dos picos (setas) das amostras 134 e 143 quando comparadas ao controle abiótico. Segundo Meng *et al* (2009) essa redução na intensidade dos picos está relacionada à redução do tamanho e/ou quantidades dos cristais no ângulo medido. Esse fato pode estar relacionado às modificações sofridas pelos polímeros sintéticos que passaram pelo processo de fermentação semissólida e sofreram degradação pela enzima lacase.

5 CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas neste trabalho estão apresentadas a seguir:

Processo fermentativo

- O substrato 2 apresentou os melhores resultados para atividade de lacase e o substrato 1 para atividade de CMCase.
- A maior atividade de lacase no substrato 1 foi $69,77 \text{ UL}^{-1}$, obtida no período de 30 dias utilizando tween como mediador.
- A atividade máxima obtida no substrato 2 foi $95,67 \text{ UL}^{-1}$, utilizando tween e RBBR, no período de 15 dias de cultivo.
- A maior atividade de CMCase no substrato 1 foi na presença do mediador RBBR aos 45 dias de fermentação, atingindo pico de $0,29 \text{ U/g}$.
- No substrato 2 a atividade máxima de CMCase foi $0,22 \text{ U/g}$ obtida na ausência de mediadores aos 60 dias de fermentação.
- O tween foi o mediador que mais influenciou, positivamente, a atividade da lacase.
- Os mediadores não apresentaram efeito em relação à atividade de CMCase, com exceção do óleo que influenciou negativamente.

PH ótimo, temperatura ótima e estabilidade do pH da lacase

- A maior atividade enzimática no substrato 1 foi obtida quando utilizado pH 2,5, apresentando uma atividade de $43,50 \text{ UL}^{-1}$ e estabilidade do pH de $51,16 \text{ UL}^{-1}$.
- No substrato 2, o pH 5,0 apresentou a melhor atividade e estabilidade de lacase, com $22,32 \text{ UL}^{-1}$ e $29,91 \text{ UL}^{-1}$, respectivamente.
- Nos dois substratos analisados nesse trabalho as maiores atividades de lacase foram obtidas a temperatura de 50°C .

Análise morfológica do PP

- Todas as amostras analisadas que foram submetidas à incubação com os dois substratos apresentaram alterações nas superfícies dos polímeros.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMILHO: Associação Brasileira dos produtores de Milho. O cereal que enriquece a alimentação humana. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/milho/cereal>. Acessado em 29 de agosto de 2013.

ABIPLAST: Associação Brasileira da Indústria do Plástico. Disponível em: <http://www.abiplast.org.br/site/os-plasticos>. Acessado em 09 de outubro de 2013.

ALBUQUERQUE, J. A. C. **Planeta Plástico**. Porto Alegre. Ed. Sagra Luzzatto, 2000. 285 p.

ALMEIDA, M. L. O; VILHENA, A. **Processamento do lixo: reciclagem do plástico**. Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT). São Paulo: IPT/CEMPRE, 2000.

AL-SALEM, S.M.; LETTIERI, P.; BAEYENS, J. Recycling and Recovery Routes of Plastic Solid Waste (PSW): A Review. *Waste Management*, n. 29, p. 2.625-2.643, 2009.

AMERICAN CHEMISTRY, ACC. Resin Statistics Summary 2009 vs. 2008, 2009.

AMITAI, G., ADANI, R., SOD-MORIAH, G., RABINOVITZ, I., VINCZE, A., LEADER, H. Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. **FEBS Letters**. 438: 195- 200, 1998.

AMORIM, B. C. Estudo da produção de celulases por fermentação semissólida em bagaço de caju (*Anacardium occidentale* L.) utilizando o microrganismo *Trichoderma* sp. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 86 p. 2010.

ANDRADE, M. C. N.; CHAVARI, J. L.; MINHONI, T. A.; ZIED, D. C. Crescimento micelial in vitro de cinco linhagens de *Agaricus bisporus* submetidas a diferentes condições de temperatura submetidas a diferentes condições de temperatura. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v. 32, n. 1, p. 69-72, 2010.

ARAGÃO, W. M. Cultivares de coqueiros. In: FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S.; SIQUEIRA, L. A. (Ed.). A cultura do coqueiro. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2007.

ASGHER, M., BHATTI, H.N., ASHRAF, M. & LEGGE, R.L. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* 19: 771–783. 2008.

ASTM – American Society For Testing Materials. Standart Practice for Determining Resistance of Plastics to fungi, G21-90, 1990.

ASTM – American Society for Testing Materials. Standart method for aerobic biodegradability of degradable plastics by specific microorganisms, D5247- 92, 1992.

BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS Microbiology Letters**, 30:215-242, 2006.

BALLAMINUT, N. Caracterização fisiológica do inóculo de *lentinuscritinus* CCB 274 empregado em biorremediação de solo, 2007. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente/SP, São Paulo, 2007.

BALLAMINUT, N e MATHEUS, D. R. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. **Brazilian Journal of Microbiology In Press**. 2006.

BARBIERI., R. H. T.; BARCELOS L. S. Produção de fertilizante orgânico a partir do bagaço de cana-deaçúcar: uma alternativa para o gerenciamento do resíduo oriundo de indústrias sucroalcooleiras. **VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**. Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, 2009.

