



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

VITÓRIA DURÃES CHLUSEWICZ

**DESLIGNIFICAÇÃO DE SERRAGEM DE PINUS
PRÉ-TRATADA VISANDO A CADEIA PRODUTIVA
DO BIOETANOL**

VITÓRIA DURÃES CHLUSEWICZ

**DESLIGNIFICAÇÃO DE SERRAGEM DE PINUS
PRÉ-TRATADA VISANDO A CADEIA PRODUTIVA
DO BIOETANOL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioenergia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioenergia. Área de concentração: Biocombustíveis.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rodrigues de Melo.

Londrina
2026

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C544 Chlusewicz , Vitória Durães .
DESIGNIFICAÇÃO DE SERRAGEM DE PINUS PRÉ-TRATADA VISANDO A CADEIA PRODUTIVA DO BIOETANOL / Vitória Durães Chlusewicz . - Londrina, 2026.
50 f.

Orientador: Marcelo Rodrigues de Melo.
Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, 2026.
Inclui bibliografia.

1. Lacase - Tese. 2. Polyporus tricholoma - Tese. 3. Biomassa lignocelulósica - Tese. 4. Biocombustível - Tese. I. Rodrigues de Melo, Marcelo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Bioenergia. III. Título.

CDU 662

VITÓRIA DURÃES CHUSEWICZ

**DESLIGNIFICAÇÃO DE SERRAGEM DE PINUS
PRÉ-TRATADA VISANDO A CADEIA PRODUTIVA
DO BIOETANOL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Bioenergia da
Universidade Estadual de Londrina - UEL,
como requisito parcial para a obtenção do título
de Mestre em Bioenergia.

Área de concentração: Biocombustíveis.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rodrigues de Melo
Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profª. Dra. Juliani Chico Piai Paiva
Departamento de Engenharia Elétrica
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profª. Dra. Maria Inês Rezende
Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 19 de fevereiro de 2026.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Universidade Estadual de Londrina.

Agradeço também ao Prof. Dr. Marcelo pela orientação, por me receber em seu laboratório e em seu projeto, pela dedicação e apoio.

Aos professores do Programa de Bioenergia e parceiros.

Aos meus colegas de mestrado e laboratório, à técnica do laboratório, e aos laboratórios 343 e LAQUIBIO.

Ao meu namorado, Charles, por sempre estar ao meu lado, me incentivar e me apoiar em minhas decisões.

Aos meus pais, sempre acreditarem em meu potencial e me apoiarem.

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

RESUMO

CHLUSEWICZ, Vitória Durães. **Deslignificação de serragem de pinus pré-tratada visando a cadeia produtiva do bioetanol**. 50 f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2026.

A demanda por biocombustíveis renováveis impulsiona a busca por matérias primas alternativas, e nesse contexto, biomassas lignocelulósicas são promissoras para a produção do etanol de segunda geração (E2G). Contudo, a estrutura complexa da lignina dificulta o acesso das enzimas à celulose, comprometendo a eficiência da conversão e a viabilidade econômica do E2G. Neste estudo avaliou-se a seleção de fungos produtores de enzimas ligninolíticas e associação destas com o pré-tratamento por explosão a vapor na deslignificação de serragem de Pinus visando a cadeia produtiva do etanol. A produção de enzimas ligninolíticas por 10 fungos basidiomicetos foi realizada por fermentação em estado sólido (FES) em serragem de Pinus não tratada quimicamente obtida no comércio local. A serragem de Pinus esterilizada e umidificada foi inoculada com discos miceliais e mantido em estufa à 28 °C durante 21 dias. Os cultivos foram interrompidos pela adição de água estéril aos frascos, seguido de homogeneização, incubação em banho de ultrassom e filtração. O filtrado denominado extrato bruto enzimático (EBE) foi avaliado quanto à atividade de lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase. A enzima de maior atividade no EBE foi parcialmente purificada com sulfato de amônio, seguido de diálise, e o fungo produtor identificado molecularmente. A enzima parcialmente purificada foi utilizada para a hidrólise enzimática de serragem *in natura*, sendo esta última submetida também ao processo de explosão a vapor. A lacase do fungo *Polyporus tricholoma* MO21-28w apresentou a maior atividade enzimática, de 5,17 U mL⁻¹, e as atividades enzimáticas para manganês e lignina peroxidase foram praticamente nulas para todos os isolados. A purificação parcial da lacase de *P. tricholoma* resultou em aumento da atividade enzimática de 5,16 para 32,30 U mL⁻¹, e o uso da lacase parcialmente purificada, bem como da explosão a vapor no pré-tratamento da biomassa levaram a alterações das características físicas do material, quando observada por microscopia eletrônica de varredura. Análise de absorção UV_{280nm} da biomassa pré-tratada enzimaticamente indicou aumento de compostos solúveis após 24 horas de incubação, comprovando sua atividade deslignificante. Em relação a remoção de lignina insolúvel, tanto o pré-tratamento de explosão a vapor (2,95 %) quanto de hidrólise enzimática (2,55 %) demonstraram eficácia individual, sendo que a combinação dos tratamentos atingiu 5,11 % de remoção de lignina. Estes resultados indicam que a enzima do fungo *P. tricholoma* MO21-28w apresenta potencial para aplicação no pré-tratamento da serragem de Pinus, de forma isolada ou combinada do pré-tratamento físico por explosão a vapor.

Palavras-chave: Lacase; *Polyporus tricholoma*; Biomassa lignocelulósica; Biocombustível.

ABSTRACT

CHLUSEWICZ, Vitória Durães. **Delignification of pretreated pine sawdust aiming at the bioethanol production chain.** 50 f. Dissertation (Master's Degree in Bioenergy) – Post Graduate Program in Bioenergy, Center for Exact Sciences, State University of Londrina, Londrina, 2026.

The demand for renewable biofuels drives the search for alternative raw materials, in this context, lignocellulosic biomasses are promising to produce second-generation ethanol (2G ethanol). However, the complex structure of lignin hinders enzyme access to cellulose, compromising conversion efficiency and the economic viability of 2G ethanol. This study evaluated the selection of fungi producing ligninolytic enzymes and their association with steam explosion pretreatment in the delignification of Pinus sawdust, aiming at the ethanol production chain. The production of ligninolytic enzymes by 10 basidiomycete fungi was carried out via solid-state fermentation (SSF) on chemically untreated Pinus sawdust obtained from local commerce. Sterilized and moistened Pinus sawdust was inoculated with mycelial discs and kept in an incubator at 28 °C for 21 days. The cultures were stopped by adding sterile water to the flasks, followed by homogenization, incubation in an ultrasonic bath, and filtration. The filtrate, called crude enzymatic extract (CEE), was evaluated for laccase, lignin peroxidase, and manganese peroxidase activity. The enzyme with the highest activity in the CEE was partially purified with ammonium sulfate followed by dialysis, and the producing fungus was molecularly identified. The partially purified enzyme was used for the enzymatic hydrolysis of in natura sawdust, which was also subjected to the steam explosion process. The laccase from the fungus *Polyporus tricholoma* MO21-28w showed the highest enzymatic activity, 5.17 U mL⁻¹, while manganese and lignin peroxidase activities were practically null for all isolates. Partial purification of *P. tricholoma* laccase resulted in an increase in enzymatic activity from 5.16 to 32.30 U mL⁻¹, and the use of partially purified laccase, as well as steam explosion in biomass pretreatment, led to changes in the material's physical characteristics, as observed by scanning electron microscopy. UV absorption analysis at 280 nm of the enzymatically pretreated biomass indicated an increase in soluble compounds after 24 hours of incubation, proving its delignifying activity. Regarding insoluble lignin removal, both steam explosion pretreatment (2.95%) and enzymatic hydrolysis (2.55%) demonstrated individual efficacy, with the combination of treatments achieving 5.11% lignin removal. These results indicate that the enzyme from the fungus *P. tricholoma* MO21-28w has potential for application in the pretreatment of Pinus sawdust, either alone or combined with physical pretreatment by steam explosion.

Key-words: Laccase; *Polyporus tricholoma*; Lignocellulosic biomass; Biofuel.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVO GERAL	12
2.1	Objetivos específicos.....	12
3	REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1	Produção de etanol combustível no Brasil.....	13
3.1.1	Etanol de segunda geração.....	14
3.2	Biomassas lignocelulósicas para produção de E2G.....	15
3.2.1	Produção de Pinus e serragem no Brasil e no estado do Paraná.....	16
3.3	Pré-tratamentos utilizados em biomassa lignocelulósica	17
3.3.1	Pré-tratamento físico por explosão a vapor	18
3.3.2	Sacarificação enzimática da biomassa	19
3.4	Fermentação em estado solido (FES) para produção de enzimas lignolíticas.....	19
3.4.1	Fungos basidiomicetos produtores de enzimas lignolíticas.....	20
3.5	Importância e ação de enzimas lignolíticas na biomassa lignocelulósica.....	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1	Fermentação em estado sólido (FES).....	23
4.1.1	Extrato bruto enzimático (EBE).....	24
4.2	Determinação da atividade enzimática no EBE	24
4.2.1	Lacase	24
4.2.2	Ligninase peroxidase	25
4.2.3	Manganês peroxidase	25
4.3	Identificação molecular do isolado MO21-28w	26
4.4	Purificação parcial da enzima de maior atividade	26
4.4.1	Determinação da concentração ideal de sulfato de amônio para purificação parcial da enzima	27
4.4.2	Purificação parcial da enzima de interesse	28
4.5	Caracterização da serragem de Pinus	28

4.5.1	Teor de umidade.....	28
4.5.2	Teor de lignina insolúvel	29
4.5.3	Teor de celulose e hemicelulose	29
4.6	Pré-tratamento da serragem de Pinus	30
4.6.1	Explosão a vapor	30
4.6.2	Tratamento enzimático	30
4.6.3	Análise de lignina após os pré-tratamentos	31
4.6.4	Análise de açúcares redutores.....	31
4.6.5	Análise por microscopia eletrônica de varredura da serragem antes e após tratamentos.....	31
4.7	Análises estatísticas	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	Fermentação em estado sólido (FES).....	33
5.2	Determinação da atividade enzimática.....	34
5.3	Identificação molecular do isolado MO21-28w	35
5.4	Purificação parcial da enzima de maior atividade	36
5.5	Caracterização da serragem de Pinus	37
5.6	Pré-tratamento da serragem de Pinus	38
6	CONCLUSÃO	43
6.1	Sugestões para trabalhos futuros.....	43
7	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

O etanol desempenha um papel estratégico na substituição dos combustíveis fósseis, contribuindo para a mitigação dos impactos ambientais e para a diversificação da matriz energética. Entretanto, a crescente demanda por esse biocombustível impõe o desafio de ampliar sua produção sem intensificar a competição por áreas agrícolas destinadas à produção de alimentos. Nesse contexto, o aproveitamento de resíduos agroindustriais surge como uma alternativa promissora, especialmente para a produção de etanol de segunda geração (E2G).

O Brasil destaca-se nesse cenário por sua grande atividade agroindustrial, que resulta na geração de grandes volumes de resíduos lignocelulósicos com potencial para conversão energética. No estado do Paraná, a presença de um importante polo moveleiro impulsiona o cultivo de espécies do gênero *Pinus*, cujo processamento para a produção de madeira serrada gera a serragem como principal resíduo. Esse subproduto, frequentemente subutilizado, apresenta elevado potencial como matéria-prima para a produção de E2G, agregando valor a cadeias produtivas já consolidadas.

Por se tratar de uma biomassa lignocelulósica, a serragem de *Pinus* apresenta elevada recalcitrância estrutural, decorrente da complexa associação entre celulose, hemicelulose e lignina. Essa característica dificulta o acesso das enzimas hidrolíticas aos polissacarídeos fermentescíveis, tornando indispensável a aplicação de pré-tratamentos para viabilizar a conversão da biomassa em açúcares. Diante disso, tem-se buscado o desenvolvimento de tecnologias que promovam a desestruturação da matriz lignocelulósica de forma eficiente e ambientalmente sustentável, reduzindo a geração de resíduos tóxicos. Nesse contexto, os pré-tratamentos combinados, especialmente a associação de métodos físicos e biológicos, têm se mostrado estratégias promissoras.

Entre os métodos físicos, a explosão a vapor destaca-se por empregar apenas água e calor para promover alterações estruturais nas fibras da biomassa, aumentando a área superficial e a acessibilidade aos polímeros estruturais. De forma complementar, os tratamentos biológicos, em especial a hidrólise enzimática, atuam de maneira mais seletiva sobre os componentes da matriz lignocelulósica, contribuindo para a remoção parcial da lignina e para a redução da recalcitrância do material.

Os principais microrganismos empregados em tratamentos biológicos da biomassa são os fungos, com destaque para os fungos basidiomicetos causadores de podridão branca. Esses microrganismos possuem a capacidade de utilizar a madeira como fonte de carbono e energia, secretando um complexo sistema de enzimas ligninolíticas que atuam diretamente sobre a

lignina. Embora diversos basidiomicetos sejam capazes de colonizar a serragem de *Pinus*, ainda são limitados os estudos que exploram seu potencial específico no pré-tratamento dessa biomassa com foco na produção de etanol de segunda geração.

Assim, o presente trabalho propõe como solução a utilização de enzimas ligninolíticas produzidas por fungos basidiomicetos, associadas ao pré-tratamento físico por explosão a vapor, como uma estratégia sustentável e eficiente para a redução da recalcitrância da serragem de *Pinus*. Ao investigar essa abordagem combinada, busca-se contribuir para o desenvolvimento de tecnologias mais limpas e viáveis para o aproveitamento de resíduos florestais na cadeia produtiva do bioetanol, ampliando as perspectivas para a produção de biocombustíveis de segunda geração no Brasil.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de enzimas ligninolíticas produzidas por basidiomicetos no pré-tratamento combinado da serragem de Pinus visando a redução da recalcitrância da biomassa.

