

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS AMBIENTAIS

JOSIANE RATIER DE QUEVEDO ANTUNES

BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUBSTRATO PARA
PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOLÍTIICAS FÚNGICAS

CAMPO GRANDE
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS AMBIENTAIS

JOSIANE RATIER DE QUEVEDO ANTUNES

**BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUBSTRATO PARA
PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOLÍTIICAS FÚNGICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), na área de concentração em Saneamento Ambiental e Recursos Hídricos como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Tecnologias Ambientais.

**ORIENTADOR: Prof. Dr.
Kennedy Francis Roche**

**CO-ORIENTADORA: Profa.
Dra. Vera Lúcia Ramos Bononi**

CAMPO GRANDE-MS
2015

Dedico

Ao meu marido Luiz e meus filhos João e Calebe: tantas vezes privados da minha presença, mas nunca do meu amor. Só de pensar em vocês, pessoas tão especiais, ganho forças para continuar seguindo em frente.

AGRADECIMENTOS

Nestes quatro anos de doutorado eu contei com a colaboração e incentivo de várias pessoas, sendo todas fundamentais na realização desse trabalho.

À Deus, que é o meu criador e supridor, que tem planos melhores e mais altos do que os meus, por ter me capacitado, me dado saúde e força para vencer mais esta etapa em minha vida possibilitando conhecer um lado maravilhoso do ser humano: o Compartilhamento de conhecimento.

Ao meu marido Luiz, que sempre acreditou no meu potencial, muitas vezes até mais que eu mesma. Agradeço pelo amor, carinho, companheirismo, incentivo e paciência durante todos esses anos. Suas palavras de apoio sempre foram fundamentais para que eu pudesse prosseguir.

Aos meus filhos João Alberto e Pedro Calebe, que são a minha herança, minha riqueza, só de olhar para eles as minhas forças são recarregadas, eles são a razão de não olhar para os obstáculos e persistir, amo incondicionalmente.

Aos meus Pais, Eugênio e Terezinha e meus irmãos Everton e Júnior, pelo amor, incentivo e apoio, por sonharem junto comigo essa grande conquista.

À Nathali, filha do coração, uma amiga mais chegada que irmã, minha eterna gratidão, pelo seu carinho, amor e cuidado com a minha família.

À minha co-orientadora, Prof.^a Dr.^a Vera Lúcia Ramos Bononi, que caminha comigo há muitos anos, e um exemplo para mim de profissional, de mãe e de mulher, obrigada pela orientação na graduação, no mestrado e no doutorado.

Aos Pesquisadores Vera Vitalli e Alex, do laboratório de micologia aplicada do IBT, sem a parceria de vocês a realização desse trabalho seria impossível.

À Michele do laboratório de fisiologia do IBT, muito obrigada pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Kennedy, por me proporcionar a entrada no doutorado e ter aceitado esse desafio.

À Prof.^a Dr.^a Rosemary Matias pela disponibilidade e gentileza e pelas importantes contribuições ao meu trabalho, foi o meu socorro presente, muito obrigada pelo seu apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

“Tua caminhada ainda não terminou... A realidade te acolhe dizendo que pela frente. O horizonte da vida necessita de tuas palavras e do teu silêncio. Não faças do amanhã o sinônimo de nunca, nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais. Teus passos ficaram. Olhes para trás... Mas vá em frente, pois, há muitos que precisam que chegues para poderem seguir-te.”

Charles Chaplin

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
EPÍGRAFE	v
SUMÁRIO	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	i
LISTA DE SIMBOLOS	x
RESUM O	11
ABSTRAC T	13
CAPÍTULO I	13
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Objetivo geral	14
1.2. Objetivos específicos	14
1.3. Organização do trabalho	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Bagaço de cana-de-açúcar	15
2.2. Materiais lignocelulósicos	16
2.2.1. Lignina	16
2.3. Celulos e	18
2.3.1. Hemicelulose	18
2.4. Fungos basidiomicetos e potencial biotecnológico	19
2.5. Enzimas	21

2.5.1. Lignina peroxidase	22
2.5.2. Manganês peroxidase	23
2.5.3. Lacases	24
2.5.4. A utilização da enzima para o processamento de biomassa para produção de etano	26
1	..
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO	32
II	..
ARTIGO 1 BASIDIOMICETOS DA SERRA DA BODOQUENA, MATO GROSSO DO SUL: CRESCIMENTO E POTENCIAL ENZIMÁTICO	32
RESUM	32
O	..
ABSTRAC	33
T	..
1. INTRODUÇÃO	33
2. MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1. Área de coleta	34
2.2. Coleta, identificação, crescimento e testes enzimáticos	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1. Família Agaricaceae	38
3.2. Família Bolbitiaceae	38
3.3. Família Colostomataceae	38
3.4. Família Hymenochaetaceae	39
3.5. Família Ganodermataceae	40
3.6. Família Meruliaceae	41
3.7. Família Pleurotaceae	42
3.8. Família Polyporaceae	42
3.9. Família Schizophyllaceae	46
3.10. Família Thelephoraceae	48

4. CONCLUSÃO	50
5. REFERÊNCIAS	50
CAPÍTULO III	53
ARTIGO ENZIMAS DE <i>Pycnoporus sanguineus</i> EM BAGAÇO DE CANA-DE- 2	
AÇÚCAR PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	53
RESUM	53
O
ABSTRAC	54
T
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAL E	56
MÉTODOS
2.1. Isolamento em meio de cultura e	56
conservação
2.2. Teste qualitativo	56
2.3. Teste quantitativo	57
2.3.1. Determinação da atividade de enzimas	57
ligninolíticas
2.3.2. Extrato enzimático do substrato	58
sólido
2.3.3. Atividades da	58
lacase
2.3.4. Atividades de manganês peroxidase	58
..
2.3.5. Atividades de lignina peroxidase	59
(LIP)
2.4. Determinação da lignina insolúvel na fração	59
sólida
2.5. Determinação das	59
cinzas
2.6. Determinação de açúcares	59
totais
2.6.1. Curva-padrão dos açúcares	60
totais
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
3.1. Análise	60
enzimática
3.2. Quantificação de lignina do bagaço de cana-de-açúcar tratadas com <i>P. sanguineus</i>	64
...
3.3. Determinação de açúcares totais do bagaço de cana-de-açúcar tratadas com <i>P.</i>

<i>sanguineus</i>	65
	...
4. CONCLUSÃO	66
	...
5. REFERÊNCIAS	67
	...

LISTA DE FIGURAS

FIGUR A	2.1	Bagaço de <i>Saccharum officinarum</i> (Poaceae)	1 6
FIGUR A	2.2	Representação estrutural da lignina	1 7
FIGUR A	2.3	Estrutura química da celulose	1 8
FIGUR A	2.4	Estrutura química das principais hemiceluloses de parede celular de planta	1 9
FIGUR A	2.5	Relação filogenética entre os fungos	2 0
FIGUR A	2.6	Fórmula estrutural esquemática para lignina e estrutura tridimensional da lignina peroxidase	2 3
FIGUR A	2.7	Mecanismo que mostra o estado inicial e estrutura tridimensional do manganês peroxidase	2 4
FIGUR A	2.8	Ciclo catalítico da lacase e estrutura tridimensional	2 4
FIGUR A	2.9	Localização da Serra da Bodoquena (A) e RPPN Estância Mimosa (B), no município de Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil	3 5
FIGUR A	3.1	Crescimento em diâmetro das espécies <i>Pycnoporus Sanguineus</i> , <i>Pleurotus agaves</i> e <i>Schizophyllum commune</i> cultivadas em Ágar Extrato de Malte (MEA)	4 9
FIGUR A	3.2	Atividades celulolíticas do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> em bagaço de cana-de-açúcar umedecido com água	6 1
FIGUR A	3.3	Atividades celulolíticas do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> em bagaço de cana-de-açúcar umedecido em Ágar Extrato de Malte (MEA)	6 2
FIGUR A	3.4	Atividades de lacase do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> em bagaço de cana-de-açúcar	6 3
FIGUR A	3.5	Atividades de manganês peroxidase do fungo <i>Pycnoporus</i>	

		<i>sanguineus</i> em bagaço de cana-de-açúcar	6
		3
FIGUR A	3.6	Porcentagem da lignina presente no bagaço da cana	6
		4
FIGUR A	3.7	Quantidade de açúcares totais solúveis, em bagaço de cana de açúcar	
		após tratamento com <i>Pycnoporus sanguineus</i> 	6
		5
FIGUR A	3.9	Quantidade de açúcares totais solúveis, em bagaço de cana de açúcar	
		após tratamento com <i>Pycnoporus sanguineus</i> em meio com e sem	
		Ágar Extrato de Malte (MEA)	6
		..	6

LISTA DE TABELAS

TABELA	1	Espécies de fungos identificados na Serra de Bodoquena, Mato Grosso do Sul	3
		7
TABELA	2	Teste enzimáticos dos fungos <i>Pycnoporus sanguineus</i> , <i>Pleurotus agaves</i> e <i>Schizophyllum commune</i> em R-RBBR (degradação lignolítica), vermelho congo (ceulase), Guaiacol	5
		(lacase)	0

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AST	Açúcares solúveis totais
BDA	Batata-dextrose-ágar
CCB	Coleção de cultura de Basidiomicetos
CCIBt	Coleção de culturas de algas, cianobactérias e fungos do Instituto de
Clig	Concentração de lignina solúvel
CMC	Carboximetilcelulose
EC	Enzyme Committee (classificação bioquímica de enzimas)
FEZ	Fermentação em estado sólido
FMSS	Fermentação semi-sólido
FSM	Fermentação submersa
IBt	Instituto de Botânica
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
LKi	Lignina Klason insolúvel
LiP	Lignina peroxidase
MA	Massa da amostra seca
MC	Massa de cinzas
Mk	Massa de lignina insolúvel seca
nM	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Peso/volume
Rpm	Rotações por minuto
RPPN	Reserva Particular do Patrimônio Natural
SI	Sistema Internacional de Unidades
UI	Unidade Internacional
v/p	Volume por peso

LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentagem
²⁺	Resultado de um átomo ou molécula que ganhou elétrons.
°C	Grau Celsius
ABTS	2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
Cm	Unidade de medida comprimento - centímetro - cm ⁻¹
cm ²	Unidade de medida de área centímetro ao quadrado
CO ₂	Dióxido de carbobo
Cu	Elemento químico Cobre
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EC	Enzyme Committee (classificação bioquímica de enzimas)
G	Unidade de medida de peso – Grama – g ⁻¹
Glc	Glicose
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
KOH	Hidróxido de potássio
L	Unidade de medida – Litro – L ⁻¹
min	Unidade de medida de tempo – minuto - min ⁻¹
mL	Unidade de medidade – mililitro – mL ⁻¹
mm	Unidade de medidade de comprimento - milímetro - mm ⁻¹
Mn	Manganês
MnP	Manganês Peroxidase
MnSO ₄	Sulfato de Manganês
NaOH	Hidróxido de sódio
R-RBBR	Remazol Brilliant Blue R (Corante de antraquinona)
μg mL ⁻¹	Micrograma por mililitro
μg μL ⁻¹	Micrograma por microlitro
UL	Unidade por litro – UL ⁻¹
μL	Microlitro - μL ⁻¹
μmoles	Micromoles
μM	Micromolar

RESUMO

Os fungos de podridão branca possuem potencial em degradar compostos lignocelulósicos, como a madeira, o que torna este grupo um alvo para pesquisas biotecnológicas. As principais enzimas relacionadas à degradação de compostos lignocelulósicos são as lacases, lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e celulases. O objetivo deste trabalho é estudar enzimas lignocelulíticas de basidiomicetos usando como substrato o bagaço de cana-de-açúcar para futuras aplicações biotecnológicas. Foram coletadas e identificadas 28 espécies de basidiomicetos e isoladas em meio de cultura. As espécies *Pycnoporus Sanguineus*, *Schizophyllum commune* e *Pleurotus agaves* apresentaram melhor crescimento e foram selecionadas para testes qualitativos que indicam a presença de enzimas lignocelulósicos extracelulares. *P. sanguineus* foi a escolhida, pois se destacou quanto ao crescimento e potencial enzimático em todos os meios selecionados, comparada as outras. Foi realizada a determinação das atividades enzimáticas e a atividade de lignina peroxidase cultivado em meio em bagaço de cana-de-açúcar umedecido com água teve seu pico no 14º dia de incubação, atingindo 420 U. L⁻¹. A atividade de lacase nas mesmas condições de cultivo apresentou, também, um pico ao 14º dia de incubação atingindo 250 U. L⁻¹. Quase não foi possível detectar manganês peroxidase quase não foi possível detectar atividade enzimática. As enzimas do fungo *P. sanguineus* utilizadas no tratamento para remover uma porcentagem da lignina presente no bagaço da cana foram capazes de remover a lignina em aproximadamente 15 %, em 28 dias. Foi gerado açúcar no meio, provavelmente devido a degradação (quebra) da lignina pela ação das enzimas fúngicas liberando carboidratos e possibilitando assim um reaproveitamento dos açúcares do bagaço para aplicações biotecnológicas como produção de etanol de segunda geração.

Palavras chave: Basidiomicetos, enzimas ligninolíticas, lacase, lignina peroxidase, etanol de segunda geração

ABSTRACT

The white rot fungi have the potential to degrade lignocellulosic compounds, such as wood, which makes this group a target for biotechnological research. The main enzymes related to degradation of lignocellulosic compounds are the laccases, the lignin peroxidase (LiP), the manganese peroxidase (MnP) and the cellulases. The aim of this work is to study the lignocellulolytic enzymes of basidiomycetes using as substrate sugarcane bagasse for future biotechnological applications. It was collected and identified 29 species of Basidiomycetes, they were isolated in cultivation. The species *Pycnoporus Sanguineus* *Schizophyllum communee* and *Pleurotus agaves* showed better growing and were selected for qualitative tests that indicate the presence of extracellular lignocellulosic enzymes. The species *P. sanguineus* was chosen because, compared to the others, it stood out as the growth and enzyme potential in all selected means. The determination of enzymatic activities was performed, the activity of fenoloxidas and *P. sanguineus* grown amid sugarcane bagasse moistened with water, peaked in the fourteenth day of incubation, reaching 420 U L⁻¹. The laccase activity under the same cultivation conditions also presented a peak on the fourteenth day of incubation reaching 250 U. L⁻¹. It was nearly impossible to detect manganese peroxidase or detect enzymatic activity. The enzymes of *P. sanguineus* fungus used in the pretreatment to remove a percentage of lignin presented in the sugarcane bagasse was able to remove lignin by approximately 15% within 28 days. It was generated sugar in it, probably due a degradation (break) of the lignin by the action of fungal enzymes releasing carbohydrates and thus enabling reuse of sugarcane bagasse sugars for biotechnology applications as second-generation production of ethanol.

Keywords: Basidiomycetous , ligninolytic enzymes, laccase , lignin peroxidase , second-generation ethanol

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A pesquisa por energias renováveis é de grande interesse para o mundo, o que propicia diversos investimentos financeiros nessa área, resultando em métodos que utilizam resíduos agrícolas como novas alternativas e, entre elas, destaca-se o aproveitamento de biomassa agroindustrial, tal como o bagaço de cana-de-açúcar. De acordo com Canilha *et al.*, 2010, os resíduos da indústria da cana-de-açúcar, como a palha e parte do bagaço, são um problema ambiental e ao mesmo tempo uma fonte renovável de recursos.

A reutilização destes resíduos pode minimizar os problemas ambientais ligados ao seu acúmulo e reduzir o uso de combustíveis fósseis. O risco da escassez das reservas de petróleo, principal fonte energética mundial, e as preocupações a preservação ambiental, levaram os governos a buscarem estratégias para uma maior produção e maior consumo de combustíveis que sejam renováveis e sustentáveis (HIMMEL *et al.*, 2007).

O uso de biocombustíveis tem como objetivo a substituição de combustíveis fósseis, permitindo a diminuição da dependência por recursos não renováveis e a redução das emissões de gases de efeito estufa. A queima destes combustíveis representa aproximadamente 82% das emissões dos gases causadores do efeito estufa. Seja pelas questões ambientais ou pela importância em reduzir a dependência externa de energia, o etanol de cana-de-açúcar, que já apresenta indicadores ambientais muito positivos quando comparado a outras opções, representa uma alternativa viável na substituição de combustíveis fósseis (LAL, 2004).

Para produção de etanol é usada a sacarose da cana-de-açúcar e muitas pesquisas são realizadas para viabilizar o uso de bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima para produzir maior quantidade de etanol com menor área plantada. A utilização do bagaço tem uma série de vantagens: vem processado das moendas; está disponível em grandes quantidades; tem custo mínimo; está pronto para uso no local, evitando aumento de custo devido ao transporte (OLIVÉRIO & HILST, 2004).

Porém os materiais lignocelulósicos apresentam resistentes a bioconversão e requerem um pré-tratamento para aumentar sua digestibilidade e tornar a celulose mais acessível às enzimas celulolíticas. A bioconversão dos resíduos lignocelulósicos pode ser realizada por microrganismos como fungos basidiomicetos, baseado em seus produtos ou metabólitos, como enzimas e polissacarídeos (VASCONCELLOS NETO, 2010).

Assim, considerando que o bioma cerrado sul-mato-grossense possui uma grande diversidade de fungos de podridão branca (QUEVEDO *et al.*, 2012), ainda não explorada comercialmente, justifica-se levantar espécies produtoras de enzimas nesta região, que têm assumido importante papel na indústria, através dos processos biotecnológicos. Além disto representam uma vasta fonte de material bruto, obtidos a baixos custos, podendo ser convertidos em açúcares fermentáveis e usados como fonte renovável de produtos químicos, combustíveis e alimento entre outros (SANTOS, 2003).

1.1. Objetivo Geral

Estudar enzimas fúngicas da região da Bodoquena, MS, usando como substrato o bagaço de cana-de-açúcar para aplicações biotecnológicas.

1.2. Objetivos Específicos

- Identificar espécies de basidiomicetos de podridão branca;
- Produzir culturas puras das espécies identificadas;
- Avaliar o crescimento e selecionar fungos quanto ao potencial de produção de enzimas;
- Determinar a atividade enzimática do Basidiomiceto selecionado (*P. sanguineus*) usando como substrato bagaço de cana-de-açúcar;
- Verificar o teor de açúcares totais e lignina do bagaço de cana-de-açúcar, quando tratadas com *P. sanguineus*.

1.2. Organização do Trabalho

O presente trabalho contou com a parceria do Instituto de Botânica de São Paulo onde foi desenvolvida toda a parte experimental da pesquisa.

A tese está apresentada em capítulos, sendo que o capítulo I corresponde ao texto geral da tese e os demais, artigos que posteriormente serão enviados para publicação:

- Capítulo I - Introdução e revisão bibliográfica sobre os assuntos abordados na tese;
- Capítulo II - Artigo I - Basidiomicetos da Serra de Bodoquena, Mato Grosso do Sul: análise de crescimento e potencial enzimático;

- Capítulo III - Artigo II - Enzimas de *Pycnoporus Sanguineus* em bagaço de cana-de-açúcar para aplicações biotecnológicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum*, e é uma gramínea proveniente da Nova Guiné, introduzida no Brasil na época colonial, atualmente muito cultivada em regiões tropicais e subtropicais do país. São plantas da classe das monocotiledôneas, de folhas envoltentes e de caule em geral que resultou em várias espécies, as quais diferem entre si, principalmente quanto ao conteúdo de fibras e açúcares. Nos dias atuais, a maior parte da cana-de-açúcar cultivada é um híbrido de planta original com outras espécies da mesma família (RABELO *et al.*, 2011).

