



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Matheus Henrique Toneti

Triagem de fungos filamentosos para degradação de lignina:

Avaliação da atividade ligninolítica e da enzima lacase

São José do Rio Preto

2023

Matheus Henrique Toneti

Triagem de fungos filamentosos para degradação de lignina:

Avaliação da atividade ligninolítica e da enzima lacase

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadoras: CAPES e FAPESP

Orientador:

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Co-orientadores:

Prof^a Dr^a Eleni Gomes

Dr Gustavo Metzker

São José do Rio Preto

2023

T664t Toneti, Matheus Henrique
Triagem de fungos filamentosos para degradação de lignina: :
avaliação da atividade ligninolítica e da enzima lacase / Matheus
Henrique Toneti. -- São José do Rio Preto, 2023
53 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio
Preto
Orientador: Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
Coorientadora: Eleni Gomes

1. Lignina. 2. Biodegradação. 3. Fungos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Matheus Henrique Toneti

Triagem de fungos filamentosos para degradação de lignina:

Avaliação da atividade ligninolítica e da enzima lacase

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadoras: CAPES e FAPESP

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Orientador

Dr^a Ana Lúcia Ferrarezi Duarte

Biomade – Soluções Tecnológicas

Prof^a Dr^a Márcia Maria de Souza Moretti

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

03 de março de 2023

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, familiares, amigos e colegas.

Ao meu orientador pela receptividade, atenção e a todos os ensinamentos que foram fundamentais para a execução do projeto.

Aos amigos dos laboratórios de Microbiologia Aplicada e Industrial e Bioquímica de Proteínas por todo o apoio, aprendizado e momentos de descontração.

Ao Ibilce e a todas as amigas que fiz durante minha vida acadêmica e que com certeza levarei para a vida toda.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e pela qualidade da minha formação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, e com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), às quais agradeço imensamente.

“No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem-feita, ou não faz.”

Ayrton Senna

Resumo

A utilização de recursos fósseis e fontes de carbono não-renováveis para a obtenção de produtos químicos e energia mostrou, por inúmeros estudos, ter impactos negativos significativos no que diz respeito a aspectos ambientais e socioeconômicos para a sociedade. Por outro lado, a utilização de biomassa vegetal para a obtenção de biocompostos e bioenergia tem ganhado cada vez mais espaço e vem recebendo a atenção e investimentos devido ao seu potencial econômico e sustentável. A obtenção de biocompostos se dá principalmente pela ação de enzimas produzidas por microrganismos que, após degradar o substrato derivado de biomassa vegetal, são capazes de liberar moléculas de alto valor agregado. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de duas espécies de fungos filamentosos (*Trichoderma harzianum* Rifai PAMB-86 e *Coriolopsis byrsina* SXS16) em degradar lignina e produzir compostos de alto valor agregado. O substrato utilizado foi o licor obtido por hidrólise alcalina de bagaço-de-cana, mistura rica em lignina e hemicelulose. A fermentação foi suplementada com vinhaça e com meio mineral, e os resultados obtidos foram comparados. A degradação da lignina foi estimada pela absorvância no comprimento de onda de 280 nm e os resultados foram promissores: após os 10 dias, mais de 50% de degradação foi observada para as espécies *Trichoderma harzianum* e *Coriolopsis byrsina* em meio contendo vinhaça e cerca de 70% para meio contendo solução mineral. Além disso, foi confirmada a possibilidade da utilização de vinhaça, um subproduto da indústria sucroalcooleira, como suplemento para o crescimento dos microrganismos, visto que os resultados obtidos se assemelham, e em alguns casos são superiores aos experimentos utilizando solução mineral como suplemento. Outros parâmetros também foram monitorados: o pH do meio, que aumentou com relação ao controle abiótico, confirmando a liberação de compostos básicos; e a atividade da enzima lacase que alcançou valores próximos de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ para o *Trichoderma harzianum* e 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ para o *Coriolopsis byrsina* no meio suplementado com meio mineral. Por outro lado, no meio suplementado com vinhaça não se observou atividade dessa enzima. Por fim, confirmou-se que o crescimento microbiano das cepas no meio de cultivo contendo o licor ocorreu de forma satisfatória e promissora, abrindo espaço para novas pesquisas envolvendo esses microrganismos para a produção de compostos de valor agregado.

Palavras-chave: Lignina. Biodegradação. Fungos.

Abstract

Numerous studies have proven that using fossil fuels and non-renewable carbon sources to produce chemical feedstocks and energy has serious detrimental effects on the environment and the economy. On the other hand, due to its potential for economic growth and sustainability, the use of vegetal biomass to produce biocompounds and bioenergy has drawn increased attention. Biocompounds are primarily obtained through the intricate enzymatic activity of microbes, which, after breaking down the substrate produced from plant biomass, are able to release molecules with significant added value. The main objective of this work was to evaluate the potential of two species of filamentous fungi (*Trichoderma harzianum* Rifai PAMB-86 and *Coriolopsis byrsina* SXS16) to degrade lignin and produce compounds with high added value. The sugarcane bagasse liquor produced by the alkaline hydrolysis of this mixture, which is high in lignin and hemicellulose, served as the study's substrate. Vinasse and mineral medium were added to the fermentation process, and the outcomes were compared. The rate of lignin degradation was calculated using absorbance at 280 nm, and the results were encouraging: after 10 days, the species *Trichoderma harzianum* and *Coriolopsis byrsina* had degraded more than 50% of the lignin in vinasse media and about 70% in mineral media. The use of vinasse, a by-product of the sugar-alcohol industry, as a supplement for the growth of microorganisms was also proven, since the results were comparable to and occasionally even superior to those achieved using only mineral solution. The pH of the medium, which increased in comparison to the abiotic control, confirming the release of basic compounds, and the laccase enzyme activity, which for *Trichoderma harzianum* and *Coriolopsis byrsina* in the medium supplemented with mineral medium reached values close to 100 mol min⁻¹ and 50 mol min⁻¹, respectively, were also monitored. On the other hand, this enzyme's activity was not maintained in the medium enriched with vinasse. Finally, it was determined that the strains' microbial development in the culture medium containing the liquor proceeded adequately and in a promising manner, opening the door for further investigation into these microbes for the manufacture of chemicals with value-added.

Keywords: Lignin. Biodegradation. Fungi.

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura molecular da biomassa lignocelulósica, evidenciando as principais moléculas e ligações entre elas.....	13
Figura 2. Molécula de lignina e suas ligações: C-C (vermelho) e C-O (azul)	16
Figura 3. Complexidade das vias reacionais da biodegradação da lignina	17
Figura 4. Etapas do processo industrial que ocorrem a geração dos subprodutos agrícolas: bagaço-de-cana e vinhaça.....	18
Figura 5. Esquema simplificado mostrando as etapas do cultivo e fermentação com meio suplementado com vinhaça.....	25
Figura 6. Esquema simplificado mostrando as etapas do cultivo e fermentação com meio suplementado com meio mineral sintético	26
Figura 7. Espectros de absorção das amostras coletadas durante a fermentação contendo vinhaça (média das triplicatas)	29
Figura 8. Teores percentuais de lignina presentes na amostra durante a fermentação estimados em função da absorbância em 280 nm com meio suplementado com vinhaça	30
Figura 9. Valores de pH em função do tempo do meio de fermentação suplementado com vinhaça.....	32
Figura 10. Cromatogramas por HPLC dos bioprodutos para as amostras com relação ao tempo de fermentação contendo vinhaça como suplementação	33
Figura 11. Mecanismo de reação e produtos derivados da transformação do ácido ferúlico em catecol.....	35
Figura 12: Cromatogramas do substrato e dos extratos enzimáticos ao final da fermentação em mesma escala - Vinhaça	36
Figura 13. Espectros de absorção na faixa de 200 – 400 nm das amostras suplementadas com meio mineral (média das triplicatas)	37
Figura 14. Perfil de degradação percentual de lignina com relação a absorbância em 280 nm em meio suplementado com meio mineral	38
Figura 15. Valores de pH em função do tempo do meio de fermentação suplementado com meio mineral.....	39
Figura 16. Atividade da enzima lacase para meio suplementado com meio mineral ao final da fermentação (10 dias).	40
Figura 17. Cromatogramas dos bioprodutos obtidos para as amostras com relação ao tempo de fermentação contendo meio mineral como suplementação	42

Figura 18. Esquema simplificado evidenciando a atuação da enzima lacase na oxidação de substratos fenólicos	44
Figura 19: Cromatogramas do substrato e dos extratos enzimáticos ao final da fermentação em mesma escala - Meio Mineral.....	45

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores aproximados dos constituintes presentes nos subprodutos vegetais.	13
Tabela 2. Quantidades de subunidades fenólicas de Coniferílico (G), Sinapílico (S) e p-Cumárico (H) em diferentes biomassas vegetais.....	14
Tabela 3. Faixa de pH e composição aproximada da vinhaça.....	18
Tabela 4. Bioprodutos obtidos da degradação da lignina e seu impacto na economia.....	20
Tabela 5. Microrganismos utilizados na fermentação	23
Tabela 6. Composição do meio sólido em Placa de Petri.....	24
Tabela 7. Composição do meio líquido utilizado para fermentação	24
Tabela 8. Composição do meio mineral utilizado na fermentação.....	25

Sumário

1. Introdução	12
2. Objetivos	22
2.1 Objetivos gerais	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. Materiais e metodologias	23
3.1. Extração de lignina (pré-tratamento)	23
3.2 Hidrólise alcalina	23
3.3 Inóculo e cultivo dos microrganismos	23
3.4 Análise da degradação de lignina	26
3.6 Determinação da atividade da enzima lacase	27
4. Resultados e discussão	29
4.1 Utilização da vinhaça como meio nutritivo	29
4.2 Utilização do meio mineral como meio nutritivo	37
5. Conclusão	46
Referências	47

1. Introdução

Dados recentes revelam que a liberação de subprodutos tóxicos da queima de combustíveis fósseis gera um prejuízo econômico global de cerca de 8 bilhões de dólares por dia (3,3% do PIB global) e é responsável por mais de 4 milhões de mortes prematuras anualmente (FARROW; MILLER; MYLLYVIRTA, 2020). Dentre os principais problemas relacionados a poluição, destacam-se: liberação de material particulado que quando inalado, causa doenças respiratórias e cardiovasculares, disfunções reprodutivas e do sistema nervoso central, câncer, destruição da camada de ozônio, liberação de compostos tóxicos tais como NO_x, SO_x, dioxinas e furanos e por fim alterações nos padrões climático (MANISALIDIS et al., 2020). Logo, a busca por tecnologias sustentáveis vem se tornando cada vez mais fundamental para a sociedade atual em função do intenso consumo de combustíveis fósseis e recursos naturais não renováveis por diversos anos, o que tem levado à liberação de gases do efeito estufa e mudanças climáticas (CHIO; SAIN; QIN, 2019).

O investimento em produtos, processos e empresas sustentáveis vem crescendo cerca de 15% ao ano, em valores que podem chegar a 53 trilhões de dólares no mundo até 2025, representando cerca de um terço dos investimentos (BLOOMBERG, 2021). Isso evidencia a necessidade das empresas se adaptarem a novas necessidades e compromissos com o meio ambiente, sendo cada vez mais requisitadas políticas de ESG (*Environmental, Social and Corporate Governance*) para que novos investimentos sejam obtidos por fundos globais (GREGORIO, 2020). Com isso, a pesquisa de novas tecnologias ambientalmente amigáveis (ditas verdes) vem ganhando espaço e atraindo a atenção no mercado global de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D), buscando alternativas sustentáveis que possam substituir derivados fósseis e não-renováveis por novos produtos que sejam sustentáveis e economicamente viáveis em um conceito conhecido como biorrefinarias.

Essa denominação é aplicada a plantas industriais que integram a conversão de matéria prima renovável, derivada de biomassa vegetal ou animal, em produtos como: combustíveis, energia e compostos químicos de alto valor agregado, contribuindo para o aumento do faturamento industrial, bem como para a diminuição ou a eliminação da geração de resíduos, fazendo com que as empresas sejam vistas de forma atrativa de acordo com conceitos de sustentabilidade e economia circular (CHERUBINI, 2010; UBANDO; FELIX; CHEN, 2020). Os subprodutos agroindustriais são produzidos por meio do manejo de cultivos e são cada vez mais gerados em virtude da mecanização da lavoura e do aumento da produção, sendo que a

sua composição varia de acordo com a cultura, possuindo em sua composição a celulose, hemicelulose e lignina, cujas porcentagens em alguns tipos de materiais são mostradas na Tabela 1.

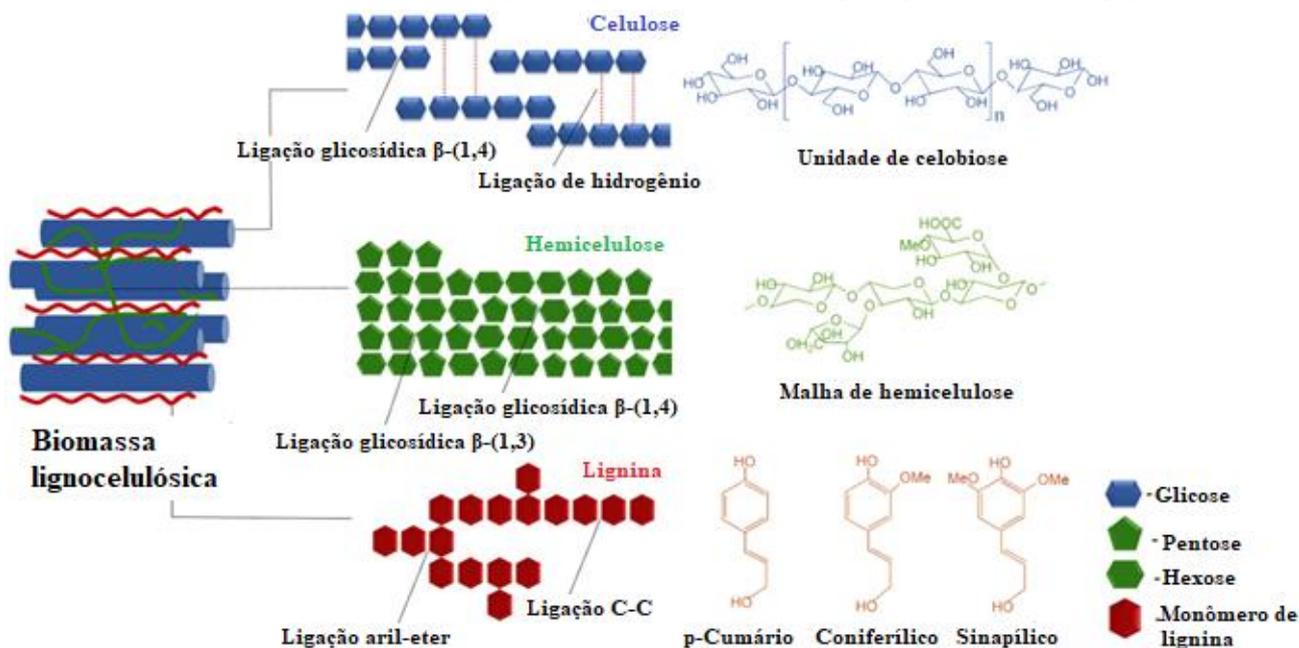
Tabela 1. Valores aproximados dos constituintes presentes nos subprodutos vegetais.

Fonte	Constituinte vegetal (%)		
	Lignina	Hemicelulose	Celulose
Madeira	25-35	20-32	40-44
Gramíneas	19	15-35	37
Palha de trigo	15	29	38
Palha de milho	19	26	38
Eucalipto	18	21	49
Bagaço de cana	19	31	49

Fonte: adaptado de (AZADI et al., 2013)

A lignina está presente na composição das células vegetais e é considerada a macromolécula fenólica natural mais abundante no mundo (RINALDI et al., 2016), sendo que em conjunto com a celulose e a hemicelulose (Figura 1) é responsável por garantir a resistência mecânica, química e biológica das células vegetais (LIU; LUO; ZHENG, 2018).