2.1 Objetivos específicos

- Selecionar fungos filamentosos produtores de enzimas ligninolíticas;
- Produzir enzimas ligninolíticas por fermentação em estado sólido (FES);
- Avaliar a atividade de lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase nos extratos enzimáticos obtidos das FES;
- Realizar a purificação parcial da enzima de interesse no extrato bruto enzimático;
- Identificar geneticamente o isolado fúngico com maior produção enzimática;
- Caracterizar a serragem de Pinus em termos de umidade, lignina, celulose e hemicelulose;
- Avaliar a eficiência do pré-tratamento físico (explosão a vapor adaptada) e enzimático (lacase) na solubilização e redução do teor de lignina da biomassa.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Neste capítulo serão apresentados os principais conceitos, fundamentos e avanços científicos relacionados à produção de etanol de segunda geração a partir de biomassas lignocelulósicas, com ênfase na serragem de Pinus. Serão abordados temas como a estrutura e composição das biomassas, métodos de pré-tratamento físico e biológico, a importância das enzimas lignolíticas produzidas por fungos basidiomicetos, além das estratégias para otimizar a conversão da biomassa em biocombustível.

3.1 Produção de etanol combustível no Brasil

O etanol é uma substância química produzida via fermentação de açúcares por leveduras, e no Brasil é comercializado em todo o país como um combustível acabado na forma hidratada, ou como componente de mistura na formação da gasolina C, na forma anidra (ANP, 2020). As especificações do etanol hidratado e etanol anidro comercializados no país são estabelecidas pela Resolução ANP nº 907/2022.

O Brasil é pioneiro na utilização em larga escala de etanol combustível desde o fim da década de 1970, com o Programa Pró-Álcool, e é o segundo maior produtor de etanol, logo depois dos Estados Unidos, tendo produzido no total 37,25 bilhões de litros na safra 2024/2025 (UNICADData, 2025). A região Centro-oeste foi responsável por 49,6 % da produção nacional de etanol (anidro e hidratado) até outubro de 2025, seguida pela região Sudeste, que produziu 41,9 % (ANP, 2025).

O etanol pode ser produzido a partir de quaisquer vegetais que possuam grande quantidade de açúcares em sua composição, como a cana-de-açúcar e a beterraba, ou de outros que contenham substâncias que podem facilmente ser convertidos em açúcar, como o amido presente no milho e em outros cereais. A partir da fermentação desses açúcares, o etanol obtido é chamado de etanol de primeira geração (E1G) (Santos *et al*, 2023). A principal matéria prima para a produção do etanol é a cana-de-açúcar, correspondendo a 89,17 % do total, até agosto de 2025. Dentre as outras matérias primas, se destaca o milho (6,68 %) e o melaço (4,01 %), porém também fazem parte o bagaço e palha de cana-de-açúcar (ANP, 2025).

O etanol lignocelulósico, ou etanol de segunda geração (E2G), é obtido de outras matérias-primas que possuem pouca quantidade de açúcares livres disponíveis, que são as biomassas lignocelulósicas, sendo geralmente utilizadas bagaço e palha da cana-de-açúcar, entre outros resíduos agroindustriais. Ele é obtido através da hidrólise da estrutura

lignocelulósica e posterior conversão fermentativa dos açúcares liberados em etanol (EPE, 2021).

3.1.1 Etanol de segunda geração

O etanol de segunda geração (E2G) ou lignocelulósico se insere na categoria dos biocombustíveis de segunda geração por utilizar insumos alternativos, como subprodutos da agroindústria, sem competir com matérias-primas básicas destinadas à alimentação ou à produção de biocombustíveis de primeira geração (EPE, 2021). No Brasil, essa inovação tem recebido amplo apoio público, desde centros de pesquisa especializados até investimentos em plantas comerciais. Existem três plantas comerciais de E2G: a Bioflex-I da Granbio (30 milhões de litros/ano) e duas da Raízen (42 e 82 milhões de litros/ano), todas utilizando resíduos da cana-de-açúcar. A Raízen possui cinco novos projetos de ampliação, com início de operação previsto até 2027 (EPE, 2023).

A produção de E2G envolve etapas como produção de enzimas, pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação, separação e destilação (Lima, 2019). O uso de resíduos lignocelulósicos permite aumentar a produção sem ampliar a área plantada, reduzindo a pegada de carbono e contribuindo para o ODS 7 da Agenda 2030 – assegurar o acesso confiável, sustentável, moderno e a preço acessível à energia para todos (Silva; Migot; Silva, 2019). O E2G representa uma grande oportunidade para aumentar a participação de energias limpas na matriz energética brasileira, considerada a mais verde entre os países industrializados (EPE, 2021). De acordo com o estudo de Silva e Queiroz (2022), os impactos econômicos e ambientais do E2G são majoritariamente positivos, prevendo uma significativa redução do custo de produção a médio e longo prazo, além da diminuição de impactos ambientais negativos, reforçando a viabilidade econômica do investimento e a oportunidade de ampliar energias limpas.

No contexto mais amplo, a concretização da Agenda 2030 depende fundamentalmente da mobilização de investimentos substanciais em áreas-chave e de uma forte e contínua vontade política dos governos, do setor privado e da sociedade civil, sendo crucial para criar estruturas legais e garantir a estabilidade das políticas (Santos *et al.*, 2023). E apesar de ser uma inovação crucial, ainda há um certo desconhecimento significativo sobre o E1G e E2G e sobre o potencial produtivo do Brasil. Essa lacuna evidencia a falha da mídia em utilizar suas plataformas (televisão e internet) como um instrumento educacional essencial para construir conhecimento

sobre o E2G e suas contribuições para o desenvolvimento econômico e ambiental (Tavora; Morgado, 2023).

Contudo, apesar da perspectiva otimista, o E2G enfrenta desafios como a logística de produção e transporte de matérias-primas, altos custos de produção (principalmente aos pré-tratamentos) e a necessidade de desenvolvimento tecnológico para o amadurecimento comercial. O E2G é visto como uma solução oportuna para construir um mercado internacional de biocombustíveis, ajudando a superar barreiras não tarifárias impostas ao etanol convencional, promovendo maior aproveitamento energético da biomassa e, em conjunto com a bioeletricidade e o biometano, impulsionando as biorrefinarias (EPE, 2021).

3.2 Biomassas lignocelulósicas para produção de E2G

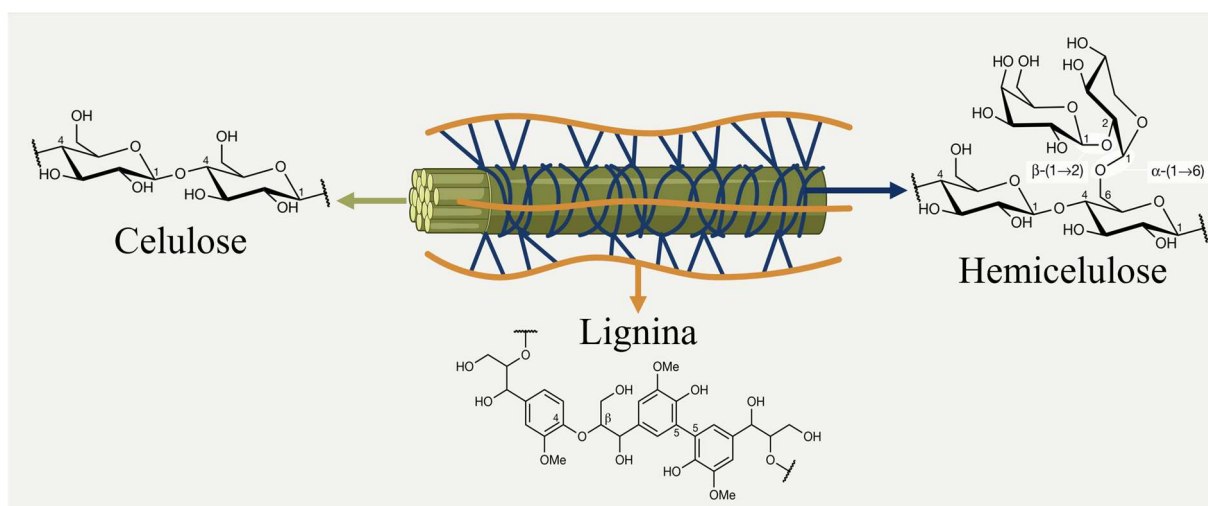
A biomassa lignocelulósica é a matéria-prima mais abundantemente disponível no planeta para a produção de biocombustíveis e pode ser classificada genericamente em biomassa virgem, resíduos de biomassa e culturas destinadas à produção de energia. A biomassa virgem inclui todas as plantas que ocorrem naturalmente, como árvores, arbustos e gramíneas. Resíduos de biomassa são produzidos como um subproduto em diversos setores industriais, como o agrícola (palha de milho, bagaço e palha de cana-de-açúcar) e o florestal (resíduos do setor de celulose e papel, serrarias, dentre outros). As culturas destinadas à produção de energia apresentam alto rendimento de biomassa, sendo estas produzidas para servir como matéria-prima para a produção de biocombustíveis 2G, que incluem cana, sorgo-sacarino, capim-elefante, dentre outras (Lima, 2019).

O Brasil dispõe de uma grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais cujo bioprocessamento desperta grande interesse econômico e social os quais têm sido estudados para a produção de biocombustíveis, como bagaço e palha de cana-de-açúcar, palha e sabugo de milho, farelo de arroz, bagaço de laranja e serragem (Cordeiro *et al.*, 2019; Moraes *et al.*, 2021; Oliveira; Oliveira; Cassiano, 2020; Rosa; Pinheiro, 2021; Santos *et al.*, 2022).

A estrutura da biomassa é formada pela interação complexa de três macromoléculas (Figura 1): dois polissacarídeos (celulose e hemiceluloses) e uma macromolécula aromática (lignina), além de outros compostos em menores proporções como proteínas estruturais, lipídios e cinzas. A celulose, principal polissacarídeo presente nas biomassas lignocelulósicas, é um componente estrutural da parede celular das plantas formada por moléculas de glicose, sendo um homopolissacarídeo. As hemiceluloses são heteropolímeros de estrutura amorfa e variável, formando cadeias moleculares curtas e bastante ramificadas. Depois da celulose, a lignina é a

macromolécula orgânica mais importante nos materiais lignocelulósicos, sendo responsável por conferir rigidez à parede das células, agindo como um agente permanente de ligação entre elas, gerando uma estrutura resistente ao impacto, compressão e dobra (Lima, 2019).

Figura 1 - Estrutura lignocelulósica com apresentação dos polímeros de celulose, hemicelulose e lignina.



Fonte: Adaptado de Biorender (2025) e Petridis, Smith (2018).

As biomassas lignocelulósicas possuem uma recalcitrância natural, conferida pela lignina, que acaba se tornando um dos principais gargalos na produção de E2G, uma vez que os carboidratos não estão facilmente acessíveis ao ataque por reagentes químicos ou enzimas que efetuarão a sua despolimerização para posterior processamento e obtenção do combustível. Devido a isso, estudos analisam diversos tratamentos para a utilização e otimização de biomassas residuais industriais, incluindo a serragem de Pinus (Mandieta *et al.*, 2021; Xie *et al.*, 2024).

3.2.1 Produção de Pinus e serragem no Brasil e no estado do Paraná

O Brasil possui uma grande base florestal com 9,5 milhões de hectares de florestas plantadas, dos quais 1,7 milhão são compostos por espécies do gênero *Pinus*. Esta cultura concentra-se majoritariamente nas regiões Sul e Sudeste devido à tolerância dessas espécies a baixas temperaturas e solos menos produtivos. O estado do Paraná, em particular, detém 42% dessa área, e é um dos protagonistas na produção de madeira e mobiliário, sustentando a indústria de madeira processada mecanicamente. Entre as mais de 90 espécies conhecidas, o

Pinus taeda e o *Pinus elliottii* ganham destaque comercial pelo rápido crescimento e versatilidade, sendo amplamente utilizados na produção de celulose, papel, chapas e madeira serrada (ABIMCI, 2022; Natalli *et al.*, 2024; Pereira, 2020).

Com uma produção que atingiu 8,2 milhões de m³ em 2021 de madeira serrada de coníferas, grupo de fibras longas que engloba o gênero *Pinus*, resulta em um volume grande de subprodutos. Estima-se que a taxa de geração de serragem na indústria madeireira varie entre 16% e 36%. Dado o protagonismo do Paraná nesse setor, tal resíduo consolida-se como uma biomassa de alto interesse para a conversão em biocombustíveis, como o etanol de segunda geração (E2G) (Cerqueira *et al.*, 2012).

No entanto, a viabilidade tecnológica dessa conversão depende da compreensão da estrutura química da biomassa. O *Pinus*, como uma gimnosperma (ou *soft wood*), possui uma lignina do tipo guaiacil (tipo G), que é mais homogênea e composta quase exclusivamente por unidades derivadas do álcool coniferílico. Para que o carbono presente nessa matriz lignocelulósica torne-se acessível ao processo fermentativo, é indispensável a aplicação de pré-tratamentos biológicos, físicos ou químicos (Campos, 2023; Sarria-Villa *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2024).

3.3 Pré-tratamentos utilizados em biomassa lignocelulósica

O pré-tratamento representa a etapa inicial e um dos maiores gargalos econômicos na produção de bioetanol de segunda geração (E2G), respondendo por, ao menos, 20% dos custos totais do processo. Sua finalidade é solubilizar ou modificar os componentes da matriz lignocelulósica (celulose, hemiceluloses e lignina), favorecendo a etapa seguinte de hidrólise enzimática e promovendo a liberação de açúcares fermentescíveis (Lima, 2019). Os métodos podem ser classificados em físicos, químicos, físico-químicos e biológicos, além das abordagens combinadas. As abordagens combinadas de diferentes pré-tratamentos buscam maximizar a digestibilidade da celulose ao remover hemiceluloses e lignina, o que minimiza a formação de subprodutos de degradação (Riaz *et al.*, 2025).

Enquanto os métodos físicos focam no aumento da área superficial sem alterar a composição química, os métodos químicos e físico-químicos são amplamente estudados por sua eficiência técnica (Santos *et al.*, 2022). A remoção da lignina é um ponto crucial, pois seu são moléculas constituídas por um sistema aromático composto de unidades de fenilpropano, e é morfologicamente amorfa, pois seu formato tridimensional é aleatório e altamente ramificado (Wastowski, 2018). Esses fatores limitam o acesso das enzimas à celulose, consequentemente

diminuindo a eficácia do tratamento. Processos como o uso de agentes alcalinos, oxidativos ou organosolv promovem mudanças estruturais por clivagem de ligações, reduzindo essa recalcitrância (Lima, 2019; Xie *et al.*, 2024).

