

**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PRODUTOS E
PROCESSOS**

NATÁLIA CRISTINA MORAIS FERNANDES

**CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS OBTIDOS A PARTIR DA
DEGRADAÇÃO DA LIGNINA UTILIZANDO O FUNGO *TRAMETES VILLOSA***

BELO HORIZONTE

2023

NATÁLIA CRISTINA MORAIS FERNANDES

**CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS OBTIDOS A PARTIR DA
DEGRADAÇÃO DA LIGNINA UTILIZANDO O FUNGO *TRAMETES VILLOSA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Produtos e Processos, do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Produtos e Processos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Fernanda Badotti

Coorientadora: Prof^a Dr^a Adriana Akemi Okuma

BELO HORIZONTE

2023

Fernandes, Natália Cristina Morais.
F363c Caracterização de produtos químicos obtidos a partir da
degradação da lignina utilizando o fungo *trametes villosa* / Natália
Cristina Morais Fernandes. – 2022.
102 f. : il.
Orientadora: Fernanda Badotti.
Coorientadora: Adriana Akemi Okuma.
Dissertação (mestrado) – Centro Federal de Educação
Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Produtos e Processos, Belo Horizonte, 2022.
Bibliografia.

1. Lignina. 2. Trametes. 3. Produtos químicos. 4. Cromatografia
líquida de alta eficiência. I. Badotti, Fernanda. II. Okuma, Adriana
Akemi. III. Título.

CDD: 676.5

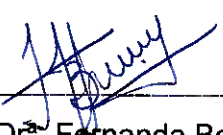
NATÁLIA CRISTINA MORAIS FERNANDES

**CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS OBTIDOS A PARTIR DA
DEGRADAÇÃO DA LIGNINA UTILIZANDO O FUNGO *TRAMETES VILLOSA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Produtos e Processos, do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Produtos e Processos.

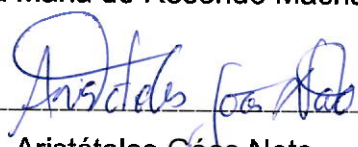
Belo Horizonte, 27 de setembro de 2022.

Aprovada pela Banca Examinadora:


Prof.ª. Dr.ª. Fernanda Badotti (Orientadora)


Prof.ª. Dr.ª. Adriana Akemi Okuma (Cooorientadora)


Prof.ª. Dr.ª. Ana Maria de Resende Machado


Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto

ATA DE Nº 07 DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos vinte e sete dias do mês de setembro do ano de dois mil e vinte dois, às catorze horas, no auditório do Campus Gameleira (Campus VI), instalou-se a banca examinadora de defesa pública de dissertação de mestrado da candidata **Natália Cristina Morais Fernandes**, discente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Produtos e Processos no CEFET-MG. A banca examinadora foi composta pelos professores: Dr^a Ana Maria de Resende Machado, examinadora interna, Dr Aristóteles Góes Neto, examinador externo, Dr^a Adriana Akemi Okuma, coorientadora e Dr^a Fernanda Badotti, orientadora e presidente da banca examinadora. Deu-se início a abertura dos trabalhos, por parte da professora Fernanda Badotti, que, após apresentar os membros da banca examinadora e esclarecer a tramitação da defesa, de imediato solicitou à candidata que iniciasse a apresentação da dissertação intitulada **"Caracterização de produtos químicos obtidos a partir da degradação da lignina utilizando o fungo *Trametes villosa*"**, marcando um tempo de quarenta minutos para a apresentação. Concluída a exposição, a presidente passou a palavra à examinadora Ana Maria de Resende, para arguir a candidata, e, em seguida, para o examinador Aristóteles Góes Neto, fazer o mesmo. Posteriormente, a Prof.^a Adriana Akemi Okuma e a Prof.^a Fernanda Badotti fizeram suas considerações sobre o trabalho em julgamento. Por fim, a Banca Examinadora reuniu-se, sem a presença da candidata, para julgamento e expedição do resultado. A discente foi considerada **APROVADA**. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata assinada por todos os membros participantes da Banca Examinadora.

Belo Horizonte, 27 de setembro de 2022


Fernanda Badotti (presidente)
Adriana Akemi Okuma
Ana Maria de Resende Machado
Aristóteles Góes Neto

RESUMO

A valorização biológica da Lignina como matéria-prima para a produção de combustível e produtos químicos de valor agregado possui caráter sustentável, por se tratar de um insumo renovável. A Lignina é um polímero altamente recalcitrante encontrado em todos os tipos de plantas, a qual faz parte do complexo conhecido como lignocelulose. O complexo lignocelulose é uma matriz fibrosa, formada por celulose, hemicelulose e Lignina. As aplicações mais conhecidas são para a celulose e a hemicelulose, sendo que a Lignina apresenta maior desafio do ponto de vista industrial, em função da necessidade de despolimerização. Desta forma, existe grande interesse no estudo para aproveitamento da Lignina, uma vez que possui estrutura rica em grupos aromáticos. O processo de degradação do material vegetal é complexo, sendo que diferentes microrganismos, enzimas e vias metabólicas finamente reguladas e interligadas estão envolvidos. Esta dissertação possui o objetivo de caracterizar os produtos químicos formados a partir da degradação microbiológica da Lignina. Lignina alcalina sintética e bagaço de cana-de-açúcar, duas fontes de lignina, foram utilizadas como substratos quando submetidas à degradação pelo fungo *Trametes villosa* CCMB561. O sobrenadante do cultivo foi coletado entre cinco e 28 dias de incubação, preparado e analisado quanto à presença de substância químicas. Para a caracterização das substâncias formadas durante o processo de degradação microbiológica da Lignina, as amostras obtidas foram submetidas à análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) e Espectroscopia na região do Ultravioleta e visível (UV-vis). O ácido vanílico foi encontrado nas amostras de Lignina sintética após o décimo quarto dia de incubação, demonstrando que o fungo utilizou a Lignina como fonte de energia e promoveu a fragmentação da Lignina. No experimento com o bagaço de cana não foram detectados compostos fenólicos, indicando que os açúcares simples podem ter induzido o crescimento do fungo *Trametes villosa* CCMB561 em detrimento a produção de compostos fenólicos.

Palavras-chaves: Lignina. *Trametes Villosa*. Produtos químicos. HPLC

ABSTRACT

The biological valorization of Lignin as a raw material for production of fuel and value-added chemical products has a sustainable character, as it is a renewable input. Lignin is a highly recalcitrant polymer found in all types of plants, which is part of the complex known as lignocellulose. The lignocellulose complex is a fibrous matrix formed by cellulose, hemicellulose and lignin. The best-known applications are for cellulose and hemicellulose, and Lignin presents a greater challenge from an industrial point of view, due to the need for depolymerization. Thus, there is great interest in the study for the use of Lignin, since it has a structure rich in aromatic groups. The process of degradation of plant material is complex, and different microorganisms, enzymes and finely regulated and interconnected metabolic pathways are involved. This dissertation has the objective of characterizing the chemical products formed from the microbiological degradation of Lignin. Synthetic alkaline lignin and sugarcane bagasse, two sources of lignin, were used as substrates when subjected to degradation by the fungus *Trametes villosa* CCMB561. The culture supernatant was collected between five and 28 days of incubation, prepared and analyzed for the presence of chemical substances. For the characterization of the substances formed during the process of microbiological degradation of Lignin, the samples obtained were submitted to analysis by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Spectroscopy in the region of Ultraviolet and visible (UV-vis). Vanillic acid was found in synthetic lignin samples after the fourteenth day of incubation, demonstrating that the fungus used lignin as an energy source and promoted the fragmentation of lignin. In the experiment with sugarcane bagasse, no phenolic compounds were detected, indicating that simple sugars may have induced the growth of the fungus *Trametes villosa* CCMB561 to the detriment of the production of phenolic compounds.

Keywords: Lignin. *Trametes Villosa*. Chemicals products. HPLC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura da célula vegetal contendo Lignina, Celulose e Hemicelulose	14
Figura 2 – Estrutura esquemática da Lignina biopolimerizada em plantas	19
Figura 3 – Estrutura esquemática das unidades p-Hidroxifenilpropanóides, Guaiacóis e Siringóis	20
Figura 4 – Cultivo do fungo <i>Trametes villosa</i> CCMB561 após sete dias de incubação	30
Figura 5 – Controle negativo meio de cultura Extrato de Malte Ágar	31
Figura 6 – Primeiro dia de Incubação do fungo <i>Trametes Villosa</i> em meio com Lignina	32
Figura 7 – Formação de micélio fúngico após cinco dias de incubação	32
Figura 8 – Espectro de absorção na região do UV-Vis dos compostos obtidos na degradação da Lignina pelo fungo <i>Trametes villosa</i> CCMB561	33
Figura 9 – Espectro de absorção na região do UV-Vis dos compostos obtidos na degradação de cana-de-açúcar pelo fungo <i>Trametes villosa</i> CCMB561	34
Figura 10 – Produção de Ácido vanílico pelo fungo <i>Trametes villosa</i> CCMB561 no meio de cultura contendo Lignina alcalina	36
Figura 11 – Espectro na região do UV-Vis para o branco água	45
Figura 12 – Espectro na região do UV-Vis para o Guaiacol	45
Figura 13 – Espectro na região do UV-Vis para o Controle Lignina _Dia 05	46
Figura 14 – Espectro na região do UV-Vis para o T01 _Lignina _Dia 05	46
Figura 15 – Espectro na região do UV-Vis para o T02 _Lignina _Dia 05	47
Figura 16 – Espectro na região do UV-Vis para o T03 _Lignina _Dia 05	47
Figura 17 – Espectro na região do UV-Vis para o T04 _Lignina _Dia 05	48
Figura 18 – Espectro na região do UV-Vis para o T05 _Lignina _Dia 05	48
Figura 19 – Espectro na região do UV-Vis para o Controle Lignina _Dia 07	49
Figura 20 – Espectro na região do UV-Vis para o T01 _Lignina _Dia 07	49
Figura 21 – Espectro na região do UV-Vis para o T02 _Lignina _Dia 07	50
Figura 22 – Espectro na região do UV-Vis para o T03 _Lignina _Dia 07	50
Figura 23 – Espectro na região do UV-Vis para o T04 _Lignina _Dia 07	51
Figura 24 – Espectro na região do UV-Vis para o T05 _Lignina _Dia 07	51
Figura 25 – Espectro na região do UV-Vis para o Controle Lignina _Dia 10	52
Figura 26 – Espectro na região do UV-Vis para o T01 _Lignina _Dia 10	52
Figura 27 – Espectro na região do UV-Vis para o T02 _Lignina _Dia 10	53
Figura 28 – Espectro na região do UV-Vis para o T03 _Lignina _Dia 10	53
Figura 29 – Espectro na região do UV-Vis para o T04 _Lignina _Dia 10	54
Figura 30 – Espectro na região do UV-Vis para o T05 _Lignina _Dia 10	54
Figura 31 – Espectro na região do UV-Vis para o Controle_Bagaço de cana Dia 05	55
Figura 32 – Espectro na região do UV-Vis para o T01 _Bagaço de cana Dia 05	55
Figura 33 – Espectro na região do UV-Vis para o T02 _Bagaço de cana Dia 05	56
Figura 34 – Espectro na região do UV-Vis para o T03 _Bagaço de cana Dia 05	56
Figura 35 – Espectro na região do UV-Vis para o T04 _Bagaço de cana Dia 05	57
Figura 36 – Espectro na região do UV-Vis para o T05 _Bagaço de cana Dia 05	57
Figura 37 – Espectro na região do UV-Vis para o Controle_Bagaço de cana Dia 07	58
Figura 38 – Espectro na região do UV-Vis para o T01 _Bagaço de cana Dia 07	58
Figura 39 – Espectro na região do UV-Vis para o T02 _Bagaço de cana Dia 07	59
Figura 40 – Espectro na região do UV-Vis para o T03 _Bagaço de cana Dia 07	59
Figura 41 – Espectro na região do UV-Vis para o T04 _Bagaço de cana Dia 07	60
Figura 42 – Espectro na região do UV-Vis para o T05 _Bagaço de cana Dia 07	60
Figura 43 – Espectro na região do UV-Vis para o Controle_Bagaço de cana Dia 10	61
Figura 44 – Espectro na região do UV-Vis para o T01 _Bagaço de cana Dia 10	61

Figura 45 – Espectro na região do UV-Vis para o T02_Bagaço de cana Dia 10	62
Figura 46 – Espectro na região do UV-Vis para o T03_Bagaço de cana Dia 10	62
Figura 47 – Espectro na região do UV-Vis para o T04_Bagaço de cana Dia 10	63
Figura 48 – Espectro na região do UV-Vis para o T05_Bagaço de cana Dia 10	63
Figura 49 – Cromatograma (HPLC) do Ácido Vanílico	64
Figura 50 – Cromatograma (HPLC) do Ácido Siríngico	64
Figura 51 – Cromatograma (HPLC) do 3-metil-1,2-ciclopentenodiono	65
Figura 52 – Cromatograma (HPLC) do 2,6-Dimetoxifenol	65
Figura 53 – Cromatograma (HPLC) do Guaiacol	66
Figura 54 – Cromatograma (HPLC) do 1,2,3-Trimetoxibenzeno	66
Figura 55 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Lignina coletado no Dia 5	67
Figura 56 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Lignina coletado no Dia 5	67
Figura 57 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Lignina coletado no Dia 5	68
Figura 58 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Lignina coletado no Dia 5	68
Figura 59 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Lignina coletado no Dia 5	69
Figura 60 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Lignina coletado no Dia 5	69
Figura 61 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Lignina coletado no Dia 7	70
Figura 62 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Lignina coletado no Dia 7	70
Figura 63 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Lignina coletado no Dia 7	71
Figura 64 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Lignina coletado no Dia 7	71
Figura 65 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Lignina coletado no Dia 7	72
Figura 66 – Cromatograma (HPLC) da amostra cinco de Lignina coletado no Dia 7	72
Figura 67 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Lignina coletado no Dia 10	73
Figura 68 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Lignina coletado no Dia 10	73
Figura 69 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Lignina coletado no Dia 10	74
Figura 70 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Lignina coletado no Dia 10	74
Figura 71 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Lignina coletado no Dia 10	75
Figura 72 – Cromatograma (HPLC) da amostra cinco de Lignina coletado no Dia 10	75
Figura 73 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Lignina coletado no Dia 14	76
Figura 74 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Lignina coletado no Dia 14	76
Figura 75 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Lignina coletado no Dia 14	77
Figura 76 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Lignina coletado no Dia 14	77
Figura 77 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Lignina coletado no Dia 14	78
Figura 78 – Cromatograma (HPLC) da amostra cinco de Lignina coletado no Dia 14	78
Figura 79 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Lignina coletado no Dia 21	79
Figura 80 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Lignina coletado no Dia 21	79
Figura 81 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Lignina coletado no Dia 21	80
Figura 82 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Lignina coletado no Dia 21	80
Figura 83 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Lignina coletado no Dia 21	81
Figura 84 – Cromatograma (HPLC) da amostra cinco de Lignina coletado no Dia 21	81
Figura 85 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Lignina coletado no Dia 28	82
Figura 86 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Lignina coletado no Dia 28	82
Figura 87 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Lignina coletado no Dia 28	83
Figura 88 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Lignina coletado no Dia 28	83
Figura 89 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Lignina coletado no Dia 28	84
Figura 90 – Cromatograma (HPLC) da amostra cinco de Lignina coletado no Dia 28	84
Figura 91 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Bagaço de cana coletado no Dia 5	85
Figura 92 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Bagaço de cana coletado no Dia 5	85
Figura 93 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Bagaço de cana coletado no Dia 5	86
Figura 94 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Bagaço de cana coletado no Dia 5	86

Figura 95 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Bagaço de cana coletado no Dia 5	87
Figura 96 – Cromatograma (HPLC) da amostra cinco de Bagaço de cana coletado no Dia 5	87
Figura 97 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Bagaço de cana coletado no Dia 7	88
Figura 98 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Bagaço de cana coletado no Dia 7 ..	88
Figura 99 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Bagaço de cana coletado no Dia 7 ..	89
Figura 100 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Bagaço de cana coletado no Dia 7	89
Figura 101 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Bagaço de cana coletado no Dia 7	90
Figura 102 – Cromatograma (HPLC) da amostra cinco de Bagaço de cana coletado no Dia 7	90
Figura 103 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Bagaço de cana coletado no Dia 10 ..	91
Figura 104 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Bagaço de cana coletado no Dia 10	91
Figura 105 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Bagaço de cana coletado no Dia 10	92
Figura 106 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Bagaço de cana coletado no Dia 10	92
Figura 107 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Bagaço de cana coletado no Dia 10	93
Figura 108 – Cromatograma (HPLC) da amostra cinco de Bagaço de cana coletado no Dia 10	93
Figura 109 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Bagaço de cana coletado no Dia 14 ..	94
Figura 110 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Bagaço de cana coletado no Dia 14	94
Figura 111 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Bagaço de cana coletado no Dia 14	95
Figura 112 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Bagaço de cana coletado no Dia 14	95
Figura 113 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Bagaço de cana coletado no Dia 14	96
Figura 114 – Cromatograma (HPLC) da amostra cinco de Bagaço de cana coletado no Dia 14	96
Figura 115 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Bagaço de cana coletado no Dia 21 ..	97
Figura 116 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Bagaço de cana coletado no Dia 21	97
Figura 117 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Bagaço de cana coletado no Dia 21	98
Figura 118 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Bagaço de cana coletado no Dia 21	98
Figura 119 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Bagaço de cana coletado no Dia 21	99
Figura 120 – Cromatograma (HPLC) da amostra cinco de Bagaço de cana coletado no Dia 21	99
Figura 121 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Bagaço de cana coletado no Dia 28 ..	100
Figura 122 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Bagaço de cana coletado no Dia 28	100

Figura 123 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Bagaço de cana coletado no Dia 28	101
Figura 124 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Bagaço de cana coletado no Dia 28	101
Figura 125 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Bagaço de cana coletado no Dia 28	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BTX	Benzeno, Tolueno e Xileno
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
GEE	Gases de Efeito Estufa
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
LC	Cromatografia Líquida, do inglês <i>Liquid Chromatography</i>
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
mL	Mililitro
MS	Espectrometria de Massas, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
nm	Nanômetro
Rpm	Rotações por minuto
UV-vis	Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA	12
2. OBJETIVOS GERAIS	13
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
3.1. BIOMASSA VEGETAL	14
3.2. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	16
3.3. LIGNINA	17
3.4. DEGRADAÇÃO MICROBIANA DA LIGNINA	20
3.5. POTENCIAIS PRODUTOS DA FRAGMENTAÇÃO DA LIGNINA	22
3.6. CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS QUÍMICOS	23
3.6.1. <i>ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL</i>	23
3.6.2. <i>CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA</i>	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. REAGENTES E SOLVENTES	26
4.2. EQUIPAMENTOS	26
4.3. METODOLOGIAS	27
4.3.1. <i>REATIVAÇÃO DO FUNGO TRAMETES VILLOSA CCMB561</i>	27
4.3.2. <i>INOCULAÇÃO DO FUNGO TRAMETES VILLOSA CCMB561 EM MEIO DE CULTURA CONTENDO LIGNINA</i>	27
4.3.3. <i>ANÁLISES DOS PRODUTOS FORMADOS</i>	28
4.3.3.1. <i>ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO UV-VIS</i>	28
4.3.3.2. <i>PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA</i>	28
4.3.3.3. <i>CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA</i>	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.3. CULTIVO DO FUNGO TRAMETES VILLOSA CCMB561	30
5.4. INOCULAÇÃO DO FUNGO TRAMETES VILLOSA CCMB561 EM MEIO DE CULTURA CONTENDO LIGNINA	31
5.5. ANÁLISE DOS PRODUTOS FORMADOS	32
5.5.1. <i>ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL</i>	32
5.5.2. <i>CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA</i>	34
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS	39
ANEXO A - ESPECTROS NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL	45
ANEXO B - CROMATOGRAMAS HPLC	64

1. Introdução/Justificativa

As mudanças climáticas, a emissão de gases de efeito estufa e o uso excessivo de recursos não renováveis vem se tornando cada vez mais uma preocupação para a sociedade, bem como, abrem oportunidade para que novos insumos, produtos e processos sejam o foco das novas pesquisas. A prospecção de novas matérias-primas e a otimização dos diferentes processos de conversão da biomassa vegetal podem desempenhar um papel essencial na redução de dependência de recursos fósseis.

O polímero de Lignina é a fonte renovável mais abundante em compostos aromáticos na natureza. Por estar presente na biomassa vegetal, a Lignina pode ser despolimerizada tanto de plantas, quanto de resíduos agroindustriais. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e o principal fabricante de derivados da cana para consumo interno e exportação. O bagaço da cana representa aproximadamente 30% de toda a colheita desta planta, sendo considerado um resíduo amplamente disponível no país.

O bagaço de cana-de-açúcar é frequentemente queimado para ser utilizado como fonte de energia para alimentar caldeiras em destilarias de cachaça e etanol combustível. Entretanto, essa biomassa à base de Lignina tem potencial para ser utilizada como fonte de produtos químicos de alto valor agregado e de combustíveis alternativos.

Embora estudos recentes descrevam a Lignina como fonte promissora de obtenção de produtos químicos de valor agregado, pouco se encontra na literatura sobre os produtos gerados a partir da degradação da Lignina por microrganismos. Neste trabalho foram analisados os produtos da degradação da Lignina utilizando o fungo *Trametes villosa* CCMB561. Os compostos foram identificados por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) e Espectrofotometria na região do Ultravioleta e visível (UV-vis). As informações geradas ao longo do desenvolvimento deste trabalho facilitam o avanço no uso de tecnologias limpas, promovendo a utilização de resíduos agroindustriais como fonte de energia e produtos secundários com valor agregado.

2. Objetivos Gerais

Caracterizar os compostos formados a partir da bioconversão da Lignina alcalina sintética e do bagaço de cana-de-açúcar pelo fungo *Trametes villosa* CCMB561 utilizando fermentação submersa.

2.1. Objetivos específicos

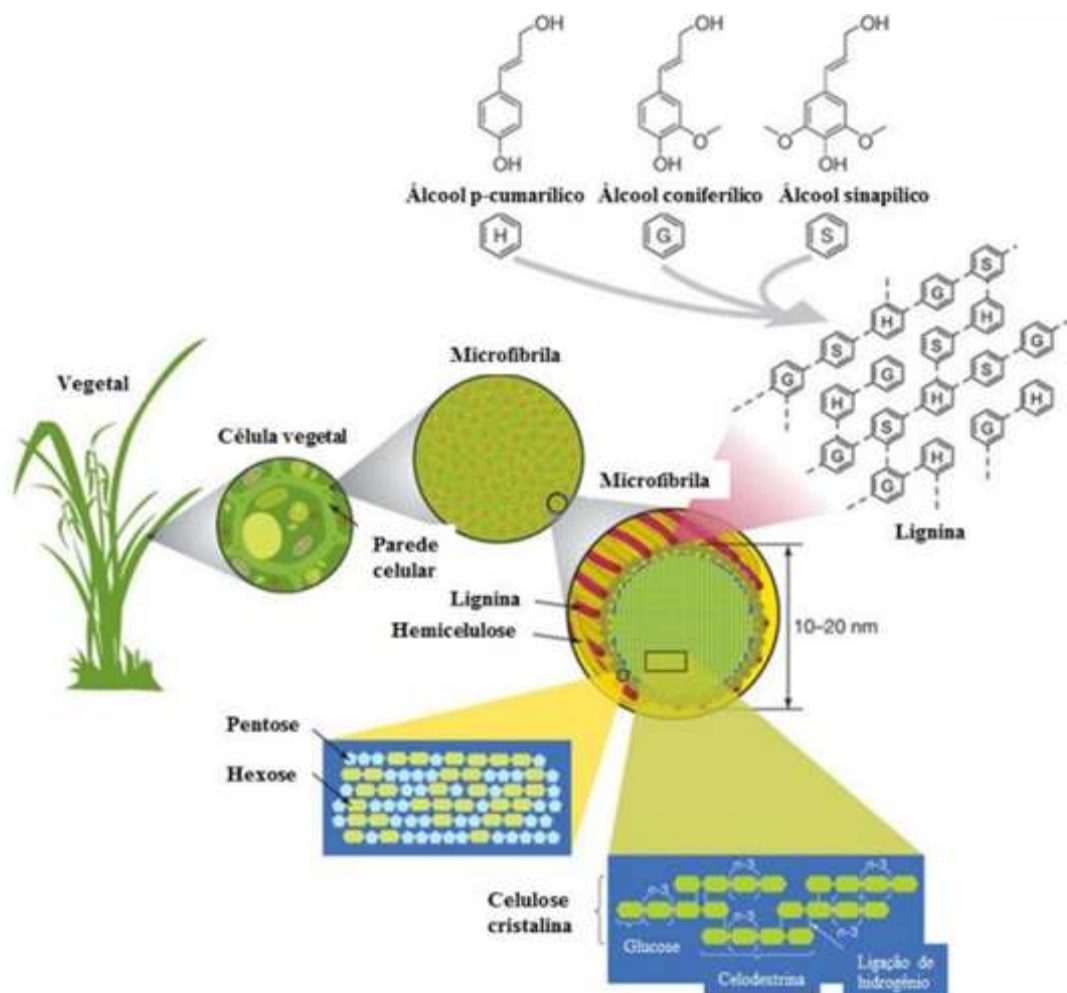
- Promover o crescimento do *Trametes villosa* CCMB561 em meio de cultura Extrato Malte Ágar;
- Incubar *Trametes villosa* CCMB561 com os substratos Lignina alcalina sintética e bagaço de cana-de-açúcar;
- Coletar o sobrenadante nos dias cinco, sete, 10, 14, 21 e 28 de incubação, para caracterização dos produtos formados;
- Analisar as amostras em UV-Vis, no modo varredura para determinar o máximo de absorbância;
- Realizar análise das amostras com método analítico em HPLC.

3. Fundamentação Teórica

3.1. Biomassa vegetal

A Biomassa Lignocelulósica é constituída de três principais polímeros naturais em sua parede celular, celulose, hemicelulose e Lignina (Figura 1). A celulose é um polímero natural formado por cadeias de glicose e é o composto mais abundante no vegetal. A hemicelulose é um polímero formado por açúcares de cinco e seis carbonos, enquanto a Lignina é uma macromolécula constituída por substâncias não aromáticas e principalmente por três substâncias fenólicas, o álcool *p*-cumarílico (H), álcool coniferílico (G) e álcool sinapílico (S) (RUBIN, 2008).

Figura 1 - Estrutura da célula vegetal contendo Lignina, Celulose e Hemicelulose



Fonte: RUBIN, 2008

Devido às suas características estruturais, a biomassa vegetal vem ganhando atenção em todo o mundo como uma fonte renovável de carbono. Composta de diferentes substâncias simples e complexas, pode ser aplicada na geração de calor, eletricidade, combustíveis e outros produtos de valor agregado. Além disso, a biomassa apresenta propriedades estruturais semelhante aos combustíveis fósseis, sendo possível aproveitar as tecnologias já existentes (YOGALAKSHMI *et al.*, 2022; PRAKASH *et al.*, 2021). Os resíduos agrícolas estão sendo utilizados para a produção de bioetanol a partir de diversas tecnologias, nos últimos anos essas tecnologias estão sendo empregadas no processo biotecnológicos de obtenção de produtos químicos e combustíveis úteis (PRAKASH *et al.*, 2021).

Em 2020, a participação dos recursos renováveis no país como matriz energética foi de 84,76%, incluindo como fonte de energias renováveis a hidráulica (65,2%), a eólica (8,8%), a solar (1,66%) e a bioenergia (9,1%), segundo o Balanço Energético Nacional (EPE, 2021). Entre os recursos renováveis aplicados a bioenergia, a biomassa da cana-de-açúcar constitui a maior parcela, colaborando com 16,9% (ANTAR *et al.*, 2021).

Pesquisas voltadas para o tema biomassa como fonte alternativa e renovável de energia se fortalecem com três principais objetivos: I) Reduzir as emissões de Gases de Efeito Estufa (GEE), a fim de mitigar o aquecimento global e as mudanças climáticas; II) Minimizar a exploração de recursos não renováveis em reservas de combustíveis fósseis e III) Reduzir a dependência de energia importada, por meio da geração de energia renovável sustentável (ANTAR *et al.*, 2021).

A biomassa lignocelulósica derivada de resíduos agrícolas e detritos florestais é considerada um recurso oportuno para a conversão em biocombustíveis e produtos químicos (YOGALAKSHMI; *et al.*, 2022). A utilização da biomassa lignocelulósica em substituição aos derivados do petróleo pode mitigar a liberação de gases poluentes emitidos pela queima de combustíveis fósseis, resultando na melhoria da qualidade ambiental, segurança energética e na economia de qualquer país (KAVITHA *et al.*, 2020).

Os resíduos lignocelulósicos mais comuns são os resíduos agrícolas obtidos de diferentes partes das plantas (caule, folhas, sementes, frutos e raízes), comumente encontrados na palha de trigo, palha de arroz e casca de arroz, dendê, bagaço de

cana-de-açúcar, caule e casca da mandioca, torta de semente de canola, espigas de milho, casca de milho, côco, bambu, cascas de trigo sarraceno, cânhamo, coroa do abacaxi, cascas de amendoim, cascas de ostra, resíduos de tabaco, cortiça e madeira (BHARDWAJ *et al.*, 2020).

O Alcatrão de eucalipto é uma biomassa renovável, composta por substâncias fenólicas e carbonílicas. O Alcatrão de eucalipto é um coproduto do processo de pirólise na obtenção do carvão vegetal. Durante o processo de queima da madeira é gerado vapor, rico em compostos voláteis. Para agregar valor à produção de carvão vegetal, diversas empresas investiram em condensar o vapor desse processo, gerando uma fração conhecida como licor pirolenhoso. Após decantação do licor, ocorre a formação de uma fase líquida aquosa (ácido pirolenhoso) e outra fase orgânica (Alcatrão vegetal) (OKUMA *et al.*, 2004).

A cana-de-açúcar se destaca no cenário econômico brasileiro, pois é um dos principais produtos agrícolas do nosso país, sendo consumida nas cozinhas, alambiques, nas indústrias alimentícias, está presente também na geração de combustível e energia. O bagaço tem aplicações na produção de papel, plástico e produtos químicos (SOUZA, 2006). Esse insumo é abundante e de baixo custo, destacando-se na indústria sucroalcooleira (DIONÍSIO *et al.*, 2021).

3.2. Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é produzida comercialmente em mais de 100 países (WHITE; VIATOR; WEBBER, 2020), sendo o Brasil o maior produtor mundial (GURGEL *et al.*, 2022), seguido pela Índia e Austrália (SOUZA, 2006). No Brasil, a safra da cana-de-açúcar de 2020/21 foi de 654,8 milhões de toneladas de acordo com o boletim de maio de 2021, que descreve um aumento de 1,8% em relação à safra 2019/20 (CONAB, 2021).

A alta produtividade da cana-de-açúcar no Brasil resulta em grande volume de resíduos, sendo que o bagaço representa aproximadamente 30% dessa fração (VIEIRA, 2019).

O bagaço de cana é um subproduto gerado a partir da moenda da cana-de-açúcar, onde se extrai o caldo de cana-de-açúcar, utilizado para produção de álcool, açúcar e/ou outros produtos (VIEIRA, 2019). A fração bagaço de cana é rica em celulose,

hemicelulose e Lignina (LIU *et al.*, 2019) e sua disposição final, feita de maneira imprópria causa impactos socioambientais negativos, degradação do solo e da água, poluição do ar e proliferação de vetores (CORDEIRO *et al.*, 2020; NOVAIS *et al.*, 2021).

Pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de separar a Lignina da estrutura lignocelulósica, viabilizando a aplicação da Lignina em escala comercial (KAMIMURA *et al.*, 2019). A despolimerização da Lignina presente no bagaço de cana torna essa matriz um potencial para obtenção de produtos de química fina (MAHMOOD *et al.*, 2016; VENCESLAU, 2018 e ANTAR *et al.*, 2021).

3.3. Lignina

A Lignina vem despertando muito interesse nos pesquisadores, pois é uma das moléculas mais abundantes em compostos aromáticos em nosso planeta, é uma matriz renovável e tem o potencial de substituir o petróleo para a obtenção de produtos químicos de interesse à sociedade. PONNUSAMY e colaboradores (2019) descreveram em sua revisão que a Lignina é o composto com características mais aplicáveis a indústria, dentre as substâncias existentes na biomassa, fator atribuído à aromaticidade e cadeias laterais na estrutura de carbono.

A estrutura da Lignina pode variar entre espécies de plantas e até mesmo entre plantas da mesma espécie, dependendo das condições ambientais (SALIBA *et al.*, 2001). Plantas herbáceas como gramíneas têm concentrações de Lignina em menor quantidade (10-19%), enquanto madeiras macias (25-35%) e madeiras duras (18-25%) têm maior concentração (PONNUSAMY *et al.*, 2019).

A estrutura da Lignina formada principalmente por grupos fenólicos é representada na Figura 2. Os grupos funcionais presentes na Lignina apresentam ampla variedade, como hidroxila alifática, carbonila, hidroxila fenólica, metoxila e álcool benzílico, grupos esses que determinam a polaridade da molécula. Esses grupos químicos são responsáveis pela heterogeneidade da Lignina na natureza e alta resistência, impondo um desafio elevado à sua despolimerização (KAMIMURA *et al.*, 2019 e LIU *et al.*, 2019).

Liu e colaboradores (2019) descreveram Lignina como um biopolímero de sequenciamento aleatório, composto de unidades fenilpropanoides ligadas entre si por

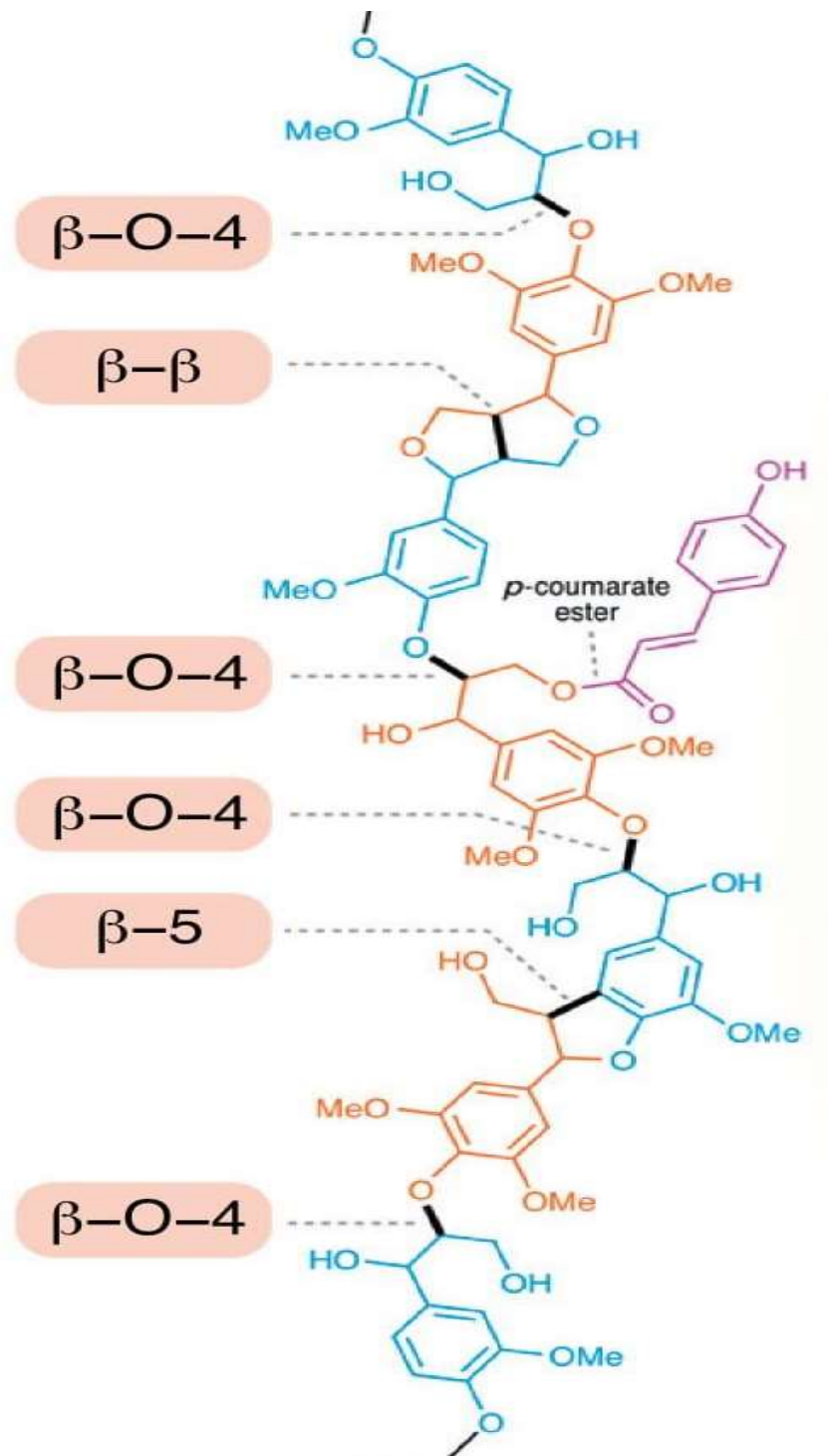
várias ligações, incluindo β -O-4 (éter arila), β -5-fenilcoumarano, 5'5-bifenila, β ' β -resinol e 4-O-5-diariléter (Figura 2). A ligação mais abundante no polímero de Lignina é a β -O-4, o que proporciona alta recalcitrância a despolimerização química e bioquímica (PONNUSAMY *et al.* 2019). A ligação β -O-4-aril favorece a recalcitrância devido à conformação espacial formada por ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals.

