



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

PATRÍCIA MARINHO SAMPAIO ABREU

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS SOB AÇÃO DO FUNGO
PSILOCYBE CASTANELLA CCIBt 2781**

Campina Grande – PB

2014

PATRÍCIA MARINHO SAMPAIO ABREU

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS SOB AÇÃO DO FUNGO
PSILOCYBE CASTANELLA CCIBt 2781**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, na área de concentração de Recursos Regionais e Meio Ambiente.

Orientadora: Líbia de Sousa C. Oliveira

Campina Grande - PB

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

- A162p Abreu, Patrícia Marinho Sampaio.
Produção de enzimas lignocelulolíticas por fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais sob ação do fungo *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 / Patrícia Marinho Sampaio Abreu. – Campina Grande, 2014.
84 f.: il. color.
- Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2014.
- "Orientação: Prof.^a Dr.^a Líbia de Sousa Conrado Oliveira".
Referências.
1. Resíduos – Engenharia Química. 2. Lacase. 3. Endoglicanase. 4. *Psilocybe Castanella* CCIBt 2781. I. Oliveira, Líbia de Sousa Conrado. II. Título.

CDU 66.0:62-665.9(043)

PATRÍCIA MARINHO SAMPAIO ABREU

PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS SOB AÇÃO DO FUNGO *PSILOCYBE CASTANELLA* CCIBt 2781

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, na área de concentração de Recursos Regionais e Meio Ambiente.

Aprovação em 08 / 08 / 2014 .

Banca Examinadora

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

Profa. Dra. Glauciane Danusa Coelho
Examinador Interno - (UATEC/CDSA/UFCG)

Profa. Dra. Ângela Maria Santiago
Examinador Externo - (DEQ/CCT/UEPB)

Profa. Dra. Kátia Davi Brito
Examinador Externo - (IFPB – Campus Campina Grande)

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

Campina Grande - PB

2014

Para Pedro e Natália, dupla dinâmica!
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me proporcionou saúde, força e sabedoria e por não me deixar esquecer que tudo vale à pena.

Ao Pedro, gratidão pela oportunidade de ser MÃE e por não precisar de mais nada nessa vida para me sentir feliz e completa.

A Natália, Tati amada, minha eterna gratidão pela dedicação e amor com que me acompanhou. Mais que uma amiga, um anjo da guarda. Obrigadíssima, Tati!

A Genival e Aparecida, os melhores pais do mundo. Que como mãe, todos os meus atos sejam certos como os seus sempre foram. Obrigada por terem me ensinado a ser a pessoa que eu sou, por terem me passado a certeza de que temos que fazer sempre o melhor e por me mostrar que todas as coisas da vida passam ou podem ser consertadas.

Aos manos amados, Flora e Rogério. Não há um dia em que eu não sinta falta e que eu não seja grata por estar na mesma família que vocês e pelo tempo em que convivemos diariamente.

A Gê, companheiro querido. Amo você incondicionalmente.

A Líbia Conrado, por tantos ensinamentos acadêmicos, científicos e morais. Mais que uma orientadora, você sempre foi uma grande amiga.

A Glauciane, exemplo de gentileza e inteligência, pela confiança, orientação, apoio e amizade, que mesmo com tantos compromissos, sempre encontrou espaço na agenda para esclarecer nossas dúvidas.

A Lahyana, pela grande amizade e por tornar nossos dias cheios de trabalho e alegria. Sentirei falta de ver você.

A Amparo, mulher que sabe orientar seres humanos de um jeito espetacular, pelo apoio nos momentos mais difíceis.

As tias amadas, Edneide, Edméia e Salete, por sempre acreditarem no meu potencial.

A Alana, minha “irmãzinha torta”, pela amizade, companhia e força em todos os momentos.

A Adriana, que mesmo distante sempre está por perto.

Ao moço do carrinho da pamonha, Ivan, pela presteza em nos trazer as palhas de milho.

A Rebeca de Almeida, Bárbara Freire e Ravena Casemiro, pela contribuição tão bem vinda na finalização dos experimentos.

A Universidade Federal de Campina Grande, pela contribuição profissional.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, pela parceria.

A banca examinadora, pela cuidadosa contribuição.

Muitíssimo obrigada a todos que trabalharam comigo neste trabalho e tudo o que o envolve. Que fique registrada a minha Gratidão.

O fim de uma fase.

"A riqueza não é coisa material. Uma ideia capaz de contribuir para o bem-estar da humanidade é que é a riqueza. Recebo de Deus inúmeras boas ideias através das quais posso ser útil a humanidade, e recebo de Deus também os recursos materiais e os colaboradores necessários para concretizá-la."

A proteção da vitalidade, diversidade e beleza da Terra é um dever sagrado.

(Carta da Terra, 2000).

RESUMO

ABREU, P. M. S. Produção de enzimas lignocelulolíticas por fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais sob ação do fungo *Psilocybe castanella* CCIBt 2781. Dissertação de Mestrado, UFCG, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. Área de concentração: Recursos Regionais e Meio Ambiente, Campina Grande - PB, Brasil.

Este trabalho teve por objetivo produzir as enzimas lacase e endoglicanase (CMCase) por meio da fermentação em estado sólido (FES) utilizando resíduos agroindustriais sob ação do fungo *Psilocybe castanella* CCIBt 2781. O fungo foi previamente crescido em MEA 2% e inoculado em substratos a base de palha de milho verde suplementado com cana-de-açúcar e bagaço de coco verde suplementado com farinha de soja nas proporções adequadas para se obter C/N 90, mediadores óleo vegetal (1 mL), Tween 80 (0,1 mL), RBBR 2% (1 mL) e 70% de umidade a 28°C, por 60 dias. A extração enzimática foi feita em tampão acetato de sódio, pH 4,8. A atividade de lacase foi determinada pela oxidação do ABTS, e a atividade de endoglicanase determinada por meio da dosagem dos açúcares redutores produzidos na degradação enzimática da carboximetilcelulose (CMC). Obteve-se a produção de lacase pelo fungo *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 sob as diferentes condições de cultivo. Uma maior produtividade foi alcançada quando o meio foi suplementado com soja. O pico de atividade de lacase ocorreu em torno do 30º dia de fermentação (113,12 U/L), contendo coco como fonte de carbono, suplementado com soja como fonte de nitrogênio, sob ação de todos os mediadores. Para o substrato a base de milho e cana, os maiores valores de atividade, foi de 98,25 U/L em 60 dias, para o mesmo tratamento. A maximização da produção de endoglicanase (0,29 U/g) ocorreu apenas para o substrato a base de milho e cana, em 45 dias, sob a influência do corante têxtil RBBR. Esses resultados mostram que a bioconversão desses resíduos sob fermentação em estado sólido (FES) é uma forma viável de obtenção das enzimas lignocelulolíticas e possuem aplicabilidade na área biotecnológica. Os dados obtidos neste estudo permitiram também evidenciar a capacidade de *P. castanella* CCIBt 2781 de degradar o corante Azul Brilhante

Remazol R em meio de cultura utilizado, durante o intervalo de tempo de 45 dias, havendo total descoloração do corante após esse período.

Palavras-chave: Resíduos. Lacase. Endoglicanase. *Psilocybe castanella* CCIBt 2781.

ABSTRACT

ABREU, P. M. S. Production of enzymes lignocellulolytic by solid state fermentation of agro-industrial waste under the action of the fungus *Psilocybe castanella* CCIBt 2781. Dissertation, UFCG, Graduate Program in Chemical Engineering. Area of concentration: Area Resource and Environment, Campina Grande - PB, Brazil.

This study aimed to produce the enzymes laccase and endoglucanase (CMCase) by solid state fermentation (SSF) using agro-industrial residues by the action of the fungus *Psilocybe castanella* CCIBt 2781. Fungus was previously grown on 2% MEA substrates and inoculated into the background of green maize straw supplemented with sugar cane bagasse and coconut supplemented with soybean meal in the proper proportions to obtain C/N 90, mediators vegetable oil (1 ml), Tween 80 (0,1 mL), RBBR 2% (1 mL) and 70% humidity at 28°C for 60 days. The enzyme extraction was performed in sodium acetate buffer, pH 4,8. The laccase activity was determined by oxidation of ABTS, and the activity of endoglucanase determined by dosage of the reducing sugars produced in the enzymatic degradation of carboxymethylcellulose (CMC). Obtained the production of laccase by the fungus *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 under different culture conditions. A higher yield was achieved when the medium was supplemented with soy. The peak activity of laccase occurred around the 30th day of fermentation (113,12 U/L), containing coconut oil as carbon source, supplemented with soy as nitrogen source, under the action of all mediators. For the substrate from corn and sugarcane, the highest values of activity was 98,25 U/L in 60 days for the same treatment. Maximising production of endoglucanase (0,29 U/g) was observed only for the substrate from corn and sugar cane, in 45 days, under the influence of textile dye RBBR. These results show that the bioconversion of these wastes in solid state fermentation (SSF) is a feasible way of obtaining lignocellulolytic enzymes form and have applicability in biotechnology field. The results of this study also allowed to show the ability of *P. castanella* CCIBt 2781de degrade Remazol Brilliant Blue R dye in used culture medium during the time interval of 45 days, resulting in complete decolorization after this period.

Keywords: Waste. Laccase. Endoglycanase. *Psilocybe castanella* CCIBt 2781

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo da estrutura molecular dos principais constituintes do material lignocelulósico (parede celular vegetal secundária).....	22
Figura 2 – Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular.....	23
Figura 3 – Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses.....	24
Figura 4 – Estrutura da lignina.....	26
Figura 5 – Precursores da lignina. Clássica: p-cumaril (1), coniferílico (2), sinapílico (3). Acilado: derivados de álcool sinapil γ -esterificados com ácido acético (4) e p-cumárico (5).....	26
Figura 6 – Ciclo catalítico da lacase.....	42
Figura 7 – Matérias-primas utilizadas.....	48
Figura 8 – Etapas do processo de fermentação em estado sólido.....	52
Figura 9 – Colônia de <i>Psilocybe castanella</i> CCIBt 2781 em MEA (2%).....	53
Figura 10 – Sistema de cultivo de <i>P. castanella</i>	54
Figura 11 – Perfil cinético de produção de lacase em bagaço de coco verde e farinha de soja, na umidade inicial 70% a 28°C.....	61
Figura 12 – Perfil cinético de produção de lacase em farelo de palha de milho verde e bagaço de cana-de-açúcar, na umidade inicial 70% a 28°C.....	62
Figura 13 – Perfil cinético de produção de CMCase em palha de milho verde e bagaço de cana-de-açúcar, na umidade inicial 70% a 28°C.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição físico-química da palha de milho verde.....	31
Tabela 2 – Composição do bagaço da cana-de-açúcar – valores médios internacionais.....	33
Tabela 3 – Caracterização química da casca de coco verde.....	35
Tabela 4 – Percentual mássico dos componentes constituintes das amostras secas e livres de extraíveis do bagaço de coco.....	35
Tabela 5 – Composição química de farinha de soja integral.....	37
Tabela 6 – Valores médios e desvio padrão dos parâmetros analisados na caracterização físico-química dos resíduos.....	57
Tabela 7 – Efeito dos mediadores sobre o crescimento microbiano durante a fermentação do resíduo de palha de milho e cana-de-açúcar à temperatura de 28°C.....	59
Tabela 8 – Efeito dos mediadores sobre o crescimento microbiano durante a fermentação do resíduo de bagaço de coco verde e farinha de soja à temperatura de 28°C.....	60

ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
abs	Absorbância
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association Official Analytical Chemists
AR	Açúcares Redutores
ASTM	American Society for Testing Materials
a_w	Atividade de água
b.u.	Base úmida
b.s.	Base seca
C	Carbono
CCIBt	Coleção de Cultura do Instituto de Botânica
CCT	Centro de Ciências e Tecnologia
CDSA	Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Carboximetilcelulase
DNS	Ácido Dinitrosalicílico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EGs	Endoglicanases
FES	Fermentação em Estado Sólido
FSS	Fermentação Semissólida

Lac	Lacase
LEB	Laboratório de Engenharia Bioquímica
LiP	Lignina Peroxidase
Mapa	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MnP	Manganês Peroxidase
N	Nitrogênio
PET	Politereftalato de etila
PPGEQ	Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química
pH	Potencial Hidrogeniônico
RBBR	Azul Brilhante de Remazol R
UAEQ	Unidade Acadêmica de Engenharia Química
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
UNICA	União da Indústria de Cana-de-Açúcar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Objetivos	20
1.1.1. Objetivo geral.....	20
1.1.2. Objetivos específicos	20
1.2 Produção Bibliográfica	21
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1. Biomassa lignocelulósica	22
2.1.1. Celulose	24
2.1.2. Hemicelulose	24
2.1.3. Lignina	26
2.1.4. Pectinas	28
2.1.5. Outras substâncias	28
2.2. Resíduos lignocelulósicos utilizados como substrato.....	29
2.3. Relação C/N do substrato	30
2.3.1. Palha de milho verde	31
2.3.2. Bagaço de cana-de-açúcar.....	32
2.3.3. Bagaço da casca de coco verde	34
2.3.4. Soja.....	36
2.4. Fermentação em estado sólido (FES).....	38
2.4.1. Basidiomicetos ligninolíticos	39
2.4.2. Enzimas ligninolíticas.....	41
2.4.2.1. Lacases (Lac).....	41
2.4.3. Enzimas celulolíticas.....	44
2.4.3.1. Endoglicanases (EGs).....	45
2.5. Uso de mediadores como indicadores de atividade ligninolítica	45

2.6. Trabalhos desenvolvidos para produção de enzimas lignocelulolíticas	47
3. MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1. Local da realização do experimento.....	49
3.2. Preparação dos resíduos	49
3.3. Caracterização físico-química	50
3.3.1. Umidade	50
3.3.2. Cinzas.....	50
3.3.3. Extrativos	51
3.3.4. Lignina	51
3.3.5. Determinação de Holocelulose	52
3.3.6. Determinação de Alfacelulose	54
3.3. Determinação de Carbono Orgânico	55
3.3.4. Determinação de Nitrogênio total.....	55
3.4. Preparação dos substratos	56
3.5. Análise qualitativa do crescimento microbiano	57
3.6. Processo fermentativo	57
3.6.1. Microrganismo e inóculo	58
3.6.2. Preparação do sistema de cultivo, inoculação e incubação.....	59
3.6.2.1. Controle biótico.....	60
3.7. Extração das enzimas.....	60
3.7.1. Determinação das atividades enzimáticas.....	61
3.7.1.1. Lacase (Lac)	61
3.7.1.2. Endoglicanase (EGs)	62
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	63
4.1. Caracterização físico-química dos resíduos secos	63
4.2. Análise qualitativa do crescimento microbiano	65
4.3. Atividades enzimáticas.....	67

4.3.1. Lacase	67
4.3.2. CMCase	69
5. CONCLUSÃO	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, as atividades agroindustriais e a indústria de alimentos produzem grande quantidade de subprodutos, tais como bagaços, farelos, palhas, cascas e sementes. Aplicá-los em bioprocessos é viável, tendo em vista o seu baixo valor agregado, a grande disponibilidade e a elevada concentração de nutrientes, que tem potencial de uso para conversão por microrganismos na obtenção de produtos de alto valor agregado, como enzimas. Basicamente, esses subprodutos são constituídos de compostos lignocelulósicos, os quais são os recursos renováveis mais abundantes na natureza, sendo esses, constituídos majoritariamente de celulose, hemicelulose e lignina (CASTRO; PEREIRA, 2010; GALEMBECK et al., 2009).