Apesar da diversidade de métodos, a escolha do pré-tratamento ideal é direcionada pelo equilíbrio entre eficiência técnica, custo operacional e impacto ambiental. Alinhado ao ODS 12 (Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis), há uma busca crescente por tecnologias que minimizem a geração desses resíduos tóxicos. Nesse cenário, o pré-tratamento por explosão a vapor se sobressai por utilizar majoritariamente água e calor, mas outras estratégias sustentáveis incluem a ozonólise, que opera em temperatura ambiente sem gerar resíduos corrosivos, e os tratamentos biológicos que, embora mais lentos, utilizam enzimas como lacases para promover uma degradação seletiva da lignina sem o uso de reagentes agressivos (Barbosa *et al.*, 2020; Moraes *et al.*, 2021).

3.3.1 Pré-tratamento físico por explosão a vapor

O pré-tratamento por explosão a vapor é um dos métodos físico-químicos mais promissores para a escala industrial por utilizar majoritariamente água e calor, o que reduz a dependência de catalisadores químicos corrosivos e se alinha ao ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis). Durante o processo, os materiais lignocelulósicos são submetidos a altas pressões de vapor saturado e temperaturas elevadas, resultando em uma descompressão súbita que rompe mecanicamente a parede celular e promove a solubilização das hemiceluloses (Barbosa *et al.*, 2020; Lima, 2019).

As principais vantagens da explosão a vapor residem no aumento da área superficial e na redistribuição da lignina, o que favorece a acessibilidade das celulasas e hemicelulasas ao substrato. Além disso, a lignina insolúvel em água resultante apresenta massa molar reduzida devido às reações de hidrólise inerentes ao processo. Essa alteração estrutural é fundamental quando o sistema é associado a tratamentos enzimáticos posteriores, visando a produção eficiente de açúcares fermentescíveis para a geração de bioprodutos (Lima, 2019; Wastowski, 2018).

Contudo, o uso de temperaturas elevadas pode desencadear a formação de inibidores que comprometem as etapas subsequentes do processo biotecnológico. Durante a desestruturação da matriz, reações secundárias geram ácidos orgânicos e compostos carboxílicos derivados da ruptura dos anéis fenólicos da lignina, que podem inibir a o

crescimento dos microrganismos assim reduzindo o rendimento global em etanol (Campos, 2023; Sarria-Villa *et al.*, 2019).

3.3.2 Sacarificação enzimática da biomassa

A conversão de biomassas lignocelulósicas em açúcares fermentescíveis, ou sacarificação, é o ponto central da produção de etanol de segunda geração (E2G), representando a etapa posterior ao pré-tratamento. Contudo, a sacarificação dessa biomassa é um desafio complexo, principalmente devido à recalcitrância da matéria-prima e à heterogeneidade dos polímeros que constituem a parede celular vegetal (Lima, 2019). Nesse contexto, o uso de coquetéis enzimáticos eficazes (compostos por celulasas e hemicelulasas) é crucial para maximizar a liberação de monômeros que serão posteriormente fermentados por microrganismos (Zhang *et al.*, 2020).

Paralelamente, os pré-tratamentos biológicos, nos quais se utilizam microrganismos vivos para a degradação da biomassa, apresentam algumas vantagens como baixo consumo energético e ausência de reagentes químicos agressivos. Entretanto, apresentam limitações críticas: o longo tempo de processo (que pode se estender por semanas) e o consumo parcial dos carboidratos da biomassa pelo próprio microrganismo, o que reduz o rendimento final de E2G (Rodrigues *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2025). Devido a esses fatores, enquanto a sacarificação é indispensável, o pré-tratamento biológico ainda enfrenta barreiras técnico-econômicas para sua ampla aplicação industrial.

3.4 Fermentação em estado solido (FES) para produção de enzimas lignolíticas

A Fermentação em Estado Sólido (FES) apresenta-se como uma estratégia fundamental para viabilizar o pré-tratamento biológico, mimetizando o habitat natural de microrganismos decompositores para degradar a matriz lignocelulósica. Ao utilizar resíduos agroindustriais como suporte e fonte de carbono, a FES promove um contato íntimo entre as hifas fúngicas e a biomassa, estimulando a secreção de complexos enzimáticos mais robustos. Essa técnica destaca-se pela baixa atividade de água, o que reduz drasticamente o risco de contaminações bacterianas e gera extratos altamente concentrados, diminuindo os custos operacionais de purificação se comparada aos processos submersos (Lima, 2019; Schmidell, 2001).

Para que o rendimento seja maximizado, a matriz sólida deve possuir características físicas ideais, como alta porosidade e granulometria adequada, permitindo o livre acesso do microrganismo a todo o meio. Esse ambiente favorece o desenvolvimento de fungos filamentosos, que são naturalmente adaptados a substratos com baixa umidade (Madigan; Martinko; Parker, 2004; Schmidell, 2001).

A eficiência desse bioprocesso no conceito de biorrefinaria está diretamente ligada à capacidade desses microrganismos de reduzirem a recalcitrância da biomassa, facilitando a conversão posterior em bioetanol de segunda geração. Dentre os diversos grupos envolvidos, os mais efetivos na secreção de enzimas capazes de romper a complexa estrutura da lignina pertencem a uma classe específica de organismos. Nesse contexto, destacam-se os fungos basidiomicetos, cujas características fisiológicas e potencial produtor de enzimas lignolíticas serão detalhados a seguir (Schmidell, 2001; Wastowski, 2018).

3.4.1 Fungos basidiomicetos produtores de enzimas lignolíticas

Os fungos basidiomicetos desempenham um papel ecológico central na natureza, sendo os principais responsáveis pela decomposição de materiais como madeira, papel e tecidos. Eles possuem a capacidade única de utilizar a celulose e a lignina como fontes de carbono e energia para sua sobrevivência (Madigan; Martinko; Parker, 2004).

Dentre os microrganismos decompositores de madeira, os fungos basidiomicetos causadores da podridão branca destacam-se como os únicos capazes de decompor completamente a lignina. Espécies como *Ganoderma lucidum*, *Trametes hirsuta*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus tricholoma* e *Polyporus brumalis* têm sido estudadas devido ao seu complexo sistema multienzimático extracelular, composto por lacases (Lac), lignina peroxidases (LiP) e manganês peroxidases (MnP) (Kiaei *et al.*, 2025; Li *et al.*, 2025; Nuchdang; Vatanyoopaisarn; Phalakornkule, 2015; Rugolo *et al.*, 2022).

Diferente dos fungos de podridão parda, que degradam preferencialmente a celulose, os basidiomicetos de podridão branca promovem uma degradação seletiva ou simultânea da lignina e das hemiceluloses. Essa característica é de extremo interesse biotecnológico, pois atua na desestruturação da barreira recalcitrante da biomassa sem comprometer a integridade dos polímeros de glicose, facilitando o acesso das celulasas para a sacarificação (Martínez *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2020).

Embora representem o sistema ligninolítico mais eficiente da natureza, o uso desses fungos em processos industriais ainda é um desafio. No contexto da serragem de Pinus, a alta

presença de resinas e a estrutura compacta das coníferas exigem linhagens com alta robustez e capacidade de secreção enzimática. Portanto, a prospecção de novas linhagens e a otimização das condições de cultivo são estratégias cruciais para revelar fontes enzimáticas com maior potencial redox e estabilidade térmica, ampliando as possibilidades para o aproveitamento de biomassas na produção de etanol de segunda geração (Suryadi *et al.*, 2022; Umar; Ahmed, 2022).

3.5 Importância e ação de enzimas lignolíticas na biomassa lignocelulósica

O conjunto de enzimas lignolíticas constitui um sistema de oxirredução presente principalmente em fungos de podridão branca, cuja função primária é promover a degradação oxidativa da lignina, liberando assim a celulose e a hemicelulose para posterior aproveitamento biotecnológico. Entre as principais enzimas envolvidas nesse processo, destacam-se as peroxidases, como a lignina peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14) e manganês peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13), e as lacases (EC 1.10.3.2). Cada grupo de enzimas possui características distintas, algumas espécies de fungos produzem apenas um subgrupo, mas outras podem sintetizar mais de um tipo (Madigan; Martinko; Parker, 2004; Wastowski, 2018).

As lacases são cuproproteínas, ou seja, possuem cobre em seu sítio ativo e atuam utilizando oxigênio molecular comoceptor de elétrons. Elas transformam diversos substratos fenólicos em radicais livres estáveis e reduzem o oxigênio a água, sendo consideradas enzimas versáteis e amplamente aplicadas em processos biotecnológicos. Diferentemente das lacases, as peroxidases são hemoproteínas e dependem estritamente do peróxido de hidrogênio para iniciar seu ciclo catalítico (Nazar *et al.*, 2023).

A lignina peroxidase se destaca pelo elevado potencial redox, permitindo oxidar unidades da lignina sem grupos fenólicos, gerando radicais que promovem a fragmentação e clivagem da estrutura polimérica. Já a manganês peroxidase apresenta um mecanismo único: requer o íon Mn^{2+} , que é oxidado pela enzima a Mn^{3+} na presença de peróxido de hidrogênio. O Mn^{3+} formado atua como mediador solúvel, difundindo-se para fora da enzima e oxidando indiretamente componentes fenólicos da lignina que são grandes demais para interagir diretamente com o sítio ativo da MnP. A ação sinérgica e complementar dessas três enzimas é fundamental para a degradação eficaz da lignina, tanto na natureza quanto na indústria para aproveitamento da biomassa (Illuri *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021).

Além dessas enzimas, existem produtoras de peróxido de hidrogênio, funcionando como acessórias às peroxidases. Elas geram peróxido de hidrogênio *in situ*, permitindo que as

peroxidases atuem. As principais enzimas produtoras de peróxido envolvidas na biodegradação da lignina são a glicose oxidase e a metanol oxidase, que utilizam glicose e metanol como substratos, respectivamente. A glicose é proveniente da biodegradação da celulose e das polioses, enquanto o metanol é produzido durante a biodegradação da própria lignina, por remoção de metoxilas ligadas aos anéis aromáticos (Wastowski, 2018).

O processo de biodegradação da lignina pode ser explicado por três principais modos, sendo a ruptura oxidativa das cadeias laterais envolvendo os carbonos α e β levando à formação de ácidos carboxílicos, a ruptura de ligações β -aril-éter e consequente modificação das cadeias laterais, e a degradação dos núcleos aromáticos por abertura oxidativa dos anéis. Essas reações ocorrem principalmente pela formação inicial de um radical catiônico nos núcleos aromáticos, intermediada pela ação das enzimas oxidativas (Campos, 2023; Wastowski, 2018).

Dessa forma, o uso de enzimas lignolíticas, especialmente aquelas produzidas por fungos de podridão branca, representa uma estratégia inovadora e sustentável para o tratamento de biomassas lignocelulósicas. Ao promoverem a degradação seletiva da lignina, essas enzimas facilitam o acesso às frações de celulose e hemicelulose, otimizando processos como a produção de bioetanol e outros bioprodutos de alto valor agregado. Além disso, a aplicação dessas enzimas reduz a necessidade de reagentes químicos agressivos, tornando o processo mais ambientalmente amigável e economicamente viável. Assim, a biotecnologia baseada em enzimas lignolíticas se destaca como uma alternativa promissora para o aproveitamento eficiente de resíduos agroindustriais e para o avanço das biorrefinarias sustentáveis.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

No presente capítulo serão descritos detalhadamente os procedimentos experimentais adotados para a realização deste estudo. Serão apresentados os materiais utilizados, as etapas de isolamento e cultivo dos fungos basidiomicetos, os métodos de produção e purificação das enzimas ligninolíticas, bem como as técnicas empregadas para caracterização da serragem de Pinus e para os pré-tratamentos físico e enzimático. Além disso, serão explicados os protocolos de análise química, microscópica e estatística, garantindo a transparência e a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

A parte experimental foi desenvolvida no Laboratório de Biotecnologia e Metabolismo Microbiano, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina. Os 10 fungos isolados utilizados foram coletados no campus da UEL e fazem parte do acervo de microrganismos do Prof. Dr. Marcelo Melo. Estes 10 isolados foram escolhidos para aumentar a probabilidade de se obter um fungo com as enzimas de interesse e por terem sido isolados de madeiras apodrecidas no solo, indicando potencial de crescimento em materiais lignocelulósicos.

4.1 Fermentação em estado sólido (FES)

A produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos foi realizada por meio de fermentação em estado sólido (FES), utilizando como substrato a serragem de Pinus não tratada quimicamente obtida no comércio local. Foram selecionados 10 fungos isolados no campus da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e foram submetidos à FES, em triplicata. Em frascos Erlenmeyer de 50 mL foram adicionados de 2 g de serragem de Pinus, esterilizados em autoclave (121 °C, 1 atm, 15 min) e mantidos em estufa de secagem (60 °C) por 24 h para remoção da umidade. Em seguida, foram adicionados de 6 mL de solução de umidificação estéril composta por (g L⁻¹): NaNO₃ (6,0), KH₂PO₄ (1,52), KCl (0,52), MgSO₄·7H₂O (0,52), ZnSO₄ (0,02), FeCl₃ (0,02) e extrato de levedura (4,0), pH 6,5 (Pontecorvo *et al.*, 1953). Em cada frasco foram inoculados três discos miceliais (10 mm Ø) retirados da borda de culturas miceliais de basidiomicetos (BDA, 10 ± 1 dia; 28 °C), visto que o crescimento fúngico ocorre por meio da extensão das células terminais, resultando em hifas mais jovens e metabolicamente ativas na zona distal (Madigan; Martinko; Parker, 2004). Os frascos inoculados foram mantidos sob condições estáticas, a 28 °C, durante 21 dias.

4.1.1 Extrato bruto enzimático (EBE)

Após o tempo de cultivo, as fermentações foram interrompidas pela adição de 20 mL de água destilada estéril a cada um dos frascos. A mistura (substrato + água destilada estéril) foi homogeneizada, mantida durante 30 minutos em ultrassom e em seguida filtrada em papel filtro. O líquido resultante da filtração contendo as enzimas produzidas, denominado de extrato bruto enzimático (EBE), foi armazenado congelado até a realização das análises.

4.2 Determinação da atividade enzimática no EBE

A atividade de enzimas ligninolíticas no EBE foram avaliadas quanto à lacase (Slomczynski *et al.*, 1995), lignina peroxidase (Tien; Kirk, 1984) e manganês peroxidase (Wariishi *et al.*, 1992). O fungo que apresentou maior atividade enzimática foi selecionado como melhor produtor e utilizado na hidrólise enzimática.