Figura 1. Estrutura molecular da biomassa lignocelulósica, evidenciando as principais moléculas e ligações entre elas.



Fonte: Adaptado de (BARUAH et al., 2018)

A lignina é uma macromolécula amorfa com estrutura altamente ramificada, hidrofóbica, sendo classificada como um polifenol, sendo composta de três subunidades derivadas do fenilpropano: álcool coniferílico (G), álcool sinapílico (S) e álcool *p*-cumárico (H) (XIE et al., 2018). Sua estrutura é composta principalmente por ligações químicas com elevada estabilidade termodinâmica tais como C-C (β -5, 5-5, β -1, e β - β) e C-O (β -O-4) (Figura 2), sendo as ligações do tipo aril-éter as mais abundantes (45-60%) contribuindo para o seu elevado caráter recalcitrante (MARINOVIĆ et al., 2018; ANDERSON et al., 2019).

A quantidade de cada subunidade fenólica G, S ou H presente após a fragmentação não é fixa e muda de acordo com a matriz vegetal, variando sua proporção em função do tipo de biomassa e até da variante genética da planta (Tabela 2).

Tabela 2. Quantidades de subunidades fenólicas de Coniferílico (G), Sinapílico (S) e *p*-Cumárico (H) em diferentes biomassas vegetais

Biomassa	Lignina (%)	Subunidade (%Molar)			Referência
		S	G	H	
Bagaço de cana-de-açúcar	20	60	38	2	(DEL RÍO et al., 2015)
Palha de cana-de-açúcar	20	28	68	4	(DEL RÍO et al., 2015)
Palha de trigo	16-21	46	45	9	(KANITSKAYA et al., 1998)
<i>Quercus suber</i> (madeira)	24	55	44	1	(LOURENÇO et al., 2016)
<i>Quercus suber</i> (galho)	38	41	58	1	(LOURENÇO et al., 2016)
<i>Quercus suber</i> (casca)	27	7	43	1	(LOURENÇO et al., 2016)

Além da quantidade absoluta de cada subunidade fenólica, outro fator importante na caracterização da lignina da biomassa vegetal é a proporção entre S/G. Estudos mostraram que a razão entre a concentração de álcool sinapílico e álcool coniferílico influencia na capacidade, em função da alteração de sua recalcitrância, da biodegradação da biomassa por microrganismos e a produção de etanol 2G e 3G, demonstrando que quanto maior a proporção S/G, maior a eficiência de produção de etanol (YOO et al., 2018). De acordo com a Tabela 1, o bagaço-de-cana possui uma das maiores razões S/G dentre as principais matrizes vegetais, mostrando o potencial promissor para a produção de etanol de segunda (2G) e terceira (3G) geração utilizando este substrato.

Para utilizar a lignina em aplicações comerciais é necessário realizar um processo de extração, ou seja, separar a lignina dos outros componentes dos vegetais, como hemicelulose e celulose. Para isso, vários processos são descritos pela literatura, sendo os mais utilizados os

processos de hidrólise ácida (PHILLIPS; GOSS, 1932), alcalina (WAHBA et al., 2015), organosolv (ZIJLSTRA et al., 2020) ou por líquidos iônicos (ACHINIVU, 2018).

O processo de hidrólise ácida é caracterizado pela utilização de ácidos fortes (alto grau de dissociação, como H_2SO_4 e HCl) para resultar na quebra das ligações presentes na malha ligno-celulósica e produzindo lignina solúvel em meio ácido. O processo de hidrólise ácida se dá por meio de três reações principais: condensação (ou rearranjo) entre os carbonos aromáticos e benzílicos, clivagem das ligações β -siringil éter e rearranjo das ligações β -aril éter, liberando compostos de baixo peso molecular e hidrofílicos (YASUDA; FUKUSHIMA; KAKEHI, 2001).

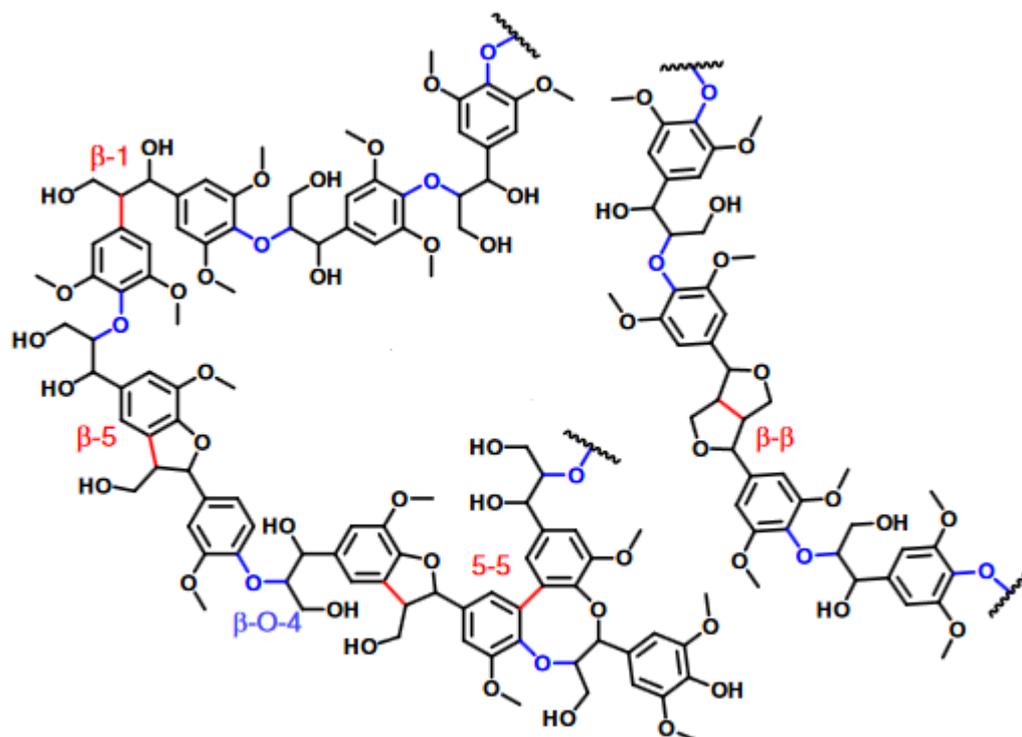
Já o processo de extração por organosolv é caracterizado pela utilização de um solvente orgânico e apolar e resulta na separação promissora dos componentes da biomassa, produzindo celulose com alto grau de pureza, hemicelulose e lignina livres de enxofre. O processo se dá por diversos mecanismos de reação: solubilização da lignina, condensação, precipitação e fragmentação (LABAUZE, CACHET, BENJELLOUN-MLAYAH, 2022).

A hidrólise alcalina é a metodologia mais comum para a extração e obtenção da lignina na forma de licor, em virtude do baixo custo, rapidez, utilização de reagentes de baixa toxicidade e a pequena geração de resíduos. O processo de extração se dá por meio da quebra das ligações intermoleculares do tipo éster cruzadas com os outros componentes vegetais: hemicelulose e celulose. Além disso, sua solubilização em meio alcalino e a alta temperatura contribui para o desprendimento da lignina do restante da malha hemicelulósica, liberando a macromolécula para biotransformação pelos microrganismos (ROCHA et al., 2012).

A técnica de separação da lignina dos demais subprodutos deve ser levada em consideração na hora de projetar uma aplicação, pois o processo de extração influencia nas características físico-químicas e moleculares da lignina a ser obtida. Além disso, o substrato vegetal pode ser submetido a certas condições de temperatura, pressão ou presença de algum composto que favoreça a formação de compostos inibidores e/ou tóxicos, tais como o furfural e o 5-hidroxi metilfurfural (HMF) no caso da hidrólise alcalina, podendo dificultar uma possível biodegradação por microrganismos (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

O processo de degradação da lignina pelos microrganismos pode seguir por diversas vias reacionais resultando na quebra das ligações C-C e C-O, indicadas na Figura 2.

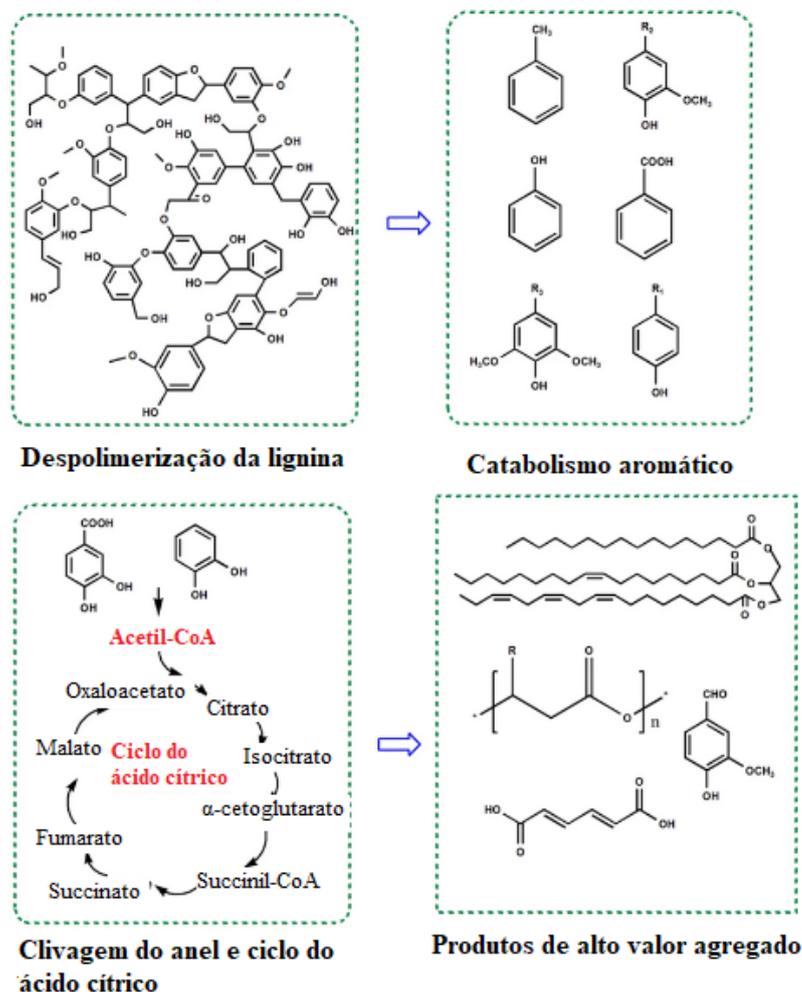
Figura 2. Molécula de lignina e suas ligações: C-C (vermelho) e C-O (azul)



Fonte: Adaptado de (ANDERSON et al., 2019).

Em uma dessas vias reacionais, a degradação da lignina consiste na despolimerização e na quebra dos anéis aromáticos presentes na macromolécula. Primeiramente, as ligações β -O-4 são oxidadas a compostos derivados de arilgliceróis. Após esta etapa, os anéis aromáticos são clivados, seguindo a via do β -cetoadipato e se acoplam às ligações β -O-4 que foram oxidadas formando estruturas cíclicas de carbonato (JAVAID et al., 2019). De modo geral, as reações enzimáticas atuam na quebra das ligações estáveis C-C e C-O por meio da oxidação seletiva do C- α do álcool benzílico a uma cetona, ativando as ligações β -O-4, liberando os monômeros fenólicos (RAHIMI et al., 2013). Com isso, observa-se que a degradação da lignina consiste em um processo complexo, não só pelas etapas múltiplas de clivagem, que acabam envolvendo diversas reações, mas também devido à grande quantidade de subprodutos que acabam se formando pela diversidade de caminhos de reação, como mostra a Figura 3.

Figura 3. Complexidade das vias reacionais da biodegradação da lignina



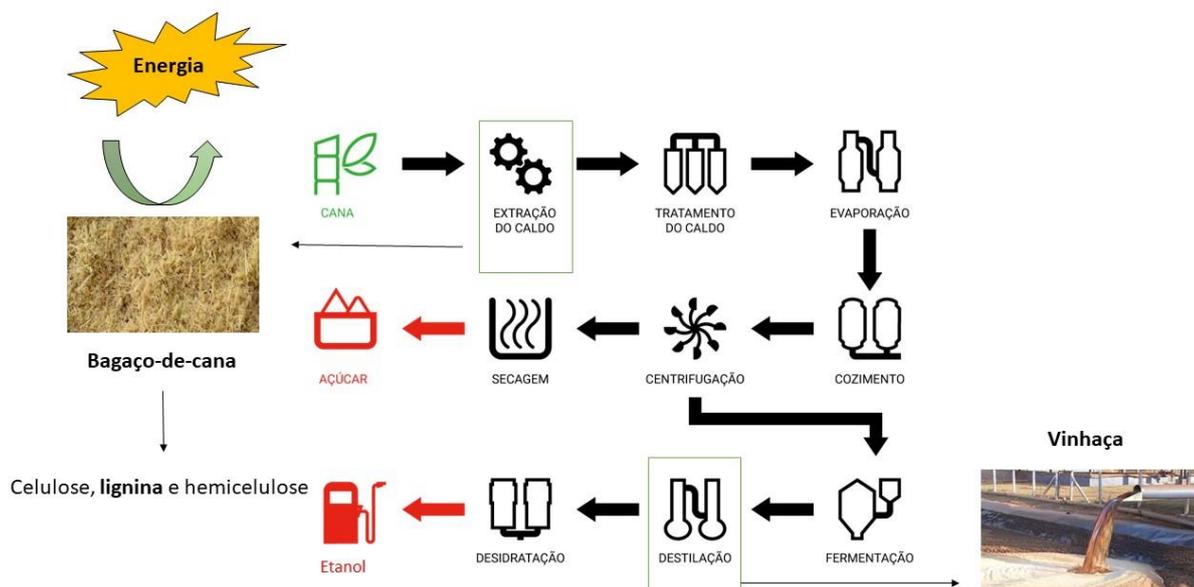
Fonte: Adaptado de WENG; PENG; HAN, 2021.

O sucesso da decomposição da lignina só pode ser alcançado na atividade de múltiplas enzimas devido à complexidade e à heterogeneidade do material e pela diversidade de ligações químicas presentes em sua estrutura (BUGG; RAHMANPOUR, 2015).

Diversos resíduos agrícolas de origem vegetal podem ser utilizados como fonte de lignina para a obtenção de produtos em processos economicamente viáveis. Além disso, diversos subprodutos gerados na cadeia de produção agrícola podem ser utilizados como ponto de partida para produzir compostos de valor agregado, como a vinhaça, outro subproduto agroindustrial de grande interesse econômico e ambiental.

A vinhaça é um efluente gerado após a destilação do vinho fermentado para a produção de etanol, como mostra a Figura 4.

Figura 4. Etapas do processo industrial que ocorrem a geração dos subprodutos agrícolas: bagaço-de-cana e vinhaça



Fonte: Adaptado de LINCE, 2018

A vinhaça caracteriza-se principalmente por ser uma suspensão de alta acidez, alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), odor característico e cor marrom escura (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). A faixa de pH e a composição aproximada da vinhaça está descrita na Tabela 3.

Tabela 3. Faixa de pH e composição aproximada da vinhaça

Parâmetro	Valor
pH	4,0 – 4,9
Matéria Orgânica (%)	3,96
Cl ⁻ (mg.L ⁻¹)	59,4
SO ₄ ⁻² (mg.L ⁻¹)	44-366
K ⁺ (mg.L ⁻¹)	1620
Lipídeos (%)	0,41
Proteínas (%)	2,92
Fenólicos (mg.L ⁻¹)	230-390

Fonte: (RODRIGUES REIS; HU, 2017)

A produção de vinhaça nas indústrias sucroalcooleiras é muito elevada: para cada litro de etanol produzido são gerados cerca de 20 litros de vinhaça (RODRIGUES REIS; HU, 2017).