É a principal matéria- prima para produção de açúcar e etanol, uma planta de grande importância para a economia brasileira, responsável por geração de empregos e de energia. No processamento da cana-de-açúcar, após a separação da garapa, da qual são produzidos o açúcar e o etanol, o resíduo mais abundante é o bagaço que é em parte queimado para a geração de calor e energia para a própria usina e vem sendo comercializado para reduzir os problemas da crise no fornecimento de energia elétrica (MANZANO, 2000).

O bagaço da cana-de-açúcar é resultante do processo de moagem do colmo extraído para obtenção do caldo que passa por etapas até a obtenção do açúcar. Estima-se que, a cada tonelada de cana moída, obtém-se 280 Kg de bagaço, sendo que a cada ano sejam produzidos de 5 a 12 milhões de toneladas desse material, correspondendo a cerca de 30% do total da cana moída (BUCKERIDGE *et al.*, 2008).

A utilização do bagaço de cana (Figura 2.1) pode ser tanto para fins energéticos como não energéticos. Por exemplo, este pode ser empregado como matéria-prima na produção de papel, celulose aglomerado e compensado ou como volumoso, na alimentação animal (SILVA, 2003).

O fato do Brasil ser o maior país tropical do mundo é um fator positivo para a produção de energia de biomassa, considerando que a grande quantidade de bagaço de cana-de-açúcar gerado pelos processos de produção de etanol vem se tornar matéria-prima para outros processos produtivos, incluindo a produção de etanol através de tecnologias portadoras de

futuro, gerando emprego e desenvolvimento. Este é um cenário tão promissor que para cada 10 milhões de toneladas de biomassa seca é possível produzir 600 milhões de galões de etanol, considerando apenas o seu componente celulósico (PEREIRA JUNIOR *et al.*, 2008).



FIGURA 2.1 – Bagaço de *Saccharum officinarum* (Poaceae). Fonte: Battistelle *et al.* (2008).

2.2. Materiais lignocelulósicos

2.2.1. Lignina

É o segundo polímero terrestre mais abundante e o termo lignina significa, madeira, que foi introduzido por Anselme Payen em duas publicações em 1838 (PAYEN, 1838) para designar o resíduo solúvel obtido no tratamento da madeira por ácido nítrico concentrado, que por um longo período teve sua constituição química na obscuridade. Peter Klason em 1917 propôs que a lignina poderia ser classificada como uma substância macromolecular constituída de unidades do álcool coniferílico, mantidas juntas através de ligações do tipo éter.

Estudos realizados em 1940, baseados em reações clássicas da química orgânica, levaram a concluir que, de uma forma geral, a lignina era constituída de unidades fenilpropanóides unidas por ligações éter e carbono. Em 1954, Lange propõe que as principais unidades aromáticas presentes na estrutura da lignina eram a p-hidroxifenila, guaiacila e seringila. A primeira fórmula química para o sistema macromolecular foi proposta por Freudenberg em 1968 e confirmada posteriormente por outros pesquisadores (SANTOS, 2001).

A lignina é encontrada como parte integral da parede celular das plantas, emaranhada em uma complexa matriz de celulose e hemicelulose, representando uma importante fonte de

carbono abundante na Terra, perdendo apenas para a celulose. Sendo uma fonte de polímeros aromáticos renovável mais abundante na natureza, sua decomposição é indispensável para a reciclagem do carbono. É quimicamente recalcitrante e a desagregação pela maioria dos organismos é heterogênea devido à estrutura complexa. Porém os fungos de podridão branca produzem uma matriz extracelular de enzimas oxidativas sinérgicas que degrada eficientemente a lignina (WONG, 2009).

Muitos modelos hipotéticos da estrutura molecular da lignina foram propostos ao longo dos anos. A lignina é uma complexa macromolécula fenólica, hidrofóbica, constituída por unidades de fenilpropano, de características tridimensional e amorfa, representando de 20% a 30% do total dos lignocelulósicos (OKINO *et al.*, 2001).

A lignina (Figura 2.2) é resistente ao ataque de grande parte dos microrganismos, porque processos anaeróbios não tendem a atacar os anéis aromáticos, e sua degradação aeróbica é lenta. Na natureza, apenas fungos basidiomicetos de podridão branca são capazes de degradar a lignina de forma eficiente, onde solubilização e mineralização de ligninas naturais e sintéticas têm sido demonstradas (KIRK *et al.*, 1976).

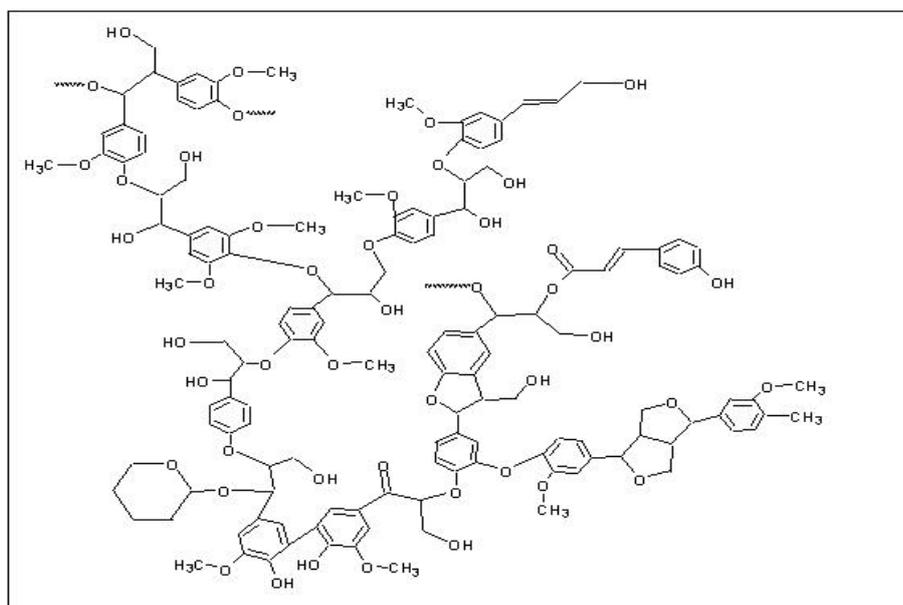


FIGURA 2.2 - Representação estrutural da lignina. Fonte: Modelo adaptado de Graminha (2008).

2.3. Celulose

É o polímero mais abundante em ambiente terrestre, constituído de cadeia longa e composto de um só monômero (D-glicose), unidas através de ligações glicosídicas, sendo o polímero linear, insolúvel em água. É um dos principais constituintes das paredes celulares das

plantas, em combinação com a lignina, hemicelulose e pectina, não sendo digerível pelo homem (ESPOSITO *et al.*, 1993).

A celulose se apresenta como recurso natural renovável, sendo a produção de bioprodutos e bioenergia renovável de menor custo com base materiais lignocelulósicos importante para o desenvolvimento sustentável dos seres humanos. A redução no custo de produção de celulase, a melhoria no desempenho de celulase, e um acréscimo na produção de açúcares de celulose são vitais para reduzir os custos de processamento de refinarias (ZHANG *et al.*, 2006).

A característica semicristalina da celulose dificulta grandemente sua degradação. Sua quebra raramente acontece por meio de um processo isolado, ocorre um ataque conjunto sobre um composto complexo de celulose (Figura 2.3) unido à lignina e hemicelulose. A ação conjunta de enzimas extracelulares específicas é essencial para realização deste processo (WYMAN, 1999).

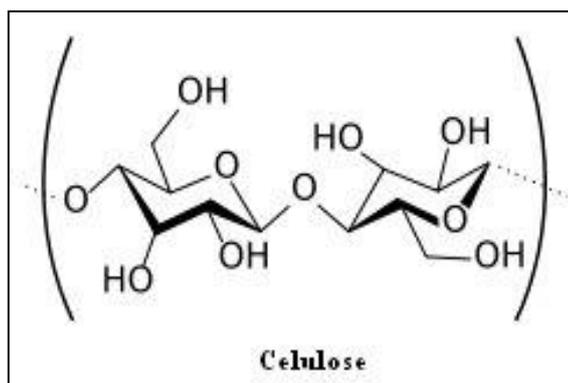


FIGURA 2.3 - Estrutura química da celulose. Fonte: Modelo adaptado de Graminha (2008).

2.3.1. Hemicelulose

É um polissacarídeo ramificado formado pela combinação de vários açúcares como pentoses, hexoses, ácidos e oxi-hexoses. Também chamada de poliose, de acordo com os açúcares presentes na cadeia principal do polímero, são classificadas como xilanas, glucomanas e galactanas (DIETRICH & WEGENER, 1989).

São componentes importantes de insumos do solo da floresta a partir de madeira e folhas. Estão presentes nas paredes celulares de quase todas as plantas terrestres. A estrutura detalhada da hemicelulose (Figura 2.4) e sua abundância variam muito entre as diferentes espécies e tipos de células. O papel biológico mais importante das hemiceluloses é a sua

contribuição para o reforço da parede celular por interação com a celulose e, em algumas paredes, com a lignina (SCHWYN & NEILANDS, 1987).

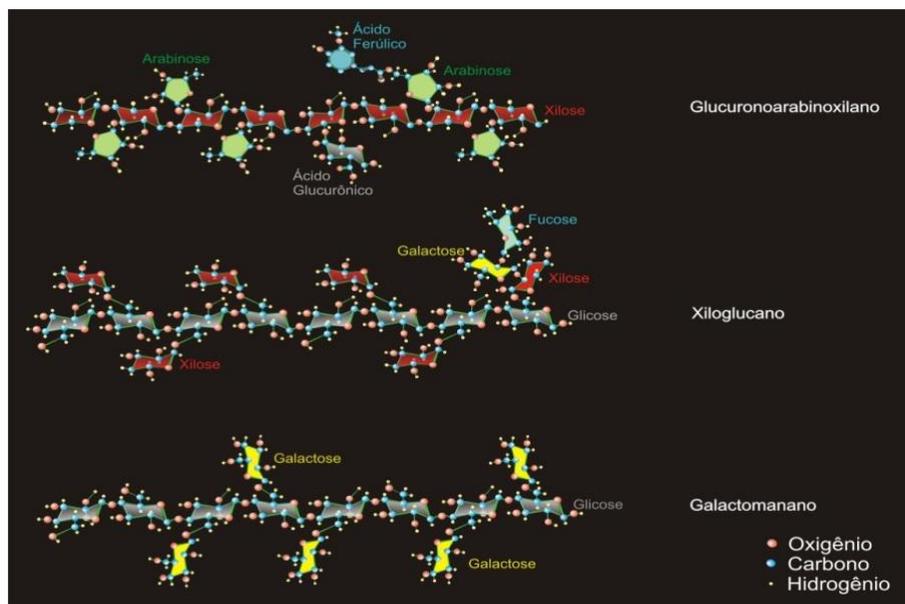


FIGURA 2.4 - Estrutura química das principais hemiceluloses de parede celular de plantas. Fonte: (BUCKERIDGE, 2008).

2.4. Fungos basidiomicetos e seu potencial biotecnológico

Os fungos constituem um grupo de organismos extremamente diversificados, distribuem-se ao redor de todo globo terrestre explorando habitats diversos como solos, plantas e animais ou outros que tenham matéria orgânica passível de colonização. Na sua maioria, são terrestres e aeróbios, crescem rapidamente, desenvolvem filamentos ramificados e a reprodução em grande parte ocorre através de esporos.

Levantamentos da década de 1990 propuseram que apenas 5% da diversidade de fungos eram conhecidos, com aproximadamente 69.900 espécies descritas na literatura. Representam, assim, um dos maiores grupos taxonômicos com o maior número de espécies na natureza, aproximando-se da casa dos 1,5 milhões de espécies (MMA, 2003).

São heterotróficos, produzem enzimas que degradam o substrato onde se encontram e absorvem os compostos mais simples, previamente degradados por um rico complexo enzimático. A variedade de enzimas hidrolíticas excretadas pelos fungos permite que esse grupo de organismos degrade e utilize quase todas as fontes de materiais orgânicos disponíveis na natureza, sendo essencialmente importantes para manutenção do equilíbrio ecológico (BONONI *et al.*, 1998).

Os fungos verdadeiros são classificados em Ascomycetos, Basidiomicetos, Zigomicetos e Quitridiomycetos. Eles diferem entre si, principalmente, pela ontogênese, Filogenia, reprodução sexuada e assexuada, produção de esporos e constituição de Parede celular (BERBEE & TAYLOR, 1992). Dentre os fungos verdadeiros, o grupo monofilético Basidiomycota (Figura 2.5) representa cerca de um terço das espécies descritas (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).



FIGURA 2.5 - Relação filogenética entre os fungos. Fonte: Fan (2000).

Os basidiomicetos possuem um papel fundamental na ciclagem de nutrientes e na manutenção dos ecossistemas terrestres, pois absorvem os nutrientes da matéria orgânica morta, utilizado para o seu crescimento e reprodução. É, assim, conhecida por apresentarem uma estrutura característica denominada de basídio, estrutura protuberante onde são produzidos e armazenados os esporos. Os basidiomicetos juntamente com alguns ascomycetos constituem o grupo dos macromycetos, e são comumente chamados de cogumelos (MORADALI *et al.*, 2007).

Este grupo é o principal responsáveis pela decomposição da madeira, composta por celulose e lignina, que dão resistência às paredes das células vegetais. A presença de um sistema ligninolítico de ação extracelular, oxidativo e altamente não específico, fez dos fungos lignocelulolíticos microrganismos capazes de atuar em diversos processos biotecnológicos. Grande parte das espécies de fungos basidiomicetos utiliza os componentes de madeira para crescimento. Os fungos degradadores de madeira são classificados em fungos de degradação

branca, degradação marrom e degradação branda ou macia, de acordo com a morfologia da degradação (MACHADO & MATHEUS, 2006).

Fungos causadores de podridão branca, degradam celulose, hemicelulose e lignina, quebrando-as em moléculas menores até CO_2 e H_2O e por isso são chamados de fungos lignocelulolíticos, causando a perda de resistência, tornando-a laminada, esponjosa e fibrosa e com uma coloração branca, resultando então o nome de podridão branca (SANTOS, 2004).

Espécies causadoras de podridão branca, por possuírem sistema enzimático capaz de degradar substâncias de estruturas tão complexas quanto à lignina, vêm sendo utilizadas em processos de tratamento de efluentes têxteis e na biorremediação de solos contaminados. Estas espécies também possuem potencial de aplicação na indústria papelreira no tratamento de efluentes e no processo de fabricação de papel, atuando na liberação das fibras da madeira após a deslignificação e na fase de branqueamento, substituindo com enorme vantagem o uso de substâncias químicas, principais causadoras de poluição da água (MATHEUS *et al.*, 2000).

2.5. Enzimas

As enzimas são moléculas proteicas, sendo, em sua maioria, polímeros constituídos por aminoácidos ligados por ligações peptídicas covalentes. Algumas são capazes de aumentar em até 10¹⁴ vezes a velocidade de determinadas reações, sem requerer condições extremas de pH, temperatura e pressão (LEHNINGER, 2000).

Atuam como catalisadores biológicos, são capazes de diminuir a energia de ativação requerida para formar um complexo de transição ativado que dará origem a um produto, aumentando a velocidade da reação sem alterar a constante de equilíbrio ou a variação de energia livre (TORTORA *et al.*, 2000).

Segundo a Comissão de Enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as enzimas estão classificadas em seis grandes grupos de acordo com o tipo de reação em que atuam, Oxirredutases, Transferases, Hidrolases, Liases, Isomerases e Ligases (SHULER, 2001).

Quase todas as enzimas preparadas em escala industrial são extracelulares, pois seu isolamento dos meios ou caldos de cultivo é geralmente mais simples, embora elas se encontrem em forma muito diluída nestes meios, o que pode tornar seu isolamento inviável (KIELING, 2002).

O processo de obtenção das enzimas se dá pela extração de tecidos animais e vegetais ou por fermentação. Contudo, a maioria das enzimas empregadas nos processos industriais é de origem microbiana. Muitos microrganismos já foram isolados na natureza e utilizados industrialmente, mas, a maioria deles de grande potencial enzimático, ainda não foi devidamente explorada e estima-se que apenas 5% dos fungos e 2% das bactérias já tenham sido avaliados e identificados como produtores de enzimas de interesse industrial (SILVA *et al.*, 2005).

As enzimas têm aplicações em vários segmentos e seu uso industrial inclui: hidrólise enzimática: produção de glicose; tratamento de resíduos; indústria têxtil: remoção de manchas, indústria de alimentos: produção de álcool etílico, etanol combustível, laticínios e ácidos orgânicos, resultando em uma indústria extremamente diversificada e com rendimentos econômicos consideravelmente altos (SOARES *et al.*, 2010).

2.5.1. Lignina peroxidase

É um grupo de enzimas oxi-redutases que catalisam a redução do peróxido de hidrogênio e a oxidação de uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos, sendo hemoproteínas monoméricas com massa molecular cerca de 40 KD (Figura 2.6) (DIETRICH & WEGENER, 1989).

A sua ação enzimática provem da redução cíclica do átomo de ferro no grupo hematina, na presença de H_2O_2 , a enzima se combina com esta molécula, formando um complexo que pode oxidar uma variedade de doadores de elétrons formando água no final (POMPEU, 2010).

São enzimas extracelulares, desempenhando importante papel durante a degradação do substrato. A enzima peroxidase é conhecida por sua capacidade de remoção de grupos fenólicos e aminas aromáticas de soluções aquosas e também de descoloração de efluentes de indústria têxtil (DURÁN, *et al.*, 2002).

Como as peroxidases clássicas, as LIP's são oxidadas por peróxidos de hidrogênio. A principal diferença funcional entre as LIP's e as peroxidases é que as primeiras podem oxidar anéis aromáticos que são apenas moderadamente ativados por doador de elétrons, Já as peroxidases agem em substratos aromáticos fortemente ativados (COURI *et al.*, 2000).

Na indústria de papel e celulose a peroxidase é utilizada na etapa de branqueamento da polpa e no tratamento de seus efluentes. Na indústria têxtil é utilizada para melhorar o branqueamento em lavanderias e inibir a transferência de cor durante a lavagem e para a

remoção do excesso de corante da água de lavagem de tecidos tingidos. A baixa especificidade do complexo enzimático peroxidase (H_2O_2) pode promover a oxidação de uma grande variedade de poluentes orgânicos (DURÁN, *et al.*, 2002).