Os fungos basidiomicetos são muito utilizados na biodegradação de resíduos industriais devido a sua habilidade em produzir enzimas, tais como as fenoloxidasas que são capazes de degradar e mineralizar compostos lignocelulolíticos, fenólicos e xenobióticos (PAZ et al., 2010). Foi utilizado o basidiomiceto *Psilocybe castanella* CCIBt 2781, pertencente à Coleção de Cultura do Instituto de Botânica (CCIBt) de São Paulo, com capacidade comprovada de produzir a enzima ligninolítica lacase.

A lacase é uma glicoproteína polifenoloxidase que contém cobre no seu sítio ativo e catalisa a redução de O_2 para água, com simultânea oxidação de substratos fenólicos. A catálise de substratos fenólicos e compostos modelos de lignina por lacase ocorrem via transferência de um elétron, conduzindo à geração de radicais fenoxila, que podem ser convertidos a quinonas (LEONOWICZ et al., 2001). A importância tecnológica das lacases é resultante da capacidade de catalisar a transformação de um grande número de compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos (DURÁN et al., 2002). Entre as aplicações das lacases incluem-se: a deslignificação, a biorremediação, o clareamento de vinho e sucos, melhoramento da panificação e a descoloração de corantes têxteis (WESENBERG et al., 2003), tratamento de resíduos líquidos (DURÁN e ESPOSITO, 2000). Nos últimos anos, tem sido evidenciado o potencial das lacases para o desenvolvimento de biosensores e de cátodos de hidrogênio em células de combustível (SHLEEV et al., 2005; COUTO e HERRERA, 2006).

Sendo os fungos, os principais microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas, a degradação de materiais lignocelulósicos pode ser feita através do uso de microrganismos que produzem enzimas específicas que hidrolisam a celulose, resultando, no fim do bioprocessamento, na molécula de glicose. A biodegradação da celulose é estimulada pelas enzimas celulolíticas, naturalmente, e as celulasas livres são produzidas por fungos e bactérias aeróbicas (SALES et al., 2010; BASSO et al., 2010). As enzimas celulolíticas se destacam no beneficiamento de produtos de indústrias têxteis, de papel, farmacêutica e alimentícia, dentre outras (ABDESHAHIAN et al., 2011; MALIK et al., 2010; OBEROI et al., 2010).

1.1 Objetivos

1.1.1. Objetivo geral

Produzir as enzimas lacase e endoglicanase (CMCase) por meio da fermentação em estado sólido (FES) utilizando os resíduos lignocelulósicos palha de milho verde suplementado com bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de casca de coco verde suplementado com farinha de soja, sob ação do fungo *Psilocybe castanella* CCIBt 2781.

1.1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar os resíduos quanto à umidade, cinzas, lignina, celulose, holocelulose, hemicelulose, extrativos, carbono e nitrogênio;
- Observar o crescimento do fungo *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 nos substratos (palha de milho verde suplementado com bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de casca de coco verde suplementado com farinha de soja);
- Avaliar a influência dos mediadores óleo de soja, Tween 80 e Azul Brilhante de Remazol R (RBBR) na produção de atividades lignocelulolíticas (lacase e endoglicanase) durante crescimento de *P. castanella* nos diferentes substratos;

- Determinar o potencial da linhagem fúngica em produzir as enzimas lignocelulolíticas lacase e endoglicanase (CMCase);
- Avaliar a correlação da atividade lignocelulolítica e o crescimento da biomassa micelial.

1.2 Produção Bibliográfica

Esta Dissertação de Mestrado deu origem, até o momento, ao seguinte trabalho:

Trabalho completo a ser publicado em anais de congresso

ABREU, P. M. S., CUNHA, L. R. de F.; OLIVEIRA, L. de S. C.; COELHO, G. D.; OLIVEIRA, B. F. de; OLIVEIRA, R. C. *Produção de enzimas lignocelulolíticas por fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais sob ação de fungo basidiomiceto*. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014, Florianópolis, Santa Catarina. Anais do XX COBEQ, 2014.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Biomassa lignocelulósica

Os compostos lignocelulósicos são os principais componentes para os bioprocessos, uma vez que a fermentação no estado sólido (FES) se destaca, sendo utilizada na obtenção de diversos produtos com grande importância comercial (GALEMBECK et al., 2009; ROSSI et al., 2009).

A lignocelulose é o principal componente estrutural das plantas e representa a principal fonte de matéria orgânica renovável na terra. Ela pode ser encontrada na parede celular, e é composto por celulose, hemicelulose e lignina, além de ácidos orgânicos, sais e minerais (PANDEY et al., 2000).

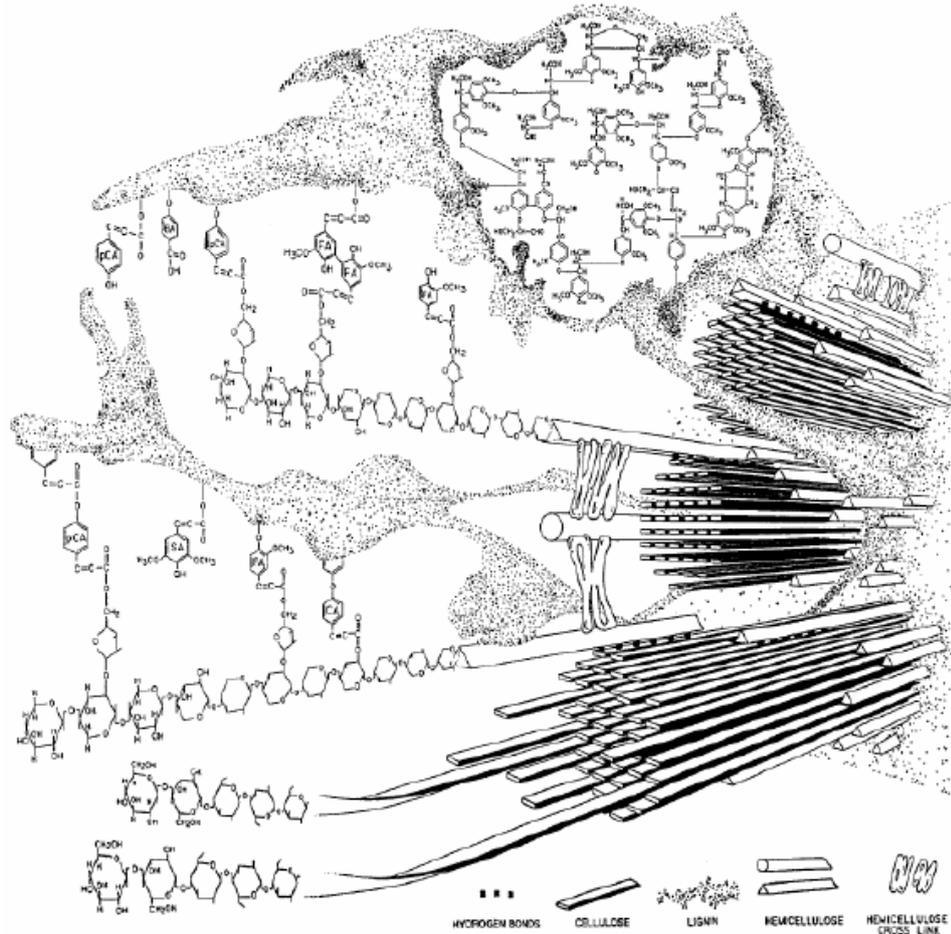
É importante enfatizar que materiais lignocelulósicos também incluem os resíduos agrícolas (palhas, caules, espigas, bagaços, cascas), resíduos industriais, resíduos sólidos urbanos e resíduos domésticos (lixo e esgoto) (MTUI, 2009). Estimativas apontam que anualmente são produzidos em todo o mundo cerca de 20 a 50 bilhões de toneladas de material lignocelulósico, dos quais apenas quatro bilhões de toneladas são efetivamente utilizados para fins agroindustriais. Entretanto, recomenda-se que estes materiais tenham um aproveitamento mais racional (BON et al., 2008).

Os resíduos lignocelulósicos, majoritariamente, são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina, apresentando baixo teor de nitrogênio. A proporção percentual desses componentes depende do tipo de material, idade e estágio vegetativo. Em média, a lignocelulose consiste de 45% de celulose, 30% de hemicelulose e 25% de lignina (GLAZER e NIKAIDO, 2007).

Dados mostram que o crescimento acentuado do consumo mundial de energia proveniente de recursos fósseis agravou o problema da poluição atmosférica, tornando-se cada vez mais evidentes as mudanças climáticas provocadas pelo efeito estufa, um fenômeno causado pela crescente poluição da atmosfera com gases que contêm dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) e outras substâncias. Nesse sentido, além do alto custo do petróleo e o esgotamento eminente desses recursos em algumas décadas, a obtenção de combustíveis a partir de fontes renováveis, como a biomassa lignocelulósica, tem despertado grande interesse nos últimos anos (HAMELINCK et al., 2005 ; PRASAD et al., 2007).

A Figura 1 apresenta um modelo da estrutura molecular dos principais constituintes do material lignocelulósico.

Figura 1 - Modelo da estrutura molecular dos principais constituintes do material lignocelulósico (parede celular vegetal secundária).



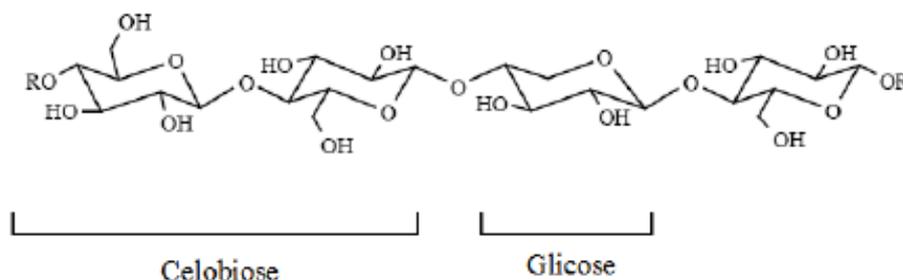
Fonte: BIDLACK et al., 1992.

Como pode ser observado na figura, os componentes são arranjados de modo que as cadeias de celulose e hemicelulose sejam fixadas pela lignina. As cadeias de celulose se mantêm compactadas através de ligações de hidrogênio que promovem a rigidez da planta, enquanto que a lignina circundante “gruda” os componentes e age como uma barreira física pra o ataque de microrganismos e água. Por sua vez, a hemicelulose proporciona a ligação entre a celulose e a lignina formando assim a rede fibrosa.

2.1.1. Celulose

A celulose é um polímero natural, sendo o principal constituinte dos materiais lignocelulósicos. É um homopolissacarídeo linear formado por unidades do monossacarídeo β -D-glicose ligadas por enlaces glicosídicos $\beta(1,4)$, de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$. Pontes de hidrogênio intra e intermoleculares são formadas entre longas cadeias de celulose originando microfibrilas cristalinas insolúveis em água (FENGER e WEGENER, 1989). A unidade estrutural do polímero de celulose é chamada de celobiose, consistindo em duas moléculas de anidroglicose (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular.



Fonte: FENGER e WEGENER, 1989.

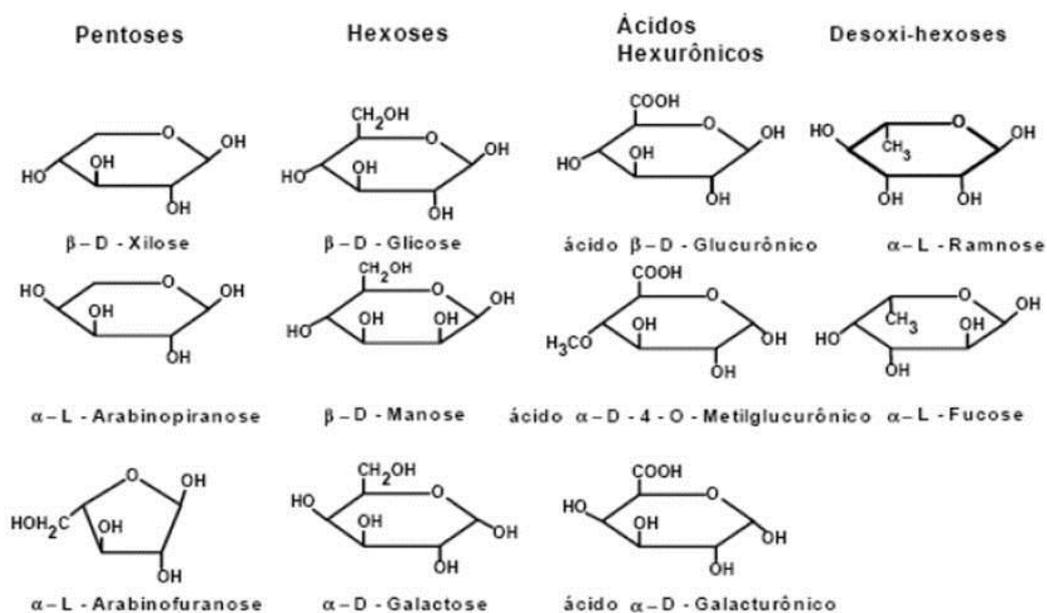
Apesar de ser quimicamente simples, existe uma complexa gama de formas físicas da celulose devido principalmente à diversidade de origem e aos processamentos tecnológicos subsequentes a que a biomassa celulósica é sujeita. A descrição destes substratos inclui propriedades como o tamanho, a forma, a porosidade, o grau de polimerização, a área superficial, a associação com compostos não celulósicos, a conformação molecular e cristalinidade, sendo todos eles relevantes para o processo de hidrólise (BEGUIN e AUBERT, 1994).

2.1.2. Hemicelulose

As polioses ou hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas, concentrando-se principalmente nas camadas primária e secundária, onde estão intimamente associadas à celulose e lignina. Cerca de 30%

dos polissacarídeos que constituem a parede celular dos vegetais referem-se a hemicelulose, sendo portanto, um carboidrato abundante na natureza (DA SILVA et al., 1997; HON e SHIRAIISHI, 1991). As unidades de açúcares que formam as hemiceluloses podem ser subdivididas em grupos, tais como pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e desoxi-hexoses (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses.



Fonte: FENDEL e WEGENER, 1989.

De maneira geral, as hemiceluloses diferem da celulose principalmente por sua constituição em diferentes unidades de açúcares, formando cadeias moleculares curtas e bastante ramificadas. Embora sejam ambas constituídas por açúcares, existem importantes diferenças de comportamento reacional entre as hemiceluloses e a celulose, devido, principalmente, a estrutura física. As hemiceluloses são totalmente amorfas e, portanto, menos resistentes ao ataque de agentes químicos. Embora não haja evidências de que a celulose e as hemiceluloses estejam ligadas quimicamente, as ligações de hidrogênio e a interpenetração física existente entre elas tornam a sua separação quantitativa impossível. A presença de hemicelulose junto à celulose resulta em importantes propriedades para as fibras, contribuindo para o intumescimento, a mobilidade interna e o aumento da flexibilidade das fibras (BIANCHI, 1995).