4.2.1 Lacase

A atividade de lacase foi determinada em uma mistura de 150 µL de 2,6-dimetoxifenol (DMP) 10 mM, 150 µL de tampão Mac. Ilvaine (pH 5,0), 200 µL de água deionizada e 500 µL do EBE (Slomczynsky *et al.*, 1995). A reação foi iniciada pela adição do EBE à mistura, que foi mantida a 50 °C durante 5 min e lida no espectrofotômetro a 468 nm. Primeiro determinou-se a absorbância líquida (*Abs liq*), valor correspondente a média da absorbância das amostras em duplicata (*R1* e *R2*) descontando-se os valores de absorbância da enzima (*C1*, controle da enzima) e do substrato (*C2*, controle do substrato), conforme a equação 1:

$$Abs\ liq = \frac{(R1+R2)}{2} - (C1 + C2) \quad (\text{Eq. 1}).$$

Uma vez obtido o valor da absorbância líquida, calculou-se o valor da atividade enzimática, conforme a equação 2, sendo *FD* o fator de diluição da amostra, ϵ o coeficiente de extinção molar, sendo 10000 M⁻¹ cm⁻¹ para o 2,6-dimetoxifenol (DMP), *v* o volume de amostra em mL, e *t* igual ao tempo de incubação em minutos:

$$\frac{U}{mL} = \frac{Abs\ liq \times 1000 \times FD}{\epsilon \times v \times t} \quad (\text{Eq. 2}).$$

Uma unidade de atividade enzimática (U mL^{-1}) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar $1 \mu\text{M}$ de DMP, por minuto, por mL do EBE.

4.2.2 Ligninase peroxidase

A atividade de lignina peroxidase (LiP) foi determinada em uma mistura de $1700 \mu\text{L}$ álcool veratrílico $8,0 \text{ mM}$ em tampão de tartarato ($0,1 \text{ M}$, $\text{pH } 3,0$), $100 \mu\text{L}$ de peróxido de hidrogênio $0,2 \text{ mM}$ e $200 \mu\text{L}$ de EBE (Tien; Kirk, 1984). A reação foi iniciada pela adição do EBE à mistura, que foi mantida a 30°C durante 10 min e lida no espectrofotômetro a 310 nm . Primeiro determinou-se a absorbância líquida (*Abs liq*), valor correspondente a média da absorbância das amostras em duplicata (*R1* e *R2*) descontando-se os valores de absorbância da enzima (*C1*, controle da enzima) e do substrato (*C2*, controle do substrato), conforme a equação 3:

$$Abs\ liq = \frac{(R1+R2)}{2} - (C1 + C2) \quad (\text{Eq. 3}).$$

Uma vez obtido o valor da absorbância líquida, calculou-se o valor da atividade enzimática, conforme a equação 4, sendo *FD* o fator de diluição da amostra, ϵ o coeficiente de extinção molar, sendo $9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o álcool veratrílico, v o volume de amostra em mL, e t igual ao tempo de incubação em minutos:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{Abs\ liq \times 1000 \times FD}{\epsilon \times v \times t} \quad (\text{Eq. 4}).$$

Uma unidade de atividade enzimática (U mL^{-1}) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar $1 \mu\text{M}$ de álcool veratrílico a veratrilaldeído, por minuto, por mL do EBE.

4.2.3 Manganês peroxidase

A atividade de manganês peroxidase foi determinada em uma mistura de $200 \mu\text{L}$ de MnSO_4 ($0,1 \text{ mM}$), $1400 \mu\text{L}$ de tampão malonato (50 mM , $\text{pH } 4,5$), $0,2 \text{ mL}$ de peróxido de hidrogênio $75 \mu\text{M}$ e $10 \mu\text{L}$ do EBE (Wariishi *et al.*, 1992). A reação foi iniciada pela adição do EBE à mistura, que foi mantida a 40°C durante 5 min e lida no espectrofotômetro a 270 nm .

Primeiro determinou-se a absorbância líquida (*Abs liq*), valor correspondente a média da absorbância das amostras em duplicata (*R1* e *R2*) descontando-se os valores de absorbância da enzima (*C1*, controle da enzima) e do substrato (*C2*, controle do substrato), conforme a equação 5:

$$Abs\ liq = \frac{(R1+R2)}{2} - (C1 + C2) \quad (\text{Eq. 5}).$$

Uma vez obtido o valor da absorbância líquida, calculou-se o valor da atividade enzimática, conforme a equação 6, sendo *FD* o fator de diluição da amostra, ϵ o coeficiente de extinção molar, sendo $11590\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ para o sulfato de manganês, *v* o volume de amostra em mL, e *t* igual ao tempo de incubação em minutos:

$$\frac{U}{mL} = \frac{Abs\ liq \times 1000 \times FD}{\epsilon \times v \times t} \quad (\text{Eq. 6}).$$

Uma unidade de atividade enzimática ($U\text{ mL}^{-1}$) foi definida como a quantidade de enzima necessária para converter $1\ \mu\text{M}$ de MnSO_4 ao complexo Mn (III) - malonato, por minuto, por mL do EBE.

4.3 Identificação molecular do isolado MO21-28w

A identificação molecular do isolado MO21-28w foi realizada com base na sequência ITS 1 (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA. A extração do DNA genômico, amplificação e sequenciamento da região ITS 1 foi realizada pela empresa Gentros Pesquisa e Desenvolvimento LTDA (Campinas, SP, Brasil) conforme protocolos próprios. A análise filogenética da sequência obtida foi realizada utilizando o software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versão 12 (MEGA 12) através de alinhamento com sequências disponíveis *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e construção de árvore filogenética modelo Kimura de 2 parâmetros (K2+G), utilizando dados de distância do Método *Neighbor-Joining* (NJ) e análise de bootstrap de 1.000 repetições.

4.4 Purificação parcial da enzima de maior atividade

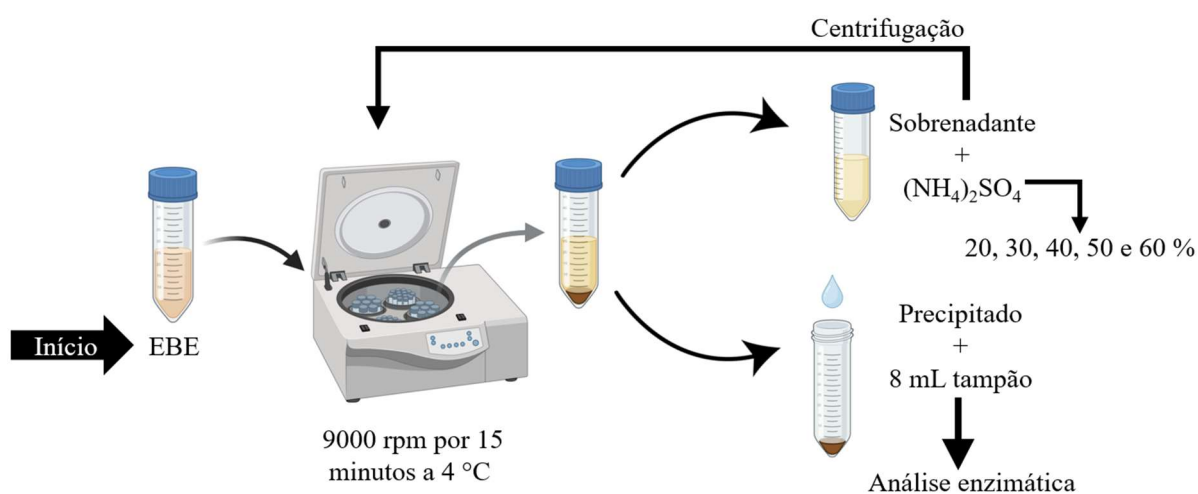
Após identificado o melhor produtor das enzimas, o fungo selecionado foi submetido

novamente à FES nas mesmas condições descritas na secção 4.2, porém o processo foi aumentado em 5 vezes. Então em frascos Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados de 10 g de serragem de Pinus, 30 mL de solução de umidificação estéril e 15 discos miceliais, em triplicata. Após isso, repetiu-se o mesmo procedimento descrito na secção 4.2.1, obtendo-se o EBE que foi tratado visando a purificação parcial da enzima de maior atividade. O procedimento de purificação foi baseado no método descrito por Umar, Ahmed (2022) utilizando sulfato de amônio.

4.4.1 Determinação da concentração ideal de sulfato de amônio para purificação parcial da enzima

Inicialmente foi necessário determinar a concentração ideal de sulfato de amônio para precipitar a maior concentração da enzima de interesse. Para isso, foi determinada a atividade enzimática nas concentrações de 0, 20, 30, 40 50, 60 e 70 % de sulfato de amônio (m/v) em 200 mL de EBE. Iniciou-se centrifugando o volume de EBE a 0 % a 9000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi reservado, e o precipitado (0 %) foi ressuscitado em 8 mL de tampão fosfato 0,1M, pH 6,0 e mantido na geladeira até a análise de atividade enzimática. Ao sobrenadante separado, foi adicionado sulfato de amônio até concentração de 20 %, repetiu-se o processo de centrifugação, separação do sobrenadante e ressuspensão do precipitado, conforme ilustra a Figura 2, e esse processo foi repetido até atingir a concentração de 70 % sulfato de amônio.

Figura 2 - Fluxograma de determinação da concentração ideal de sulfato de amônio.



Fonte: Autoria própria (2025).

Cada precipitado das diferentes concentrações foi analisado quanto a atividade enzimática de maior atividade (método descrito na secção 4.3.1) e quantidade de proteína, utilizando o método de Lowry *et al.* (1951) e albumina como padrão.

4.4.2 Purificação parcial da enzima de interesse

Uma vez determinada a concentração ideal de sulfato de amônio, foi repetido o procedimento em 450 mL de EBE com sulfato de amônio a 20 %, com objetivo de precipitar outras enzimas e proteínas que não a de interesse. Em seguida foi adicionado sulfato de amônio até a concentração ideal previamente determinada, repetiu-se o procedimento e o precipitado ressuspendido foi mantido refrigerado por 12 horas. Em seguida, ele foi submetido à diálise por 24 horas a 4 °C em tampão fosfato 0,1M, pH 6,0 e congelado até a utilização.

4.5 Caracterização da serragem de Pinus

Para a caracterização da biomassa, a serragem de Pinus não tratada quimicamente obtida no comércio local foi secada em estufa a 60 ± 3 °C por 24 h antes de iniciar os testes (exceto teor de umidade), tendo uma camada de 1 cm na secagem. Após isso, foi passada em uma peneira de mesh 28, utilizando o material fino peneirado para as análises.

4.5.1 Teor de umidade

Para determinar o teor de umidade, um cadinho de porcelana foi colocado em uma estufa a 105 ± 3 °C por 1 h, sendo transferido para um dessecador por 30 minutos para esfriar a temperatura ambiente e então anotada a sua massa. Em seguida, foi adicionado 1,0 g de serragem de Pinus (MSu) no cadinho e levado à estufa a 105 ± 3 °C por 2 h. Após este tempo, ele foi colocado em um dessecador por 30 minutos para esfriar a temperatura ambiente e então anotada a sua massa (MSs), sendo repetido o processo até massa constante, conforme a NBR 16550 (ABNT, 2018). A umidade foi calculada em porcentagem pela equação 7:

$$Umidade (\%) = \left(\frac{MSu - MSs}{MSu} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 7}).$$

4.5.2 Teor de lignina insolúvel

Para determinar o teor de lignina insolúvel (*LI*) em ácido, foi utilizado o método TAPPI T222 om-88 (1999). Então pesou-se 1 g de amostra de serragem de Pinus em base seca (*MSs*) e transferiu-se para um béquer de 50 mL. Os béqueres foram colocados em agitadores magnéticos, em banho maria com uma placa de Petri a 60 °C. Em seguida foram adicionados 10 mL de ácido sulfúrico 72 %, então o béquer foi coberto com papel alumínio e mantido por 7 minutos sob aquecimento e agitação. Após esse período, a solução foi transferida para um Erlenmeyer de 500 mL e adicionados 275 mL de água destilada, e autoclavada a 120 °C por 30 minutos. Após o resfriamento dos frascos, o conteúdo foi filtrado a vácuo com 600 mL de água destilada, tendo a massa dos filtros conhecida, e em seguida foram secados em estufa a 100 °C por 12 horas. Após este período, foram resfriados em dessecador por 30 minutos, pesados e descontado o valor do filtro, obtendo a massa de lignina (*ML*). Para calcular o teor de lignina insolúvel em ácido, utilizou-se a equação 8:

$$\text{Lignina Insolúvel (\%)} = \frac{ML}{MSs} \times 100 \quad (\text{Eq. 8}).$$

4.5.3 Teor de celulose e hemicelulose

Os teores de celulose e hemicelulose foram determinados segundo a metodologia de Van Soest (1965), utilizando detergente ácido (FDA) e neutro (FDN). Então pesou-se 0,5 g de amostra de serragem de Pinus em base seca (*MS*) para FDA e FDN, e transferiu-se para um Erlenmeyer de 125 mL. Nos frascos FDN foi adicionado 0,5 g de sulfito de sódio e 50 mL de reagente FDN, e nos frascos FDA, 50 mL de reagente FDA. Os frascos foram cobertos com papel alumínio e foram colocados em banho maria fervente por 1 hora. Após resfriadas, as soluções foram filtradas a vácuo com 800 mL de água destilada, tendo a massa conhecida dos filtros, e a filtragem finalizada com 40 mL de acetona. Os filtros foram secados em estufa a 100 °C por 12 horas. Após este período, foram resfriados em dessecador por 30 minutos e pesados. Foram descontados os valores de massa dos filtros, obtendo os valores de massa filtrada (*MF*). Para calcular os teores de celulose e hemicelulose, primeiro calculou-se os valores de FDA e FDN, conforme as equações 9 e 10:

$$FDA = \frac{MF}{MS} \times 100 \quad (\text{Eq. 9}),$$

$$FDN = \frac{MF}{MS} \times 100 \quad (\text{Eq. 10}).$$

Em seguida utilizou-se as equações 11 e 12 para obter os teores de celulose e hemicelulose:

$$\%Celulose = FDA - \%Lignina \quad (\text{Eq. 11}),$$

$$\%Hemicelulose = FDN - FDA \quad (\text{Eq. 12}).$$

4.6 Pré-tratamento da serragem de Pinus

Após a obtenção da enzima purificada e a caracterização da serragem, seguiu-se para a etapa de pré-tratamento da serragem de Pinus. Esta foi peneirada utilizando o material fino peneirado em 28 mesh (Sarria-Villa *et al.*, 2019), e o pré-tratamento foi realizado em duas etapas: física (explosão a vapor) e biológica (hidrólise enzimática).