A presença de diferentes unidades precursoras e o elevado número de combinações possíveis entre as unidades precursoras faz com que a estrutura da Lignina seja bem mais complexa que a apresentada pela celulose e pelas polioses (LINO, 2015).

A Lignina é um polímero amorfo, tridimensional, de cadeia longa e elevada massa molar. Uma estrutura química robusta, classificada como heterogênea devido às várias estruturas poliméricas e fenólicas. Normalmente, constitui o segundo componente em quantidade na biomassa vegetal, tendo como principal função unir as fibras da celulose e hemicelulose por meio de ligações covalentes e ligações de hidrogênio, tornando a estrutura da planta extremamente forte e resistente à deformação. Essas características proporcionam resistência a insetos e a microrganismos patogênicos (PONNUSAMY *et al.*, 2019; RUBIN, 2008 e SHIN *et al.*, 2019).

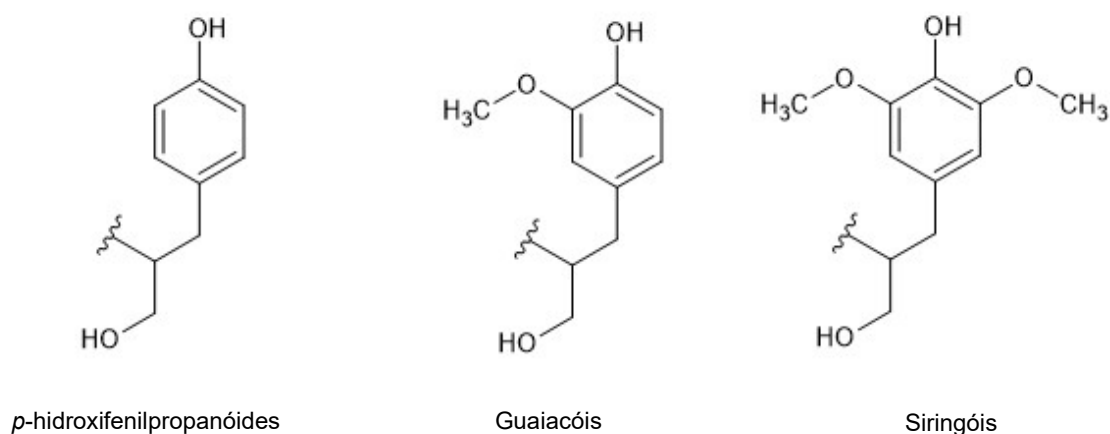
A fragmentação da Lignina produz fundamentalmente uma mistura de compostos fenólicos, onde predominam os *p*-hidrofenilpropanoides (LI e ZHENG, 2019), guaiacóis (2-metoxifenóis), e siringóis (2,6-dimetoxifenóis) (OKUMA, 2004), representados na Figura 3.

Figura 2 – Estrutura esquemática da Lignina biopolimerizada em plantas



Fonte: KAMIMURA *et al.*, 2019.

Figura 3 – Estrutura esquemática das unidades p-Hidroxifenilpropanóides, Guaiacóis e Siringóis



Fonte: Autor (ACD/ChemSketch)

3.4. Degradação microbiana da Lignina

A bioconversão de resíduos lignocelulósicos tem recebido cada vez mais atenção na pesquisa e na indústria, por ser uma matéria-prima renovável e sustentável, conforme já relatado nesta dissertação. PONNUSAMY *et al.* (2019) descreve em seu trabalho que os méritos do processo biológico estão relacionados ao custo-benefício, processo ecologicamente correto (*eco-friendly*) e alta propensão em degradar os componentes da parede de células vegetais. Uma grande variedade de microrganismos é capaz de degradar a Lignina por meio de enzimas e reações químicas, o que torna a biomassa vegetal mais receptiva à sacarificação via unidades de açúcar polissacarídeo (PONNUSAMY *et al.* 2019).

Os fungos têm sistemas enzimáticos poderosos para a despolimerização da Lignina. Os principais microrganismos responsáveis pela decomposição de madeiras e plantas são os denominados fungos de podridão-branca. Os fungos da podridão branca secretam uma ou mais enzimas modificadoras da Lignina, além de outros compostos necessários para a degradação efetiva da Lignina (DASHTBAN, M. *et al.*, 2010).

Os fungos de podridão branca são capazes de excretar enzimas que podem degradar a Lignina, hemicelulose e celulose presentes na biomassa (PONNUSAMY *et al.* 2019). Por exemplo, o *Phanerochaete chrysosporium* é conhecido pela capacidade de converter Lignina em substâncias de menor complexidade (LIU *et al.*, 2019). O filo

basidiomiceto abrange os principais fungos que metabolizam a Lignina. Outros fungos também foram descritos como metabolizadores da Lignina, como *Ceriporiopsis Subvermispora*, *Echinodontium taxodii*, *Pleurotus ostreatus* e *Cyathus stercoreus*. Entre as bactérias promissoras que metabolizam a Lignina estão *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus jostii*, *Rhodococcus opacus*, *Acinetobacter baylyi*, *Amycolatopsis sp.* e *Sphingomonas* (LIU *et al.*, 2019).

Os fungos da podridão marrom atacam preferencialmente a hemicelulose e a celulose de forma simultânea, por consequência, acessam a Lignina e promovem modificação na sua estrutura. As enzimas Lignina Peroxidase, Peroxidase dependente de Manganês, Polifenoloxidase e Lacase degradam a Lignina de forma eficaz (PONNUSAMY *et al.* 2019). Em geral, as Lacases usam o oxigênio molecular como aceptor de elétrons, enquanto as peroxidases usam o peróxido de hidrogênio como cossustrato (DASHTBAN, M. *et al.*, 2010).

ANDRIANI e colaboradores (2020) descreveram em seu estudo, que fungos pertencentes ao gênero *Trametes* apresentam alto potencial para utilização na indústria biotecnológica, devido à sua habilidade de produzir enzimas hidrolíticas e oxidativas que atuam eficientemente na degradação da lignocelulose. Algumas espécies do gênero *Trametes* são frequentemente estudadas pois já existem relatos de produção simultânea e sequencial de enzimas ligninolíticas, hemicelulolíticas e celulolíticas (ANDRIANI, *et al.* 2020; TOMÉ, *et al.* 2022).

A espécie *Trametes villosa* é menos estudada quando comparada a outras espécies do gênero, no entanto, estudos já demonstraram o potencial desse fungo em produzir *Lacase*, *peroxidase* e *celulase* em substratos lignocelulósicos (CONIGLIO *et al.*, 2020). CARNEIRO e colaboradores (2017) determinaram a presença de Manganês Peroxidase e Lignina Peroxidase em meio de cultura de bagaço de cana com a espécie *Trametes villosa* CCMB561, enzimas relevantes para a quebra eficiente de lignina, características de um fungo de podridão branca.

Os resultados obtidos nos estudos de Silva e colaboradores (2014) demonstraram que o *Trametes villosa* CCMB561 possui alto potencial lignolítico especialmente por causa de sua produção de peroxidase dependente de manganês, obtendo $35,05 \pm 1,45$ (%) de redução da Lignina presente no bagaço de cana-de-açúcar.

3.5. Potenciais produtos da fragmentação da Lignina

A bioconversão da Lignina gera fragmentos químicos predominantemente fenólicos, de acordo com a característica estrutural da biomassa. As classes de substâncias orgânicas comumente encontradas são os compostos aromáticos, carboxílicos, ésteres, álcoois, aldeídos e cetonas (PONNUSAMY et al., 2019).

A despolimerização da Lignina por fungos da podridão branca produz uma mistura heterogênea de compostos de baixa massa molar que varia de acordo com os tipos de biomassa da planta e as linhagens de fungos empregadas. Chen e Wan (2017) verificaram em sua revisão bibliográfica a geração de compostos químicos a partir da despolimerização da Lignina por vias microbiológicas. Os autores estudaram a despolimerização por bactérias, fungos e enzimas. Identificaram vanilina, ácido 4-hidroxipentadienóico, ácido 4-carboxi-2-hidroxipentadienóico, ácido 5-carboxivanílico, ácido vanílico, alguns Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA's) e a formação de lipídeos.

KAMIMURA *et al.*, (2019) sugere em seu trabalho que a Lignina é despolimerizada em duas etapas, sendo a primeira causada pelos fungos de podridão branca, liberando três unidades fenilpropanóides. Já a segunda etapa é responsável pela transformação dos fenilpropanóides em aromáticos de baixa massa molar (Vanilina, Seringato e *p*-hidroxibenzoato), sendo as bactérias as principais responsáveis por esta etapa. Vale ressaltar que os autores realizaram um experimento de cocultura microbiana para a bioconversão da Lignina.

HODÁSOVÁ *et al.* (2015) descreveu em seu estudo as diversas substâncias que podem ser geradas a partir da fragmentação da Lignina, tanto por processos químicos, físicos como biológicos. Nesse levantamento de informações, os autores descreveram a formação de Benzeno, Tolueno e Xilenos (BTX), Fenol e Vanilina, substâncias de características aromáticas. No entanto, segundo os autores, apenas o ácido vanílico, o ácido ferúlico e o ácido *p*-Cumarílico são produzidos por processo biológicos.

O Benzeno, Tolueno e Xilenos (BTX) proveniente de Lignina é semelhante ao BTX do petróleo, podendo ser usado como um substituto. HODÁSOVÁ *et al.* (2015) relatou que BTX têm aplicações em larga escala, portanto, apresentam ótimo potencial na

indústria química. Esses compostos representam 60% de todos os produtos aromáticos do mercado e 24% do mercado petroquímico global.

O fenol é importante na produção de plásticos e outros materiais. As principais aplicações dos fenóis incluem a produção de resinas de fenol-formaldeído, espumas de poliuretano ou poliuretanos para a indústria automobilística. Atualmente, a principal matéria-prima do fenol é o petróleo, sendo que esta matriz pode ser substituída pela Lignina. O preço do fenol proveniente da Lignina e do petróleo são os mesmos. Sendo assim, considerando que a Lignina é um insumo renovável, ganha além do valor econômico, valor ambiental (HODÁSOVÁ *et al.*, 2015).

Os siringóis são gerados durante a fragmentação da Lignina. Essas substâncias possuem grande interesse comercial, pois são produtos intermediário para a formação dos anéis aromáticos 3,4,5-trimetoxilados. Anéis aromáticos 3,4,5-trimetoxilados são estruturas presente em muitas substâncias naturais e apresentam atividades biológicas comprovadas (OKUMA, 2004).

A comercialização da Lignina é majoritariamente aplicada para a obtenção de vanilina (LIU *et al.*, 2020). Comercialmente, a vanilina é produzida há quase 80 anos. Porém, apenas 20% da vanilina no mercado é produzida a partir de Lignina e outros 80% são produzidos a partir de petróleo bruto. O valor de mercado da vanilina depende da fonte. A vanilina natural produzida a partir de baunilha de Madagascar é a que apresenta o maior valor comercial, que ultrapassa os \$ 1.200,00 dólares o quilograma. A vanilina produzida a partir da Lignina e do petróleo bruto possuem preços similares, sendo encontrada por não mais de \$ 40,00 dólares o quilograma (HODÁSOVÁ *et al.*, 2015).

3.6. Caracterização dos produtos químicos

3.6.1. Espectroscopia na região do Ultravioleta e visível

A espectrometria de absorção molecular na região do UV e visível usa de fonte de radiação eletromagnética na faixa de comprimento de onda entre 160 e 780 nm. A fonte de radiação promove transições eletrônicas na molécula do composto em estudo, sendo limitadas pela presença de um par isolado ou de uma ligação π a partir da qual possa ocorrer a transição eletrônica (SKOOG *et al.*, 2006).

Os espectrofotômetros UV-VIS consistem em duas fontes, uma na região do UV e outra na região do visível, uma célula não interferente (cubeta) e um detector para se medir a luz. Os detectores podem ser programados para medir a absorbância em um determinado comprimento de onda ou podem varrer toda a faixa UV-VIS (SKOOG *et al.*, 2006).

A espectroscopia UV-visível (UV-vis) tem sido aplicada de várias maneiras para facilitar a análise qualitativa e quantitativa. A aplicação dessa técnica é ampla, podendo ser utilizada na verificação de ingredientes farmacêuticos, da estabilidade de compostos, dentre outros (CARVALHO, 2019). O espectro UV-VIS é registrado como uma função de absorbância *versus* comprimento de onda (CARVALHO, 2019). Skoog e colaboradores (2006) diz que o espectro da absorbância se relaciona com a cor do material, sendo a cor percebida pelo olho humano, a cor complementar a absorvida.

3.6.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia é uma técnica amplamente utilizada e permite a identificação, separação e determinação de compostos químicos presentes em diversos tipos de amostras, das mais simples às mais complexas. Sendo assim, é a técnica com maior aplicação analítica, considerada a de melhor resultado na separação de analitos (SKOOG *et al.*, 2006).

Como a aplicação cromatográfica expandiu-se, fez-se necessário uma evolução na abordagem de análises instrumentais e dados gerados, de forma a acompanhar a riqueza de amostras complexas (PREBIHALO *et al.*, 2017).

Para obter uma quantificação precisa, os compostos devem ser totalmente separados um do outro. Em vários casos, isso pode ser possível usando a detecção seletiva. Enquanto várias técnicas cromatográficas são potencialmente úteis, Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) são claramente as técnicas mais utilizadas para relevantes separações (MEGSON *et al.*, 2016).

A importância da cromatografia líquida como técnica analítica e seu impacto em nossas vidas não pode ser minimizada. A técnica é usada para separar, identificar e quantificar aminoácidos, toxinas ambientais, ingredientes ativos em medicamentos, drogas de abuso, surfactantes, carboidratos e muitos outros compostos de extrema

importância. Alguns compostos orgânicos não podem ser analisados por GC, pois não são suficientemente voláteis ou são termicamente sensíveis. A cromatografia líquida é, portanto, uma técnica de separação muito importante (VITHA, 2017).

Os detectores acoplados no HPLC podem variar de acordo com o objetivo da análise. O detector UV-Vis é o de maior utilização pois possuem baixo custo, aceitam o uso de gradiente para fase móvel e possuem robustez as variações de temperatura. Os detectores UV-Vis possuem formato de detectores de comprimento de onda fixo ou variável (arranjo de diodos) (VITHA, 2017).

O uso individual do HPLC não é recomendado para identificação de substâncias químicas, já que a comparação do tempo de retenção da amostra com um padrão na análise é um parâmetro menos confiável. Entretanto, é comum utilizar outras técnicas para identificar e confirmar as identidades das substâncias, como: Espectroscopia na região do Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear, Espectrometria de Massas, por exemplo (COSTA, 2019).

4. Materiais e métodos

4.1. Reagentes e solventes

Na etapa de cultivo do fungo *Trametes villosa* CCMB561 foram utilizadas placas de Petri 90 x 15 mm contendo meio de cultura Extrato de Malte Ágar (Extrato de Malte marca: KASVI, referência: K25-611006, Dextrose marca: Dinâmica, referência: 1673 e Ágar marca: Himedia, referência: GRM666-500G).

Como substratos para o cultivo do fungo foram utilizados a Lignina alcalina em pó (Sintética) SIGMA-ALDRICH, Lote: MKDD3898; ref.: 370959 e o Bagaço de cana-de-açúcar cultivada na região de Itabirito-MG (cultivar desconhecido). O bagaço foi seco, moído e peneirado em peneira com abertura a 4,75 mm, utilizando a fração menor que 4,75 mm.

O solvente Acetonitrila HPLC, Merck Lote: I525330 007 foi utilizada como fase móvel na análise por HPLC e como solução diluente para as amostras. A solução diluente foi preparada com 30 mL de Acetonitrila e 70 mL de água deionizada.

4.2. Equipamentos

A Autoclave PRISMATEC autoclave Vertical CS foi utilizada para autoclavar o meio de cultura Extrato de Malte ágar e os materiais do experimento de incubação do fungo com os substratos.

Balança analítica PIONNER, Estufa incubadora e Fluxo laminar foram utilizados para preparo dos cultivos e incubação do fungo *Trametes villosa*.

As amostras foram submetidas à centrifugação na Centrífuga NOVATECNICA, modelo NT810 e Centrífuga 5410 *Eppendorff*.

O UV-Vis da Varian Cary 50 Scan foi utilizado para análise espectroscópica na região do ultravioleta e visível.

Para as análises de cromatografia líquida foram utilizados o Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) Shimadzu®, Prominence-i LC-2030 Plus, Detector UV-vis e a coluna Phenomenex® Hyperclone 5µ ODS (C18), comprimento 150 mm por 4,6 mm de diâmetro.

4.3. Metodologias

4.3.1. Reativação do fungo *Trametes villosa* CCMB561

O isolado fúngico *Trametes villosa* CCMB561 está depositado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG). O isolado foi cultivado em placas de Petri 90 x 15 mm contendo meio de cultura Extrato de Malte Ágar (2% de Extrato de Malte, 2% de dextrose e 2% de Ágar) incubado em estufa a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 dias conforme TOMÉ e colaboradores (2022).

4.3.2. Inoculação do fungo *Trametes villosa* CCMB561 em meio de cultura contendo Lignina

O cultivo do fungo *Trametes villosa* CCMB561 foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL utilizando-se duas fontes de lignina, bagaço de cana e lignina alcalina sintética. Concentrações equivalentes de lignina foram utilizadas nos experimentos, para tal, o percentual de lignina no bagaço de cana foi considerado como sendo 20% (TOMÉ *et al.*, 2022). Em seis frascos Erlenmeyers foram adicionados 0,48 g da Lignina alcalina sintética e em outros seis Erlenmeyers foram adicionados 2,4 g de bagaço de cana, aos quais foram adicionados 120 mL de água destilada. Os frascos foram fechados com rolha de algodão e papel pardo e levados para esterilização em autoclave.

Com auxílio de canudos de plástico e palitos esterilizados, 10 plugs do cultivo do fungo *Trametes villosa* CCMB561 foram coletados da placa Petri e inoculados em 10 Erlenmeyers, sendo 2 Erlenmeyers mantidos sem inóculo, os quais foram considerados controles do experimento. Dessa forma, cada condição experimental foi realizada com cinco réplicas e um controle, totalizando 12 Erlenmeyers. Todos os Erlenmeyers foram incubados em estufa a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, por 28 dias.

Alíquotas de 15 mL foram retiradas nos dias cinco, sete, dez, 14, 21 e 28 de incubação e transferidas para tubos cônicos estéreis do tipo *Falcon*, sendo cada tudo devidamente identificado com um número de um a cinco e controle, o nome do substrato incubado e o dia de retirada da alíquota. Todos os procedimentos foram realizados no ambiente estéril do fluxo laminar.

Após a coleta de cada alíquota do experimento, as amostras foram centrifugadas 5000 rpm por 5 minutos, e os sobrenadantes armazenados -20 °C para análises posteriores.

4.3.3. Análises dos produtos formados

4.3.3.1. Espectroscopia na região do UV-vis

As análises por Espectroscopia na região do UV-vis foram realizadas no equipamento UV-vis Varian Cary 50 Scan do Laboratório de Orgânica no Departamento de Química, Unidade Nova Suíça, CEFET-MG. As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, em seguida foram diluídas em água deionizada na concentração 1:1, ou seja 1,0 mL de amostra e 1,0 mL de água. A mistura foi transferida para uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de largura. Foi utilizado o Guaiacol como padrão referência. A leitura no espectrofotômetro foi no modo varredura, realizando a análise entre os comprimentos de onda 750 nm e 230 nm.

4.3.3.2. Preparo das amostras para análise cromatográfica

No Laboratório InTechLab do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG), Unidade Gameleira, foram preparadas as amostras para análise cromatográfica. Transferiu-se um mililitro de cada amostra do experimento de degradação fúngica para um *Eppendorff* identificado, em seguida foram submetidos a centrifugação por 5 minutos a 5410 rpm. Retirou-se cuidadosamente 50 µL do sobrenadante de cada *Eppendorff* e em seguida foi realizada a transferência para um *vial* (de HPLC) com 950 µL de solução água:Acetonitrila 70:30, que foi homogeneizado e reservado para análise.

4.3.3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para análise de cromatografia líquida foi utilizado o HPLC Shimadzu® do Laboratório InTechLab. As análises foram realizadas com base no método descrito por Taira e colaboradores (2018) com adaptações. O HPLC utilizado possui quatro linhas para fase móvel (A, B, C, D). Nesse trabalho foram utilizadas as linhas A e D, com Acetonitrila e água, respectivamente, o gradiente pode ser observado na Tabela 1. A programação estabelecida foi com fluxo permanente de 1,0 mLmin⁻¹. A coluna utilizada foi a Phenomenex® Coluna Hyperclone 5µ ODS (C18), comprimento 150 mm

por 4,6 mm de diâmetro, em forno com temperatura fixa em 25 °C. Detector UV-vis Shimadzu®, modelo LC-2030, com comprimento de onda 280 nm, volume de injeção 10 µL. Os dados adquiridos foram tratados pelo software LabSolutions da Shimadzu®.

Tabela 1 – Gradiente Fase móvel

Tempo (min)	Linha A - Acetonitrila (%)	Linha D - Água (%)
0	10	90
3	10	90
5	25	75
19	25	75
20	10	90

Fonte: autor

5. Resultados e Discussão

5.3. Cultivo do fungo *Trametes villosa* CCMB561

A observação dos meios de cultivo contendo o fungo *Trametes villosa* CCMB561 revelou a formação de hifas aéreas em toda extensão da placa, formando assim uma massa filamentosa, conhecida como micélio (TORTORA, 2016). Os micélios apresentaram coloração branca, uniforme e sem contaminantes ao longo dos dias de incubação (Figura 4).

Figura 4 – Cultivo do fungo *Trametes villosa* CCMB561 após sete dias de incubação



Em contrapartida, a placa de controle negativo (sem inoculação), manteve-se inalterada durante todos os dias de incubação, demonstrando assim a ausência de contaminação no meio de cultura incubado, conforme Figura 6.

Figura 5 – Controle negativo meio de cultura Extrato de Malte Ágar



5.4. Inoculação do fungo *Trametes villosa* CCMB561 em meio de cultura contendo Lignina

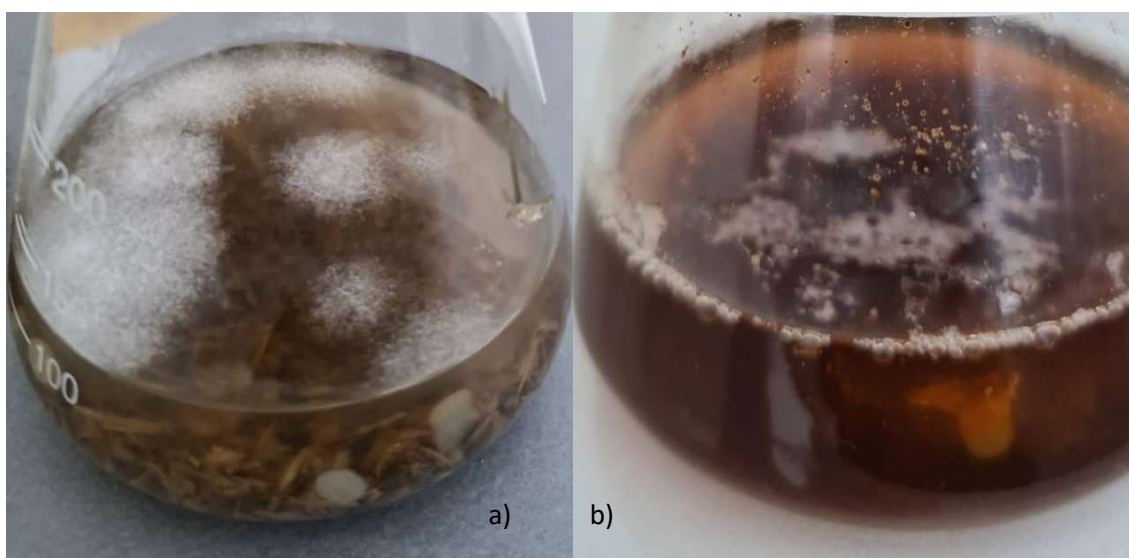
Neste trabalho, foi observado o crescimento do fungo *Trametes villosa* CCMB561 ao longo dos 28 dias de incubação (Figuras 6 e 7). A presença de micélios foi observada tanto para os experimentos com Lignina, quanto para os experimentos em bagaço de cana-de-açúcar, o que indica a capacidade deste fungo em utilizar Lignina como fonte de energia. Outro trabalho demonstra a capacidade de fungos *Trametes villosa* CCMB561 em reduzir a Lignina presente no bagaço de cana em 35,05%. Tendo apenas o bagaço de cana como substrato, ou seja, fonte de nutriente (SILVA, et al. 2014).

Figura 6 – Primeiro dia de Incubação do fungo *Trametes Villosa* em meio com Lignina



Fonte: Autor. a) Erlenmeyer contendo Bagaço de cana e os plugs do fungo *Trametes villosa* CCMB561 e b) Erlenmeyer contendo Lignina alcalina e os plugs do fungo *Trametes villosa* CCMB561.

Figura 7 – Formação de micélio fúngico após cinco dias de incubação



Fonte: Autor. a) Erlenmeyer contendo Bagaço de cana e micélios do fungo *Trametes villosa* CCMB561 na superfície do meio de cultura e b) Erlenmeyer contendo Lignina alcalina e micélios do fungo *Trametes villosa* CCMB561 submerso no meio de cultura.

5.5. Análise dos produtos formados

5.5.1. Espectroscopia na região Ultravioleta-visível

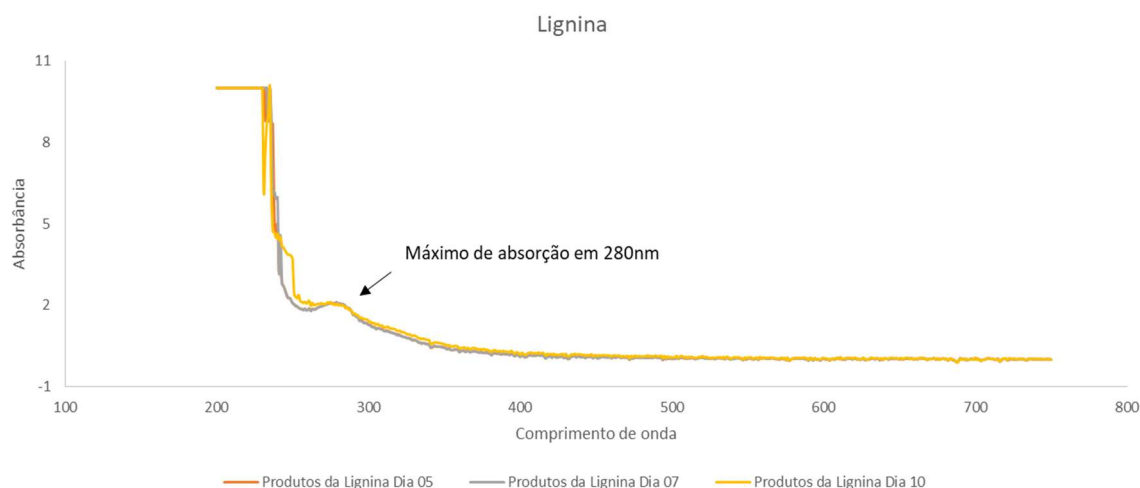
A análise de Espectroscopia na região UV-vis tem o objetivo de investigar em qual comprimento de onda se encontra o máximo de absorção da amostra em estudo,

informação que contribui para as análises em HPLC, o qual possui um detector de UV-vis.

Os resultados obtidos na análise de UV-vis demonstraram que a banda de máximo de absorção foi em 280 nm, sendo a varredura realizada entre os comprimentos de onda 750 nm e 200 nm, para as amostras do experimento de degradação da Lignina alcalina (Figuras 8 e 9).

Segundo Wrolstad (2002), todas as substâncias fenólicas absorvem a luz UV e todas têm alguma absorbância a 280 nm. Essa propriedade dos compostos fenólicos pode ser usada para análise espectral. No entanto, os resultados não podem ser relacionados a nenhuma substância específica, uma vez que os compostos fenólicos têm absorvidade molar específica próxima a esse comprimento de onda. O valor desse método é devido sua extrema simplicidade e rápida obtenção de resultado, exigindo apenas filtração ou centrifugação e diluição, se necessário. Sendo muito adequado para monitoramento de compostos fenólicos.

Figura 8 – Espectro de absorção na região do UV-Vis dos compostos obtidos na degradação da Lignina pelo fungo *Trametes villosa* CCMB561



Fonte: Autor. Espectro de absorção na região do UV-Vis, onde a linha em laranja representa os valores médios obtidos das amostras coletadas no quinto dia de incubação. A linha em cinza representa os valores médios obtidos das amostras coletadas no sétimo dia de incubação. A linha amarela representa os valores médios obtidos das amostras coletadas no décimo dia de incubação.

Figura 9

Figura 9 – Espectro de absorção na região do UV-Vis dos compostos obtidos na degradação de cana-de-açúcar pelo fungo *Trametes villosa* CCMB561



Fonte: Autor. Espectro de absorção na região do UV-Vis, onde a linha em vermelho representa os valores médios obtidos das amostras coletadas no quinto dia de incubação. A linha em cinza representa os valores médios obtidos das amostras coletadas no sétimo dia de incubação. A linha amarela representa os valores médios obtidos das amostras coletadas no décimo dia de incubação.

Os resultados das análises realizadas por Espectroscopia na região do UV-Vis, na faixa de comprimento de onda 750 nm a 200 nm para as amostras, incluindo o branco e o Guaiacol podem ser acessados no anexo 7.1. O branco de água, conforme previsto, não apresentou máximo de absorção, já o Guaiacol apresentou máximo de absorção em 280 nm, resultado esperado por ser uma substância fenólica.

5.5.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Após a determinação do máximo de absorção pela análise de varredura por Espectroscopia na região UV-vis, nossos estudos foram conduzidos a análise por HPLC que teve como objetivo separar os compostos fenólicos com absorbância em 280 nm.

Para análise das amostras obtidas no experimento microbiológico, foram analisados os padrões Ácido vanílico, Ácido sirínico, 3-metil-1,2-ciclopentenodiona, 2,6-Dimetoxifenol, Guaiacol e 1,2,3-Trimetoxibenzeno. Esses padrões foram escolhidos

para dar cobertura aos possíveis fragmentos gerados na degradação biológica da Lignina. Na Tabela 2 são descritos os tempos de retenção de cada substância padrão selecionada seguindo o método de separação proposto (item 4.3.3.3).

Tabela 2 – Tempos de retenção (min) para as substâncias utilizadas como padrão nas análises cromatográficas deste estudo

Padrão	Tempo de retenção (min)
Ácido vanílico	1,196
Ácido sirínico	3,884
3-metil-1,2-ciclopentenodiona	4,390
2,6-Dimetoxifenol	9,193
Guaiacol	9,262
1,2,3-Trimetoxibenzeno	15,082

Foi possível observar que houve a separação das substâncias ao realizar gradiente de água e Acetonitrila. As seis substâncias trabalhadas tiveram tempos de retenção distintos. Os picos do 2,6-Dimetoxifenol e do Guaiacol foram os que apresentaram maior proximidade, entretanto, nenhuma das alterações realizadas no gradiente da fase móvel, temperatura de coluna e fluxo de fase móvel permitiram melhor separação. Fischer e Höffler (2020) relataram grande dificuldade na análise de derivados da Lignina. De acordo com o método de separação descrito, de 14 analitos testados em 28 min de corrida, três pares de picos apresentaram baixa resolução, ou seja, houve coeluição em três pares de substâncias analisadas.

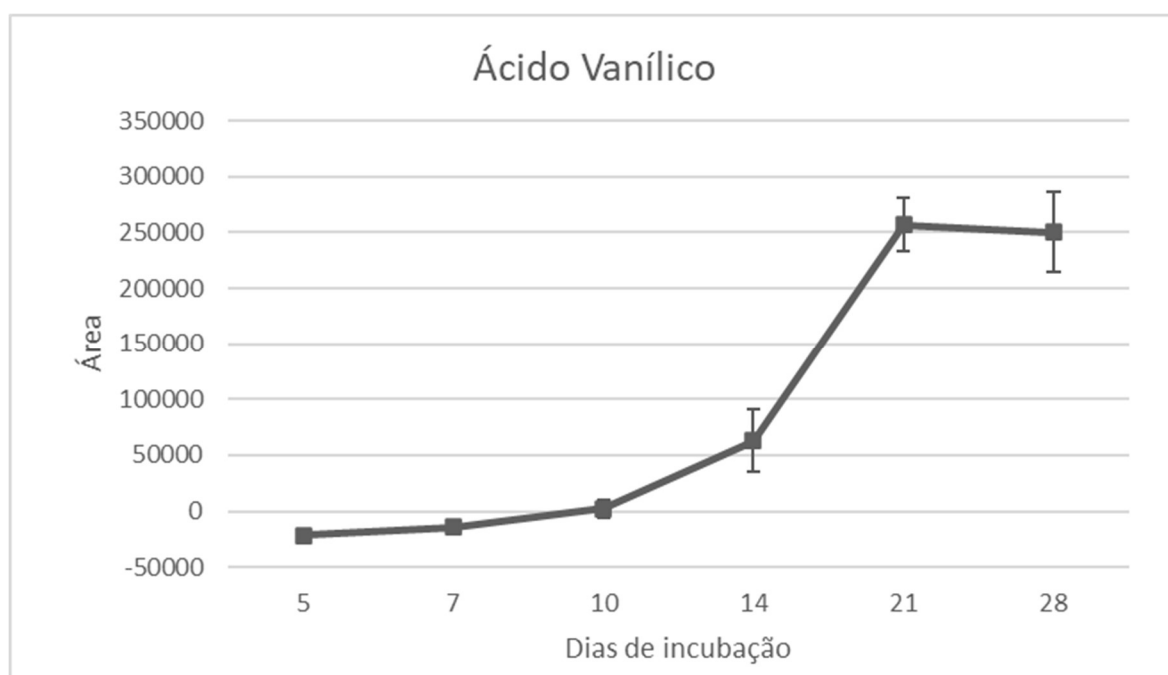
As análises cromatográficas das amostras de controle apresentaram picos com pequenas áreas, semelhantes a ruídos. Essas áreas servem de *background* para cada grupo de amostra a qual pertence o controle. Ou seja, o controle do dia sete dos experimentos realizados com Lignina foi o *background* para as cinco amostras coletadas no mesmo dia.

Ao analisar os resultados cromatográficos, referente aos seis dias coletados das amostras de Lignina (Dias 5, 7, 10, 14, 21 e 28) foi possível observar um crescente aumento na área referente ao ácido vanílico, tempo de retenção próximo a 1,196 min (Tabela 3 e Figura 10).