2.1.3. Lignina

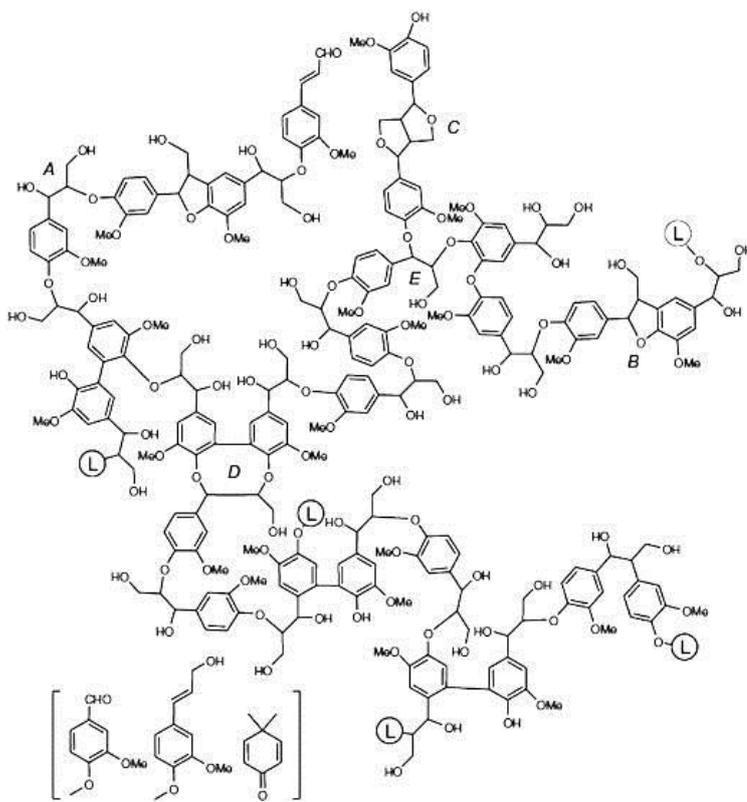
Depois da celulose, a lignina é o segundo polímero mais abundante na parede celular das plantas, fornecendo rigidez.

A parede celular lignificada pode ser vista como um complexo, com microfibrilas de celulose e hemicelulose, e a lignina como uma “matriz plástica” conferindo resistência ao material lignocelulósico.

A lignificação da parede celular é um processo controlado individualmente para cada célula, sendo a lignina o último polímero a ser depositado na parede celular, surgindo inicialmente nos cantos das células após a deposição da celulose na parede secundária, que ocorre depois do término do processo de alongamento das células e quando começa o espessamento da parede secundária. A deposição da lignina prossegue pela lamela média, pela parede primária e continua na parede secundária, até a formação da parede terciária (FENGEL e WEGENER, 1989). A interação entre a lignina, celulose e hemicelulose determinam a ultraestrutura da parede celular dos materiais lignocelulósicos.

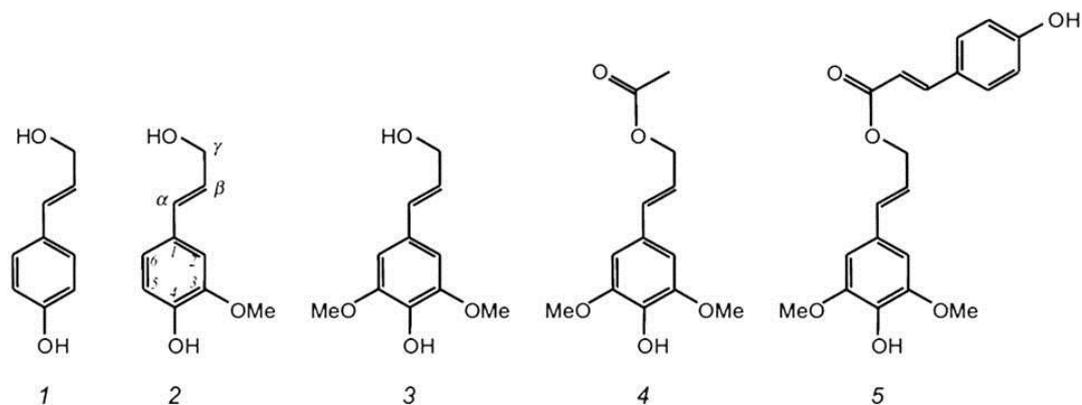
Do ponto de vista químico, a lignina é um composto heterogêneo, de alto peso molecular, de estrutura irregular, altamente insolúvel e recalcitrante (Figura 4). Este biopolímero é formado pela polimerização oxidativa de três precursores fenilpropanóides monoméricos: álcool sinapílico (propanol siringil), álcool coniferílico (propanol guaiacil) e álcool cumarílico (propanol phidroxifenil) (Figura 5), unidos entre si, e com os polissacarídeos da parede celular, por ligações éter e carbono-carbono. A proporção destes monômeros pode variar entre espécies de plantas, sendo as ligações β -O-4 as mais frequentes (JEFFRIES, 1994; HOFRICHTER, 2002; ÖNNERUD et al., 2002).

Figura 4 – Estrutura da lignina.



Fonte: Ruiz-Dueñas e Martínez, 2009.

Figura 5 – Precursores da lignina. Clássica: p-cumaril (1), coniferílico (2), sinapílico (3). Acilado: derivados de álcool sinapil γ -esterificados com ácido acético (4) e p-cumárico (5).



Fonte: Ruiz-Dueñas e Martínez, 2009.

Apesar de vários dos seus aspectos necessitarem ser investigados, a degradação da lignina pode ser entendida como um processo multienzimático resultante da ação coordenada de uma série de enzimas intra e extracelulares, do grupo das oxidoredutases (representadas por peroxidases, lacases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio) e de metabólitos intermediários de baixa massa molecular (LEONOWICZ et al., 1999; SHAH; NERUD, 2002; CANTARELLA et al., 2003).

2.1.4. Pectinas

As pectinas constituem o componente principal da lamela média da parede vegetal. São as frações mais facilmente extraíveis da parede celular, apresentando propriedades de gel.

São uma complexa família de polissacarídeos constituídos basicamente por ácido poligalacturônico e, em menor quantidade, ramnose, arabinose e galactose (BRETT e WALDRON, 1996). A pectina é formada por um esqueleto de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações $\alpha(1,4)$. A cadeia de poligalacturônico está interligada por resíduos de ramnose unidas por ligações $\alpha(1,2)$. Estes resíduos de ramnose podem ter unido a si largas cadeias laterais de L-arabinose e D-galactose. Em algumas pectinas, as cadeias laterais podem finalizar no ácido ferúlico unidos na posição O-3 da arabinose ou na O-2 da galactose (ANDERSEN, 2007).

2.1.5. Outras substâncias

Há ainda outras substâncias presentes na biomassa lignocelulósica, que não são parte da parede celular, sendo a maioria, solúvel em solventes neutros. Os compostos solúveis em solventes neutros ou frações extraíveis correspondem de 4-10% do peso seco da madeira. Incluem uma diversidade de compostos como os terpenos, que são polímeros de isopreno; as resinas, que incluem grande variedade de compostos não voláteis como óleos, ácido graxos, álcoois, resinas ácidas, fitosterol, dentre outros; e os fenóis, que apresentam como representante

principal os taninos. Dentro desta fração de extraíveis podem-se incluir carboidratos de baixo peso molecular, alcalóides e lignina solúvel (KLINKE et al., 2004).

Nas frações não extraíveis encontram-se parte das cinzas, resíduos inorgânicos, principalmente carbonatos alcalinos, alcalinos terrosos e oxalatos, que permanecem depois de queimar o substrato a elevadas temperaturas, e representam aproximadamente 2% do peso seco das madeiras (KLASS, 1998). A proporção destes componentes estruturais nos resíduos agrícolas e em madeiras depende da espécie, idade, condições de crescimento, entre outros fatores.

2.2. Resíduos lignocelulósicos utilizados como substrato

Agrícolas, industriais, florestais e resíduos sólidos urbanos são abundantes fontes de lignocelulose disponíveis em todo o mundo que, ainda são tratados como resíduos em muitos países (DASHTBAN et al., 2009).

No Brasil, segundo dados citados por Ferreira-Leitão et al. (2010), a agroindústria de milho (13.767.400 ha), cana-de-açúcar (7.080.920 ha), arroz (2.890.930 ha), mandioca (1.894.460 ha), o trigo (1.853.220 ha), frutas cítricas (930.591 ha), coco (283.205 ha) e grama (140 mil ha) ocupa coletivamente uma área de 28.840.726 ha e gera 597 milhões de toneladas de resíduos por ano.

A escolha por um substrato específico para o cultivo em estado sólido, leva em consideração vários fatores, principalmente relacionados ao custo e viabilidade, e o efeito desse substrato na fisiologia do fungo em relação à degradação do xenobiótico (LAMAR e WHITE, 2001). Visto que, muitos materiais lignocelulósicos são descartados como resíduos, a escolha dos resíduos foi feita em função da grande disponibilidade desses resíduos gerados na região e com o objetivo de agregar valor a esses resíduos e minimizar o impacto ambiental causado pelo acúmulo destes no ambiente. Além disso, podem também ser empregados como suplementos em meios para crescimento de fungos de podridão branca estimulando a produção de enzimas na fermentação sólida.

No contexto da discussão apresentada, foram privilegiados os resíduos agroindustriais: farelo de palha de milho verde, bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de casca de coco verde. A farinha de soja foi empregada como suplemento (fonte de nitrogênio) em meio para crescimento do fungo *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 contendo coco como fonte de carbono (energia).

2.3. Relação C/N do substrato

As necessidades nutricionais dos microrganismos são diversas, visto que apresentam diferenças inerentes na sua capacidade de sintetizar os constituintes celulares a partir de nutrientes simples. A demanda por água, fontes de energia, carbono, nitrogênio e elementos minerais, assim como o acesso/utilização de oxigênio, entretanto, é comum a todos os microrganismos.

A escolha da fonte de carbono é muito importante devido ao fato da síntese de diversas biomoléculas estar sujeita à repressão catabólica. Por exemplo, para muitas espécies de fungos a glicose é um repressor da produção de lacase e, quando utilizada como fonte de carbono, a formação de lacases somente tem início quando diminui a concentração de açúcar no meio (GALHAUP et al., 2002a).

Da mesma forma, a fonte de nitrogênio deve ser escolhida com bastante critério. Entre as fontes encontram-se: extrato de levedura (rico em vitaminas do complexo B e aminoácidos); licor da maceração do milho (subproduto da industrialização do milho, fonte bem balanceada em carbono, nitrogênio, enxofre e sais minerais, contendo ainda vitaminas, como riboflavina, niacina, ácido pantotênico, biotina e piridoxina); farinha de soja (resíduo da indústria de produção de óleo de soja, rico em nitrogênio, o qual é, entretanto, mais complexo e de mais difícil assimilação do que o nitrogênio do licor da maceração do milho) (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

As condições de limitação de nitrogênio são naturais para os fungos de podridão branca, pois a madeira é pobre neste nutriente. Além disso, a degradação de diversos grupos de compostos por basidiomicetos, tem mostrado ser dependente do sistema que degrada lignina, que em alguns microrganismos é expresso sob condições limitantes de nutrientes (carbono, nitrogênio ou enxofre). Isso é observado em *P. chrysosporium*, onde o mecanismo que degrada a lignina ocorre durante o metabolismo secundário, sendo desencadeado pela limitação desses nutrientes (REDDY et al. 1998, REDDY e GOLD, 2000). Assim sendo, a relação C/N do substrato utilizado como suporte para o inóculo tem papel significativo na degradação por fungos de podridão branca (LAMAR e WHITE, 2001). Suplementação de nitrogênio, com farinha de cereais, por exemplo, pode ser feita nos substratos e dependendo do fungo estudado, podendo melhorar seu

crescimento (MATHEUS e BONONI, 2002; MATHEUS et al. 2003, SILVA et al. 2005).

Em estudo dirigido à relação C/N do substrato utilizado para *P. castanella*, Matheus e Bononi (2002), mostraram que a suplementação do bagaço de cana-de-açúcar com farinha de soja e adição de óleo vegetal em níveis adequados interferiu, em alguns casos de forma positiva, na degradação de poluentes por esse fungo.

2.3.1. Palha de milho verde

Representante da família *Poaceae*, gênero *Zea*, botanicamente denominado *Zea mays L.*, sendo, portanto, da mesma espécie do milho cultivado para a produção de grãos, o milho verde atinge seu ponto de colheita quando seus grãos apresentam-se no estado leitoso, com 70 a 80% de umidade (PEREIRA FILHO, 2003).

Os vários tipos de milho apresentam diferentes conteúdos de açúcares, teores e qualidade de proteína e também no tipo, forma e concentração de amido (MAGALHÃES; DURÃES; CARNEIRO, 2002). Enquanto o milho-verde comum apresenta 3% de teor de açúcar e 60 a 70% de teor de amido, o milho doce apresenta de 9 a 14% de açúcar e 30 a 35% de amido.

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). A parede celular medida pela fibra em detergente neutro ocupa a maior proporção (cerca de 80%) da matéria seca dos componentes químicos da palha. Esta fração é constituída por celulose, hemicelulose e lignina, na proporção aproximada de 40%, 30% e 12% da matéria seca, respectivamente (QUEIROZ et al., 1998; TOLERA e SUNDSTOL, 2000).

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

A Tabela 1 apresenta a composição química da palha de milho verde.

Tabela 1 – Composição físico-química da palha de milho verde.

Componente	%
Lignina solúvel	5,35
Lignina insolúvel	8,79
Lignina total	14,14
Holocelulose	57,49
Celulose	41,18
Extrativos	28,53
Polioses	16,31
Cinzas	1,52
Umidade	12,96

Fonte: SALAZAR et al., 2005.

2.3.2. Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), uma gramínea originária do sudeste asiático, foi introduzida no Brasil pelos portugueses no início do século XVI, e tem seu cultivo em regiões tropicais e subtropicais do país. Sendo uma planta da família *Poaceae*, tem como principais características a forma da inflorescência (espiga), o crescimento do caule em colmos, folhas com lâminas de sílica em suas bordas e bainha aberta. Desde a sua origem até os dias atuais ela vem passando por modificações, o que resultou em várias espécies, as quais diferem entre si principalmente quanto ao conteúdo de fibras e açúcares. A maior parte da cana-de-açúcar cultivada é um híbrido multiespecífico, recebendo a designação de *Saccharum spp.*

A composição de cana varia de acordo com muitos fatores, tais como o processo de extração, a variedade de cana e composição do solo. Geralmente, ela é constituída por cerca de 32-44% de celulose, 27-32% de hemicelulose e de 19-24% de lignina (MALHERBE e CLOETE, 2002; HOWARD et al., 2003). Este resíduo

apresenta pequenas quantidades de outros compostos, tais como pectina, proteínas, sais minerais e compostos de baixo peso molecular, além de terem menor teor de cinzas (aproximadamente 2,4%), o que representa uma grande vantagem para a bioconversão de microrganismos, quando comparado com outros resíduos, tais como arroz e palha de trigo, o qual contém cerca de 17,5 e 11% de cinzas, respectivamente. Além disso, quando comparado com outros resíduos agroindustriais, o bagaço pode ser considerado um rico reservatório de energia devido ao seu alto rendimento e capacidade de regeneração anual (PANDEY et al., 2000).