BARR, D. P.; AUST, S. D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science and Technology**, v.28, p. 78-87, 1994.

BAZINET, L. Electroacidification of soybean for production of isolate. **Food Technology**, Chicago, v.51, n.9, p.52-60, 1997.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degradating enzymes and their potencial industrial application. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 3-4, p. 586-620, 1997.

BLANCO, M. C. S. Compostagem. Disponível em: http://www.cati.sp.gov.br/Cati/tecnologias/manejo_conservacao_solo/compostagem.php. Acessado em: 30 de abril de 2014.

BON, E. P.S.; FERREIRA, M.A. Enzimas em biotecnologia produção, aplicação e mercado, Rio de Janeiro. **Interciência**, p. 506, 2008.

BONOMO, R.P., BOUDET, A.M., COZZOLINO, R., RIZZARELLI, E., SANTORO, A.M. & STERJADES, R. A comparative study of two isoforms of laccase secreted by the “white-rot” fungus *Rigidoporus lignosus*, exhibiting significant structural and functional differences. **Journal of Inorganic Biochemistry**. 71: 205-211, 1998.

BONONI, V. L. CAPELARI, M.; MAZIEIRO, R.; TRUFEM, S. F. B. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. São Paulo: Ícone, 1999.

BOURBONNAIS, R. e PAICE, M.G. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Biochemical Journal**. 255: 445-450. 1988.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 267, p. 99–102, 1990.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G.; FREIERMUTH, B.; BODIE, E.; BORNEMANN, S. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63 p. 4627-4632. 1996.

BRASIL. EMBRAPA SOJA. 2013. Disponível em: www.cnpso.embrapa.br. Acessado em setembro de 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. Brasília: Editora MS. 2005, 1017p.

BRASIL – Ministério da agricultura. Culturas – Cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar/>. Acessado em 22 de agosto de 2013.

BRASIL – Ministério da agricultura. Culturas – Milho. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>. Acessado em 22 de agosto de 2013.

BRASIL – Ministério da agricultura. Mercado interno. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/mercado-interno>. Acessado em 22 de agosto de 2013.

BRASKEM. Polipropileno. Pesquisado em: <http://www.braskem.com.br/>. Acesso em 10 de dezembro de 2013.

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

CALL, H.P.; MÜCKE, L. History, overview and applications of mediated lignolytic system, especialmente laccase-mediator-system (Lignozym –process). **Journal of Biotechnology**, v.53, p. 2909-2913, 1997.

CAMPOS, D. B. C. **Hidrólise enzimática do bagaço deslignificado do pedúnculo do caju para produção de bioetanol**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 78 p. 2011.

CASTRO, P.R.C; KLUGE, R.A. **Ecofisiologia de Cultivos Anuais**. Trigo, Milho, Soja, Arroz e Mandioca. 1º ed. São Paulo: Nobel, 1999.

COELHO, G.D., CHU, E.P. & MACHADO, K.M.G. Purificação parcial e caracterização da lacase produzida por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo (Resumo) Anais do V Congresso Latino Americano de Micologia, Brasília-DF, p.249, 2005.

COELHO, G. D. Purificação parcial do sistema enzimático produzido por *Psilocybecastanella* CCB444 durante crescimento em solo, 2007. Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente/SP, São Paulo, 2007.

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de Cana-de-Açúcar. Safra 2013/2014, Segundo levantamento, agosto de 2013. Disponível em

http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_-_abril_2013_1o_lev.pdf. Acessado em 20 de setembro de 2013.

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra Brasileira de grãos. Safra 2012/2013. Décimo primeiro levantamento, agosto de 2013. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_09_10_43_44_boletim_portugues_agosto_2013_port.pdf. Acessado em 09 de Setembro de 2013.

CONTATO, M.C.D.; SERAFINI, T.Z.; SOTO, J.M.R. Contaminação por sólidos e químicos em tartarugas marinhas no Sul do Brasil. In: Simpósio Brasileiro De Engenharia Ambiental, Itajaí/SC, 2003.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Coconut flesh: a novel raw material for laccase production by *Trametes hirsuta* under solid-state conditions: Application to Lissamine Green B decolourization. **Journal of Food Engineering**. v. 71, p. 208-213, 2005.

COUTO, S. R.; HERRERA, J. L. T. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 500–513, 2006.

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

DE SOUZA, C. G.; PERALTA, R. M. Purification and characterization of the main laccase produced by the White-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, p. 278-286, 2003.

DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Desenvolvimento in vitro de *Pleurotus spp.* sob a influência de diferentes substratos e dextrose. Arquivos do Instituto Biológico, v. 72, n. 3, p. 331-338, 2005.

DUPONT, R.R.; BRUELL, C.J.; MARLEY, M.C.; DOWNEY, D.C.; NORRIS, R.D; HULLING, S.G.; PIVETS, B. Bioremediation. Annapolis: **American Academy of Environmental Engineers and USEPA**, 1997.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (eds) **Microbiologia Ambiental**. Embrapa-CNPMA, Jaguariúna, p. 269-292, 1997.

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

DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, p. 907-931, 2002.

EGGERT, C., TEMP, U., DEAN, J.F.D. & ERIKSSON, K.L. Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid. **FEBS Letters**. 376: 202-206, 1995.

EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K. E. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1151–1158, 1996.

EIRA, A. F. Cultivo de cogumelos (compostagem, Condução e ambiente). Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/IIIRifib/71-81.pdf>. Acessado em 30 de abril de 2014.

EMBRAPA - Soja. Soja na alimentação. Disponível em http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php?pagina=23. Acessado em 24 de maio de 2014.

FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of lacase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, p. 231–240, 2002.

FAO: Organizações das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. Depósito de documentos de la FAO -Maize in humannutrition. Disponível em: http://www.fao.org/docrep/T0395S/T0395S02.htm#Capitulo_1_Introducción. Acessado em 29 de agosto de 2013.

FARIA, A. U.; MARTINS-FRANCHETTI, S. M. Biodegradação de Filmes de Polipropileno (PP), Poli(3-hidroxi-butarato) (PHB) e Blenda de PP/PHB por Micro-organismos das Águas do Rio Atibaia. **Polímeros**, vol. 20, nº 2, p. 141-147, 2010.

FARNET, A. M.; CRIQUET, S.; TAGGER, S.; GIL, G.; LE PETIT J. “Purification, partial characterization, and reactivity with aromatic compounds of two laccases from *Marasmius quercophilus* strain 17,” **Canadian Journal of Microbiology**, vol. 46, no. 3, pp. 189–194, 2000.

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

FERREIRA JR, O. L.; VILELA, E. S. D.; GIOVEDY, J. S.; SILVA, C. M. M. S.; MELO I. S. Atividade de enzimas ligninocelulolíticas envolvidas na degradação do bagaço de cana-de-açúcar por linhagens fúngicas da caatinga. 5º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC, Campinas/SP, 2011.

FOALE, M.; HARRIES, H. Farm and Forestry Production and Marketing Profile for Coconut (*Cocos nucifera*). In: ELEVITCH, C. R. (Ed.). Specialty Crops for Pacific Island Agroforestry, Holualoa, Hawai'i. **Permanent Agriculture Resources**, 2009.

FONTES, H. R.; WANDERLEY, M. Novos cenários para a cultura do coqueiro gigante no Brasil. 2010.

FUKUSHIMA, Y. e KIRK, T.K. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. **Applied and Environmental Microbiology**, 61 (3): 872-876. 1995.

GAITAN, I. J., MEDINA, S. C., GONZÁLEZ, J. C., RODRÍGUEZ, A., ESPEJO, J. A., OSMAC, J. F., SARRIA, V., ALMÉCIGA-DÍAZ, C. J. SÁNCHEZ, O. F. Evaluation of toxicity and degradation of a chlorophenol mixture by the laccase produced by *Trametes pubescens*. **Bioresource Technology**, v.102, p.3632–3635, 2011.

GALHAUP, C.; WAGNER, H.; HINTERSTOISSER B.; HALTRICH, D. Increased Production of laccase by the Wood-degrading basidiomycete *trametespubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 529-536, 2002.

GARCIA, M. C.; TORRE, M.; MARINA, M. L.; LABORDA, F. Composition and characterization of soybean and related products. CRC - **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.37, n.4, p.361-391, 1997.

GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Isoflavones in soy based foods consumed in Brazil: levels, distribution, and estimated intake. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5987 - 5993, 2002.

GILKES, N. R.; LANGSFORD, M. L.; KILBURN, D. G.; MILLER, R. C. Jr.; WARREM, R. A. J. Mode of action and substrate specificities of cellulases from cloned bacterial genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 16, p. 10455-10459, 1991.

GIVEN, D. I.; MOSS, A.R. The nutritional value of cereal straw for ruminants. A review. **Nutrition Abstracts and Reviews** (series B), v.65, p. 793-811, 1995.

GOMES, S. A. S. S.; REBELO, M. F.A. New laccase biosensor for polyphenols determination. **Sensor**, v. 3, P. 166-175, 2003.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Quim. Nova**, v. 32, p. 1500-1503, 2009.

GUEDES, R. C. Estudo da influência de pré-tratamentos de dois resíduos lignocelulósicos (bagaço do pedúnculo do caju e casca de coco) utilizados como substrato na indução à síntese de enzimas celulolíticas. 2010. 88f. Dissertação de mestrado na área de engenharia química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

GUIMARÃES, P. G.; CONRADO, L. S. **Estudo da Produção de Celulolíticas por Fermentação Semi-sólida do Bagaço do Caju Deslignificado**. VII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande. 2011.

GUTIÉRREZ, A. Exopolissacarídios y metabolitos aromáticos de *Pleurotus*: Naturaleza y funcionenl degradation de la lignina, 1995. Tese de doutorado apresentada a Universidade de Sevilha, Sevilha, 1995.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R. P. Production of cellulase on sugarcane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 7, p. 665-667, 1997.

GUTIÉRREZ-SOTO, J.G., SALCEDO-MARTÍNEZ, S.M. CONTRERAS-CORDERO, J.F., HERNÁNDEZ-LUNA, C.E. Characterization of the major laccase from *trametes maxima* cu1 and decolorization of nine commercially significant dyes by the enzyme. **Water Research & Development**. v. 1, p10-19, 2011.

HAGGBLOM, M. M. Microbiol break dow no fhalogenated aromatic pesticides andrelated compounds. **FEMS microbiology review**, v. 103, p. 29-72, 1992.