Esse grande volume de efluentes acaba sendo um problema frequente para as indústrias, que acabam liberando esse líquido nas lavouras em crescimento em um processo conhecido como fertirrigação, que gera impactos ambientais negativos no seu entorno, como eutrofização de corpos aquáticos e a mortalidade de peixes, além de contribuir para a proliferação de insetos como moscas e mosquitos (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Com isso, a utilização eficiente e sustentável da vinhaça como meio nutritivo para diversas culturas pode ser peça chave na obtenção de bioprodutos de alto valor agregado em biorrefinarias, no crescimento microbiano e na produção de enzimas.

As enzimas microbianas envolvidas na degradação da lignina são divididas em dois grupos principais: enzimas modificadoras de lignina (LME) e as auxiliares de degradação de lignina (LDA). As LME são produzidas por diversos microrganismos e são classificadas majoritariamente em Lacases e Peroxidases. Já as LDA são classificadas principalmente em Glioxal Oxidases, Glicose Desidrogenases, Aril Álcool Oxidases, Piranose-2 Oxidases, entre outras (JANUSZ et al., 2017). As lacases são o grupo mais distribuído e estudado das enzimas oxidases contendo cobre (IBRAHIM et al., 2011), sendo consideradas como catalisadores sustentáveis devido ao fato de utilizarem O_2 como cofator principal e gerar água como subproduto (ASINA, 2016). Além disso, os métodos biológicos de processamento vêm ganhando espaço devido suas vantagens com relação aos métodos químicos convencionais: baixo consumo de energia, menor utilização de reagentes químicos e maior especificidade do substrato e da reação (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016).

As lacases (E.C. 1.10.3.2) pertencem à família das enzimas multicobre (portadoras de mais de um íon cobre em sua estrutura) e são essenciais na degradação de material lignocelulósico devido a seu alto potencial de oxidação. Neste complexo enzimático, o oxigênio molecular atua como acceptor final de elétrons, possibilitando a oxidação e, conseqüentemente, a clivagem de compostos aromáticos por mecanismos de reação de catálise por radical, resultando na redução de moléculas de água (MARGOT et al., 2013). Essa família de enzimas está presente em diversos grupos biológicos e seu papel se estende não somente a degradação de material lignocelulósico mas também a detoxificação, patogenicidade seletiva, morfogênese, esporulação, etc.; sendo produzida por diversas espécies de fungos e bactérias do solo (SPINA et al., 2020). As lacases produzidas mais especificamente por fungos possuem maior atividade em meios ácidos e tendem a diminuir sua capacidade enzimática e atividade conforme o pH aumenta em virtude da ligação entre os ânions hidróxidos aos cobres localizados na estrutura

proteica da enzima, impossibilitando a transferência de elétrons entre eles e diminuindo seu potencial redox.(MARGOT et al., 2013)

A degradação da lignina produz uma ampla variedade de bioprodutos, dependendo da espécie de microrganismos e dos parâmetros utilizados, sendo os principais produtos já reportados: lipídeos, biopoliésteres (PHA), *cis-cis* ácido mucônico, vanilina, caprolactama, bioconservantes (ácido *p*-hidroxibenzoico), ácido adípico, entre outros (XU et al., 2019).

A maioria dos produtos derivados da degradação da lignina são de grande interesse econômico (Tabela 4), visto que podem gerar compostos de alto valor agregado a partir de resíduos que tem baixo custo de aquisição pela indústria que fará sua transformação. Como exemplo do potencial econômico dos resíduos lignocelulósicos, são negociados anualmente 22 bilhões de dólares somente de produtos derivados do ácido *cis-cis* mucônico, e atualmente sua obtenção em escala industrial se dá apenas por derivados petroquímicos, em um processo com baixa viabilidade econômica (WU et al., 2017).

Tabela 4. Bioprodutos obtidos da degradação da lignina e seu impacto na economia

Bioprodutos	Valor de mercado/ano (US\$)	Utilização
ácido <i>cis-cis</i> mucônico	22,0 bilhões	Precursor para produção de bioplásticos, (PET, NYLON) aditivos alimentícios, remédios e cosméticos ¹
Caprolactama	15,0 bilhões	Bioplásticos e biotermoplásticos ²
Ácido Adípico	6,6 bilhões	Biopoliuretano ³
Ácido Tereftálico	260,0 bilhões	Bioplástico (PET) ⁴
Pirogalol	Mercado potencial – Valor desconhecido	Antimicrobiano e antioxidante ⁵

1: (KHALIL et al., 2020) 2:(SIBIKIN; KARGER-KOCSIS, 2018) 3: (WARD; JONES, 2017) 4: (KRISHNAN; KULKARNI, 2008) 5: (FLORENCE; SUTANTO; DARMAWAN, 2018)

Fonte: (Adaptado de WU et al., 2017).

Visando a degradação sustentável do material lignocelulósico, a via enzimática tem ganhado destaque por meio do emprego de microrganismos versáteis, como os fungos filamentosos. Dentro do enorme espectro de microrganismos disponíveis para essa função, destacam-se os fungos filamentosos presentes no solo e são conhecidos por terem importância

na biodegradação de material lignocelulósico na natureza. A presença destes fungos no solo é importante para garantir a saúde e a qualidade do solo, sendo influenciado diretamente pela diversidade e a composição dos vegetais e das condições ambientais, resultando em promoção de crescimento, mutualismo e fitopatogenicidade. Os fungos têm papel determinante nos principais ciclos biogeoquímicos (nitrogênio, fósforo, carbono e enxofre), produção de fitohormônios e controle biológico. São considerados os principais decompositores de matéria orgânica devido a sua capacidade de produzir enzimas não-específicas que degradam um amplo espectro de moléculas recalcitrantes como a lignina (MAGDALENA et al., 2018; RODRIGUEZ-COUTO, 2017).

Os fungos possuem mecanismos adaptativos, em virtude de sua estrutura celular mais desenvolvida, que fazem com que eles se desenvolvam melhor em ambientes contendo compostos de alta massa molecular devido a sua capacidade de liberação de enzimas extracelulares que vão catalisar a reação dos substratos em produtos sem alterar o metabolismo intra-celular (LAILI et al., 2018).

As rotas metabólicas pelas quais os fungos degradam a lignina foram estudadas, sendo a via do β -cetoadipato a mais comum e mais utilizada (DASHTBAN et al., 2010; WELLS; RAGAUSKAS, 2012).

Assim, os fungos filamentosos presentes em solos mostram-se candidatos promissores para a degradação e a biotransformação de substratos lignocelulósicos em compostos de maior valor agregado em um processo sustentável e economicamente viável dentro dos conceitos de química verde e biorrefinaria.

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais:

Utilizar duas espécies de fungos filamentosos (*Trichoderma harzianum* Rifai PAMB-86 e *Corioloropsis byrsina* SXS16) apontados previamente (GOMES et al., 2009; GIESE et al., 2011) como capazes de biotransformarem biomassa vegetal, para averiguar a possível capacidade de degradação de lignina presente em licor derivado de bagaço-de-cana.

2.2 Objetivos específicos:

- Produção de licor a partir do pré-tratamento do bagaço-de-cana por hidrólise alcalina.
- Crescimento e multiplicação das espécies de fungos filamentosos utilizando o licor como substrato e suplementado com vinhaça e meio mineral.
- Avaliar a atividade da lacase produzida durante a fermentação para ambos os meios nutritivos.
- Identificar e se possível, quantificar os bioprodutos liberados após a degradação enzimática de lignina pelos fungos filamentosos.

3. Materiais e metodologias

3.1. Extração de lignina (pré-tratamento)

O bagaço da cana-de-açúcar foi lavado sob água corrente com o intuito de remover o açúcar resultante do processo de moagem. Após esta etapa, foi seco em temperatura ambiente por três dias, então peneirado em peneira *Granutest* para padronização do tamanho das partículas: entre 1,41 e 2,83 mm de comprimento (DOS SANTOS et al., 2021).

3.2 Hidrólise alcalina

O material peneirado foi imerso em solução aquosa de NaOH 0,5 M na proporção 1:10 g mL⁻¹ e depois autoclavado por 1 hora a 120 °C em autoclave *Fabbe Vertical Modelo 103*. Em seguida, a suspensão foi filtrada a vácuo em papel de filtro quantitativo *GE Healthcare* (12,5 cm de diâmetro), para a obtenção do licor sem quaisquer materiais fibrosos. O filtrado (licor negro) foi acidificado com ácido sulfúrico (0,5 mol L⁻¹) até pH 6,0, e então armazenado a 4°C (IDRIS et al., 2019).

3.3 Inóculo e cultivo dos microrganismos

Os fungos filamentosos escolhidos para análise da eficiência na degradação de lignina estão contidos na Tabela 5:

Tabela 5. Microrganismos utilizados na fermentação

Espécie	Linhagem
<i>Trichoderma harzianum</i>	Rifai PAMB-86
<i>Coriolopsis byrsina</i>	SXS16

Fonte: autoria própria.

Todos os fungos estão armazenados na coleção de cultura de microrganismos localizado no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada na Universidade Estadual Paulista, Câmpus de São José do Rio Preto. Inicialmente, os fungos foram cultivados em Placa de Petri contendo o meio de PDA (*Potato Dextrose Agar*) e incubados a 30 °C por 7 dias em incubadora B.O.D. *MA 415* em triplicata. Após esse período, foi retirado um círculo de 1,0 cm do micélio crescido em PDA e inserido no centro de uma outra placa contendo vinhaça (5% v/v em água destilada) e licor a 5% (Tabela 6), ambos autoclavados, com o intuito de estimular a adaptação dos fungos para posterior cultivo em meio líquido.

Tabela 6. Composição do meio sólido em Placa de Petri

Composto	Concentração
Vinhaça	5% (v/v)
Ágar	1,5 % (m/v)
Licor	5% (v/v)

Fonte: autoria própria.

Após os 7 dias em meio sólido, foram incubados dois círculos de 1,0 cm de diâmetro retirados do micélio e inseridos em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido, cuja composição está contida na Tabela 7.

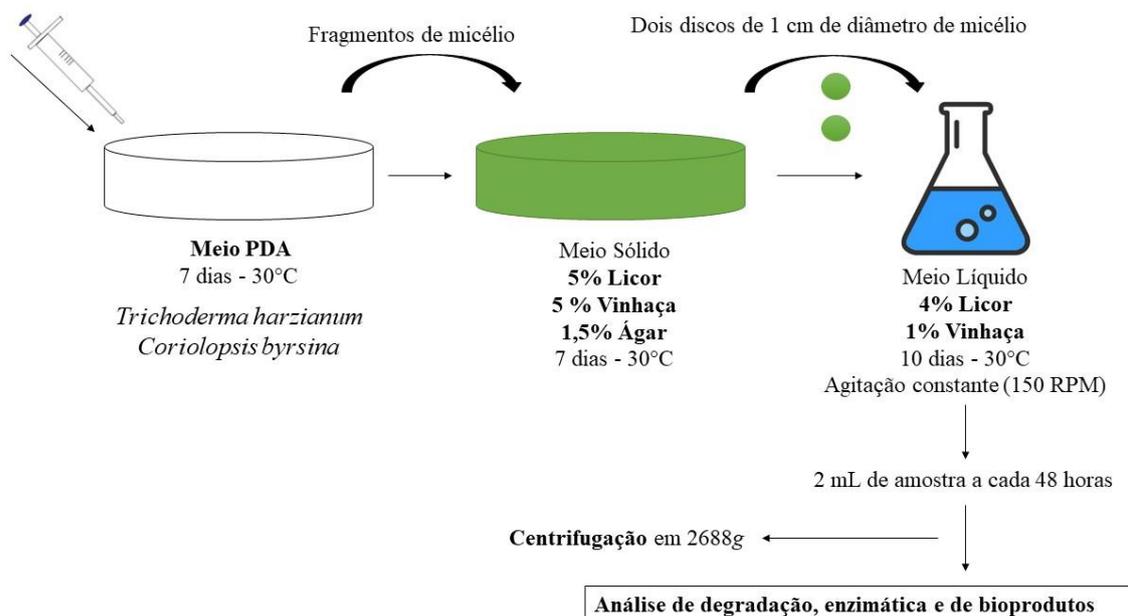
Tabela 7. Composição do meio líquido utilizado para fermentação

Composto	Quantidade
Vinhaça	1% (v/v)
Licor	4% (v/v)

Fonte: autoria própria.

Toda a fermentação ocorreu na ausência de luz a 30°C por 10 dias a 150 rpm em incubadora B.O.D. *MA 415*. Alíquotas de 2 mL de amostra foram coletadas a cada 2 dias, centrifugadas a 10.000 rpm (2.688 xg) em centrífuga de *Eppendorf 5415D* não refrigerada por 10 minutos. O sobrenadante foi analisado, todo o processo ocorreu em triplicata e está esquematizado na Figura 5.

Figura 5. Esquema simplificado mostrando as etapas do cultivo e fermentação com meio suplementado com vinhaça



Fonte: autoria própria.

Todos os processos realizados na fermentação suplementada com vinhaça foram realizados novamente substituindo a vinhaça pelo meio mineral (Tabela 8).

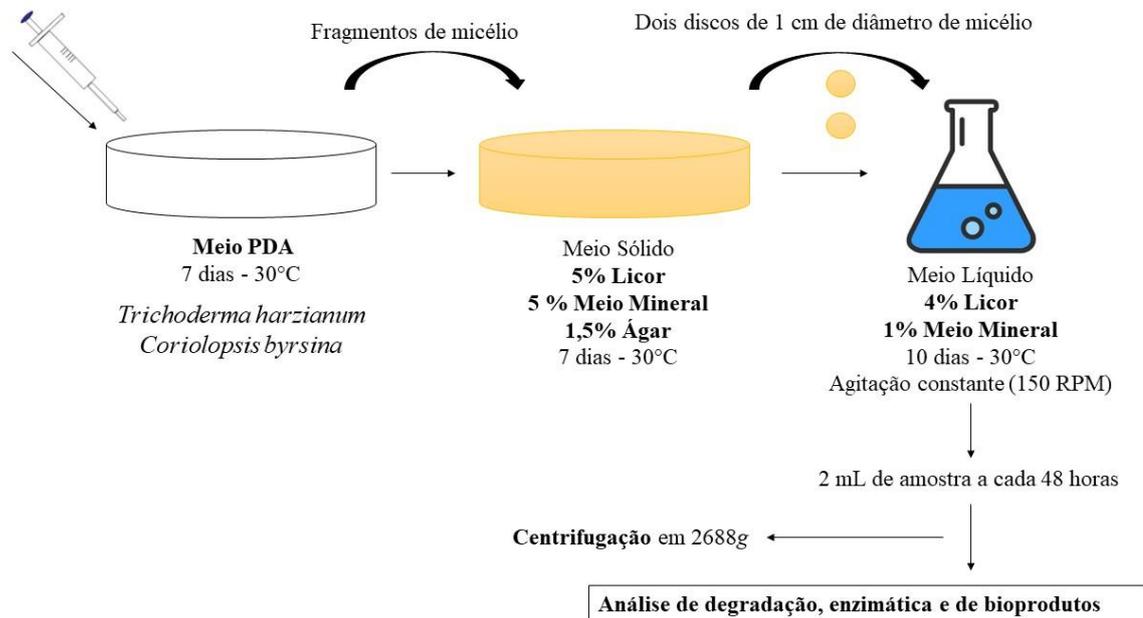
Tabela 8. Composição do meio mineral utilizado na fermentação

Composto	Quantidade (% m/v)
KH ₂ PO ₄	0,7
K ₂ HPO ₄	0,2
MgSO ₄	0,01
CaCl ₂	0,01
Extrato de Levedura	0,1
Peptona	0,1

Fonte: autoria própria.