A despeito da estrutura, a cana consiste de vários tipos de tecidos, tais como o córtex (ou casca), tecido parenquimatoso e hastes fibrovasculares. O córtex é composto de fibras muito lignificadas, sendo caracterizado pela espessura da parede celular, comprimento e rigidez de suas fibras. Este tecido confere proteção contra os efeitos mecânicos externos, servindo de suporte para a planta. A parte interior do talo é constituída por um tecido parenquimatoso (medula) de caráter não fibroso, o qual possui como principal função o armazenamento do suco adocicado produzido pela planta. Dentro deste tecido, encontram-se as hastes fibrovasculares, compostas de fibras curtas e vasos que atuam na sustentação e condução dos alimentos e outros produtos ao longo da planta (PATURAU, 1989).

A Tabela 2 apresenta a composição média do bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 2 – Composição do bagaço da cana-de-açúcar – valores médios internacionais.

Tipo	Holocelulose*	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas
Total	70,5	36,0	26,0	20,0	2,2
Fibra	71,5	41,0	27,5	20,5	1,2
Medula	71,0	33,5	29,0	21,0	3,2

*Holocelulose indica a fração total de carboidratos do material da planta que fica depois da remoção da lignina.

Fonte: PATURAU, 1989.

O Brasil é atualmente o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, responsável por 590 milhões de toneladas por ano, safra 2012/2013 (UNICA – Disponível em: <http://www.unicadata.com.br>). Cerca de 90% da produção brasileira é

colhida principalmente no Estado de São Paulo que é responsável por 60%. O bagaço de cana-de-açúcar representa o maior percentual de resíduos do setor agroindustrial brasileiro, com uma média de 75 milhões de toneladas/ano (TEIXEIRA et al., 2007). O bagaço é o subproduto da moagem, processo através do qual é separado do caldo de cana, rico em açúcares. Após a extração do caldo, do qual são produzidos o açúcar e o álcool etílico, o bagaço que sobra é em parte queimado para a geração de energia elétrica e térmica para os processos industriais (HASSUANI et al., 2005).

Devido ao excedente de bagaço e a legislação que restringe gradualmente a queima da palha no campo, o que deverá atuar positivamente para que este resíduo seja incorporado ao sistema de geração de energia nos próximos anos, foi estimado que as usinas de açúcar e álcool podem liberar de 30 a 50% do bagaço produzido para usos alternativos. O bagaço de cana-de-açúcar pode também ser empregado como suplemento em meios para crescimento de fungos de podridão branca estimulando a produção de enzimas ligninolíticas (PANDEY et al., 2000; ARORA e GILL, 2001).

2.3.3. Bagaço da casca de coco verde

O coqueiro (*Cocos nucifera L.*) é talvez a árvore mais conhecida dos trópicos e uma das mais importantes economicamente, sendo o seu fruto utilizado como fonte de alimentação e bebida. É cultivado e utilizado na Índia e na Ásia Continental há pelo menos 3000 anos e chegou ao Brasil pela colonização portuguesa (PINO, 2005). Chegou ao Brasil em 1553, na Bahia, a bordo das embarcações portuguesas, provenientes das ilhas de Cabo Verde.

O fruto do coqueiro é constituído por albúmen líquido (água-de-coco), albúmen sólido ou amêndoa, endocarpo e casca. A casca representa em torno de 80% do peso total do fruto, sendo composta pelo mesocarpo (fibra e pó) e epicarpo (camada mais externa da casca). A alta umidade, cerca de 85%, e as características da fibra do coco verde reduzem seu aproveitamento em relação a casca do coco maduro. Atualmente, existem projetos para a utilização da fibra de coco como carga para o politereftalato de etila (PET). Na indústria da borracha, também possui vasto número de projetos envolvendo produtos ecológicos diversos, desde a utilização da

fibra do coco maduro e verde na confecção de solados de calçados, até encostos e bancos de carros.

A casca de coco verde, subproduto do uso e da industrialização da água de coco, é depositada em lixões e às margens de estradas. Sendo um material de difícil decomposição, a utilização da casca do coco verde processada, além da importância econômica e social, é também importante do ponto de vista ambiental. Segundo Rosa et al. (2001) 80% a 85% do peso bruto do coco verde é considerado lixo. As fibras das cascas de coco possuem grande durabilidade, atribuída ao alto teor de lignina (41 a 45%), quando comparadas com outras fibras naturais. Têm percentual menor de celulose, entretanto a quantidade de lignina é muito grande, conferindo-lhe então, um comportamento singular frente às outras fibras. O teor de lignina nas fibras varia em função da idade do fruto (VAN DAM et al., 2004).

A composição química da casca de coco depende de vários fatores que influenciam o crescimento da planta e a produção do fruto, entre estes fatores encontram-se a fonte, a época do ano, a quantidade de chuvas. Na Tabela 3 são apresentados os resultados de uma análise química típica da casca de coco verde.

Tabela 3 – Caracterização físico-química da casca de coco verde.

Elemento	g/kg	mg/kg
N	6,52	-
P	1,42	-
K	11,5	-
Ca	6,8	-
Mg	1,79	-
Na	12,5	-
Fe	1,97	-
Cu	-	6,6
Zn	-	31,8
Mn	-	23,8
M.O. ¹	-	72,58

M.O.¹ Matéria orgânica em percentagem

Fonte: ROSA et al., 2001.

A Tabela 4 apresenta 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.

2.3.4. Soja

A soja (*Glycine max (L.) Merrill*), atualmente cultivada, é muito diferente dos ancestrais que lhe deram origem: espécies de plantas rasteiras que se desenvolviam na costa leste da Ásia, principalmente ao longo do Rio Amarelo, na China. No Brasil, a soja foi introduzida na Bahia em 1882 e levada para São Paulo em 1891. No Rio Grande do Sul foi cultivada pela primeira vez em 1900 e em 1940, ocorreu o início da expansão desta cultura no estado. Na década de 1980 foi introduzida na região dos Cerrados, tornando-se a cultura anual de maior área plantada no país (EMBRAPA, 2004).

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 importantes alternativas para alimentação humana e animal em função de seu elevado teor de proteínas (TOLEDO et al., 2007).

O Brasil é o segundo produtor mundial de soja, mas é o quarto maior produtor de óleo e farelo. Esta diferença é explicada pelo “mix” exportado no complexo soja: mais soja em grão é direcionada ao mercado externo proporcionalmente ao farelo. A

indústria nacional transforma, por ano, cerca de 30,7 milhões de toneladas de soja, produzindo 5,8 milhões de toneladas de óleo comestível e 23,5 milhões de toneladas de farelo protéico, contribuindo para a competitividade nacional na produção de carnes, ovos e leite. Além disso, a soja e o farelo de soja brasileiros possuem alto teor de proteína e padrão de qualidade Premium, o que permite sua entrada em mercados extremamente exigentes como os da União Europeia e do Japão.

A soja também se constitui em alternativa para a fabricação do biodiesel, combustível capaz de reduzir em 78% a emissão dos gases causadores do efeito estufa na atmosfera. O cultivo de soja no Brasil se orienta por um padrão ambientalmente responsável, com o uso de práticas de agricultura sustentável que permitem o uso intensivo da terra e com menor impacto ambiental, reduzindo a pressão pela abertura de novas áreas e contribuindo para a preservação do meio ambiente (Mapa, 2013).

Na tabela 5 observa-se a composição química da farinha de soja, a qual constitui alto teor de proteína, atuando como fonte de nitrogênio para o crescimento microbiano.

Tabela 5 – Composição físico-química de farinha de soja integral.

Componente	%
Proteína	40,5
Óleo (incluindo lecitinas)	20,5
Umidade	6,6
Fibra	2,3
Cinzas	4,5
Carboidratos	25,6

Fonte: PRINGLE, 1974.

2.4. Fermentação em estado sólido (FES)

Fermentação em estado sólido ou fermentação semissólida (FSS) pode ser definida como o cultivo de microrganismos numa matriz insolúvel sólida, na presença de água suficiente para suportar o crescimento microbiano. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (RAIMBAULT, 1998).

A FES é tida como o mais antigo processo fermentativo usado pelo homem, apresentando as seguintes características: a fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes, além de servir como suporte para o crescimento das células microbianas; o ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, deve atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas. O substrato não deve apresentar aglomeração das suas partículas individuais; o crescimento microbiano ocorre em condições mais próximas às dos habitats naturais; o meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão completamente acessíveis ao microrganismo (PINTO et al., 2005).

De todos os parâmetros que influenciam o processo fermentativo, a água apresenta papel de destaque na FES, em virtude do seu elevado grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida e está relacionada a dois parâmetros. O primeiro, a umidade, diz respeito à porcentagem de água na massa total do meio; o segundo, a atividade de água (a_w), um parâmetro termodinâmico relacionado ao potencial químico da água, ou seja, à quantidade de moléculas de água disponíveis nas vizinhanças imediatas das partículas do substrato. Para o entendimento da FES, a umidade tem se mostrado menos elucidativa que a atividade de água, pois esta última afeta diretamente o crescimento microbiano e a síntese de metabólitos (GERVAIS; MOLIN, 2003).

Os substratos para FES são, em geral, resíduos ou subprodutos da agroindústria. Farelos, cascas, bagaços e outros são materiais considerados viáveis para a biotransformação. São recursos naturais renováveis e produzidos em grandes quantidades, o que, algumas vezes, faz com que se tornem um problema ambiental. Como já fora mencionado, a estrutura desses materiais tem como seus principais componentes celulose, hemicelulose, lignina, pectina e proteínas, o que os

caracteriza como materiais extremamente heterogêneos, e que servem tanto como fonte de carbono e energia quanto de suporte para o crescimento microbiano (PANDEY, 2003).

Considerando-se o grande potencial do Brasil para a produção agrícola, há uma grande geração de resíduos ou subprodutos agroindustriais. Nesse sentido, a fermentação em estado sólido se apresenta como uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para os resíduos gerados, diminuindo possíveis problemas ambientais, bem como, de agregar valor a essas matérias-primas, por meio da produção de substâncias de interesse econômico como enzimas, e com isso contribuir para uma maior diversificação do agronegócio nacional (PANDEY et al., 2001).

A fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais tratados com fungos de degradação branca pode aumentar a digestibilidade da matéria seca, além de incrementar o conteúdo protéico do substrato fermentado. Este tipo de fermentação é mais adequado para o cultivo deste microrganismo devido ao seu desenvolvimento micelial (GUTIERREZ-CORREA; TENGEDY, 1997).

2.4.1. Basidiomicetos ligninolíticos

O grupo dos basidiomicetos inclui os fungos que produzem esporos (basidiósporos) de origem sexuada em uma estrutura especializada denominada de basídio e popularmente chamados de cogumelos e orelhas-de-pau. A fase vegetativa dos basidiomicetos é denominada micélio, que por sua vez é formado por muitos filamentos septados chamados hifas (GUGLIOTTA; CAPELARI, 1998).

Os basidiomicetos ligninolíticos secretam enzimas que convertem os polímeros externos em moléculas menores, que são assimiladas e utilizadas como nutrientes. Os fungos decompositores da madeira podem ser classificados em grupos ecofisiológicos: causadores de podridão branca, de podridão parda e de podridão mole. Ao lado de outros microrganismos, atuam na decomposição da matéria orgânica, dinamizando a ciclagem de nutrientes e regulando o equilíbrio energético dos ecossistemas terrestres (TUOMELA et al., 2000). Além disso, estes

organismos parecem ser os únicos capazes de mineralizar a molécula de lignina presente na madeira (KIRK; FARRELL, 1987; LEONOWICZ et al., 1999; SHAH; NERUD, 2002).

Há várias espécies de fungos da podridão branca da madeira, sendo a maioria deles os basidiomicetos ligninolíticos, além de alguns ascomicetos. Os fungos basidiomicetos causadores da podridão branca ou basidiomicetos ligninolíticos, atacam a madeira dura (*hardwood*) ou madeira mole (*softwood*), enquanto os ascomicetos provavelmente degradam unicamente madeira dura. A degradação da lignina por basidiomicetos ligninolíticos é mais rápida que quaisquer outros organismos e eles são responsáveis pela maior parte da degradação da lignina na natureza. Entretanto, o substrato de crescimento não é unicamente lignina, mas também hemiceluloses e celulose (KIRK; FARRELL, 1987; BLANCHETTE, 1995). Sabidamente, a lignina não funciona como fonte primária de carbono e energia para os fungos basidiomicetos. Para sua degradação há necessidade de uma fonte de carbono adicional que funciona como um co-substrato.

De acordo com Silva (2004) muitos basidiomicetos ligninolíticos desenvolvem-se em meios simples que tenham disponibilidade de carbono assimilável, nitrogênio e fontes de fósforo e sais minerais necessários. Mas para meios formulados a partir do bagaço de cana-de-açúcar e soja, como é o caso desta pesquisa, é preciso utilizar suplementação com outros materiais, contendo elementos essenciais para obtenção do crescimento do fungo.

Outra aplicação dos basidiomicetos lignocelulolíticos está relacionada com a biodegradação de substâncias químicas recalcitrantes à degradação biológica no meio ambiente, devido a capacidade desses organismos de degradar diversas moléculas poluentes como pesticidas clorados (DDT), dioxinas (2,3,7,8 – tetraclorodibenzo-p-dioxina), hidrocarbonetos aromáticos (benzo- α -pireno), além de bifenilas policloradas, pentaclorofenol e hexaclorobenzeno. Nesse sentido, tem sido largamente estudada a utilização desses fungos em processos de biorremediação de materiais, como solo, resíduos e efluentes industriais, contaminados com substâncias recalcitrantes à degradação biológica (MATHEUS et al., 2000).

2.4.2. Enzimas ligninolíticas

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

A decomposição da lignina é indispensável para a reciclagem do carbono, uma vez que é a mais abundante fonte renovável de polímero aromático na natureza. Devido à sua estrutura complexa e heterogênea, a lignina é quimicamente recalcitrante à degradação pela maioria dos organismos. Apenas os basidiomicetos, fungos de podridão branca, são capazes de degradar a lignina de forma eficiente, produzindo uma variedade de enzimas extracelulares oxidativas que atuam em sinergia. Entre essas enzimas, os principais grupos incluem as fenoloxidasas e peroxidases (WONG, 2009).

2.4.2.1. Lacases (Lac)

Descrita pela primeira vez por Yoshida em 1883, a lacase é uma das primeiras enzimas já descritas (SHLEEV et al., 2005). As lacases são enzimas capazes de catalisar a oxidação de vários compostos aromáticos, principalmente fenóis, com a concomitante redução do oxigênio à água (DURÁN et al., 2002). São glicoproteínas extracelulares que possuem quatro átomos de cobre no sítio ativo (MAYER; STAPLES, 2002; WESENBERG et al., 2003).