Tabela 3 – Áreas obtidas a partir das médias das amostras coletadas de Lignina, relativo ao tempo de retenção equivalente ao ácido vanílico

Dia de coleta das amostras de Lignina	Média das áreas obtidas	Desvio
5	-21870	4622
7	-14494	3793
10	2358	7626
14	63140	28358
21	256793	23893
28	250062	35993

Figura 10 – Produção de Ácido vanílico pelo fungo *Trametes villosa* CCMB561 no meio de cultura contendo Lignina alcalina



O ácido vanílico é um produto previsto na decomposição da Lignina pois é resultado da fragmentação da estrutura desse biopolímero. Taira e colaboradores (2018) determinaram em seu trabalho que o ácido vanílico foi uma das substâncias fenólicas encontradas a partir da degradação fúngica da biomassa de arroz, Taira utilizou o LC/MS/MS para caracterização das substâncias. Chen e Wan (2017) e Hodásová (2015) descreveram, em sua revisão bibliográfica, que o ácido vanílico é um dos

compostos fenólicos encontrados na bioconversão da Lignina por fungos, corroborando assim com o resultado encontrado neste trabalho.

Diferentemente da Lignina, o experimento utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, não apresentou nenhuma substância com área acima do *background*, para os resultados de HPLC. Apesar da presença de Lignina na biomassa, o fungo de podridão branca utiliza como fonte de energia, primeiramente, os açúcares de mais fácil acesso, os açúcares mais simples tipo glicose, presente na celulose, e açúcares de cinco e seis carbonos constituintes da hemicelulose (RUBIN, 2008). Quando a fonte de energia simples começa a esgotar, inicia-se o consumo de carbono de matriz complexa, presente na Lignina.

Os resultados de Carneiro e colaboradores (2017) e SILVA e colaboradores (2014) corroboram com os resultados encontrados neste trabalho. Demonstraram que quando o fungo é cultivado em diferentes substratos lignocelulósicos, há uma expressão diferente dos genes Lignina Peroxidase, Manganês Peroxidase e Lacase. Sugerindo que respostas metabólicas específicas podem ser desencadeadas quando o fungo é cultivado em Lignina alcalina e bagaço de cana.

6. Conclusão

Neste trabalho, a caracterização das amostras do experimento com o fungo *Trametes villosa* CCMB561 em meio de cultura contendo Lignina, se mostrou uma opção para a obtenção de compostos fenólicos. O ácido vanílico foi encontrado nas amostras de Lignina sintética após o décimo quarto dia de incubação, demonstrando que o fungo utilizou a Lignina como fonte de energia e promoveu a fragmentação da Lignina. No experimento com o bagaço de cana não foram detectados compostos fenólicos, indicando que os açúcares simples podem ter induzido o crescimento do fungo *Trametes villosa* CCMB561 em detrimento a produção de compostos fenólicos.

Em conclusão, o trabalho apresentado mostra-se como um estudo inicial para que outros sejam realizados envolvendo a degradação de lignina por parte do fungo *Trametes villosa* CCMB561. Apesar dos desafios, foi possível vislumbrar o grande potencial encontrado nesta área, proporcionando conhecimento que poderá ser aplicado em pesquisas futuras, auxiliando o desenvolvimento de novos métodos de caracterização dos compostos fenólicos gerados a partir da degradação da Lignina.

7. Referências

- ANDRIANI, Ade; MAHARANI, Alike; YANTO, Dede Heri Yuli; PRATIWI, Hartinah; ASTUTI, Dwi; NURYANA, Isa; AGUSTRIANA, Eva; ANITA, Sita Heris; JUANSSILFERO, A.B.; PERWITASARI, Urip. Sequential production of ligninolytic, xylanolytic, and cellulolytic enzymes by *Trametes hirsuta* AA-017 under different biomass of Indonesian sorghum accessions-induced cultures. **Bioresource Technology Reports**, [S.L.], v. 12, p. 100562, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100562>.
- ANTAR, Mohammed; LYU, Dongmei; NAZARI, Mahtab; SHAH, Ateeq; ZHOU, Xiaomin; SMITH, Donald L.. Biomass for a sustainable bioeconomy: an overview of world biomass production and utilization. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 139, p. 110691, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2020.110691>.
- BHARDWAJ, Aastha; ALAM, Tanweer; SHARMA, Vasudha; ALAM, Mohammad Sarwar; HAMID, Hinna; DESHWAL, Gaurav Kr. Lignocellulosic Agricultural Biomass as a Biodegradable and Eco-friendly Alternative for Polymer-Based Food Packaging. *Journal Of Packaging Technology And Research*, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 205-216, 22 abr. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s41783-020-00089-7>.
- CARNEIRO, R. T. DE O. et al. *Trametes villosa* Lignin Peroxidase (TvLiP): Genetic and Molecular Characterization. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 27, n. 1, p. 179–188, 28 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.1606.06055>>.
- CARVALHO, Maisa Azevedo Dalbone de. **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE UMA MATRIZ VÍTREA PARA A PRODUÇÃO DE UM VIDRO COM NANOPARTÍCULAS DE COBRE**. 2019. 100 f. Tese (Doutorado) - Curso de Escola de Engenharia Industrial Metalúrgica de Volta Redonda, Universidade Federal Fluminense, Volta Redonda, 2019.
- CHEN, Zhu; WAN, Caixia. Biological valorization strategies for converting lignin into fuels and chemicals. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p.610-621, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.166>.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTACIMENTO. Boletim Maio de 2021. Quadrimestral, v.7, N 4. <https://www.conab.gov.br/>. Acesso: 18 de outubro de 2021.
- CONIGLIO, Romina O.; DÍAZ, Gabriela V.; FONSECA, María I.; CASTRILLO, María L.; PICCINNI, Florencia E.; VILLALBA, Laura L.; CAMPOS, Eleonora; ZAPATA, Pedro D..

Enzymatic hydrolysis of barley straw for biofuel industry using a novel strain of *Trametes villosa* from Paranaense rainforest. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, [S.L.], v. 50, n. 8, p. 753-762, 10 mar. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10826068.2020.1734941>.

CORDEIRO, Noéle Khristinne; CARDOSO, Kerolém Prícila Sousa; MATA, Tatiane Calandrino da; BARBOSA, Jaqueline de Araújo; GONÇALVES JUNIOR, Affonso Celso. GESTÃO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS COMO FORMA DE REDUÇÃO DOS IMPACTOS AMBIENTAIS. **Revista de Ciências Ambientais**, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 23, 24 ago. 2020. Centro Universitario La Salle - UNILASALLE. <http://dx.doi.org/10.18316/rca.v14i2.5593>.

COSTA, Ingrid Ferreira. **Vantagens e Limitações da Técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. 2019. Disponível em: <https://www.linkedin.com/in/ingridferreiracosta/>. Acesso em: 13 abr. 2022.

DASHTBAN, Mehdi. SCHRAFT, Heidi. SYED, Tarannum A. QIN, Wensheng. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **International Journal of Biochemistry Molecular Biology**. 2010;1(1):36-50. Epub 2010 May 23. PMID: 21968746; PMCID: PMC3180040.

DIONÍSIO, S.R.; SANTORO, D.C.J.; BONAN, C.I.D.G.; SOARES, L.B.; BIAZI, L.e.; RABELO, S.C.; IENCZAK, J.L.. Second-generation ethanol process for integral use of hemicellulosic and cellulosic hydrolysates from diluted sulfuric acid pretreatment of sugarcane bagasse. *Fuel*, [S.L.], v. 304, p. 121290, nov. 2021. **Elsevier BV**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121290>.

EPE, Empresa de Pesquisa Energética. **Balanco Energético Nacional 2021: ano base 2020**. Rio de Janeiro. 2021. 292 p. Ministério de Minas e Energia. Disponível em: <https://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/balanco-energetico-nacional-2021>. Acesso em: 23 mar. 2022.

FISCHER, Klaus; HÖFFLER, Susanne. RP-HPLC Analysis of Phenolic Lignin Monomers with DAD and Coulometric Array Detection. *Journal Of Chromatographic Science*, [S.L.], v. 59, n. 4, p. 312-324, 19 dez. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/chromsci/bmaa105>.

GURGEL, Aline do Monte; SOUTO, Aline de Souza; GUEDES, Clenio Azevedo; GUEDES, Geovanna Hachyra Facundo; PEREIRA, João Antonio dos Santos; BEZERRA, Virgínia Carmem Rocha. Espelho sem reflexos: conflitos e vulnerabilidades socioambientais em uma região produtora de cana-de-açúcar. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 1049-

1060, mar. 2022. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1413-81232022273.27502020>.

KAMIMURA, Naofumi; SAKAMOTO, Shingo; MITSUDA, Nobutaka; MASAI Eiji; KAJITA Shinya. Advances in microbial lignin degradation and its applications. **Current Opinion In Biotechnology**, v. 56, p.179-186, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2018.11.011>.

KAVITHA, S.; KANNAH, R. Yukesh; KASTHURI, S.; GUNASEKARAN, M.; PUGAZHENDI, Arulazhagan; RENE, Eldon R.; PANT, Deepak; KUMAR, Gopalakrishnan; BANU, J. Rajesh. Profitable biomethane production from delignified rice straw biomass: the effect of lignin, energy and economic analysis. *Green Chemistry*, [S.L.], v. 22, n. 22, p. 8024-8035, 2020. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/d0gc02738c>.

HODÁSOVÁ, L'udmila; JABLONSKÝ, Michal; ŠKULCOVÁ, Andrea; HÁZ, Aleš. Lignin, potential products and their market value. **Wood Research**, Bratislava, v. 6, n. 60, p.973-986, jul. 2015.

LI, Xiang; ZHENG, Yi. Biotransformation of lignin: mechanisms, applications and future work. **Biotechnology Progress**, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 195-219, 16 out. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.2922>.

LINO, Alessandro Guarino. **COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURAL DA LIGNINA E LIPÍDIOS DO BAGAÇO E PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR**. 2015. 108 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

LIU, Zhi-hua; LE, Rosemary K.; KOSA, Matyas; YANG, Bin; YUAN, Joshua; RAGAUSKAS, Arthur J. Identifying and creating pathways to improve biological lignin valorization. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 105, p.349-362, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.009>.

LIU, Yi; LUO, Gang; NGO, Huu Hao; GUO, Wenshan; ZHANG, Shicheng. Advances in thermostable laccase and its current application in lignin-first biorefinery: a review. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 298, p. 122511, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122511>.

MAHMOOD, Nubla; YUAN, Zhongshun; SCHMIDT, John; XU, Chunbao (Charles). Depolymerization of lignins and their applications for the preparation of polyols and rigid

polyurethane foams: a review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 60, p. 317-329, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.01.037>.

MEGSON, David; REINER, Eric J; JOBST, Karl J; DORMAN, Frank L; ROBSON, Mathew & FOCANT, Jean-François. A review of the determination of persistent organic pollutants for environmental forensics investigations. **Analytica Chimica Acta**, Toronto, v. 941, p.10-25, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.08.027>.

N, Yogalakshmi K; T, Poornima Devi; P, Sivashanmugam; S, Kavitha; R, Yukesh Kannah; VARJANI, Sunita; ADISHKUMAR, S.; KUMAR, Gopalakrishnan; J, Rajesh Banu. Lignocellulosic biomass-based pyrolysis: a comprehensive review. **Chemosphere**, [S.L.], v. 286, p. 131824, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131824>.

NOVAIS, Roney Calheiros de; MAGALHÃES, Ivomberg Dourado; LIMA, Cícero Luiz Calazans de; MEDEIROS, Aldair de Sousa; GONZAGA, Giordano Bruno Medeiros. Produção de etanol e seus impactos ambientais na indústria alcooleira de Alagoas. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 298-306, 1 jul. 2021. Grupo Verde de Agroecologia e Abelhas. <http://dx.doi.org/10.18378/rvads.v16i3.8616>.

Okuma, Adriana Akemi. **Estudo da fração siringila do alcatrão de Eucalyptus sp. como insumo químico**. 2004. 246 p. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

PONNUSAMY, Vinoth Kumar; NGUYEN, Dinh Duc; DHARMARAJA, Jeyaprakash; SHOBANA, Sutha; BANU, J. Rajesh; SARATALE, Rijuta Ganesh; CHANG, Soon Woong; KUMAR, Gopalakrishnan. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 271, p. 462-472, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.070>.

PRAKASH, Dhakshinamoorthy Gnana; GOPINATH, Kannappan Panchamoorthy; VINATHA, Viswanathan; SHREYA, Suresh; SIVARAMAKRISHNAN, Ramachandran; CHI, Nguyen Thuy Lan. Enhanced production of hydrocarbons from lignin isolated from sugarcane bagasse using formic acid induced supercritical ethanol liquefaction followed by hydrodeoxygenation. **Chemosphere**, [S.L.], v. 285, p. 131491, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131491>.

PREBIHALO, Sarah E.; BERRIER, Kelsey L.; FREYE, Chris E.; BAHAGHIGHAT, H. Daniel; MOORE, Nicholas R.; PINKERTON, David K.; SYNOVEC, Robert E.. Multidimensional Gas Chromatography: advances in instrumentation, chemometrics, and applications. **Analytical**

Chemistry, [S.L.], v. 90, n. 1, p. 505-532, 10 nov. 2017. American Chemical Society (ACS).
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04226>.

RUBIN, Edward M.. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, [S.L.], v. 454, n. 7206, p. 841-845, ago. 2008. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1038/nature07190>.

SALIBA, Eloísa de Oliveira Simões; RODRIGUEZ, Norberto Mário; MORAIS, Sérgio Antônio Lemos de e PILO-VELOSO, Dorila. Ligninas: métodos de obtenção e caracterização química. **Cienc. Rural, Santa Maria**, v. 31, n. 5, p. 917-928, Oct. 2001.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782001000500031>.

Silva, M. , Souza, V. , Santos, V. , Kamida, H. , Vasconcellos-Neto, J. , Góes-Neto, A. and Bello Koblitz, M. (2014) Production of Manganese Peroxidase by *Trametes villosa* on Unexpensive Substrate and Its Application in the Removal of Lignin from Agricultural Wastes. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5, 1067-1077.
<http://dx.doi.org/10.4236/abb.2014.514122>.

SHIN, Sang Kyu; KO, Young Jin; HYEON, Jeong Eun; HAN, Sung Ok. Studies of advanced lignin valorization based on various types of lignolytic enzymes and microbes. *Bioresource Technology*, [S.L.], v. 289, p. 121728, out. 2019. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121728>.

Skoog, D. A, West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*, Editora Thomson, tradução da 8ª edição, 2006.

SOUZA, Cristiano Soares de. **DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LIGNINA DO BAGAÇO DA CANA DE AÇÚCAR**. 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

TAIRA, Junsei; TOYOSHIMA, Rin; AMEKU, Nana; IGUCHI, Akira; TAMAKI, Yasutomo. Vanillin production by biotransformation of phenolic compounds in fungus, *Aspergillus luchuensis*. **Amb Express**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 40-47, 13 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-018-0569-4>.

TOMÉ, Luiz Marcelo Ribeiro; SILVA, Felipe Ferreira da; FONSECA, Paula Luize Camargos; MENDES-PEREIRA, Thairine; AZEVEDO, Vasco Ariston de Carvalho; BRENIG, Bertram; BADOTTI, Fernanda; GÓES-NETO, Aristóteles. Hybrid Assembly Improves Genome Quality

and Completeness of *Trametes villosa* CCMB561 and Reveals a Huge Potential for Lignocellulose Breakdown. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 142, 30 jan. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof8020142>.

TORTORA, Gerard J.; CASE, Christine L.; FUNKE, Berdell R. Microbiologia-12ª Edição. Artmed Editora, 2016.

VENCESLAU, Hayssa Michely Barbosa de Barros. **Diversificação das aplicações do bagaço de cana de açúcar**. 2018. 41 f. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia em Produção Sucroalcooleira, Tecnologia Sucroalcooleira, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/15998>. Acesso em: 18 nov. 2019.

VIEIRA, Viviane Borges. **Bioprodução de pediocina por *Pediococcus pentosaceus* ET34 em resíduo agroindustrial hidrolisado bagaço de cana-de-açúcar**. 2019. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Htts://Doi.Org/10.11606/D.9.2019.Tde-09082019-141832, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.9.2019.tde-09082019-141832>. Acesso em: 18 nov. 2019.

VITHA, Mark F.. **Chromatography**: principles and instrumentation. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2017. 281 p.

WHITE, Paul M.; VIATOR, Ryan P.; WEBBER, Charles L. Temporal and varietal variation in sugarcane post-harvest residue biomass yields and chemical composition. **Industrial Crops And Products**, [S.L.], v. 154, p. 112616, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112616>.

WROLSTAD, Ronald E.. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. 6. ed. Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc., 2002.