O esquema simplificado da fermentação com meio mineral está contido na Figura 6.

Figura 6. Esquema simplificado mostrando as etapas do cultivo e fermentação com meio suplementado com meio mineral sintético



Fonte: autoria própria.

3.4 Análise da degradação de lignina

Alíquotas de amostras de cada fermentação foram coletadas e centrifugadas. Após isso, 50 µL do sobrenadante foram diluídos em 950 µL de água destilada para serem analisadas por Espectrometria de UV-Vis em varredura de 200 a 400 nm em equipamento *Spectra Max Plus 384*, observando o pico correspondente a 280 nm, comprimento de onda na qual a lignina possui maior absorbância (SEESURIYACHAN et al., 2015; ZHU et al., 2017; IDRIS et al., 2019). Assim, a quantidade de lignina degradada foi obtida por porcentagem relativa com relação ao controle, por meio da seguinte equação:

$$L_{280\%} = \frac{A_{\text{Controle}} - A_{\text{Amostra}}}{A_{\text{Controle}}} \times 100$$

Onde:

$L_{280\%}$ = Porcentagem de lignina degradada para determinada fermentação

A_{controle} = Absorbância obtida em 280 nm do controle (abiótico)

A_{Amostra} = Absorbância obtida em 280 nm das fermentações

Com isso, foi possível elaborar o perfil de degradação de lignina para cada espécie de microrganismo em função do tempo (de 0 até 10 dias).

3.5 Monitoramento do pH do meio

Logo após a coleta dos extratos enzimáticos, foi realizado a medição do pH da alíquota em equipamento da marca Digimed devidamente calibrado com intervalo de confiança de no mínimo 95% utilizando conjunto de tampões de pH = 4,0 e 7,0. Com isso, um gráfico foi obtido relacionando a variação de pH do meio em função do tempo de fermentação para todas as amostras, incluindo o controle abiótico.

3.6 Determinação da atividade da enzima lacase

A atividade enzimática da lacase foi determinada por metodologia descrita por Buswell et al. (1995) e compreende a oxidação de ABTS (2,2-azino-bis-etilbentiazolina) pela enzima. Nesta metodologia, coletou-se 100 µL de extrato enzimático e adicionou-se 900 µL de tampão acetato de sódio 0,1M de pH 5,0 e 800 µL de solução de ABTS (0,03% m/v) e aqueceu-se a 37°C durante 10 min, em triplicata. Após isso, realizou-se a leitura no comprimento de onda de 420 nm em cubeta de 1 cm em Espectrometro de UV-Vis *Spectra Max Plus 384* (BUSWELL; CAI; CHANG, 1995; MENEZES et al., 2010) e por meio da equação 1, foi calculada a atividade enzimática em função da absorbância, onde o valor de coeficiente de absorvidade molar para o ABTS é de $\epsilon_{abts} = 3,6 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$:

Equação 1: Determinação da atividade da enzima lacase em função da absorbância em 420 nm

$$U(\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}.\text{L}^{-1}) = \left(\frac{\text{Abs}}{\epsilon \times V_a \times t_t} \right) \times Fd \times 10^6$$

Legenda: Abs = Absorbância; ϵ = absorvidade molar; V_a = volume de amostra; t_t = tempo de reação em minutos; Fd = fator de diluição

3.7 Análise preliminar de bioprodutos

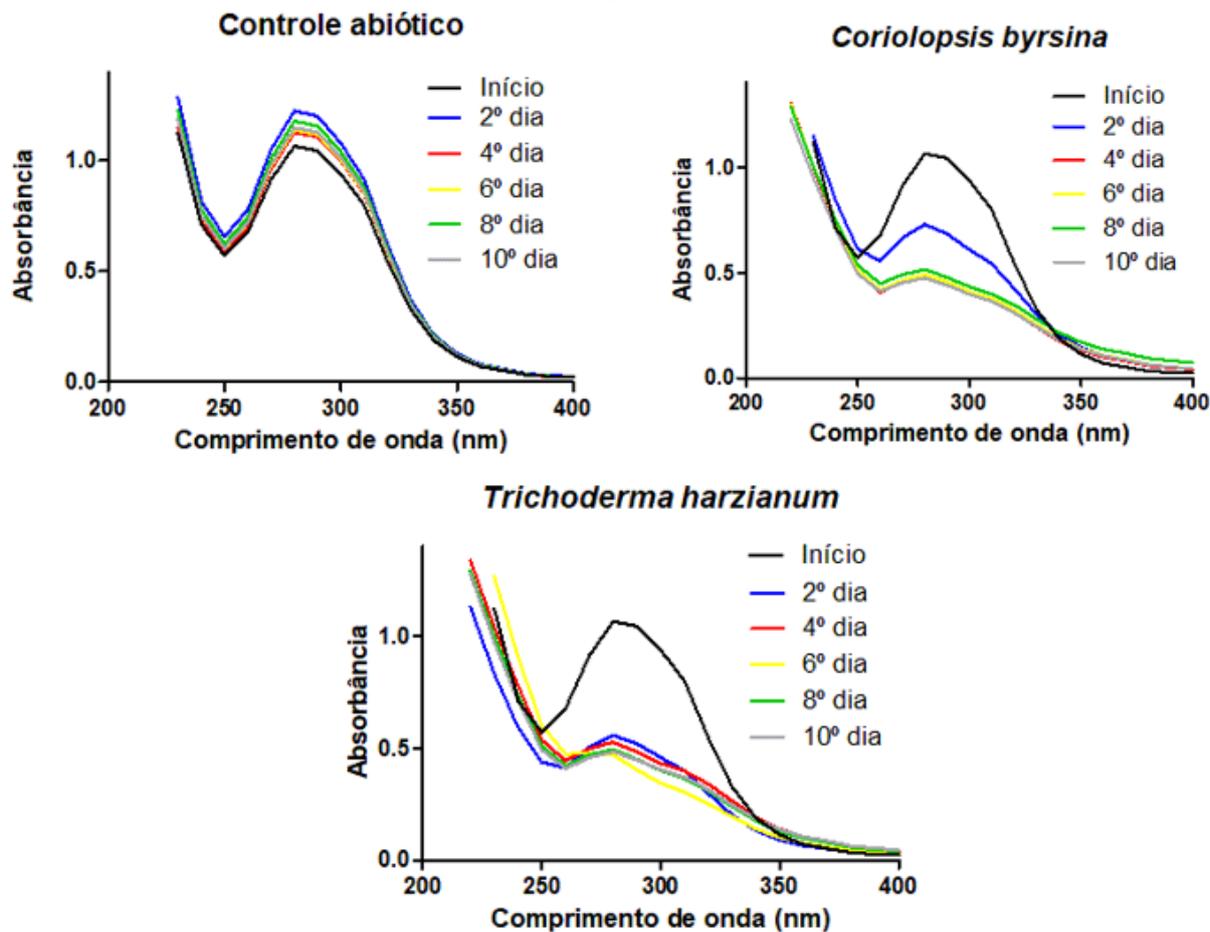
As amostras coletadas durante a fermentação foram injetadas em um HPLC Shimadzu Nexera XR com detector de arranjo de diodos, operando de 190-800 nm. A coluna utilizada foi a C-18 Agilent Poroshell 120 (4,6 x 100 mm) com partículas de 2,7 μ M. A fase móvel utilizada foi água (A) e metanol (B) e a eluição se deu em modo gradiente: inicial foi de 60 % (A) e 40% (B), elevando B até 100% em 20 minutos mantendo-se essa condição por 5 minutos e posteriormente retornando a condição inicial. O tempo total de análise foi de 30 minutos a um fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e temperatura de 25°C. O volume de injeção foi de 20 μ L e comprimento de onda de monitoramento do espectro foi de 280 nm (VARGAS et al., 2020).

4. Resultados e discussão

4.1 Utilização da vinhaça como meio nutritivo

A degradação de lignina pelos fungos filamentosos em fermentação submersa contendo vinhaça, representados por meio dos Espectros de UV-Vis na faixa de 200 – 400 nm é mostrada na Figura 7.

Figura 7. Espectros de absorção das amostras coletadas durante a fermentação contendo vinhaça (média das triplicatas)

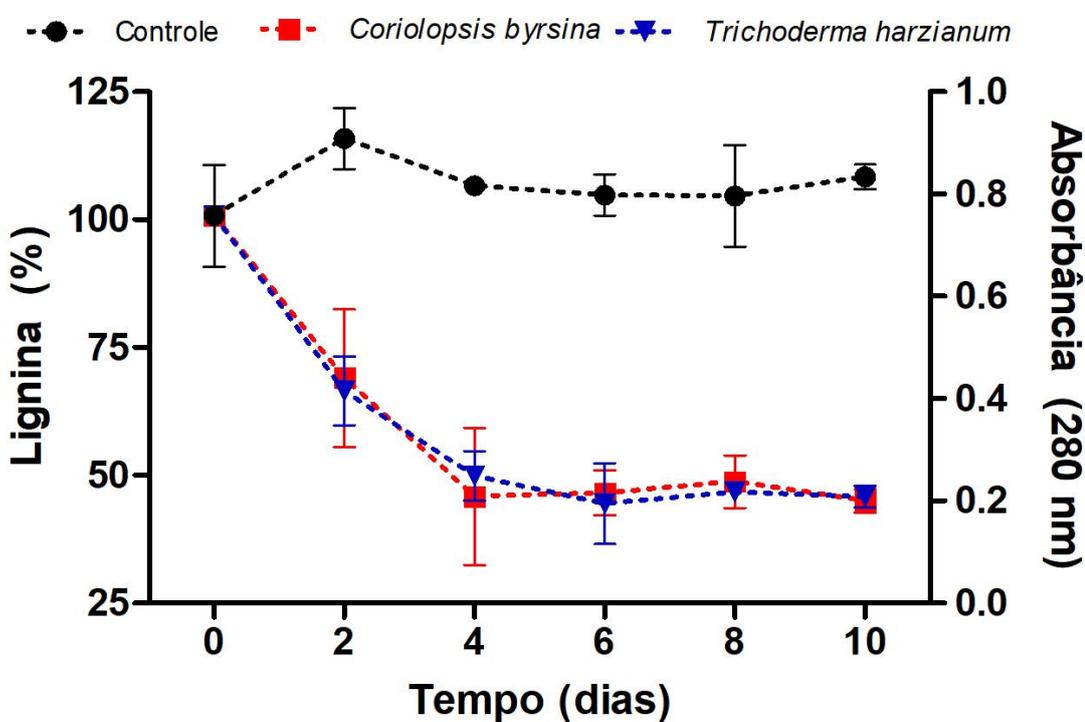


Fonte: Autoria própria.

Como pode-se observar, houve uma alteração expressiva no perfil dos espectros de varredura na presença dos fungos, evidenciando a degradação enzimática do substrato de lignina. A diferença entre os espectros observados na Figura 5, mostra que as espécies utilizadas produzem diferentes enzimas, mesmo que o objetivo entre eles seja a degradação do substrato para produção de energia (ZHU et al., 2017). A absorvância na região de 280 nm é obtida pela presença de grupos cromóforos, tais como ligações C=C conjugadas, anéis aromáticos e grupos fenólicos altamente condensados (KOCH et al., 2003). Um alto grau de conjugação das

estruturas aromáticas resulta na estabilização das ligações π - π^* , fazendo com que amplie a largura da banda de absorção na região de 280 nm (FACKLER; THYGESEN, 2013). Na fermentação, a diminuição da absorbância nesta região, evidencia o processo enzimático de degradação da lignina pelos microrganismos (IDRIS et al., 2019). Além disso, pode-se observar a manutenção dos perfis de absorção nas amostras controle. Assim, uma diminuição do pico de absorção em 280 nm é um indicio importante de que o teor de lignina nas amostras diminuiu durante a fermentação. Os percentuais de lignina degradada pelos microrganismos estão presentes na Figura 8.

Figura 8. Teores percentuais de lignina presentes na amostra durante a fermentação estimados em função da absorbância em 280 nm com meio suplementado com vinhaça



Fonte: autoria própria.

Como pode-se observar no gráfico contido na Figura 8, os teores percentuais para a degradação de lignina têm valores próximos a 50% para as espécies *Coriolopsis byrsina* e *Trichoderma harzianum* após os 10 dias de fermentação. O teor de degradação de lignina encontrado para as espécies em questão mostra-se significativo uma vez que se compara com os valores encontrados na literatura: Idris et al., 2018 encontrou valores próximos a 15% de degradação para as espécies de fungos *Daldinia eschscholtzii*, *Hypoxylon investiens*; Zhu et al.,

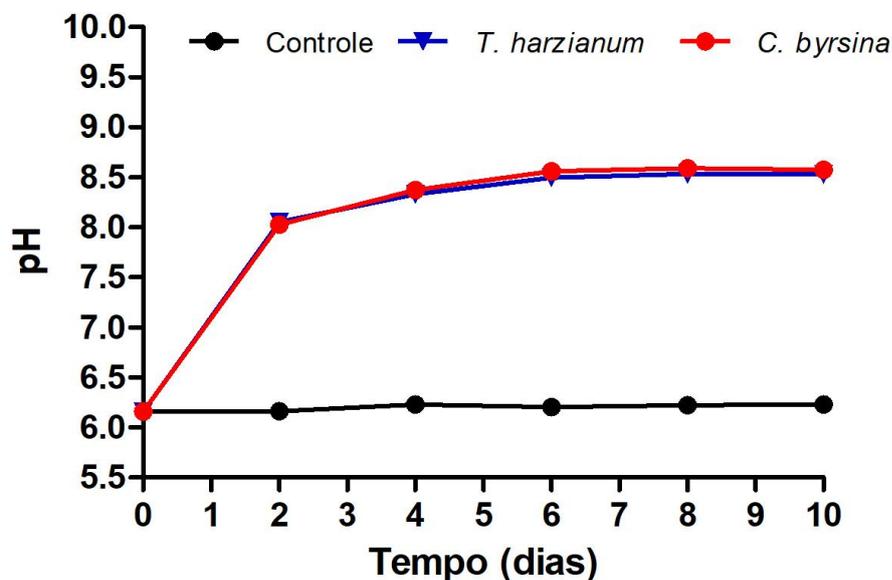
2017 demonstrou uma diminuição da concentração de lignina de 35% para 20% do teor de lignina utilizando a bactéria *Bacillus ligniniphilus*.

A alta eficiência para degradação de lignina pode estar relacionada não só com a versatilidade das espécies fúngicas, mas também devido a dois fatores principais: presença de açúcares de fácil assimilação, como monossacarídeos e dissacarídeos, e pH do meio de cultura da fermentação. Pesquisas anteriores mostraram que a presença desses açúcares, acaba resultando em um aumento expressivo na capacidade dos microrganismos em secretar enzimas capazes de degradar lignina, causando um forte aumento do rendimento de degradação (WU, J.; XIAO; YU, 2005; ZHANG et al., 2021). Neste estudo, foi utilizado um meio nutritivo de vinhaça (um subproduto da produção de açúcar e álcool) que contém açúcares como glicose e frutose que não foram aproveitados na indústria e que acabaram contribuindo para aumentar o rendimento de degradação enzimática da lignina pelos microrganismos.

A vinhaça é um dos resíduos derivados da fermentação alcoólica proveniente da indústria sucroalcooleira e os açúcares presentes em sua composição são resultado do consumo parcial pelas leveduras responsáveis pela fermentação, devido principalmente ao Efeito Crabtree, um efeito que regula o consumo de açúcares em processos fermentativos com alta concentração de glicose (PFEIFFER; MORLEY, 2014).