HAMMEL, K. E. Oxidation of aromatic pollulants by lignin degrading fungi and their extracellular peroxidases. *Metal Ions Biology System*, v. 28, p. 41-60, 1992.

HAMMEL, K.E.; KAPICH, A. N.; JENSEN JR.; K. A.; RYAN, Z. C.Review: Reactive oxygen species as agents of Wood decay by fungi. **Enzyme and Microbial Technology** v. 30, p. 445-453, 2002.

Harper, H.A., Rodwell, V.W. & Mayes, P.A. *Manual de Química Fisiológica*. 5 ed. p. 736, 1982.

HEINZKILL, M., BECH, L., HALKIER, T., SCHNEIDER, P. e ANKE, T. 1998. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (Family Coprinaceae). **Applied and Environmental Microbiology**. 64 (5): 1601-1606.

HOFRICHTER M. Lignin conversion by manganese peroxidases (MnP).**Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 454-466, 2002.

IAC: Instituto Agronômico de Campinas –. Boletim 200: Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas. 6° ed. Campinas, 1998.

ICIDCA: Instituto Cubano de Investigaciones de Los Derivados de La Canã de Azucar. **Manual de los derivados de lacañã de azucar**. México: CEPLACEA, 1990. 447p.

JORDAAN, J., PLETSCHKE, B.I. & LEUKES, W.D. Purification and partial characterization of thermostable laccase from an unidentified basidiomycete. **Enzyme and Microbial Technology**. 34: 635-641, 2004.

JUNG, H.; XUC, F.; LIA, K. Purification and characterization of laccase from wooddegradingfungus *Trichophytonrubrum*LKY-7. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 161–168, 2002.

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

KARIM, M. A. A.; ANNUAR, M. S. M. Novel application of coconut husk as growth support matrix and natural inducer of fungal laccase production in a bubble column reactor. *J. Mol. Biol. Biotechnol.* v. 17 (2), p. 47-52, 2009.

KIM, H.; PETERSON, T. G.; BARNES, S. Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signaling pathways. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 68, n. 6, p.1418S-1425S, Suppl. S, 1998.

KIRK, T. K. Effects of microorganisms on lignin. *Annual Review of Phytopathology* 9: 185-210. 1971.

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

KOLEKAR, Y. M.; KODAM, K. M. Decolorization of textile dyes by *Alishewanella* sp. KMK6. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 95, p. 521–529, 2012.

KUHAD, R.C. *et al.* A hypercellulolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 19, p. 397-400, 1994.

KUHAD, R.C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K.E. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*. 57, 45–125, 1997.

KUWAHARA, M., GLENN, J.K., MORGAN, M.A. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**. 169: 247-250. 1984.

LAMAR, R. T. e WHITE, R. B. Microremediation – commercial status and recent developments. *In*: Glenn, V. S. M., Ong, J. S. K. & Leeson, A. (eds.). *Bioremediation of Energetics, Phenolics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. San Diego, Battelle Press, 3v, p. 263-278. 2001.

LECHNER, B.E. e PAPINUTTI, V.L. Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw. **Process Biochemistry**. 41: 594-598, 2006.

LEE, B.; POMETTO, III., FRATZKE, A.; BAILEY, JR, T.B. Biodegradation of degradable plastic polyethylene by *Phanaerochaete* and *Streptomyces* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, n. 3, p. 678-685, 1991.

LEISINGER, T. Microorganisms and xenobiotic compounds. **Experientia**, v. 39, p. 1183-1191, 1983.

LE POIDEVIN, N.; ROBINSON, L. A. **Métodos de diagnóstico foliar utilizados nas plantações do grupo booker na Guiana Inglesa: Amostragem e técnica de análise**. 21. ed. Paris: Fertilité, 1964. 3-11 p.

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

LESTAN, D.; STRANCAR, A.; PERDIH, A. 1990. Influence of some oils and surfactants on ligninolytic activity, growth and lipid fatty acids of *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 34: 426-428.

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

LINS, S. A. da S. Produção de celulases por fermentação semissólida em bagaço de pedúnculo do caju utilizando *Trichoderma reesei* LCB 48. Dissertação apresentada na Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 75 p. 2012.

LOPES, D. O.; BUZATO, J. B. **Produção de celulase por *Trichoderma SP. T676* por fermentação em estado sólido com bagaço de cana-de-açúcar**. 3o Encontro de Bolsistas do Programa de Apoio a Ações Afirmativas para Inclusão Social, Londrina, 2008.

LUNDELL, T.K., MÄKELÄ, M.R. & HILDÉN, K. Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes – ecological, functional and phylogenetic review. *Journal of Basic Microbiology* 50: 5–20. 2010.

MACHADO, K.M.G., MATHEUS, D.R.; BONONI, V.L.R. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 21: 297-310, 2005.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R. Biodegradation of remazol brilliant bluer by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 468-473, 2006.

MAGRINI, A. *et al.* Impactos ambientais causados pelos plásticos: uma discussão abrangente sobre os mitos e os dados científicos. 2º edição. Rio de Janeiro, 2012.

MAJEAU, A.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2331–2350, 2010.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. *Introdução a Polímeros*. 2. ed. Sao Paulo: Editora Blucher, 1999.