ANEXO A - Espectros na região do Ultravioleta-visível

Figura 11 – Espectro na região do UV-Vis para o branco água

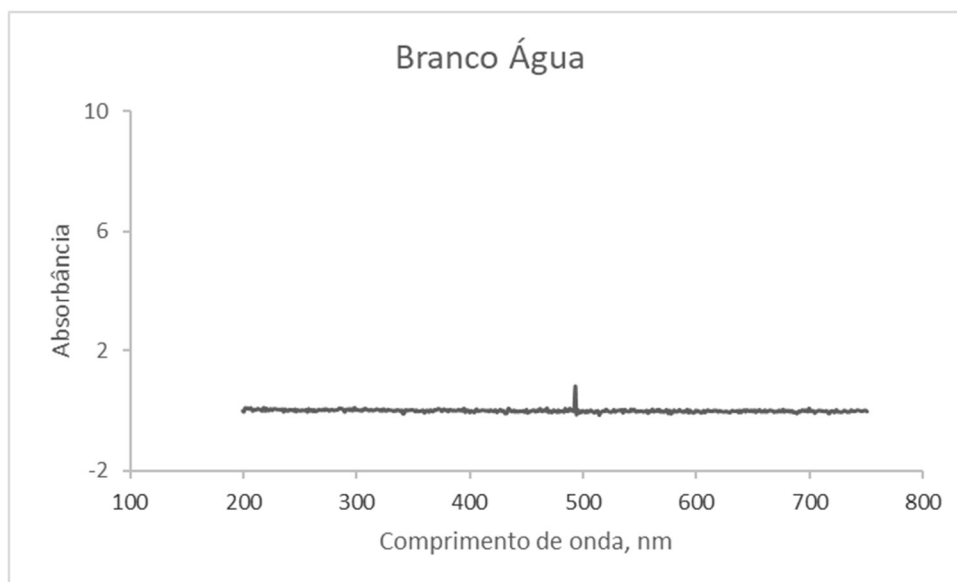


Figura 12 – Espectro na região do UV-Vis para o Guaiacol

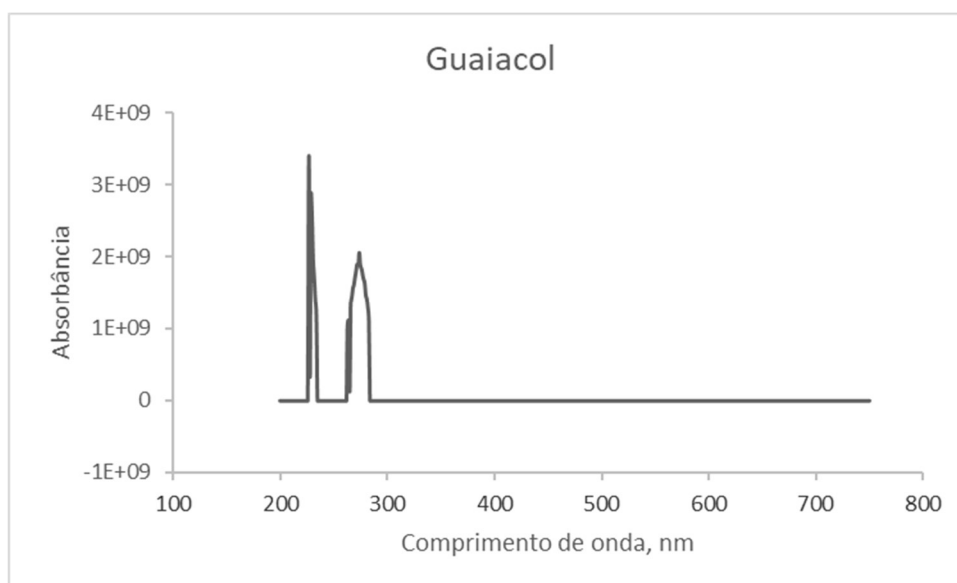


Figura 13 – Espectro na região do UV-Vis para o Controle Lignina _Dia 05

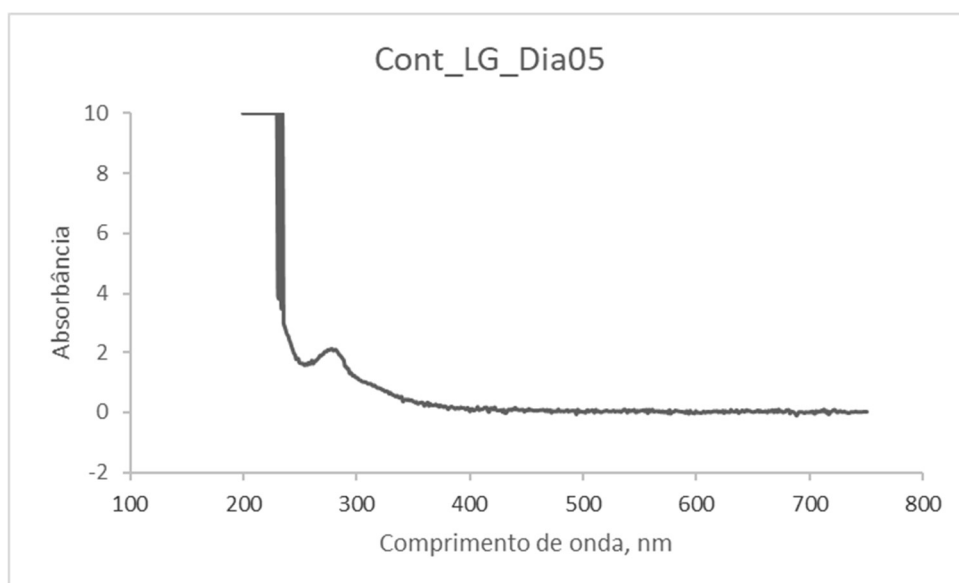


Figura 14 – Espectro na região do UV-Vis para o T01_Lignina _Dia 05

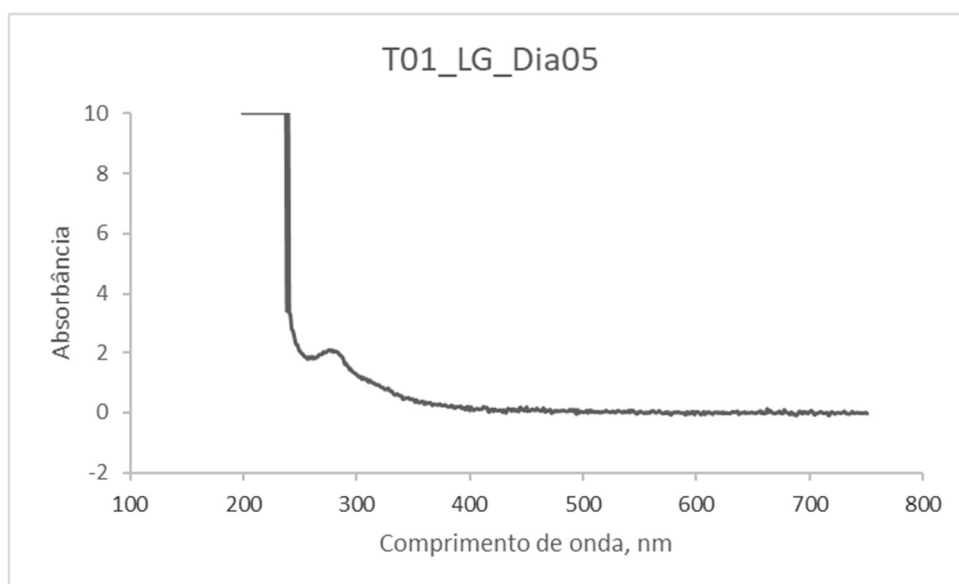


Figura 15 – Espectro na região do UV-Vis para o T02_Lignina _Dia 05

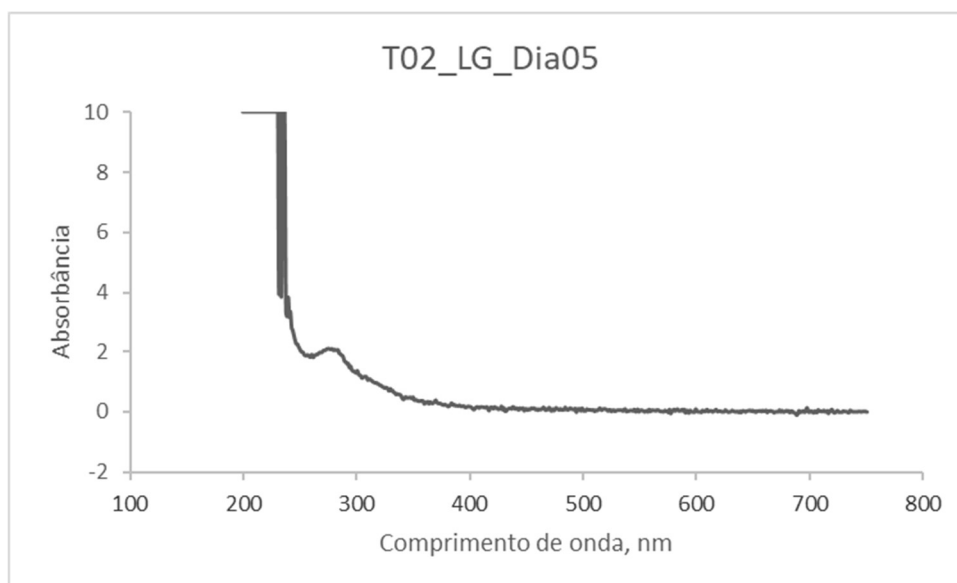


Figura 16 – Espectro na região do UV-Vis para o T03_ Lignina _Dia 05

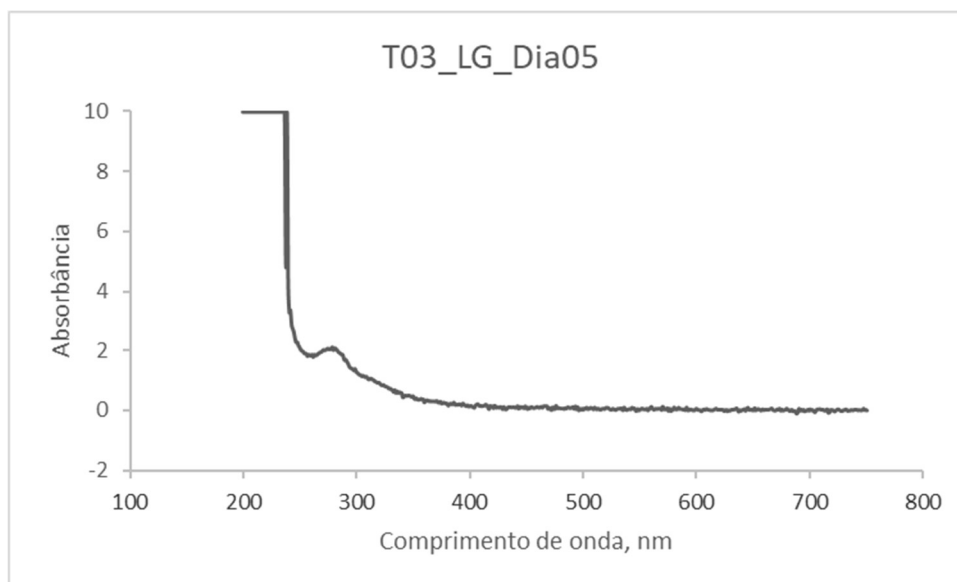


Figura 17 – Espectro na região do UV-Vis para o T04_Lignina _Dia 05

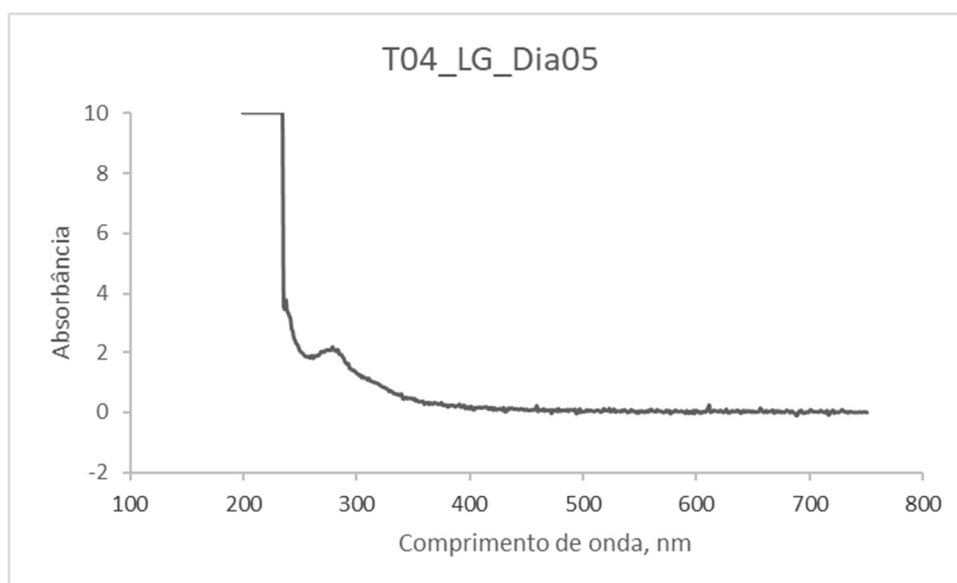


Figura 18 – Espectro na região do UV-Vis para o T05_Lignina _Dia 05

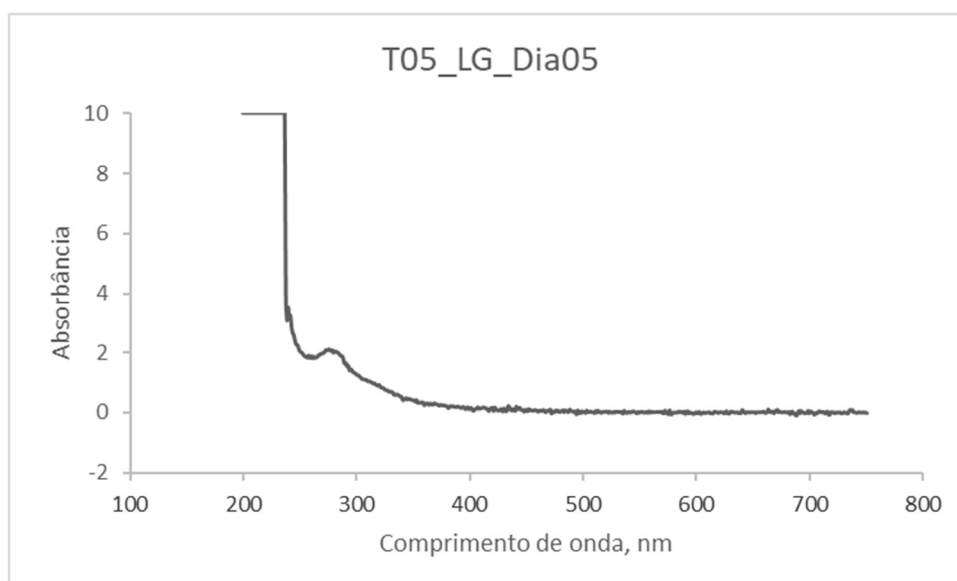


Figura 19 – Espectro na região do UV-Vis para o Controle Lignina _Dia 07

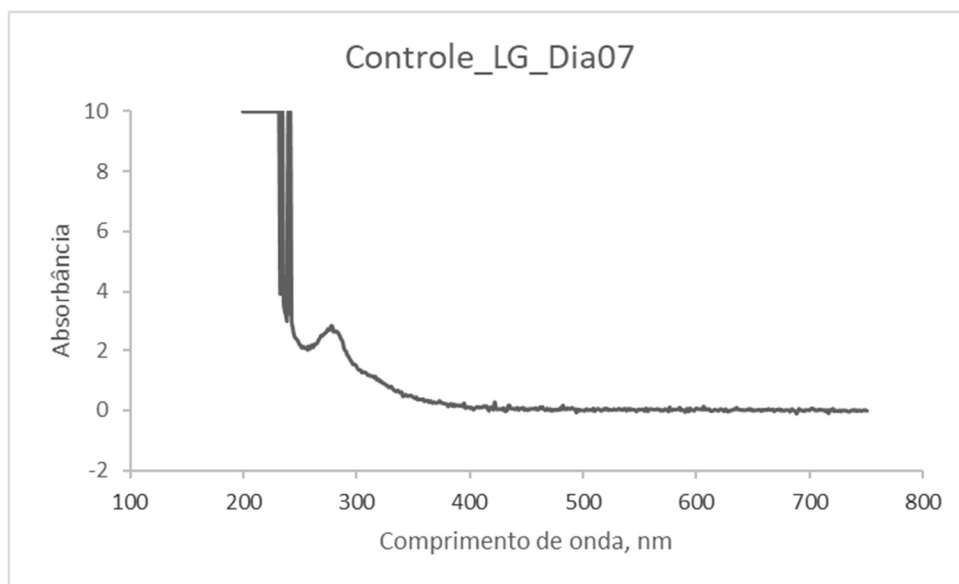


Figura 20 – Espectro na região do UV-Vis para o T01_Lignina _Dia 07

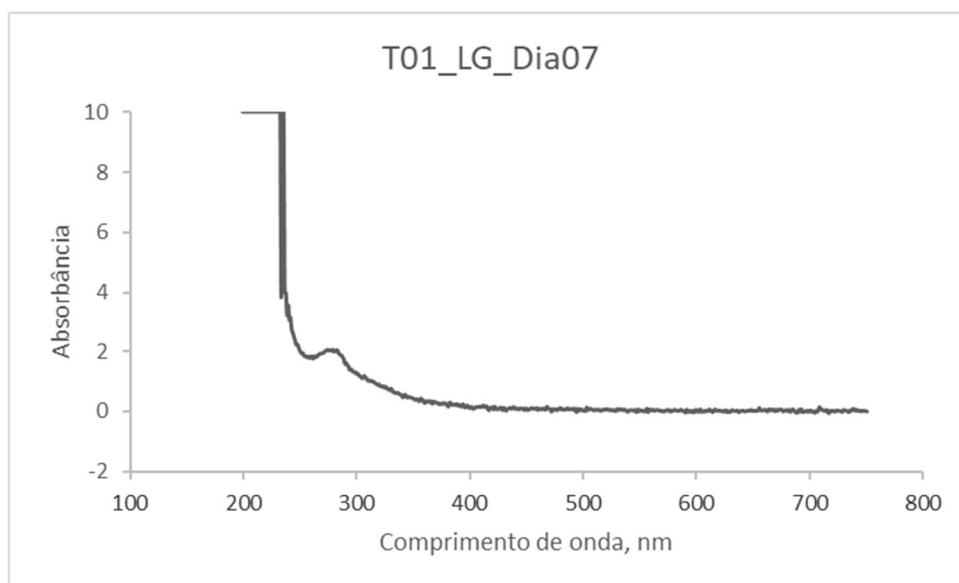


Figura 21 – Espectro na região do UV-Vis para o T02_Lignina _Dia 07

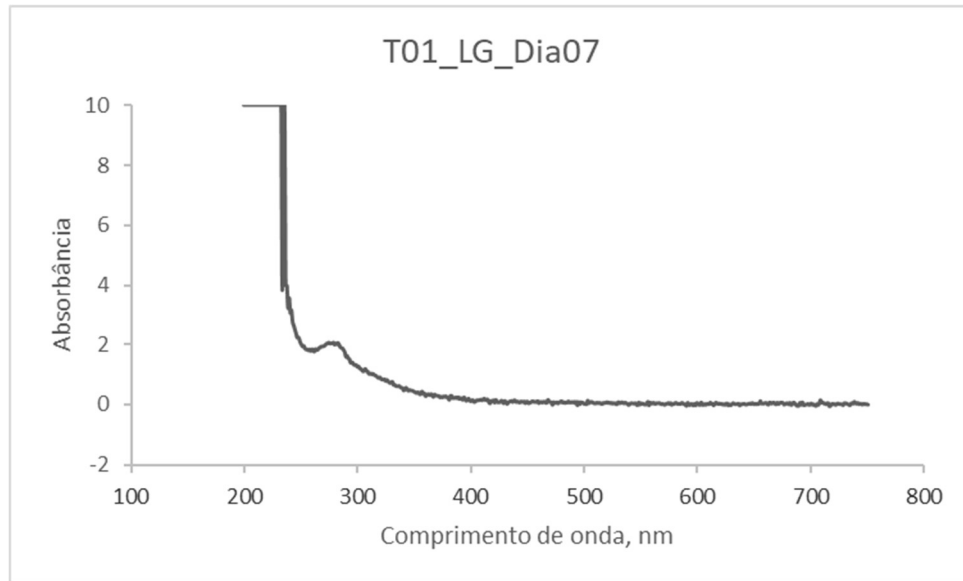


Figura 22 – Espectro na região do UV-Vis para o T03_Lignina _Dia 07

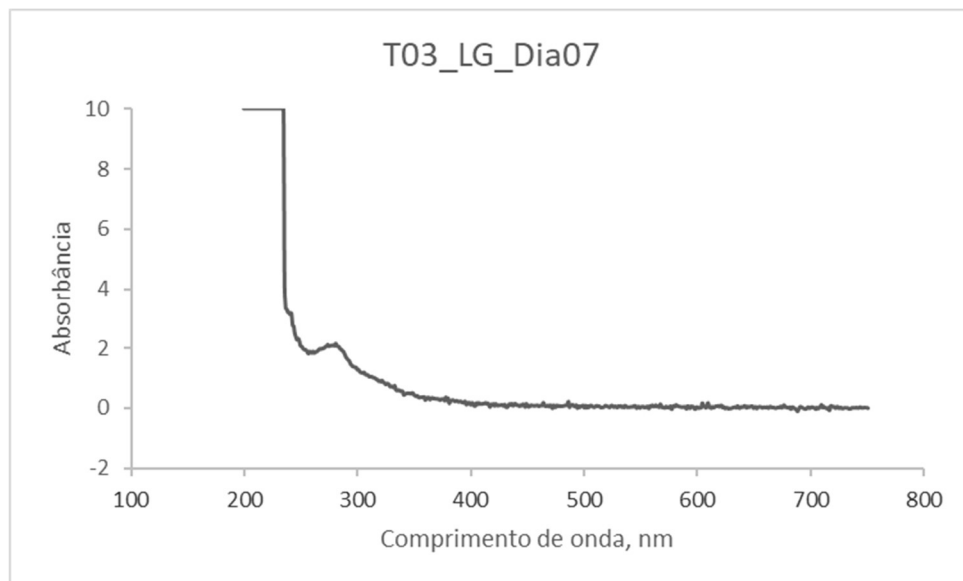


Figura 23 – Espectro na região do UV-Vis para o T04_Lignina _Dia 07

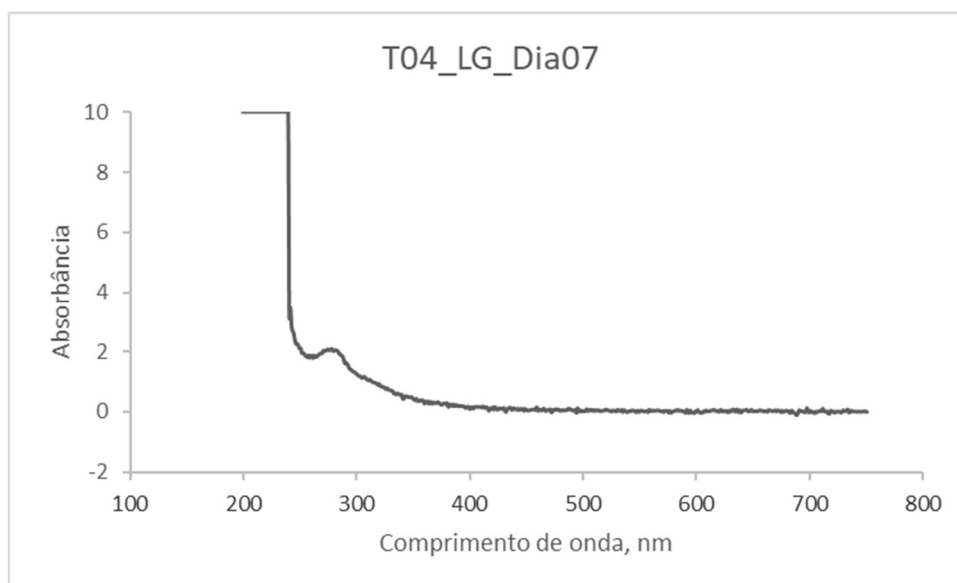


Figura 24 – Espectro na região do UV-Vis para o T05_Lignina _Dia 07

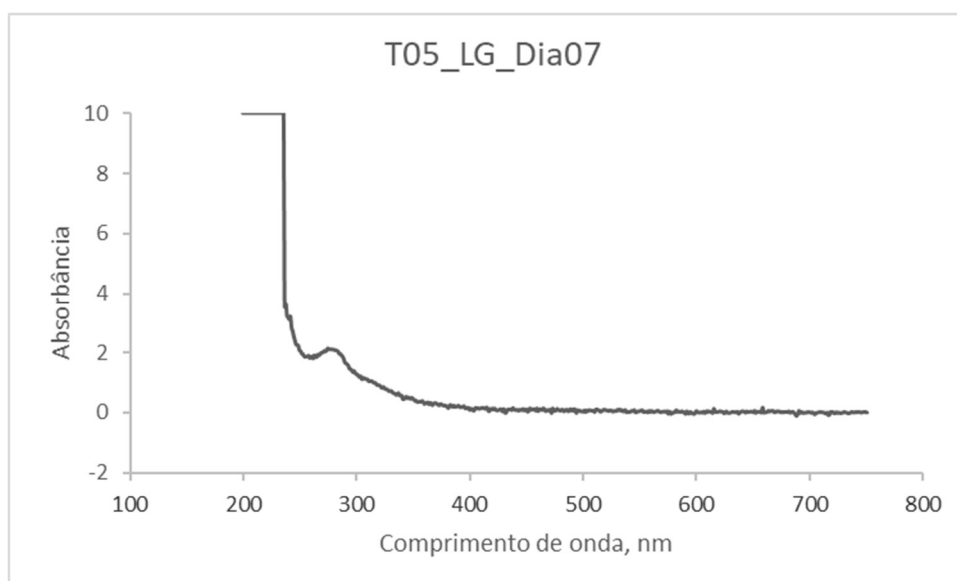


Figura 25 – Espectro na região do UV-Vis para o Controle Lignina _Dia 10

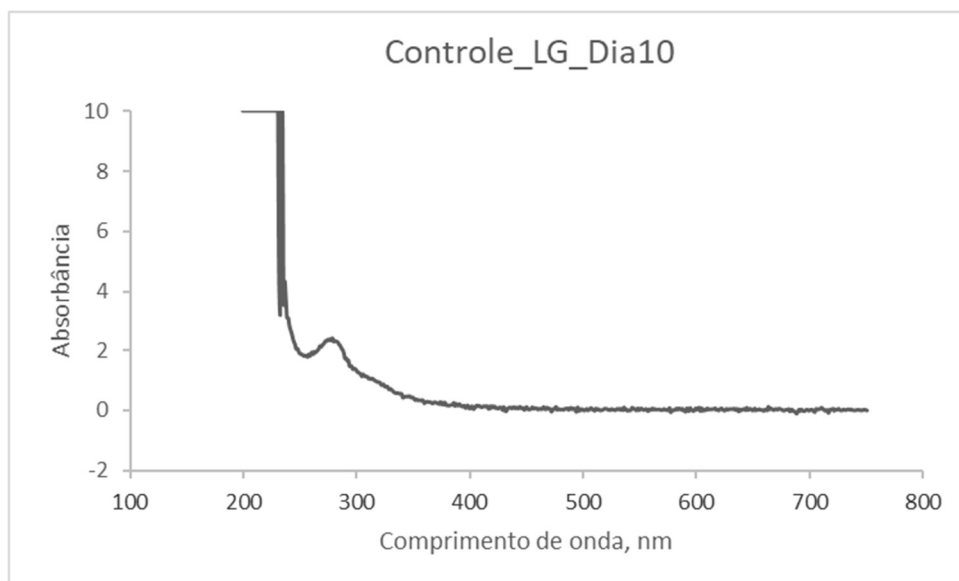


Figura 26 – Espectro na região do UV-Vis para o T01_Lignina_Dia 10

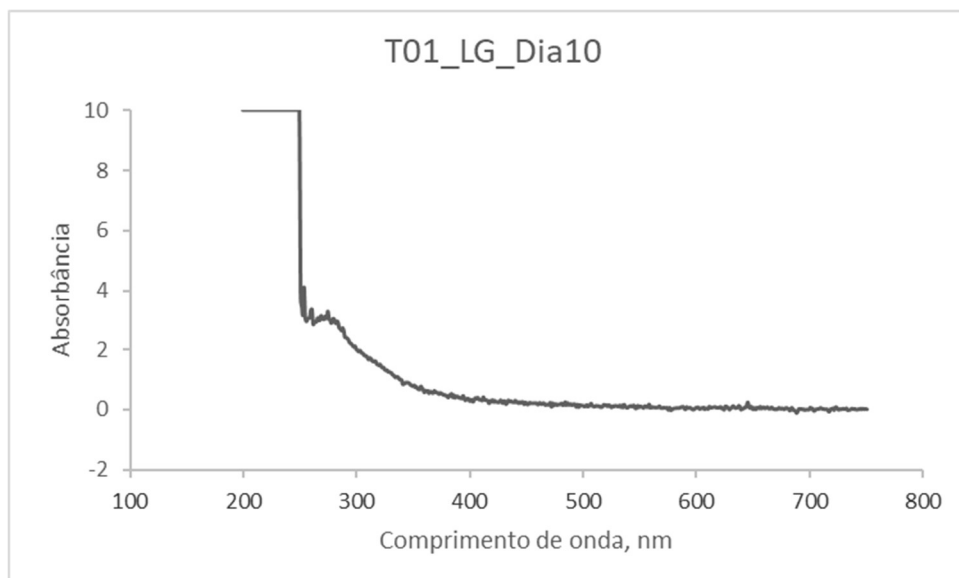


Figura 27 – Espectro na região do UV-Vis para o T02_Lignina_Dia 10

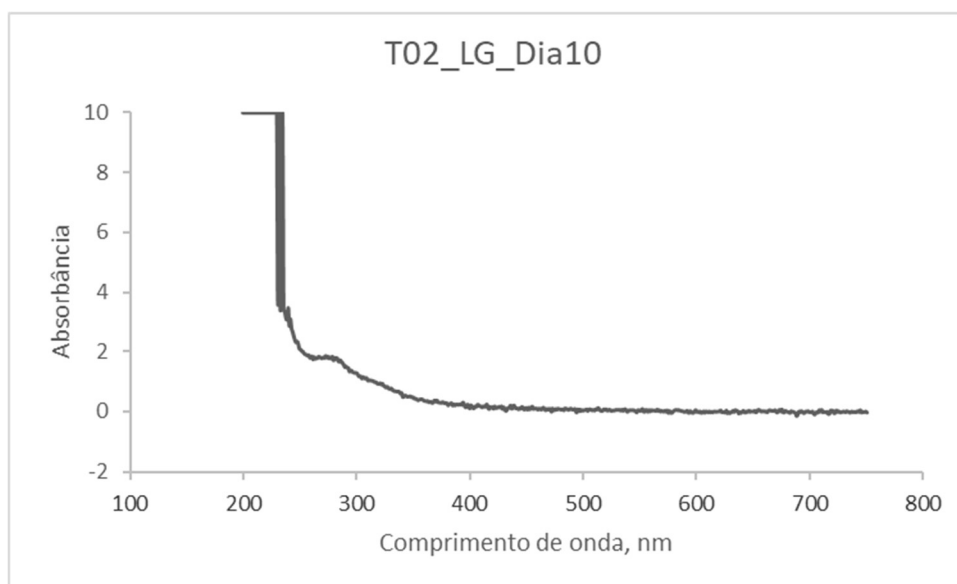


Figura 28 – Espectro na região do UV-Vis para o T03_Lignina_Dia 10

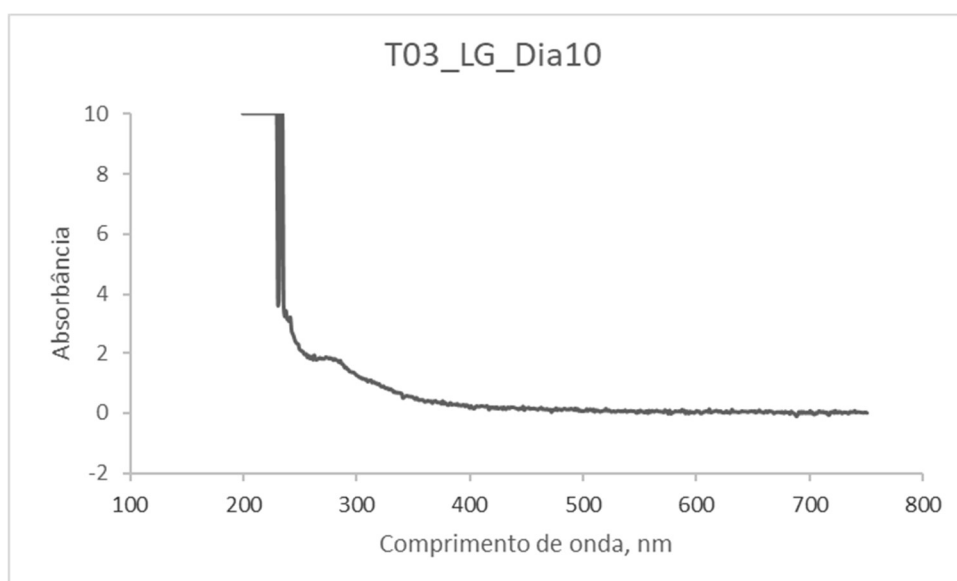


Figura 29 – Espectro na região do UV-Vis para o T04_Lignina_Dia 10

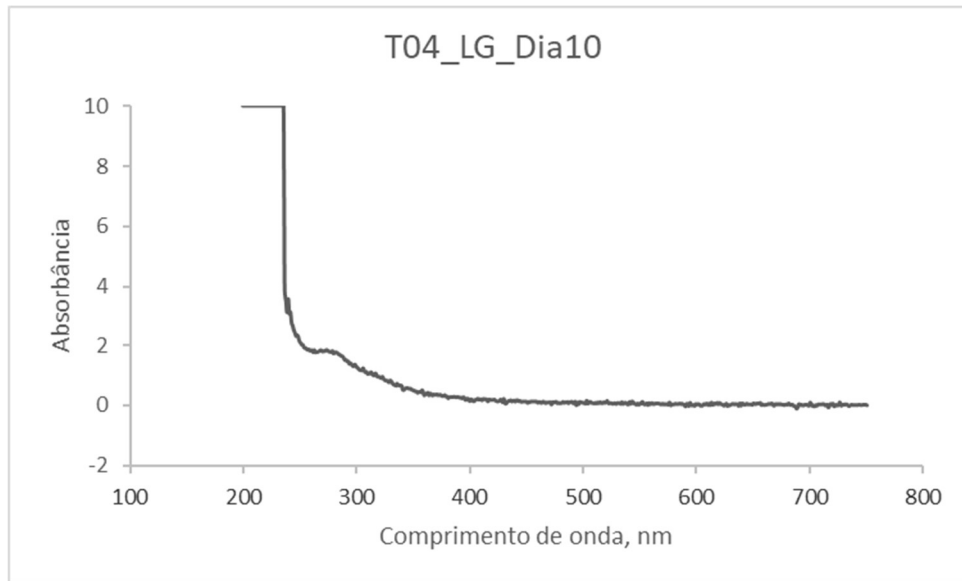


Figura 30 – Espectro na região do UV-Vis para o T05_Lignina_Dia10

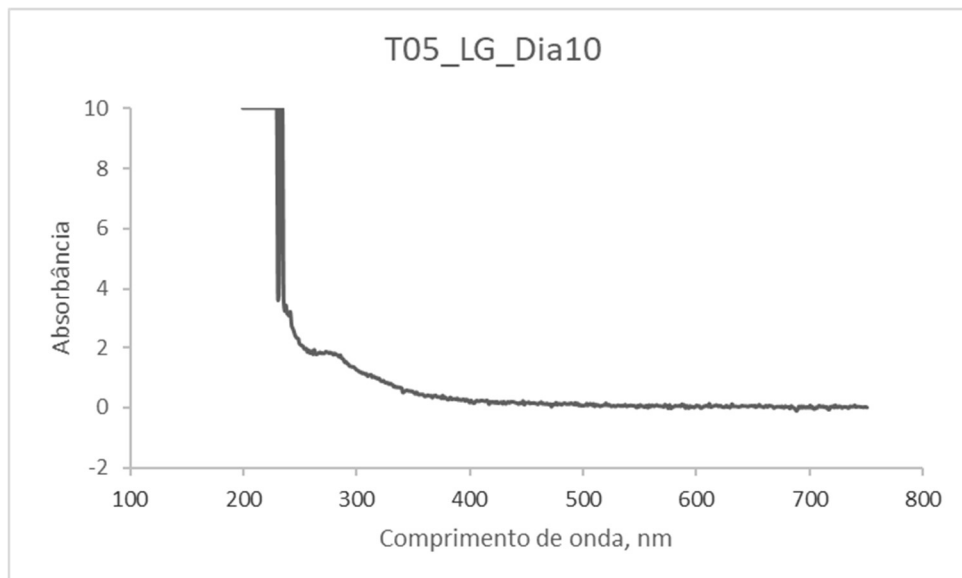


Figura 31 – Espectro na região do UV-Vis para o Controle_Bagaço de cana Dia 05

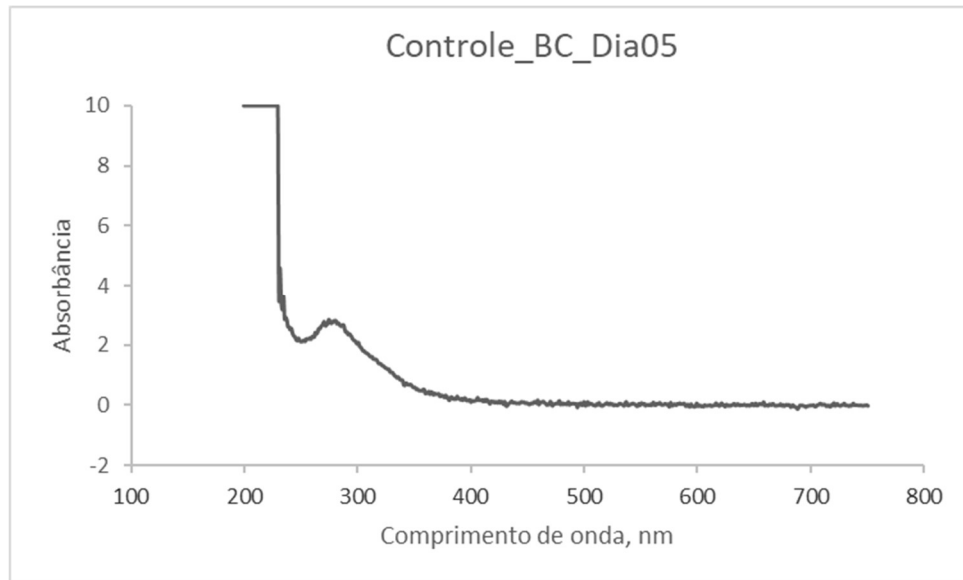


Figura 32 – Espectro na região do UV-Vis para o T01_Bagaço de cana Dia 05

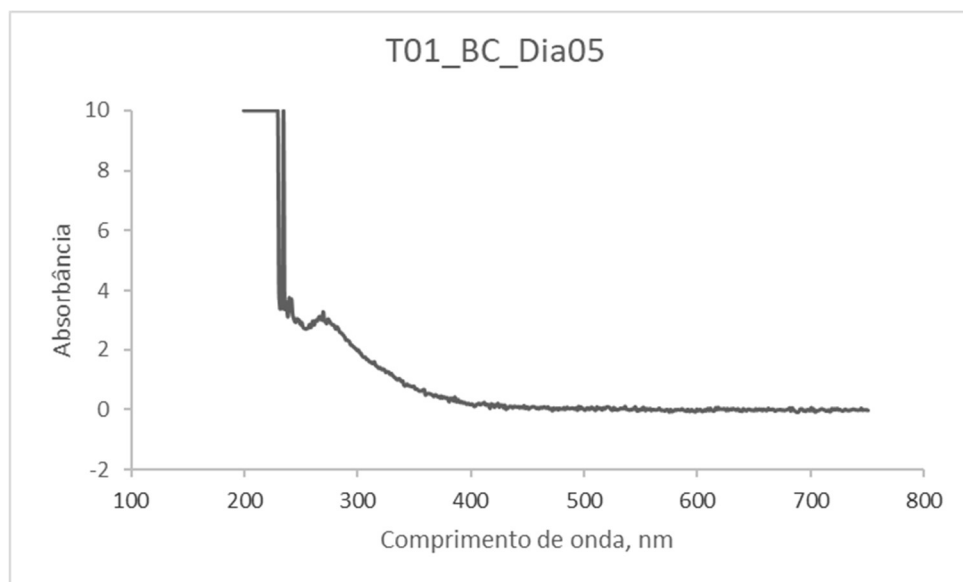


Figura 33 – Espectro na região do UV-Vis para o T02_Bagaço de cana Dia 05

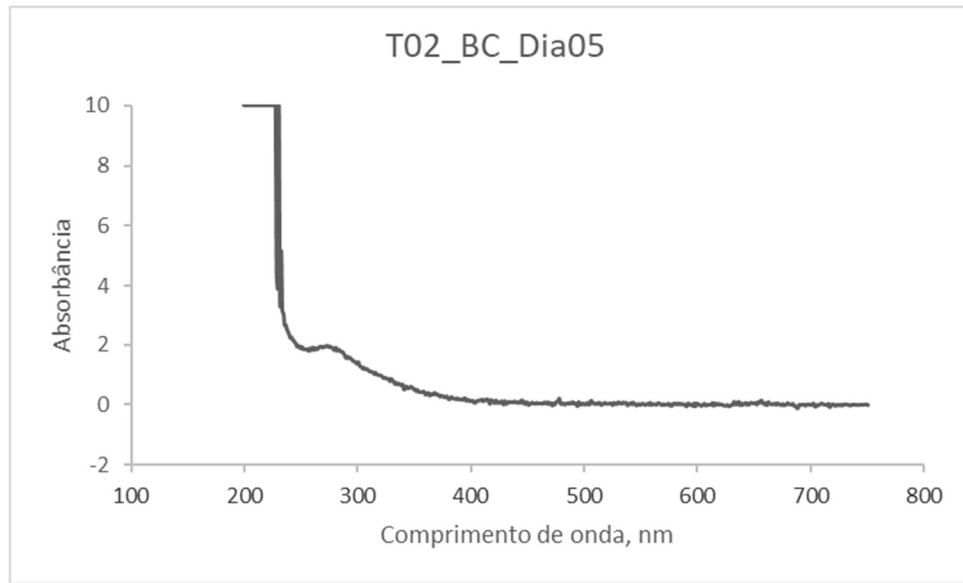


Figura 34 – Espectro na região do UV-Vis para o T03_Bagaço de cana Dia 05

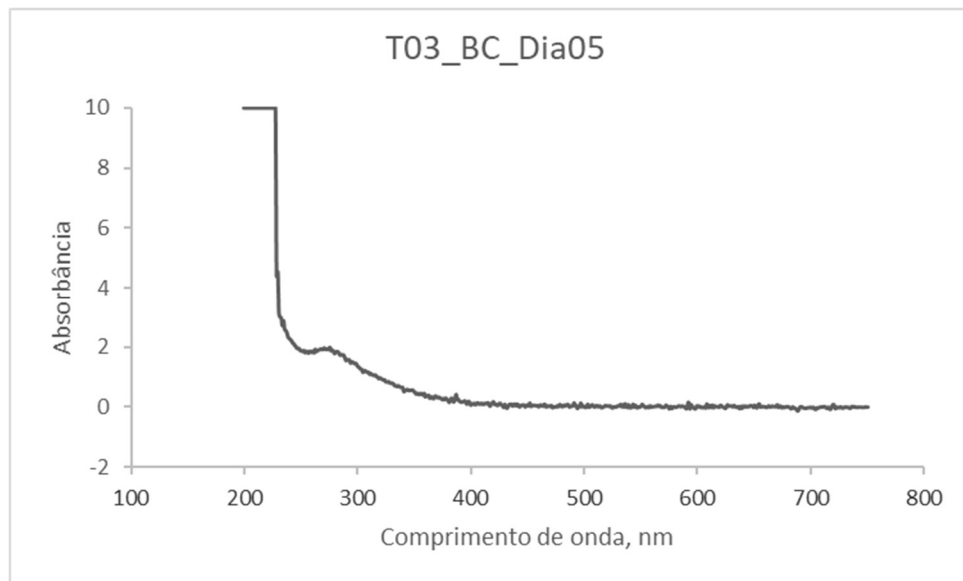


Figura 35 – Espectro na região do UV-Vis para o T04_Bagaço de cana Dia 05