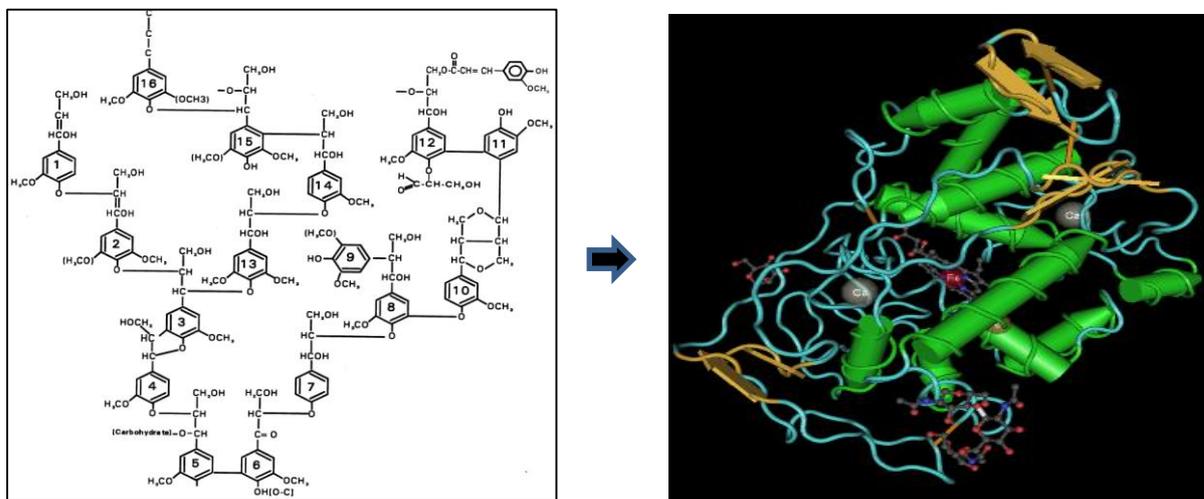


FIGURA 2.6 - Fórmula estrutural esquemática para a lignina e estrutura tridimensional da lignina peroxidase. Fonte: Lee (1997); Wong (2009).

2.5.2. Manganês peroxidase

Manganês peroxidase (MnP) (Figura 2.7) é uma enzima extra celular glicosilada, possui um grupamento heme, que foi descoberto em *Phanerochaete chrysosporium* há quase 20 anos atrás por duas equipes internacionais de pesquisa (M. Gold e Grupo de Crawford), (SCHELLER & ULVSKOV, 2010).

A MnP é a mais comum das ligninas peroxidase modificadas, é dependente de peróxido de hidrogênio e do íon Mn^{+2} e α -cetoácidos como lactato são responsáveis por estabilizar sua atividade (GRGIČ & PERDIH, 2003). Produzida por quase todos os basidiomicetose vários fungos do solo, colonizando a serrapilheira em decomposição. Estes fungos secretam oxidoreduases inespecíficas entre estas a manganês peroxidase, que desempenha um papel fundamental na degradação da lignina (ZHANG *et al.*, 2006).

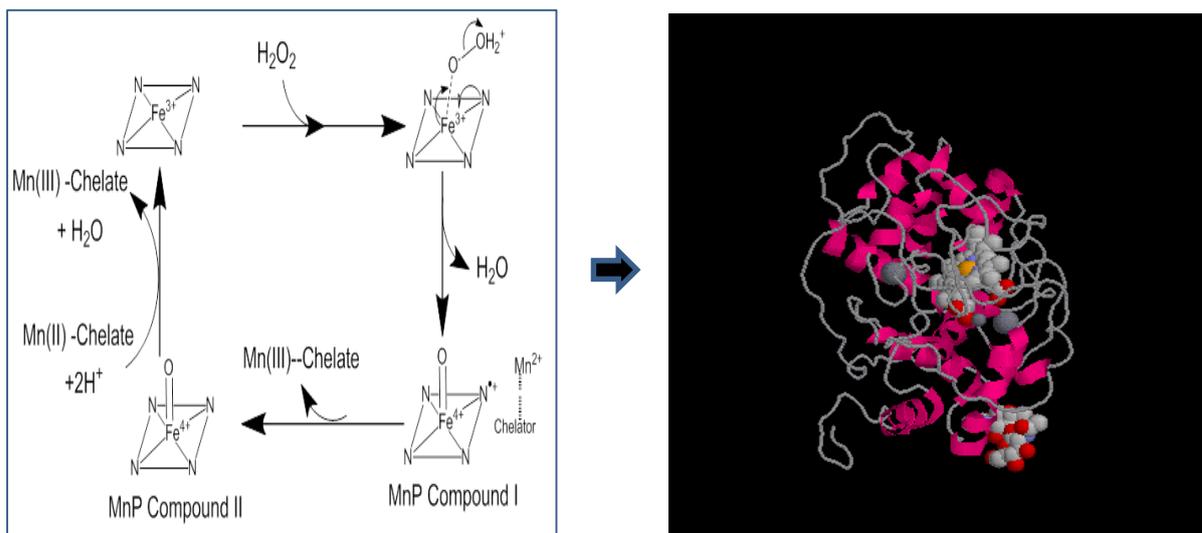


FIGURA 2.7 - Mecanismo que mostra o estado inicial e estrutura tridimensional do manganês peroxidase. Fonte: Glenn & Gold (1995); Wong (2009).

2.5.3. Lacases

As lacases (Figura 2.8) são polifenóis oxidase, cuproproteínas do pequeno grupo de enzimas chamadas cuproproteínas azuis, pertencem à uma ampla e diversificada superfamília de proteínas de oxidases (LUNDELL *et al.*, 2010), ou ainda enzimas fenoloxidase se fazem parte de um grupo de enzimas oxidases que complexam o cobre (KIELING, 2002).

São produzidas por fungos e, também, por plantas superiores, sendo secretadas pela maioria dos basidiomicetos. As lacases fúngicas em geral possuem 03 átomos de cobre, todos no estado de oxidação Cu²⁺ na enzima nativa.

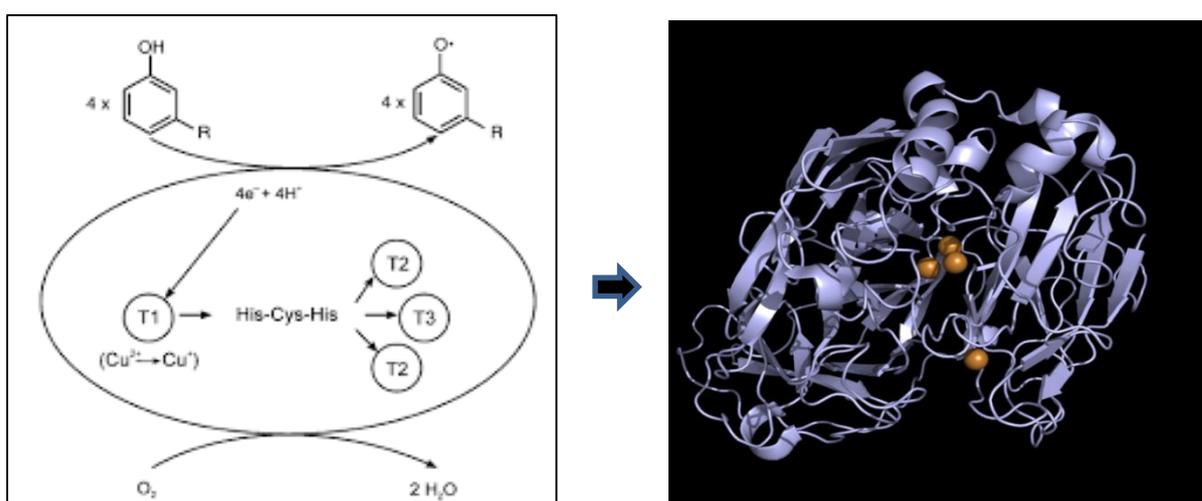


FIGURA 2.8 - Ciclo catalítico da lacase e estrutura tridimensional. Fonte: Baldrian (2006); Wong (2009).

Estas enzimas catalisam oxidações por extração de um elétron de substratos fenólicos gerando radicais fenoxilas. Devido a sua capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, permite que as enzimas sejam usadas em aplicações industriais como deslignificação, modificação de fibras da madeira, clareamento de corantes em processos têxteis, síntese de produtos químico-medicinais e remediação de solos e águas contaminadas (LANGH, *et al.*, 1997).

A lacase é uma das mais antigas enzimas descritas, sendo sua atividade relatada há mais de cem anos atrás, na árvore de laca japonesa, *Vernicifera rhus*, enzima envolvida no processo de degradação de material lignocelulósico, que contém quatro núcleos de cobre, e é capaz de oxidar o substrato usando oxigênio molecular como aceptor de elétrons (THURSTON, 1994).

Os múltiplos genes da lacase podem ser expressos por fungos ligninolíticos, com características físico-químicas diferentes codificando iso-enzimas com elevada similaridade na estrutura primária. As propriedades bioquímicas e físico-químicas de lacase como atividade enzimática, estabilidade, pH e temperatura, inicialmente fornecem importantes resultados para estudos básicos e para a aplicação das lacases na biotecnologia (MAYER & STAPLES, 2002).

2.5.4. A utilização da enzima para o processamento de biomassa para produção de etanol

A utilização da enzima para o processamento é relativamente recente. Enquanto a química de obtenções de açúcares a partir de madeira tem em torno de dois séculos de pesquisa e desenvolvimento, as enzimas para hidrólise enzimática somente 50 anos (MACHADO & MATHEUS, 2006).

Durante anos as enzimas foram utilizadas como catalisadores na produção de etanol através da hidrólise do amido. No entanto, utilizam-se enzimas para conseguir a celulose, um processo complexo e protegido por materiais resistentes ao ataque químico como a lignina e a hemicelulose (POMPEU, 2010).

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é um processo muito estudado por apresentar especificidade da reação, ausência de reações secundárias (que levariam à perda de rendimento), ausência de formação de produtos secundários (inibidores da fermentação alcoólica) e reação em condições suaves que não requerem altas pressões e temperaturas ou ambientes corrosivos para os equipamentos (BASTOS, 2007).

A cristalinidade da celulose, a proteção da lignina e as configurações espaciais do complexo celulose-hemicelulose-lignina tornam este tipo de hidrólise um processo lento e

pouco econômico. A estrutura capilar das fibras de celulose e a presença de metais diminuem a eficiência da hidrólise enzimática (LUNDELL *et al.*, 2010).

No processo enzimático, a hidrólise é catalisada por enzimas chamadas celulasas que atacam as cadeias de celulose para obter polissacarídeos menores, as enzimas exoglucanases atuam nos terminais não redutores das cadeias menores removendo a celobiose e β -glucosidases que hidrolisam a celobiose e outros oligômeros à glicose.

As enzimas conhecidas como celulasas hidrolisam a celulose liberando inclusive a glicose e outros açúcares, fonte de energia dos fungos, por degradação de parte de fibras de celulose. A celulase pode diminuir o comprometimento e o diâmetro das fibras de madeira. Um ataque fúngico preliminar facilita a abertura das fibras de madeira por métodos mecânicos (AGUIAR FILHO, 2008). A produção de celulasas pelos fungos é lenta, porém de custo potencialmente baixo.

A hidrólise conduzida em condições brandas em pH 4,8 e temperatura entre 45 e 50 °C apresenta custo de utilidade relativamente baixo (OGEDA & PETRI, 2010). No caso da hidrólise enzimática dependente bastante da natureza do material celulolítico, a principal vantagem é que a reação pode ser realizada em condições favoráveis, não sendo necessário temperaturas altas e pressões ou pH extremo.

Comparativamente, a hidrólise com ácido diluído encontra-se em um estágio avançado, o limitante é o rendimento de 50 a 70%. A hidrólise com ácido concentrado apresenta rendimentos maiores e maiores problemas de inibidores, necessidade de recuperação do ácido e de 23 equipamentos resistentes à corrosão, o que compromete o desempenho econômico do processo. A hidrólise enzimática apresenta rendimentos de 75 a 85%, e melhorias são esperadas para 85 a 95%. Além disso, a não utilização de ácidos pode representar grandes vantagens não só econômica, em equipamentos com materiais mais baratos e menor custo operacional, como também ambiental, pois não há produção de resíduos (MACHADO & MATHEUS, 2006).

REFERÊNCIAS

- AGUIAR FILHO. J.M.M. **Análise enzimático de fungos lignocelulósicos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. Piracicaba, 2008. 79p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**, 4.ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1996.

BALDRIAN, P. Fungal laccases - occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v.30, n.1, p.215-242, mar. 2006.

BATTISTELLE, R.A.G.; MARCÍLIO, C.; LAHR. Emprego do bagaço da cana-de-açúcar (*saccharum officinarum*) e das folhas caulinares do bambu da espécie *Dendrocalamus giganteus* na produção de chapas de partículas. **Revista Minerva**, v.5, n.3, p.297-305, set./dez. 2008.

BASTOS, V.D. **Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias**. 1.ed. Rio de Janeiro: BNDES/Setorial, 2007.

BERBEE, M.L.; TAYLOR, J.W. Convergence in ascospore discharge mechanism among pyrenomycete fungi based on 18S ribosomal RNA gene sequence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.1, n.1, p.59-71, mar. 1992.

BONONI, V.L.R.; GRANDI, R.A.P. **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 1998.

BUCKERIDGE, M.S. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: SIMPÓSIO DE ETANOL CELULÓSICO, 1, 2008, São Paulo. **Apresentação...** São Paulo, FAPESP, 2008. Disponível em: <<http://www.fapesp.br/chamadas/bioen/apresentacoes/20080703-MBuck.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2014.

CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F.; SILVA, S.S.; SILVA, J.B.A.; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista analytica**, v.1, n.44, p.44-48, dez. 2009/jan. 2010.

COURI, S.; TERZI, S.C.; PINTO, G.A.S.; FREITAS, S.P; COSTA, A.C.A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v.36, n.3, p.255-261, out. 2000.

DIETRICH, F.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. New York: Walter de Gruyter, 1989.

DURÁN, N.; ROSA, M.A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of Laccases and Tyrosinases (Phenoloxidases) Immobilized on Different Supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, n.7, p.907-931, dez. 2002.

ESPOSITO, E.; INNOCENTINI-MEI, L.H.; FERRAZ, A.; CANHOS, V. P.; DURAN, N. Phenoloxidases and hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* (EUC-2050 strain): Applications. **Journal of Biotechnology**, v.20, n.3, p.219-228, jun.1993.

FAN, L. **Production of extra-cellular polyssacharide from *Agaricus blazei* by submerged and solid state fermentation and its antitumor effect**. Curitiba, 2000. 50p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná.

GLENN, J.K.; GOLD, M.H. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.242, n.2, p.329–41, nov.1985.

GRAMINHA, E.B.N.; GONÇALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A.; SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid- state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v.144, n.1-2, p.1-22, jun. 2008.

GRGIČ, I.; PERDIH, A. Stimulation of ligninolytic enzyme production in *Phanerochaete chrysosporium* by polyxyalkanes. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, n.3, p.360-368, mar. 2003.

HIMMEL, M.E.; DING, S.Y.; JOHNSON, D.K.; ADNEY, W.S.; NIMLOS, M.R.; BRADY, J.W.; FOUST, T.D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **SCIENCE**, v.315, n.5813, p.804-807, fev. 2007.

KIELING, D.D. **Enzimas: Aspectos gerais**. Florianópolis, 2002. 15p. Dissertação (Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina.

KIRK, T.K.; CONNORS, W.J.; ZEIKUS, J.G. Requirement for a Growth Substrate During Lignin Decomposition by Two Wood-Rotting Fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.32, n.1, p.192-194, jul. 1976.

LAL, R. Soil Carbon Sequestration Impacts on Global Climate Change and Food Security. **Science**, v.304, n.5677, p.1623-1627, jun. 2004.

LANGH, E.; ELLER, G.; ZADRAZIL, F. Lignocellulose decomposition and production of ligninolytic enzymes during interaction of white rot fungi with soil microorganisms. **Microbial Ecology**, v.34, p.1-10, ago. 1997.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v.56, n.1, p.1-24, jul. 1997.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of Biochemistry**. 5.ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2000. (vol.3)

LUNDELL, T.K.; MÄKELÄ, M.R.; HILDÉN, K. Lignin-modifying enzymes in Filamentous basidiomycetes—ecological, functional and phylogenetic review. **Journal of Basic Microbiology**, v.50, n.1, p.5-20, fev. 2010.

MACHADO, K.M.G.; MATHEUS, D.R. Biodegradation of remazol brilliant blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.4, p.468-473, out./dez. 2006.

MANZANO, R.P.; FUKUSHIMA, R.S.; GOMES, J.D.F.; GARIPPO, G. Digestibilidade do bagaço de cana-de-açúcar tratado com reagentes químicos e pressão de vapor. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.4, p.1196-1204, jul./ago. 2000.

MATHEUS, D.R.; BONONI, V.L.R.; MACHADO, K.M.G. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.16, n.5, p.415-421, jul. 2000.

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C. Lacase: New functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v.60, n.6, p.551- 565, jul. 2002.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. **Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil**. Brasília: COBIO/MMA-GTB/CNPq-NEPAM/UNICAMP-MMA/GEF/PNUD, 2003. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/verteb.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2014.

MORADALI, M.F.; MOSTAFAVI, H.; GHODS, S.; HEDJAROUDE, G.A. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **International Immunopharmacology**, v.7, n.6, p.701-724, jun. 2007.

OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. Hidrólise enzimática de biomassa. Instituto de Química, **Química Nova**, v.33, n.7, p.1549-1558, set. 2010.

OKINO, E. Y. A.; SANTANA, M. A. E.; SOUZA, M. R.; SOUSA, M. E. Dimensional stability and mechanical properties of acetylated Hevea brasiliensis flakeboards. **Journal of Tropical Forest Products**, v. 7, n. 1, p. 96-102, 2001.

OLIVÉRIO, J.L.; HILST, A.G.P. DHR - DEDINI Hidrólise Rápida (DEDINI Rapid Hydrolysis) - revolutionary process for producing alcohol from sugar cane bagasse. **International Sugar Journal**, v.106, n.1263, p.168-172, [s. m.] 2004.

PAYEN, A. Mémoire sur la composition du tissu des plantes et du ligneux. In: **Comptes Rendus**, Paris: Academie des Sciences, 1838. (vol. 7.) p.1052-1056.

PEREIRA JUNIOR, N.; COUTO, M.A.P.G.; ANNA, L.M.M.S. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. In: PEREIRA JUNIOR, N. (Eds.) **Series on Biotechnology**, Rio de Janeiro: Escola de Química, 2008. Vol. 2. p. 8-47.

POMPEU, G.B. **Comportamento enzimático de quatro fungos lignocelulolíticos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar e expostos a duas concentrações de nitrogênio, visando à produção de etanol**. Piracicaba, 2010. 96p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

QUEVEDO, J.R.; BONONI, V.L.R.; OLIVEIRA, A.K.M.; GUGLIOTA, A.M. Agaricomycetes (Basidiomycota) em um fragmento florestal urbano na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v.10, n.4, p.430-438, out./dez. 2012.

RABELO, S.C.; FONSECA, N.A.A.; ANDRADE, R.R.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A.C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. **Biomass and Bioenergy**, v.25, n.7, p.2600-2607, jul. 2011.

SANTOS, F.H. Análise Conformacional de modelos de lignina. **Química Nova**, v.24, n.4, p.480-490, jul./ago. 2001.