MANSUR, M.; ARIAS, M. E.; FLÄRDH, M. The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. *Mycologia*, Stanford, v. 95, n. 6, p. 1013-1020, 2003.

MARCONCINI, J. M.; ITO, E. N.; PAES, M. C. D.; TEIXEIRA, F. F.; MATTOSO, L. H. C. EMBRAPA: Metodologia de Caracterização Morfológica de Palha de Milho Baseada em Microscopia Ótica e Eletrônica. *ISSN 1518-7179. Novembro, 2008*. São Carlos, SP.

MARTÍNEZ, A.T. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. **Enzyme and Microbial Technology**. 30: 425-444. 2002.

MARTÍNEZ, Á. T., SPERANZA, M., RUIZ-DUEÑAS, F. J., FERREIRA, P., CAMARERO, S., GUILLÉN, F., MARTÍNEZ, M. J., GUTIÉRREZ, A. e DEL RIO, J. C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**. 8: 195-204, 2005.

MARTINS, C. R.; JÚNIOR, L. A. DE J. EMBRAPA. Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional - Panorama 2010. ISSN 1678-1953. Aracajú, 2011.

MATHEUS, D. R. & BONONI, V. L. R. C/N Ratio and vegetable oil to mineralize Chexachlorobenzene by white-rot-fungi. *In*: Gavaskar, A. R., Chen, A. S. C. (eds.). Remediation of chlorinated and recalcitrant compounds. Monterey, CA, Paper 2B-10. 2002.

MATHEUS, D. R.; MACHADO, K. M. G. Biorremediação: potencial de aplicação para POPs. *In*: Fernicola, N. A. G & Oliveira, S. S. (Orgs.). **Produtos orgânicos Persistentes – POPs**, CRA, Salvador, v. 13, p. 479-500, 2002.

MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R.; MACHADO, K. M. G. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 415-421, 2000.

MATHEUS, D. R. Otimização da biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p. 2003.

MAURYA, D. P.; SINGH, D.; PRATAP, D.; MAURYA, J. P. Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. *J. Environ. Biol*, v.33, p 5-8, 2012.

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

MD. Z.; ALAM A. A.; MAMUN, I. Y.; QUDSIEH, S. A.; MUYIBI, H. M.; SALLEH, N. M. Solid state bioconversion of oil palm empty fruit bunches for cellulase enzyme production using a rotary drum bioreactor. **BiochemicalEngineeringJournal**, 2008.

MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos**, v. 5, n. 1, p. 68-78, 2009.

MENG, X.; QIAN, Z.; WANG, H.; GAO, X.; YI, Q.; ZHANG, S.; YANG, M. Polym composite, 2009.

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

MEYER, A. S.; ROSGAARD, L.; SORENSEN, H.R. The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. *Journal of Cereal Science*, v. 50, p. 337-344, 2009.

MIKOLASCH, A.; SCHAUER, F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 82, p. 605-624, 2009.

MILAGRES, A. M. F.; BORGES, L.; AGUIAR, C. L. Degomagem de rami para fins têxteis utilizando extratos enzimáticos. **Anais do SHEB**, n. 4, p. 261-269, 1994.

MIN, K.L., KIM, Y.H., KIM, Y.W., JUNG, H.S. e HAH, Y.C. Characterization of a Novel Laccase Produced by the Wood-Rotting Fungus *Phellinus ribis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 392 (2): 279-286, 2001.

MITTIDIARI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Produção de enzimas hidrolíticas para formulação de detergentes biodegradáveis. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., Brasília, 2002. **Anais**. Brasília, 2002.

MIURA, S.; ARIMURA, T.; ITODA, N.; DWIARTI, L.; FENG, J. B.; BIN, C. H.; OKABE, M. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, p. 153, 2004.

MOMOHARA, I.; MATSUMOTO, Y.; IUZU, A. Involvement of veratryl alcohol and active oxygen species in degradation of a quinone compound by lignin peroxidase. **FEBS Letters**, v. 273, p. 159-162, 1990.

MOJISOV, K. The effects of different carbon sources on biosynthesis of pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*. **Applied Technologies and Innovations**, v.3, p. 23-30, 2010.

MOREIRA NETO, S. L. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybecastanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno, 2006. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Botânica, São Paulo, p.124, 2006.

MOREIRA, P. R.; ALMEIDA-VARA, E.; SENA-MARTINS, G.; POLÓNIA, I.; MALCATA, F. X.; DUARTE, J.C. Decolourisation of Remazol Brilliant Blue R via novel *Bjerkandera* sp strain. *Journal of Biotechnology*, v. 89, p. 107-111, 2001.

MORIYA, R. Y.; DUARTE, M. M. C.; MEDEIROS, M. B.; GONÇALVES, A. R. *Resumos do X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica*, São José dos Campos, Brasil, 2006.

MOROSHI, N.. Laccases from the ligninolytic fungus *Coriolus versicolor*. **American Chem. Soc. Symp. Ser.** 460: 204-207, 1991.

MULLER, R.J.; KLEEBERG, I.; DECKWER, W.D. Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 87-95, 2006.