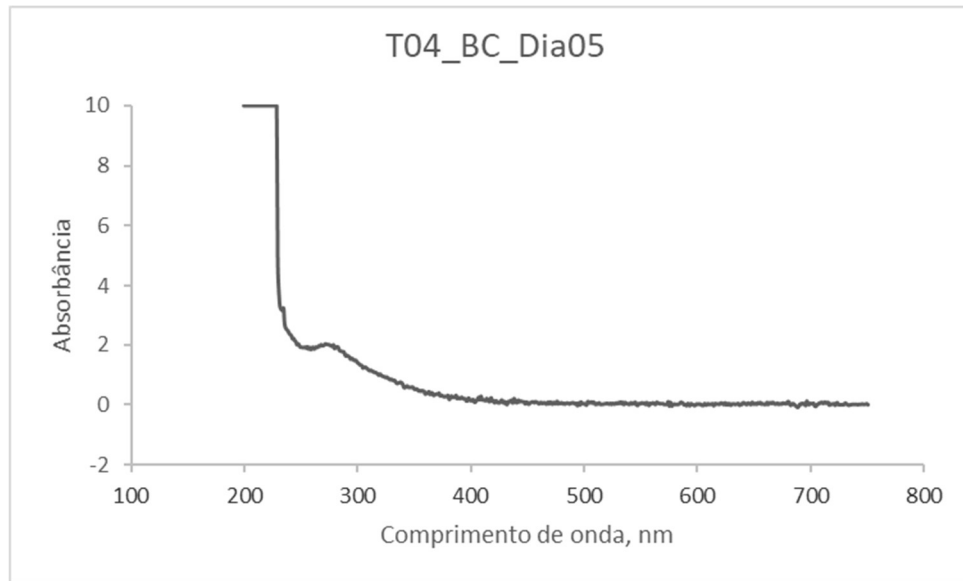


Figura 36 – Espectro na região do UV-Vis para o T05_Bagaço de cana Dia 05

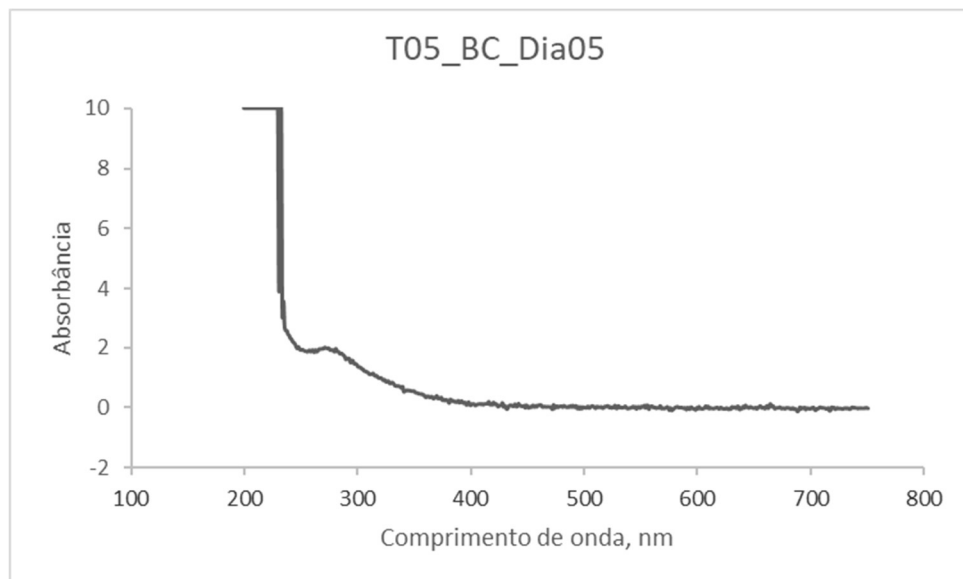


Figura 37 – Espectro na região do UV-Vis para o Controle_Bagaço de cana Dia 07

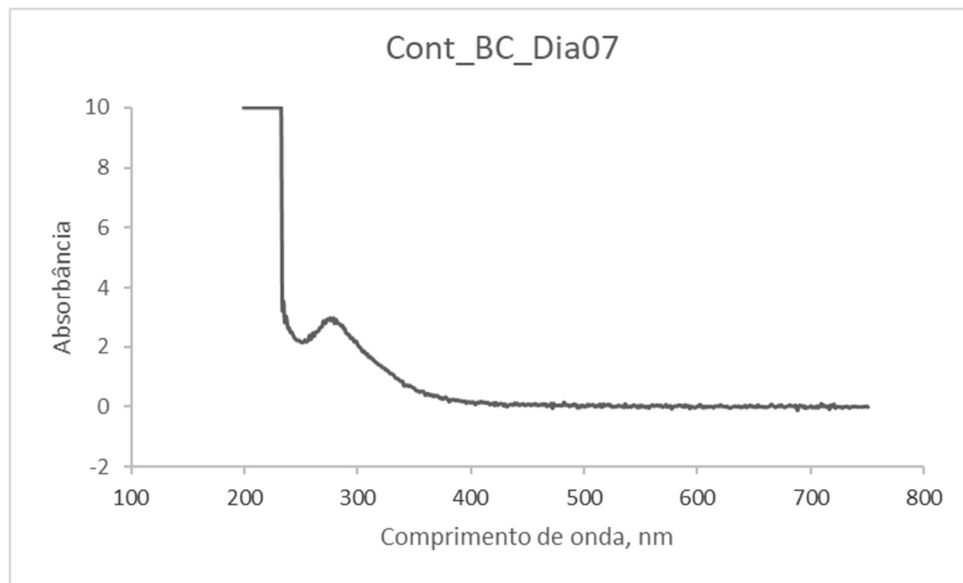


Figura 38 – Espectro na região do UV-Vis para o T01_Bagaço de cana Dia 07

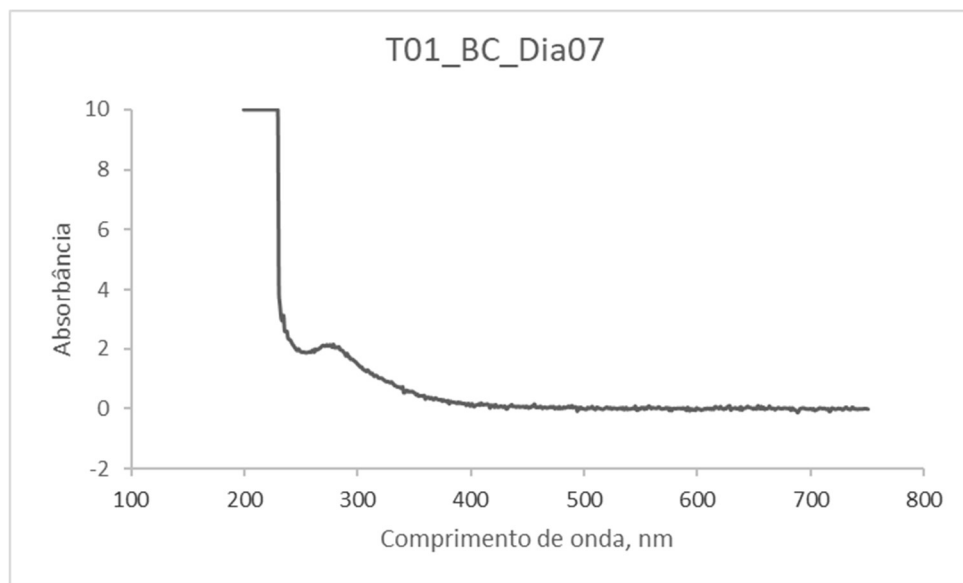


Figura 39 – Espectro na região do UV-Vis para o T02_Bagaço de cana Dia 07

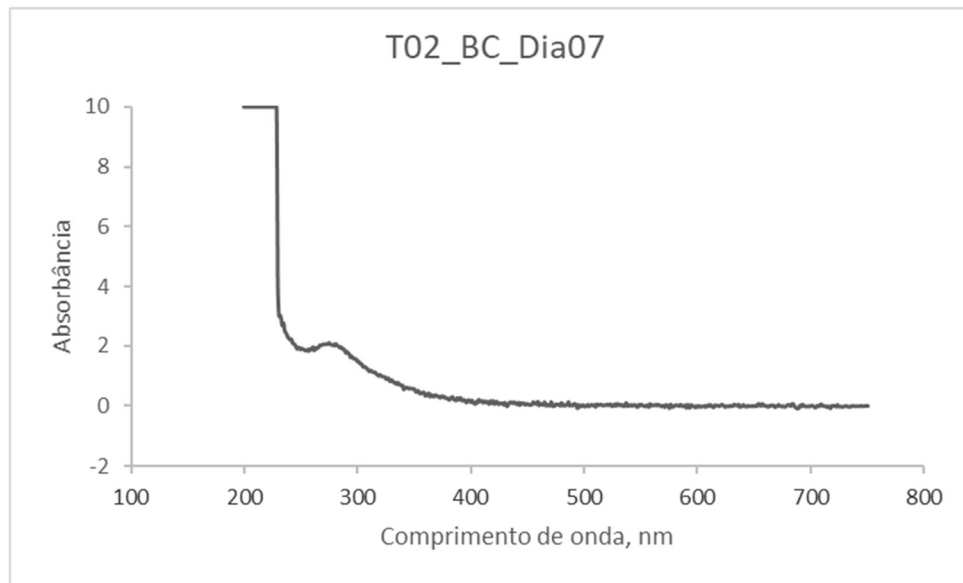


Figura 40 – Espectro na região do UV-Vis para o T03_Bagaço de cana Dia 07

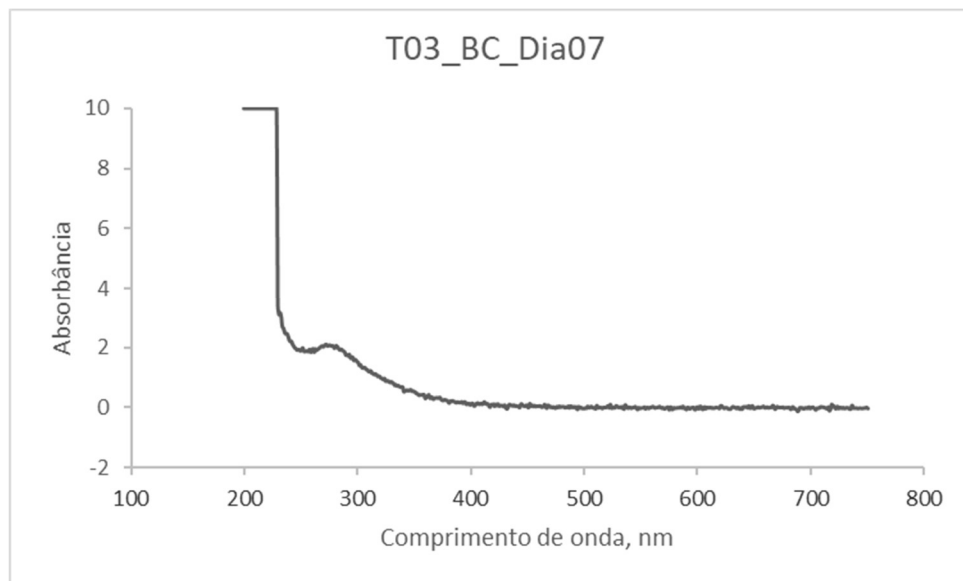


Figura 41 – Espectro na região do UV-Vis para o T04_Bagaço de cana Dia 07

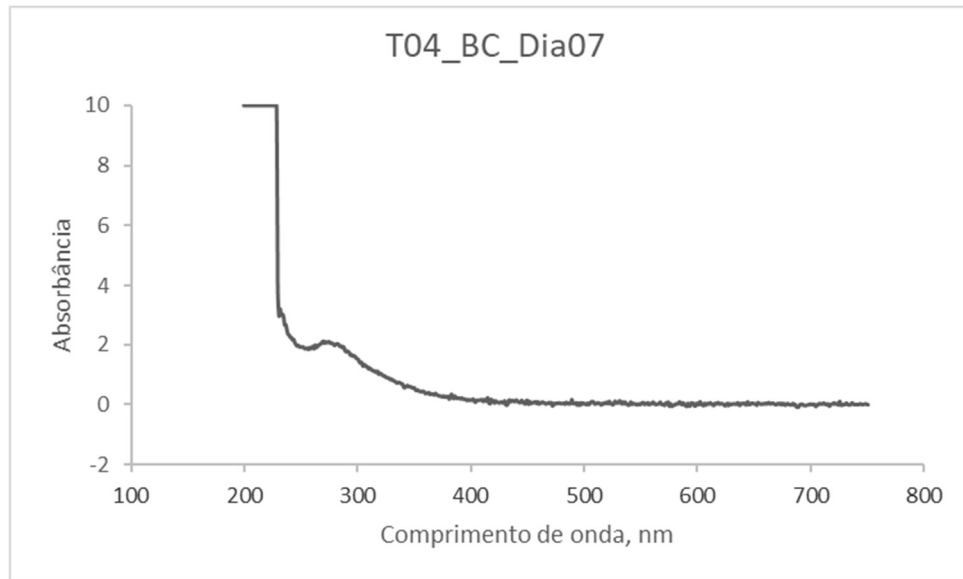


Figura 42 – Espectro na região do UV-Vis para o T05_Bagaço de cana Dia 07

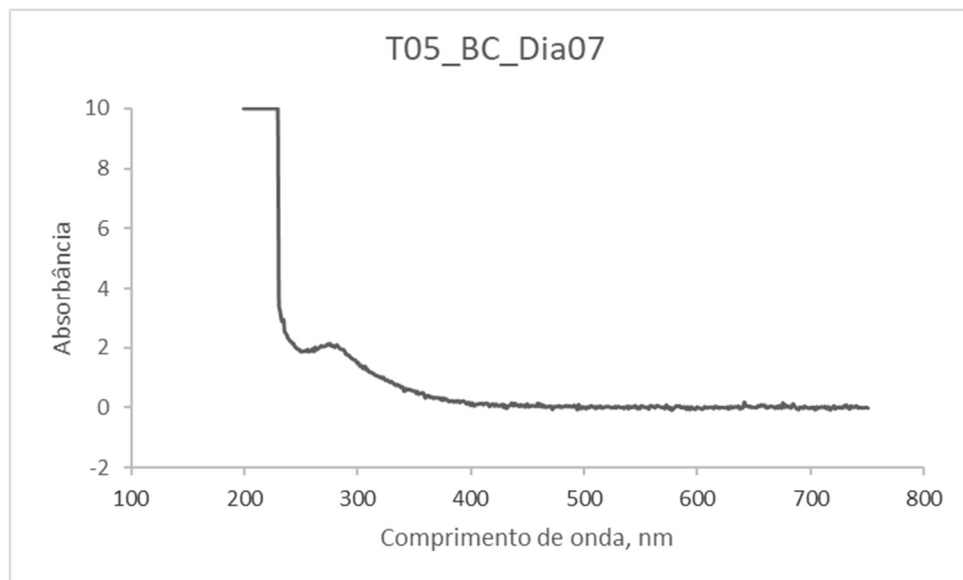


Figura 43 – Espectro na região do UV-Vis para o Controle_Bagaço de cana Dia 10

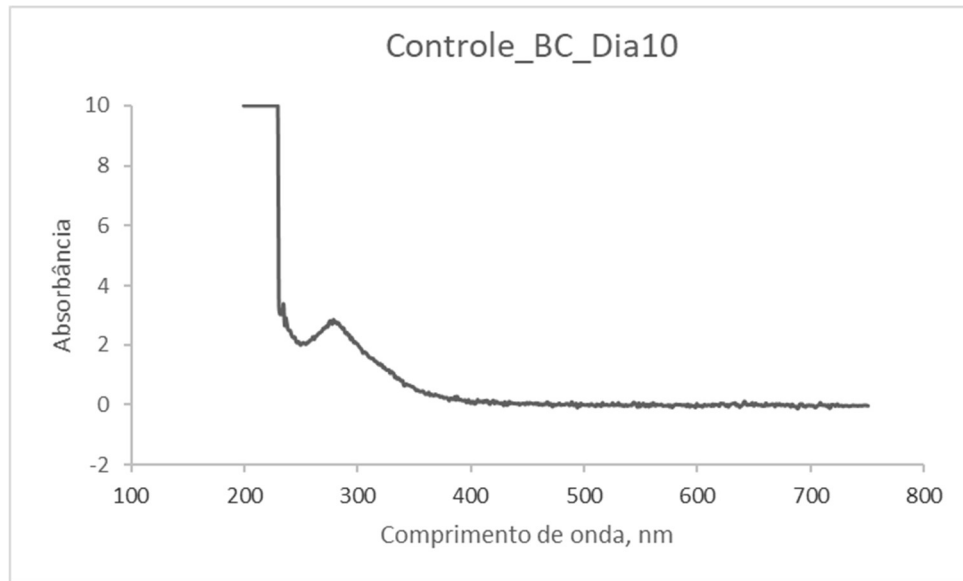


Figura 44 – Espectro na região do UV-Vis para o T01_Bagaço de cana Dia 10

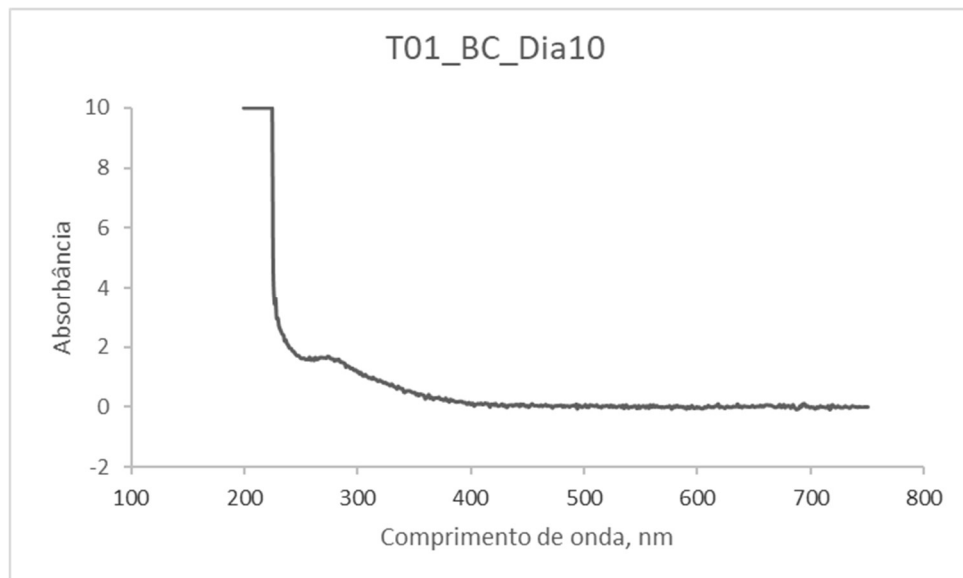


Figura 45 – Espectro na região do UV-Vis para o T02_Bagaço de cana Dia 10

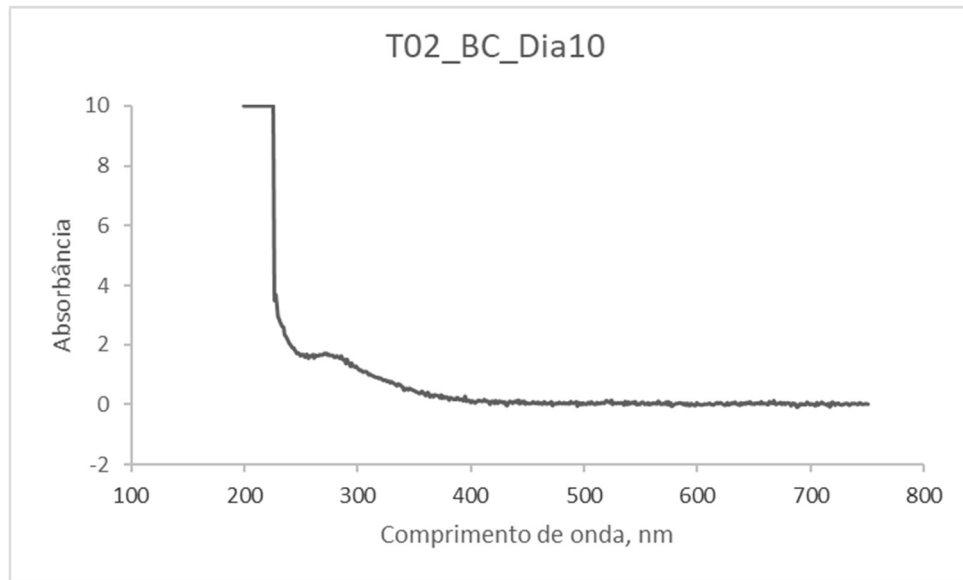


Figura 46 – Espectro na região do UV-Vis para o T03_Bagaço de cana Dia 10

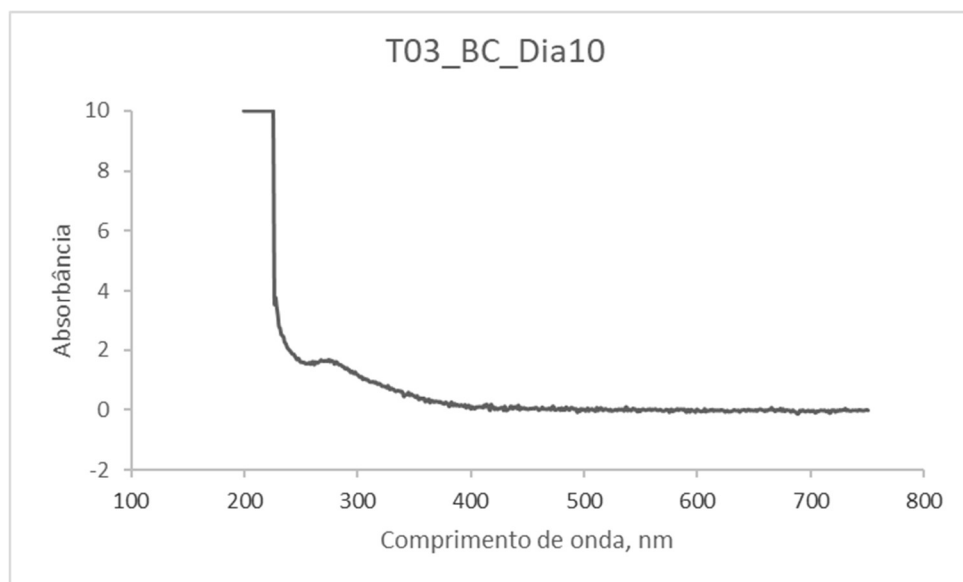


Figura 47 – Espectro na região do UV-Vis para o T04_Bagaço de cana Dia 10

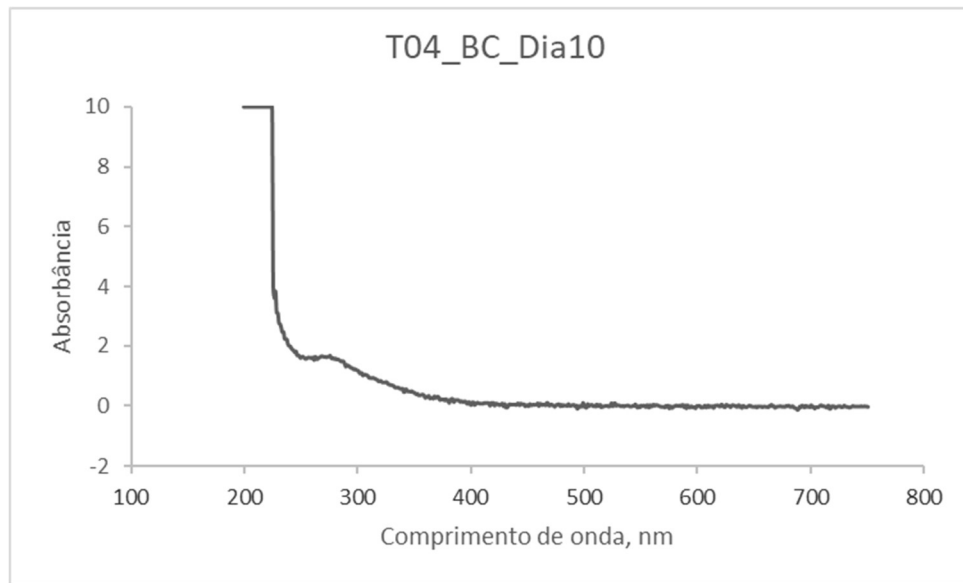
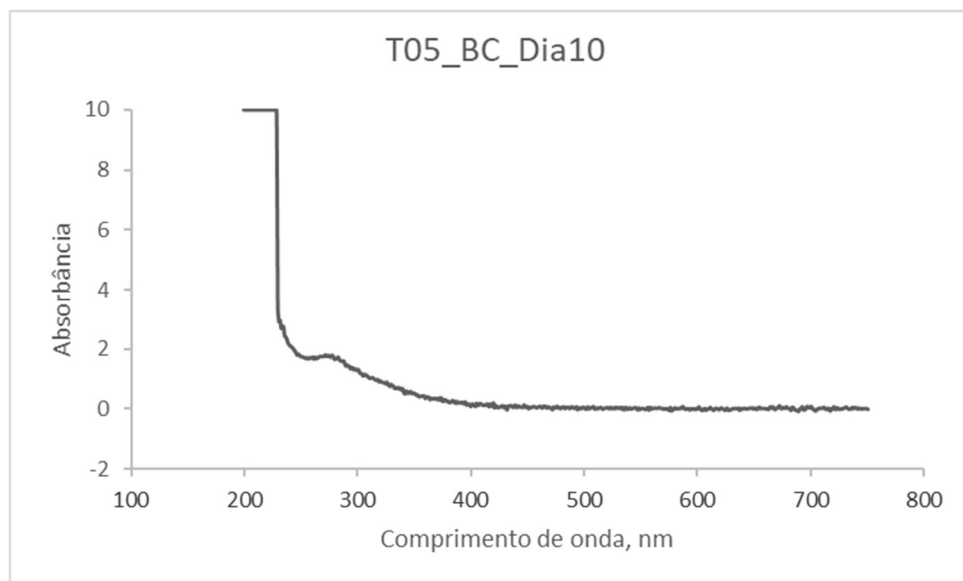


Figura 48 – Espectro na região do UV-Vis para o T05_Bagaço de cana Dia 10



ANEXO B - Cromatogramas HPLC

Figura 49 – Cromatograma (HPLC) do Ácido Vanílico

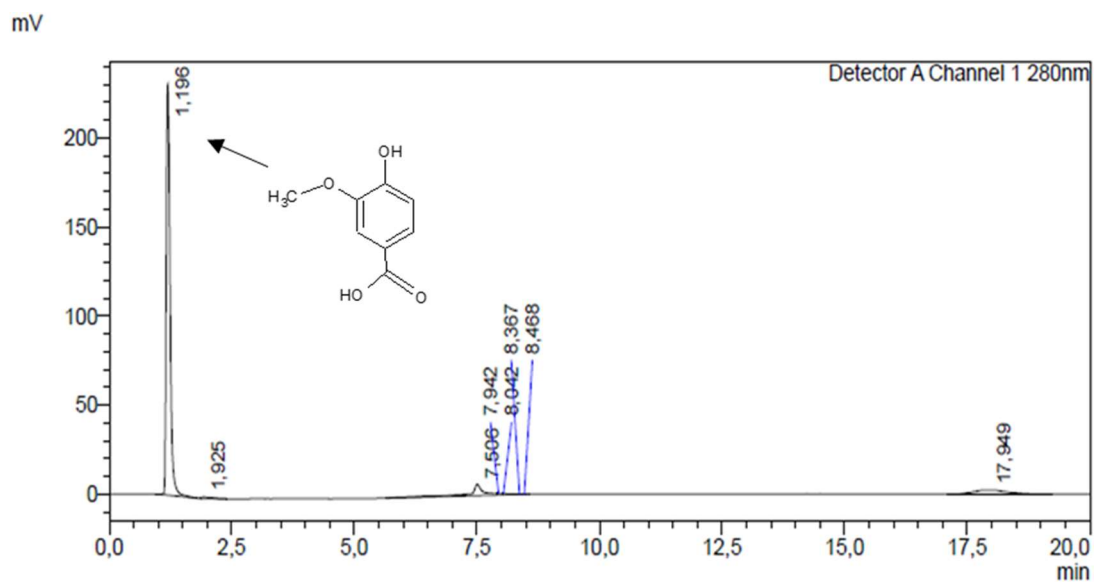


Figura 50 – Cromatograma (HPLC) do Ácido Siringico

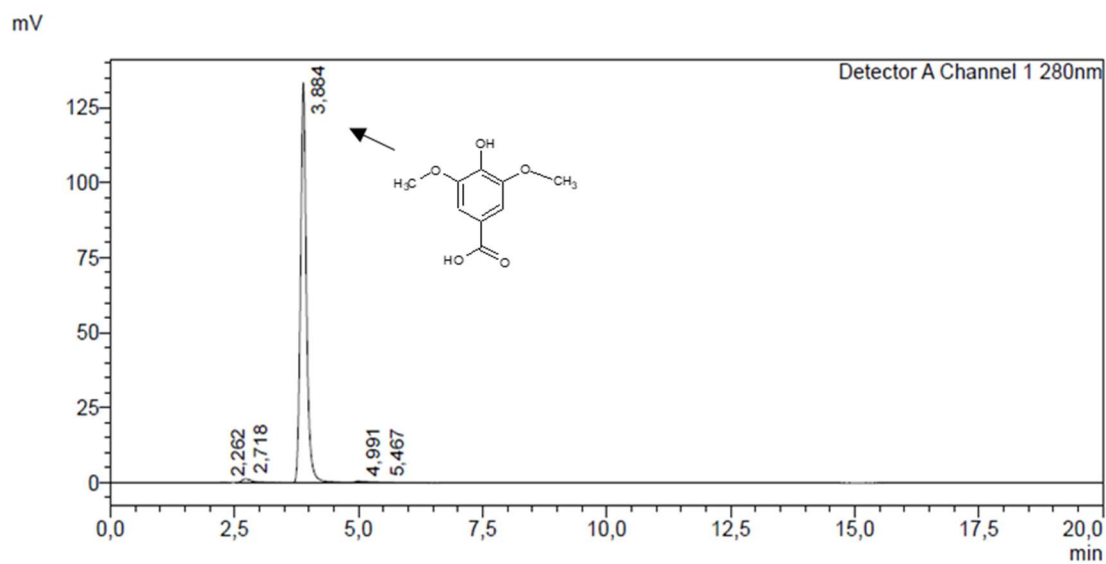


Figura 51 – Cromatograma (HPLC) do 3-metil-1,2-ciclopentenodiona

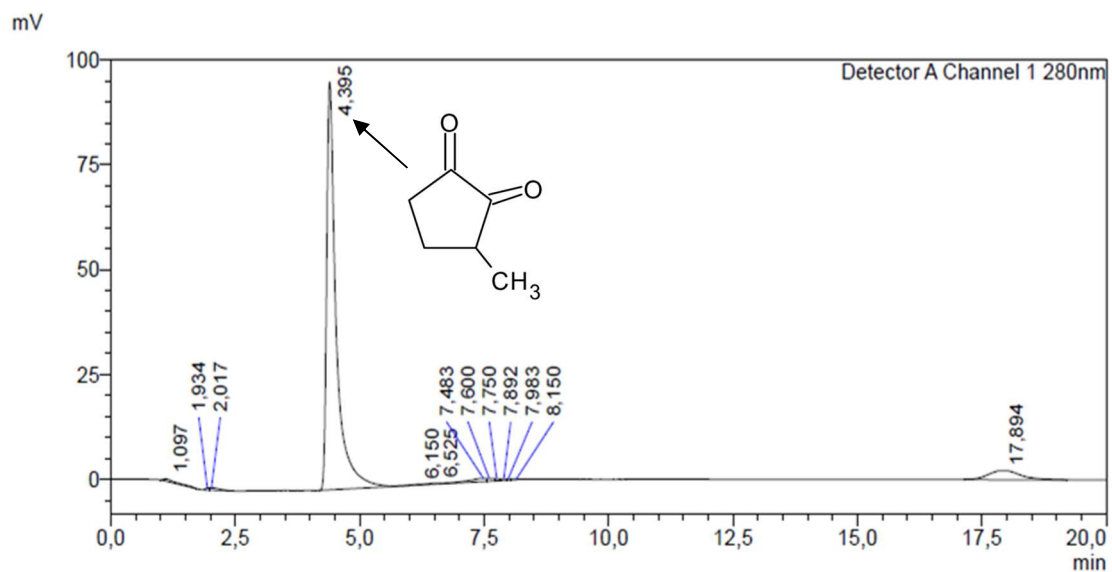


Figura 52 – Cromatograma (HPLC) do 2,6-Dimetoxifenol

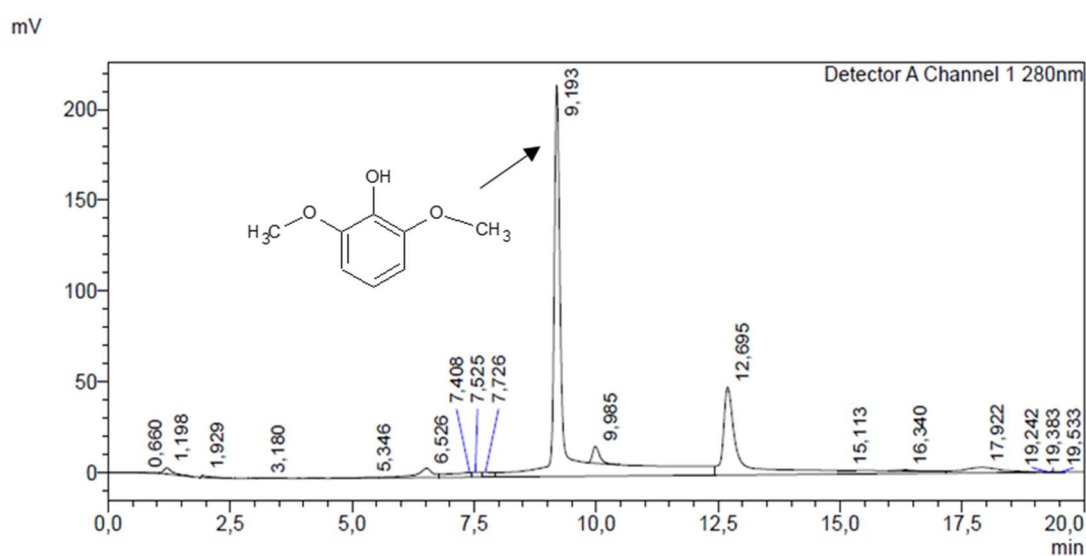


Figura 53 – Cromatograma (HPLC) do Guaiacol

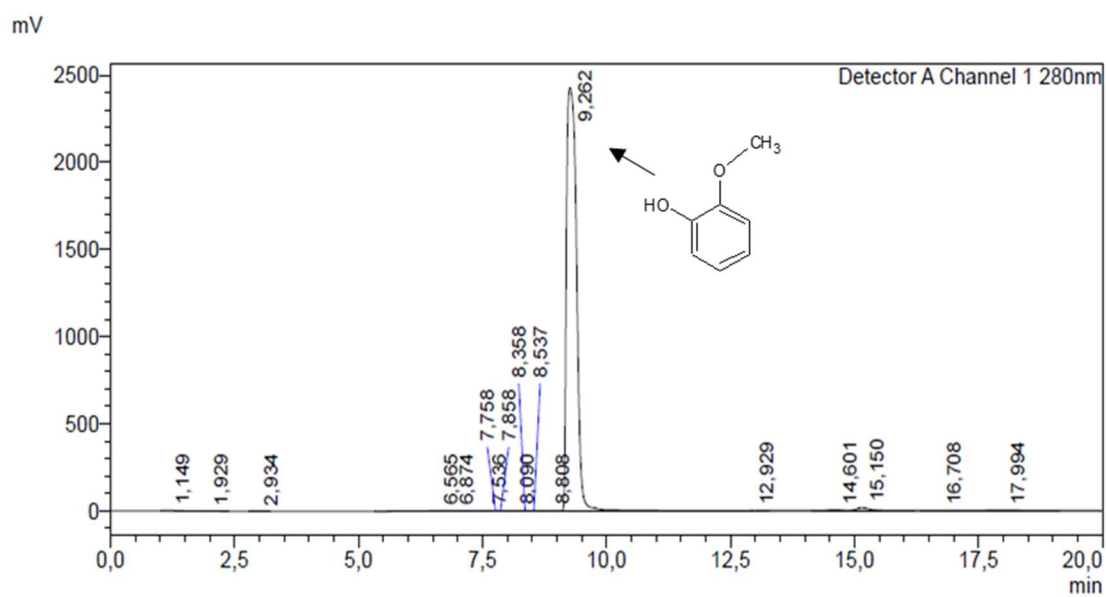


Figura 54 – Cromatograma (HPLC) do 1,2,3-Trimetoxibenzeno

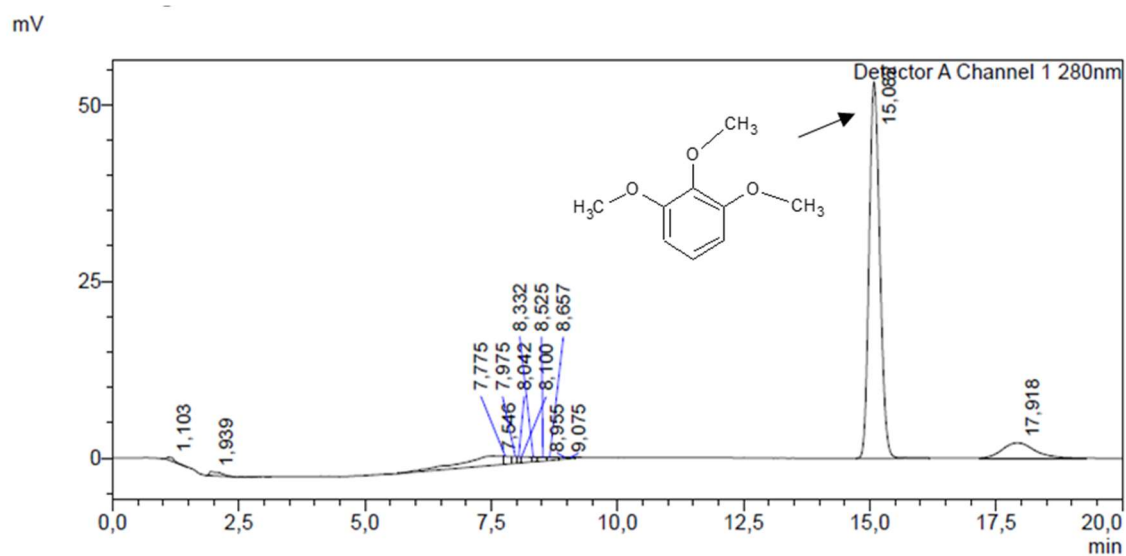


Figura 55 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Lignina coletado no Dia 5

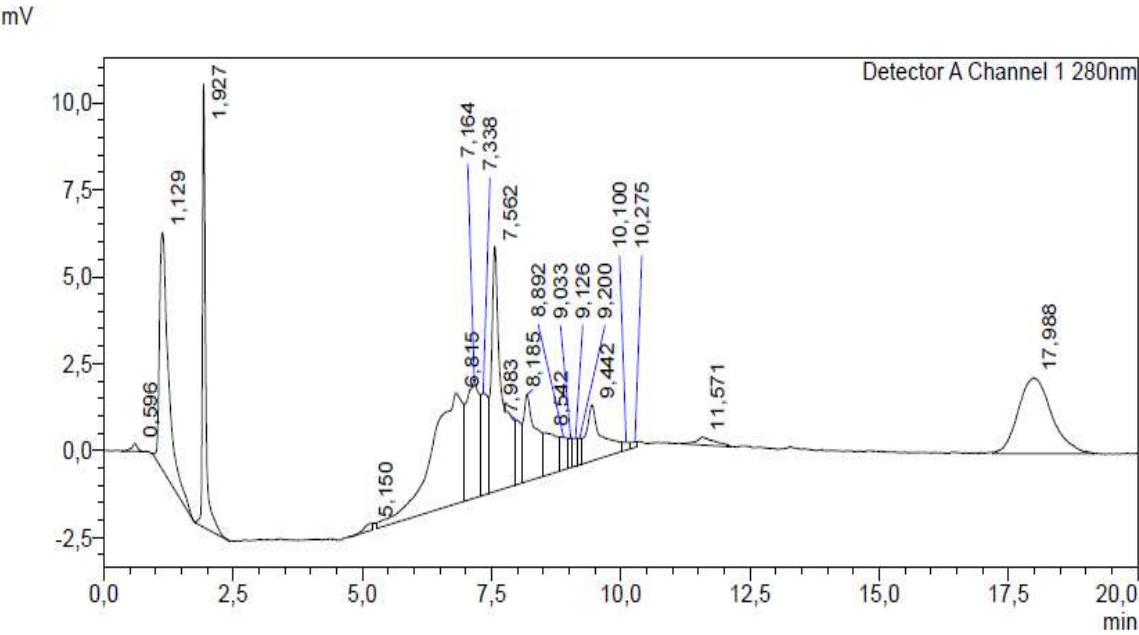


Figura 56 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Lignina coletado no Dia 5

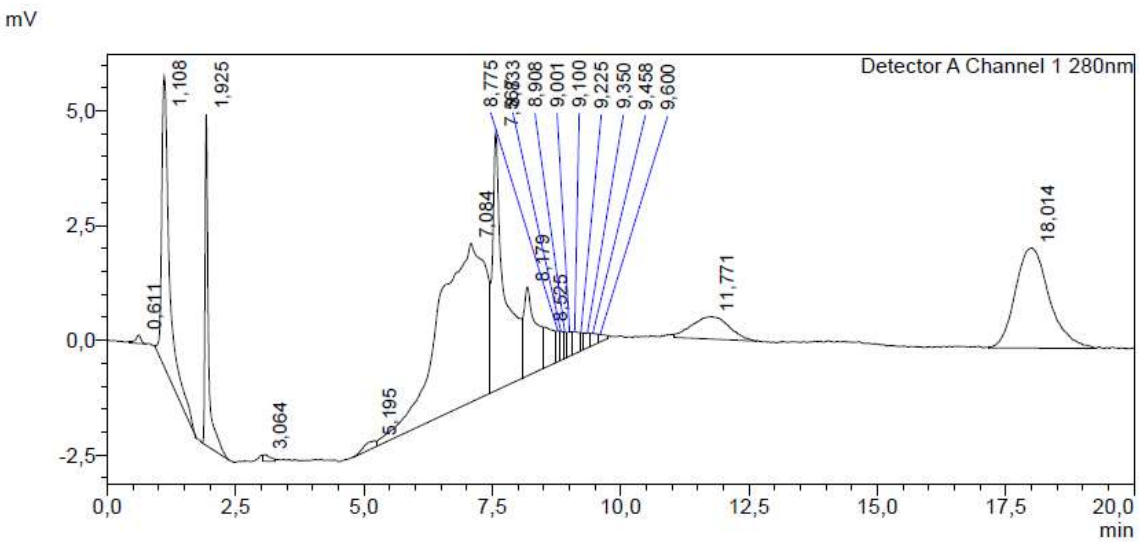


Figura 57 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Lignina coletado no Dia 5

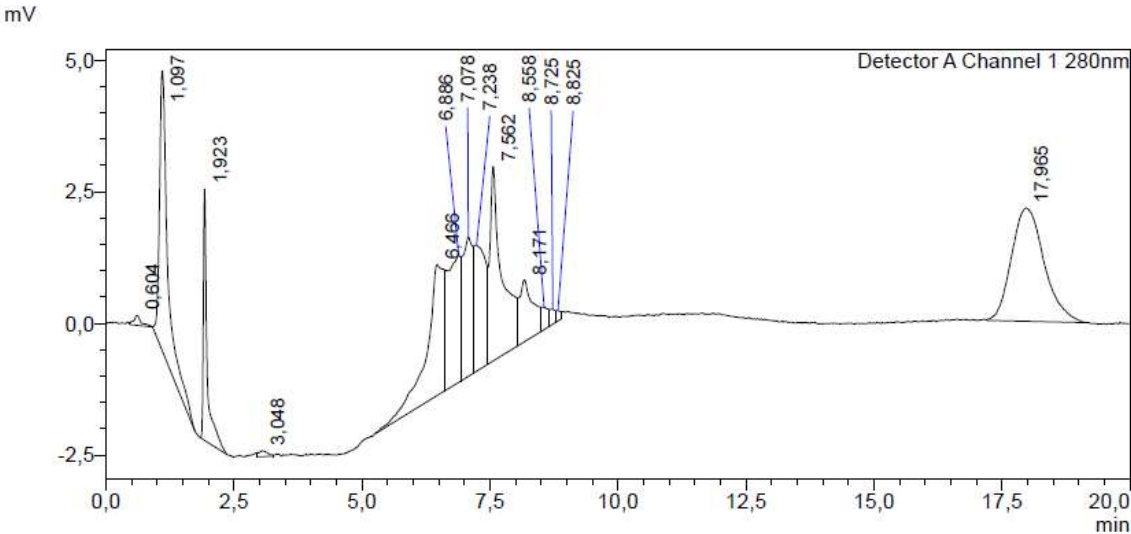


Figura 58 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Lignina coletado no Dia 5

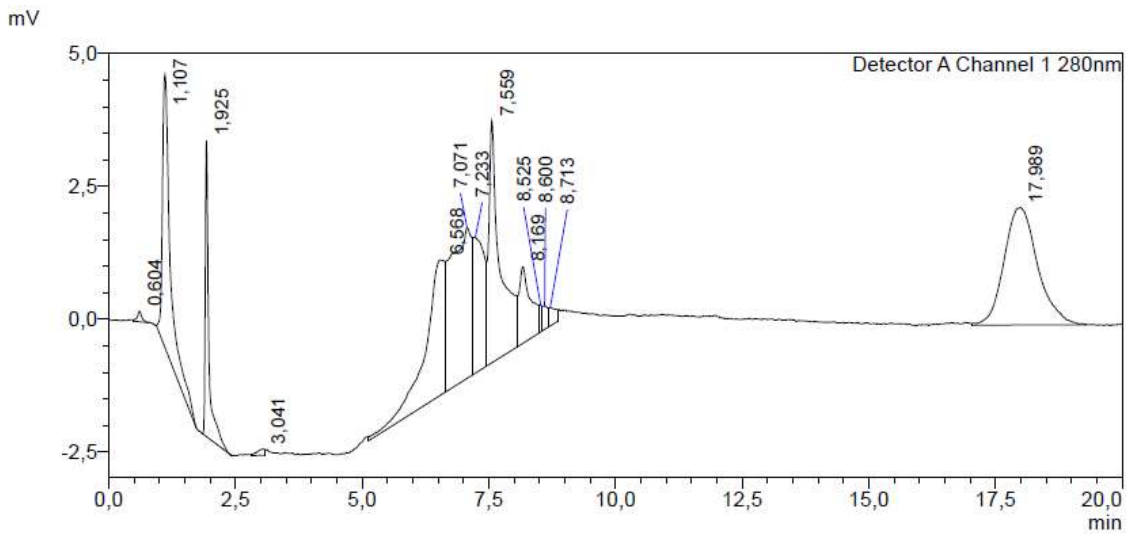


Figura 59 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Lignina coletado no Dia 5