A lacase era conhecida somente para eucariotos (fungos, plantas superiores e insetos), mas há evidência de sua distribuição em procaríotos, e a primeira estrutura cristalina de uma lacase bacteriana foi obtida. Em plantas, lacases estão envolvidas na lignificação. Em fungos, além da degradação de lignina, as lacases parecem estar envolvidas na esporulação, produção de pigmentos e patogenicidade de plantas. Em insetos, lacase catalisa a união oxidativa de catecóis com proteínas envolvidas na esclerotização da cutícula (YAVER et al., 1996; ENGUITA et al., 2003; CLAUS, 2004). A importância biotecnológica das lacases aumentou a partir da descoberta da habilidade destas enzimas oxidarem substratos de alto potencial

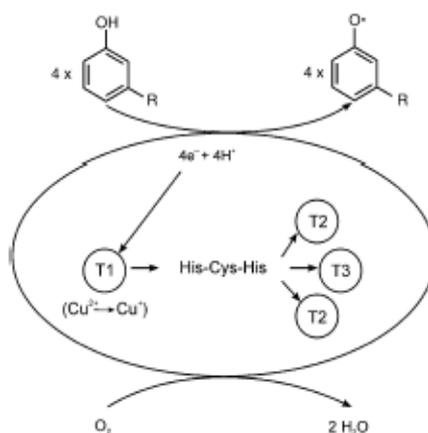
redox na presença de mediadores (BOURBONNAIS; PAICE, 1990; MARTÍNEZ et al., 2005). Entre as aplicações das lacases estão a deslignificação, a biorremediação, o clareamento de vinho e sucos (MAYER; STAPLES, 2002), descoloração de corantes têxteis (WESENBERG et al., 2003) e o tratamento de resíduos líquidos (DURÁN e ESPOSITO, 2000). Tem sido também evidenciado o potencial das lacases para o desenvolvimento de biosensores e de cátodos de hidrogênio em células de combustível (SHLEEV et al., 2005; COUTO; HERRERA, 2006).

As propriedades bioquímicas e físico-químicas da lacase (atividade, estabilidade, pH e temperatura ótimos, etc.) fornecem muitas informações iniciais importantes para estudos básicos e para a aplicação de lacases na biotecnologia (MOUGIN et al., 2003).

Para a atividade catalítica de lacase são necessários quatro átomos de cobre por unidade de proteína ativa, distribuídos entre diferentes sítios de ligação: 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 à 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; NERUD, 2002).

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 sequência fortemente conservada do tripeptídeo His-Cys-His, aos sítios T2 e T3, onde o oxigênio molecular é reduzido à água conforme apresentado na Figura 6 (BALDRIAN, 2006).

Figura 6 - Ciclo catalítico da lacase.



Fonte: BALDRIAN, 2006.

Baldrian (2006) analisou cerca de uma centena de lacases de fungos causadores da podridão branca purificadas, e entre elas verifica-se que o pH ótimo de reação, tendo ABTS como substrato, está na faixa ácida (abaixo de 4). A temperatura ótima de reação dessas enzimas está na faixa de 50 a 70°C, sendo que em poucos casos as lacases apresentaram temperatura ótima abaixo de 45°C.

A presença de isoformas de lacase é bem comum entre basidiomicetos. Isoformas de lacases de mesma origem podem apresentar diferentes propriedades bioquímicas, apesar das estruturas primárias destas proteínas serem muito similares. No entanto, existem casos em que as propriedades bioquímicas das lacases são similares enquanto as estruturas primárias mostram-se diferentes, mesmo sendo elas provenientes do mesmo organismo (SHIN; LEE, 2000). Na verdade, ainda não é claro se basidiomicetos possuem vários genes que codificam lacase, ou se a diversidade de isoenzimas deve-se a modificações pós transcricionais e/ou a proteólise, que pode acontecer durante processos de cultivo e purificação (SHLEEV et al., 2005).

2.4.3. Enzimas celulolíticas

A celulase refere-se a classe de enzimas que são produzidas essencialmente por fungos, bactérias e protozoários e catalisam a hidrólise da celulose. Surgiram como subprodutos da Segunda Guerra Mundial, depois de constatado que o excessivo desgaste de roupas e equipamentos nas selvas do Pacífico Sul, em 1944, se dava devido ação de microrganismos, o *Trichoderma viride* (atualmente denominado de *T. reesei*), um fungo capaz de converter celulose em seus monômeros (ERENO, 2007; HASSUANI, 2005; FENGEL; WEGENER, 1989). Só então na década de 60, descobriu-se que preparados de enzimas extracelulares eram responsáveis pela ação hidrolítica.

Sendo os fungos, os principais microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas, a degradação de materiais lignocelulósicos pode ser feita através do uso de microrganismos que produzem enzimas específicas que hidrolisam a celulose, resultando, no fim do bioprocessamento, na molécula de glicose (SANTOS e GOUVEIA, 2009). A biodegradação da celulose é estimulada pelas enzimas celulolíticas, naturalmente, e as celulases livres são produzidas por fungos e bactérias aeróbicos (SALES et al., 2010; BASSO et al., 2010). As enzimas celulolíticas se destacam no beneficiamento de produtos de indústrias têxteis, de papel, farmacêutica e alimentícia, dentre outras (ABDESHAHIAN et al., 2011; MALIK et al., 2010; OBEROI et al., 2010).

Embora existam discordâncias entre alguns autores, relacionadas com a especificidade das diferentes celulases e o seu modo de ação, é geralmente reconhecida a existência de três tipos de celulases nos sistemas completos: endoglicanases, exoglicanases ou celobiohidrolases e β -glicosidase ou celobiase.

Muitos substratos são utilizados com o objetivo de se obter grandes quantidades de enzimas celulolíticas por microrganismos. Os resíduos agroindustriais podem ser devidamente moídos ou triturados para servir como fonte de nutrientes, principalmente de carbono, em uma fermentação (DA SILVA et al., 1994). Na maioria dos casos, o simples enriquecimento destes compostos com fonte de nitrogênio, minerais ou vitaminas é suficiente para produção de elevada atividade enzimática (BISARIA; GHOSE, 1984; ELISASHVILI, 1993).

2.4.3.1. Endoglicanases (EGs)

As enzimas endoglicanases realizam quebras aleatórias nas regiões amorfas internas da cadeia de celulose, ou seja, regiões desordenadas hidratadas e flexíveis, gerando oligossacarídeos de vários comprimentos (BOISSET et al., 2000). São assim, antes de qualquer coisa, responsáveis pela diminuição do grau de polimerização das cadeias celulósicas. Conseqüentemente, as novas extremidades da cadeia de celulose são suscetíveis à ação da celobiohidrolase (LYND et al., 2002).

2.5. Uso de mediadores como indicadores de atividade ligninolítica

Embora existam bastantes pesquisas sobre a fisiologia das enzimas ligninolíticas, o mecanismo de degradação da lignina não está completamente compreendido. Essa dificuldade está relacionada 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 os cofatores de baixas massas moleculares que servem como mediadores de óxido - redução – mediadores redox (MESTER; TIEN, 2000), os níveis de H_2O_2 e os radicais hidroxilas produzidos pelos fungos (HAMMEL et al., 2002; SHAH; NERUD, 2002).

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. Em conjunto com mediadores, a lacase torna-se capaz de degradar também estruturas não fenólicas da lignina (BOURBONNAIS et al., 1996, CALL; MÜCKE, 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, 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).

O uso de corantes, como indicadores de atividade ligninolítica, foi sugerido a partir de evidências que corantes poliméricos atuavam como substrato de enzimas ligninolíticas. Apresenta vantagens por serem estáveis, solúveis, de baixo custo e obtidos facilmente em sua forma pura. Além disso, têm baixa toxicidade aos microrganismos, permitem desenvolvimento de ensaios espectrofotométricos simples, rápidos e quantitativos.

Azul Brilhante de Remazol R (RBBR) é um corante sintético utilizado como matéria-prima na fabricação de corantes poliméricos. É derivado do antraceno, organopoluente recalcitrante, que representa uma importante classe de poluentes, muitas vezes tóxica (SOARES et al., 2001). Trabalhos demonstram que a descoloração do corante RBBR está relacionada, pelo menos parcialmente, com a ação de enzimas ligninolíticas, como a lacase (DEVECI et al. 2004, PALMIERI et al. 2005).

Mtui e Nakamura (2004) em trabalho de seleção de basidiomicetos com capacidade em degradar lignina utilizando o RBBR, observaram que os fungos capazes de oxidá-los produziram lacase. Assim, correlacionaram a descoloração do RBBR e a oxidação dos substratos orgânicos recalcitrantes utilizados com a degradação da lignina e de compostos xenobióticos.

A produção de lacases também pode ser estimulada pela adição de detergentes (POINTING et al., 2000). Surfactantes não-iônicos, como o Tween-80, têm sido utilizados para aumentar a viabilidade das reações entre as enzimas e seus respectivos substratos (POZDNYAKOVA et al., 2004). Kuhad et al. (1994) constataram um aumento de 30% na produção de celulases pelo *Fusarium oxysporum* na presença desse detergente. Segundo Pardo et al. (2000) a produção de xilanases e celulases por *Thecotheus pelletieri* não foi afetada pela adição do surfactante. Entretanto, Brucato e Wong (1994) constataram uma inibição da produção de enzimas extracelulares pelo *Penicillium funiculosum* na presença desse detergente.

2.6. Trabalhos desenvolvidos para produção de enzimas lignocelulolíticas

Valeriano et al. (2009) obtiveram atividade máxima de 2019 U/L e 1035 U/L para lacase quando o fungo *Pynoporus sanguineus* foi cultivado em meio contendo 2,5-xilidina e etanol como substrato indutor, respectivamente.

Giese et al. (2004) estudaram a influência dos Tweens 80, 60, 40 e 20 na produção de lacases pelo *Botryosphaeria sp.* usando dois substratos diferentes, o ABTS (PPO-I) e o DMP (PPO-II). Foi observado que todos os Tweens estudados aumentaram a produção das lacases (PPO-I). Os Tweens 60 e 20 aumentaram a produção da lacase (PPO-II) indutiva, enquanto que os Tweens 80 e 40 não causaram nenhum efeito.

Trabalhos demonstram que a descoloração do corante RBBR está relacionada, pelo menos parcialmente, com a ação de enzimas ligninolíticas como a lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase (DEVECI et al., 2004; PALMIERI et al., 2005).

Ballaminut e Matheus (2007) avaliaram a descoloração do corante RBBR (1 mg/L) e a atividade enzimática da lacase de *L. crinitus* durante 30 dias de crescimento. O fungo cresceu em bagaço de cana-de-açúcar suplementado com farinha de soja e amido solúvel e obtiveram, no 10º dia de incubação, atividade de lacase com 17,59 U/L.

Yamanaka et al. (2007) constataram a influência do corante RBBR sobre a atividade de lacases produzidas por *Psilocybe castanella*, onde este, na ausência do corante, foi capaz de produzir 25 U/L em 15 dias de cultivo, e na presença, produziu cerca de 100 U/L desta atividade enzimática aos 12 dias de cultivo.

Farinas (2011) estudou substratos como farelo de soja, bagaço de cana, bagaço de laranja, casca de arroz e farelo de trigo para produção de celulasas com *Aspergillus niger*. A autora encontrou atividades de CMCase em torno de 1 U/g utilizando bagaço de cana como substrato.

Abdelnasser et al. (1997) testaram três linhagens fúngicas *Phanerochaete chrysosporium* NRRL 6359, *Phanerochaete chrysosporium* NRRL 6361 e *Coriolus versicolor* NRRL 6102, quanto à capacidade de produzir xilanase e celulase, em resíduos agrícolas (bagaço de cana tratado e não tratado, palha de trigo, espigas de milho, cascas de arroz e celulose em pó) e observaram que espigas de milho, palha de trigo e bagaço de cana tratado promoveram maior indução enzimática.

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.

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*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local da realização do experimento

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

3.2. Preparação dos resíduos

Os resíduos, utilizados como matérias-primas foram, farelo de palha de milho verde, bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de casca de coco verde. A farinha de soja foi utilizada como fonte de nitrogênio.

A Figura 7 mostra a aparência das matérias-primas utilizadas nos experimentos.

Figura 7 – Matérias-primas utilizadas.



Foto: Patrícia Marinho.

Os resíduos, com exceção da farinha de soja, foram secos em estufa, com circulação de ar forçada a 55°C até atingir a massa constante, sendo posteriormente triturados em moinho de facas e forrageira, no caso da casca de coco verde, e autoclavados a 121°C e 1 atm por 1 h. Em seguida foram homogeneizados e

submetidos à técnica do quarteamento para a retirada de aproximadamente 150 g para a realização da caracterização físico-química. O restante dos resíduos foram armazenados em sacos de polietileno com sistema de fechamento hermético, o qual chamou-se de biomassa/resíduo seco.

3.3. Caracterização físico-química

3.3.1. Umidade

A determinação do teor de umidade dos materiais foi realizada seguindo-se a metodologia descrita em BRASIL (2005). Foram pesados 2 g do material em cadinhos de porcelana previamente secos e tarados. Em seguida, pôs-se as amostras na estufa a 105°C por 24 horas. Após a secagem, o material foi colocado no dessecador, no qual permaneceu até resfriamento total da amostra e em seguida, pesou-se. O cálculo da umidade (%U), em base úmida, foi realizado usando a Equação 1:

$$\% U = \frac{(M1 - M2)}{M1} \times 100 \quad (1)$$

Onde, M1 = Massa inicial da amostra (g)

M2 = Massa final da amostra (g)

3.3.2. Cinzas

Determinou-se o teor percentual de cinzas seguindo a metodologia descrita em BRASIL (2005). Colocou-se 3 g de amostra em cadinhos de porcelana e levou-se a estufa a 105°C por 2 horas. Em seguida, foram colocados na chapa elétrica a fim de realizar a pré-queima para facilitar a combustão na mufla. Os cadinhos foram então colocados na mufla a 550°C por 5 horas, foram retirados e transferidos para um dessecador até total resfriamento e só então foram pesados (AOAC, 1975).

O cálculo do teor de cinzas (%C) foi realizado usando a Equação 2:

$$\%C = \frac{M2}{M1} \times 100 \quad (2)$$

Onde, M1 = Massa inicial da amostra (g)

M2 = Massa final da amostra (g)

3.3.3. Extrativos

A determinação do teor de extrativos presentes 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.

3.3.4. 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 (L_I) foi filtrada empregando um cadinho de Gush, com kitassato, acoplado a uma bomba de vácuo, sendo posteriormente seca e pesada. A lignina solúvel (L_S) foi determinada medindo-se a absorvância nos comprimentos de onda de 280 e 215 nm do filtrado e o cálculo é feito com base na Equação 3.

$$L_I(g/L) = \frac{4,53 (abs_{215\text{ nm}} - abs_{245\text{ nm}})}{300} \quad (3)$$

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 4.

$$L_T(g) = L_I + L_S \quad (4)$$

3.3.5. Determinação de Holocelulose

Em um erlenmeyer de 500 mL, adicionou-se cerca de 3 g do material vegetal, sem umidade nem extrativos, e com seu conteúdo de holocelulose a ser determinado. A seguir, adicionou-se 120 mL de água destilada. Em uma capela de exaustão, preparou-se um banho-maria que mantivesse a temperatura constante a $70 \pm 2^\circ\text{C}$. Ao erlenmeyer, acrescentou-se 2,5 g de clorito de sódio (NaClO_2), com pureza aproximada de 80%, e 1 mL de ácido acético glacial, com pureza $\geq 99,85\%$. O conjunto erlenmeyer-reagentes foi tampado e mergulhado no banho, aquecido por uma hora e mantido sobre um agitador magnético ligado. Após esse tempo, adicionou-se 2,5 g de clorito de sódio e 1 mL de ácido acético, e deixou-se por mais uma hora. Em seguida, adicionou-se 2,5 g de clorito de sódio e 1 mL de ácido acético, e prosseguiu-se com o aquecimento em banho por mais três horas. Ao longo do aquecimento, ocorre a elevação de cloro, como pôde ser notado pela formação de um gás amarelo-esverdeado dentro do erlenmeyer.