MURRAY, N. P. Caracterización y evaluación agronómica Del residuo de fibra de coco: un nuevo material para el cultivo en sustrato, 2001. Tese de doutorado apresentada ao departamento de química, Escola Técnica Superior de Engenheiros Agrônomos, Universidade Politécnica de Valencia, Valencia, 2001.

NASSAR, M. M.; ASHOUR, E. A.; WAHID, S. S. Thermal characteristics of bagasse. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 61, p. 885-890, 1996.

NETO, S. L. M. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo, 2006

NIKU-PAAVOLA, M.L., FAGERSTRÖM, R., KRUUS, K. & VIIKARI, L. 2004. Thermostable laccases produced by a white-rot fungus from *Peniophora* species. **Enzyme and Microbial Technology**. 35: 100-102.

NYANHONGO, G. S.; GOMES, J.; GUBITZ, G.; ZVAUYA, R.; READ, J. S.; STEINER, W. "Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*," **Bioresource Technology**, v. 84, n 3, p 259–263, 2002.

OHLER, J. G. El cocotero: árbol de la vida. Roma: FAO. Estudios FAO de Producción y Protección Vegetal, n. 57, p. 348, 1986.

OKAMOTO, K.; YANAGI, S. O.; SAKAI, T. Purification and characterization of extracellular laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Mycoscience**, New York, v. 41, n. 1, p. 7-13, 2000.

OKINO, E. Y. A.; TEXEIRA, D. E.; MOREIRA, J. M. M. A. P.; COSTA, A. F. Resistência à biodegradação de composto de madeira-plástico submetido ao ataque de fungos de podridão-branca e parda: determinação do índice de susceptibilidade de degradação (dsi). **Floresta e Ambiente**, v.12, n.2, p. 28 – 34, 2006.

OLIVEIRA, S. L. do R. Aproveitamento da casca do coco verde (*Cocos nucifera* L.) para produção de celulases. Dissertação submetida à coordenação do programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2010.

OMENA, T. H. Argamassa modificada com poliestireno sulfonada a partir de copos plásticos descartados, 2012. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em engenharia civil da Universidade Federal de Uberlândia, 2012.

PALMA, M.B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. 2003. 169f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

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

PALMIERI, G., GIARDINA, P., BIANCO, C., SCALONI, A., CAPASSO, A., SANNIA, G. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Biological Chemistry**. 272 (50): 31301- 31307, 1997.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocess and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1135-1169, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agroindustrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PANDEY, V. K.; SINGH, M. P.; SRIVASTAVA, A. K.; S. K. VISHWAKARMA, S. K.; TAKSHAK, S. Biodegradation of sugarcane bagasse by *Pleurotus citrinopileatus*. **Cell. Mol. Biol.** 58 (1): 8-14, 2012.

PASTI, M. B.; CROWFORD, D. L. Relationships between the abilities of streptomycetes to decolorize three anthron-type dyes and to degrade ligninocellulose. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 902-907, 1991.

PATURAU, J. M. By-products of the cane sugar industry – an introduction to their industrial utilization. 3^a ed. Amsterdam, **Elsevier**, p.435, 1989.

PERCHARSKY, V. K.; ZAVALIJ, P. Y. **Fundamentals of powder diffraction and structural characterization of materials**. 1^a ed., New York: Springer, p. 731, 2005.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. In Series on Biotechnology, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, 45 p. 2008.

PERRY, L. Plant fóssil reveal ancient trade and agriculture in South America. **Nature**, v.440, 2006.

PINO, G. A. H. Biossorção de Metais Pesados Utilizando Pó da Casca de Coco Verde (*Cocos nucifera*), 2005. Dissertação de mestrado apresentada ao departamento de ciência dos materiais e metalurgia, Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2005.

PLASTICS EUROPE. Plastics - the Facts. An Analysis of the European Plastics Production, Demand and Recovery for 2010, 2011.

PLÁSTICOS. Disponível em: [HTTP://www.desenvolvimento.gov.br](http://www.desenvolvimento.gov.br). Acessado em 09 de julho de 2013.

POINTING, S.B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol Biotechnol* 57: 20-33.

POZDNYAKOVA, N.N., RODAKIEWICZ-NOWAK, J. e TURKOVSKAYA, O.V. Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 30:19-24, 2004.

POZDNYAKOVA, N. N.; TURKOVSKAYA, O. V.; YUDINA, E. N.; RODAKIEWICZ-NOWAK, Y. Yellow laccase from the fungus *Pleurotusostreatus* d1: purification and characterization. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, p. 56–61, 2006.

PRINGLE, W. Full fat soy flours. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 51, p. 74A-76A, 1974.

QUEIROZ, A. C.; BARBOSA, M.A.; RESENDE, F. D.; PEREIRA J. C.; DUTRA, A. R. Suplementação da palhada de milho na alimentação de bovinos. 1. consumo, taxa de passagem da matéria seca, degradação in situ da matéria seca e da fibra em detergente neutro. **Rev. Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.2, p.381-389, 1998.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 174-188, 1998.

RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKA, M. N.; BANO, Z. Biopotentialites of the basidiomacromycetes. **Advances in Applied Microbiology**, v. 37, p. 223-361, 1992.

RAJEEV K. S.; REETA R. S.; GINCY M. M.; PANDEY A. Biotechnology Division, National Institute for Interdisciplinary Science and Technology. **Renewable Energy**, p. 421–424, 2009.