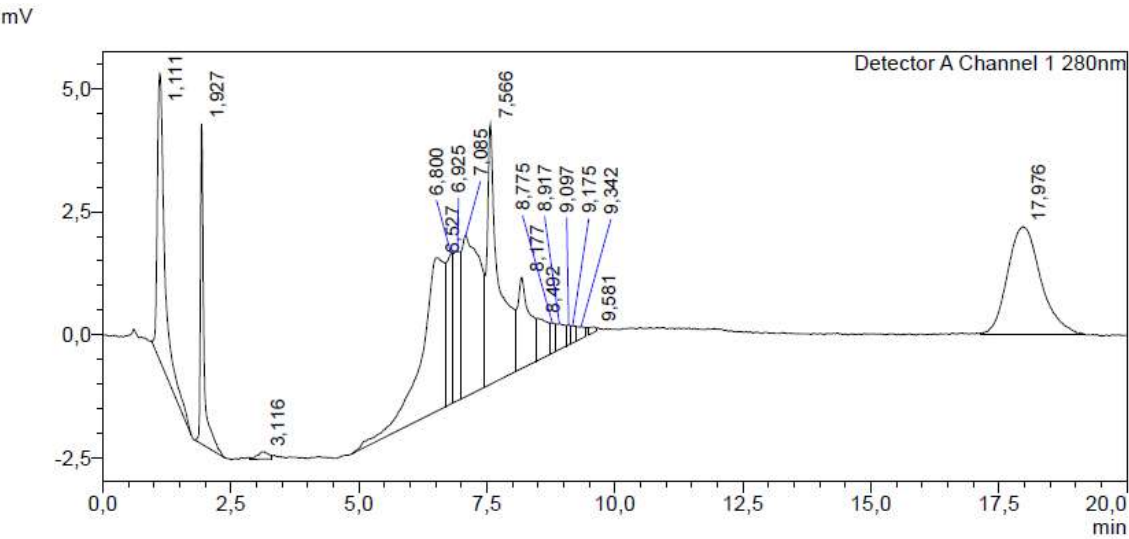


Figura 60 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Lignina coletado no Dia 5

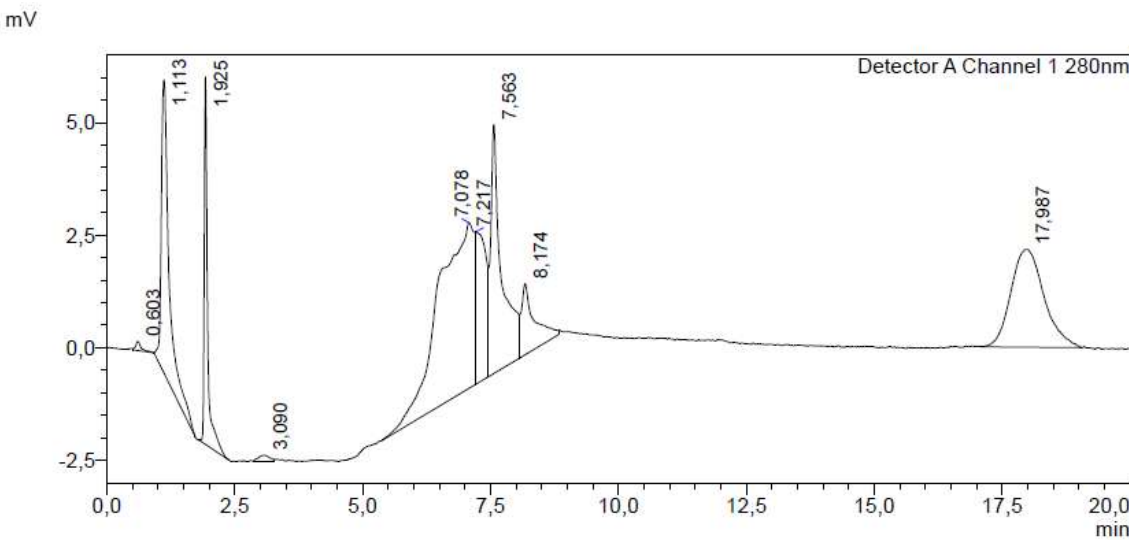


Figura 61 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Lignina coletado no Dia 7

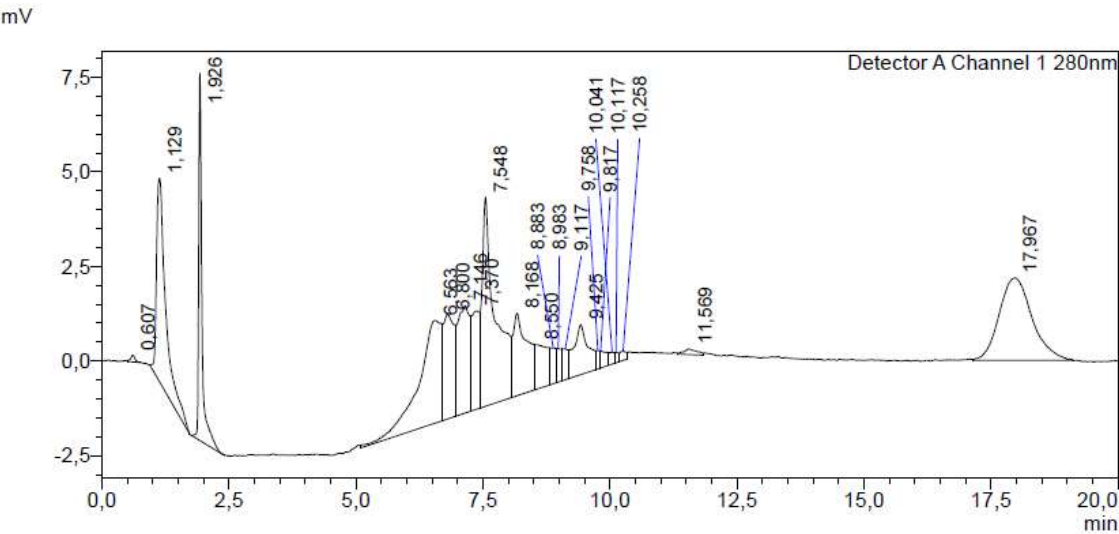


Figura 62 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Lignina coletado no Dia 7

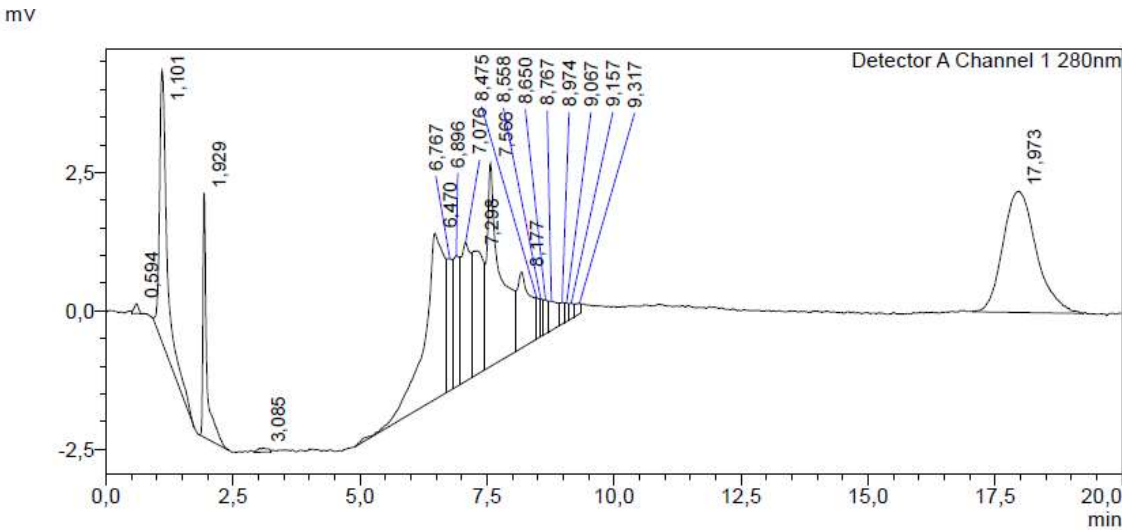


Figura 63 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Lignina coletado no Dia 7

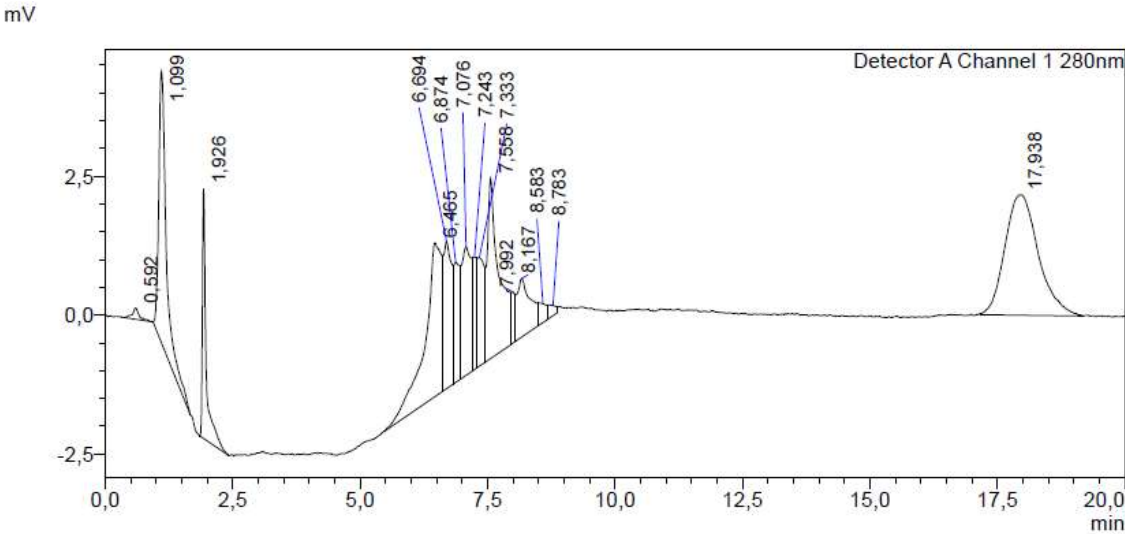


Figura 64 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Lignina coletado no Dia 7

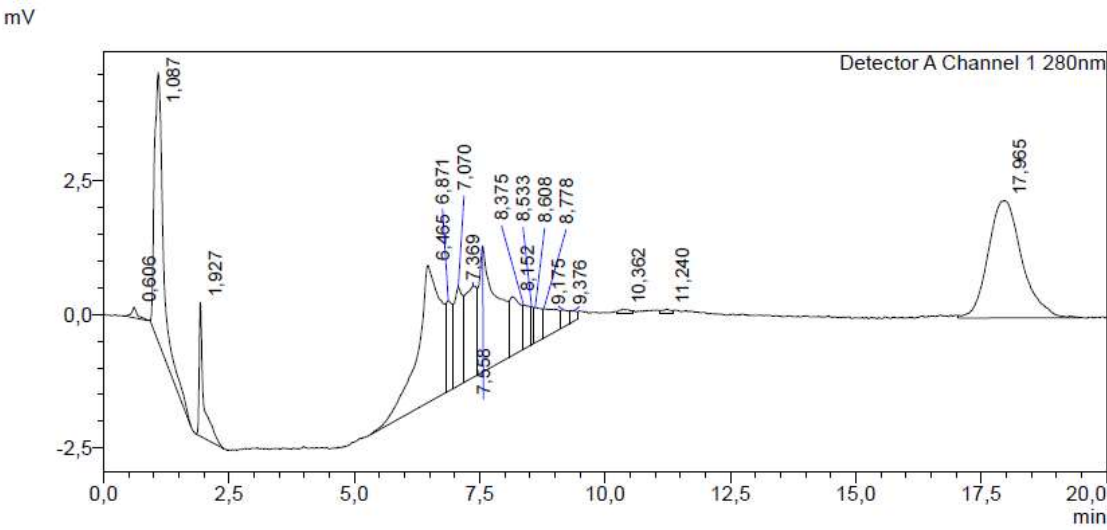


Figura 65 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Lignina coletado no Dia 7

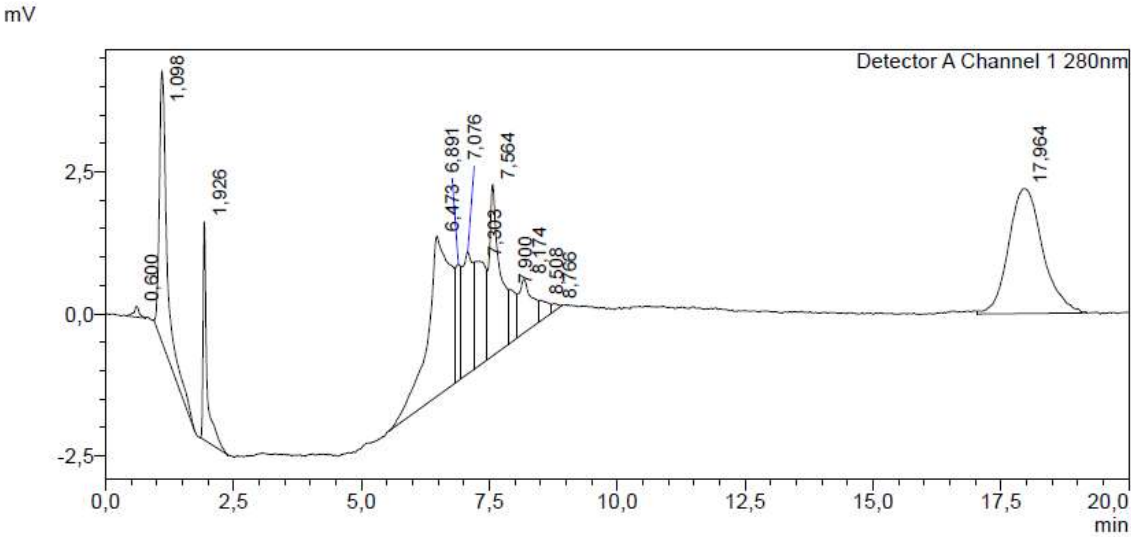


Figura 66 – Cromatograma (HPLC) da amostra cinco de Lignina coletado no Dia 7

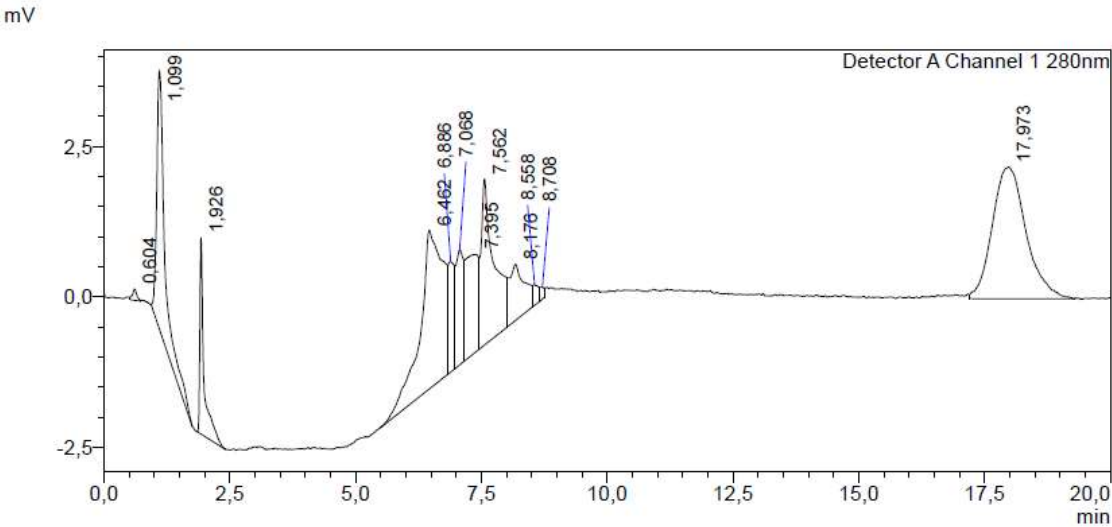


Figura 67 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Lignina coletado no Dia 10

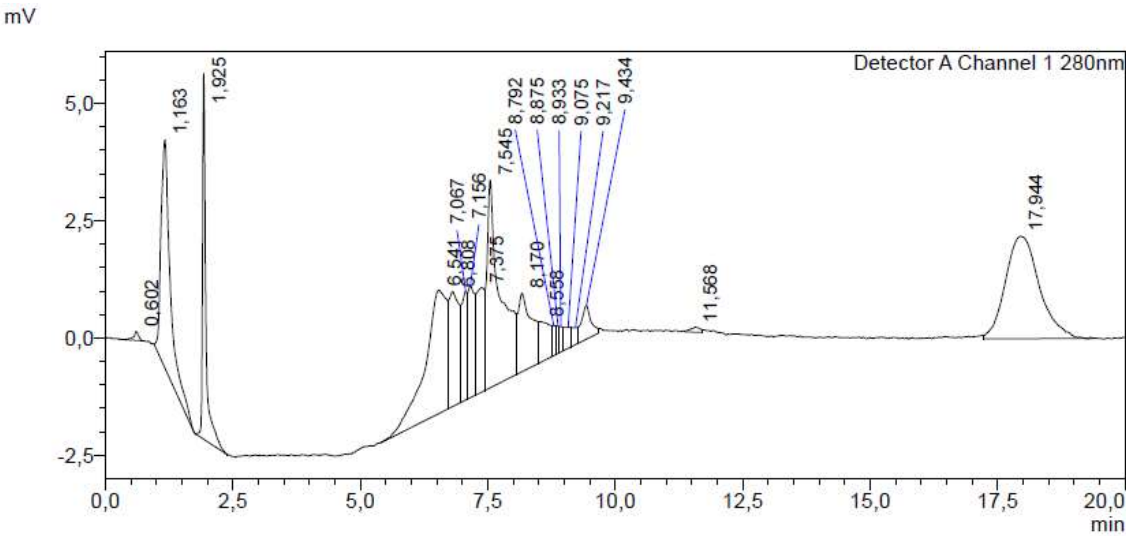


Figura 68 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Lignina coletado no Dia 10

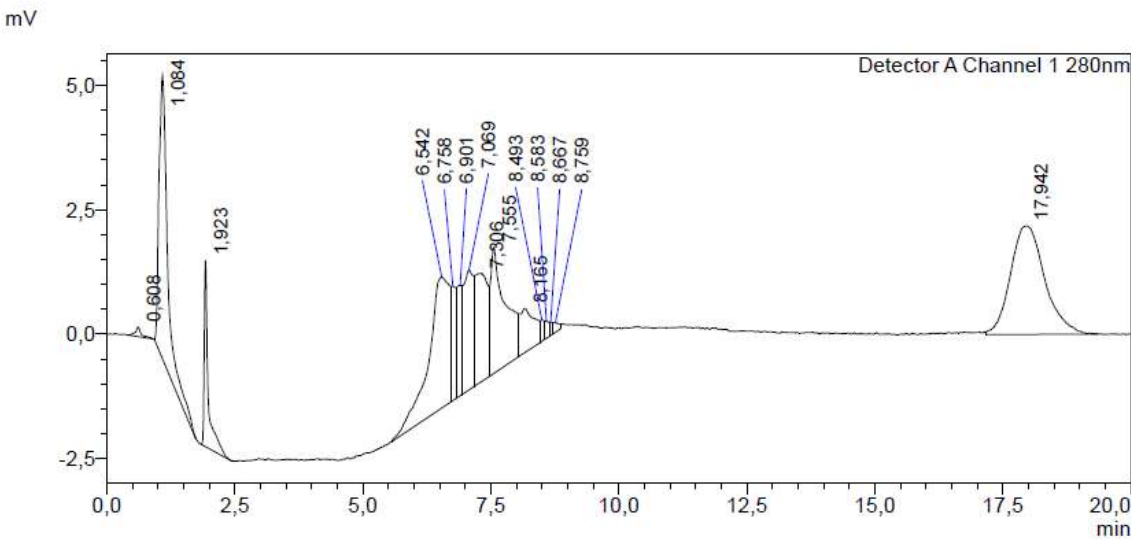


Figura 69 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Lignina coletado no Dia 10

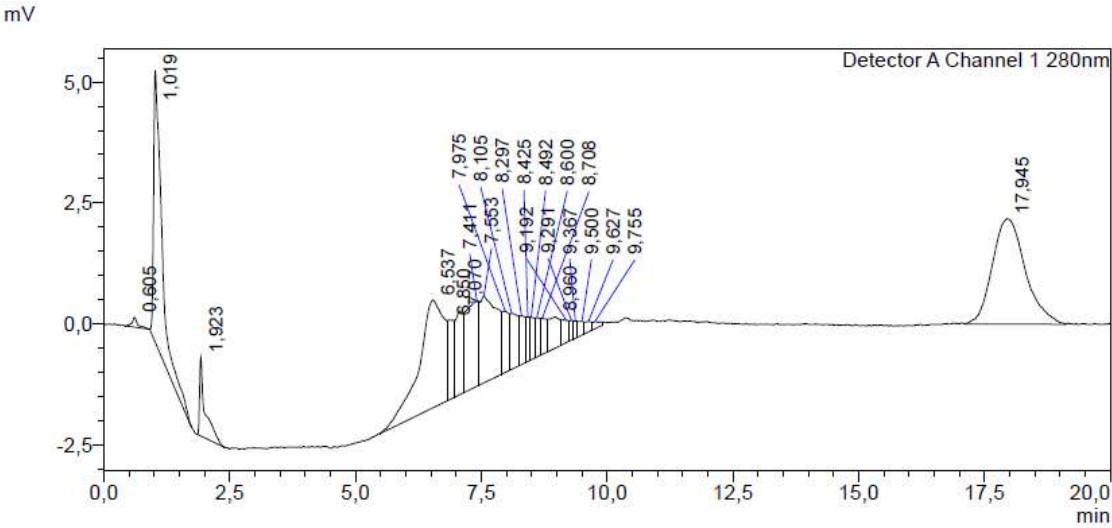


Figura 70 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Lignina coletado no Dia 10

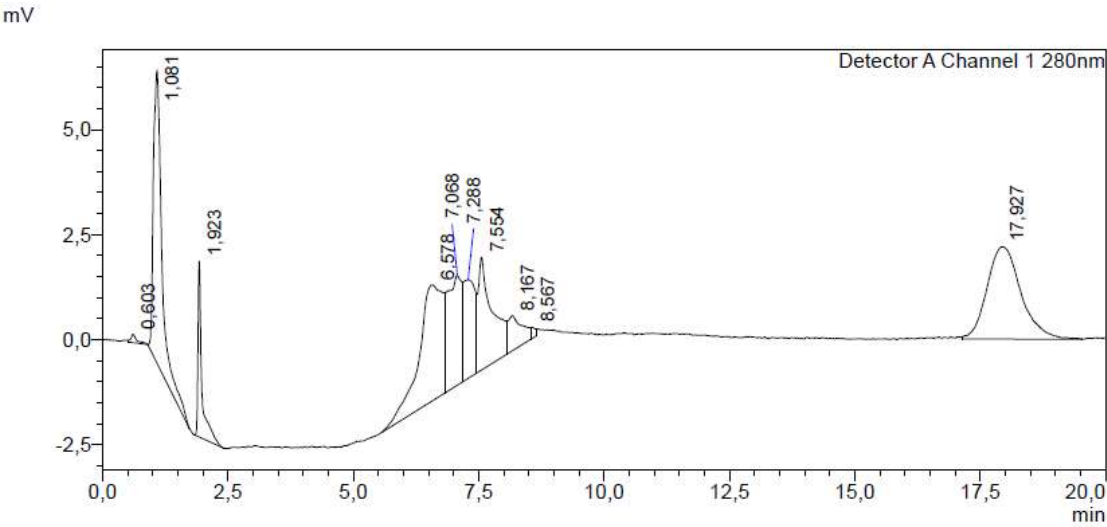


Figura 71 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Lignina coletado no Dia 10

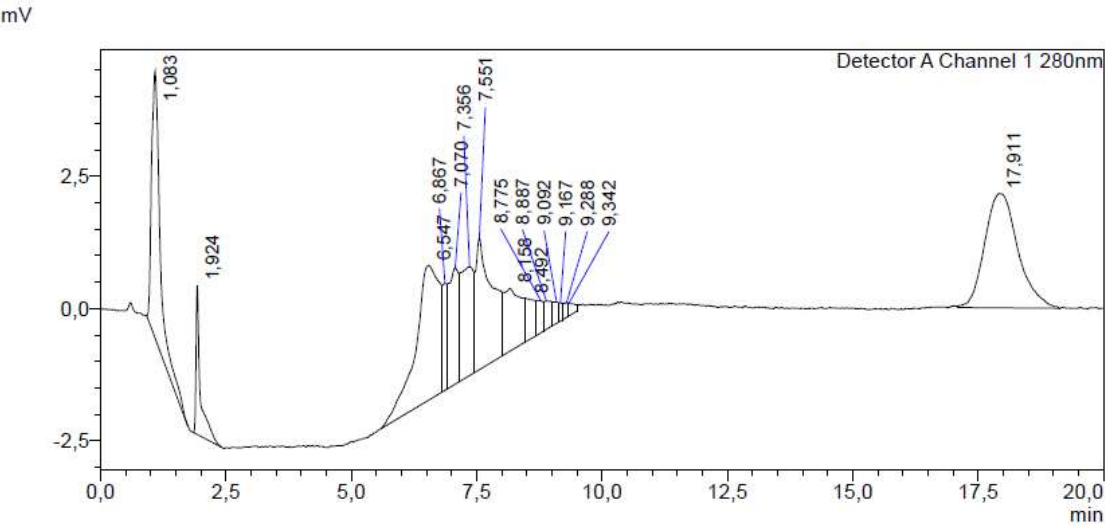


Figura 72 – Cromatograma (HPLC) da amostra cinco de Lignina coletado no Dia 10

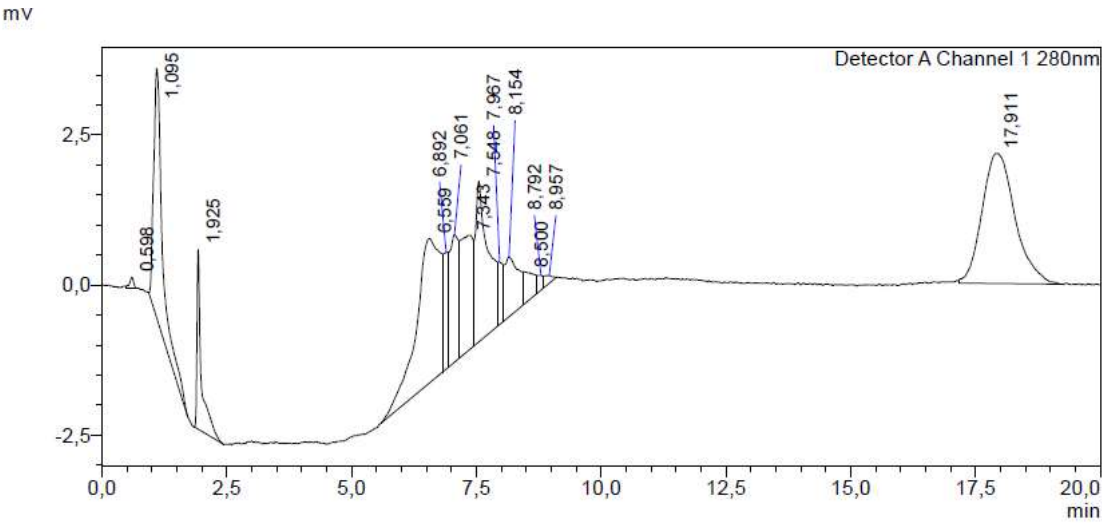


Figura 73 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Lignina coletado no Dia 14

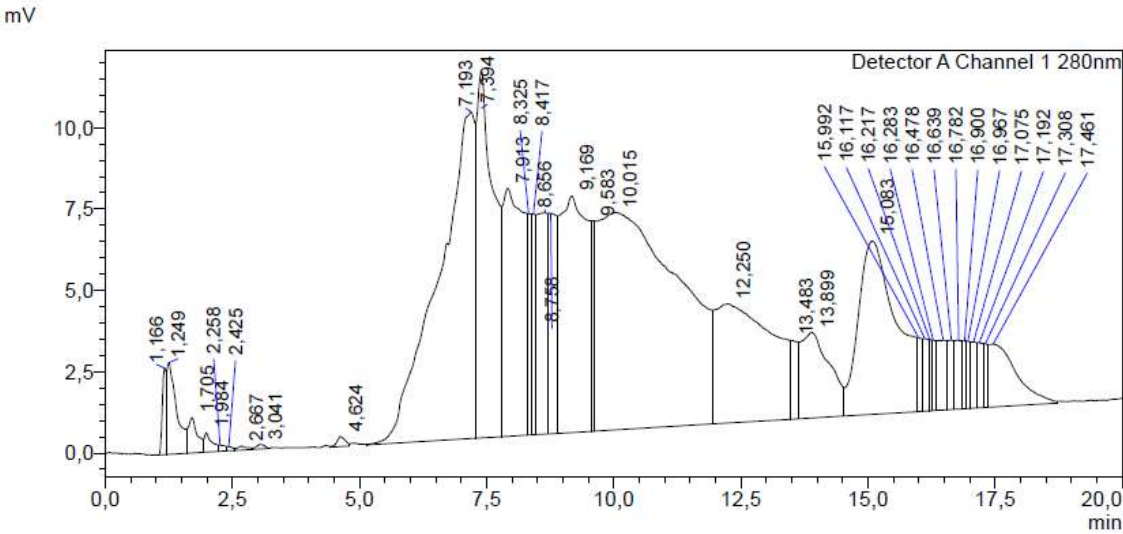


Figura 74 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Lignina coletado no Dia 14

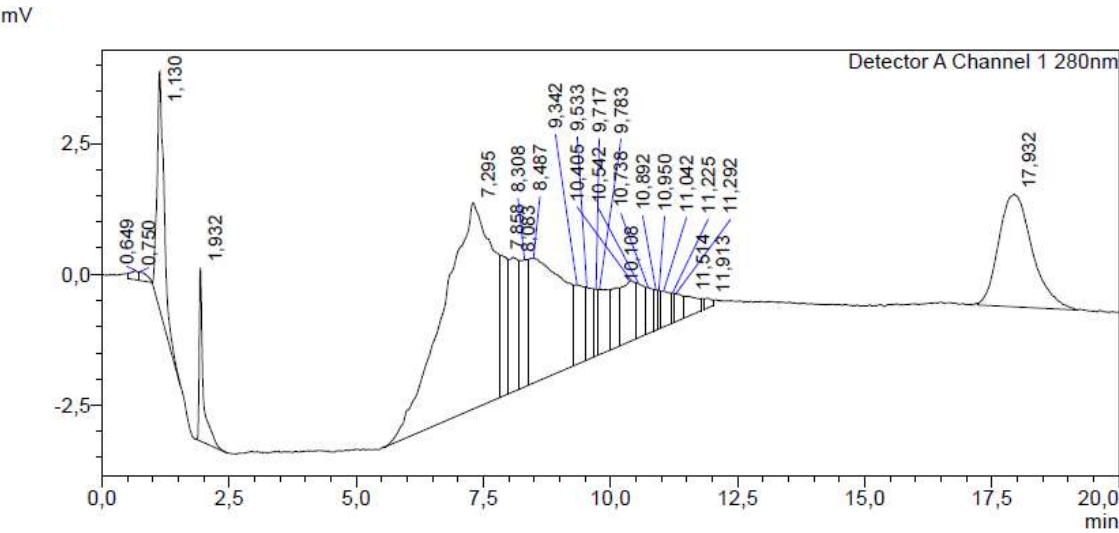


Figura 75 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Lignina coletado no Dia 14

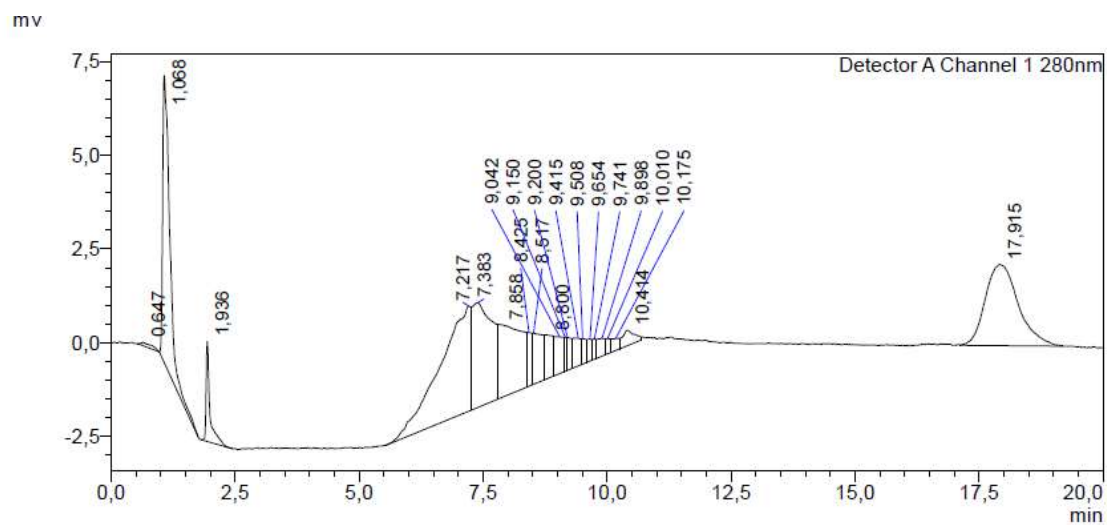


Figura 76 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Lignina coletado no Dia 14

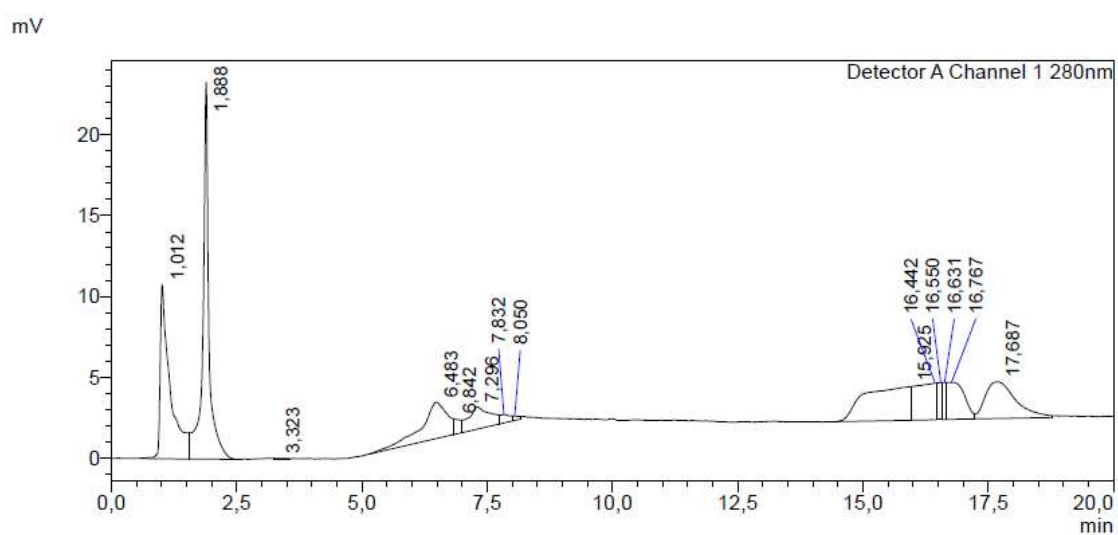


Figura 77 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Lignina coletado no Dia 14