Um outro fator importante e que pode contribuir de forma expressiva no rendimento fermentativo é o pH, que pode afetar de forma exponencial a capacidade de degradação de lignina por diversos fatores: alteração do pH ótimo de crescimento das espécies utilizadas e/ou para o rendimento enzimático, e alteração das moléculas resultantes do processo de degradação (FANG et al., 2018). Estudos mostraram que condições ácidas para degradação de lignina são mais eficientes pois resultam em maior produção enzimática e, além disso, as enzimas degradadoras de lignina possuem maior atividade nesta faixa de pH, tais como lacases e peroxidases (MATE; ALCALDE, 2017; ZHANG et al., 2021). Neste estudo, o pH do licor foi ajustado para valores próximos de 6,0, e a utilização de vinhaça como meio nutritivo acaba acidificando o meio de fermentação devido à presença de ácidos orgânicos (como ácido láctico e acético) resultantes do processo de fermentação alcoólica na indústria. Os resultados das análises de pH dos extratos enzimáticos estão contidos na Figura 9.

Figura 9. Valores de pH em função do tempo do meio de fermentação suplementado com vinhaça



Fonte: autoria própria

Como pode-se observar, houve uma alcalinização do meio de fermentação para as amostras biologicamente ativas. O aumento do pH dos extratos enzimáticos a partir do início da fermentação pode ser explicado pela liberação de produtos de natureza alcalina derivados da biodegradação da lignina (POMETTO; CRAWFORD, 1986). O principal mecanismo para a liberação desses produtos é a desmetilação, processo no qual há a remoção de grupos metila da estrutura da lignina, liberando produtos como catecol, importante intermediário da via do β -ceto adipato, e também de moléculas contendo grupos hidroxil-fenólicos, por meio da via da enzima O-desmetilase quanto pela via da enzima lacase (KIM et al., 2021; CUI et al., 2022).

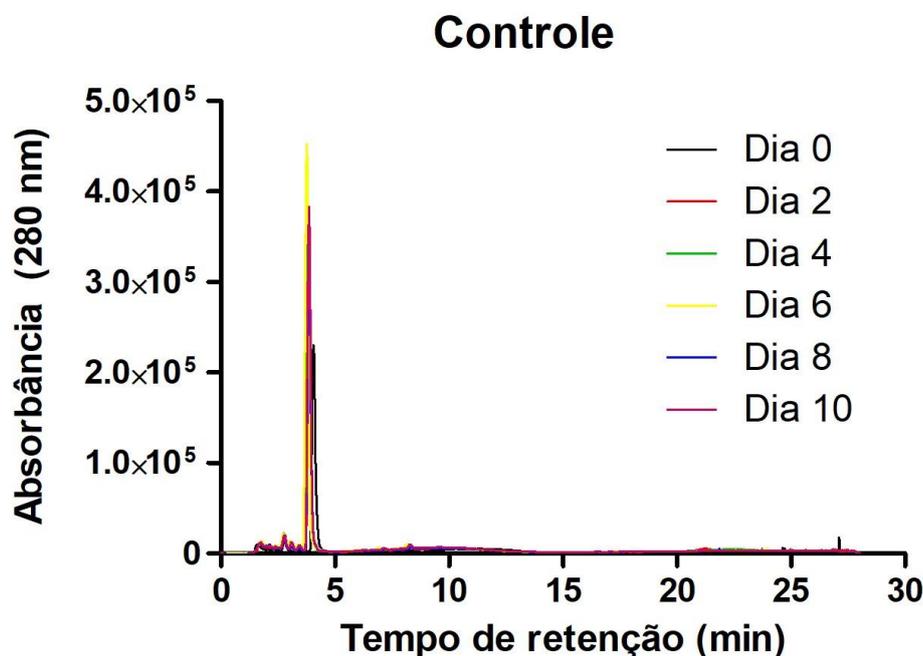
O pH é um dos fatores mais importantes quando se trata do cultivo de microrganismos e do estudo da eficiência enzimática. A lacase derivada de fungos, uma das enzimas mais importantes com relação a biodegradação de lignina, possui pH ótimo na faixa ácida, ou seja, a conversão de substrato em produtos acontece de forma mais eficiente quando o meio está com o pH menor que 7,0 (BALDRIAN, 2006). Um dos fatores que explica o platô de biodegradação e estabilidade observados a partir do 4º dia de fermentação (Figura 8) é o próprio aumento do pH do meio obtido pela liberação dos bioprodutos, causando uma diminuição da atividade das enzimas lignolíticas, como a lacase, inibindo o crescimento microbiano e consequentemente diminuindo a biodegradação de substrato. O aumento do pH é resultado do aumento de íons hidroxila (OH^-) no meio fermentativo e influencia na atividade da enzima por vários motivos, destacando-as duas principais: saturação dos co-fatores enzimáticos de íons Cu^{2+} pela formação

de $\text{Cu}(\text{OH})_2$; e pela alteração do potencial redox dos clusters iônicos (XU, F., 1997). Com isso, pode-se observar que o aumento do pH pode ser um dos fatores relacionados com a diminuição da atividade de degradação de lignina.

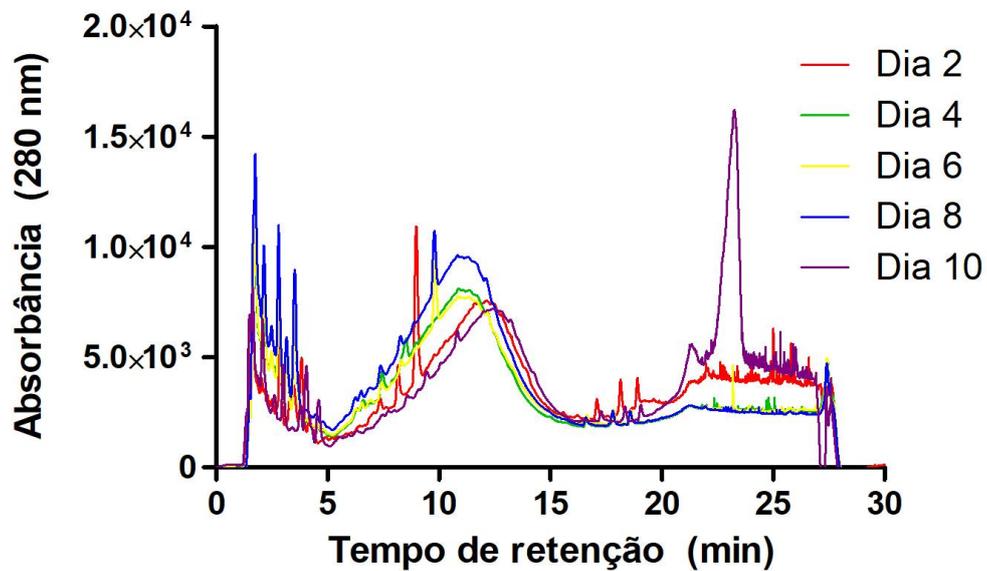
Também foi analisada a atividade enzimática da lacase, obtida dos extratos enzimáticos durante o processo fermentativo. O teste realizado não demonstrou atividade para a enzima lacase em nenhum dos dias e para nenhuma das amostras analisadas em meio contendo vinhaça. Isso pode ser explicado por dois fatores principais: presença de inibidores enzimáticos derivados da vinhaça, que possivelmente diminuíram a atividade da lacase, aliado ao meio de fermentação muito diluído, diminuindo a concentração de proteínas e consequentemente, de produtos formados, sendo, portanto, de difícil detecção pelo protocolo utilizado.

A análise preliminar dos bioprodutos foi obtida por HPLC por meio da separação dos compostos através das suas diferentes polaridades. Os resultados estão contidos nos gráficos da Figura 10. Observe a alteração de escala nos valores de absorbância entre os gráficos do controle e dos fungos.

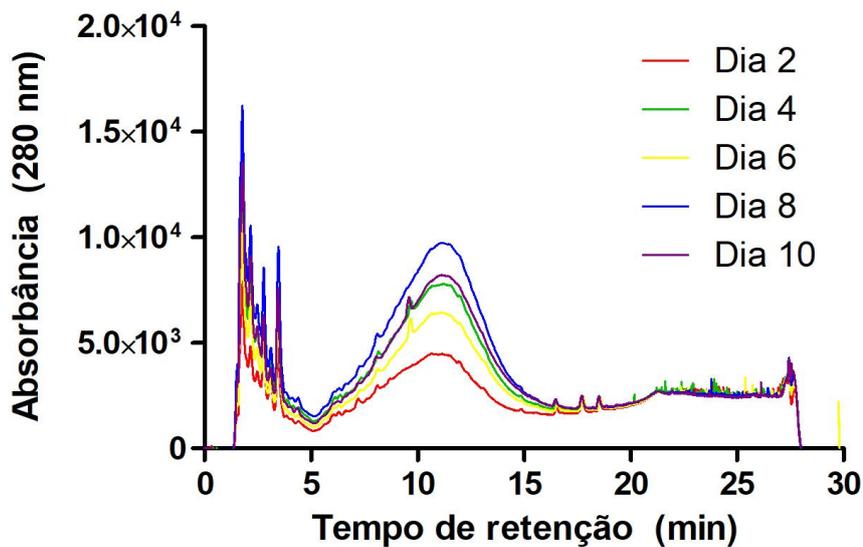
Figura 10. Cromatogramas por HPLC dos bioprodutos para as amostras com relação ao tempo de fermentação contendo vinhaça como suplementação



Trichoderma harzianum



Coriolopsis byrsina

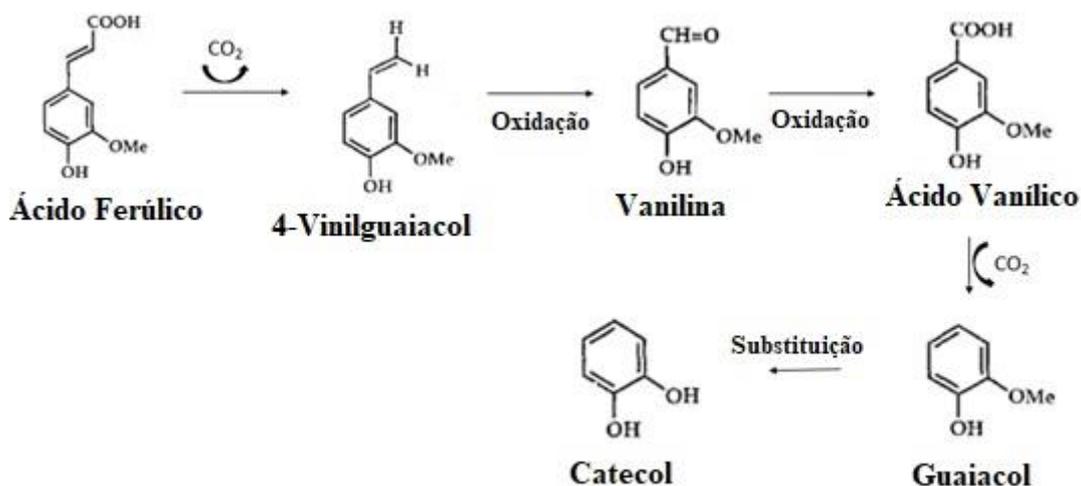


Fonte: Autoria própria

Como pode-se observar, o cromatograma referente ao controle evidencia a existência de uma grande quantidade de compostos, sendo considerados os picos dos substratos fenólicos de lignina. De acordo com Prothmann, o licor possui cerca de 587 espécies químicas, entre oligômeros e derivados, e grande parte desses compostos possui tempo de retenção menor que 10 minutos (PROTHMANN et al., 2018). Assim, comparando-se os cromatogramas do *Trichoderma harzianum* e do *Coriolopsis byrsina*, observa-se que esses compostos com tempo de retenção menor que 10 minutos foram parcialmente degradados, ou seja, o sinal de absorbância diminuiu e outros picos apareceram, evidenciando que novas biomoléculas foram liberadas. No

cromatograma referente ao *Trichoderma harzianum* apareceu um pico novo no décimo dia de fermentação, próximo dos 24 minutos de tempo de retenção. Comparando com dados de estudos similares envolvendo biodegradação de lignina e HPLC, possivelmente o pico refere-se a 4-vinil-guaiacol, sendo formado a partir da descarboxilação de ácido ferúlico (JIANG et al., 2011; WILLIAMSON et al., 2020). Contudo, diversos picos de absorvância foram detectados nessa proximidade, caracterizando a presença de diversos metabólitos de mesma derivação, como evidencia o esquema de formação de catecol a partir de ácido ferúlico mostrado na Figura 11:

Figura 11. Mecanismo de reação e produtos derivados da transformação do ácido ferúlico em catecol



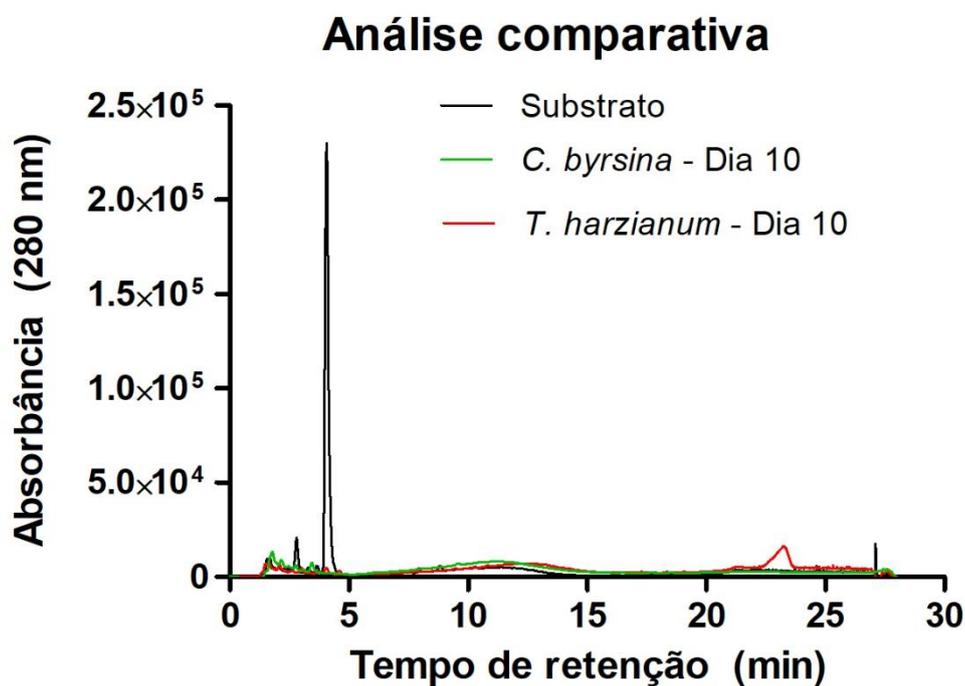
Fonte: Adaptado de: (ROSAZZA et al., 1995)

O processo de separação na cromatografia líquida se deu por meio da polaridade dos compostos, e diversos picos foram detectados próximos uns aos outros ou até mesmo sobrepostos em um mesmo tempo de retenção devido à semelhança estrutural que resulta em polaridades semelhantes, dificultando sua separação.

Diversos estudos apontam os derivados obtidos com a degradação do ácido *p*-cumárico como inibidores enzimáticos, tais como o ácido ferúlico, vanilina, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, etc., ligando-se a enzimas oxidativas por meio de ligações de hidrogênio, fazendo com que ocorra uma diminuição da atividade fermentativa e do crescimento microbiano. Tal fato pode ter ocorrido no experimento realizado visto que a lignina não foi completamente degradada, embora ainda houvesse substratos disponíveis, o que possivelmente desencadearia uma parada no processo fermentativo (NILE et al., 2015).

A análise comparativa entre o cromatograma do substrato e dos extratos enzimáticos coletados ao final das fermentações e com a mesma escala de sinal (Figura 12), evidenciaram que o pico referente aos compostos fenólicos próximo ao tempo de retenção de 5 minutos foi completamente degradado para ambas as fermentações, corroborando com o potencial promissor para esses fungos na degradação de compostos fenólicos.