Durante as cinco horas de aquecimento e degradação oxidativa da lignina, foi providenciado gelo e água gelada suficientes para a realização de um banho de gelo, que cobrisse até além da altura do conteúdo do erlenmeyer. O recipiente permaneceu nesse banho de gelo por 30 minutos.

Enquanto isso, preparou-se a aparelhagem de filtração na capela de exaustão. A massa do funil de vidro sinterizado foi medida e o funil, colocado sobre um kitassato de 1 L, usando-se um conector. Por fim, conectou-se uma bomba de vácuo ao kitassato para iniciar a filtração.

O conteúdo do balão foi transferido para o funil, com uma agitação constante para evitar a perda de precipitado no interior do funil. Com água destilada, lavou-se o erlenmeyer e transferiu-se o conteúdo para o funil, tanto para não ocorrerem perdas de holocelulose, quanto para lavar o material recolhido. O precipitado recolhido no funil foi enxaguado até que o filtrado tivesse um pH próximo ao da água utilizada. Verificando-se a proximidade da neutralidade, fez-se uma lavagem com um pequeno volume, de cerca de 10 mL a 20 mL de acetona ou de metanol, seguida de mais um enxague com bastante água destilada.

O funil, então, foi levado para uma estufa a 105°C e seco até adquirir massa constante. Apesar das variações que ocorrem para diferentes materiais, pôde-se indicar um tempo de 18 horas como um parâmetro inicial para a secagem, e, a partir dele, realizar adaptações de metodologia. Após a secagem, levou-se o conjunto funil-holocelulose ao dessecador por pelo menos 30 minutos, até atingir a temperatura ambiente, e mediu-se a massa do funil somada à massa de holocelulose, em uma balança analítica.

Com base na massa do funil limpo e seco (MF); na massa da amostra (MA); e na massa do funil somada à massa de holocelulose, após a secagem em estufa (MFH), pode-se calcular o teor de holocelulose (TH%), conforme a Equação 5:

$$\% TH = \frac{MFH - MF}{MA} \times 100 \quad (5)$$

3.3.6. Determinação de Alfacelulose

Pesou-se cerca de 1 g da holocelulose seca obtida, colocando-se em um almofariz, à temperatura ambiente. Adicionou-se 15 mL de uma solução de NaOH a 17,5%, aguardou dois minutos de contato entre a solução e a celulose, e, então, começou-se a triturar o material por oito minutos. Terminado esse tempo, adicionou-se 40 mL de água destilada ao almofariz, e transferiu-se o conteúdo, quantitativamente, para o funil.

O conteúdo do almofariz foi transferido para o funil com uma agitação constante, para evitar a perda de precipitado no interior do instrumental. Lavou-se bem o almofariz com água destilada, transferindo-se para o funil. O precipitado recolhido no funil foi enxaguado até que o filtrado tivesse um pH próximo ao da água utilizada.

O funil foi levado para uma estufa a 105°C, e seco até adquirir massa constante. Após a secagem, colocou-se o conjunto funil-holocelulose em um dessecador, por pelo menos 30 minutos, para atingir a temperatura ambiente, e mediu-se a massa do funil somada à massa de alfacelulose, em uma balança analítica.

Com base na massa do funil limpo e seco (MF); na massa da amostra de holocelulose (MAH); e na massa do funil somada à massa de alfacelulose, após a secagem em estufa (MFA), pode-se calcular o teor de alfacelulose (TA%), conforme a Equação 6:

$$\% TA = \frac{MFA - MF}{MAH} \times 100 \quad (6)$$

Conhecendo-se os valores de holocelulose e de alfacelulose, pode-se então, por meio do cálculo da diferença, determinar o teor de hemicelulose.

3.3. Determinação de Carbono Orgânico

A determinação de carbono orgânico foi realizada segundo o método BRASIL (2005), utilizando-se a seguinte Equação 7:

$$\%CO = \frac{\%MO}{f} \quad (7)$$

Onde, f é o fator de conversão de C para matéria orgânica, face ao conceito de que o teor de C da matéria orgânica do solo é igual a 58%, sendo então igual a 1,724 (EMBRAPA, 1999);

% MO, o teor de matéria orgânica, determinado por:

$$\%MO = \frac{(M1 - M2)}{M1} \times 100 \quad (8)$$

Onde, $M1 = \%U =$ amostra úmida (g)

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

3.3.4. Determinação de Nitrogênio total

O teor de nitrogênio total (%N) foi determinado pelo método semi-micro Kjeldahl adaptado do teor de proteína bruta, por espectrofotometria UV-visível a 410 nm, segundo o método descrito em Le Poidevin e Robinson (1964). Em tubos de ensaios adicionou-se 0,1 gramas das amostras, 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 1 mL 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 (%N) das amostras foi calculado através da Equação 9.

$$\% N = (abs_{amostra} - abs_{branco}) \times f \quad (9)$$

Onde, $abs_{amostra}$ = Leitura da absorbância da amostra

abs_{branco} = Leitura da absorbância do branco

f = fator da curva de calibração

3.4. Preparação dos substratos

O inóculo fúngico foi cultivado em meio sólido, contendo farelo de palha de milho verde suplementado com bagaço de cana-de-açúcar (substrato 1) e bagaço de coco verde suplementado com farinha de soja (substrato 2), nas proporções adequadas para se obter C/N 90 e umidade para 70% da capacidade máxima de retenção de água (BALLAMINUT E MATHEUS, 2007).

O ajuste da relação C/N dos substratos sólidos foi feito através da determinação de carbono e nitrogênio total de cada componente, calculado através da seguinte expressão (EMBRAPA, 2001), com adaptação:

$$PMRC = \frac{(90 \times Nn) - Cn}{Cc - (90 \times Nc)} \quad (10)$$

Onde, PMRC = partes de material rico em carbono

Nn = teor de nitrogênio do material rico em nitrogênio

Cn = teor de carbono do material rico em nitrogênio

Cc = teor de carbono do material rico em carbono

Nc = teor de nitrogênio do material rico em carbono

3.5. Análise qualitativa do crescimento microbiano

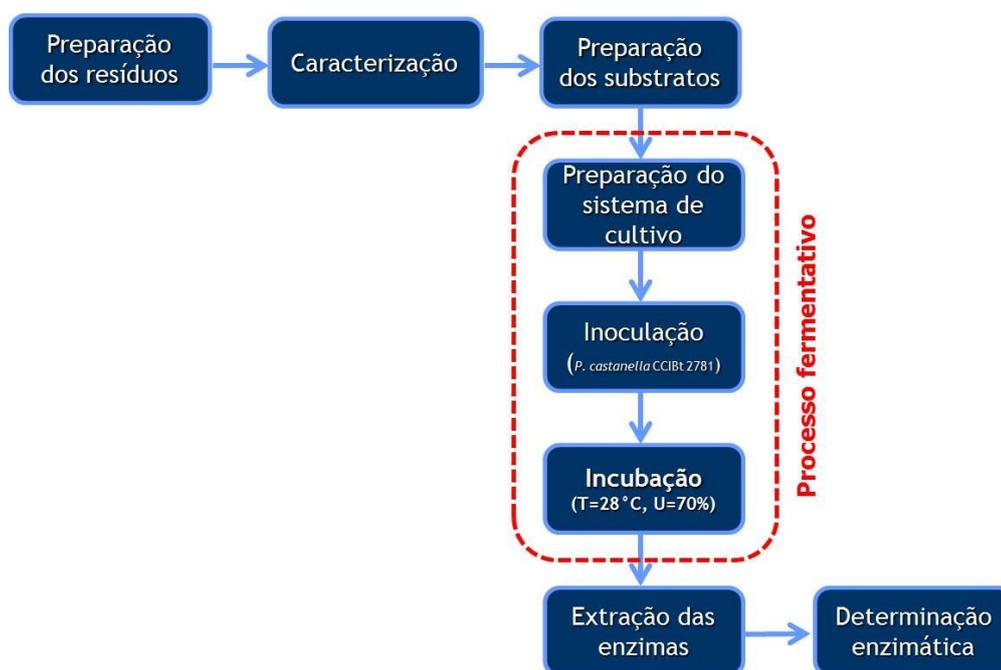
Através da observação visual dos frascos, foram determinados quais dos substratos apresentaram maior desenvolvimento micelial. Os fungos foram observados e determinados de acordo com o padrão adaptado da ASTM G21-90 (1990), apresentando as seguintes faixas de crescimento:

- (-) 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.

3.6. Processo fermentativo

A Figura 8 apresenta as etapas do processo de fermentação em estado sólido, para a produção das enzimas lacase e endoglicanase (CMCase).

Figura 8 – Etapas do processo de fermentação em estado sólido.



Fonte: Patrícia Marinho.

3.6.1. Microrganismo e inóculo

Utilizou-se o isolado de fungo basidiomiceto de podridão branca, o *Psilocybe castanella* CCIBt 2781, sendo este, um basidiomiceto da família Strophariaceae que ocorre em solo. O microrganismo pertencia à Coleção de Cultura do Instituto de Botânica (CCIBt) de São Paulo, SP e foi mantido por repiques sucessivos a 4°C, em meio ágar extrato de malte (MEA) 2% (2% extrato de malte, 0,1% peptona, 2% glicose e 1,5% de ágar).

Para preparo do inóculo, o fungo foi previamente cultivado em placas de Petri contendo MEA 2%, incubadas a 25°C até que o micélio colonizasse 3/4 da superfície da placa (Figura 9). Foi utilizado como inóculo 1/6 do micélio fúngico cultivado da placa, para cada frasco contendo substrato sólido.

Figura 9 - Colônia de *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 em MEA (2%)



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

3.6.2. Preparação do sistema de cultivo, inoculação e incubação

As fermentações foram realizadas em duplicata, em frascos de vidro contendo 20 g de substrato (Figura 10). Como substratos, utilizou-se palha de milho verde suplementado com cana-de-açúcar e bagaço de coco verde suplementado com farinha de soja, de modo a ajustar a relação C/N para 90. 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, conforme a Equação 11.

$$V_{AA} \left(\frac{g}{cm^3} \right) = m_{AA} = \frac{m_i (U_2 - U_1)}{1 - U_2} \quad (11)$$

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

Através de um planejamento, foram realizados 8 ensaios, onde a cada frasco foram adicionadas diferentes combinações com as quantidades de mediadores

(emulsão de óleo vegetal (1mL), Tween 80 (0,1 mL) e Azul Brilhante de Remazol R (RBBR) 2% (1 mL)) e 1/6 de inóculo fúngico.

Os experimentos foram conduzidos à temperatura (28°C) e umidade controlada (70%), em câmara incubadora (modelo MA1415/780 Marconi) e em diferentes tempos de fermentações (15, 30, 45, e 60 dias).

Figura 10 - Sistema de cultivo de *P. castanella*



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

3.6.2.1. Controle biótico

Foram utilizados os frascos contendo os substratos inoculados apenas com os microrganismos. Desta forma, eliminou-se a interferência das características dos mediadores. Este controle foi realizado em duplicata, sendo dois frascos para cada período de incubação.

3.7. Extração das enzimas

A extração do complexo enzimático foi realizada segundo o procedimento descrito por Moreira-Neto (2006). Finalizado o tempo de fermentação, a cada frasco

foram adicionados 60 mL de solução tampão de acetato de sódio com pH 4,8 a 50 mM (1:3 m/v). Essa suspensão foi agitada manualmente durante 5 minutos, seguida de agitação a 120 rpm por 1 h em incubadora com agitação orbital (modelo MA420 Marconi). A suspensão contendo o extrato enzimático bruto foi extraída por meio da filtração em papel de filtro qualitativo, e a solução obtida foi transferida para frascos vazios, armazenados em geladeira e utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

3.7.1. Determinação das atividades enzimáticas

3.7.1.1. Lacase (Lac)

A atividade da lacase foi determinada pela oxidação do ABTS. A mistura foi utilizada usando 0,75 mL de tampão citrato-fosfato a 50 mM (pH 4,0), 0,15 mL de água Milli-Q® Ultrapure da marca Millipore, 0,3 mL de uma solução de ABTS a 5 mM e 1,8 mL do extrato enzimático. Com a adição do ABTS a reação foi iniciada e sua oxidação, acompanhada pelo aumento da absorbância a 420 nm no espectrofotômetro Bel Photonics 2000 UV. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µmol de ABTS por minuto, sendo a atividade enzimática aqui expressa em U/L, calculada usando a Equação 12:

$$U/L = \frac{\Delta_{abs} \times 10^6}{\varepsilon \times R \times t} \quad (12)$$

Onde, Δ_{abs} = absorbância (final – inicial)

ε = absorção molar ($\varepsilon_{420 \text{ nm}} = 36.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

R = quantidade de extrato enzimático utilizado (mL)

t = tempo de reação (min)

3.7.1.2. Endoglicanase (EGs)

A atividade cinética da enzima endoglicanase, também chamada de carboximetilcelulase (CMCase), foi determinada por meio da dosagem dos açúcares redutores produzidos na degradação enzimática da carboximetilcelulose (CMC) a 1% m/v diluído em solução tampão de acetato de sódio com o pH 5,0 a 50 mM e sua quantificação ocorreu por meio do método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Em três tubos de ensaio foram adicionados: 1,0 mL de solução tampão de acetato de sódio, 1,0 mL de extrato enzimático bruto e 1,0 mL de CMC (1% m/v); controle da reação – 1,0 mL do mesmo tampão e 1,0 mL de extrato enzimático; branco da reação – 1,0 mL de água destilada e 1,0 mL de DNS. A reação foi interrompida com a adição de 1,0 mL DNS. Os tubos foram submergidos em banho-maria (Solab) a 50°C por 60 minutos, e após esse tempo foram adicionados 1,0 mL de água destilada e, posteriormente, foi efetuada a medição de absorbância a 540 nm. Essa quantificação foi repetida três vezes para cada unidade de tratamento. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcares redutores por minuto a 50°C, sendo a atividade enzimática expressa em U/g, calculada seguindo a Equação 13.

$$CMCase (U/g) = \frac{AR_{Liberado} \times 10^6}{180 \times 60} = \frac{(AR_{Com\ CMC} - AR_{Sem\ CMC}) \times 10^6}{180 \times 60} \quad (13)$$

Onde, AR = açúcares redutores

180: massa da glicose

t = tempo de reação (t = 60 min)

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Caracterização físico-química dos resíduos secos

Na Tabela 6 são apresentados os resultados obtidos da caracterização dos resíduos secos.

Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão* dos parâmetros analisados na caracterização físico-química dos resíduos.