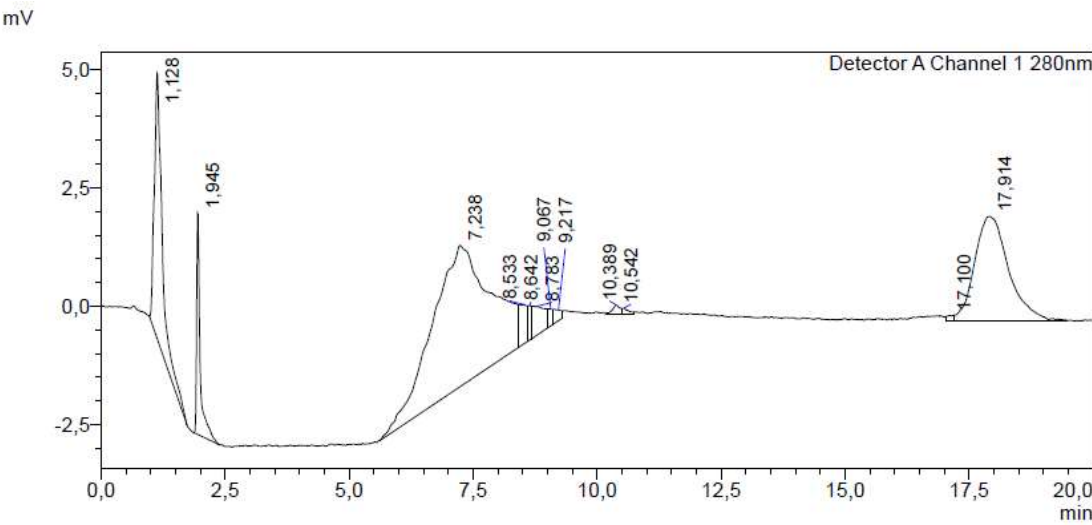


Figura 78 – Cromatograma (HPLC) da amostra cinco de Lignina coletado no Dia 14

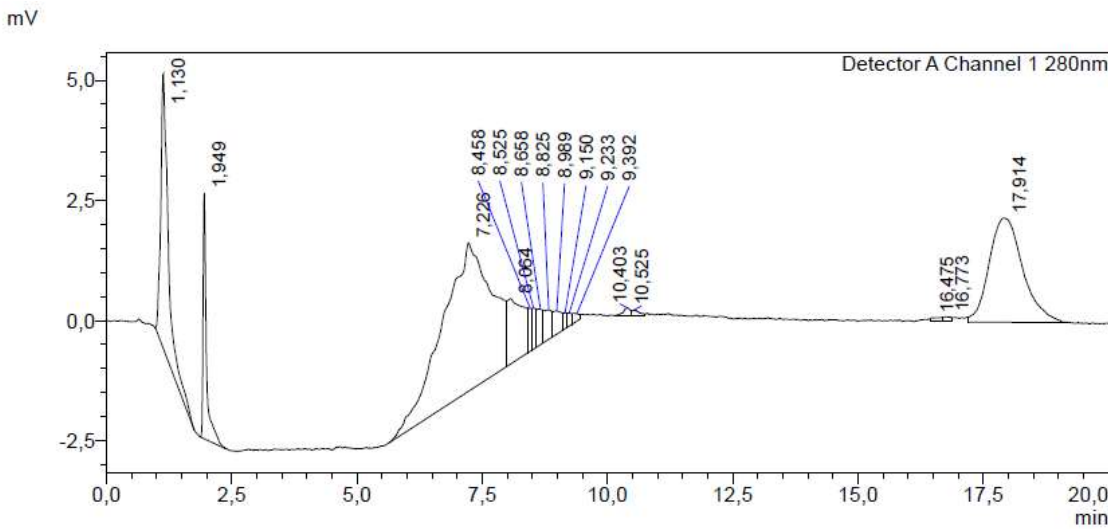


Figura 79 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Lignina coletado no Dia 21

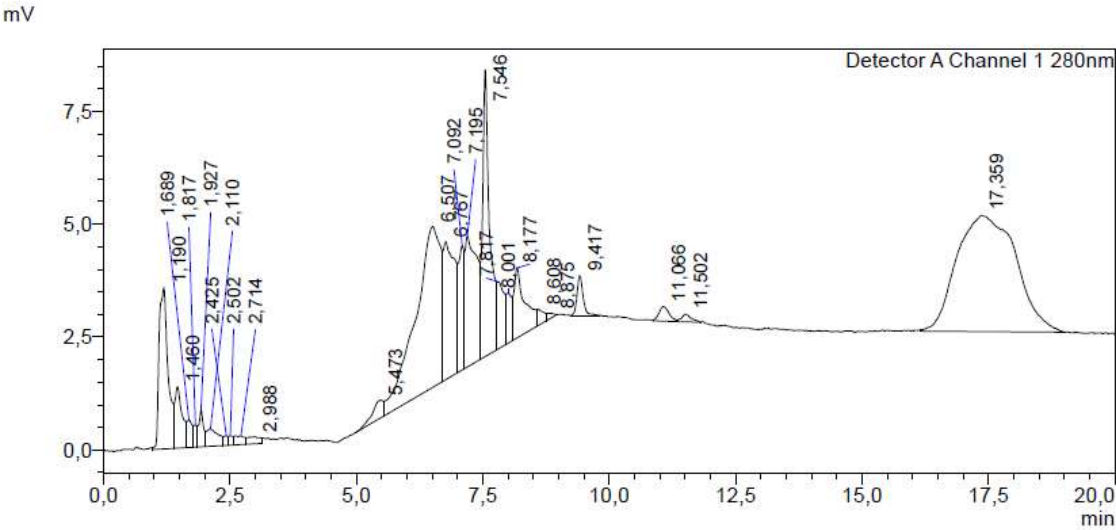


Figura 80 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Lignina coletado no Dia 21

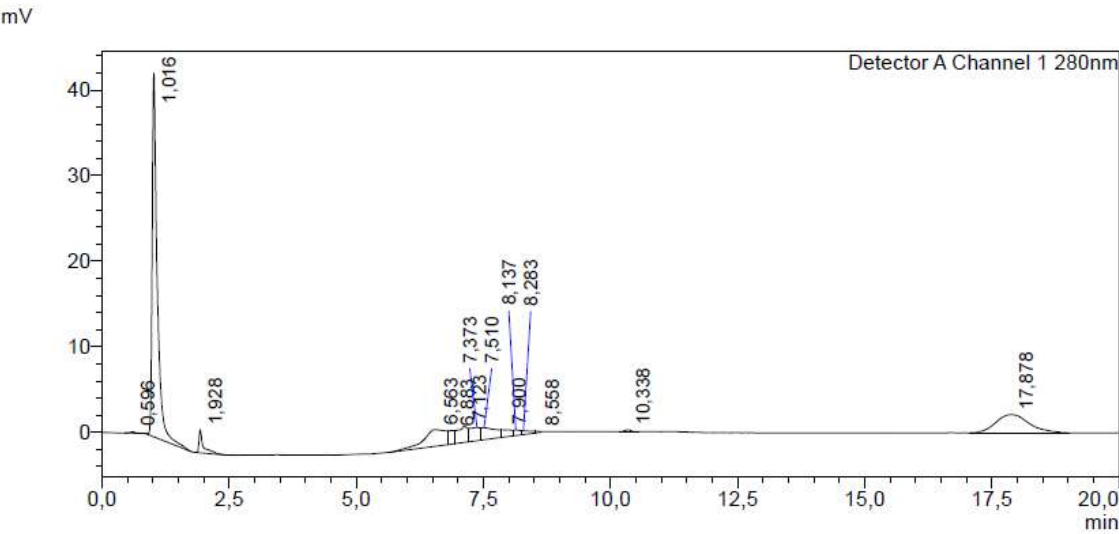


Figura 81 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Lignina coletado no Dia 21

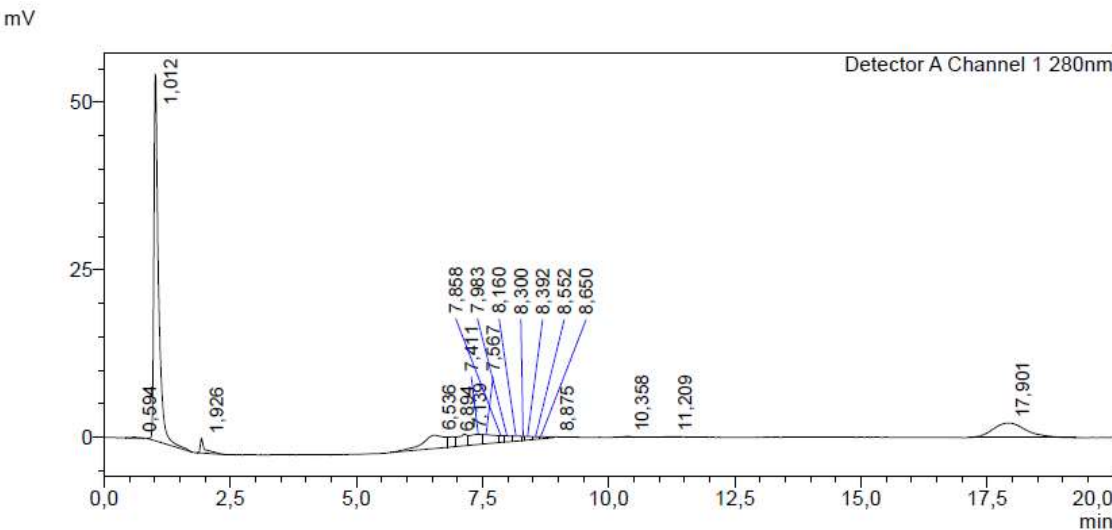


Figura 82 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Lignina coletado no Dia 21

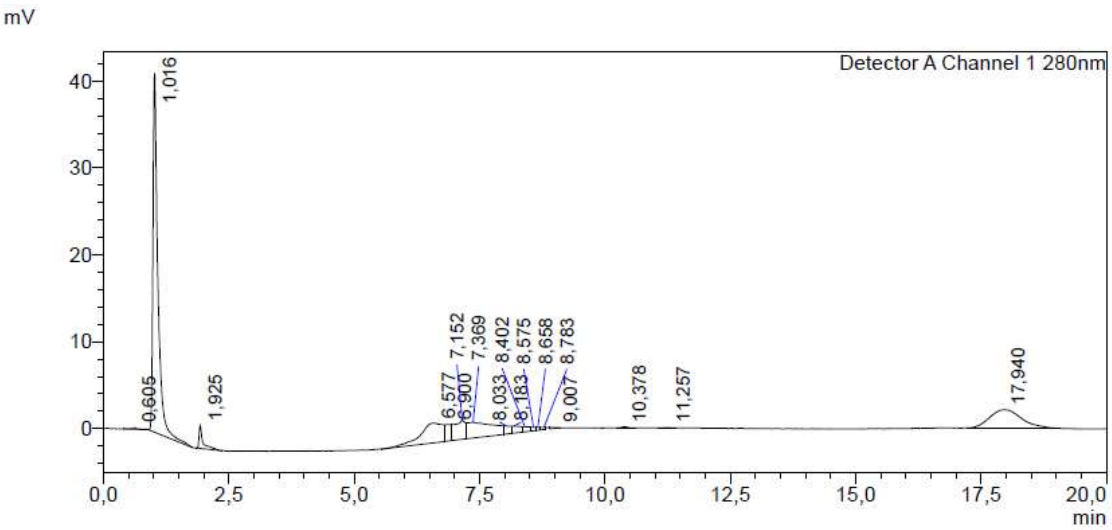


Figura 83 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Lignina coletado no Dia 21

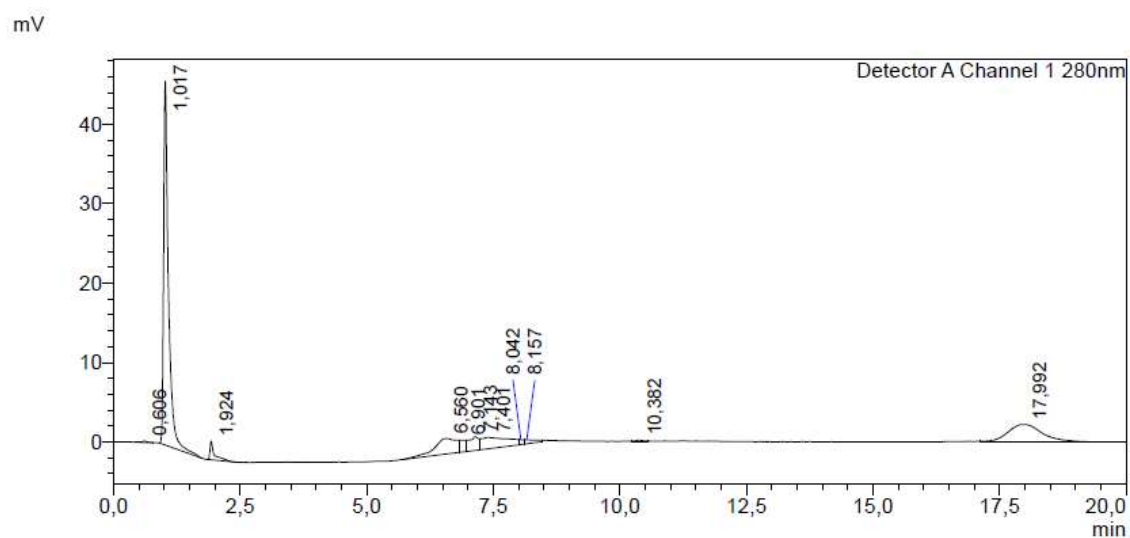


Figura 84 – Cromatograma (HPLC) da amostra cinco de Lignina coletado no Dia 21

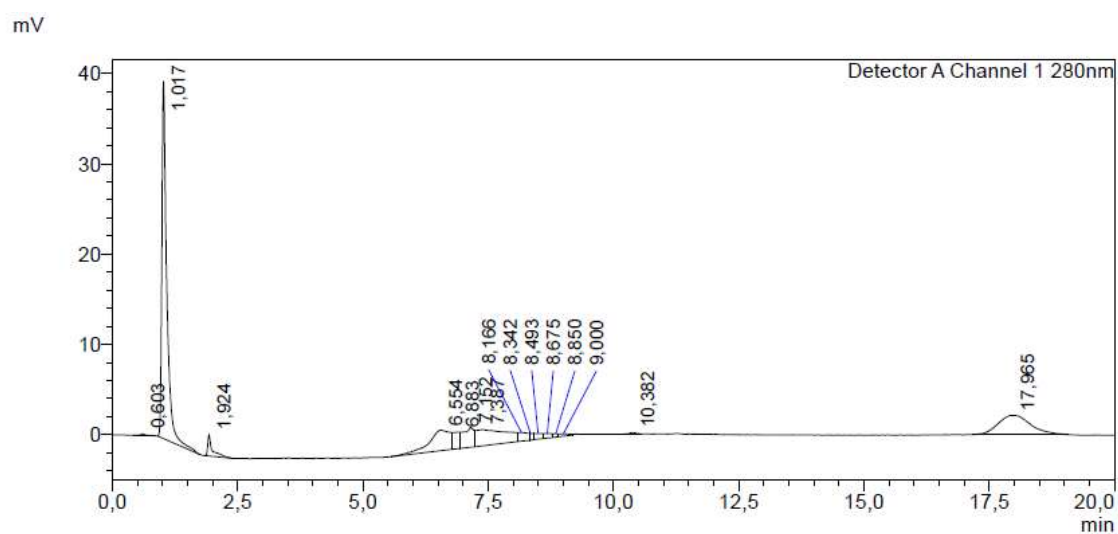


Figura 85 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Lignina coletado no Dia 28

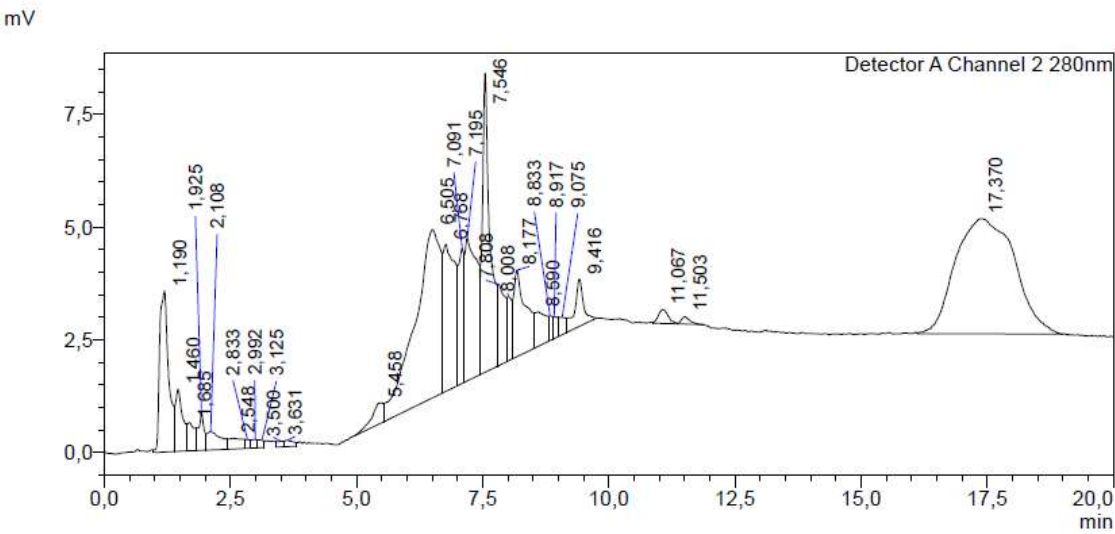


Figura 86 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Lignina coletado no Dia 28

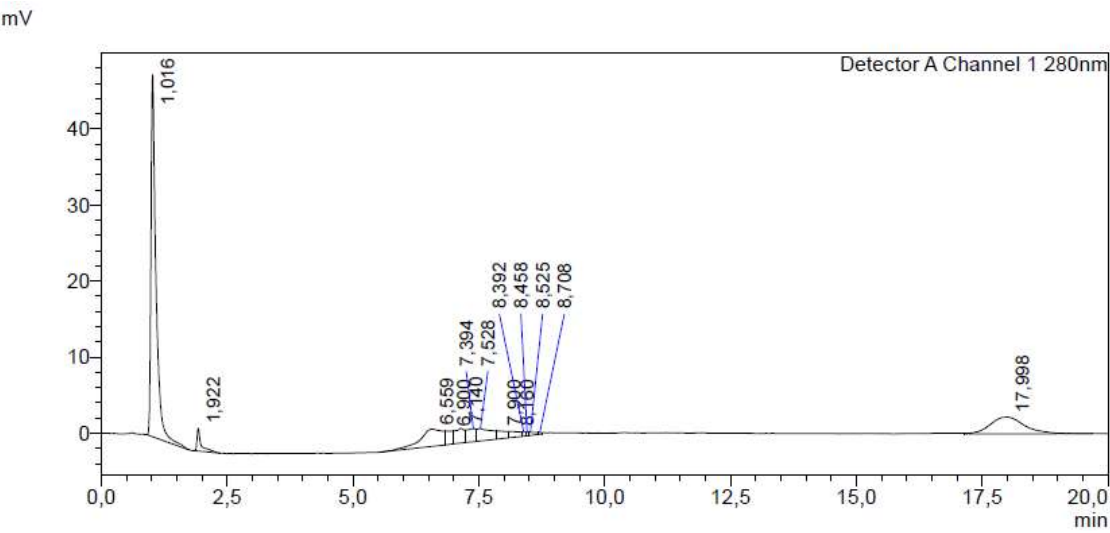


Figura 87 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Lignina coletado no Dia 28

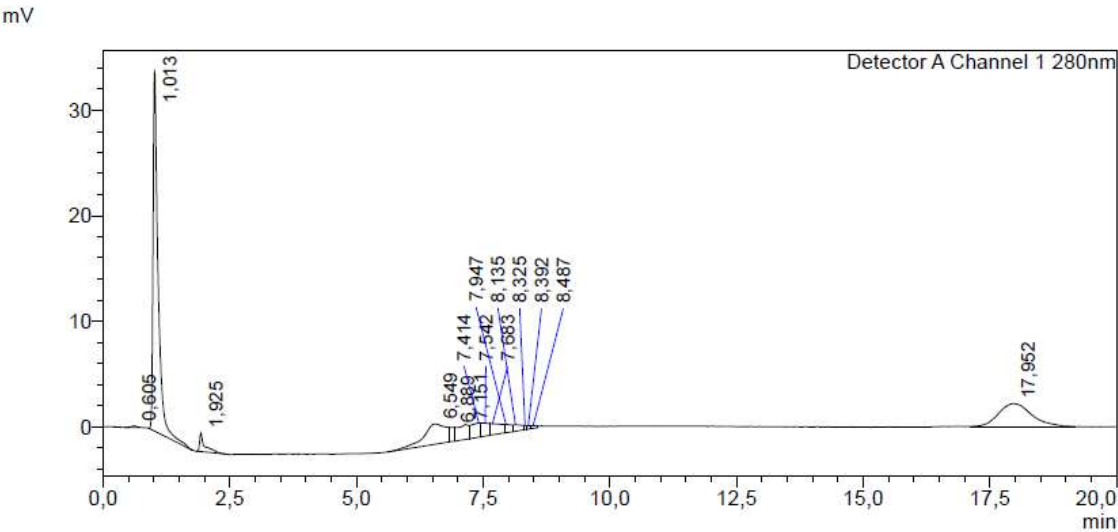


Figura 88 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Lignina coletado no Dia 28

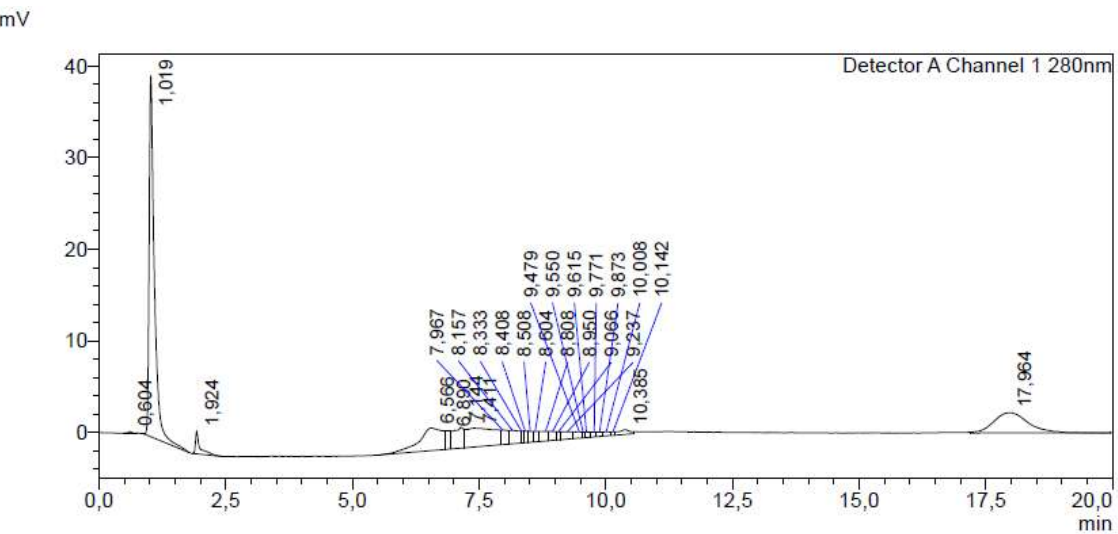


Figura 89 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Lignina coletado no Dia 28

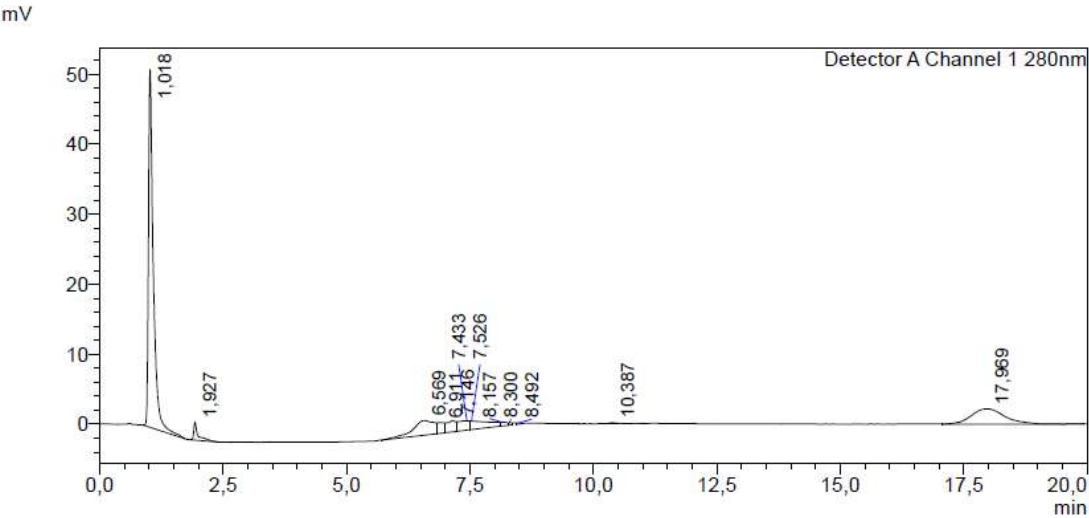


Figura 90 – Cromatograma (HPLC) da amostra cinco de Lignina coletado no Dia 28

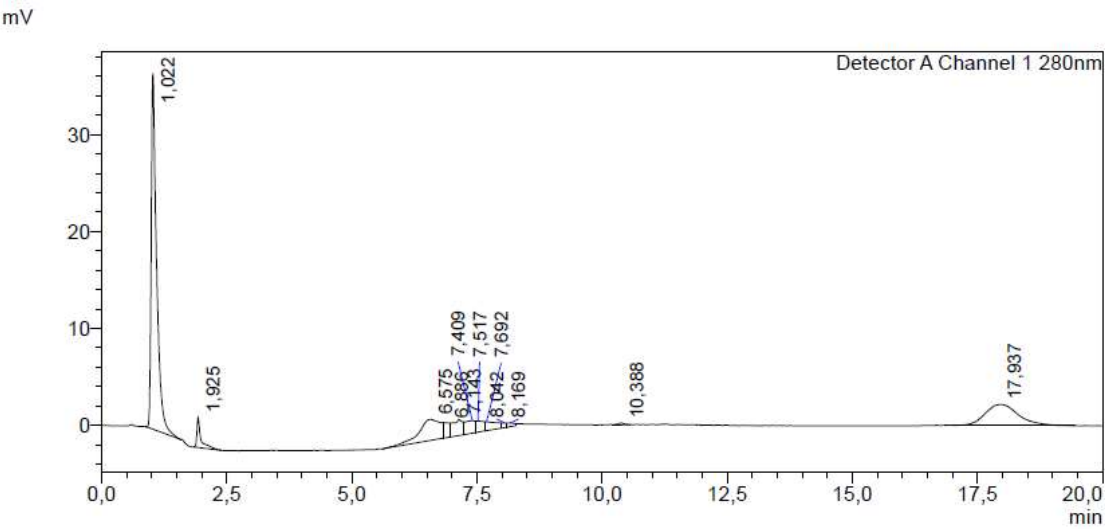


Figura 91 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Bagaço de cana coletado no Dia 5

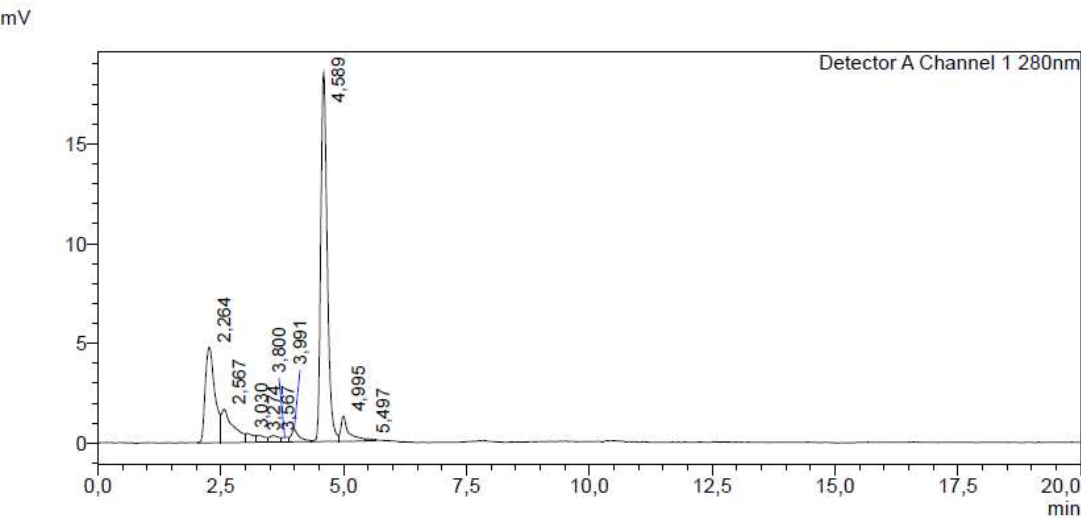


Figura 92 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Bagaço de cana coletado no Dia 5

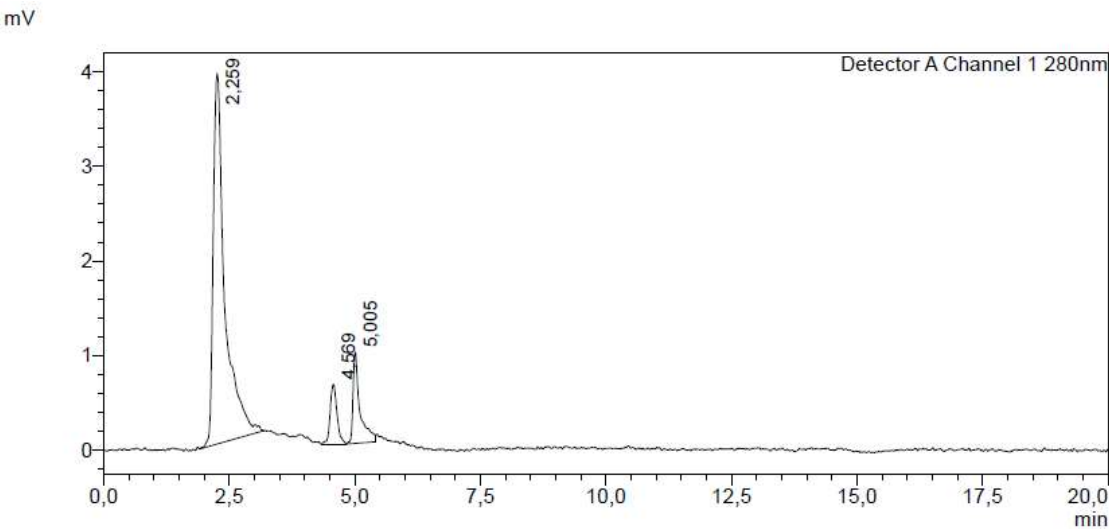


Figura 93 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Bagaço de cana coletado no Dia 5

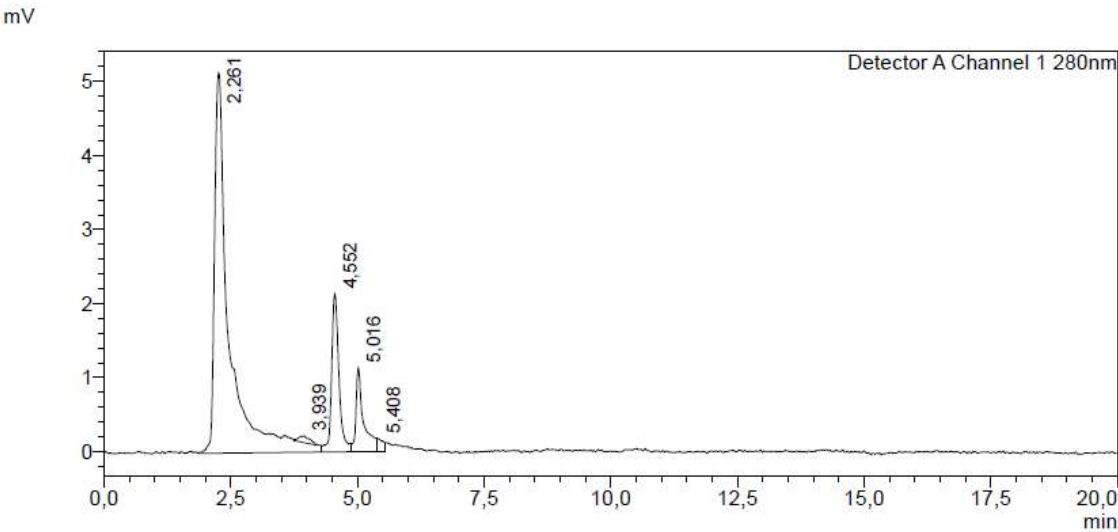
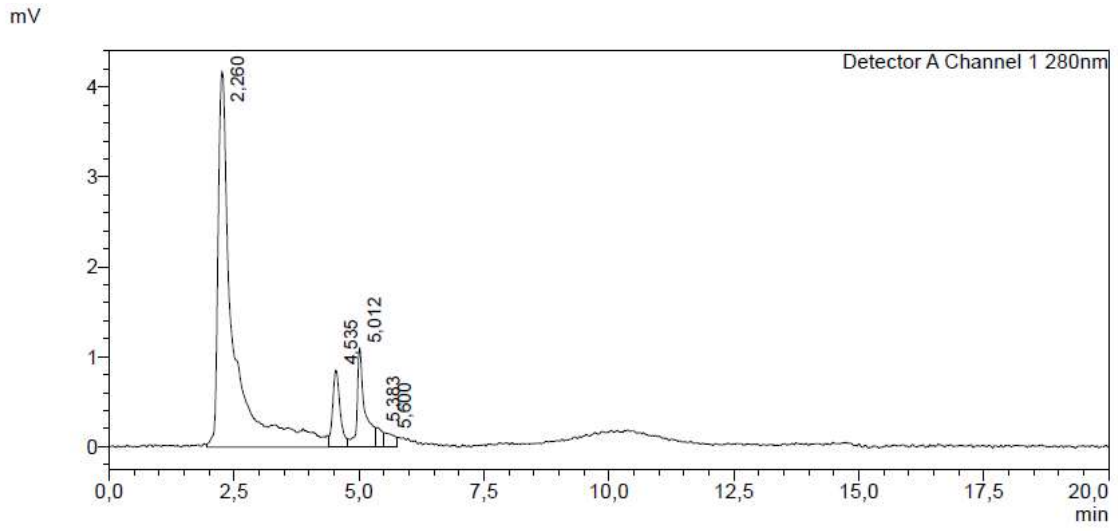


Figura 94 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Bagaço de cana coletado no Dia 5



mV

Figura 95 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Bagaço de cana coletado no Dia 5

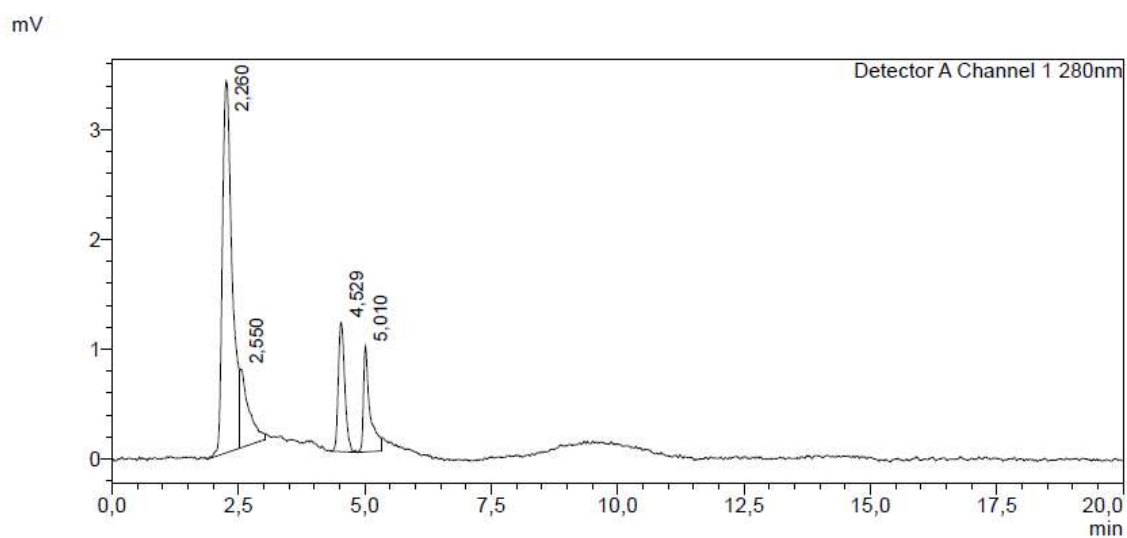


Figura 96 – Cromatograma (HPLC) da amostra cinco de Bagaço de cana coletado no Dia 5