Figura 12: Cromatogramas do substrato e dos extratos enzimáticos ao final da fermentação em mesma escala - Vinhaça

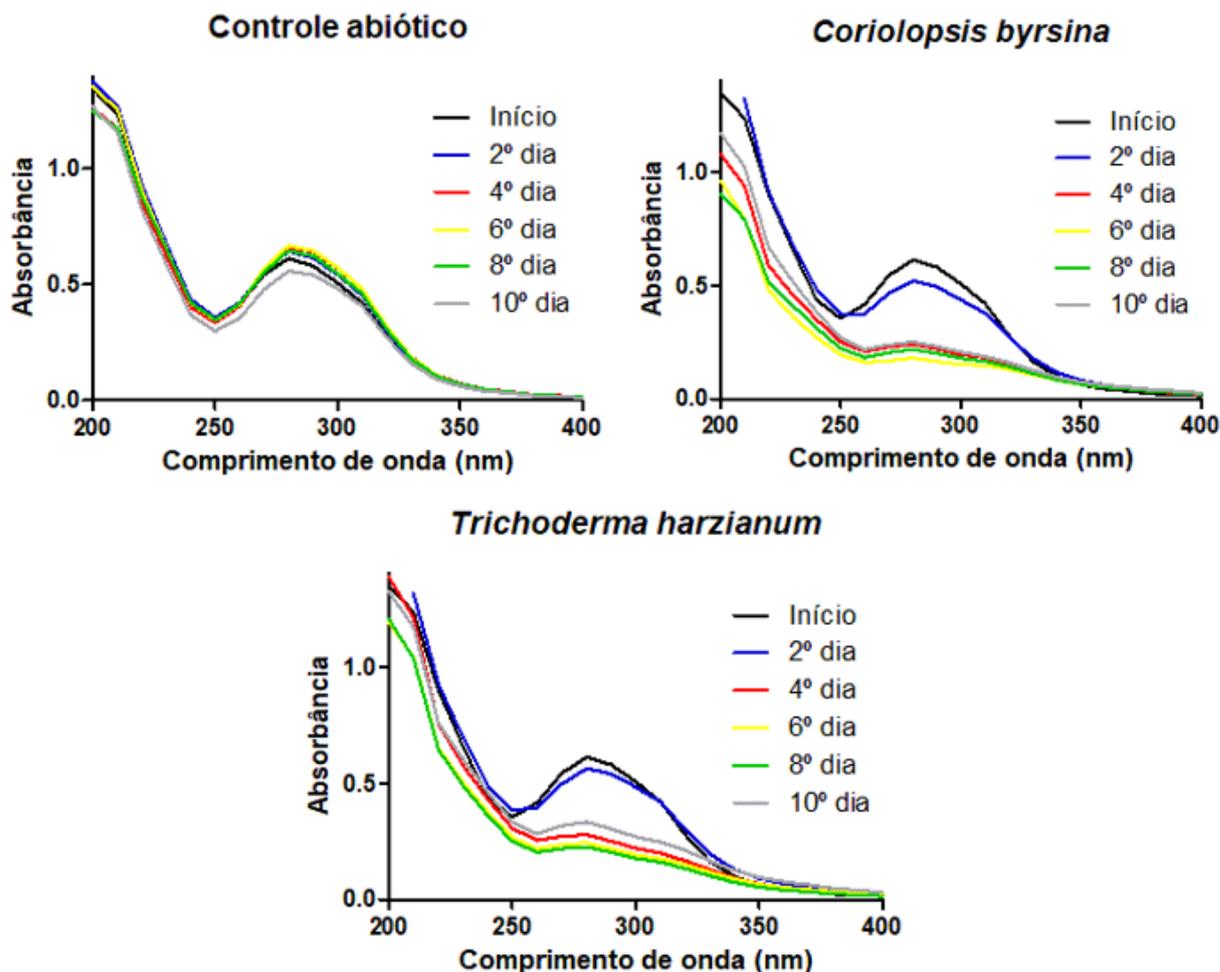


Fonte: autoria própria.

4.2 Utilização do meio mineral como meio nutritivo

Os Espectros de varredura UV-Vis das amostras coletadas das fermentações contendo lignina e meio mineral são mostrados na Figura 13.

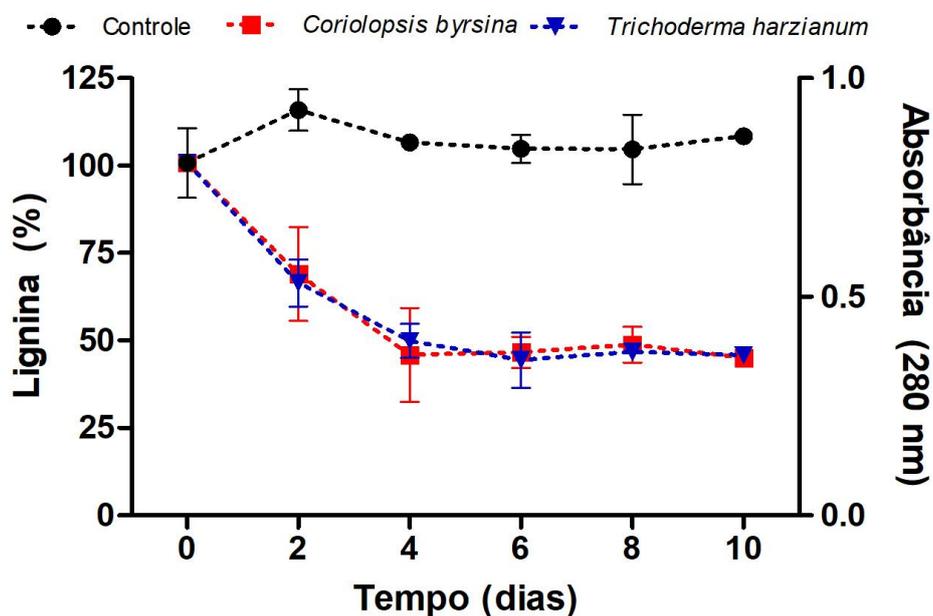
Figura 13. Espectros de absorção na faixa de 200 – 400 nm das amostras suplementadas com meio mineral (média das triplicatas)



Fonte: Autoria própria

Como pode-se observar, a absorvância correspondente a banda próxima de 280 nm também tende a diminuir ao longo do processo fermentativo utilizando meio mineral, indicando uma possível degradação dos compostos fenólicos derivados da lignina presente no licor, similar ao observado na fermentação suplementada com vinhaça, enquanto a amostra referente ao controle pouco se observa na alteração da banda próxima de 280 nm. O perfil de degradação percentual indicando a variação da absorvância no comprimento de onda de 280 nm está contido na Figura 14.

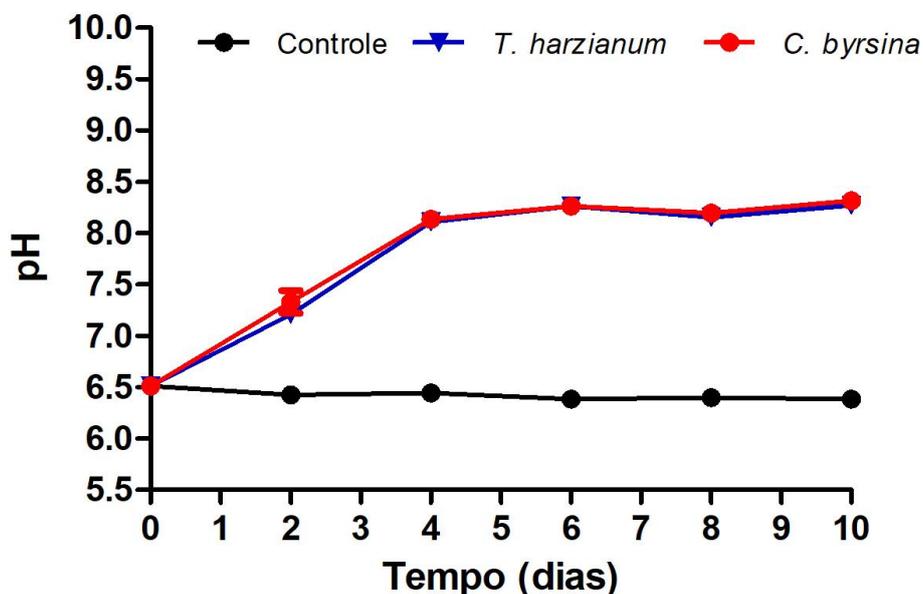
Figura 14. Perfil de degradação percentual de lignina com relação a absorbância em 280 nm em meio suplementado com meio mineral



Fonte: Autoria própria

Como podemos observar, a suplementação com meio mineral também foi importante para garantir a síntese enzimática e a consequente degradação dos compostos fenólicos derivados da lignina, chegando a valores de degradação próximos de 70% para *Corioloopsis byrsina* e *Trichoderma harzianum*. Comparando-se com os valores encontrados na literatura já citados no capítulo anterior, os resultados mostram-se ainda mais promissores. O resultado de degradação tem influência direta no aumento do pH, fato observado também nos experimentos realizados utilizando a vinhaça como forma de suplementação, possivelmente devido a liberação de algum bioproduto básico ao meio fermentativo. Os dados estão contidos na Figura 15.

Figura 15. Valores de pH em função do tempo do meio de fermentação suplementado com meio mineral



Fonte: autoria própria

Observa-se pelo gráfico de pH em função do tempo de fermentação que o platô de estabilidade obtido a partir do quarto dia de fermentação também se manteve em valores próximos de pH igual a 8,5, semelhante ao gráfico da Figura 7, na qual foram monitorados os valores de pH para o meio suplementado com vinhaça. Possivelmente, nesse valor de pH, as enzimas responsáveis pela degradação do substrato já não possuem atividade enzimática eficiente para a continuação da liberação dos bioprodutos, que são responsáveis de maneira indireta pelo aumento da alcalinização do meio. Isso resulta numa diminuição ou até a paralisação da atividade de degradação, fato observado também no perfil de degradação (Figura 9), onde a absorvância no comprimento de 280 nm diminui a sua queda acentuada a partir do quarto dia de fermentação.

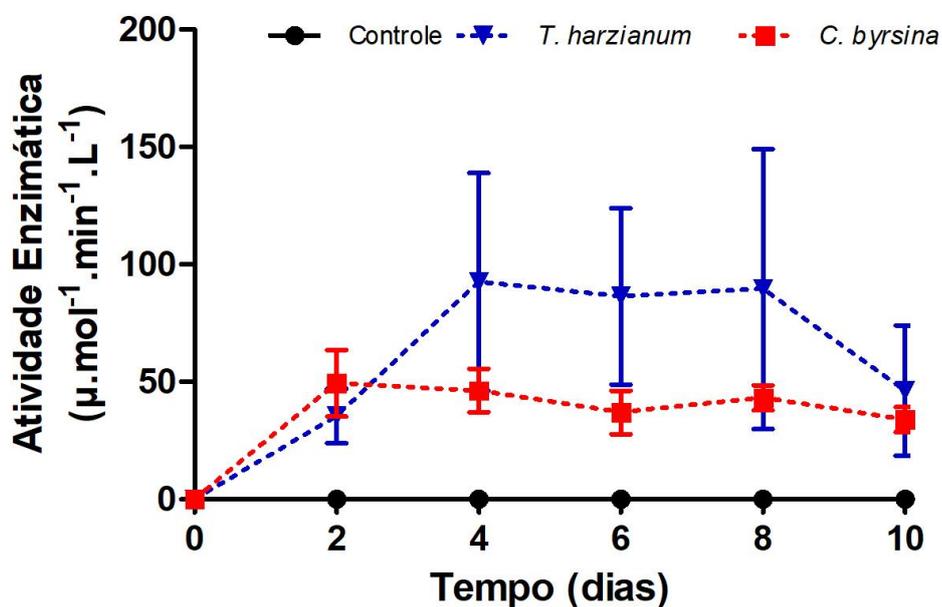
A principal diferença observada entre os perfis de pH e os meios de suplementação utilizados foi nos primeiros dias de fermentação. No meio suplementado com vinhaça (Figura 7), o pH alcançou valores próximos de 8,0 já no segundo dia de fermentação. Já no meio suplementado com meio mineral (Figura 15), somente a partir do quarto dia de fermentação foi alcançado esse valor de pH. Isso foi observado devido a uma leve capacidade de tamponamento em pH = 6,0 pelo meio mineral, devido ao sistema fosfato mono e biácido, o que acabou contribuindo para diminuir a intensidade do aumento do pH no início da fermentação. Entretanto, como o tampão possuía baixa capacidade de tamponamento, e somado a isso, a solução mineral estava muito diluída, a partir do quarto dia já foi observado o mesmo platô de estabilidade observado no meio suplementado com vinhaça.

Outro fator importante que influencia na degradação de lignina é a presença de açúcares. Como não foi adicionada nenhuma fonte de açúcares redutores que são imprescindíveis para alta eficiência de degradação de lignina, pode-se considerar que os microrganismos utilizaram os açúcares derivados da hemicelulose: cerca de 70% da massa seca do bagaço-de-cana é composto por carboidratos, e desta quantidade, cerca de 20% é composto por xilana, um polímero composto por uma estrutura principal de xiloses unidas por ligação β -1,4 com um final redutor, ramnose e ácido galacturônico (MÄKI-ARVELA et al., 2011; WIERZBICKI et al., 2019).

Com isso, pode-se considerar que os microrganismos possam ter utilizado como fonte inicial de energia os açúcares provenientes da hemicelulose para que pudesse dar início a produção enzimática, principalmente da enzima lacase, para degradação da lignina, um substrato muito mais complexo.

Os resultados obtidos da atividade da lacase para a fermentação suplementada com meio mineral estão contidos na Figura 16.

Figura 16. Atividade da enzima lacase para meio suplementado com meio mineral ao final da fermentação (10 dias).



Fonte: Autoria própria.