4.6.1 Explosão a vapor

Para aumentar a área de contato das enzimas, a serragem foi submetida ao pré-tratamento de explosão a vapor em escala laboratorial, segundo o método utilizado por Barbosa *et al.* (2020). Em frascos Erlenmeyers de 250 mL, foram adicionados 10 g da serragem e 90 mL de água destilada, e os frascos foram vedados com papel alumínio. Então foram colocados em autoclave por 45 minutos a 120 °C a 1 atm e após este tempo a autoclave foi desligada e despressurizada imediatamente. O material foi filtrado e mantido em estufa a 60 °C por 24 horas para secagem.

4.6.2 Tratamento enzimático

O tratamento enzimático da lignina foi realizado baseado no método de Kruseniskia *et al.* (2019) com modificações, assim em frascos Erlenmeyer de 50 mL foram adicionados 1 g da serragem, tampão citrato de sódio 0,05 mol L⁻¹ com pH 4,8 e solução de enzima correspondente 10 U mg⁻¹ de enzima de maior atividade, conforme a Tabela 1, e as amostras foram coletadas após 24 horas. Após esta etapa, as amostras foram analisadas quanto a liberação de lignina solúvel e açúcares redutores no meio, e remoção de lignina insolúvel da biomassa. Os

experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 1 - Experimento de deslignificação com diferentes concentrações de enzima.

Tratamento	Explosão a vapor	Hidrólise enzimática	Tampão (mL)	Solução enzimática (mL)
Controle (C)	-	-	10	0
TE	+	-	10	0
HE	-	+	9	1
TEHE	+	+	9	1

Legenda: TE – tratamento de explosão; HE – hidrólise enzimática; TEHE – tratamento de explosão e hidrólise

Fonte: Autoria própria (2025).

4.6.3 Análise de lignina após os pré-tratamentos

Para determinação da lignina liberada no meio, foi coletada uma alíquota líquida de cada amostra, que foi diluída na proporção 1:10 e filtrada em filtro 0,22 μm . Em seguida foram analisadas por Espectrofotometria de UV-Vis em varredura de 260 a 360 nm no equipamento Genesys™ 6 Spectrophotometer, observando o pico em 280 nm, comprimento na qual a lignina possui maior absorbância. Foi utilizado tampão como linha base para os tratamentos C e TE, e uma solução de tampão com a mesma concentração de enzima que os tratamentos como linha base dos tratamentos HE e TEHE (Cruz; Dangelo; Oliveira, 2019). Além da análise de espectrofotometria em varredura, também foi realizada a análise de lignina insolúvel em ácido conforme descrito na secção 4.5.2.

4.6.4 Análise de açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores liberados nos diferentes tratamentos foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), conforme descrito por Miller (1959). As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 540 nm, utilizando uma curva padrão de glicose para a quantificação, e os resultados expressos em mg mL^{-1} .

4.6.5 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura da serragem antes e após tratamentos

Para visualização do efeito dos tratamentos na serragem, foi utilizada a técnica de

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no equipamento de marca Thermo Fisher-FEI, modelo Apreo 2 C, fabricado na Holanda, EU, com fonte de geração de elétrons por emissão de campo (FEG-SEM) com a metodologia de recobrimento com ouro (Au). As imagens foram feitas nos aumentos 1000x e 2000x nas amostras Controle do tratamento, Tratamento de Explosão, Tratamento de Hidrólise e Tratamento de Fermentação em Estado Sólido.

4.7 Análises estatísticas

Com exceção dos cultivos dos 10 isolados, todos os demais cultivos e análises foram realizados em triplicata e submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica Versão 10 (Stat Soft Inc., Tulsa, OK, USA, 2011) e os gráficos plotados através do software SigmaPlot Versão 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA, 2013).

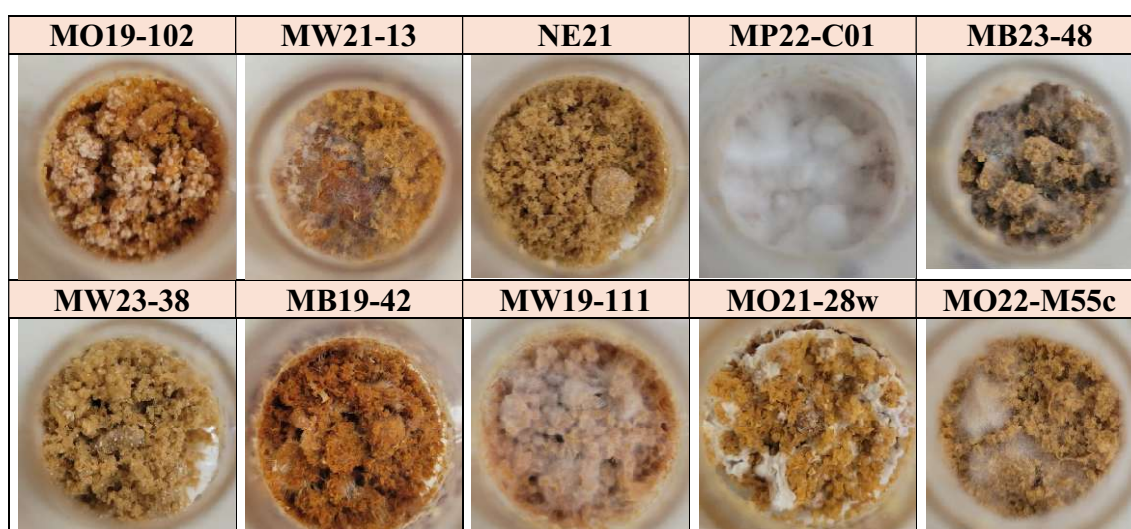
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente capítulo serão apresentados e discutidos os dados obtidos ao longo dos experimentos realizados, destacando as principais descobertas relacionadas à produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos, à caracterização da serragem de Pinus e à eficácia dos diferentes pré-tratamentos aplicados. Serão discutidos os resultados referentes ao crescimento fúngico, atividade enzimática, identificação molecular, purificação das enzimas, análises químicas e microscópicas da biomassa, bem como a remoção de lignina e a liberação de açúcares redutores. A análise crítica dos resultados permite avaliar o potencial biotecnológico das estratégias adotadas e suas contribuições para a cadeia produtiva do bioetanol.

5.1 Fermentação em estado sólido (FES)

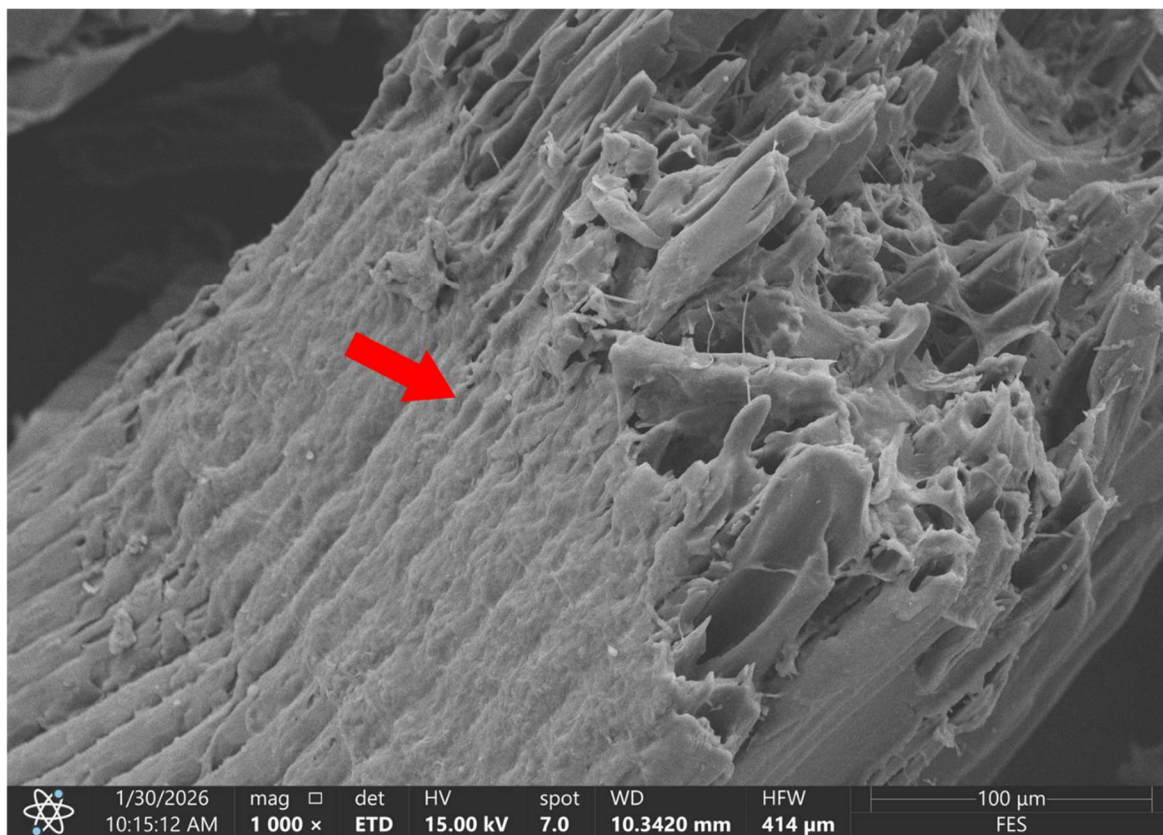
Dentre os 10 isolados fúngicos cultivado por FES para produção de enzimas ligninolíticas, 8 apresentaram crescimento micelial visível no substrato, com os isolados NE21 e MW23-38 não apresentando crescimento micelial visível (Figura 3). Também é possível observar na Figura 4, a amostra do isolado MO21-28w submetida à microscopia eletrônica de varredura, a colonização do material pelo fungo, sendo possível notar a presença extensa de hifas, destacando a capacidade do fungo em utilizar o material como suporte de crescimento e fonte de energia.

Figura 3 – Isolados crescidos em serragem.



Fonte: Autoria própria (2025).

Figura 4 – Amostra de serragem colonizada pelo isolado MO21-28w submetida a microscopia eletrônica de varredura.

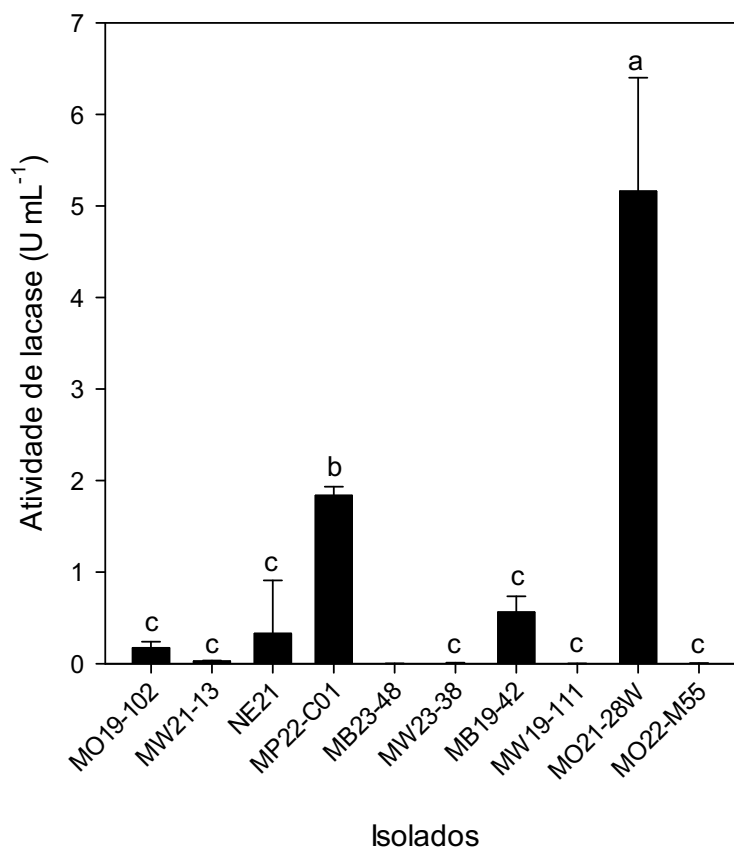


Fonte: Autoria própria (2025).

5.2 Determinação da atividade enzimática

Em relação às atividades enzimáticas, apenas a atividade de lacase foi detectada no EBE dos diferentes isolados, não sendo detectadas atividade de lignina peroxidase e manganês peroxidase. A atividade de lacase foi detectada em 9 dos 10 EBEs testados, com a maior atividade obtida com o isolado MO21-28w (5,16 U) e com o isolado MB23-48 não tendo atividade de lacase detectável (Figura 5).

Figura 5 - Atividade enzimática da lacase no EBE de isolados cultivados em serragem de Pinus.



a, b, c Atividades enzimáticas seguidas de mesmas letras não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

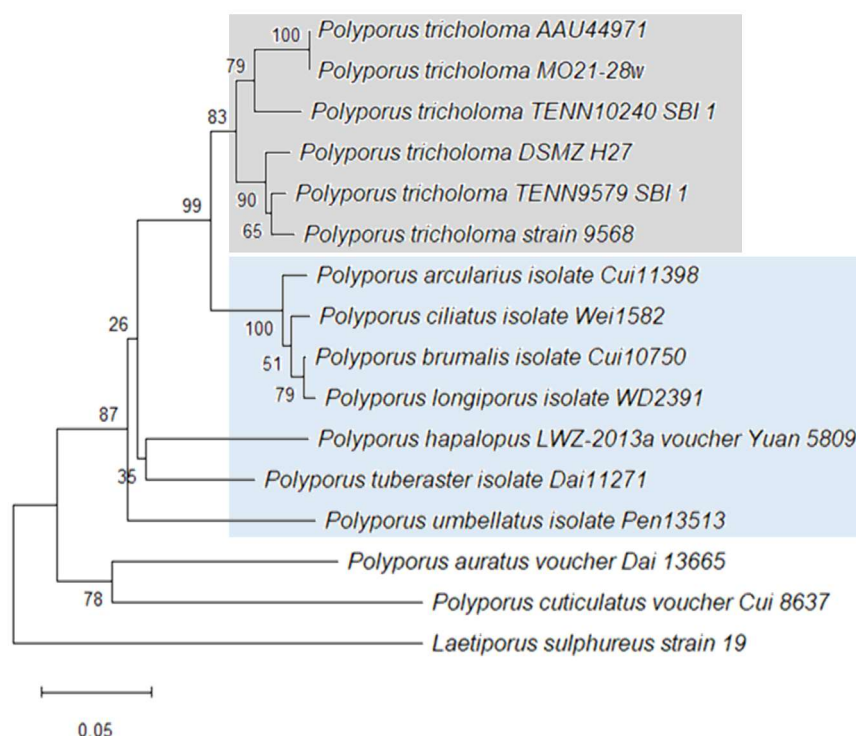
Fonte: Autoria própria (2025).