SANTOS, S.X.; CARVALHO, C.C.; BONFÁ, M.; SILVA, R.; CAPELARI, M.; GOMES, E. Screening for pectinolytic activity of wood rotting basidiomycetes and characterization of the enzymes. **Folia Microbiol**, v.49, n.1, p.46-52, jan. 2004.

SANTOS, S.X. **Diversidade, isolamento em cultura e perfil enzimático de fungos decompositores de madeira da Estação Ecológica do Noroeste Paulista**. Rio Claro, 2003. 222p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada)) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Universidade Estadual Paulista.

SHELLER, H.V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v.61, n.1, p.263-289, jun. 2010.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v.160, n.1, p.47-56, jan.1987.

SHULER, M.L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering – Basic Concepts**. Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences. New Jersey: Prentice Hall Int, 2001.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E.S.; SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochemistry**, v.40, n.8, p.2885-2889, jul. 2005.

SILVA, R.N.; MONTEIRO, V.N.; ALCANFOR, J.D.X.; ASSIS, E.M.; ASQUIERI, E.R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.3, p.337-341, set./dez. 2003.

SOARES, I.A.; FLORES, A.C.; ZANETTIN, L.; PIN, H.K.; MENDONÇA, M.M.; BARCELOS, R.P.; TREVISOL, L.R.; CARVALHO, R.D.; SCHAUREN, D.; ROCHA, C.L.M.S.C.; BARONI, S. Identification of the amylolytic potential of mutant strains of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. **Food Science and Technology**, v.30, n.3, p.700-705, jul./set. 2010.

THURSTON, C.F. The structure and function of fungal lacases. **Microbiology**, v.140, n.1, p.19-26, jan. 1994.

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

VASCONCELLOS NETO, J. R. T. **Diversidade e seleção de fungos Basidiomicetos Afiloforóides para produção de enzimas lignocelulolíticas em área de Mata Atlântica do Sul da Bahia**. Feira de Santana, 2010. 72p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana.

WONG, D.W. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.157, n.2, p.174-209, mai. 2009.

WYMAN, C.E. Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges.

Annual Review of Energy and the Environment, v.24, n.1, p.189- 226, nov. 1999.

ZHANG, YHP.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v.24, n.5, p.452-481, set./out. 2006.

CAPÍTULO II

ARTIGO 1

BASIDIOMICETOS DA SERRA DE BODOQUENA, MATO GROSSO DO SUL: CRESCIMENTO E POTENCIAL ENZIMÁTICO

Josiane Ratier de Quevedo¹; Vera Lúcia Ramos Bononi²; Kennedy Francis Roche³

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; ²Pesquisador Científico do Instituto de Botânica, São Paulo; ³Professor Titular da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

RESUMO

A Serra da Bodoquena é caracterizada pela grande extensão de ambientes naturais bem preservados e diferentes habitats, que garantem à região uma alta diversidade de espécies. Em relação à diversidade de fungos, seu potencial é praticamente desconhecido. Os fungos de podridão branca possuem potencial em degradar compostos lignocelulósicos, como a madeira, o que torna este grupo um alvo para pesquisas biotecnológicas. As principais enzimas relacionadas à degradação de compostos lignocelulósicos são as lacases, lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP). O objetivo deste trabalho foi identificar, avaliar o crescimento e o potencial enzimático de basidiomicetos da Serra da Bodoquena – MS. Foram realizadas três coletas no ano de 2012, totalizando 28 espécies; as mesmas foram fotografadas, analisadas morfológicamente, identificadas, e preservadas no herbário do Instituto de Botânica em São Paulo, SP. Foram selecionadas 10 espécies que apresentaram melhores condições estruturais, sendo inoculadas com cinco repetições. As espécies que proporcionaram cultura foram *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune* e o *Pleurotus agaves*. Foram avaliados tanto o crescimento do micélio como o diâmetro do halo formado em cada tratamento e, também, o seu potencial enzimático. Nos resultados observou-se que o fungo *Pycnoporus sanguineus* obteve maior crescimento em todos os meios selecionados e apresentando potencial enzimático.

Palavras chave: Diversidade, Polyporaceae, Hymenochaetaceae, enzimas lignocelulósicas

ABSTRACT

The Bodoquena Sierra is characterized by the large expanse of natural environments preserved and different habitats, which guarantee the region a high diversity of species. Regarding the diversity of fungi, their potential is virtually unknown. The white rot fungi have the potential to degrade lignocellulosic compounds, such as wood, which makes this group a target for biotechnological research. The main enzymes related to degradation of lignocellulosic compounds are laccases, lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP). The objective of this study was to identify, evaluate growth and enzymatic potential basidiomycetous the Serra da Bodoquena - MS. Three samples were taken in 2012, totaling 28 species; they have been photographed, analyzed morphologically identified, and preserved in the herbarium of the Botanical Institute in São Paulo, SP. We selected 10 species with better structural conditions, being inoculated with five repetitions. Species which provided culture were *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune* and *Pleurotus agaves*. They were evaluated both growth of the mycelium as the diameter of the halo formed in each treatment, and also their enzymatic potential. From the results it was observed that the fungus *Pycnoporus sanguineus* increased growth obtained in all the selected means and presenting enzyme potential.

Keywords: Diversity, Polyporaceae, Hymenochaetaceae, lignocellulosic enzymes

1. INTRODUÇÃO

A Serra da Bodoquena é uma região rica em diversidade de espécies animais, vegetais e de micro-organismos. Isso faz com que seja considerada uma área prioritária para a conservação da biodiversidade no Cerrado (MMA, 1999). No entanto, à diversidade de fungos da região, é praticamente desconhecida.

Conforme literatura, cerca de 105.000 espécies foram descritas, provavelmente apenas uma pequena proporção dos que existem. O conhecimento das comunidades de basidiomicetos em áreas tropicais é fragmentado e reduzido (GIBERTONI *et al.*, 2007), haja vista que, para o Estado de Mato Grosso do Sul, existem apenas dois trabalhos com identificação de basidiomicetos realizados no Pantanal do Rio Negro e em Campo Grande (QUEVEDO *et al.*, 2012).

Os basidiomicetos são popularmente chamados de cogumelos ou “orelhas-de-pau”, encontrados nos troncos de florestas do mundo todo, são macroscópicos e facilmente coletados

e preservados. Possuem um papel fundamental na ciclagem de nutrientes e na manutenção dos ecossistemas terrestres, pois absorvem os nutrientes da matéria orgânica morta, utilizado para o seu crescimento e reprodução (MORADALI *et al.*, 2007).

Este grupo é o principal responsáveis pela decomposição da madeira, composta por celulose e lignina, que dão resistência às paredes das células vegetais, utilizando-se desses componentes para seu crescimento. Os fungos degradadores de madeira são classificados em fungos de degradação branca, marrom e branca ou macia, de acordo com a morfologia da degradação (MACHADO & MATHEUS, 2006).

Espécies causadoras de degradação branca, por possuírem sistema enzimático capaz de degradar substâncias de estruturas tão complexas quanto à lignina, vêm sendo utilizadas em processos de tratamento de efluentes têxteis e na biorremediação de solos contaminados. Estas espécies também possuem potencial de aplicação na indústria papelreira no tratamento de efluentes e no processo de fabricação de papel, atuando na liberação das fibras da madeira após a deslignificação e na fase de branqueamento, substituindo com enorme vantagem o uso de substâncias químicas, principais causadoras de poluição da água (MATHEUS *et al.*, 2000).

Considerando que a Serra da Bodoquena possui uma grande diversidade de fungos ainda não explorada, justifica-se levantar espécies produtoras de enzimas nesta região, que têm assumido importante papel na indústria, através dos processos biotecnológicos.

Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi identificar, avaliar o crescimento e o potencial enzimático de basidiomicetos da Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de coleta

A área de estudo compreende a RPPN Estância Mimosa (20°58'57"S e 56°30'58"O; 390 m de altitude), localizada às margens do rio Mimoso, na área rural do município de Bonito, serra da Bodoquena, a 15 km de sua área urbana, no estado de Mato Grosso do Sul.

A Serra da Bodoquena, localizada na porção sudoeste do Estado, é uma região montanhosa com cerca de 300 km de comprimento no sentido norte-sul e 20-50 km de largura no sentido Leste-Oeste (BOGGIANI *et al.*, 1993), conforme Figura 1.

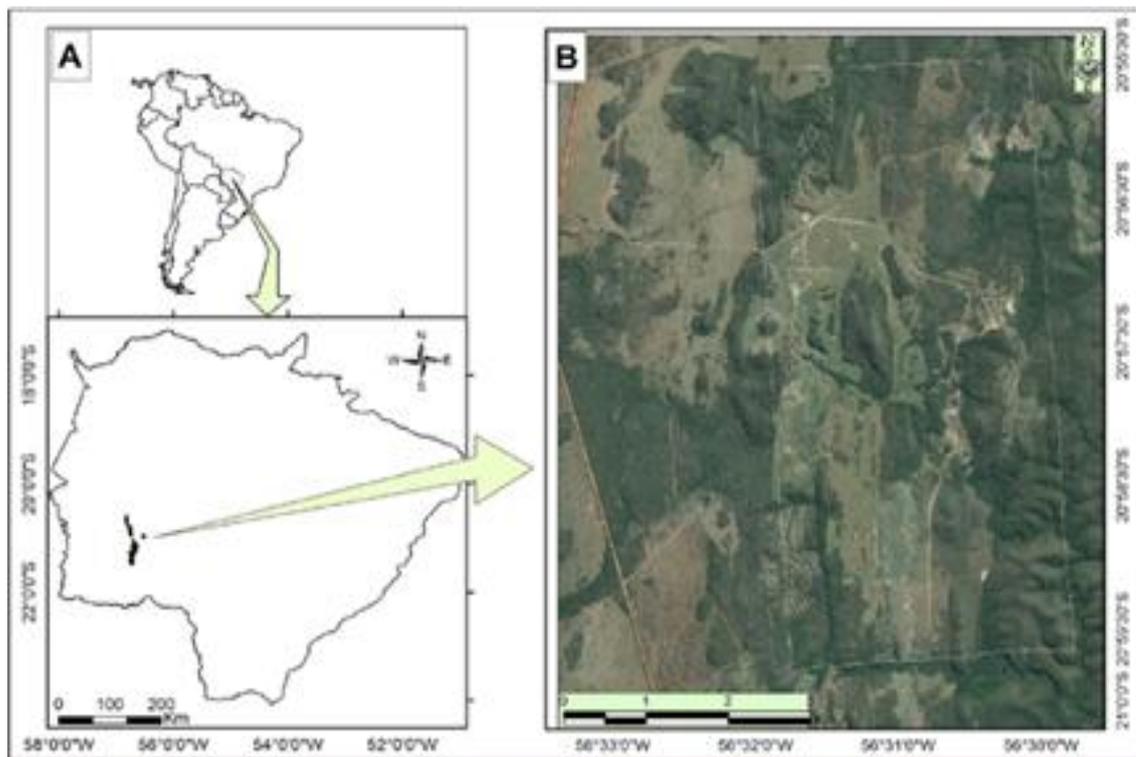


Figura 2.9 - Localização da Serra da Bodoquena (A) e RPPN Estância Mimosa (B), no município de Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil.

A altitude média na região varia de 400 a 600 m acima do nível do mar, com valores máximos de altitude em torno dos 770 m em sua porção norte e valores mínimos pouco abaixo dos 300 m. A região é rica em nascentes, funcionando como um extenso divisor de águas entre a Bacia do Rio Paraguai, localizada a oeste, e as sub-bacias do Rio Apa, ao sul, e Rio Miranda, a leste (SALZO & MATOS, 2006).

O clima é do tipo tropical sub quente, segundo classificação de Köppen, com temperaturas médias anuais entre 22 °C e 26 °C, temperaturas máximas em torno de 35 °C a 40 °C e mínimas podendo chegar próximas de 0 °C. A umidade relativa do ar é baixa, raramente atingindo 80%, e a precipitação média anual é de cerca de 1400 mm, com verões quentes e chuvosos de novembro a março, e invernos secos de abril a outubro (IBGE, 2006). Em termos biogeográficos, a Serra se localiza em áreas de transição e sob influência do Cerrado e Pantanal, apresentando também influências da Mata Atlântica e do Chaco. Desta forma, sua paisagem é bastante complexa com relação à diversidade de fisionomias vegetais, predominando florestas estacionais decíduais e semidecíduais, especialmente em áreas montanhosas, matas ciliares e de galeria ao longo de diferentes tipos de corpos d'água, manchas de savana florestada (cerradão), savana arborizada (cerrado stricto sensu), campos naturais secos e úmidos, além de

pastagens antrópicas e áreas perturbadas em diferentes estágios de regeneração natural (POTT & POTT, 2003).

2.2. Coleta, identificação, crescimento e testes enzimáticos

Foram realizadas três coletas de fungos nos meses de outubro, novembro e dezembro de 2012, e posteriormente secos conforme recomendado em FIDALGO & BONONI (1984). A identificação foi feita usando chaves de identificação, observação de microestruturas e comparação com material de herbário. Todo material foi depositado no Herbário Científico “Maria Eneyda P. Kauffmann Fidalgo”, do Instituto de Botânica. A classificação seguida foi segundo KIRK *et al.* (2008).

Cada basidioma foi conduzido a câmara de fluxo laminar, sendo retirado pedaços de aproximadamente 01 cm² do contexto que foram colocados no meio de cultura BDA (Batata-dextrose-ágar) preparado previamente a coleta. Uma vez crescidos em placa de Petri e sem contaminação, procedeu-se a conservação pelos métodos Castelani ou água destilada estéril, tubo com meio de cultura Ágar Extrato de Malte (MEA) e papel filtro.

Para igualar a idade fisiológica dos cultivos, cada linhagem foi crescida no meio de cultura MEA por sete dias, em Biochemical oxygen demand – BOD em 25 °C, e foram retirados discos de micélio com diâmetro de 5 mm e inoculados no centro das placas.

Foram selecionados três fungos (*Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune* e *Pleurotus agaves*) para análise de crescimento e potencial enzimático.

Foram avaliados o crescimento do micélio e o diâmetro do halo formado em cada tratamento, diariamente, por quatro dias, e mensurado o diâmetro de cada colônia, nos dois sentidos perpendiculares, até que o micélio de qualquer das colônias atingisse a borda da placa. O diâmetro do crescimento micelial (cm) e a velocidade de crescimento micelial foram determinados, após a inoculação, pela diferença diária entre as medidas de diâmetros consecutivos, até o sétimo dia. Cada unidade experimental foi constituída por uma placa de Petri. Para avaliar o complexo enzimático foram realizados testes enzimáticos qualitativos em placas de Petri com os meios: Ágar Extrato de Malte 2% para crescimento, MEA e o corante azul brilhante de remazol R-RBBR para sistema degradativo lignolítico (OKINO *et al.*, 2001; MACHADO & MATHEUS, 2006), guaiacol e α -naftol para lacase; pirogalol para peroxidases (STALPERS, 1978; SCHWYN & NEILANDS, 1987) e enzimas celulolíticas com vermelho congo, carboximetilcelulose (CMC) e meio basal.

Foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial A (4) x B (3) (A = meios, B = isolados) com quatro repetições cada tratamento. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5% de significância para comparação das médias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificadas 28 espécies de Agaricomycetes (Basidiomycota), distribuídas em quatro ordens e dez famílias, listadas dentro de seus grupos taxonômicos e por ordem alfabética, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Espécies de fungos identificados na Serra de Bodoquena, Mato Grosso do Sul

FAMÍLIA	ESPÉCIE
Agaricaceae	<i>Leucocoprinus brebissonii</i>
	<i>Phaeomarasmius gracilis</i>
Bolbitiaceae	<i>Bolbitius vitellinus</i>
Colostomataceae	<i>Calostoma zanchianum</i>
Hymenochaetaceae	<i>Phellinus linteus</i>
	<i>Phellinus sancti-georgii</i>
	<i>Phylloporia spathulata</i>
Ganodermataceae	<i>Ganoderma australe</i>
	<i>Ganoderma multiplicatum</i>
Meruliaceae	<i>Aquascypha hydrophora</i>
	<i>Cymatoderma dendriticum</i>
	<i>Stereum lamellatum</i>
Pleurotaceae	<i>Pleurotus agaves</i>
Polyporaceae	<i>Coriolopsis byrsina</i>
	<i>Hexagonia hydnoides</i>
	<i>Hexagonia papyracea</i>
	<i>Lentinus crinitus</i>
	<i>Microporellus dealbatus</i>
	<i>Nigroporus vinosus</i>
	<i>Polyporus arcularius</i>
	<i>Polyporus grammocephalus</i>
	<i>Pycnoporus sanguineus</i>
	<i>Trametes cingulate</i>
	<i>Trametes membranacea</i>
<i>Tyromyces duracinus</i>	
Schizophyllaceae	<i>Schizophyllum sp.</i>
	<i>Schizophyllum commune</i>
Thelephoraceae	<i>Thelephora aurantiaca</i>

3.1. Família Agaricaceae

- *Leucocoprinus brebissonii* (Godey) Locq.:
 - ✓ Distribuição geográfica: Espécie cosmopolita, citada nas Américas para Venezuela, Bermudas, Martinica, Trinidad e Tobago (PEGLER, 1983).
 - No Brasil citada para o Estado de São Paulo, nos Parques Estaduais das Fontes do Ipiranga (GRANDI *et al.*, 1984; PEGLER, 1997; GIMENES, 2007) e Ilha do Cardoso (CAPELARI, 1989), e Rio Grande do Sul (PEREIRA & PUTZKE, 1990).
 - Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do sul: Bonito, Estância Mimosa.
- *Phaeomarasmius gracilis* (Quél.):
 - ✓ Distribuição geográfica: Espécie com referência para Chile, Argentina e Brasil, no Rio Grande do Sul (SINGER & DIGILIO, 1952; PEREIRA & PUTZKE, 1990). Constitui primeira citação para o Estado.
 - ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do sul: Bonito, Estância Mimosa.

3.2. Família Bolbitiaceae

- *Bolbitius vitellinus* (Pers. ex Fr.):
 - ✓ Distribuição geográfica: A espécie é cosmopolita (PEGLER, 1997) e geralmente ocorre sobre húmus, no solo, sendo frequente em vários continentes.
 - No Brasil, foi citada para os Estados de São Paulo (PEGLER, 1997) e Rio Grande do Sul (PEREIRA & PUTZKE, 1990). Na Venezuela, citada por Dennis (1970).
 - ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do sul: Bonito, Estância Mimosa, sobre esterco.

3.3. Família Colostomataceae

- *Calostoma zanchianum* (Rick):
 - ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do sul: Bonito, Estância Mimosa.