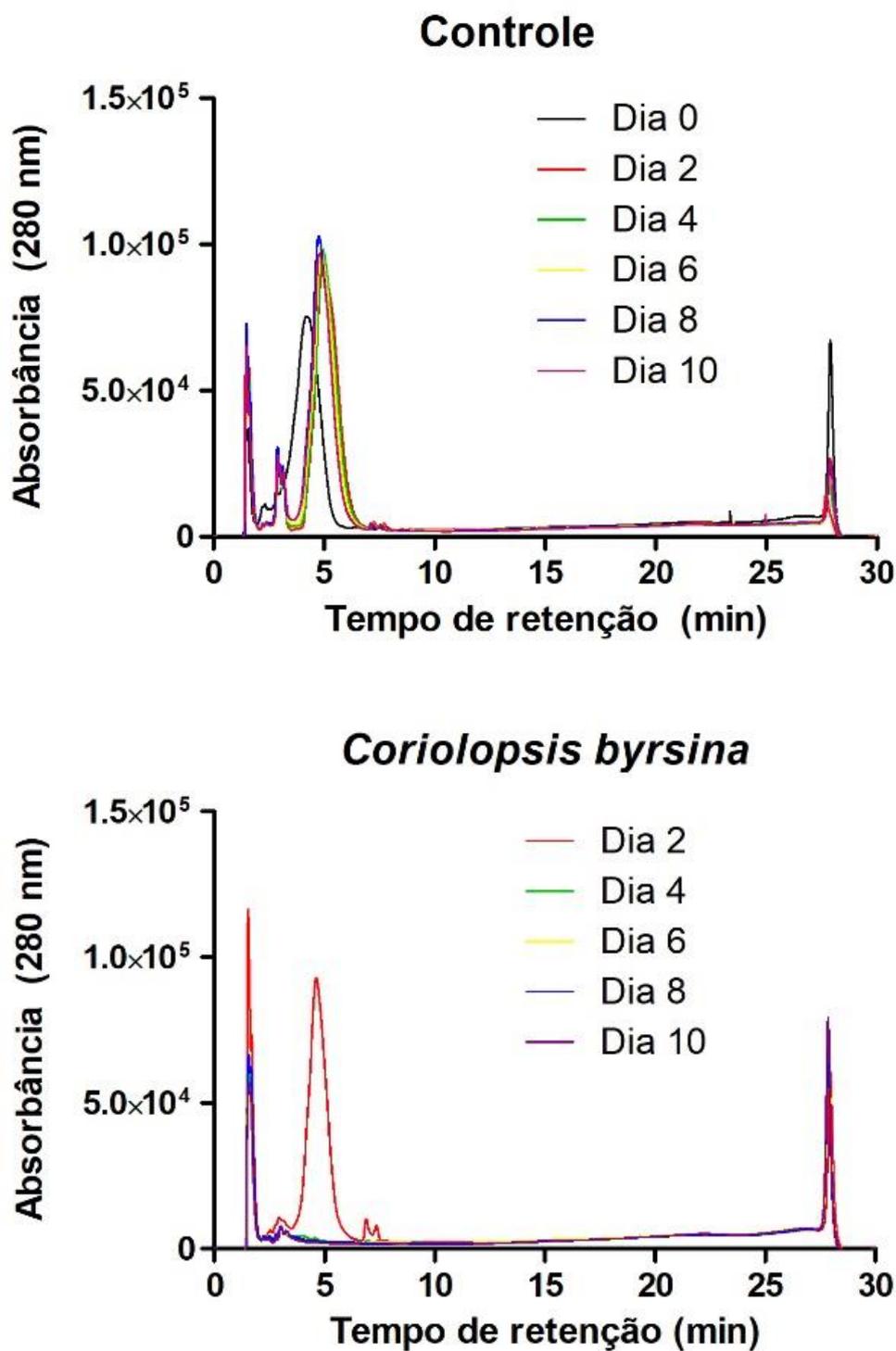
Diferentemente dos extratos enzimáticos do meio suplementado com vinhaça, nos quais não foram observados atividade enzimática para lacase, nos extratos do meio suplementado com meio mineral foi observado atividade para todos os dias de fermentação. De acordo com o

perfil da Figura 16 a maior atividade foi encontrada para a espécie *Trichoderma harzianum* no quarto dia de fermentação, valor que se manteve até o oitavo dia de fermentação. Esse valor de atividade pode ser explicado pelo platô de estabilidade de pH (Figura 15). Nos primeiros dias de fermentação, foi observado um gradativo aumento na atividade enzimática da lacase devido ao fato dos microrganismos estarem em processo de adaptação ao meio de fermentação, sintetizando as enzimas necessárias, inclusive a lacase. Com isso, o aumento da atividade enzimática foi observado de forma gradativa até aproximadamente ao quarto dia de fermentação para o *Trichoderma harzianum* e ao segundo dia de fermentação para o *Corioloopsis byrsina*. Os valores de atividade entre as espécies variaram, pois, cada microrganismo possui sua própria etapa de adaptação e agilidade na síntese proteica. O platô de estabilidade da atividade enzimática foi encontrado para o valor próximo de $100 \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ para a espécie *Trichoderma harzianum* e $50 \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ para a espécie *Corioloopsis byrsina*. Os valores máximos de atividade na qual o platô se manteve estável pode ter relação com as lacases produzidas pelos microrganismos: diferentes microrganismos, produzem lacases específicas (TONIN et al., 2016), que acabam tendo características específicas.

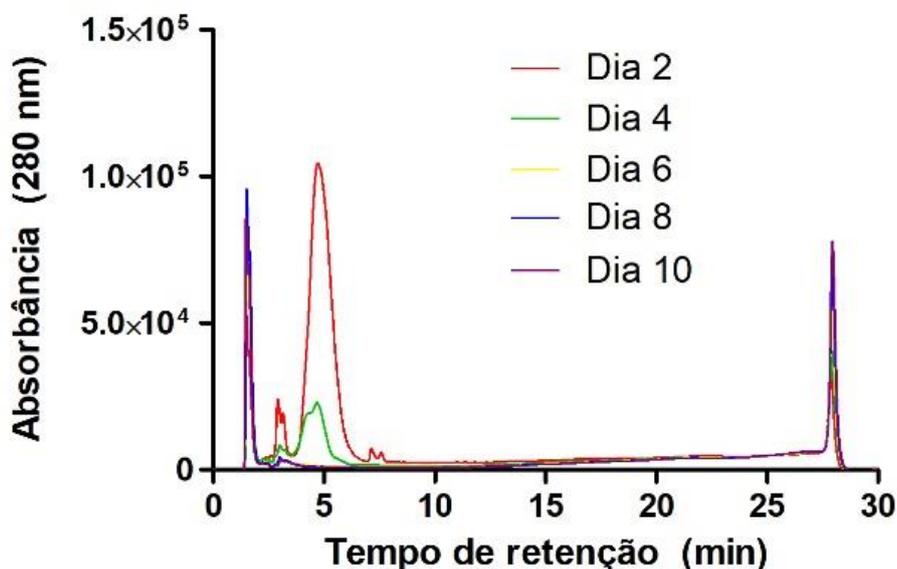
Diversos estudos na literatura a respeito da quantificação da atividade da enzima lacase mostram que os valores encontrados neste estudo estão acima que os encontrados por outros pesquisadores: Han et al., reportaram valores de aproximadamente $36 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ para *Lenzites betulina* Han 851 e $5 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ para *Schizophyllum commune* Han 881 utilizando substratos vegetais lignocelulósicos (HAN et al., 2021).

Os cromatogramas obtidos para os bioprodutos em função do tempo para os microrganismos incubados com meio mineral estão contidos na Figura 17.

Figura 17. Cromatogramas dos bioprodutos obtidos para as amostras com relação ao tempo de fermentação contendo meio mineral como suplementação



Trichoderma harzianum



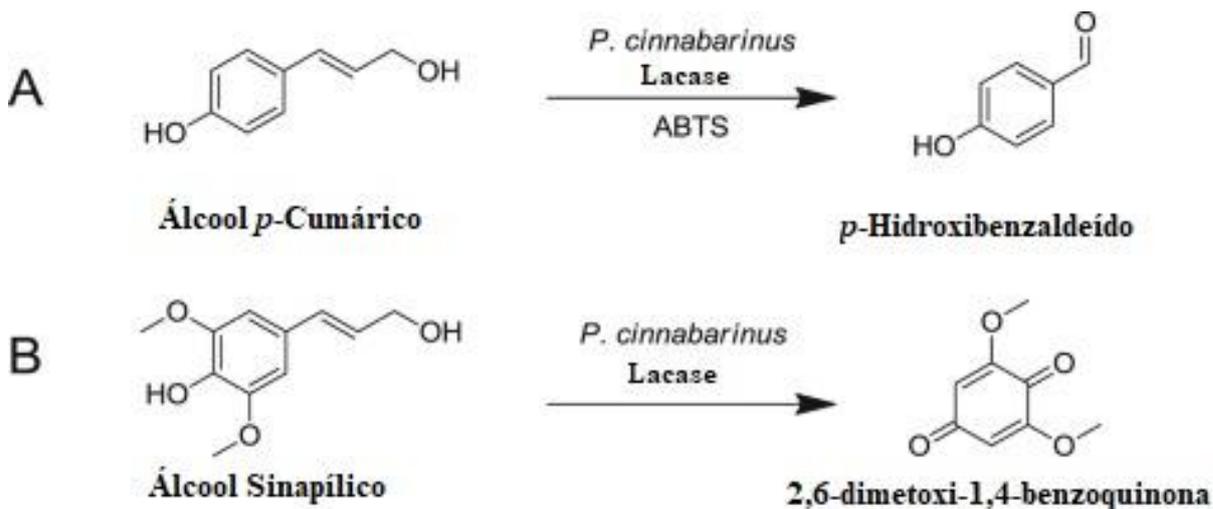
Fonte: Autoria própria

Como pode-se observar, os picos referentes a amostra Controle próximos do tempo de retenção de 5 minutos são os picos relacionados com o substrato, ou seja, com o licor rico em lignina. Uma pequena variação dos tempos de retenção desses picos pode estar relacionada com alguns fatores: coluna cromatográfica, oxidação e reação dos compostos fenólicos entre si. Os picos localizados próximos a 5 minutos de tempo retenção estão presentes na amostra Controle no início da fermentação e estão relacionados com as moléculas presentes no licor, ou seja, substrato da fermentação.

Nos cromatogramas referentes as amostras fermentadas pelos microrganismos, observa-se uma diminuição intensa com o passar do tempo em relação aos picos do substrato. Por outro lado, o conjunto de picos próximo aos 27 minutos de tempo retenção também está presente na amostra Controle e não diminui com o passar do tempo nas fermentações, podendo ser atribuído a peptona que foi adicionada no meio mineral e que não foi utilizada pelos microrganismos como fonte proteica, visto que nos cromatogramas referentes as amostras do meio fermentado com vinhaça não possuem tal pico (Figura 10). A diminuição da intensidade dos picos próximos a 5 minutos evidencia o consumo intenso dos substratos derivados do licor no meio de fermentação, entre o segundo e o quarto dia fermentação, alinhando com os resultados obtidos tanto para o perfil de pH quanto para a atividade enzimática. Observa-se que os novos picos formados possuem tempo de retenção menor que os picos referentes ao substrato (5 min), que

poder explicado pelo aumento da polaridade dos bioprodutos, que acabou resultando em uma menor interação com a coluna C-18, diminuindo seu tempo no interior da coluna e resultando em um menor tempo de retenção no cromatograma. Isso ocorreu pois a lacase atua como uma enzima oxidante: no processo de oxidação de compostos orgânicos ocorre dois fenômenos principais: diminuição de átomos de hidrogênio e aumento de átomos de oxigênio, como mostra o esquema simplificado da Figura 18.

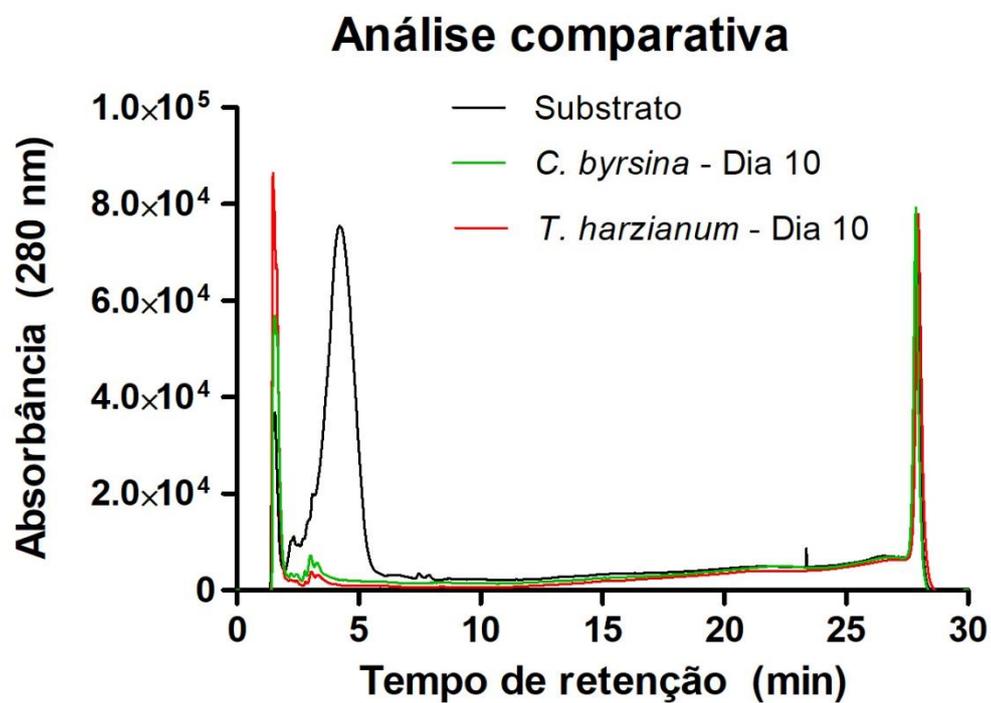
Figura 18. Esquema simplificado evidenciando a atuação da enzima lacase na oxidação de substratos fenólicos



Fonte: Adaptado de (TONIN et al., 2016)

A análise comparativa entre o cromatograma do substrato e dos extratos enzimáticos coletados ao final das fermentações e com a mesma escala de sinal (Figura 19), evidenciaram que o pico referente aos compostos fenólicos próximo ao tempo de retenção de 5 minutos foi completamente degradado para ambas as fermentações. Além disso, observou-se que a intensidade desse pico foi menor no meio mineral com relação ao meio contendo vinhaça, que já possui compostos fenólicos em sua composição. Outro fator importante foram os picos próximos a 27 minutos que apareceram no substrato e nos extratos enzimáticos, evidenciando que não houve a degradação desse composto, provavelmente peptona, durante a fermentação.

Figura 19: Cromatogramas do substrato e dos extratos enzimáticos ao final da fermentação em mesma escala - Meio Mineral



Fonte: autoria própria

5. Conclusão

Concluiu-se por meio dos experimentos realizados que os resíduos agroindustriais lignocelulósicos podem fornecer alternativas importantes no que diz respeito ao crescimento sustentável e são valiosos de acordo com os conceitos de economia verde. Assim, a combinação entre o bagaço-de-cana e os fungos filamentosos mostrou ter um potencial promissor no estudo envolvendo biodegradação e o cultivo de microrganismos, sendo capazes de degradarem substratos complexos, e abrindo espaço, assim, para estudos envolvendo biorrefinaria e biorremediação *in situ*. O licor, extraído do bagaço-de-cana por hidrólise alcalina, se mostrou um substrato promissor para a bioprodução de compostos sustentáveis. Além disso, provamos que a vinhaça também mostrou ser uma alternativa como meio de cultivo para suplementação de microrganismos, abrindo espaço para a utilização em crescimentos microbianos, possibilitando a obtenção de inúmeros bioprodutos de valor agregado.

Como perspectivas futuras a serem exploradas a partir dos resultados obtidos por esse estudo, deve-se analisar os bioprodutos gerados pelas fermentações por LC-MS/MS por meio do desenvolvimento de novas metodologias que permitam a melhor separação e análise dos compostos obtidos, uma vez que os cromatogramas obtidos utilizando detecção por absorção na região do UV-Vis mostraram-se pouco promissores no que se refere a identificação dos picos, em virtude principalmente da complexidade da matriz analisada.

Referências

ACHINIVU, E. C. Protic Ionic Liquids for Lignin Extraction-A Lignin Characterization Study. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p., 2018.

ANDERSON; STONE, M.; KATAHIRA, R.; REED, M.; MUCHERO, W.; RAMIREZ, K.; BECKHAM, G.; ROMAN-LESHKOV, Y. Differences in S/G ratio in natural poplar variants do not predict catalytic depolymerization monomer yields. **Nature Communications**, v. 10, n., p., 2019.

ANDERSON, E. M.; STONE, M. L.; KATAHIRA, R.; REED, M.; MUCHERO, W.; RAMIREZ, K. J.; BECKHAM, G. T.; ROMÁN-LESHKOV, Y. Differences in S/G ratio in natural poplar variants do not predict catalytic depolymerization monomer yields. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 2033, 2019.

AZADI, P.; INDERWILDI, O. R.; FARNOOD, R.; KING, D. A. Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, n., p. 506-523, 2013.

BALDRIAN, P. Fungal laccases - occurrence and properties. **FEMS Microbiol Rev**, v. 30, n. 2, p. 215-242, 2006.

BARUAH, J.; NATH, B. K.; SHARMA, R.; KUMAR, S.; DEKA, R. C.; BARUAH, D. C.; KALITA, E. Recent Trends in the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Value-Added Products. **Frontier Energy Research**, v. 6, n., p., 2018.

BUGG, T. D.; RAHMANPOUR, R. Enzymatic conversion of lignin into renewable chemicals. **Curr Opin Chem Biol**, v. 29, n., p. 10-17, 2015.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S.-T. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, n. 1, p. 81-87, 1995.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 7, p. 1412-1421, 2010.