5.3 Identificação molecular do isolado MO21-28w

Com base nestes resultados o isolado MO21-28w foi submetido a identificação molecular com base na sequência ITS 1 do rDNA, sendo identificado como *Polyporus tricholoma* MO21-28w dado seu agrupamento com outras linhagens de *P. tricholoma* (área em cinza), e em ramo distinto de outras espécies da clade polyporellus (Dai *et al.*, 2014) ou da clade core polyporus (Ji *et al.*, 2022) (área em azul) (Figura 6). Além disso, com base na identificação do isolado *P. tricholoma* MO21-28w, é possível observar que sua atividade de lacase determinada neste estudo supera o valor máximo reportado por Grassi *et al.* (2018), que foi de $4,23 \text{ U mL}^{-1}$, obtido em meio sintético otimizado e incubação no escuro utilizando outra linhagem de *P. tricholoma*. Por outro lado, Grassi *et al.* (2018) detectaram atividade, ainda que pequena, de manganês peroxidase de $0,09 \text{ U mL}^{-1}$, mas sem atividade

relevante para lignina peroxidase. Esses dados indicam que a principal enzima ligninolítica produzida, nas condições testadas, é a lacase, embora haja potencial de *P. tricholoma* também para a expressão de MnP e LiP.

Figura 6 - Árvore filogenética baseada nas sequências ITS 1 (internal transcribed spacer 1) de linhagens representativas do gênero *Polyporus*. As análises foram realizadas utilizando o programa MEGA12 (versão 12.1.2), aplicando o modelo Kimura 2-parâmetros (K2+G) e o método de Neighbor-Joining (NJ) com análise de bootstrap de 1000 repetições.

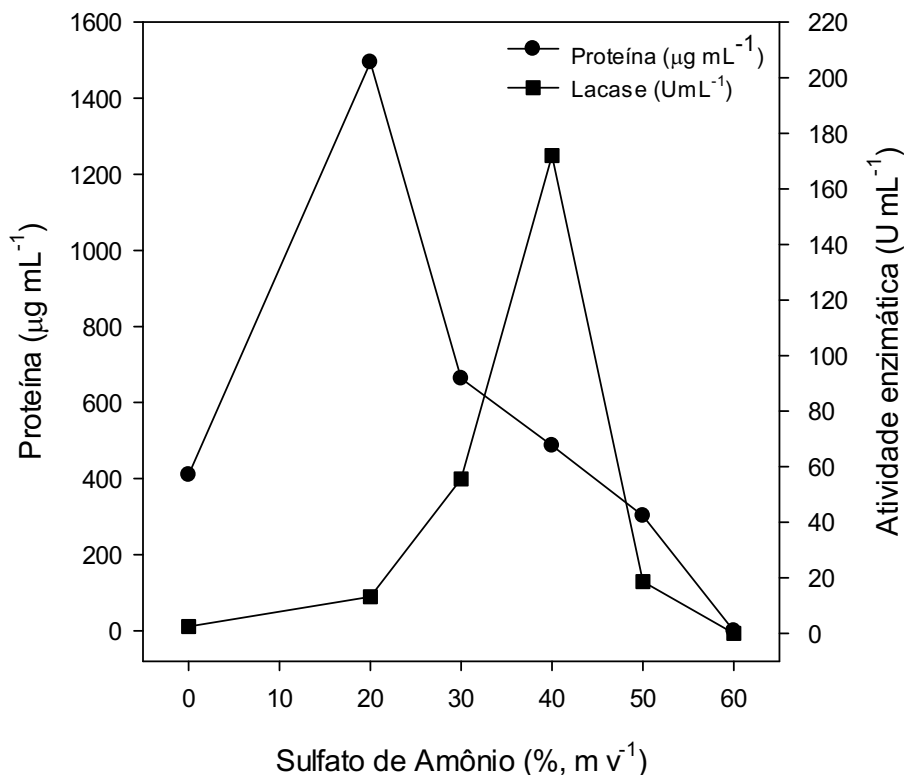


Fonte: Autoria própria (2026).

5.4 Purificação parcial da enzima de maior atividade

A purificação parcial com sulfato de amônio do extrato bruto enzimático de *P. tricholoma* MO21-28w resultou em remoção de outras proteínas sem interesse para o presente trabalho presentes no EBE, principalmente na concentração de 20 % (m/v), enquanto na concentração de 40 % (m/v) de sulfato de amônio foi obtida a fração de maior atividade para a enzima de interesse, a lacase (Figura 7). Além disso, a comparação da atividade enzimática do extrato enzimático parcialmente purificado (EPP) com o EBE, demonstrou uma concentração de 4,6 vezes na atividade enzimática específica, potencializando a atividade enzimática do extrato a ser empregado na hidrólise da serragem de pinus (Tabela 2).

Figura 7 – Concentração de proteína e atividade enzimática na purificação parcial do extrato enzimático de *P. tricholoma* MO21-28w com diferentes concentrações de sulfato de amônio.



Fonte: Autoria própria (2025).

Tabela 2 – Comparação dos valores entre os extratos enzimáticos bruto e parcialmente purificado de *P. tricholoma* MO21-28w.

Extrato enzimático	Bruto	Parcialmente purificado
Atividade enzimática (U mL ⁻¹)	5,16	32,30
Concentração de proteína (mg mL ⁻¹)	1,037	1,398
Atividade enzimática específica (U mg ⁻¹)	4,98	23,10

Fonte: Autoria própria (2025).

5.5 Caracterização da serragem de Pinus

A caracterização da serragem de Pinus utilizada neste apresentou valor de umidade de 6,15 %, indicando que o material apresenta baixa retenção de água (Tabela 3), sendo inferior ao registrado por Xie *et al.* (2024), que foi de 7,80 %. Essa diferença pode indicar particularidades no processamento ou na origem da biomassa, e reforça a adequação da

serragem de Pinus como substrato para processos biotecnológicos, já que a baixa umidade favorece o controle microbiológico e a eficiência das etapas subsequentes de fermentação e hidrólise (Schmidell, 2001). O teor de celulose, de 32,35 %, está na faixa inferior quando comparado com os dados da literatura, que variam de 39,90 % (Kruveniski *et al.*, 2019) a 54,75 % (Sarria-Villa *et al.*, 2019). Essa diferença merece atenção, pois a celulose é o componente mais abundante da parede celular e sua variação pode indicar diferenças na espécie exata de Pinus, idade da madeira, parte da árvore utilizada, ou o método de análise empregado.

Tabela 3 - Caracterização da serragem de Pinus.

COMPONENTE	TEOR (%)
Umidade	6,15
Celulose	32,35
Hemicelulose	18,34
Lignina	32,17
Fonte: Autoria própria (2025).	

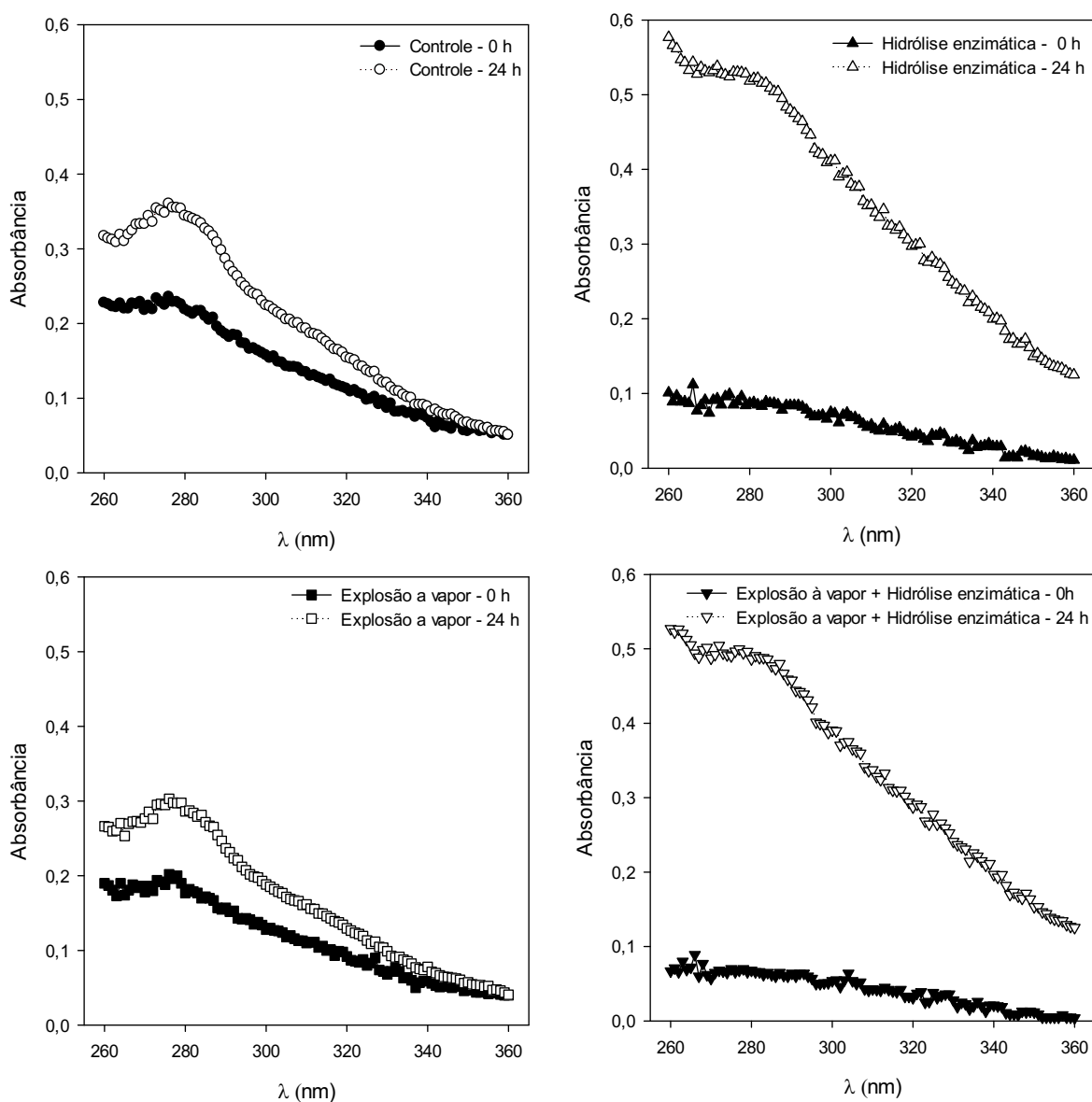
Quanto ao teor de hemicelulose, de 18,34 %, o valor encontrado neste estudo está dentro da faixa relatada por outros autores, variando de 7,80 % (Sarria-Villa *et al.*, 2019) a 25,60 % (Mandieta *et al.*, 2021). É um valor intermediário, próximo ao de Kruveniski *et al.* (2019) (20,50 %) e abaixo do de Xie *et al.* (2024) (22,20 %) e Mandieta *et al.* (2021) (25,60 %). Por fim, o teor de lignina, de 32,17 % (Tabela 2), apresenta a maior concordância com a literatura, que variam de 27,89 % (Sarria-Villa *et al.*, 2019) a 31,40 % (Kruveniski *et al.*, 2019), apresentando maior proximidade com o valor obtido por Kruveniski *et al.* (31,40 %). Importante ressaltar que os valores não somam 100 % pois existe uma fração menor da madeira formada basicamente por compostos fenólicos e resinas, comumente chamados de extrativos, podendo alcançar até 10 % da composição (Campos, 2023).

5.6 Pré-tratamento da serragem de Pinus

A análise da lignina solúvel após os ensaios de explosão a vapor e/ou de hidrólise enzimática observa-se que todos os tratamentos apresentam uma curva parecida com pico na região de 280 nm, região de absorção da lignina (Cruz; Dangelo; Oliveira, 2019) (Figura 8). Nas amostras Controle (serragem em tampão) e Explosão (serragem submetida a explosão a vapor em tampão) houve um pequeno aumento na absorção de 0 para 24 horas, indicando uma

possível lixiviação e solubilização da lignina e seus derivados em solução (Figura 8). Por outro lado, nas amostras Hidrólise (serragem submetida a hidrólise enzimática) e Explosão + Hidrólise (serragem submetida a explosão a vapor e à hidrólise enzimática) observa-se um aumento considerável na absorção (Figura 8), evidenciando a ação da lacase de *P. tricholoma* MO21-28w na remoção e solubilização de fragmentos de lignina e outros compostos aromáticos que estavam presos na matriz lignocelulósica (Kiaei *et al.*, 2025).