3.4. Família Hymenochaetaceae

- *Phellinus linteus* (Berk. & M.A. Curtis):
 - ✓ Descrição - Basidiósporos castanho-dourados, ovóides a subglobosos e setas abundantes são características distintas de *Phellinus linteus*. O desenvolvimento dos basidiomas é tipicamente unglado a sub-aplanado, podendo ser dimidiado a alongado (RYVARDEN, 2004);
 - ✓ Distribuição geográfica: circumglobal (RYVARDEN, 2004). Constitui primeira citação para o Estado de Mato grosso do Sul.
 - Basidioma perene, ressupinado a efuso-reflexo, dimidiado a alongado, lenhoso, 1-6,5 x 0,3- 3,7 x 0,2-0,9 cm. Superfície abhimental bege a castanho-escura, escruposa, concentricamente zonada, com pequenos e recentes basidiomas crescendo perpendicularmente aos mais velhos. Margem aguda a arredondada, castanho-pálida a acinzentada, com porção estéril inferior. Superfície himenial poróide, marrom-acastanhada, poros circulares a irregulares, 5-6 poros mm⁻¹, com dissepimentos inteiros e finos. Contexto amarelo-dourado e lustroso a castanho-escuro, com fracas zonas concêntricas. Sistema hifálico dimítico; hifas não amilóides e não dextrinóides; hifas generativas hialinas, 1,25-2,5 µm diâmetro; hifas esqueléticas castanho-escuras, parede espessa e moderadamente intumescidas em KOH, raramente ramificadas, 3,75-5 µm diâmetro Elementos estéreis: setas himeniais abundantes, parede espessa, subuladas, 18,75-26,25 x 5-10 µm. Basídios não observados, mas clavados, 11-13 x 6-7 µm, segundo Ryvar den (2004). Basidiósporos ovóides a subglobosos, castanho-104 dourados, parede levemente espessa, 3,75-5 x 2,5-3,75 µm. Substrato: tronco de árvore viva.
 - ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do sul: Bonito, Estância Mimosa, em tronco de árvore viva.

- *Phellinus sancti-georgii* (Pat.):
 - ✓ Distribuição geográfica: americana, conhecida na Venezuela (RYVARDEN, 2004). Constitui primeira citação para o stado de Mato Grosso do Sul;
 - Basidioma perene, pileado séssil, semicircular, unglado, ligeiramente dimidiado, conato lateralmente, até quatro cm comprimento, 05 cm largura e 2,8 cm espesso na base. Superfície abhimentalcastanho-escura a enegrecida no centro, castanho-amarelada próximo à margem, com zonas sulcadas, tomentosa,

radial e irregularmente estriada, com distinta linha negra abaixo do tomento. Margem redonda, lisa, com faixa estéril inferior amarelada de até 02 mm. Superfície himenial poróide, castanho-escuro, refringente, poros circulares, 7-8 poros/mm; tubos indistintamente estratificados, frágeis e finos, até 02 mm profundos. Contexto castanho-fulvo a avermelhado, fibroso, denso, até 02 mm espesso com linha negra separando do tomento. Sistema hifálico dimítico; hifas não amilóides e não dextrinóides; hifas generativas castanho-claras a castanho-amareladas, com septos simples, 3,75-5 μm diâmetro; hifas esqueléticas castanho-escuro a amarelo-douradas, parede espessa a semi-sólida, 3,75-6,25 μm diâmetro. Elementos estéreis: setas himeniais e hifas setiformes ausentes. Basídios não observados. Basidiósporos globosos, castanho-avermelhados, não dextrinóides, parede espessa, cinco μm diâmetro. Substrato: tronco morto de angiosperma.

- ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do sul: Bonito, Estância Mimosa, em tronco de árvore morta.

A presença de tubos frágeis e finos parece ser característica distintiva desta espécie dentro do gênero que, juntamente ao tipo dos basidiósporos, a diferencia de *Phellinus baccharidis* (Pat.) Pat., espécie mais próxima, cujos basidiósporos são hialinos a amarelo-pálidos e ligeiramente maiores (5-6 (-6,5) μm diâmetro) (RYVARDEN, 2004).

- *Phylloporia spathulata* (Hook.):
 - ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do sul: Bonito, Estância Mimosa, sobre madeira em decomposição.

3.5. Família Ganodermataceae

- *Ganoderma multiplicatum* (Mont.) Pat.:
 - ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do sul: Bonito, Estância Mimosa, em tronco de árvore viva.
 - Comentários: *Ganoderma multiplicatum* pode ser reconhecido pelo basidioma sésil, dimidiado, 10 x 8 x 2 cm, com superfície pilear lacada, avermelhada, superfície himenial poroide, 6-8 poros/mm, sistema hifálico dimítico, células

da cutícula amilóides, pouco sinuosas, regulares, raras protuberâncias ou lóbulos; e basidiósporos elipsoides, com ápice truncado, 7-8 x 5-6 mm. Apresenta distribuição tropical (RYVARDEN, 2004) e no Brasil foi citada para os Estados de Alagoas, Amazonas, Pará, Rio de Janeiro, Rondônia, Roraima, Santa Catarina e São Paulo (GUGLIOTTA & ABRAHÃO, 2012) e já foi citada anteriormente para o Estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande (QUEVEDO *et al.*, 2012).

- *Ganoderma australe* (Fr.) Pat.:
 - Comentários: *Ganoderma australe* apresenta basidioma aplanado até 20 cm larg. e 05 cm espesso, superfície superior castanha opaca, superfície himenial poróide, 3-5 poros mm⁻¹, sistema hifálico dimítico, hifas conectivas com ansas e basidiósporos truncados 8-12 x 6-8 mm. Espécie de distribuição neotropical (RYVARDEN, 2004), apresenta ampla distribuição no Brasil, onde foi citada para Amazonas, Acre, Bahia, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Rondônia, Roraima, Santa Catarina e São Paulo (GUGLIOTTA & ABRAHÃO, 2012). E já foi citada anteriormente para o Estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande (QUEVEDO *et al.*, 2012).
 - ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do sul: Bonito, Estância Mimosa, em tronco de árvore viva.

3.6. Família Meruliaceae

- *Aquascypha hydrophora* (Berk.):
 - ✓ Material examinado: BRASIL. MATO GROSSO DO SUL: Bonito, Estância Mimosa, em tronco de árvore viva.
- *Cymatoderma dendriticum* (Pers.):
 - ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do sul: Bonito, Estância Mimosa, sobre madeira em decomposição.
- *Stereum lamellatum* (Berk. & M.A. Curtis):
 - ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do sul: Bonito, Estância Mimosa, sobre madeira em decomposição.

3.7. Família Pleurotaceae

- *Pleurotus agaves* Dennis:
 - ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do sul: Bonito, Estância Mimosa.
 - Espécie de distribuição pantropical e frequente em áreas semiáridas e savanas. Está amplamente distribuída no Brasil, citada para os Estados do Amazonas, Roraima, Rondônia, Maranhão, em manguezais, Pará, Alagoas, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Bahia, Maranhão, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (FIDALGO (1968); GUGLIOTTA & BONONI, 1999), e para o Estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande (QUEVEDO *et al.*, 2012).

3.8. Família Polyporaceae

- *Microporellus dealbatus* (Berk. & M.A. Curtis):
 - ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do Sul: Bonito, Estância Mimosa, sobre árvore viva.
- *Corioloopsis byrsina* (Mont.):
 - ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do Sul: Bonito, Estância Mimosa.
- *Hexagonia hydnoides* (Sw.):
 - ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do Sul: Bonito, Estância Mimosa, em tronco de árvore viva.
 - Comentários: *Hexagonia hydnoides* é facilmente reconhecida pelo basidioma séssil, superfície pilear fimbriada, com pêlos ramificados, castanho-escuros e aproximadamente 0,5 cm compr. Microscopicamente o sistema hifálico trimítico e os basidiósporos cilíndricos, 8,5-12 x 2,5-3,6 mm, complementam o diagnóstico. Espécie de distribuição pantropical e considerada comum no Brasil, onde foi citada para diversos Estados (GUGLIOTTA & BONONI, 1999; GUGLIOTTA & ABRAHÃO, 2012), inclusive Mato Grosso do Sul, Campo Grande (QUEVEDO *et al.*, 2012).

- *Hexagonia papyracea* Berk.:
 - ✓ Material examinado: BRASIL. MATO GROSSO DO SUL: Bonito, Estância Mimosa, sobre madeira em decomposição.
 - Comentários: O basidioma sésil a efuso-reflexo, com superfície pilear concentricamente zonada, com zonas purpúreas e castanhas, claras e escuras, poros hexagonais 1-2 mm⁻¹, sistema hifálico trimítico e os basidiósporos 9-14 × 4,5-5,5 μm caracterizam a espécie. *Hexagonia papyracea* apresenta distribuição pantropical (GUGLIOTTA & BONONI, 1999), está amplamente distribuída no Brasil (GUGLIOTTA & ABRAHÃO, 2012), já foi citada anteriormente para o Estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande (QUEVEDO *et al.*, 2012).

- *Lentinus crinitus* (L.) Fr.:
 - ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do Sul: Bonito, Estância Mimosa.
 - Comentários: A espécie apresenta distribuição pantropical, encontrada do México até a Argentina. Possui ampla distribuição no Brasil (FONSÊCA, 1999). Inclusive para o Estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande (QUEVEDO *et al.*, 2012).

- *Pycnoporus sanguineus* (L.):
 - ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do Sul: Bonito, Estância Mimosa em tronco de árvore viva.
 - Comentários: *Pycnoporus sanguineus* é facilmente reconhecido devido ao basidioma vermelho-alaranjado. Microscopicamente caracteriza-se pelo sistema hifálico trimítico e basidiósporos cilíndricos, 3,5-4,8 x 2,5 μm, com distribuição pantropical (RYVARDEN & JOHANSEN, 1981) e está amplamente distribuída no Brasil, já tendo sido registrada para o Estado de Mato Grosso do Sul, no Pantanal do Negro (BONONI *et al.*, 2008) e Campo Grande (QUEVEDO *et al.*, 2012).

- *Polyporus arcularius* (Batsch) Fr.:
 - ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do Sul: Bonito, Estância Mimosa.

- *Polyporus grammacephalus* Berk.:
 - ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do Sul: Bonito, Estância Mimosa.

- *Nigroporus vinosus* (Berk.):
 - ✓ Distribuição geográfica: pantropical (RYVARDEN & JOHANSEN, 1981). No estado, citada anteriormente para o PEFI, São Paulo (JESUS, 1993), como *Nigroporus nivosus*;
 - Basiônimo: *Polyporus vinosus* Berk. Basidioma anual, pileado sésstil, dimidiado, semicircular, 2,3-3,5 x 1-1,7 x 1-1,5 cm, rígido quando seco, coriáceo quando fresco. Superfície abhimental castanho-vinácea a castanho-purpúrea, velutina, azonada. Margem concolor à superfície abhimental a pouco mais clara, inteira, lisa, estéril, até 01 mm. Superfície himenial poróide, castanho-purpúrea a violeta escuro, (5-) 6-7 poros/mm, poros regulares, hexagonais, tubos concolores à superfície himenial, até 0,3 cm profundos, dissepimentos finos. Contexto homogêneo, castanho-escuro a castanho-vináceo, até 1,2 cm espesso na base, reação KOH positivo. Sistema hifálico dimítico; hifas não amilóides; hifas generativas castanho-amareladas a castanho-douradas, com ansas, não dextrinóides, parede fina, 2,5-3,75 μm diâmetro; hifas esqueléticas castanho-escuras, fuliginosas a castanho-rosadas em KOH, não ramificadas ou com ramificações dicotômicas raras, parede espessa, algumas com septos simples, 3,75-5 μm diâmetro. Elementos estéreis ausentes. Basídios não observados. Basidiósporos alantóides, hialinos, não amilóides e não dextrinóides, parede fina e lisa, 2,5-3,75 x 1,25 μm . Substrato: tronco morto e caído de angiosperma, causando podridão branca.
 - ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do Sul: Bonito, Estância Mimosa.

- *Tyromyces duracinus* (Pat):
 - ✓ Distribuição geográfica: Pantropical (GUGLIOTTA & BONONI, 1999). No estado, citada anteriormente para Cananéia, na Ilha do Cardoso (GUGLIOTTA & BONONI, 1999). Está sendo citada pela primeira vez para o estado.
 - Basiônimo: *Leptoporus duracinus* Pat.; *Polyporus duracinus* (Pat.) *Antrodiella duracina* (Pat.) I. *Tyromyces elmeri* Murrill; *Polyporus elmeri* (Murrill); *Trametes elmeri* (Murrill); Basidioma anual, pileado sésstil, dimidiado, solitário,

macio a corticento quando fresco e rígido e enrugado quando seco, 0,6-4,6 x 0,3-4,5 x 0,2-0,5 cm. Superfície abhimenial lisa, glabra, zonas concêntricas discretas, em tons de castanho e creme, com porções remanescentes. Margem fina, lisa, inteira, estéril, até 0,1 cm. Superfície himenial poróide, poros circulares a angulares, 5-6 (-7) poros mm^{-1} , mais clara que a superfície abhimenial e refringente, tubos castanho-claros, até 02 mm profundos, dissepimentos finos e lacerados. Contexto fibroso, castanho-claro, até 03 mm, KOH negativo. Sistema hifálico monomítico; hifas não amilóides e não dextrinóides; hifas generativas hialinas, com ansas, parede fina, 2,5 μm diâmetro. No himênio e parede espessada, 3,75-5 μm diâmetro. Elementos estéreis ausentes. Basídios clavados, parede fina, hialinos, bi a tetraesporados, 5-6,25 x 3,75-5 μm . Basidiósporos alantóides, hialinos, lisos, não amilóides, parede fina, 3,75-5 x 1,25-2,5 μm .

- ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do Sul: Bonito, Estância Mimosa.
- *Trametes cingulate* Berk.; *Coriolus cingulatus* (Berk.); *Coriolus decorsei* (Har. & Pat); *Polystictus decorsei* (Har. & Pat.); *Polyporus decorsei* (Har. & Pat.); *Polyporus palliseri* Berk. ex Cooke; *Fomes palliseri* (Berk. ex Cooke); *Scindalma palliseri* (Berk. ex Cooke); *Fomes virginiae* Mancini & Sacc.; *Scindalma virginiae* (Mancini & Sacc.):
 - ✓ Distribuição geográfica: Ásia e África (RYVARDEN & JOHANSEN, 1981). Constitui primeira citação para o Estado de Mato Grosso do Sul.
 - Basidioma anual, pileado séssil a pseudoestipitado, dimidiado ou semicircular, aplanado e mais fino próximo à margem, com base contraída, vários a partir de um estipe ou solitários, macio quando fresco e flexível quando seco, 0,7-4,6 x 0,7-3,9 x 0,1-0,8 cm. Superfície abhimenial lisa, glabra, concentricamente zonada, em tons de castanho e creme. Margem espessa, lisa, redonda, inteira, estéril, concolor à superfície abhimenial. Estipe circular, glabro, liso, creme a castanho, denso e homogêneo, 0,2-1,1 x 0,2-0,9 x 0,5-1,3 cm. Superfície himenial poróide, mais clara que a superfície abhimenial e refringente, poros angulares alongados, 7-9 poros/mm, com paredes levemente espessas, tubos não estratificados, tubos castanho-claros, até 02 mm profundos, formando até 04 camadas distintas, dissepimentos finos elacerados. Contexto fibroso, castanho-claro, até 06 mm, amarelo em KOH, camada superior acinzentada a enegrecida,

bastante fina e não presente como uma cutícula distinta. Sistema 170 hifálico trimítico; hifas não amilóides e não dextrinóides; hifas generativas hialinas, comansas, parede espessa, 2,5-3,75 μm diâmetro; hifas esqueléticas amarelas, parede espessa, abundantes em todo o basidioma, douradas e sólidas no contexto, 3,75-6,25 μm diâmetro; hifas conectivas hialinas a amarelas, bastante frequentes, parede espessa a quase sólida no contexto, levemente irregulares e moderadamente ramificadas, 1,25-3,75 μm diâmetro. Elementos estéreis ausentes. Basídios clavados, parede fina, hialinos, bi a tetraesporados, 11,25-12,5 x 3,75-5 μm . Basidiósporos largo-elipsóides, hialinos, lisos, não amilóides, parede fina, 6,25-7,5 x 2,5 μm . Substrato: galho de angiosperma morta, causando podridão branca.

✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do Sul: Bonito, Estância Mimosa.

- *Trametes membranacea* (Sw.):

✓ Distribuição geográfica: Ásia e África (RYVARDEN & JOHANSEN, 1981).
Constitui primeira citação para o Estado do Mato Grosso do Sul.

✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do Sul: Bonito, Estância Mimosa.

3.9. Família Schizophyllaceae

- *Schizophyllum* Fr.:

- Basidioma cupulóide, solitário, gregário a densamente imbricado, séssil, píleo subgloboso a reniforme, branco a castanho, coriáceo, fino, superfície abhimenial coberta por película com hifas em tricoderme, superfície himenial falsamente lamelada, contexto fino, rígido, coriáceo. Sistema hifálico monomítico, hifas generativas não amilóides e não dextrinóides, com ansas, parede fina a espessa, não infladas, cistídios presentes ou geralmente ausentes, basídios estreitamente clavados, basidiósporos elipsóides a alantóide-cilíndricos, hialinos, lisos. Parasita ou saprófito, geralmente lignícola, causador de podridão branca. Gênero cosmopolita.

✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do Sul: Bonito, Estância Mimosa.

O gênero é o único que possui falsas lamelas e por esse motivo não pode ser confundido com nenhum outro de Agaricales. Dentro do gênero há dois grupos que podem ser facilmente separados e intitulados para facilitar o reconhecimento. O primeiro grupo, representado por *Schizophyllum commune*, *S. radiatum* e *S. fasciatum* Pat., é caracterizado pelo contexto com lúmen representando aproximadamente metade do diâmetro dos filamentos e basídios com parede fina. O outro grupo, composto por *S. umbrinum* Berk., e *S. Leprieurii* Linder, é reconhecido pelo contexto composto por lúmen que representa um terço do diâmetro dos filamentos e basídios com paredes lateral e terminal espessadas (LINDER, 1933).

As características microscópicas são as mais importantes para a delimitação das espécies de *Schizophyllum*, apesar de os basidiósporos de *S. commune* Fr. e *S. radiatum* (Sw.) Fr., por exemplo, serem praticamente idênticos. Os pêlos abhimeniais presentes nas porções terminais de cada falsa lamela também são bastante característicos para as espécies, podendo ser simples ou ramificados, retos ou ondulados, e ainda halinos ou coloridos. Às vezes ásperos com depósitos cristalinos, que não são constantes nem caracteres específicos (LINDER, 1933).

- *Schizophyllum commune* Fr.:

- ✓ Distribuição geográfica: Cosmopolita (FONSÊCA, 1999). Citada anteriormente para o Estado de São Paulo nos municípios de Brotas e Mogi Guaçu, em áreas de Cerrado (FIDALGO *et al.*, 1965); (JESUS, 1993).

- Basidioma anual, pileado, imbricado, séssil, flabeliforme, coriáceo, solitário, alguns com crescimento discoidal, 0,2-3,3 x 0,3-1,9 x 0,1-0,2 cm. Superfície abhimenial vilosa, radialmente estriada, concentricamente zonada em tons de cinza e branco. Margem vilosa, lobada, freqüentemente incisa e involuta, concolor à superfície abhimenial. Superfície himenial cinza-acastanhada, com falsas lamelas que se enrolam aos pares formando cânulas radiais. Contexto homogêneo, com porções em tons de cinza e castanho, reação em KOH negativa. Sistema hifálico monomítico; hifas generativas não amilóides e não dextrinóides, com ansas, parede fina a espessa, hialinas, 2,5-8,75 μm diâmetro. Elementos estéreis ausentes.