REDIFF ON THE NET. Disponível em <http://www.members.reddif.com/jogsn/BP4.html>. Acessado em 5 de abril de 2011.

REID, I. D.; McDONALD, J. C. Anthracenediethanol inhibits lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium* by competing for oxidation by lignin peroxidase, and not by trapping single oxygen. *Biodegradation*, v. 2, p. 61-69, 1991.

REGINA, M.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; BARBOSA, A. de M.; AMADOR, I. R.; NOBREGA, G. M. A.; MASCHIARE, D. C. Sabugo de milho e carvão ativado na produção de Lacase e Basidiomas de *Pleurotus* sp. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 39-48, 2012.

REID, I. D.; McDONALD, J. C. Anthracenediethanol inhibits lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium* by competing for oxidation by lignin peroxidase, and not by trapping single oxygen. *Biodegradation*, v. 2, p. 61-69, 1991.

RODGERS, C. J., BLANFORD, C. F., GIDDENS, S. R., SKAMNIOTI. P., ARMSTRONG, F. A., GURR S. J. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes?. **Trends in Biotechnology**. v. 28, 2009.

RODRIGUES, S.; PINTO, G. A. S.; FERNANDES, F. A. N. Optimization of ultrasound extraction phenolic compounds from coconut (*cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Sonoche mistry*, v. 15, n.1, p. 95-100, 2008.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIG, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação semissólida. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 46, n. 8, p. 912-919. 2011.

ROSA, M.F; SANTOS, F.J.S.; MONTENEGRO, A.A.T.; ABREU, F.A.P.; CORREIA, D; ARAUJO, F.B.S.; NORÔES, E.R.V. Caracterização do pó da casca de coco verde usado como substrato agrícola. Comunicado técnico, 54, Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p. 6, 2001.

ROTHSCHILD, N.; NOVOTNY, C.; SASEK, V.; DOSORETZ, C. G. Ligninolytic enzymes of the fungus *Irpelex lacteus* (Polyporustulipiferae): isolation and characterization of lignin peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 627-633, 2002.

RYAN, S., SCHNITZHOFFER, W., TZANOV, T., CAVACO-PAULO, A. & GÜBITZ, G.M. An acid-stable laccase from *Sclerotium rolfsii* with potential for wool dye decolourization. **Enzyme and Microbial Technology**. 33: 766-774, 2003.

SAITO, T., HONG, P., KATO, K., OKAZAKI, M., INAGAKI, H., MAEDA, S., YOKOGAWA, Y. Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (family Chaetomiaceae) isolated from soil. **Enzyme and Microbial Technology**. 33: 520–526, 2003.

SALAS, C., LOBOS, S., LARRAÍN, J., SALAS, L., CULLEN, D. e VICUÑA, R. Properties of laccase isoenzymes produced by the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 21: 323-333, 1995.

SALAZAR, R. F. S.; SILVA, G. L. P.; SILVA, M. L. C. P. Estudo da composição da palha de milho para posterior utilização como suporte na preparação de compósitos. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica – COBEQ. Unicamp/SP, 2005.

SALAZAR, V. L. P.; LEÃO, A. L. Biodegradação das fibras de coco e de sisal aplicadas na indústria automotiva. **Energ. Agric.**, Botucatu, v.21, n.2, p. 99-133, 2006.

SALIBA, E. de O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; MORAIS, S. A. L.; PILÓ-VELOSO, D. Ligninas – Métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 917-928, 2001.

SAPARRAT, M. C. N.; GUILLÉN, F.; ARAMBARRI, A. M.; MARTÍNEZ, A. T.; MARTÍNEZ, M. J. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the White rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1534-1540, 2002.

SANTOS, M. L., LIMA, O. J., EDUARDO J. NASSAR, E. J., CIUFFI, K. J., CALEFI, P. S. Estudo das condições de estocagem do bagaço de cana-de-açúcar por análise térmica. **Quim. Nova**, V. XY, p. 1-5, 2011.

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

SEAB - Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento e DERAL - Departamento de Economia Rural. Soja – Análise da Conjuntura Agropecuária. Outubro, 2012.

SHAH, V.; NERUD F. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. **Can.J. Microbiol**, v.48, p. 857-870, 2002.

SHANNON, M. J. R.; UNTERMAN, R. Evaluating bioremediation: distinguishing fact from fiction. **Annu.Ver. Microbiol**, v. 47, p. 715-738, 1993.

SHIN, K.S.; LEE, Y.J. Purification and Characterization of a New Member of the Laccase Family from the White-Rot Basidiomycete *Coriolus hirsutus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 384 (1): 109-115, 2000.

SHLEEV, S. V.; MOROZOVA, O. V.; NIKITINA, O. V.; GORSHINA, E. S.; RUSINOVA, T. V.; SEREZHENKOV, V. A.; BURBAEV, D. S.; GAZARYAN, I. G.; YAROLOV, A. I. Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. **Biochimie**, v. 86, p. 693-703, 2005.

SHRADDHA, SHEKHER, R.; SEHGAL, S.; KAMTHANIA, M.; KUMAR, A. Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. **Enzyme Research**, 2011.

SILVA, K. R. I. Biodegradação de polietileno tereftalato (PET) por fungos ligninolíticos. Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2009.