Parâmetros Analisados	Farelo de palha de milho verde	Bagaço de cana	Bagaço de casca de coco verde	Farinha de soja
Umidade (b.u.) (%)	7,78 (0,11)	7,8 (0,16)	9,62 (0,07)	4,97 (0,07)
Umidade (b.s.) (%)	8,44 (0,13)	8,11 (0,0)	10,64 (0,08)	-
Cinzas (%)	2,47 (0,06)	0,97 (0,08)	3,61 (0,12)	3,42 (0,74)
Extrativos (%)	18,01 (0,37)	6,1 (0,17)	10,50 (0,08)	-
Lignina (%)	8,07 (0,36)	14,92 (0,0)	24,93 (0,53)	-
Holocelulose (%)	63,58 (1,14)	70,71 (1,09)	45,54 (0,61)	-
Alfacelulose (%)	53,68 (2,06)	36,43 (0,69)	27,07 (0,51)	-
Hemicelulose (%)	9,90	34,28	18,47	-
Carbono (%)	56,33	45,0	31,43	18,09
Nitrogênio (%)	0,4	0,23	0,27	7,2

* indicado pelos valores entre parênteses.

Fonte: Dados da pesquisa.

Os valores obtidos na análise estão, de um modo geral, dentro da faixa de valores encontrados na literatura. Normalmente não são encontrados valores fixos para cada análise, mas sim uma faixa de valores. Isso ocorre porque a constituição final de cada planta sofre vários tipos de influência, como clima (temperatura, umidade), constituição do solo, infecção e pragas, método de plantio, época de colheita e outros, fazendo com que plantas de mesma espécie apresentem composições diferentes.

As umidades encontradas estão dentro dos valores recomendados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece o máximo de 15% (b.u.). Assim, considera-se que esses materiais possuem boa estabilidade física e química, podendo ser armazenados em temperatura ambiente.

Na fermentação em estado sólido, a quantidade de água livre presente nos substratos é um dos fatores que mais afetam o crescimento microbiano e a formação de produto, pelo fato de determinar a quantidade de água inicial disponível para o microrganismo e por fazer com que o substrato se dilate, facilitando assim, a penetração do micélio para a utilização do substrato (MURTHY et al., 1993). Sendo assim, existe uma necessidade de umidificar esse substrato para que o microrganismo se desenvolva. Nesse caso, 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.

Observa-se que os teores de cinzas nas biomassas variaram entre 0,97 a 3,61%. O resultado encontrado no farelo de palha de milho verde (2,47%) foi superior ao encontrado por Salazar et al. (2005), de 1,52%, visto que o resultado encontrado para o bagaço de cana-de-açúcar (0,97%), foi inferior ao encontrado por Paturau (1989), com 2,2%. Para o bagaço da casca de coco verde (3,61%), o resultado foi superior ao encontrado por Guedes (2010), com 2,27%. Para farinha de soja o valor obtido (3,42%) foi inferior ao observado por Pringle (1974), de 4,5%. As variações nos valores podem ser atribuídas em razão da localização geográfica dos locais de cultivo, além da variedade do vegetal utilizado em cada trabalho.

No farelo de palha de milho verde as porcentagens de carbono e nitrogênio encontradas foram de 56,33% e 0,4%. Blanco (2014) trabalhando com os mesmos resíduos, obteve valores superiores, 96,75% e 0,48%, respectivamente. Barbieri e Barcelos (2009) trabalhando com bagaço de cana-de-açúcar, encontraram 37,81% para o carbono e 1,07% para nitrogênio, valores inferior e superior, quando comparados aos do presente trabalho. Salazar e Leão (2006) trabalhando com fibra de coco, obtiveram resultados de carbono (45,39%) e nitrogênio (0,19%). Para a farinha de soja, o resultado de nitrogênio encontrado (7,2%) corrobora com Eira (2014), que obteve 7,38% trabalhando com farelo de soja. O resultado obtido para o carbono (18,09%) foi inferior ao encontrado pelo autor (31,8%).

O percentual de lignina encontrado para o bagaço de cana-de-açúcar (14,92%) foi inferior ao encontrado por Gouveia (2009), que foi de 22,1%. Guedes (2010), trabalhando com casca de coco, obteve valor superior (43,71%) ao encontrado nessa pesquisa. Para o farelo da palha de milho verde, o percentual de lignina encontrado foi inferior ao observado por Salazar *et al.* (2005), de (14,14%).

Avaliando os teores de holocelulose encontrados para os resíduos utilizados, observa-se que os valores encontrados neste trabalho são bem próximos dos encontrados na literatura, como encontrado por Salazar *et al.* (2005) no subproduto da agroindústria do milho, que foi de 57,49%.

4.2. Análise qualitativa do crescimento microbiano

Nas Tabelas 7 e 8 são apresentados os resultados obtidos para o crescimento microbiano, determinado por observação visual, de acordo com o padrão adaptado da ASTM G21-90 (1990). Os resultados estão organizados em função de cada tratamento e do tempo de fermentação, na temperatura de 28°C. Como pode ser observado, o fungo apresentou crescimento micelial significativo já nos primeiros 15 dias de incubação, para os dois substratos utilizados.

Na Tabela 7, observa-se a variação do crescimento microbiano para o substrato a base de palha de milho e cana-de-açúcar. Verificou-se que nos primeiros 15 dias houve crescimento, havendo um acréscimo no desenvolvimento micelial nos frascos contendo os mediadores RBBR, Tween 80 e RBBR. Aos 30 dias a maior colonização da superfície foi observada sob ação do Tween 80 e RBBR, e aos 45 dias em todos os frascos contendo RBBR, demonstrando uma expressiva descoloração do RBBR, mantendo-se até os 60 dias. Nesse sentido, pode-se dizer que houve influência da presença do corante sobre o aumento de biomassa de *P. castanella*.

Tabela 7 – Efeito dos mediadores sobre o crescimento microbiano durante a fermentação do resíduo de palha de milho e cana-de-açúcar à temperatura de 28°C

MEDIADORES	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Controle	++	++	++	+
Óleo	+	++	++	+
Tween 80	+	++	++	++
Óleo e Tween 80	++	++	+	++
RBBR	+++	++	+++	++
Óleo e RBBR	+	+	+++	+++
Tween 80 e RBBR	+++	+++	+++	+++
Óleo, Tween 80 e RBBR	-	++	+++	+++

Legenda: (-) 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.

Fonte: Dados da pesquisa.

Na Tabela 8, observa-se a variação do crescimento para o substrato a base de bagaço de coco verde e farinha de soja. Observou-se nos primeiros 15 dias crescimento micelial, até que em 30 dias ocorreu sua colonização máxima, com posterior redução desse crescimento, notavelmente nos frascos contendo RBBR. Não foi detectada influência da presença do corante sobre o aumento de biomassa de *P. castanella*.

Tabela 8 - Efeito dos mediadores sobre o crescimento microbiano durante a fermentação do resíduo de bagaço de coco verde e farinha de soja à temperatura de 28°C

MEDIADORES	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Controle	++	+++	++	+
Óleo	++	+++	++	+++
Tween 80	++	+++	++	++
Óleo e Tween 80	++	+++	++	+
RBBR	++	+++	+	+
Óleo e RBBR	++	+++	+	+
Tween 80 e RBBR	++	+++	+	+++
Óleo, Tween 80 e RBBR	++	+++	+	+

Legenda: (-) 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.

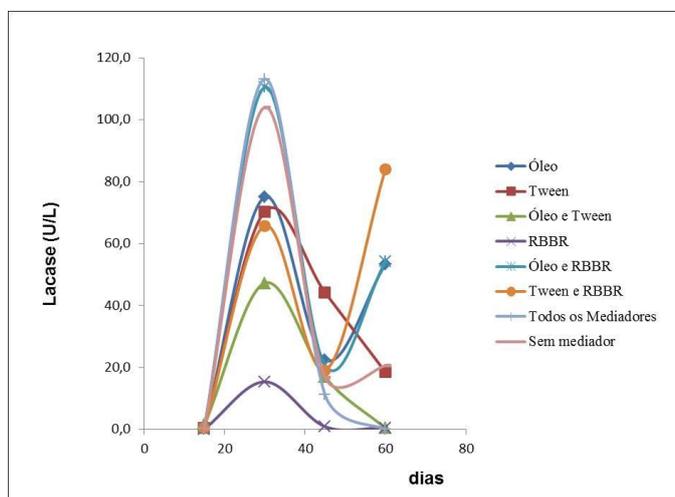
Fonte: Dados da pesquisa.

4.3. Atividades enzimáticas

4.3.1. Lacase

Nas Figuras 11 e 12 estão apresentados os perfis cinéticos das atividades de lacase, determinada pela oxidação do ABTS. Observa-se que a variação da atividade enzimática ocorreu em função do tempo de fermentação (15, 30, 45 e 60 dias), à temperatura (28°C) e umidade (70%) constantes. A maior atividade enzimática de lacase foi de 113,12 U/L, alcançada no 30° dia para o substrato de bagaço de coco verde suplementado com farinha de soja, sob ação de todos os mediadores (Figura 11). A máxima produção de atividade de lacase neste período, coincide com o aumento de biomassa de *P. castanella*.

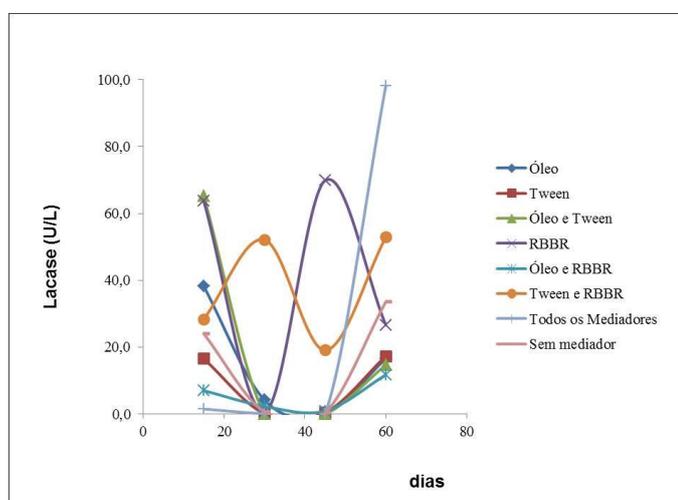
Figura 11 – Perfil cinético de produção de lacase em bagaço de coco verde e farinha de soja, na umidade inicial 70% a 28°C.



Fonte: Dados da pesquisa.

Na Figura 12, para o substrato a base de milho e cana-de-açúcar, a máxima atividade de lacase (98,25 U/L) foi verificada aos 60 dias, sob ação de todos os mediadores, destacando-se a atividade de 65,24 U/L no 15º dia, sob ação do óleo vegetal e Tween 80, e do RBBR. Nesta condição de cultivo, a adição de óleo vegetal e Tween 80, bem como RBBR, induziu a atividade de lacase, concordando com Yamanaka e Machado (2007), que trabalhando com meio de cultivo sintético observaram que, ao passo que na ausência do corante o fungo *P. castanella* foi capaz de produzir 25 UL⁻¹ em 15 dias de cultivo, na presença do RBBR houve produção de cerca de 100 UL⁻¹ desta atividade enzimática aos 12 dias de cultivo.

Figura 12 – Perfil cinético de produção de lacase em farelo de palha de milho verde e bagaço de cana-de-açúcar, na umidade inicial 70% a 28°C.



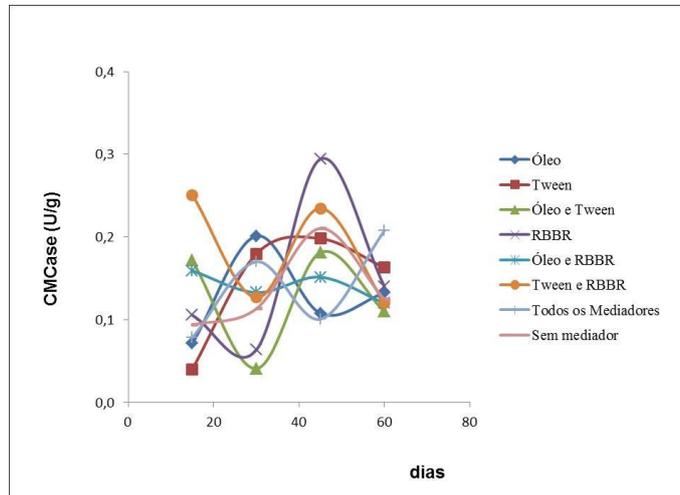
Fonte: Dados da pesquisa.

4.3.2. CMCCase

Na Figura 13, observa-se a variação da atividade de endoglicanase (CMCase) em função do tempo de fermentação. Observou-se que a maior atividade enzimática (0,29 U/g) ocorreu para o substrato a base de palha de milho verde e cana-de-açúcar, em 45 dias, sob a ação do RBBR, constatando-se que houve influência da presença do RBBR sobre a atividade de CMCase produzida por *P. castanella*. A máxima produção de atividade de CMCase provavelmente pode ser explicada pelo o aumento de biomassa de *P. castanella*, como pode ser observado na Tabela 5.

Rodríguez-Zúñiga et al. (2011) trabalhando com resíduo de cana-de-açúcar obtiveram em 72 h de fermentação, atividade de 0,3 U/g, utilizando *Aspergillus Niger*. Lins (2012) em estudo de produção de celulasas com bagaço de pedúnculo do caju, utilizando *Trichoderma reesei* LCB 48 e umidade inicial de 65%, obteve atividade de 0,37 U/g, valor de atividade inferior ao citado por Amorim (2010) que obteve em seus ensaios com bagaço de caju, utilizando *Trichoderma sp.*, atividade enzimática de 0,733 U/g, em 66 horas de fermentação.

Figura 13 – Perfil cinético de produção de CMCase em palha de milho verde e bagaço de cana-de-açúcar, na umidade inicial 70% a 28°C.



Fonte: Dados da pesquisa.

5. CONCLUSÃO

Em função dos dados obtidos, pode-se concluir que a bioconversão dos resíduos palha de milho verde suplementado com cana-de-açúcar e bagaço de coco verde, suplementado com farinha de soja sob fermentação em estado sólido com o auxílio do microrganismo *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 é uma alternativa de obtenção da enzima lacase, apresentando-se o resíduo a base de milho e cana como uma matéria-prima viável para a produção de endoglicanase (CMCase).

Os dados deste estudo permitiram também evidenciar a capacidade de *P. castanella* de degradar o corante Azul Brilhante Remazol R em meio de cultivo utilizado, durante o intervalo de tempo de 45 dias, havendo total descoloração do corante após esse período. Houve influência da presença do RBBR sobre as atividades de lacase e endoglicanase, produzidas por *P. castanella* CCIBt 2781 nas condições avaliadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDESHAHIAN, P.; SAMAT, N.; HAMID, A. A.; YUSOFF, W. M. W. Solid substrate fermentation for cellulose production using palm kernel cake as a renewable lignocellulosic source in packed-bed bioreactor. *Biotechnol. and Bioprocess. Eng.*, Busan, v. 16, n. 2, p. 238-244, 2011.

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 20 de novembro de 2013.

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

ANDERSEN, NATALIJA. Enzymatic Hydrolysis of cellulose – Experimental and Modeling Studies. BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, Denmark, 2007. Tese de Doutorado.

ARORA, D. S.; GILL, P. K. Effects of various media and supplements on lacase production by some white rot fungi. *Bioresource Technology*. 77: 89-91, 2001.

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

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

BALLAMINUT, N. Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* CCB 274 empregado em biorremediação de solo, 2007. Dissertação de Mestrado - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente/SP, São Paulo, 2007.