- Basídios clavados, tetraesporados, parede fina, hialinos, 15-18,75 x 2,5-3,75 μm . Basidiósporos cilíndricos a alantóides, não amilóides e não dextrinóides, parede fina e lisa, hialinos, 6,25-7,5 x 2,5 μm . Substrato: tronco morto de angiosperma.

- ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do Sul: Bonito, Estância Mimosa.

3.10. Família Thelephoraceae

- *Thelephora aurantiaca* Raf.:

- ✓ Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do Sul: Bonito, Estância Mimosa.

As famílias melhores representadas foram a Polyporaceae, com 12 espécies distribuídas em nove gêneros, seguido da Hymenochaetaceae e Meruliaceae com três espécies e dois e três gêneros respectivamente. Esse resultado corrobora com trabalhos realizados por QUEVEDO *et al.* (2012) na região do Parque do Prosa, Campo Grande – MS e BONONI *et al.* (2008) no Pantanal do Rio Negro – MS, onde foram encontradas maior número de espécies da família Polyporaceae.

O levantamento indicou 16 novos registros para o estado de Mato Grosso do Sul (*Coriolopsis byrsina*, *Cymatoderma dendriticum*, *Leucocoprinus brebissonii*, *Nigroporus vinosus*, *Phaeomarasmius gracilis*, *Phellinus linteus*, *Phellinus sancti-georgii*, *Phylloporia spathulata*, *Polyporus arcularius*, *Polyporus grammacephalus*, *Thelephora aurantiaca*, *Trametes angulata*, *Trametes membranacea*, *Tyromyces duracinus*, *Schizophyllum commune* e *Stereum lamellatum*).

Os novos registros para o Estado, demonstram a carência de estudo na região da Serra da Bodoquena, não foram encontradas novas espécies, o que era esperado. Por se tratar de ambiente de transição circundado por outros ecossistemas como Mata Atlântica e Chaco paraguaio, a maioria das espécies já era conhecida de outras localidades em ambientes de cerrado, mata tropical úmida ou mesmo áreas alagadas.

Das espécies identificadas, 10 foram isoladas por apresentar boas condições estruturais, sendo que somente três obtiveram crescimento e formaram cultura pura (*Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune* e *Pleurotus agaves*) e analisadas quanto ao crescimento e potencial de produção de enzimas.

O *P. sanguineus* obteve junto com *S. commune* maior velocidade de crescimento, estatisticamente iguais. Enquanto que o isolado *P. agaves*, obteve menor valor de velocidade de crescimento, entre os isolados testados, apresentou crescimento micelial fracamente adensado, conforme Figura 2.

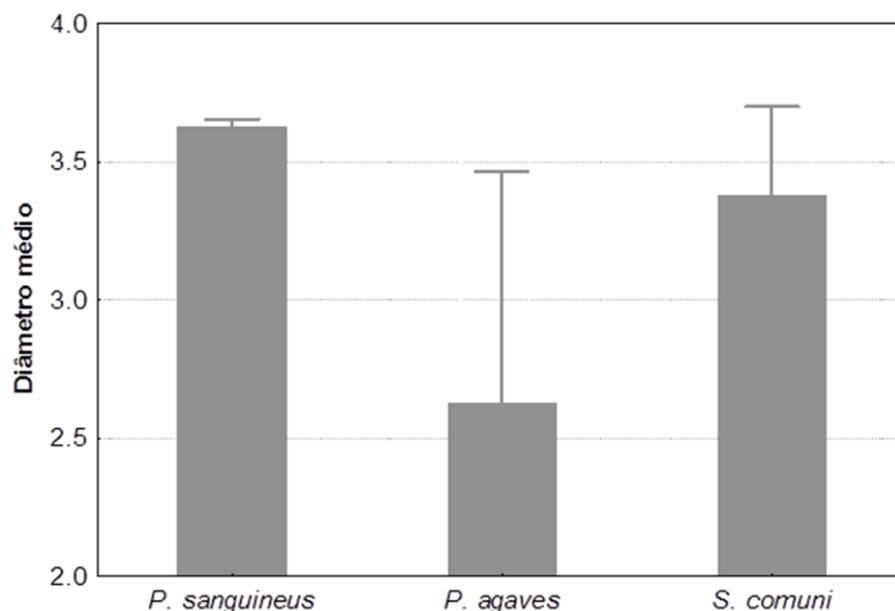


Figura 3.1 - Crescimento em diâmetro das espécies *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus agaves* e o *Schizophyllum commune* cultivadas em Ágar Extrato de Malte (MEA).

A velocidade de crescimento está intimamente ligada a diversos fatores, como pH, temperatura, luminosidade, relação carbono-hidrogenio e disponibilidade de nutrientes (ALEXOPOULOS *et al.* 1996). Dentre os fatores que influenciam na ocorrência de diferentes graus de adensamento de hifas são: composição química do meio de cultivo (MARINO *et al.*, 2006), estabilidade genética do isolado (LI *et al.*, 1994) e espécie de fungo (STAMETS, 1993).

Os resultados apresentados com *P. sanguineus*, estão de acordo com os obtidos por SILVA *et al.* (2010), trabalhando com potencial degradador *in vitro* de fungos causadores de podridão branca em serragem de clones de eucalipto.

Em relação ao potencial de produção de enzimas lignocelulolíticas o *P. sanguineus* e o *P. agaves* cresceram em todos meios selecionados, com exceção do meio guaiacol onde somente o *P. sanguineus* apresentou potencial para produção de lacase (Tabela 2). Também observou-se a existência do halo de crescimento escurecido na cultura, essa coloração deve-se a oxidação do guaiacol, presente no meio, em tetra guaiacol (AGUIAR FILHO, 2008). O fungo *S. commune* cultivado nos três meios não produziu enzimas, não se diferenciando dos resultados de VERDE (2010), trabalhando com produção de enzimas de fungos de podridão branca isolado em Nuevo León, México.

Tabela 2 – Teste enzimáticos dos fungos *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus agaves* e *Schizophyllum commune* em R-RBBR (degradação lignolítica), vermelho congo (ceulase), Guaiacol (lacase)

Fungo	Degradação Lignolítica	Celulase	Lacase
<i>P.</i>	+	+	+
<i>S. commune</i>	-	-	-
<i>P. agaves</i>	+	+	-

4. CONCLUSÃO

A família melhor representada neste levantamento, foi Polyporaceae, com doze espécies, todas degradadoras de madeira. O fungo *P. sanguineus* pertencente a essa família, foi o que melhor se destacou com relação ao crescimento e potencial enzimático

5. REFERÊNCIAS

BOGGIANI, P.C.; FAIRCHILD, T.R.; COIMBRA, A.M. O grupo Corumbá (Neoproterozóico-Cambriano) na região central da Serra da Bodoquena (Faixa Paraguai), Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Geociências**, v.23, n.3, p.301-305, set.1993.

BONONI, V.L.R.; OLIVEIRA, A.K.M.; QUEVEDO, J.R.; GUGLIOTTA, A.M. Fungos macroscópicos do Pantanal do Rio Negro, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Hoehnea**, v.35, n.4, p.489-511, out. 2008.

CBS. Knav. **Fungal Biodiversity Centre**. Utrecht: An institute of Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. Disponível em: <<http://www.cbs.knaw.nl>>. Acesso em: fev. 2015.

DENNIS, R.W.G. **Fungus flora of Venezuela and adjacent countries**. London: Lubrecht & Cramer Limited, 1970. (vol. 3.)

FIDALGO, M.E.P.K. Typification of the Genus Hexagona. **International Association for Plant Taxonomy (IAPT)**, v.17, n.1, p.37-43, fev. 1968a.

FIDALGO, M.E.P.K. Contribution to the fungi of Mato Grosso, Brasil. **Rickia**, v.3, n.1, p.171-219, [s. m.] 1968b.

FIDALGO, O.; BONONI, V.L.R. (Coords.). **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1984. (Manual n. 4).

FIDALGO, O.; Fidalgo, M.E.P.K.; FURTADO, J.S. Fungi of the “cerrado” region of São Paulo. **Rickia**, v.2, n.1, p.55-71, [s. m.] 1965.

FONSÊCA, M.P. Aphylophorales lignocelulolíticos da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André, 1999. 292p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade de São Paulo.

GIBERTONI, T.B.; SANTOS, P.J.P.; CAVALCANTI, M.A.Q. Ecological aspects of Aphyllophorales in the Atlantic Rain Forest in Northeast Brazil. **Fungal Diversity**, v.25, n.1, p.49-67. [s. m.] 2007.

GIMENES, L.J. **A tribo *Leucocoprineae* (Agaricaceae) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga**. São Paulo, 2007. 84p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade vegetal e meio ambiente) - Instituto de Botânica.

GRANDI, R.A.P.; GUZMÁN, G.; BONONI, V.L.R. Adições às Agaricales do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil. **Rickia**, v.11, n.1, p.27-33, [s. m.] 1984.

GUGLIOTTA, A.M.; ABRAHÃO, M.C. *Polyporales*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico**, Rio de Janeiro, v.1, p.196, 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB092934>>. Acesso em: 15 jan. 2015.

GUGLIOTTA, A.M.; BONONI, V.L.R. *Polyporaceae* do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Botânica**, v.12, n.1, p.1-112, [s. m.] 1999.

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**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1998. p.68-105.

GUZMÁN-DÁVALOS, L.; GUZMÁN, G. Contribucion al conocimiento de los lepiotaceos (Fungi, Agaricales) de Quintana Roo. **Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología**, v.17, n.1, p.43-54, [s. m.] 1982.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Diretoria de Geociências. **Mapa das Unidades de Relevo**. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 02 mai. 2014.

JESUS, M.A. Basidiomicetos lignocelulolíticos de floresta nativa de *Pinus elliottii* Engelm. do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. **Hoehnea**, v.20, n. 1, p.119-126, [s. m.] 1993.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; DAVID, J.C.; STALPERS, J.A. **Dictionary of the Fungi**. 9.ed. Wallingford: CAB International, 2001.

LINDER, D.H. The genus *Schizophyllum*. I. Species of the western hemisphere. **American Journal of Botany**, v.20, n.8, p.552-564, out. 1933.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. **Ações prioritárias para a conservação da biodiversidade do Cerrado e Pantanal**. Brasília: MMA, 1999.

PEGLER, D.N. **Agaric flora of Lesser Antilles**. Chicago: Stationery Office Books, 1983. (Royal Botanic Gardens - Kew Bulletin Additional Series 9).

PEGLER, D.N. **The Agarics of São Paulo, Brazil**. Chicago: Royal Botanic Gardens, Kew, 1997.

PEREIRA, A.B.; PUTZKE, J. **Famílias e gêneros de fungos *Agaricales* (cogumelos) no Rio Grande do Sul**. Santa Cruz do Sul: Editora das Faculdades Integradas de Santa Cruz do Sul, 1990.

POTT, A.; POTT, V.J. Espécies de fragmentos florestais em Mato Grosso do Sul, *In*: Costa, R.B.D. (eds). **Fragmentação florestal e alternativas de desenvolvimento rural na região centro oeste**. Campo Grande: UCDB, 2003. p.26-52.

RYVARDEN, L.; JOHANSEN, I. A preliminary flora of East Africa. **British Mycological Society**, v.76, n.2, p.349-350, fev.1981.

RYVARDEN, L. 2004. **Neotropical Polypores**: Part 1. Introduction, Ganodermataceae & Hymenochataceae. Oslo: Fungiflora, 2004.

SALZO, I.; MATOS, A.M. **Plano de Manejo do Parque Nacional da Serra da Bodoquena**. Encarte II. Bonito: IBAMA, 2006.

SILVA, G.A.; MARINO, R.H.; LOPES, M.E.G.; ALMEIDA, T.A.; COSTA, A. C.F.; MARTINS, M.V.G. Avaliação do potencial de degradação de fungos causadores de podridão branca. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.5, n.2, p.225-231, 2010.

SINGER, R.; DIGILIO, A.P.L. Prodomo de la flora agaricina Argentina. **Lilloa**, v.25, n.1, p. 5-462, [s. m.] 1952.

STAMETS, P. 1993. **Growing gourmet, medicinal mushrooms**. Oregona: Ten Speed Press.

VERDE, G.R. **Producción de enzimas lignolíticas por hongos de pudrición blanca aislados en Nuevo León**. Nuevo León, 2010. 65p. Tese Doutorado (Doctor en Ciencias con Especialidad en Biotecnología) Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

CAPÍTULO III

ARTIGO 2

ENZIMAS DE *Pycnoporus sanguineus* EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Josiane Ratier de Quevedo¹; Vera Lúcia Ramos Bononi²; Kennedy Francis Roche³

¹Doutoranda do Programa de Pós - Graduação em Tecnologias Ambientais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; ²Pesquisador Científico do Instituto de Botânica, São Paulo; ³Professor Titular da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

RESUMO

A produção de bioetanol e de açúcares a partir do caldo de cana gera como um dos subprodutos, o bagaço, que é uma biomassa industrial lignocelulósica que pode ser aproveitado para produção de etanol de segunda geração, desde que previamente submetido a processos hidrolíticos para gerar açúcares fermentescíveis. O objetivo deste trabalho foi determinar a atividade enzimática de *Pycnoporus sanguineus* usando como substrato bagaço de cana de açúcar e verificar o teor de açúcares totais e lignina do bagaço de cana quando tratadas com o fungo. O *P. sanguineus* foi utilizado como fonte produtora das enzimas lacase, manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP), capazes de hidrolisar o bagaço de cana. A atividade de lignina peroxidase do cultivado bagaço de cana umedecido com água teve seu pico no 14º dia de incubação, atingindo 420 U. L⁻¹. A atividade de lacase nas mesmas condições apresentou, também, um pico ao 14º dia de incubação atingindo 250 U. L⁻¹. Para manganês peroxidase, foi detectado pequena atividade enzimática. As enzimas do fungo *P. sanguineus* utilizadas no pré-tratamento para remover lignina presente no bagaço foi capaz de retirar, aproximadamente, 15% em 28 dias. Foi gerado açúcar no meio, devido a degradação (quebra) da lignina pela ação das enzimas fúngicas, liberando carboidratos e possibilitando assim um reaproveitamento dos açúcares do bagaço da cana para aplicações biotecnológicas, como produção de etanol de segunda geração.

Palavras chave: Lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase, biotecnologia

ABSTRACT

The production of bioethanol and sugar from sugarcane juice generated as a by-product, the bagasse, which is a lignocellulosic industrial biomass that can be used for second generation ethanol production, if previously subjected to hydrolytic processes to generate fermentable sugars. The aim of this study is to determine the enzymatic activity of *Pycnoporus sanguineus* using as a substrate sugar cane bagasse and check the content of total sugars and lignin from sugarcane bagasse when treated with the fungus. *Pycnoporus sanguineus* was used as

production source of the laccase enzymes, manganese peroxidase (MnP) and lignin peroxidase (LiP) that are able to hydrolyze sugarcane bagasse. The phenol activity of the one grown amid sugarcane bagasse moistened with water peaked in the fourteenth day of incubation, reaching 420 U L^{-1} . The laccase activity under the same cultivation conditions also presented a peak after 14 days of incubation reaching 250 U L^{-1} . For manganese peroxidase it was hardly possible to detect any enzyme activity. The enzymes of the fungus *P. sanguineus* used as a pre-treatment to remove a percentage of the lignin presented in the sugarcane bagasse was able to remove lignin by approximately 15% within 28 days. It was generated sugar in the middle, due to degradation (breakdown) of lignin by the action of fungal enzymes releasing carbohydrates and thus enabling reuse of sugars from sugar cane bagasse for biotechnological applications such as second-generation ethanol.

Key words: Laccase manganese peroxidase, lignin peroxidase, biotechnology

1. INTRODUÇÃO

Na biotecnologia, agentes biológicos de notável importância são os fungos, principalmente devido a sua grande diversidade genética, o que lhes permitem desenvolver funções únicas e apresentarem grande capacidade em degradar as moléculas mais complexas através da produção de enzimas específicas (LIU *et al.*, 2011).

Os fungos, do tipo podridão branca, são conhecidos pela eficiente capacidade de degradação de materiais lignocelulósicos na natureza, tem ampla aplicação industrial e, especificamente, são utilizados no biobranqueamento da polpa de papel, na biodegradação de poluentes, biorremediação e, recentemente, suas enzimas estão sendo utilizadas no pré-tratamento para produção de etanol de segunda geração (MATHEUS *et al.*, 2000; SOUZA 2012).

Diversos processos têm sido explorados nos últimos anos na indústria com o objetivo de hidrolisar os polissacarídeos celulose e hemicelulose em glicose e xilose, respectivamente. A maioria dos métodos empregados tende ao uso de enzimas microbianas ou ácido sulfúrico, em concentrações variadas (BALAT e BALAT, 2008). Contudo, antes do material ser hidrolisado, o mesmo deve ser submetido a uma etapa de pré-tratamento com o alvo desta tecnologia sendo remover barreiras estruturais e composicionais dos materiais lignocelulósicos,

promovendo uma melhora na percentagem de hidrólise e aumento dos rendimentos de açúcares fermentáveis, a partir da celulose e hemicelulose (MOSIER *et al.*, 2005).

Para obter açúcar e álcool, a cana-de-açúcar é processada e são gerados os subprodutos, bagaço e palha, resíduos lignocelulósicos compostos por celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é a matéria mais abundante na terra, e ocorre em associação com a hemicelulose e a lignina, resultando assim o termo “lignocelulósico”; este, é portanto, o material orgânico renovável mais abundante e favorável de conversão biológica, química e fisiológica em produtos de interesse econômico (PAVARINA, 1997).

Subprodutos como bagaço, palha de cana-de-açúcar, cascas, gramíneas e resíduos florestais são tradicionalmente queimados ou descartados; porém, podem ser utilizados como matérias-primas para obtenção de etanol (JARDINE *et al.*, 2009).

O bagaço de cana, para a maior parte dos países tropicais, é um dos principais materiais lignocelulósicos utilizados para a bioconversão em etanol, uma vez que apresentam alta concentração de carboidratos, baixo conteúdo relativo de lignina, fácil utilização, baixo custo de colheita, de transporte e de armazenagem (PANDEY *et al.*, 2000).

Vários estudos vem sendo desenvolvidos na área de tecnologia enzimática que é hoje, um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. Os processos industriais biocatalisados apresentam menor impacto ambiental e também menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e, sendo altamente específicas, minimizam os efeitos indesejáveis (MITCHELL *et al.*, 2006).

Entre as espécies utilizadas na produção de enzimas está o *Pycnoporus sanguineus* antes conhecido popularmente como “orelha de pau”, que faz parte da família Polyporaceae, Agaricomycetes, Basidiomycetes e ocorre em todo o Brasil (QUEVEDO *et al.* 2012). É um fungo facilmente encontrado (cosmopolita), decompositor e de cor alaranjada, responsável pela degradação branca (NOBLES & FREW, 1962). A degradação da lignina pelos fungos de podridão branca ocorre de forma mais rápida se comparado a outros organismos na natureza (TUOMELA *et al.*, 2000).