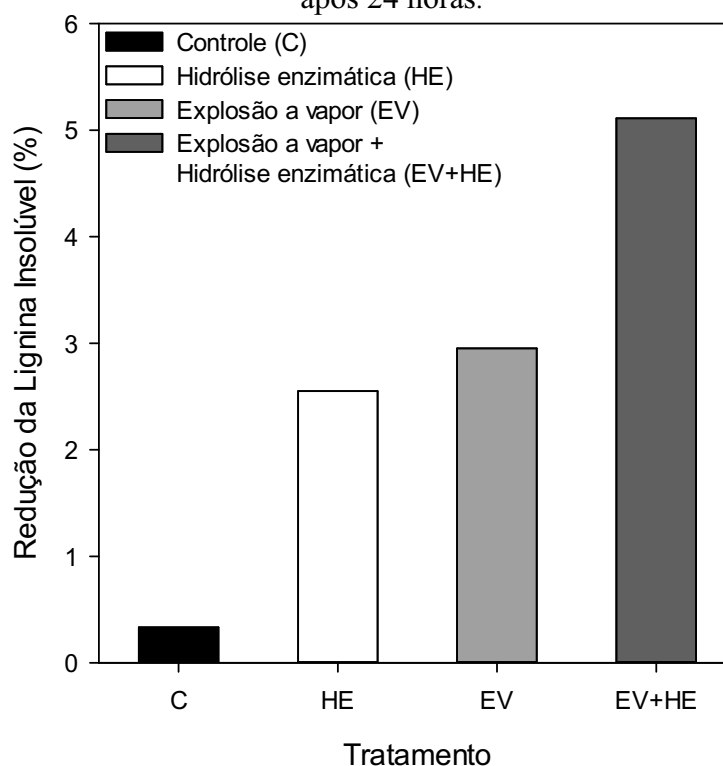
Figura 8 – Análise de lignina solúvel dos tratamentos controle (●), hidrólise enzimática (▲), explosão a vapor (■) e explosão a vapor + hidrólise enzimática (▼), por espectrofotometria com varredura entre os comprimentos de onda de 260 a 360 nm, nos tempos inicial (zero, símbolos fechados) e após 24 horas (símbolos abertos).



Fonte: Autoria própria (2025).

Também foi analisada a remoção de lignina insolúvel da biomassa após 24 horas de reação, um indicador direto da eficácia dos tratamentos na despolimerização e solubilização da lignina remanescente na serragem. É possível observar que o tratamento controle apresentou uma remoção mínima (0,33 %), confirmando que a lixiviação natural em água, sem tratamento químico ou enzimático, tem impacto mínimo na remoção da lignina insolúvel (Figura 9). Em relação ao tratamento de explosão, seu efeito resultou em uma diminuição de 2,95 % da lignina insolúvel (Figura 9), isto pode ser atribuído principalmente à fragmentação e à solubilização de partes da lignina pelo choque térmico e mecânico, principal efeito da explosão a vapor além da abertura das fibras do material (Sarria-Villa *et al.*, 2019). A aplicação da enzima lacase resultou em 2,55 % de diminuição da lignina (Figura 9), ligeiramente inferior ao valor obtido apenas com o pré-tratamento, porém demonstra a capacidade da enzima de penetrar na matriz lignocelulósica não-tratada e atuar sobre a lignina acessível, confirmando sua atividade deslignificante.

Figura 9 – Remoção de lignina insolúvel em ácido nos tratamentos controle (C), hidrólise enzimática (HE), explosão a vapor (EV) e explosão a vapor + hidrólise enzimática (EV+HE) após 24 horas.



Fonte: Autoria própria (2025).

No trabalho de Ryu *et al.* (2013), utilizando *Polyporus brumalis* geneticamente modificado para superexpressão de lacase, foram obtidos valores de remoção de lignina de 10%

em 15 dias e 14% em 45 dias para *Pinus densiflora*, enquanto a linhagem selvagem atingiu 7% e 10% nos mesmos períodos. Embora os percentuais do presente estudo sejam menores, o tempo de reação é muito mais curto, demonstrando que métodos rápidos e combinados podem ser alternativas eficientes para o pré-tratamento de biomassa lenhosa, especialmente em processos industriais que demandam agilidade. Por fim, a combinação dos tratamentos de explosão e hidrólise apresentou o melhor resultado, alcançando uma diminuição de 5,11 % da lignina insolúvel (Figura 9), indicando que pré-tratamento combinado atuou desorganizando a matriz da biomassa, rompendo as ligações e aumentando a área superficial, o que permitiu que a enzima tivesse maior acessibilidade aos sítios reativos da lignina remanescente, otimizando a sua despolimerização e solubilização, resultando na maior remoção total.

É importante ressaltar que pode haver a reação de condensação da lignina, na qual os componentes hidrolizados da lignina podem sofrer condensação entre si ou com outros componentes químicos. Isso pode levar à formação de compostos de elevado peso molecular e reverter a hidrólise e solubilização da lignina. Em alguns casos os produtos da condensação podem apresentar peso molecular superior ao da lignina original (Wastowski, 2018). Por isso em todos os métodos de extração de lignina os extrativos devem ser previamente removidos para se evitar a formação da condensação de produtos com a lignina durante os procedimentos de isolamento, porém no presente trabalho, visando a utilização industrial, a serragem não foi submetida ao processo de remoção de extrativos em nenhum dos tratamentos.

Além disso, os tratamentos aplicados a serragem não resultaram em liberação considerável de açúcares redutores em solução, indicando que a atividade de deslignificação da biomassa não afetou os polímeros de celulose e hemicelulose (Tabela 4). Desta forma, reforça-se a importância da etapa de sacarificação com coquetéis enzimáticos para liberação de açúcares fermentescíveis no meio.

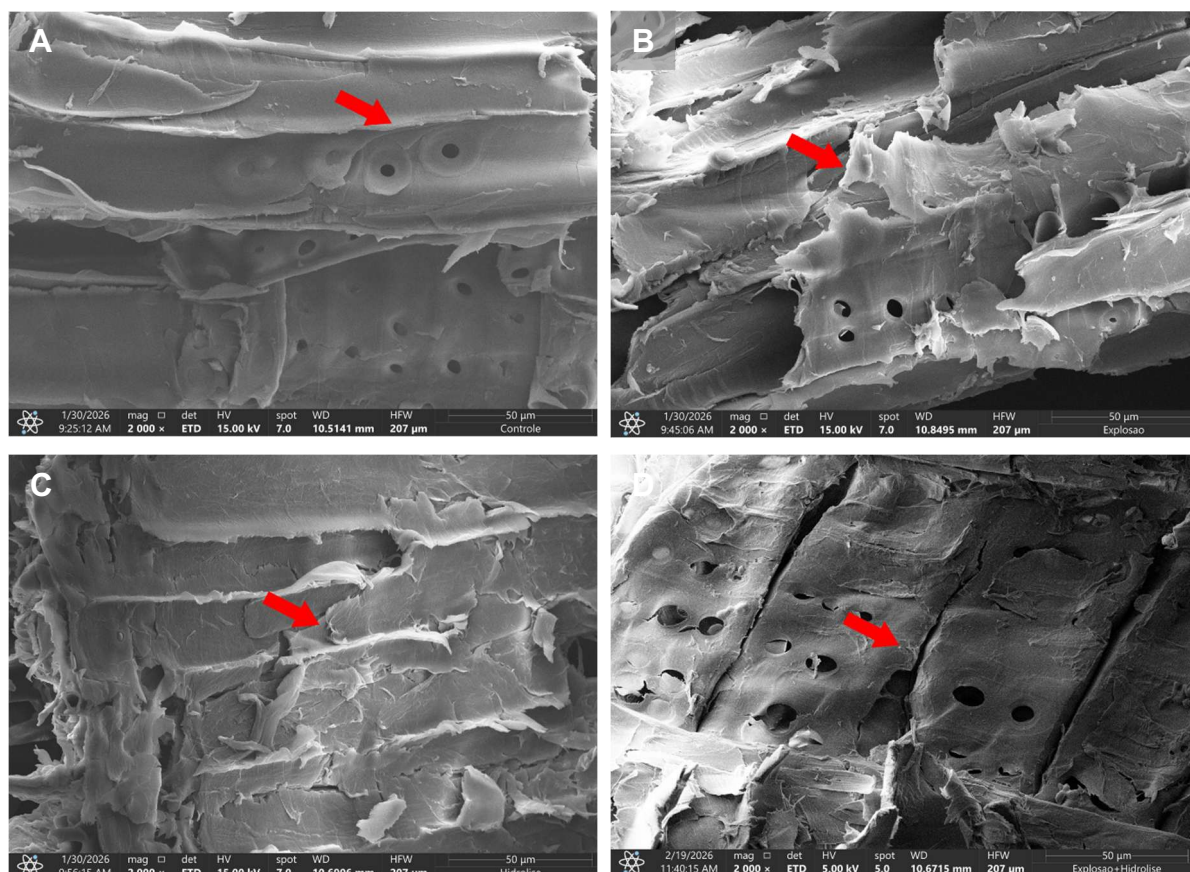
Tabela 4 – Liberação de açúcares redutores e rendimento de açúcar em relação a biomassa nos tratamentos controle, hidrólise enzimática (HE), explosão a vapor (EV) e explosão a vapor + hidrólise enzimática (EV+HE).

Tratamento	Concentração de açúcares	Rendimento (Y_{PS})
	redutores (g L ⁻¹)	(mg g ⁻¹)
Controle	0,096	1,897
HE	0,246	4,869
EV	0,110	2,184
EV+HE	0,249	4,961

Fonte: Autoria própria (2025).

As imagens obtidas pela técnica de MEV reforçam o caráter deslignificante da enzima. A análise da serragem de *Pinus in natura* (Controle) revela uma estrutura celular altamente organizada, íntegra e compacta, com a lamela média (camada rica em lignina que une as células) preservada (Figura 10A). É possível observar a superfície lisa e rígida das fibras e a presença nítida dos traqueídeos, que se mantêm desobstruídas. Essa conformação demonstra a elevada recalcitrância natural da biomassa, onde a matriz de lignina e hemiceluloses recobre as microfibrilas de celulose, atuando como uma barreira física que limita o acesso de agentes hidrolíticos ao interior da estrutura vegetal (Schmidell, 2001). Com a aplicação da explosão a vapor (Figura 10B), da hidrólise enzimática (Figura 10C) nota-se uma desorganização da estrutura lisa da fibra, com separação física entre as fibras da serragem. E por fim, na amostra submetida aos tratamentos combinados (Figura 10D), é possível notar a ausência da lamela média no ponto localizado analisado, corroborando com os resultados obtidos de remoção de lignina insolúvel.

Figura 10 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de serragem de *Pinus* com tratamentos controle (A), hidrólise enzimática (B), explosão a vapor (C) e explosão a vapor + hidrólise enzimática (D).



Fonte: Autoria própria (2025).

6 CONCLUSÃO

O presente estudo evidenciou que a aplicação de enzimas ligninolíticas produzidas por basidiomicetos, especialmente a lacase do isolado MO21-28w, associada ao pré-tratamento físico por explosão a vapor, representa uma abordagem eficiente para a redução da recalcitrância da serragem de Pinus. A estratégia combinada demonstrou potencial para aumentar a remoção de lignina, facilitando o acesso aos carboidratos estruturais da biomassa nas etapas posteriores da cadeia produtiva.

Dentro os dez fungos basidiomicetos isolados, o MO21-28w se destacou pela elevada atividade enzimática de lacase. A produção das enzimas por fermentação em estado sólido foi eficiente, resultando em extratos enzimáticos com boa atividade de lacase, enquanto as atividades de manganês peroxidase e lignina peroxidase não foram identificadas. A caracterização da serragem de Pinus revelou composição adequada para processos biotecnológicos, com teores de umidade, celulose, hemicelulose e lignina compatíveis com a literatura.

A identificação genética do isolado MO21-28w confirmou sua classificação como *Polyporus tricholoma*, reforçando o potencial biotecnológico desse fungo para aplicações em biomassa lenhosa. O processo de purificação parcial do extrato enzimático resultou em aumento expressivo da atividade específica da lacase, demonstrando a eficiência do protocolo adotado. Quanto à avaliação dos pré-tratamentos, tanto o físico (explosão a vapor) quanto o enzimático (lacase) mostraram-se eficazes individualmente na remoção de lignina insolúvel, mas a combinação dos dois proporcionou o melhor resultado, evidenciando um efeito sinérgico na redução da recalcitrância da biomassa.

Em síntese, os resultados obtidos confirmam que o uso da lacase produzida por *Polyporus tricholoma*, em conjunto com o pré-tratamento físico, é uma alternativa sustentável e eficiente para a deslignificação da serragem de Pinus. Essa abordagem contribui para a valorização de resíduos agroindustriais e para o desenvolvimento de processos mais limpos e viáveis na produção de biocombustíveis, alinhando-se às demandas atuais por sustentabilidade e inovação tecnológica.

6.1 Sugestões para trabalhos futuros

Diante dos resultados obtidos, sugere-se que trabalhos futuros explorem novas abordagens para aprimorar o pré-tratamento da serragem de Pinus, destacando a realização da

etapa de sacarificação utilizando enzima celulase, visando avaliar o potencial de liberação de açúcares fermentescíveis após a deslignificação. Além disso, seria interessante testar o processo de explosão a vapor em ciclos sucessivos, bem como investigar diferentes condições de pH, temperatura e concentrações da enzima lacase, buscando otimizar sua atividade e eficiência. A eletroforese do extrato enzimático parcialmente purificado poderá contribuir para a identificação e caracterização das proteínas presentes, ampliando o entendimento sobre o perfil enzimático obtido. Por fim, recomenda-se a análise da atividade de outras enzimas relevantes no extrato bruto enzimático, como celulase e xilanase, para avaliar o potencial sinérgico no pré-tratamento e na conversão da biomassa, ampliando as perspectivas para a produção de bioetanol de segunda geração.