CHIO, C.; SAIN, M.; QIN, W. Lignin utilization: A review of lignin depolymerization from various aspects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, n., p. 232-249, 2019.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; ESCHER, J. P.; CORREIA, J. E.; MARINHO, J. F. U.; FONTANETTI, C. S. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752-2761, 2013.

CUI, L.; WANG, Z.; ZENG, Y.; YANG, N.; LIU, M.; ZHAO, Y.; ZHENG, Y. Lignin Biodegradation and Its Valorization. **Fermentation**, v. 8, n., p. 366, 2022.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; SYED, T. A.; QIN, W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **Int J Biochem Mol Biol**, v. 1, n. 1, p. 36-50, 2010.

- DEL RÍO, J. C.; LINO, A. G.; COLODETTE, J. L.; LIMA, C. F.; GUTIÉRREZ, A.; MARTÍNEZ, Á. T.; LU, F.; RALPH, J.; RENCORET, J. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, n., p. 322-338, 2015.
- DOS SANTOS, M. B. C.; SCARPASSA, J. A.; MONTEIRO, D. A.; LADINO-ORJUELA, G.; DA SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Evaluation of the tolerance and biotransformation of ferulic acid by *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7. **Brazilian Journal of Microbiology**, v., n., p., 2021.
- FACKLER, K.; THYGESEN, L. G. Microspectroscopy as applied to the study of wood molecular structure. **Wood Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 203-222, 2013.
- FANG, X.; LI, Q.; LIN, Y.; LIN, X.; DAI, Y.; GUO, Z.; PAN, D. Screening of a microbial consortium for selective degradation of lignin from tree trimmings. **Bioresour Technol**, v. 254, n., p. 247-255, 2018.
- FLORENCE, I.; SUTANTO, H.; DARMAWAN, A. Antibacterial and antioxidant activities of pyrogallol and synthetic pyrogallol dimer. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v.22, n. 2, p.39-47, 2018
- GIESE, E.; DEKKER, R.; BARBOSA, A.; DE, M.; SILVA, M.; DA SILVA, R. Production of β -(1,3)-glucanases by *Trichoderma harzianum* Rifai: Optimization and Application to Produce Gluco-oligosaccharides from Paramylon and Pustulan. **Fermentation Technology**, v. 1, p. 1-5, 2011.
- GOMES, E.; AGUIAR, A. P.; CARVALHO, C. C.; BONFÁ, M. R. B.; SILVA, R. D.; BOSCOLO, M. Ligninases production by Basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 40, n., p. 31-39, 2009.
- HAN, M.-L.; YANG, J.; LIU, Z.-Y.; WANG, C.-R.; CHEN, S.-Y.; HAN, N.; HAO, W.-Y.; AN, Q.; DAI, Y.-C. Evaluation of Laccase Activities by Three Newly Isolated Fungal Species in Submerged Fermentation With Single or Mixed Lignocellulosic Wastes. **Frontiers Microbiology**, v. 12, 2021.
- IBRAHIM, V.; MENDOZA, L.; MAMO, G.; HATTI-KAUL, R. Blue laccase from *Galerina* sp.: Properties and potential for Kraft lignin demethylation. **Process Biochemistry**, v. 46, n., p. 379-384, 2011.
- IDRIS; RAMADHANI, I.; KANTI, A.; SUDIANA, I. M. Screening of potential lignin-degrading fungi from the tropical forest for lignocellulose biotreatment. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 308, n., p., 2019.
- JANUSZ, G.; PAWLIK, A.; SULEJ, J.; SWIDERSKA-BUREK, U.; JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; PASZCZYNSKI, A. Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. **FEMS Microbiol Rev**, v. 41, n. 6, p. 941-962, 2017.

JAVAID, R.; SABIR, A.; SHEIKH, N.; FERHAN, M. Recent Advances in Applications of Acidophilic Fungi to Produce Chemicals. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 786, 2019.

JIANG, Z.; ZHU, J.; LI, X.; LIAN, Z.; YU, S.; YONG, Q. [Determination of main degradation products of lignin using reversed-phase high performance liquid chromatography]. **Se Pu**, v. 29, n. 1, p. 59-62, 2011.

KANITSKAYA, L. V.; ROKHIN, A. V.; KUSHNAREV, D. F.; KALABIN, G. A. Chemical structure of wheat dioxane lignin studied by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. **Polymer Science Series A**, v. 40, n. 5, p. 459-463, 1998.

KHALIL, I.; QUINTENS, G.; JUNKERS, T.; DUSSELIER, M. Muconic acid isomers as platform chemicals and monomers in the biobased economy. **Green Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 1517-1541, 2020.

KIM, K. H.; JEONG, K.; ZHUANG, J.; JEONG, H. J.; KIM, C. S.; KOO, B.; YOO, C. G. Tandem conversion of lignin to catechols via demethylation and catalytic hydrogenolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 159, n., p. 113095, 2021.

KOCH, G.; ROSE, B.; PATT, R.; KORDSACHIA., O. Topochemical Investigations on Delignification of *Picea abies* [L.] Karst. during Alkaline Sulfite (ASA) and Bisulfite Pulping by Scanning UV Microspectrophotometry %J. v. 57, n. 6, p. 611-618, 2003.

LABAUZE, H.; CACHET, N.; BENJELLOUN-MLAYAH, B. Acid-based organosolv lignin extraction from wheat straw: Kinetic and structural analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 187, n., p. 115328, 2022.

LIU, Q.; LUO, L.; ZHENG, L. Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 335, 2018.

LINCE: Instrumentação e controle. Disponível em: <https://instrumentacaoecontrole.com.br/o-papel-da-instrumentacao-no-processo-fermentativo-da-usina-sucroalcooleira/>. Acesso: 09/03/2022.

LOURENÇO, A.; RENCORET, J.; CHEMETOVA, C.; GOMINHO, J.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RÍO, J. C.; PEREIRA, H. Lignin Composition and Structure Differs between Xylem, Phloem and Phellem in *Quercus suber* L. **Front Plant Sci**, v. 7, n., p. 1612, 2016.

MAGDALENA, F.; HANNULA, S.E.; BELKA, M.; JEDRYCZKA, M. Fungal Biodiversity and Their Role in Soil Health. **Frontiers Microbiology**, v. 9, n.707, 2018

MÄKI-ARVELA, P.; SALMI, T.; HOLMBOM, B.; WILLFÖR, S.; MURZIN, D. Y. Synthesis of Sugars by Hydrolysis of Hemicelluloses- A Review. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 9, p. 5638-5666, 2011.

MANISALIDIS, I.; STAVROPOULOU, E.; STAVROPOULOS, A.; BEZIRTZOGLU, E. Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review. v. 8, n., p., 2020.

MARGOT, J.; BENNATI-GRANIER, C.; MAILLARD, J.; BLÁNQUEZ, P.; BARRY, D.; HOLLIGER, C. Bacterial versus fungal laccase: Potential for micropollutant degradation. **AMB Express**, v. 3, n., p. 63, 2013.

MARINović, M.; NOUSIAINEN, P.; DILOKPIMOL, A.; KONTRO, J.; MOORE, R.; SIPILÄ, J.; DE VRIES, R. P.; MÄKELÄ, M. R.; HILDÉN, K. Selective Cleavage of Lignin β -O-4 Aryl Ether Bond by β -Etherase of the White-Rot Fungus *Dichomitus squalens*. **ACS Sustain Chem Eng**, v. 6, n. 3, p. 2878-2882, 2018.

MATE, D. M.; ALCALDE, M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. **Microbiology Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1457-1467, 2017.

MENEZES, C. B.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; MIQUELETTO, P. B.; PASSARINI, M. R.; SILVA, C. H.; JUSTO, M. R.; LEAL, R. R.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; BERLINCK, R. G.; SETTE, L. D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiol Res**, v. 165, n. 6, p. 466-482, 2010.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresour Technol**, v. 93, n. 1, p. 1-10, 2004.

NILE, S.; KO, E. S.; KIM, D.; KEUM, Y.-S. Screening of ferulic acid related compounds as inhibitors of xanthine oxidase and cyclooxygenase-2 with anti-inflammatory activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n., p., 2015.

PFEIFFER, T.; MORLEY, A. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. **Frontiers Molecular Bioscience**, v. 1, n. 17, p., 2014.

PHILLIPS, M.; GOSS, M. J. THE HYDROLYSIS OF LIGNIN WITH 12% HYDROCHLORIC ACID. **J Am Chem Soc**, v. 54, n. 8, p. 3374-3377, 1932.

POMETTO, A. L.; CRAWFORD, D. L. Effects of pH on Lignin and Cellulose Degradation by *Streptomyces viridosporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 246-250, 1986.

PROTHMANN, J.; SPÉGEL, P.; SANDAHL, M.; TURNER, C. Identification of lignin oligomers in Kraft lignin using ultra-high-performance liquid chromatography/high-resolution multiple-stage tandem mass spectrometry (UHPLC/HRMSn). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 29, p. 7803-7814, 2018.

RAHIMI, A.; AZARPIRA, A.; KIM, H.; RALPH, J.; STAHL, S. S. Chemoselective metal-free aerobic alcohol oxidation in lignin. **J Am Chem Soc**, v. 135, n. 17, p. 6415-6418, 2013.

RINALDI, R.; JASTRZEBSKI, R.; CLOUGH, M. T.; RALPH, J.; KENNEMA, M.; BRUIJNINCX, P. C. A.; WECKHUYSEN, B. M. Paving the Way for Lignin Valorisation: Recent Advances in Bioengineering, Biorefining and Catalysis. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 55, n. 29, p. 8164-8215, 2016.

ROCHA, G. J. M.; GONÇALVES, A. R.; OLIVEIRA, B. R.; OLIVARES, E. G.; ROSSELL, C. E. V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 274-279, 2012.

RODRIGUES REIS, C. E.; HU, B. Vinasse from Sugarcane Ethanol Production: Better Treatment or Better Utilization? **Frontiers Energy Research**, v. 5, n. 7, p., 2017.

RODRIGUEZ-COUTO, S. Industrial and environmental applications of white-rot fungi. **Mycosphere**, v. 8, n.3, p. 456-466, 2017.

ROSAZZA, J. P.; HUANG, Z.; DOSTAL, L.; VOLM, T.; ROUSSEAU, B. Review: biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product. **J Ind Microbiol**, v. 15, n. 6, p. 457-471, 1995.

SEESURIYACHAN, P.; KUNTIYA, A.; KAWEE-AI, A.; TECHAPUN, C.; CHAIYASO, T.; LEKSAWASDI, N. Improvement in efficiency of lignin degradation by Fenton reaction using synergistic catalytic action. **Ecological Engineering**, v. 85, n., p. 283-287, 2015.

SIBIKIN, I.; KARGER-KOCSIS, J. Toward industrial use of anionically activated lactam polymers: Past, present and future. **Advanced Industrial and Engineering Polymer Research**, v. 1, n. 1, p. 48-60, 2018.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. **Bioresour Technol**, v. 199, n., p. 76-82, 2016.

SPINA, F.; GEA, M.; BICCHI, C.; CORDERO, C.; SCHILIRÒ, T.; VARESE, G. C. Ecofriendly laccases treatment to challenge micropollutants issue in municipal wastewaters. **Environ Pollut**, v. 257, n., p. 113579, 2020.

TONIN, F.; MELIS, R.; CORDES, A.; SANCHEZ-AMAT, A.; POLLEGIONI, L.; ROSINI, E. Comparison of different microbial laccases as tools for industrial uses. **N Biotechnol**, v. 33, n. 3, p. 387-398, 2016.

UBANDO, A.; FELIX, C.; CHEN, W.-H. Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review. **Bioresour Technol**, v., n., p. 122585, 2020.

WAHBA, S. M. R.; DARWISH, A. S.; SHEHATA, I. H.; ABD ELHALEM, S. S. Sugarcane bagasse lignin, and silica gel and magneto-silica as drug vehicles for development of innocuous methotrexate drug against rheumatoid arthritis disease in albino rats. **Materials Science and Engineering: C**, v. 48, n., p. 599-610, 2015.

WARD, R. S.; JONES, R. 1.26 Polyurethanes and Silicone Polyurethane Copolymers. In: (Ed.). 2017, p.570-619.

WELLS, T.; RAGAUSKAS, A. J. Biotechnological opportunities with the β -ketoacid pathway. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 627-637, 2012.

WIERZBICKI, M. P.; MALONEY, V.; MIZRACHI, E.; MYBURG, A. A. Xylan in the Middle: Understanding Xylan Biosynthesis and Its Metabolic Dependencies Toward Improving Wood Fiber for Industrial Processing. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 176, p., 2019.

WILLIAMSON, J. J.; BAHRIN, N.; HARDIMAN, E. M.; BUGG, T. D. H. Production of Substituted Styrene Bioproducts from Lignin and Lignocellulose Using Engineered *Pseudomonas putida* KT2440. **Biotechnology Journal**, v. 15, n. 7, p. 1900571, 2020.

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

WU, W.; DUTTA, T.; VARMAN, A. M.; EUDES, A.; MANALANSAN, B.; LOQUÉ, D.; SINGH, S. Lignin Valorization: Two Hybrid Biochemical Routes for the Conversion of Polymeric Lignin into Value-added Chemicals. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8420, 2017.

VARGAS, J.A.; ORTEGA, J.O.; SANTOS, M.B.C.; METZKER, G.; GOMES, E.; BOSCOLO, M. A new synthetic methodology for pyridinic sucrose esters and their antibacterial effects against Gram-positive and Gram-negative strains. **Carbohydrate Research**, v. 489, 2020.

XIE, M.; ZHANG, J.; TSCHAPLINSKI, T. J.; TUSKAN, G. A.; CHEN, J.-G.; MUCHERO, W. Regulation of Lignin Biosynthesis and Its Role in Growth-Defense Tradeoffs. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1427, p., 2018.

XU, F. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. **J Biol Chem**, v. 272, n. 2, p. 924-928, 1997.

XU, Z.; LEI, P.; ZHAI, R.; WEN, Z.; JIN, M. Recent advances in lignin valorization with bacterial cultures: microorganisms, metabolic pathways, and bio-products. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 32, 2019.

YASUDA, S.; FUKUSHIMA, K.; KAKEHI, A. Formation and chemical structures of acid-soluble lignin I: sulfuric acid treatment time and acid-soluble lignin content of hardwood. **Journal of Wood Science**, v. 47, n. 1, p. 69-72, 2001.

YOO, C. G.; DUMITRACHE, A.; MUCHERO, W.; NATZKE, J.; AKINOSHO, H.; LI, M.; SYKES, R. W.; BROWN, S. D.; DAVISON, B.; TUSKAN, G. A.; PU, Y.; RAGAUSKAS, A. J. Significance of Lignin S/G Ratio in Biomass Recalcitrance of *Populus trichocarpa* Variants for Bioethanol Production. **ACS Sustain Chem Eng**, v. 6, n. 2, p. 2162-2168, 2018.

ZHANG, W.; REN, X.; LEI, Q.; WANG, L. Screening and Comparison of Lignin Degradation Microbial Consortia from Wooden Antiques. **Molecules**, v. 26, n. 10, p., 2021.

ZHU, D.; ZHANG, P.; XIE, C.; ZHANG, W.; SUN, J.; QIAN, W. J.; YANG, B. Biodegradation of alkaline lignin by *Bacillus ligniniphilus* L1. **Biotechnol Biofuels**, v. 10, n., p. 44, 2017.

ZIJLSTRA, D. S.; LAHIVE, C. W.; ANALBERS, C. A.; FIGUEIRÊDO, M. B.; WANG, Z.; LANCEFIELD, C. S.; DEUSS, P. J. Mild Organosolv Lignin Extraction with Alcohols: The Importance of Benzylic Alkoxylation. **ACS Sustain Chem Eng**, v. 8, n. 13, p. 5119-5131, 2020.