Este fungo é capaz de selecionar a lignina presente na parede celular deixando a celulose praticamente intacta.

A indústria sucroalcooleira é uma excelente representação do processo de desenvolvimento limpo, tendo o bagaço de cana como uns dos maiores subprodutos, os quais são reutilizados no mesmo processo. O objetivo deste estudo é determinar a atividade enzimática do *P. sanguineus*, e verificar as transformações da lignina do bagaço de cana quando

tratadas com fungo. A integração de cadeias produtivas existentes inserindo subprodutos de um tipo de produção em outra, pode baratear o processo com a inserção de novos componentes, diminuindo o resíduo descartado na natureza e gerando sustentabilidade aos sistemas (BON *et al.*, 2008).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolamento em meio de cultura e conservação

O fungo *P. sanguineus* foi coletado na Serra da Bodoquena, município de Bonito, MS. Cada basidioma foi conduzido a câmara de fluxo laminar do Núcleo de Pesquisa em Micologia do Instituto de Botânica - SP, sendo retirado pedaços de aproximadamente 01 cm² do contexto que foram colocados no meio de cultura BDA (Batata-dextrose-ágar), preparado previamente a coleta. Uma vez crescidos em placa de Petri e sem contaminação, procedeu-se a conservação pelos métodos Castelani ou água destilada estéril, tubo com meio de cultura Ágar Extrato de Malte (MEA) e papel filtro, a fim de ter o material disponível e pronto para ser armazenado na coleção de cultura CCIBt do Instituto de Botânica.

2.2. Teste qualitativo

Para avaliar o complexo enzimático, foram realizados testes enzimáticos qualitativos em placas de Petri com os meios Extrato de Malte Agar 2% para crescimento, MEA e o corante azul brilhante de remazol R-RBBR para sistema degradativo lignolítico (OKINO *et al.*, 2001; MACHADO & MATHEUS, 2006), guaiacol e α -naftol para lacase; pirogalol para peroxidases e enzimas celulolíticas com vermelho congo, carboximetilcelulose (CMC) e meio basal (STALPERS, 1978; SCHWYN & NEILANDS, 1987). Para igualar a idade fisiológica dos cultivos, cada linhagem foi crescida no meio de cultura MEA por sete dias, e retirados discos de micélio com diâmetro de 5 mm e inoculados no centro das placas. Foram avaliados tanto o crescimento do micélio como o diâmetro do halo formado em cada tratamento. Em todas as placas, duas retas perpendiculares foram marcadas, cujo ponto de cruzamento coincidiu com o centro do inóculo. As medições do crescimento e do halo foram feitas nos dois quadrantes a cada dois dias, durante sete dias, com experimentos com quatro repetições.

2.3. Teste quantitativo

2.3.1. Determinação da atividade de enzimas ligninolíticas

Reagentes:

Álcool veratrílico em tampão tartarato: em 50 mL⁻¹ de H₂O destilada adicionou-se 4,6 g de tartarato de sódio. O pH foi ajustado para 3,0 e adicionou-se 14 µL⁻¹ de álcool veratrílico.

Peróxido de hidrogênio: em 50 mL⁻¹ de H₂O destilada, adicionou-se 33 µL⁻¹ de H₂O₂.

Lactato de sódio: em 50 mL de H₂O destilada adicionou-se 1,2 mL⁻¹ de lactato de sódio.

Sulfato de Manganês: em 50 mL⁻¹ de H₂O destilada adicionou-se 0,017 g de MnSO₄.

Albumina bovina: em 50 mL⁻¹ de H₂O destilada adicionou-se 0,25 g de albumina bovina (Albumin Bovine Fraction V, MP Biomedicals®).

Vermelho de fenol: em 50 mL⁻¹ de H₂O destilada adicionou-se 0,05 g de vermelho de fenol.

Peróxido de hidrogênio em tampão succinato: em 50 mL⁻¹ de H₂O destilada adicionou-se 2,7 g de succinato de sódio; então o pH foi ajustado para 4,5 e acrescentou-se 33,3 µL⁻¹ de 30% H₂O₂.

Hidróxido de sódio: em 50 mL⁻¹ de H₂O destilada adicionou-se 4,0 g de NaOH. Unidades mL⁻¹ CMC = (4)

Tampão citrato-fostato: 1,05 g de ácido cítrico foi adicionado em 50 mL⁻¹ de H₂O destilada (solução A); separadamente, 1,41 g de fosfato de sódio foi adicional em 50 mL⁻¹ de H₂O destilada. Então a solução A foi adicionada na solução B e o pH foi ajustado para 5,0.

2.3.2. Extrato enzimático do substrato sólido

O extrato enzimático bruto proveniente do cultivo em substrato sólido foi obtido com solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 na proporção de 1:3 (p/v). A homogeneização foi feita manualmente por 3 min, seguida de agitação em mesa agitadora a 120 rpm (TECNAL / TE -140) durante 1 hora (MOREIRA NETO *et al.*, 2009). O extrato obtido foi filtrado em papel de filtro e centrifugado a 10000 rpm por 10 min (Centrífuga EPPENDORF – Mod. 5804 R). O sobrenadante recuperado foi utilizado para determinação das atividades enzimáticas.

2.3.3. Atividades da lacase

A atividade das enzimas lacase e manganês peroxidase foram determinados a partir do cálculo da diferença de absorbância. Todas as atividades foram expressas em $U = \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$. A atividade da lacase foi determinada utilizando-se seringaldazina como substrato enzimático (SZKLARZ *et al.*, 1989). A oxidação de seringaldazina até sua forma quinona foi acompanhada por 5 minutos a 525 nm, a temperatura ambiente. A mistura da reação foi constituída por 0,6 mL de caldo enzimático, 0,3 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0), e 0,1 mL de seringaldazina 1,0 mM preparada em etanol (ELISSETCHE *et al.*, 2007).

2.3.4. Atividades de manganês peroxidase

A atividade de manganês peroxidase foi determinada pela oxidação do fenol vermelho. A reação foi realizada em tubos de 30 mL⁻¹ com 3,0 mL⁻¹ de succinato de sódio 20 mM, tampão 4,5, 3,0 mL⁻¹ de lactato de sódio 50 mM⁻¹, 1,0 mL⁻¹ de MnSO₄ 1,0 mM, 1,0 mL⁻¹ de fenol vermelho 1g/L⁻¹, 0,5 mL⁻¹ de albumina bovina 1%, 1,0 mL⁻¹ de extrato e 0,5 mL⁻¹ de H₂O₂ 2,0 mM. A intervalos de 1 minuto, a 2 mL⁻¹ desta mistura foi adicionado 60 μL^{-1} de uma solução 6,5 M de NaOH. A absorbancia foi medida a 610 nm durante 10 m (LUNDELL *et al.*, 2010).

2.3.5. Atividades de lignina peroxidase (LIP)

A LIP foi testada usando azure B como substrato. As reações foram realizadas em microcubeta de 3 mL⁻¹ contendo 1,25 mL⁻¹ de tartarato de sódio 50 mM, tampão pH 4,5, 0,5 mL⁻¹ do cultivo, 0,25 mL⁻¹ de azure B 320 μM e 0,5 mL⁻¹ de H₂O₂ 2 mM. A reação foi monitorada a 651 nm (ARCHIBALD, 1992).

As atividades das enzimas (lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase foram determinadas, a partir do cálculo da diferença de absorbância, conforme descrito a seguir. Todas as atividades foram expressas em $U/L \text{ min}^{-1}$ ($\mu\text{moles produto/min. L}$). Os cálculos realizados a partir da equação:

$$U/L = Y \text{ abs} \times 106 / E \times R \times t = U/L. \text{ min}^{-1} (1),$$

Onde A, absorvância final - absorvância inicial; E, e (do produto formado); R, quantidade de caldo enzimático (L); t, tempo.

2.4. Determinação da Lignina Insolúvel na Fração Sólida

Lignina insolúvel foi determinada de acordo com o método Klasson modificado por Rocha *et al.* (2006). O material retido no papel de filtro foi lavado com 1500 mL⁻¹ de água destilada e transferido para pesa-filtros para secagem em estufa a 100 °C até massa constante. A percentagem de lignina insolúvel foi calculada em relação à massa de amostra seca, conforme a Equação 1: onde: LKi – Lignina Klason insolúvel; Mk – massa de lignina insolúvel seca; MC – massa de cinzas; MA – massa da amostra seca.

$$\%L_{Ki} = \frac{M_K - M_C}{M_A} * 100 \quad (1)$$

2.5. Determinação das Cinzas

Após a determinação da lignina insolúvel em meio ácido, a mesma, juntamente com o papel de filtro, foi transferida para um cadinho de porcelana, previamente tarado. A amostra foi calcinada lentamente até 300 °C e mais 2 h a 800 °C, em uma mufla (Fornitec modelo MDS 15x15x30). Na determinação das cinzas totais, foram pesados aproximadamente 2 g do bagaço em cadinho de porcelana previamente tarado. Por diferença de massa, o teor de cinzas da lignina insolúvel e das cinzas totais foi determinado, conforme a Equação 2. Onde: % cinzas – percentual em massa de cinzas; Mc – massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio); Ma – massa da amostra base seca (D'SOUZA *et al.*, 1999).

$$\% \text{ cinzas} = \frac{M_c}{M_a} * 100 \quad (2)$$

2.6. Determinação de Açúcares Totais

A quantificação de açúcares totais foi realizada pelo método de fenol-sulfúrico descrito por DUBOIS *et al.* (1956) e modificado por CUESTA *et al.* (2002). Este método permite a

dosagem de açúcares simples ou complexos numa faixa de sensibilidade de 10 a 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e se fundamenta no fato de que estes compostos e seus derivados, incluindo metil ésteres com grupos redutores livres ou potencialmente livres, quando tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado, dão uma coloração amarelo alaranjado, com uma reação sensível e coloração estável possível de ser lida a 490 nm, diretamente proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise enzimática celulolítica

O fungo *P. sanguineus* cultivado em meio de bagaço de cana-de-açúcar umedecido com água ou MEA por 28 dias. Foi medida a atividade das enzimas Lignina peroxidase (LIP), Manganês peroxidase (MnP) e Lacase.

A LIP foi a maior entre as enzimas estudadas, atingindo um pico de 420 UI mL^{-1} . As condições de cultivo podem influenciar a expressão dos genes responsáveis pela produção de LIP (RÜTTIMANN *et al.*, 1992; D'SOUZA *et al.*, 1999). Porém, compostos fenólicos causam inativação da atividade de LIP e podem interferir na oxidação do álcool veratrílico por peroxidase, causando inibição competitiva pelo substrato enzimático. Os estudos realizados mostram que o bagaço é um substrato potencial para a produção de enzimas lignocelulolíticas como a LIP. De acordo com D'SOUZA *et al.* (1999), não existe atividade enzimática de LIP superior a 420 UI mL^{-1} produzidas por espécies de fungos sem adição de tratamentos que estimulem a produção de enzimas.

A atividade de LIP de *P. sanguineus* cultivado (Figura 3.2), teve um aumento a partir do 7º dia de incubação, atingindo um pico de 420 U. L^{-1} no 14º dia. A partir do 15º e 16º dia, a atividade decai até chegar a 1,00 U. L^{-1} no 28º dia, devido provavelmente a escassez de fontes energéticas necessárias ao metabolismo e também decorrente ao acúmulo de metabolitos secundários, que geram a inibição da enzima, principalmente no acúmulo de glicose e celobiose (FLACHNER & RÉCZEY, 2004; HENDRIKS & ZEEMAN, 2009).

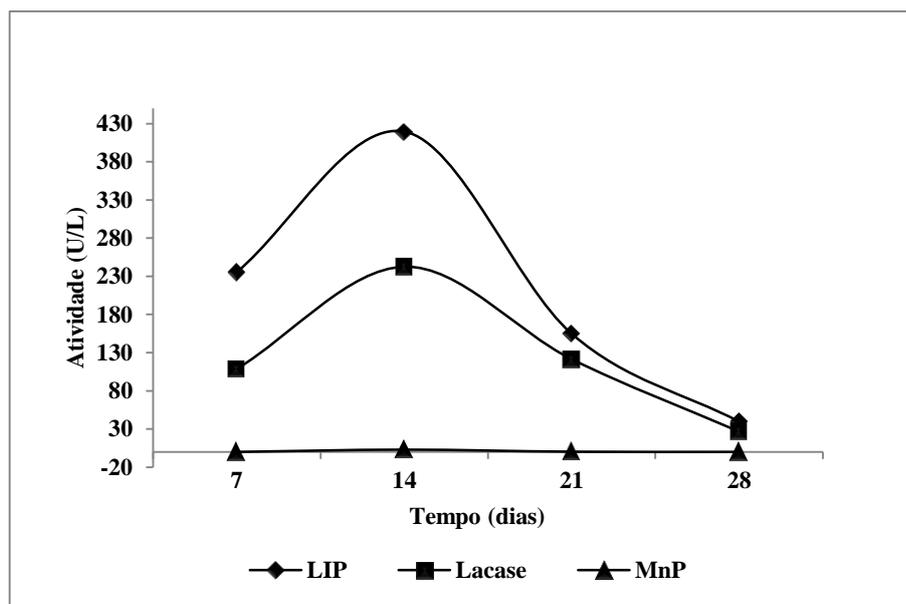


FIGURA 3.2 - Atividades celulolíticas do fungo *Pycnoporus sanguineus* em bagaço de cana-de-açúcar umedecido com água.

A atividade enzimática de LIP e lacase foi significativamente menor quando o bagaço de cana foi umedecido com MEA; isso implica que o excesso de nutrientes e glicose nesse meio possa estar inibindo o sistema enzimático do fungo (Figura 3.3).

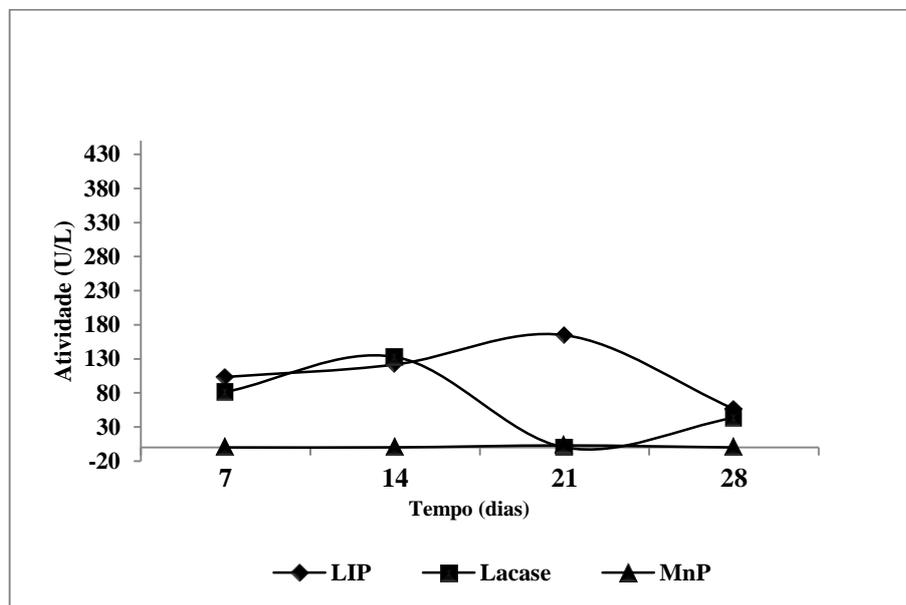


FIGURA 3.3 - Atividades celulolíticas de *Pycnoporus sanguineus* em bagaço de cana-de-açúcar umedecido com Ágar Extrato de Malte (MEA).

A atividade de lacase nas mesmas condições de cultivo apresentou um aumento também a partir do 7º dia de incubação, porém com um pico menor, de 250 U. L⁻¹ no 14º dia, com queda progressiva até chegar 1,0 U. L⁻¹, 28º dia. A atividade de lacase (Figura 3.4) apresentou um

pico de 250 U. L⁻¹. Atividade enzimática no fungo *Lentinula edodes* crescendo em resíduo de malte, em diferentes formas de incubação, possui maior atividade de lacase no 30º dia de incubação, com aproximadamente 100 U. L⁻¹ (HATVANI & MÉCS, 2003). Resultados semelhantes foram apresentados por KAAL *et al.* (1995) ao analisarem atividade de enzimas ligninolíticas de fungos de podridão branca, quando a atividade de lacase foi de aproximadamente 70 U. L⁻¹. CHAPARRO *et al.* (2009) ao analisar a atividade enzimática de fungos degradadores de madeira, encontraram atividade de aproximadamente 170 U. L⁻¹ entre o 10º dia de incubação. *P. sanguineus* apresentou atividade de lacase superior a todos esses fungos citados.

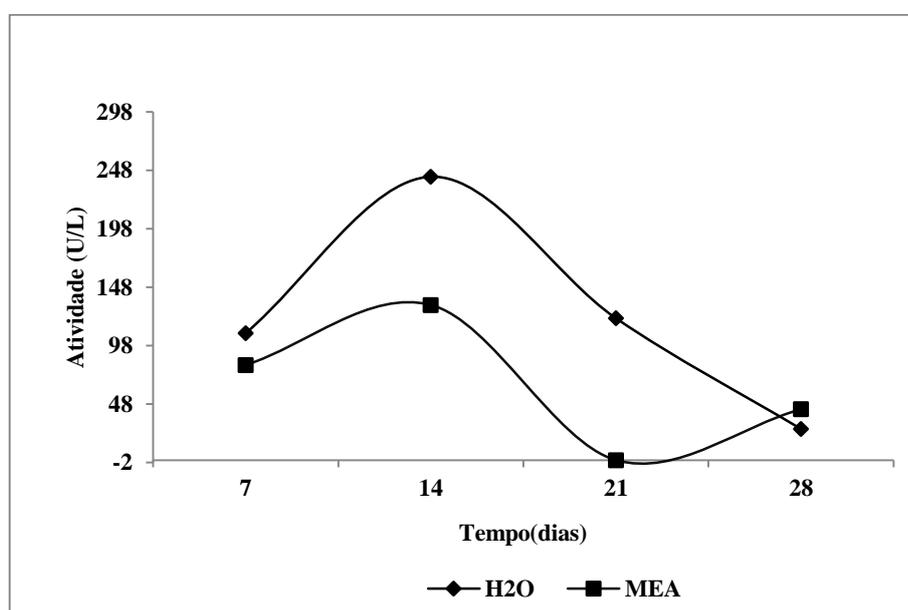


FIGURA 3.4 - Atividades de lacase do fungo *Pycnoporus sanguineus* em bagaço de cana-de-açúcar.

A atividade de manganês peroxidase foi pouco expressiva, e não houve diferença quando umidecida com H₂O ou MEA, apresentando a mesma atividade; porém o pico de produção enzimática com MEA foi retardado (Figura 3.5).