SILVÉRIO, S. C.; MOREIRA, S.; MILAGRES, A. M. F.; MACEDO, E. A.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Laccase production by free and immobilized mycelia of *Peniophora cinerea* and *Trametes versicolor*: a comparative study. **Bioprocess Biosyst Eng**, 2012.

SOUZA, A. F. ROSADO, F. R. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. **Agronegócios e Meio Ambiente**, v.2, n.1, p. 121-139, 2009.

SPI. The Plastics Industry Trade Association. *Plastics Fact Sheet*, 2011.

SPINACÉ, M. A. S.; PAOLI, M. A. A tecnologia da reciclagem de polímeros. *Quím. Nova*, Fev., vol.28, nº1, p.65-72, 2005.

SUGIURA, M., HIRAI, H., NISHIDA, T. Purification and characterization of a novel lignin peroxidase from white-rot fungus *Phanerochate sordida* YK-624. **FEMS Microbiology Letters**. 224: 285-290. 2003.

SWAMY, J.; RAMSAY, J. A. Effects of Mn²⁺ e NH₄⁺ concentrations on laccase and manganese peroxidase production and Amaranth decolorization by *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 51, p. 391-396, 1999.

TANGO, J.S. Farinhas de soja integral. **B. Inst. Tecnol. Alim.**, Campinas, v. 29, p. 21-45, 1972.

TEIXEIRA, A. F.; PIRES, A. V.; NASCIMENTO, P. V. N. Bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de bovinos. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 8, n. 6, p. 1695-7504, 2007.

TELEMACO, E. P. Degradação fotoquímica de efluentes industriais contendo polipropileno e isoniazida, 2008. Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em engenharia química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

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

TOLEDO, T. C. F.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; ARTHUR, V.; PIEDADE, S. M. S. Efeito da radiação gama na absorção de água e no tempo de cocção em cultivares de soja. **Bragantia**, v.66 (4), p. 565-570, 2007.

TOLERA, A.; SUNDSTOL, F. Supplementation of graded levels of *Desmodium intortum* hay to sheep feeding on maize stover harvested at three stages of maturity. 1. Feed intake, digestibility and body weight change. **Animl Feed Science and Technology**, v. 85, p. 239-257, 2000.

TUOMELA, M. Degradation of lignin and other ¹⁴C-labelled compounds in compost and soil with an emphasis on white-rot fungi. Dissertação de mestrado, University of Helsinki, Helsinki, 70 p. 2002.

UNICA - União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. *Açúcar e álcool do Brasil: Commodities da Energia e do Meio Ambiente*, São Paulo, 2004.

VARES, T., KALSI, M., HATAKKA, A. Lignin peroxidase, manganese peroxidase, and others ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw. **Applied and Environmental Microbiology**. 61 (10): 3515-3520. 1995.

VICTOR, O.T. Cellulase production by *Aspergillus flavus* Linn isolate NSPR 101 fermented in saw dust, bagasse and corn cob. **Afr. J. Biotechnol**, p. 150-152, 2003.

VIKINESWARY, S., ABDULLAH, N., RENUVATHANI, M., SEKARAN, M., PANDEY, A.; JONES, E.B.G. 2006. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology** 97: 171-177.

VYAS, B. R. M.; MOLITORIS, H. P. Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolourization of Remazol Brilliant Blue R. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 11, p. 3919-3927, 1995.

WESSELS, J.G.H. Development regulation of fungal cell wall formation. *Annual Review Phytopathology*. 32: 413-437. apud Pessoni, R. Isolamento e caracterização de enzimas extracelulares e de parede celular do fungo *Penicillium janczewskii*, crescido em diferentes fontes de carbono. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 163 p. 1994. 2002.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. ***Biotechnology Advances***, v. 22, p. 161–187, 2003.

YAROLOPOV, A. I.; SKOROBOGATKO, O. V.; VAARTANOV, S. S. Laccase: properties, catalytic mechanism and applicability. ***Applied and Biotechnology***, v.49, p. 257-280, 1994.

XIAO, Y.Z., TU, X.M., WANG, J., ZHANG, M., CHENG, Q., ZENG, W.Y., SHI, Y.Y. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2. ***Applied Microbiology and Biotechnology***. 60: 700-707, 2003.

XU, F.; SUN, J. X.; LIU, C. F.; SUN, R. C. Comparative study of alkali- and acidic organic solvent-soluble hemicellulosic polysaccharides from sugarcane bagasse. ***Carbohydrate Research***, v. 341, p. 253-261, 2006.

ZHAO, Y. C.; YI, X. Y.; ZHANG, M.; LIU, L.; MA, W. J. Fundamental study of degradation of dichlorodiphenyltrichloroethane in soil by laccase from white rot fungi. ***Int. J. Environ. Sci. Tech.*** v.7 (2), p. 359-366, 2010.

ZHU, X.; GIBBONS, J.; GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A.; WILLIAMSON, P. R. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. ***Infection and Immunity***, v.69, p. 5589-5596, 2001.

ZOUARI-MECHICHI, H., MECHICHI, T., DHOUIB, A., SAYADI, S., MARTÍNEZ, A., MARTÍNEZ, M. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. ***Enz. Microbiol Technol.*** 39: 141-148, 2006.