BALLAMINUT, N.; MATHEUS, D. R. Characterization of fungal inoculum used in soil remediation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 248-252, 2007.

BARBIERI, R. H. T.; BARCELOS L. S. Produção de fertilizante orgânico a partir do bagaço de cana-de-açúcar: 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.

BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1282-1289, 2010.

BEGUIN, P., AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.*, 13:25-58, 1994.

BIANCHI, MARIA LUCIA. Polpação de palha de milho utilizando-se diferentes processos organosolv. Dissertação de Mestrado - Campinas: Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, 1995.

BIDLACK, J.; Malone, M. e Benson, R. Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in Plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, v. 72, p. 51-56, ISSN 0078-4303, 1992.

BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulose materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme and Microbiology Technology*, v. 3, p. 90-104, 1984.

BLANCO, M. C. S. Compostagem. Disponível em: http://www.cati.sp.gov.br/Cati/_tecnologias/manejo_conservacao_solo/compostagem.php, acessado em 09 de maio de 2014.

BLANCHETTE, R. A. Degradation of lignocellulose complex in wood. *Can. J. Bot.* 73: S999-S1010. *apud* Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. & Itavaara, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology* 72: 169-183. 1995.

BOISSET, C.; FRASCHINI, C.; SCHULEIN, M.; HENRISSAT, B.; CHANZY, H. Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:1444-1452, 2000.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F. e Pereira Jr, N. Enzimas na Produção de Etanol. In: Enzimas em Biotecnologia. Produção, Aplicações e Mercado. Bom, E.; Ferrara, M. A. e Corvo, M. L., p. 241-271, Interciência, ISBN: 978-85-7193-189-3, Rio de Janeiro, 2008.

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, 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 – Milho. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>, acessado em 20 de novembro de 2013.

BRASIL – Ministério da agricultura. Culturas – Cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar/>, acessado em 20 de novembro de 2013.

BRASIL – Ministério da agricultura. Culturas – Soja. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>, acessado em 20 de novembro de 2013.

BRETT, C., WALDON, K. Cell wall architecture and the skeletal role of the cell wall. In: *Physiology and biochemistry of plant cell walls*, Blackk, M. and Charlwood, B. (Eds), Chapman and Hall, 2nd edition, p. 44-74, 1996b.

BRUCATO, C. L.; WONG, S. S. Extracellular poly-(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Penicillium funiculosum*: general characteristics and active site studies. *Arch. Biochem. Biophys.*, Orlando, v. 290, p. 497-502, 1994.

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.

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

CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

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

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

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

DA SILVA, R., FRANCO, C. M. L., GOMES, E. Pectinases, hemicelulasas e celulasas, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: Revisão. *Boletim da SBCTA*, 31(2):249-260, 1997.

DA SILVA, R.; YIM, D. K.; PARK, Y. K. Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp for pulp improvement. *Journal Fermentation and Bioengineering*, v. 77, p. 109-111, 1994.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *International Journal of Biological Sciences*, v. 5, n.6, p. 578-595, 2009.

DEVECI, T.; UNYAYAR, A.; MAZMANCI, M. A. Production of Remazol Brilliant Blue R decolourising oxygenase from the culture filtrate of *Funalia trogii* ATCC 200800. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 30: 25-32, 2004.

DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 31, p. 907-931, 2002.

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

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> (em: 09 de maio de 2014).

ELISASHVILI, V. L. Biosynthesis and properties of cellulases and xylanases of higher Basidiomycetes. *Applied Biotechnology and Microbiology*, v. 29, p. 257-266, 1993.

ENGUITA, F. J.; MARTINS, L. O.; HENRIQUES, A. O.; CARRONDO, M. A. Crystal Structure of a Bacterial Endospore Coat Component. A Laccase with enhanced thermostability properties. *The Journal of Biological Chemistry*. p. 278, 2003.

ERENO, D. Álcool de Celulose. *Pesquisa FAPESP*, 133. p. 29-31, 2007.

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

FARINAS, C. S. et al. Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 28, n. 1, p. 17-26, 2011.

FENGEL, D.; WEGENER, G. *Wood chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin: Walter de Gruyter, p. 610-613, 1989.

FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; NEPOMUCENO, A. L.; MOLINARI, H. B. C; BON, E. P. S. Biomass Residues in Brazil: Availability and Potential Uses. *Waste and Biomass Valorization*. v. 1, n.1, p. 65–76, 2010.

GALEMBECK, F.; BARBOSA, C. A. S.; SOUSA, R. A. Aproveitamento sustentável de biomassa e de recursos naturais na inovação química. São Paulo: Química Nova, 2009.

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

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 13, n. 2/3, p. 85-101, 2003.

GIESE, E. C.; COVIZZI, L. G.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. de M. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria sp.* *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. v. 26, n. 4, p. 463-470, 2004.

GLAZER, A. N., Nikaido, H. Biomass, In: *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*, Glazer, A. N., Nikaido, H., p. 430-455, Cambridge University Press, ISBN 978-0-521-84210-5, New York, 2007.

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. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 88f, 2010.

GUGLIOTTA, A. M.; CAPELARI, M. Taxonomia de basidiomicetos. In: Bononi, V. L. R. (Org.). *Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*. Instituto de Botânica, São Paulo, p. 184, 1998.

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

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.

HAMELINCK, C. N., Hooijdonk, G., Faaij, A. P. C. Ethanol from Lignocellulosic Biomass: Techno-Economic Performance in Short-, Middle- and Long-Term. *Biomass Bioenergy*, v. 28, p. 384-410, ISSN 0961-9534, 2005.

HASSUANI, S. J. Biomass power generation: sugar cane bagasse and trash/Suleiman José Hassuani, Manoel Regis Lima Verde Leal, Isaías de Carvalho Macedo – Piracicaba: PNUD – CTC, p. 217, 2005.

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

HON, D. N. S., SHIRAISHI, N. *Wood and cellulosic chemistry*. New York: Marcel Dekker, p. 1032, 1991.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; RENSBURG, J. V. E. L.; HOWARD, S. Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production. *African Journal of Biotechnology*, v. 2, p. 602-619, 2003.

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 la canã de azucar. México: CEPLACEA, p. 447, 1990.

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

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

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

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

KLASS, D. L. Biomass for renewable energy, fuels, and chemicals. Academic Press, San Diego, 1998.

KLINKE, H. B., THOMSEN, A. B., AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, p. 10-26, 2004.

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

LAMAR, R. T.; WHITE, R. B. Micoremediation – 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, v. 3, p. 263-278, 2001.

LEONOWICZ, A.; CHO, N. S.; LUTEREK, J.; WILKOLAZKA, A.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; MATUSZEWSKA, A.; HOFRICHTER, M.; WESENBERG, D.; ROGALSKI, J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.*, Berlin, v. 41, p. 185-227, 2001.

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.

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 semi-sólida em bagaço de pedúnculo do caju utilizando *Trichoderma reesei* LCB 48. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 75 p. 2012.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL; W. H., PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 66: 506-577, 2002.

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.

MAGALHÃES, P. G.; DURÃES, F. O. M.; CARNEIRO, N. P. Fisiologia do milho. In: Circular Técnica, n. 22, Sete Lagoas, EMBRAPA/CNPMS, p. 15-48, 2002.

MALIK, S. K.; MUKHTAR, H.; FAROOQI, A. A.; IKRAM-UL-HAQ. Optimization of process parameters for the biosynthesis of cellulases by *Trichoderma viride*, *Pakistan J. Botany*, v. 42, n. 6, p. 4243-4251, 2010.

MALHERBE, S.; CLOETE, T. E. Lignocellulose Biodegradation: Fundamentals and Applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 1, n. 2, p. 105-114, 2002.

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

MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R. C/N Ratio and vegetable oil to mineralize 14Chexachlorobenzene 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. M.; BONONI, V. L. R.; MACHADO, K. M. G.; SILVA, R. R.; RODRIGUES, T. A. Growing basidiomycetes in bioreactors to be applied to bioremediation of HCB in soil. In: Magar, V. S.; Kelley, M. E. (eds.). In Situ and On-Site Bioremediation. Proceedings of the Seventh. International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. Orlando, Battelle Press, Paper G5, 2003.

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 and Biotechnology*, v. 16, p. 415-421, 2000.

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

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.

MOREIRA-NETO, S. L. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno, 2006. Dissertação de Mestrado - Instituto de Botânica, São Paulo, p.124, 2006.

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

MTUI, G.Y.S. Recent Advances in Pretreatment of Lignocellulosic Wastes and Production of Value Added Products. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 8, p. 1398-1415, ISSN 1684-5315, 2009.

MTUI, G.; NAKAMURA, Y. Lignin-degrading enzymes from mycelial cultures of basidiomycete fungi isolated in Tanzania. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 37 (1): 113-118, 2004.

OBEROI, H. S. et al. Production of cellulases through solid state fermentation using kinnow pulp as a major substrate. *Food Bioprocess Technol.*, Dublin, v. 3, n. 4, p. 528-536, 2010.

ÖNNERUD, H.; ZHANG, L.; GELLERSTEDT, G. e HENRIKSSON, G. Polymerization of Monolignols by Redox Shuttle – Mediated Enzymatic, 2002.

PALMIERI, G.; CENNAMO, G.; SANNIA, G. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 17-24, 2005.

PANDEY, A. Solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, n.2/3, p.81-84. 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAM, P. Solid state fermentation in biotechnology. Nova Deli: Asiatech, 221p. 2001.

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

PARDO, A. G. *et al.* Cellulose and xylan degrading enzymes in *Thecotheus pelletieri*. *Rev. Argent. Microbiol.*, Buenos Aires, v. 32, p. 190-195, 2000.

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

PAZ, E. S. L. da; FONSECA, A. P. G. da; FREITAS, L. R.; GUARANÁ, C. F. R.; JÚNIOR, F. B. da P. Isolamento e avaliação da atividade fenoloxidase de Basidiomycetes coletados em área de Mata Atlântica – PE. CIENTEC - Revista de Ciência, Tecnologia e Humanidades do IFPE - Ano II, n. 1, 2010.

PEREIRA FILHO, I. A. O cultivo do milho-verde. Brasília, Embrapa, p. 204, 2003.

PINO, G. A. H. Biossorção de Metais Pesados Utilizando Pó da Casca de Coco Verde (*Cocos nucifera*). Dissertação de Mestrado - Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2005.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S. de; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. Comunicado Técnico on line Embrapa, ISSN 1679-6535, 2005.

POINTING, S. B. *et al.* Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. *Mycologia*, Lawrence, v. 92, p. 139-144, 2000.

POZDNYAKOVA, N. N. et al. Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. *J. Mol. Catal.*, Lausanne, v. 30, p. 19-24, 2004.

PRASAD, S.; Singh, A. e Joshi, H. C. Ethanol as an Alternative Fuel from Agricultural, Industrial and Urban Residues. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 50, n. 1, p. 1-39, ISSN 0921-3449, 2007.

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. Suplementação da palha 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. *Ver. Brasileira de Zootecnia*, 27(2), p. 381-389, 1998.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 1, n. 3, 1998.

REDDY, G. V. B.; GELPKE, M. D. S.; GOLD, M. H. Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of Reductive Dechlorination. *Journal of Bacteriology* 180 (19): 5159–5164, 1998.

REDDY, G. V. B.; GOLD, M. H. Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. *Microbiology* 146: 405–413, 2000.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIG, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. *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.

ROSA, M. F.; BEZERRA, F. C.; ARAÚJO, F. B. S NORÕES, E. R. V. Utilização do pó de coco verde na germinação de alface hidropônico. Horticultura Brasileira, Brasília. Suplemento ref. 545. Edição de resumos do XLI Congresso Brasileiro de Olericultura, Brasília, DF, v. 19, n. 2, p. 294, 2001.

ROSSI, S. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; PEREIRA, B. M. P.; GAGO, F. D.; RIZZOLO, J. A.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MEDEIROS, A. B. P. Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. *Food Res. Int.*, v. 42, p. 484-486, 2009.

RUIZ-DUEÑAS, F. J. e MARTÍNEZ, A. T. Microbial Degradation of Lignin: How a Bulky Recalcitrant Polymer is Efficiently Recycled in Nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnology*, 1641771751-7915, 2009.

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.

SALES, M. R.; MOURA, R. B. de; PORTO, T. S.; MACEDO, G. R. de; PORTO, A. L. F. Variáveis que influenciam a produção de celulasas e xilanasas por espécies de *Aspergillus*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1290-1296, 2010.

SANTIAGO, A. M. Estudo do potencial de cascas do umbu (*Spondia tuberosa*), jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), goiaba (*Psidium guajava*) na produção e recuperação da exo-poligalacturonase. Tese de Doutorado. Programa de pós-Graduação em Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB. 2012.

SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 27-33, 2009.

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

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.*, v. 384, p. 109–115, 2000.

SHLEEV, S.; JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; KHALUNINA, A.; MOROZOVA, O.; YAROLOPOV, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L. Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes. *Bioelectrochem.*, v. 67, p. 115-124, 2005.

SILVA, E. M.; MACHUCA, A.; MILAGRES, A. M. F. Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. *Letters in Applied Microbiology* 1-6, 2005.

SILVA, R. R. Ergosterol para determinação da biomassa dos fungos *Lentinus crinitus* Berk e *Psilocybe castanella* Peck em biorremediação de solos. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, p. 108, 2004.

DA SILVA, K. R. I. Biodegradação de polietileno tereftalato (PET) por fungos ligninolíticos. Dissertação de Mestrado - Campinas, SP. 2009.

SOARES, G. M. B.; COSTA-FERREIRA, M.; AMORIM, P. Decolorization of an anthraquinone-type dye using a laccase formulation. *Bioresource Technology* 79: 171-177, 2001.

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

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. *Animal Feed Science and Technology*, v. 85, p. 239-257, 2000.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*. v. 72, p. 169-183, 2000.

UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar. Disponível em: <http://www.unica.com.br/>, acessado em 20 de novembro de 2013.

VALERIANO, V. S.; SILVA, A. M. F.; SANTIAGO, M. F.; BARA, M. T. F.; GARCIA, T. A. Production of laccase by *Pycnoporus sanguineus* using 2,5 - xylydine and ethanol. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40: 790-794, 2009.

VAN DAM, J. E. G. et al. Process for production of high density/high performance binderless boards from hole coconut husk. Part 1: Lignin as intrinsic thermosetting binder resin. *Industrial Crops and Products*. v. 19, n. 3, p. 207-216, 2004.

VAN DER MERWE, J. J. Production of laccase by the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*. Dissertação de Mestrado - University of the Free State, Bloemfontein, South África, p. 125, 2002.

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

WONG, D. W. S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 157, p. 174-209, 2009.

YAMANAKA, R.; MACHADO, K. M. G. Influência do corante Azul Brillhante de Remazol R sobre o sistema enzimático ligninolítico de *Psilocybe castanella* CCB444 em meio de cultivo sintético. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1119-1121, 2007.

YAVER, D. S.; XU, F.; GOLIGHTLY, E. J.; BROWN, K. M.; BROWN, S. H.; REY, M. W.; SCHNEIDER, P.; HALKIER, T.; MONDORF, K. e DALBOGE, H. Purification, Characterization, Molecular Cloning, and Expression of two Laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 62 (3), p. 834-841, 1996.