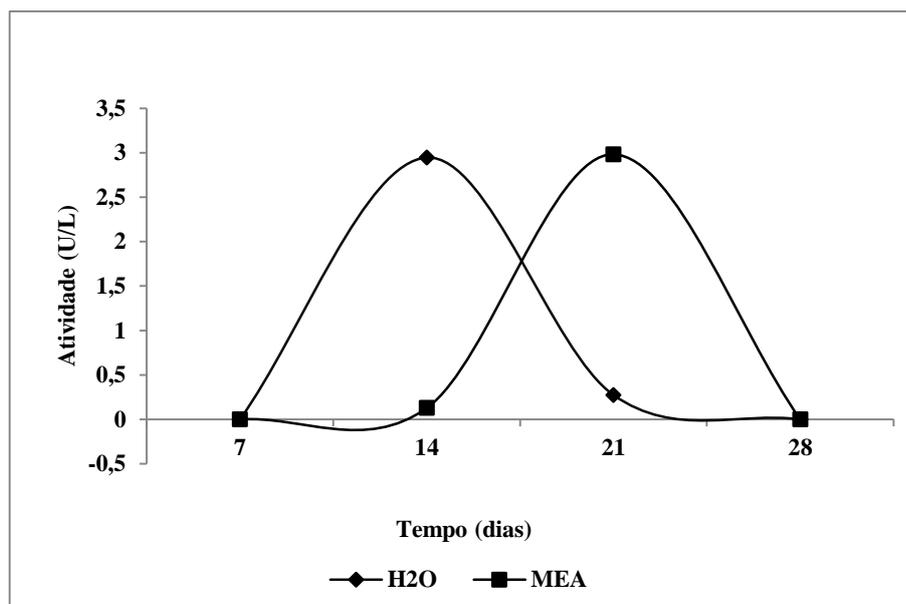


FIGURA 3.5 - Atividades de manganês peroxidase do fungo *Pycnoporus sanguineus* em bagaço de cana de açúcar.

Quase não foi possível detectar a atividade do manganês peroxidase. RABONATO (2013), encontrou a atividade de MnP em *P. sanguineus* de $11,27 \text{ U mL}^{-1}$ (21º dia). REGINA *et al.* (2009), detectaram atividade de MnP para todas as linhagens de *Lentinula edodes* produzidas em substrato a base de bagaço de cana, com máximo de $0,20 \text{ UI g}^{-1}$.

A MnP não está presente em todos os fungos de podridão branca e a sua atividade é sensível à presença de alguns metais, tais como cobre, ferro, zinco e níquel, essencial para o crescimento e, também, atuam como cofatores enzimáticos, induzindo a atividade lignolítica (BALDRIAN *et al.*, 2005). Entretanto estes metais são tóxicos ao fungo quando em excesso, podendo inibir o crescimento e a atividade de enzimas ligninolíticas.

3.2. Quantificação de lignina do bagaço de cana-de-açúcar tratadas com (*P. sanguineus*)

Verificou-se redução de lignina no meio, as enzimas do fungo *P. sanguineus* foram capazes de remover 15%, da lignina presente no bagaço da cana, através do tratamento em 28 dias. Porém a atividade enzimática iniciou-se praticamente aos 14 dias (Figura 3.6).

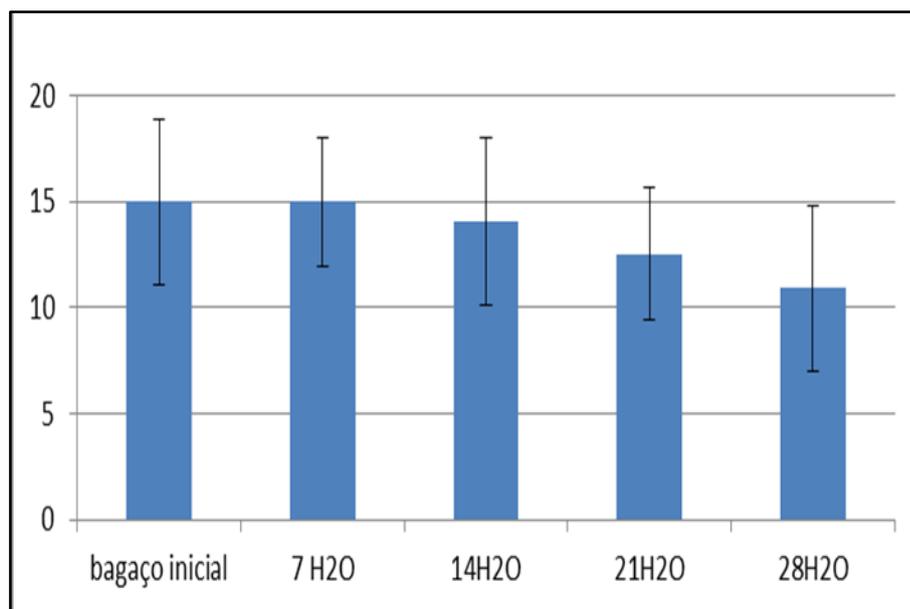


FIGURA 3.6 - Porcentagem da lignina presente no bagaço da cana através do tratamento em 28 dias

Isso mostra a eficácia das enzimas deste fungo em degradar a lignina; provavelmente, se o tempo fosse aumentado, a porcentagem da remoção da lignina seria maior.

A dificuldade de acesso à celulose e conseqüentemente aos açúcares do bagaço, aumenta devido à presença de lignina sobre a superfície celulósica, a qual impede o intumescimento das fibras. Deste modo, quando a remoção de lignina, ocorre exposição das moléculas de glicose e hemicelulose à ação hidrolítica (OGEDA & PETRI, 2010).

3.3. Determinação de açúcares totais do bagaço de cana-de-açúcar quando tratadas com (*P. sanguineus*)

Verificou-se uma redução de açúcares a partir do 7º dia de crescimento do fungo no meio (aproximadamente 30%), o que pode ser atribuído ao consumo de açúcar usado pelo fungo em seu crescimento primário (Figura 3.7).

Mas numa segunda etapa, após 28 dias de incubação, há um aumento da quantidade de açúcar solúvel no meio, superando a quantidade inicial. Isso poderia ser explicado pela degradação (quebra) da lignina pela ação das enzimas fúngicas, liberando carboidratos no meio e possibilitando assim um reaproveitamento dos açúcares do bagaço de cana para a produção de álcool de segunda geração ou o uso do bagaço em outros processos biotecnológicos, como a produção de cogumelos comestíveis.

No Brasil, estudando enzimas ligninolíticas de basidiomicetos HELM *et al.* (2010) também obtiveram uma pequena produção de açúcar da ordem de 2% que consideram muito baixa para a produção de etanol.

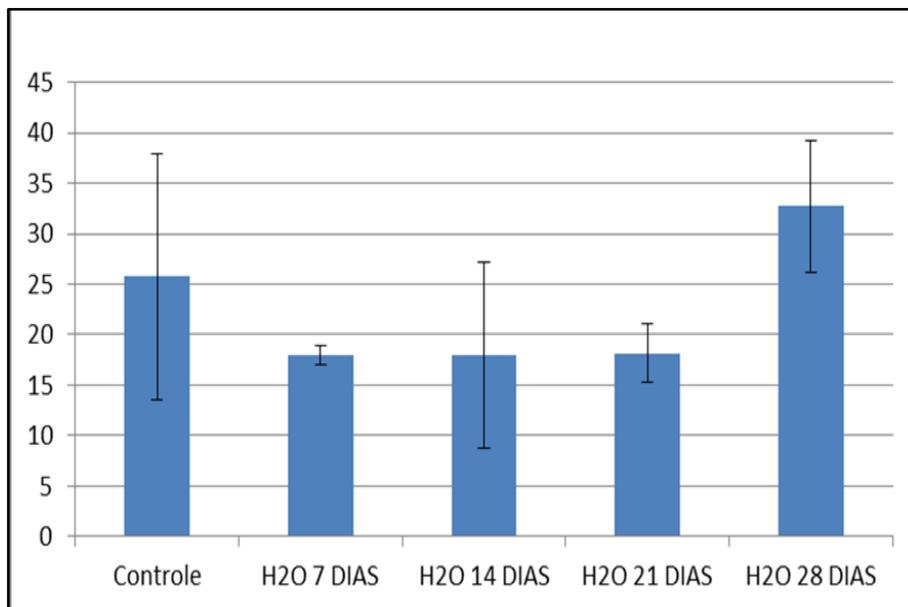


FIGURA 3.7 - Quantidade de açúcares totais solúveis, em bagaço de cana-de-açúcar após tratamento com *Pycnoporus sanguineus*.

As condições de cultivo do fungo (em bagaço umedecido com água ou MEA) (Figura 3.9) afeta na quantidade de açúcar no meio. O aumento de açúcar após 28 dias não ocorre quando o meio é enriquecido com MEA sugerindo que meio mais rico reduz a atividade das enzimas ligninolíticas.

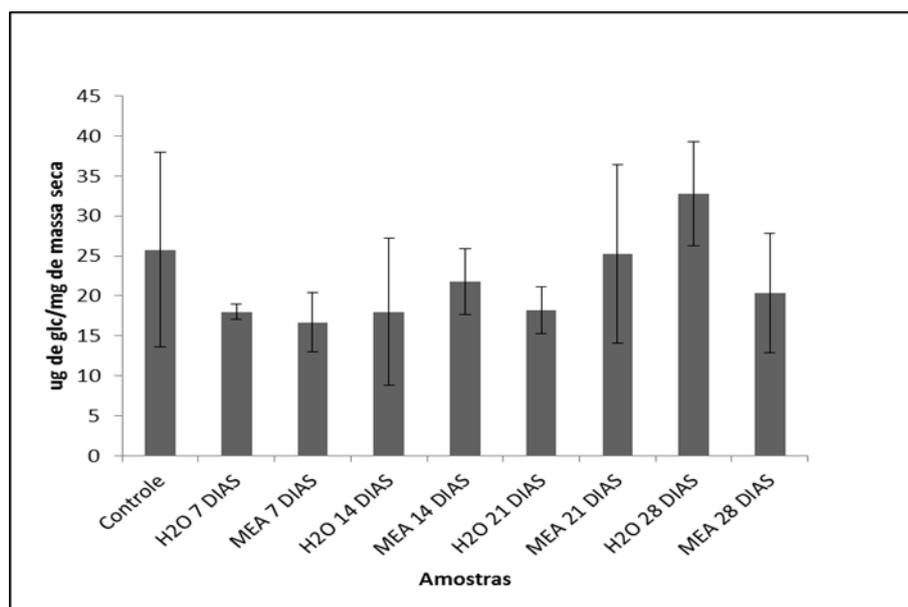


FIGURA 3.9 - Quantidade de açúcares totais solúveis, em bagaço de cana de açúcar após tratamento com *Pycnoporus sanguineus* em meio com e sem Ágar Extrato de Malte (MEA).

Zhang *et al.* (2006) isolaram polissacarídeos, sendo homopolissacarídeos os açúcares mais comuns produzidos por basidiomicetos, podendo ser solúveis ou insolúveis em água. Isso levanta a hipótese de que o aumento de açúcares solúveis no meio em estudo pode não provir do bagaço de cana, mas ser consequência de uma produção do próprio *P. sanguineus* lignolíticos.

De qualquer forma, açúcar é gerado no meio com potencial aproveitamento em processos biotecnológicos.

4. CONCLUSÃO

O fungo *Pycnoporus sanguineus* apresentou potencial para produzir enzimas Lignina peroxidase (LIP) e Lacase, em meio de bagaço de cana-de-açúcar umedecido com água.

As condições de cultivo do fungo em bagaço umedecido com MEA são afetadas, pois não há aumento na quantidade de açúcar no meio. O meio enriquecido com MEA sugere que meio mais rico reduz a atividade das enzimas ligninolíticas.

O fungo *Pycnoporus sanguineus* promoveu um aumento da quantidade de açúcar solúvel no meio, superando a quantidade inicial, liberando carboidratos no meio, possibilitando assim um reaproveitamento dos açúcares do bagaço de cana para a produção de álcool de segunda geração ou o uso do bagaço em outros processos biotecnológicos.

A atividade enzimática *Pycnoporus sanguineus* que teve início praticamente aos 14 dias, sugere que essas enzimas são formadas durante o crescimento secundário do fungo e um maior tempo de incubação deve ser considerado em estudos futuros.

5. REFERÊNCIAS

AGUIAR FILHO, J.M.M. **Análise enzimático de fungos lignocelulósicos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. Piracicaba, 2008. 79p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

ARCHIBALD, F.S. Lignin peroxidase activity is not important in biological bleaching and delignification of unbleached kraft pulp by trametes versicolor. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.9, p.3101–3109, set. 1992.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.34, n.5, p.551–573, out. 2008.

BALDRIAN, P.; VALÁSKOVÁ, V.; GABRIEL, J. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. **Research in Microbiology**, v.156, n.5-6, p.670-676, jun./jul. 2005.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L.; VERMELHO, A.B.; PAIVA, C.L.A.; ALENCASTRO, R.B.; COELHO, R.R.R.C. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

CHAPARRO, D.F.; ROSAS, D.C.; VARELA, A. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). **Revista Iberoamericana de Micología**, v.26, n.4, p.238-243, out./dez. 2009.

CUESTA, A.; PEDROLA, L.; SEVILLA, T.; GARCIA-PLANELLAS, J.; CHUMILLAS, M.J.; MAYORDOMO, F.; LEGUERN, E.; MARÍN, I. VILCHEZ, J.J.; PALAU, F. The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. **Nature Genetics**, v.30, n.1, p.22–25, jan. 2002.

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

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, mar. 1956.

ELISSETCHE, J.P.; FERRAZ, A.; FREER, J.; RODRÍGUEZ, J. Enzymes produced by *Ganoderma australe* growing on wood and in submerged cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.23, n.3, p.429-434, mar. 2007.

FLACHNER, B.; RÉCZEY, K. β -glucosidase production and characterization of some *Aspergillus* strains. **Chemical and Biochemical engineering quarterly**, v.18, n.3, p.303-307, [s. m.] 2004.

HATVANI, N.; MÉCS, I. Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of *Lentinula edodes*. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v.55, n.2, p.199-203, jun. 2003.

HELM, C.V.; HIGA, A.M.; HOFFMANN, K.; BRANDANI, L.C.; LIMA, E.A.; MAGALHÃES, W.L.E. Avaliação de basidiomicetos para produção de enzimas lignocelulolíticas em fermentação submersa em diferentes substratos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 6, 2010, Brasília. **Anais**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Micologia, 2010. p. 378-379.

HENDRIKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, n.100, n. 1, p.10-18, jan. 2009.

JARDINE, J.G.; DISPATO, I.; PERES, M.R. **Considerações sobre o bioetanol lignocelulósicos para subsidiar a elaboração de conteúdo da árvore de conhecimento Agroenergia**. 1.ed. Campinas: Embrapa, 2009. (Documentos/Embrapa Informática Agropecuária n.95). p.11-12.

KAAL, E.E.J.; FIELD, J. A.; JOYCE, T. W. Increasing lignolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. **Bioresource Technology**, v.53, n.2, p.133-139, [s. m.] 1995.

LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; WU, H.; XU, D.; TANG, Z.; SHEN, Q. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.65, n.5, p.717-725, ago. 2011.

LUNDELL, T.K.; MÄKELÄ, M.R.; HILDÉN, K. Lignin-modifying enzymes in Filamentous basidiomycetes—ecological, functional and phylogenetic review. **Journal of Basic Microbiology**, v.50, n.1, p.5-20, fev. 2010.

MACHADO, K.M.G.; MATHEUS, D.R. Biodegradation of remazol brilliant blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.4, p.468-473, out./dez. 2006.

MATHEUS, D.R.; BONONI, V.L.R.; MACHADO, K.M.G. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.16, n.5, p.415-421, jul. 2000.

MITCHELL, D. A.; BEROVIČ, M.; KRIEGER, N. The physical structure of SSF bioreactor systems. In: MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. (Eds). **Solid-State Fermentation Bioreactors**. Berlin: Springer-Verlag, 2006. p.19.

MOREIRA NETO, S.L.; MATHEUS, D.R.; MACHADO, K.M.G. Influence of pH on the growth and production of the ligninolytic system of tropical basidiomycetes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.5, p.1075-1082, set./out. 2009.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n.6, p.673-686, abr. 2005.

NOBLES, M.K.; FREW B.P. Studies in wood-inhabiting hymenomycetes. The genus *Pycnoporus* Karst. **Canadian Journal of Botany**, v.40, n.7, p.987-1016, [s. m.] 1962.

OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. Hidrólise enzimática de biomassa. Instituto de Química, **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, set. 2010.

OKINO, E.Y.A.; SANTANA, M.A.E.; SOUZA, M.R.; SOUSA, M.E. Dimensional stability and mechanical properties of acetylated *Hevea brasiliensis* flakeboards. **Journal of Tropical Forest Products**, v.7, n.1, p.96-102, [s. m.] 2001.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, n.1, p.69-80, ago. 2000.

PAVARINA, E.C. **Estudo dos Sistemas celulolítico e fermentativo de fungos macroaeróbios facultativos**. Campinas, 1997. 82p. Dissertação (Mestrado Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.

QUEVEDO, J.R.; BONONI, V.L.R.; OLIVEIRA, A.K.M.; GUGLIOTA, A.M. Agaricomycetes (Basidiomycota) em um fragmento florestal urbano na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v.10, n.4, p.430-438, out./dez. 2012.

RAJEDRAN, S.; JEZEWSKA, M.J.; BUJALOWSKI, W.J. Human DNA polymerase β recognizes single-stranded DNA using two different binding modes. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.47, p.31021–31031, ago. 1998.

RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKA, M.N.; BANO, Z. Biodegradative and biosynthetic capacities of mushrooms: present and future strategies. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.18, n.2-3, p.91-236, [s. m.] 1998.

REGINA, M.; BROETTO, F.; GIOVANNOZZI-SERMANNI, G.; MARABOTINI, R.; PERANNI, C.; LINDE, G.A.; COLAUTO, N.B.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Atividade de enzimas oxidativas do *Lentinula edodes* em substratos agroindustriais. **Semina: Ciências Agrárias**, v.30, n.4, p.881-888, out./dez. 2009.

ROBANATO, A.C. **Linhagens fúngicas na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. Botucatu, 2013. 69p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

ROCHA, G.J.M.; SILVA, J.S. Otimização das Condições de Polpação Alcalina do Bagaço de Malte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 16, 2006, São Paulo. **Resumos**. São Paulo, ABEQ, 2006.

RÜTTIMANN, C.; SCHWEMBER, E.; SALAS, L.; CULLEN, D.; VICUNA, R. Lignolytic enzymes of the white-rot basidiomycetes *Phlebia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispora*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.16, n.1, p.64-76, ago. 1992.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v.160, n.1, p.47-56, jan.1987.

SOUZA, G. **Produção, extração e estabilidade de enzimas lignocelulolíticas para uso em degradação em compostos poluentes**. Piracicaba, 2012. 111p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

STALPERS J.A. **Identification of Wood-inhabiting Aphyllophorales in Pure Culture**. 16.ed. Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1978.

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

TUOMELA, M.; VIKAMAN, M.; HATAKKA, A.; ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v.72, n.2, p.169-183, abr. 2000.

ZHANG, H.; HONG, Y.Z.; XIAO, Y.Z.; YUAN, J.; TU, X.M.; ZHANG, X.Q. Efficient production of laccases by *Trametes* sp. AH28-2 in cocultivation with a *Trichoderma* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.73, n.1, p.89-94, nov. 2006.