7 REFERÊNCIAS

- ABIMCI, Associação Brasileira da Indústria de Madeira Processada Mecanicamente. **Estudo Setorial 2022. Ano base 2021**. 2022. Disponível em: <<https://abimci.com.br/wp-content/uploads/2022/09/Estudo-Setorial-2022.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2025.
- ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 16550: Bagaço de cana-de-açúcar – caracterização química**. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.
- ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Etanol**. Ministério de Minas e Energia, 13 jun 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/etanol/apresentacao>>. Acesso em: 18 set 2024.
- ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (2025). **Painel Dinâmico de Produtores de Etanol**. Ministério de Minas e Energia, 2025. Disponível em: <<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiMmRhZWU2NDU2ZWE2Yi00NzI5LWJjMGQtNjIwNjE0MjM0MjEzIiwidCI6IjQ0OTlmNGZmLTl0YTYtNGI0Mi1iN2VmLTEyNGFmY2FkYzIxMyJ9>>. Acesso em: 18 set 2024.
- BARBOSA, K. L.; SILVA, J. DOS S.; DOS SANTOS, T. V.; DOS SANTOS-ROCHA, M. S. R.; MALTA, V. R. DOS S.; ALMEIDA, R. M. R. G. Pré-tratamento de Explosão a Vapor, Caracterização Química e Morfológica do Bagaço da Cana-de-Açúcar Usado para Produção de Etanol 2G. **Rev. Virtual Quim.**, v. 12, n. 1, p. 63-74, 2020. DOI: 10.21577/1984-6835.20200007
- CAMPOS, Allini Klos Rodrigues de. **Fundamentos da química da madeira**. Curitiba, PR: Intersaberes, 2023. E-book. Disponível em: <https://plataforma.bvirtual.com.br>.
- CERQUEIRA, Pedro Henrique Alcântara de; VIEIRA, Giovanni Correia; BARBERENA, Iara Magalhães; MELO, Lara Clímaco; FREITAS, Luís Carlos de. Análise dos Resíduos Madeireiros Gerados Pelas Serrarias do Município de Eunápolis-BA. **Floresta e Ambiente**, v. 19, n. 4, p. 506-510, out./dez. 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/floram.2012.051>
- Cordeiro, Márcio De Andrade; Almeida, Ossalin De; Rodrigues, Elizabeth Maria Soares; Chaves Neto, Antônio Maia De Jesus; Machado, Nélío Teixeira. PRODUÇÃO DE ETANOL ATRAVÉS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO CAROÇO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart). **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.8, n.1, p. 122- 152, 2019.
- CRUZ, Vitor M. V.; DANGELO, José Vicente H.; OLIVEIRA, Vinicius B. L. G. de. Determinação do teor de lignina total em amostras do processo de extração da lignina do licor negro. **52º ABTCP Congresso Internacional de Celulose e Papel**, ABTCP, 2019.
- DAI, Y. C.; XUE, H. J.; VLASÁK, J.; RAJCHENBERG, M.; WANG, B.; ZHOU, L-W. Phylogeny and global diversity of *Polyporus* group Melanopus (Polyporales, Basidiomycota). **Fungal Diversity**, v. 64, p. 133–144, 2014.
- EPE, Empresa de Pesquisa Energética. **Fact Sheet: Etanol lignocelulósico ou de segunda geração – E2G**. 2021. Disponível em: <https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-628/FS-EPE-DPG-SDB-2021-01->

[E2G_PT.pdf](#)

EPE, Empresa de Pesquisa Energética. Cenários de oferta de etanol e demanda de ciclo Otto 2024-2033. **Nota técnica EPE/DPG/SDB/2023/03**, dezembro 2023. Disponível em:

<https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-255/topico-691/NT-EPE-DPG-SDB-2023-03_Cenarios_de_oferta_de_etanol_2033.pdf>. Acesso em: 18 set. 2024.

GRASSI, Emanuel; ROBLEDI, Gerardo; LEVIN, Laura. Influence of light on lignin-degrading activities of fungal genus *Polyporus* s. str. **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jobm.201800183>.

ILLURI, R.; KUMAR, M.; EYINI, M.; VEERAMANIKANDAN, V.; ALMAARY, K. S.; ELBADAWI, Y. B.; BIRAQDAR, M. A.; BALAJI, P. Production, partial purification and characterization of ligninolytic enzymes from selected basidiomycetes mushroom fungi. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, 2021, p. 7207–7218. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.026>

Ji, X.; Zhou, J-L.; Song, C-G.; Xu, T-M.; Wu, D-M.; Cui, B-K. Taxonomy, phylogeny and divergence times of *Polyporus* (Basidiomycota) and related genera. **Mycosphere**. v. 13, p. 1–52, 2022.

KIAEI, Fatemeh; SHAHVERDI, Ahmad Reza; DELNAVAZI, Mohammad-Reza; FARAMARZI, Mohammad Ali; MOJTABA VI, Somayeh. Enhanced laccase production by *Paramyrtetecium roridum* under solid-state fermentation: Application in neutral-pH delignification and valorization of acorn shells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 321, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.146535>.

KRUYENISKI, Julia; FERREIRA, Paulo J.T.; CARVALHO, Maria da Graça Videira Sousa; VALLEJOS, Maria E.; FELISSIA, Fernando E.; AREA María C. Physical and chemical characteristics of pretreated slash pine sawdust influence its enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops & Products**, v. 130, 2019, p. 528–536, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.075>.

Li, C.; Zhu, L.; Dong, Q.; Su, Y.; Luo, C. Characterization of Pyrolysis Bio-Oil and Biochar from *Polyporus brumalis*-Pretreated Pine Wood Chip. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 13, p. 8034–8046, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5c02085>.

LIMA, Urgel de Almeida. Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos. 2 ed., vol. 3. São Paulo: Blucher, 2019.

LIU, Shenglong; LIU, Huan; SHEN, Chen; FANG, Wei; XIAO, Yazhong; FANG, Zemin. Comparison of performances of different fungal laccases in delignification and detoxification of alkali-pretreated corncob for bioethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 48, 2021. DOI: 10.1093/jimb/kuab013.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v. 193, n. 1, p. 265-75, nov. 1951. PMID: 14907713.

MADIGAN; MARTINKO; PARKER, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo, SP: Pearson, 2004. E-book. Disponível em: <https://plataforma.bvirtual.com.br>.

MANDIETA, C. M.; FELISSIA, F. E.; ARISMENDY, A. M.; KRUYENISKI; AREA, M. C. Estratégias de hidrólise enzimática e fermentação para o biorrefino de serragem de Pinus. **BioResources**, v. 14, n. 4, p. 7474-7491, 2021.

Martínez, Jazel; Sosa-Balagurusamy, Nagamani; Benavente-Valdes, Juan Roberto; Montanez, Julio; Morales-Oyervides, Lourdes. Process performance improvement for the simultaneous production of ligninolytic enzymes in solid culture using agricultural wastes through the Taguchi method. **Journal of Environmental Management**, v. 293, 2021, DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112966>>.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determinations of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORAES, Diego Bárbara De; SANTOS, Adriele Cristina; COLLICCHIO, Erich; NAOE, Lucas Koshy; DOMINICES, Kallyana Moraes Carvalho. Produção de etanol a partir do farelo de arroz por hidrólise enzimática. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 36, n. 2, p. 273-284, abril-junho, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.17224/EnergAgric.2021v36n2p273-284>

NATALLI, Luiz Henrique; AGUIAR, Jéssica Thalheimer De; MUNARETTO, Lorimar Francisco; HILLIG, Everton. Effect of equipment age on residues generation in sawmill in the municipality of Irati-PR. **Mix Sustentável**, Florianópolis, v.10, n.5, p.63-74, out. 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.29183/2447-3073.MIX2024.v10.n5.63-74>

NAZAR, Mudasar; XU, Qi; Zahoor; ULLAH, Muhammad Wajid; KHAN, Nazir Ahmad; IQBAL, Babar; ZHU, Daochen. Integrated laccase delignification with improved lignocellulose recalcitrance for enhancing enzymatic saccharification of ensiled rice straw. **Industrial Crops & Products**, v. 202, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116987>.

Nuchdang, S.; Vatanyoopaisarn, S.; Phalakornkule, C. Effectiveness of fungal treatment by *Coprinopsis cinerea* and *Polyporus tricholoma* on degradation and methane yields of lignocellulosic grass. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 104, p. 38–45, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.05.015>.

Oliveira, Johnatt Allan Rocha De; Oliveira, Lucas Dos Santos; Cassiano, Kyara Silva. Hidrólise enzimática da casca da pupunha para produção de etanol de segunda geração. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 6, n. 4, p.19317-19327, apr. 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n4-194.

PEREIRA, Andréa Franco. **Madeiras brasileiras: guia de combinação e substituição**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2020. E-book. Disponível em: <https://plataforma.bvirtual.com.br>.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMONS, L. M.; McDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The Genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**. v. 5, p. 141-238, 1953.

RIAZ, Sana; JOHN, Ashwini J.; SAMUEL, Melvin S.; ETHIRAJ, Selvarajan. Recent developments and emerging methodologies in the pre-treatment of lignocellulosic biomass. **Sustainable Chemistry for the Environment**, v. 11, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scenv.2025.100285>.

RODRIGUES, Patrícia de Oliveira; GURGEL, Leandro Vinícius Alves; PASQUINI, Daniel; BADOTTI, Fernanda; GOES-NETO, Aristoteles; BAFF, Milla Alves. Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes. **Renewable Energy**, v. 145, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.041>.

Rosa, Júlia Maria Andrade; Pinheiro, Iara Rebouças. Planejamento Experimental DCCR aplicando a Hidrólise Enzimática do bagaço de Laranja empregando as enzimas Celulases e Pectinases. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.1, p.3191-3208 jan. 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n1-216.

Rugolo, Maximiliano; Bravo-Arrepol, Gastón; Cajas-Madriaga, Daniel; Rajchenberg, Mario; Becerra, José. Biotransformation of *Araucaria araucana* lignans: solid-state fermentation with a naturally occurring *Pleurotus ostreatus* strain. **Rodriguésia**, v. 73: e01332020. 2022. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860202273033>>.

Ryu, S.-H.; Cho, M.-K.; Kim, M.; Jung, S.-M.; Seo, J.-H. Enhanced lignin biodegradation by a laccase-overexpressed white-rot fungus *Polyporus brumalis* in the pretreatment of wood chips. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 3839–3852, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0412-y>.

Santos, Felipe Augusto; Santos, Sharline Florentino De Melo; Cardoso-Simões, Amanda Letícia De Carvalho; Carvalho-Gonçalves, Laís Campos Teixeira De; Oliveira, Carolina Zanini. Influência do tempo de contato, temperatura e concentração de solvente no pré-tratamento alcalino da palha de cana-de-açúcar. **Divulgação Científica E Tecnológica do IFPB**, v. 59, n. 1, João Pessoa, 2022. DOI: <<http://dx.doi.org/10.18265/1517-0306a2021id4612>>.

SANTOS, Mario Roberto dos; BRITO, José Luiz Romero de; SHIBAO, Fabio Ytoshi; MELERO, José Carlos Martinez. Objetivos de desenvolvimento sustentável e a cultura da cana-de-açúcar para produção de etanol. **Caderno de Administração**, Maringá, v. 31, n. 2, jul.-dez. 2023 DOI: <<https://doi.org/10.4025/cadadm.v31i2.58362>>.

SARRIA-VILLA, R. A.; GALLO-CORREDOR, J. A.; PÁEZ, M. I.; BENITEZ-BENITEZ, R. Bioethanol production from sawdust of Colombian pine: conditions and efficiency. **Int. J. Renewable Energy Technology**, v. 10, n. 1/2, p.118–134. 2019.

SCHMIDELL, Willibaldo *et al.* (coord.). **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo, SP: Blucher, 2001. E-book. Disponível em: <https://plataforma.bvirtual.com.br>.

SILVA, Fabio Sousa Guedes; MIGOT, Beatriz Cristina; SILVA, Fabio Cesar da. A importância do bioetanol dentro do contexto brasileiro, comparação de sua síntese a partir de cana-de-açúcar e milho e bioetanol de segunda geração. 8 Jornada Científica e Tecnológica da FATEC de Botucatu. **JORNACITEC**, São Paulo, 2019.

SILVA, A. B. L.; QUEIROZ, E. S. Impactos econômicos e ambientais da produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Engineering Sciences**, v. 10, n. 2, p. 31-38, 2022. DOI: <http://doi.org/10.6008/CBPC2318-3055.2022.002.0004>

SLOMCZYNSKI, D.; NAKAS, J. P.; TANENBAUM, S. W. Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34. **Applied Environmental Microbiology**. v. 61, n. 3, p. 907-912, 1995.

SURYADI, Herman; JUDONO, Jessica J.; PUTRI, Merianda R.; ECLESSIA, Alma D.; ULHAQ, Jiihan M.; AGUSTINA, Dinar N.; SUMIATI, Triyani. Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi. **Heliyon**, v. 8, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08865>.

TAPPI, Technical Association of the Pulp and Paper Industry. Official Test Methods, Provisional Test Methods, and Useful Test Methods – **Fibrous Materials and Pulp Testing**, Atlanta, USA, Np, 1979.

TÁVORA, Carla Gonçalves; MORGADO, Eduardo Martins. Etanol de Segunda Geração (E2G) em relação à sociedade e à mídia. **Peer Review**, v. 5, n. 21, 2023. DOI: 10.53660/1111.prw2650, ISSN: 1541-1389

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **PNAS**. v. 81, n. 8, p. 2280–2284, 1984.

UMAR, Aisha; AHMED, Shakil. Optimization, purification and characterization of laccase from *Ganoderma leucocontextum* along with its phylogenetic relationship. **Scientific Reports**, v. 12, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06111-z>

UNICADData, União da Indústria de Cana-de-Açúcar e Bioenergia. **FOTOGRAFIA DO SETOR SUCROENERGÉTICO NO BRASIL E OS BENEFÍCIOS ECONÔMICOS, AMBIENTAIS E SOCIAIS GERADOS**. Observatório da Cana e Bioenergia, 2025. Disponível em: < <https://unicadata.com.br/listagem.php?idMn=158> >. Acesso em: 20 set. 2025.

VAN SOEST, P. J. Symposium on factors influencing the voluntary intake of herbage by ruminants: Voluntary intake in relation to chemical composition and digestibility. **Journal of Animal Science**, v. 24, n. 3, p. 834–843, aug. 1965. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas1965.243834x>

WANG, Yuan; WANG, Chenxu; MA, Zi; QIN, Lejing; XU, Lei; LI, Peiwen Zhao Kai. Enzymatic degradation of lignin for valorization: A sustainable bridge towards advanced lignin-based biorefineries. **Biomass and Bioenergy**, v. 202, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2025.108231>.

WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Kinetic mechanism and role of chelators. **Journal of Biological Chemistry**. v. 267, n. 33, p. 23688-23695, 1992.

WASTOWSKI, A. D. **Química da madeira**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2018. E-

book. Disponível em: <https://plataforma.bvirtual.com.br>.

XIE, XINYU; SONG, KAI; WANG, JING; HU, JINGUANG; WU, SHUFANG; CHU, QIULU. Efficient ethanol production from masson pine sawdust by various organosolv pretreatment and modified pre-hydrolysis simultaneous saccharification and fermentation. **Renewable Energy**, v. 225, 2024, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2024.120289>

ZHANG, Sitong; XIAO, Jianlong; WANG, Gang; CHEN, Guang. Enzymatic hydrolysis of lignin by ligninolytic enzymes and analysis of the hydrolyzed lignin products. **Bioresource Technology**, v. 304, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122975>