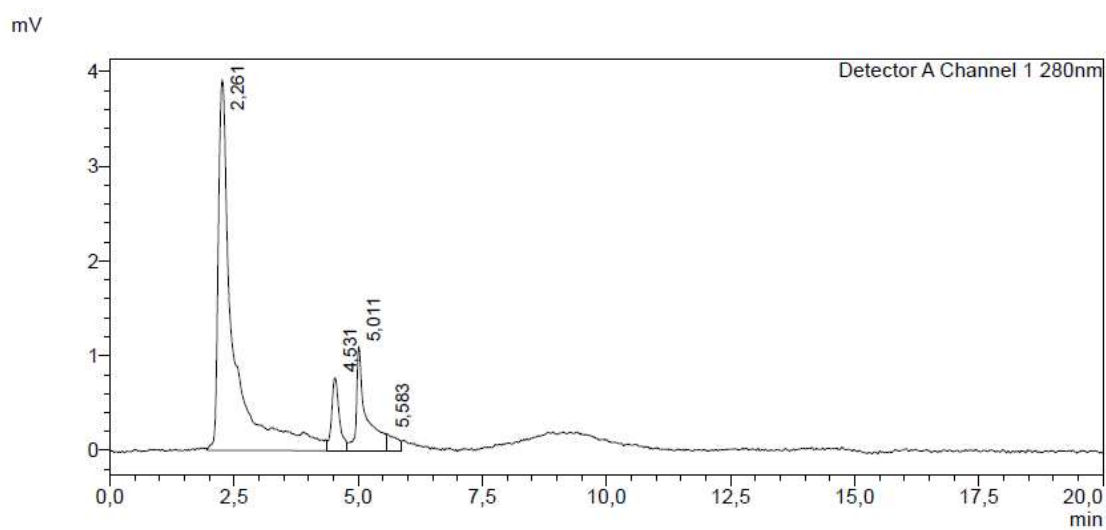


Figura 97 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Bagaço de cana coletado no Dia 7

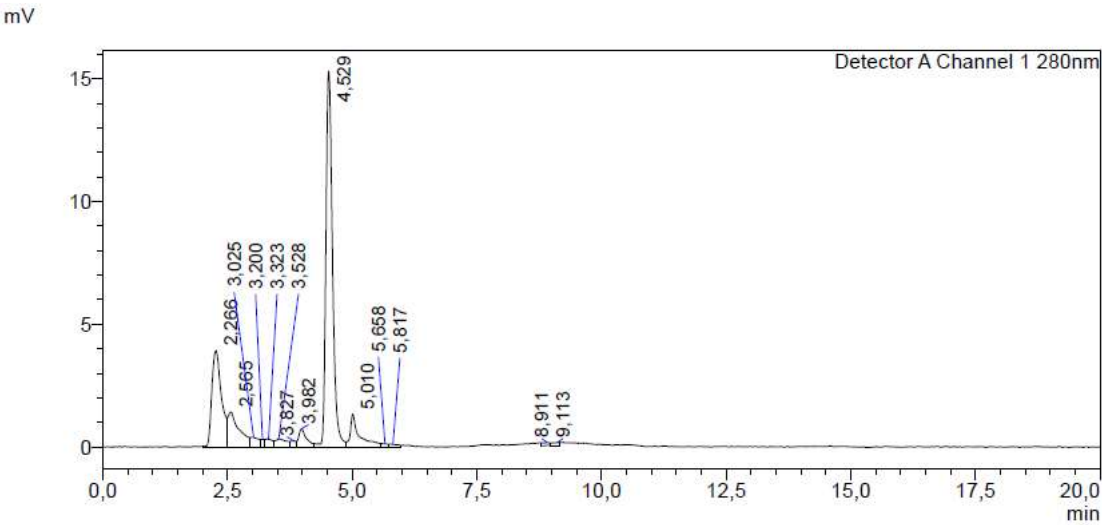


Figura 98 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Bagaço de cana coletado no Dia 7

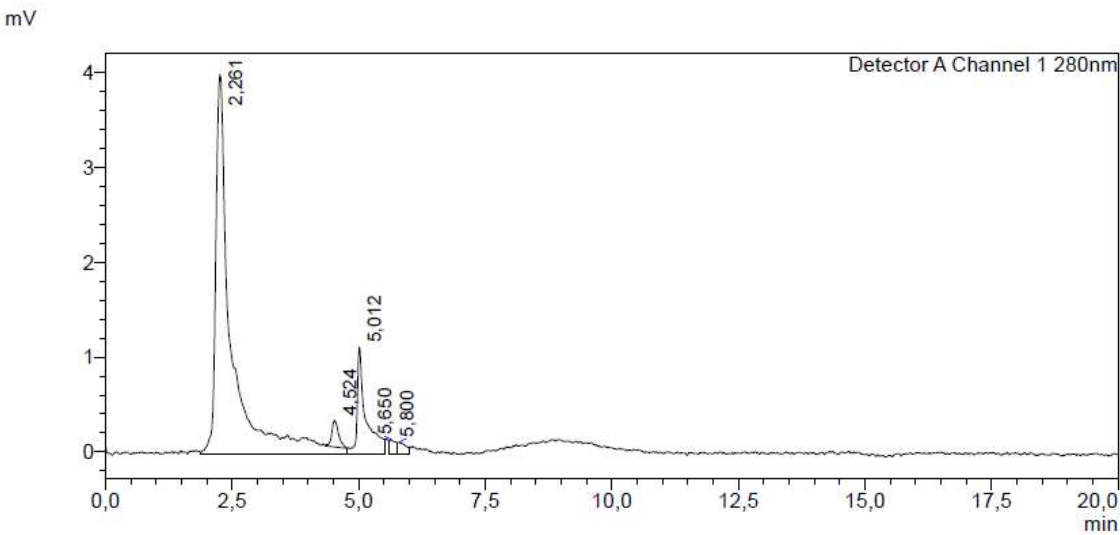


Figura 99 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Bagaço de cana coletado no Dia 7

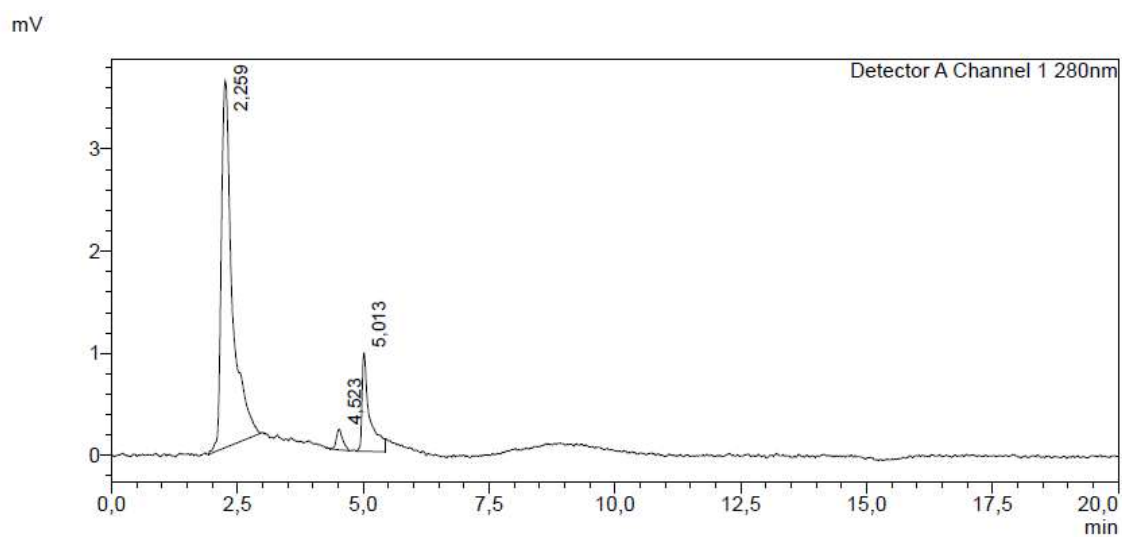


Figura 100 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Bagaço de cana coletado no Dia 7

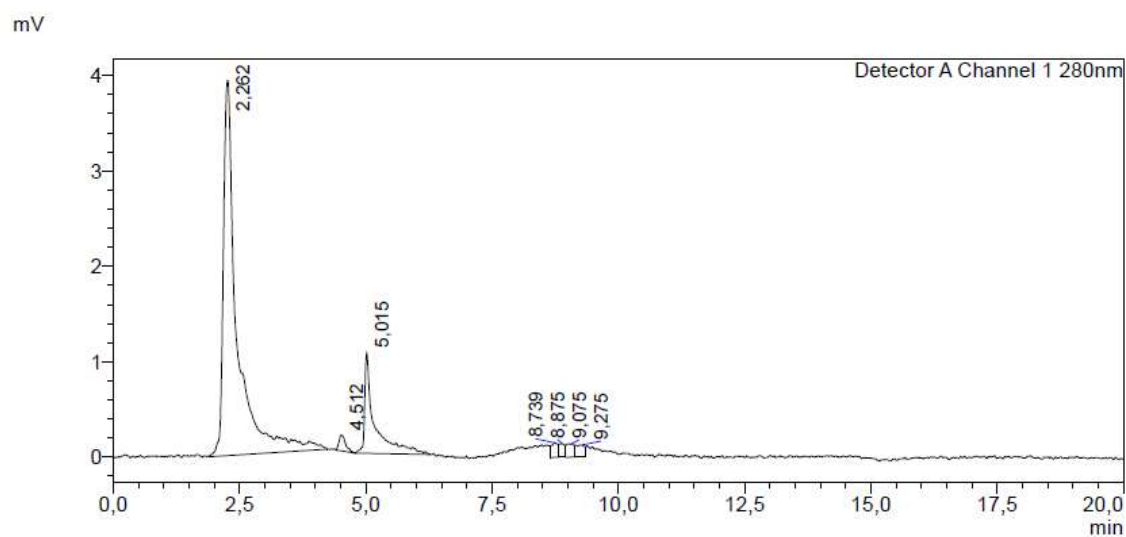


Figura 101 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Bagaço de cana coletado no Dia 7

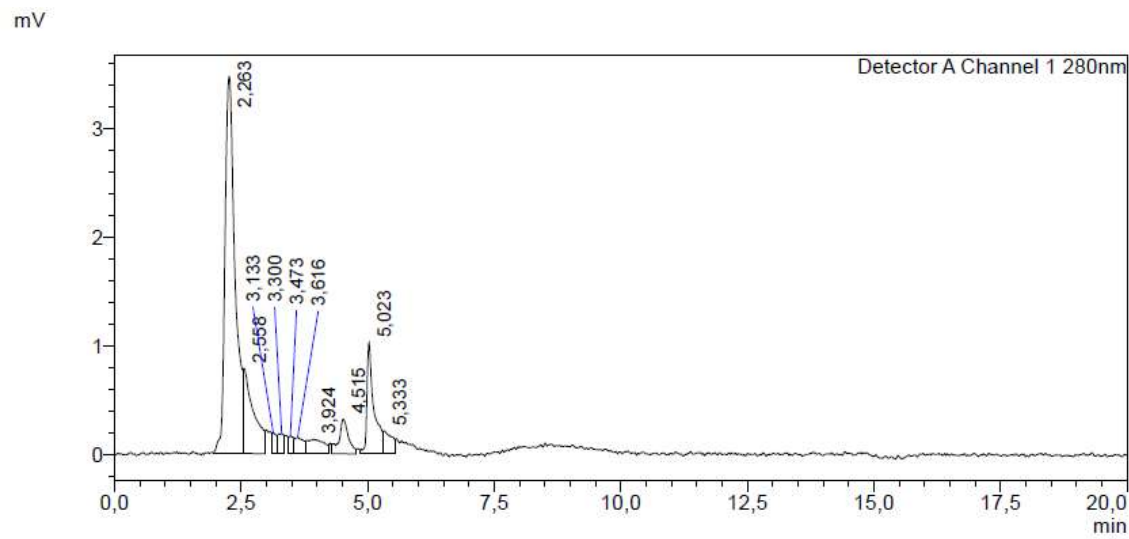


Figura 102 – Cromatograma (HPLC) da amostra cinco de Bagaço de cana coletado no Dia 7

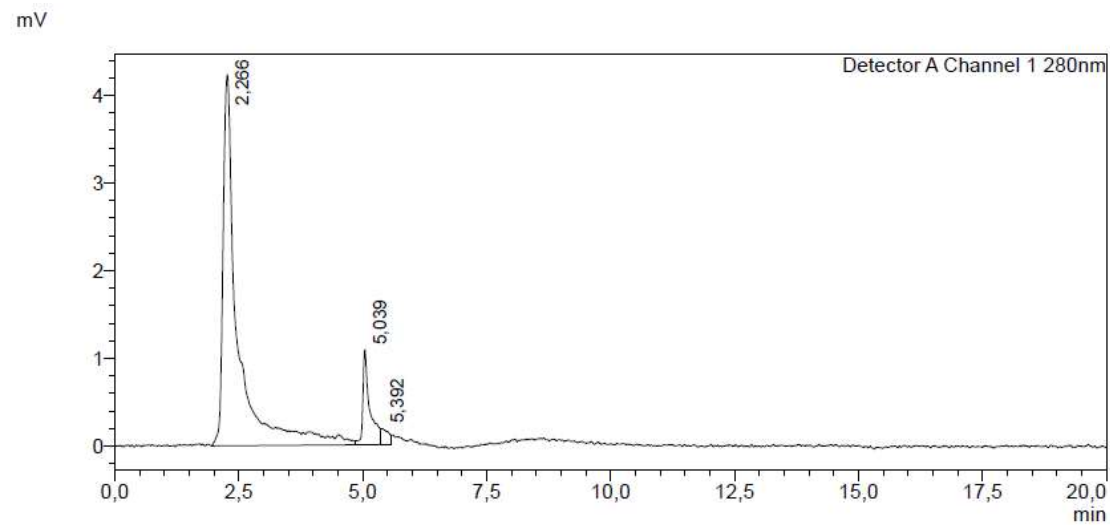


Figura 103 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Bagaço de cana coletado no Dia 10

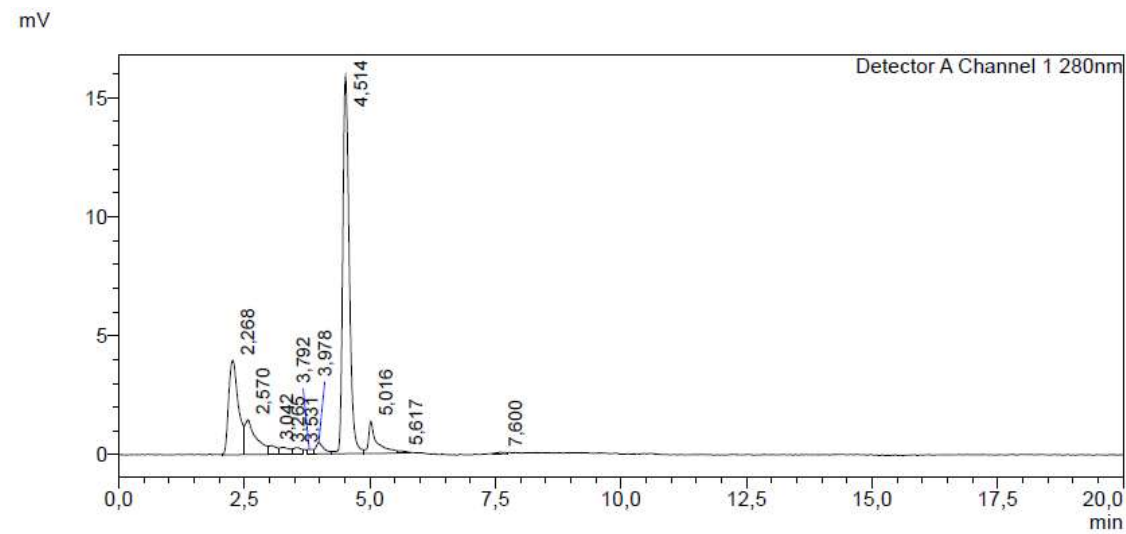


Figura 104 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Bagaço de cana coletado no Dia 10

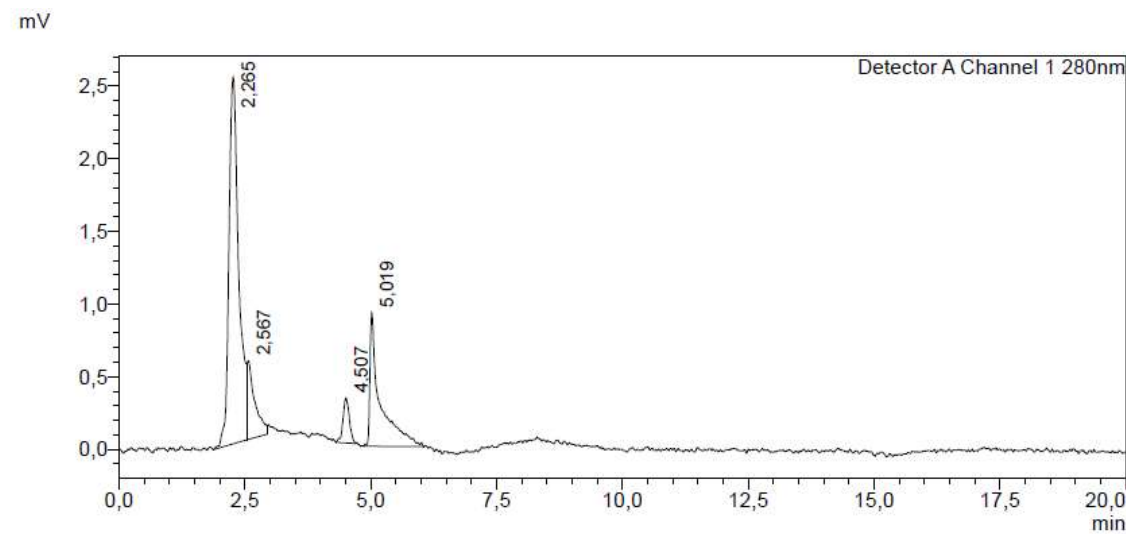


Figura 105 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Bagaço de cana coletado no Dia 10

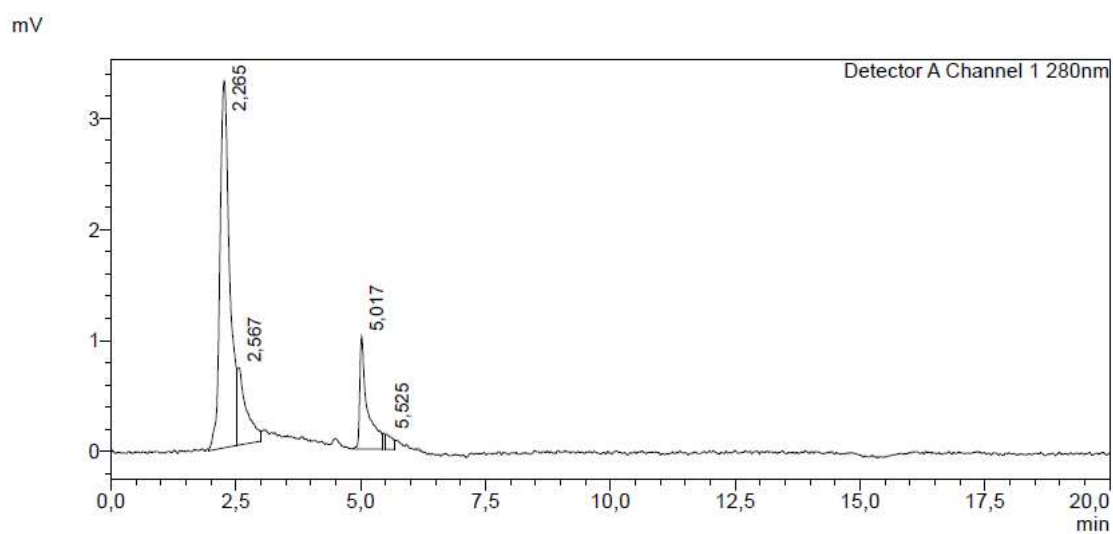


Figura 106 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Bagaço de cana coletado no Dia 10

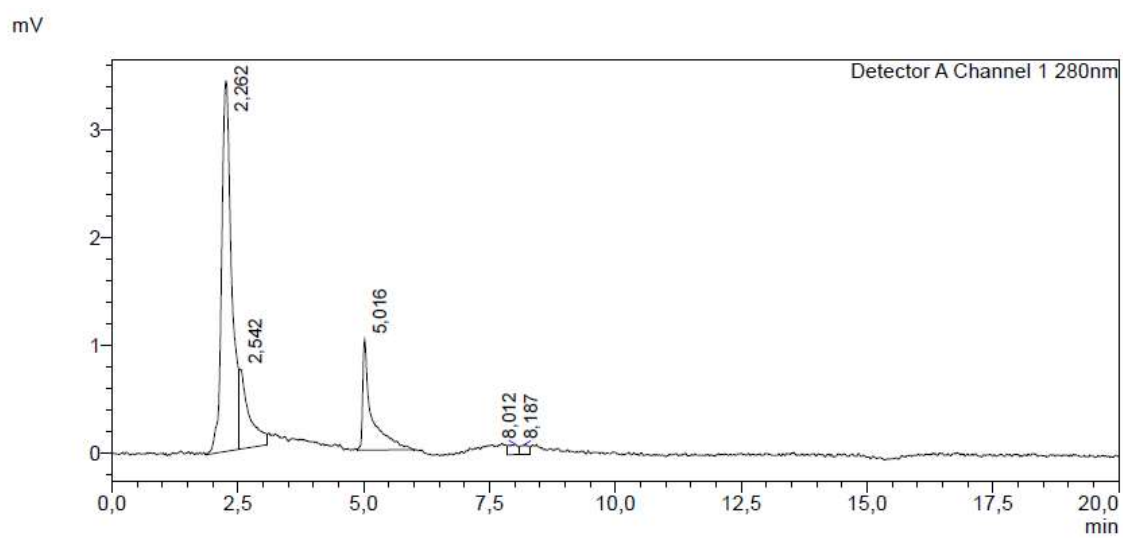


Figura 107 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Bagaço de cana coletado no Dia 10

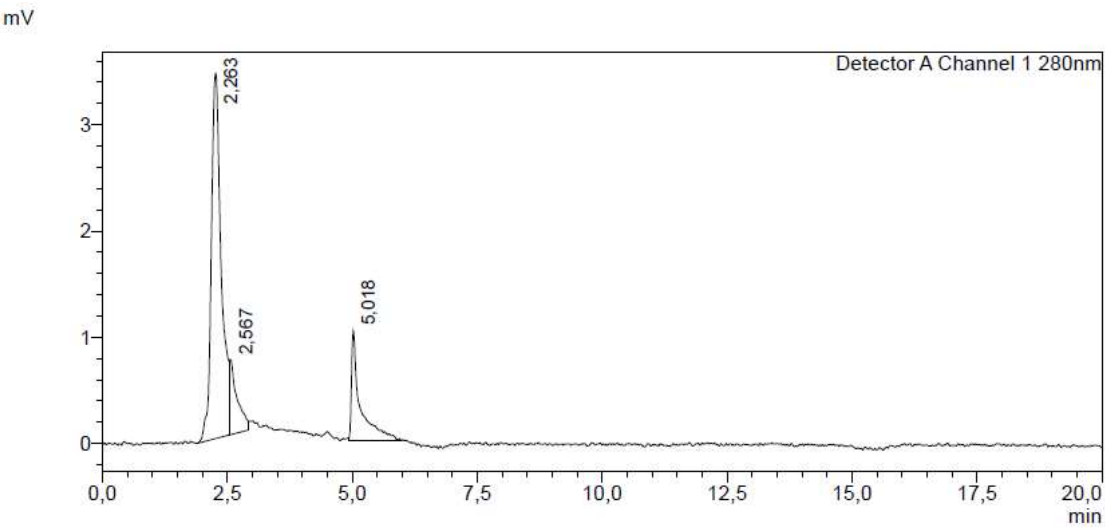


Figura 108 – Cromatograma (HPLC) da amostra cinco de Bagaço de cana coletado no Dia 10

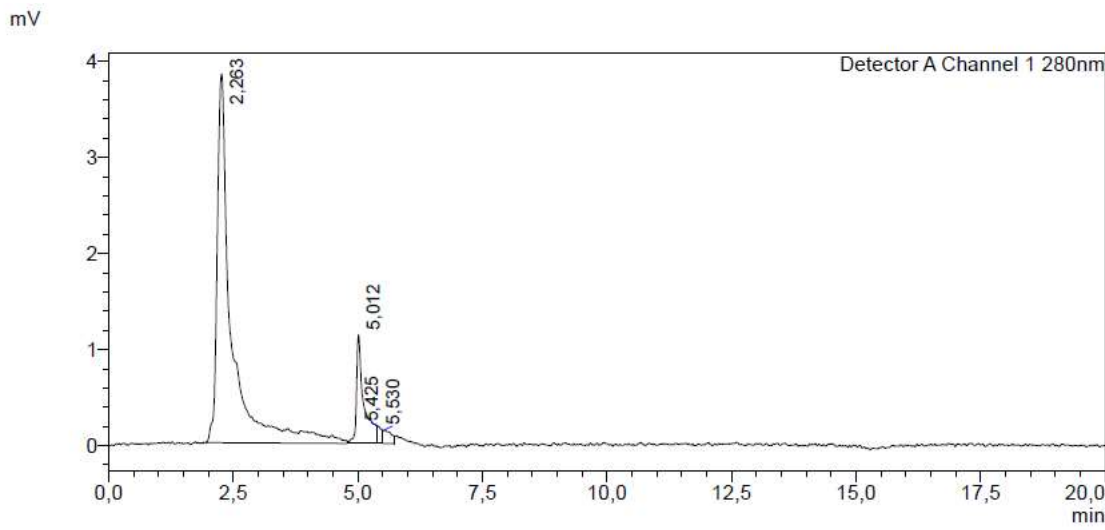


Figura 109 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Bagaço de cana coletado no Dia 14

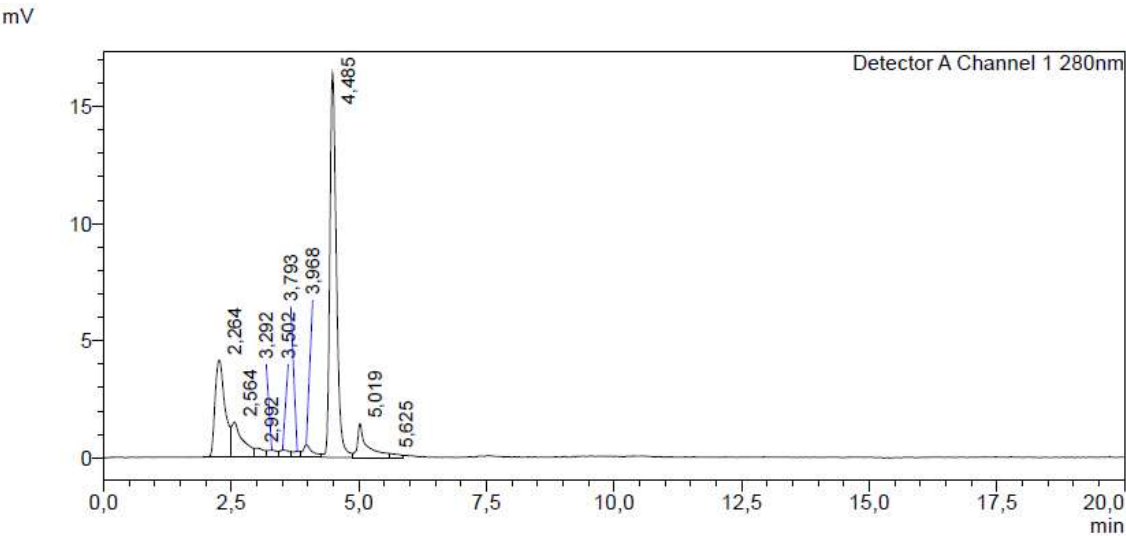


Figura 110 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Bagaço de cana coletado no Dia 14

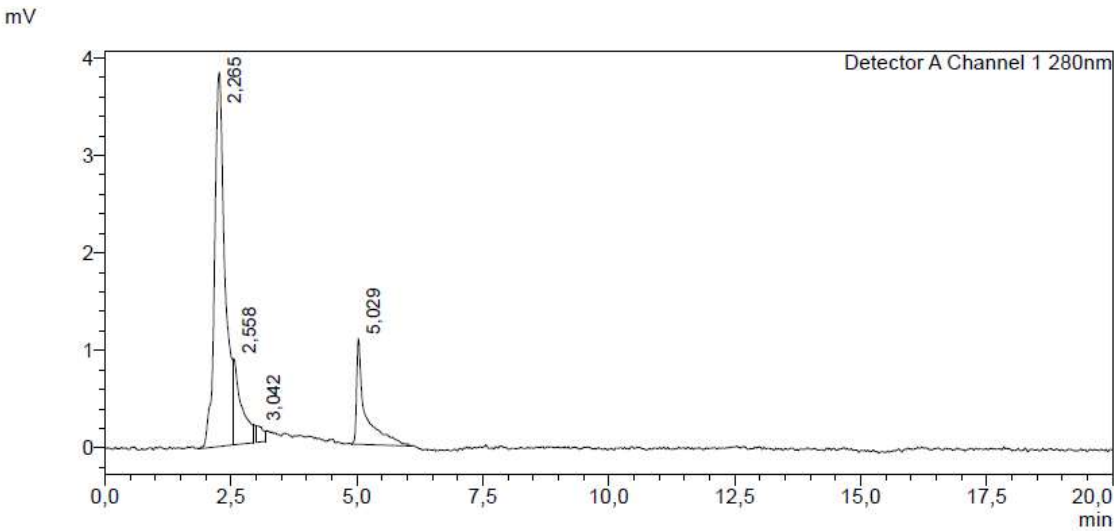


Figura 111 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Bagaço de cana coletado no Dia 14

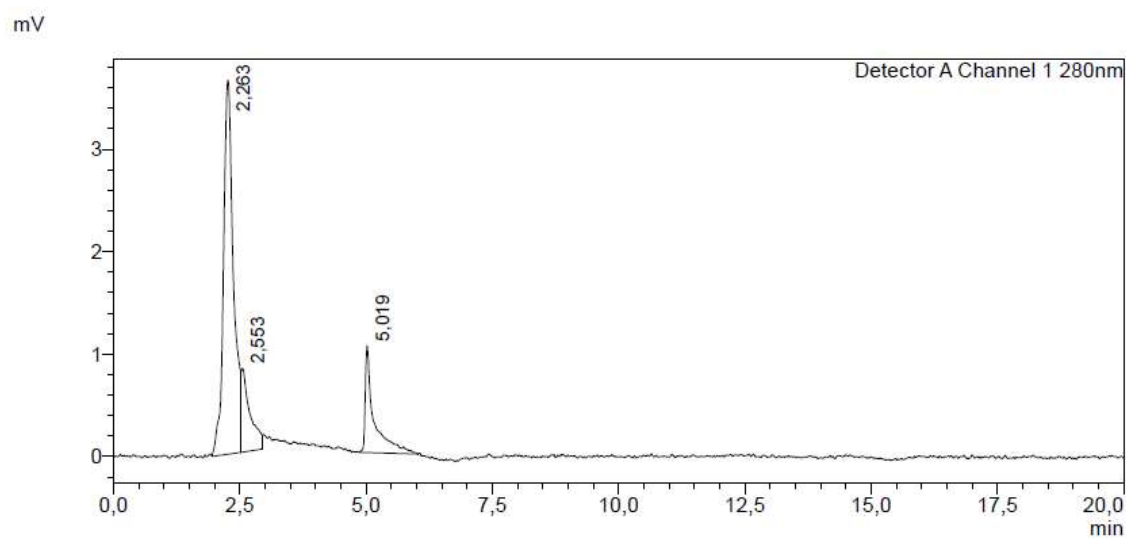


Figura 112 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Bagaço de cana coletado no Dia 14

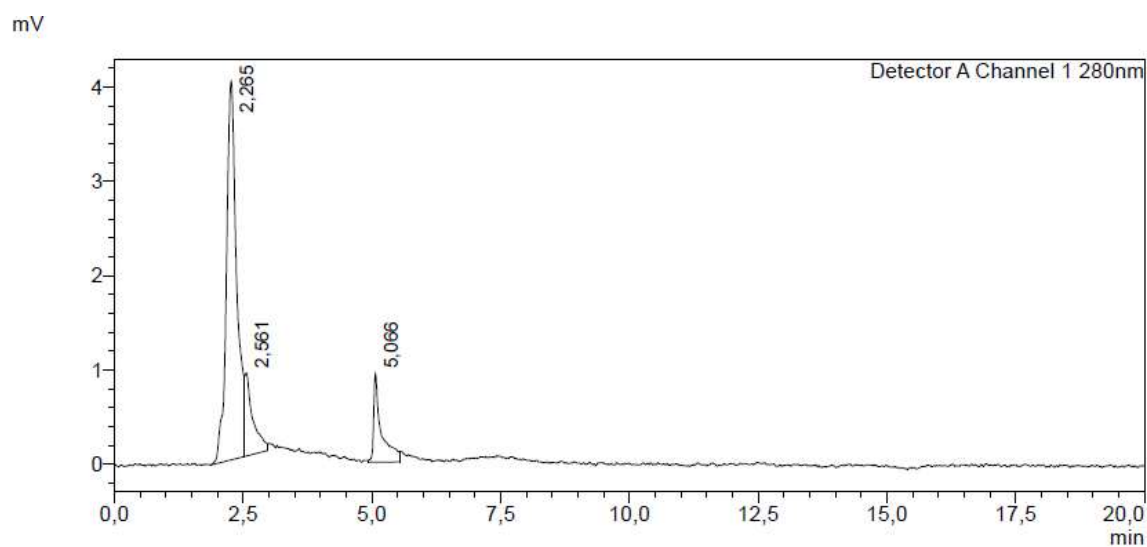


Figura 113 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Bagaço de cana coletado no Dia 14

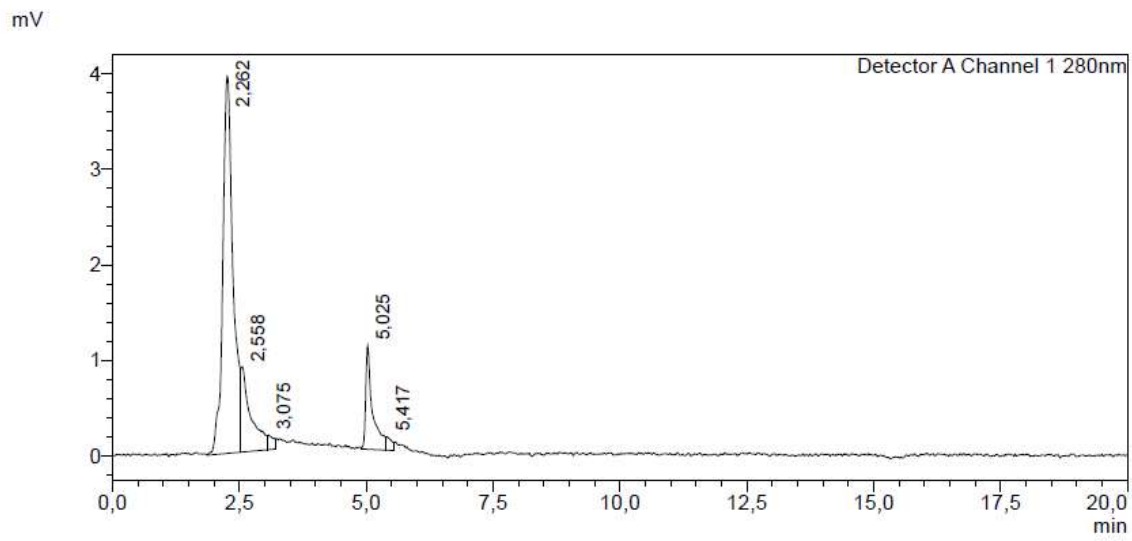


Figura 114 – Cromatograma (HPLC) da amostra cinco de Bagaço de cana coletado no Dia 14

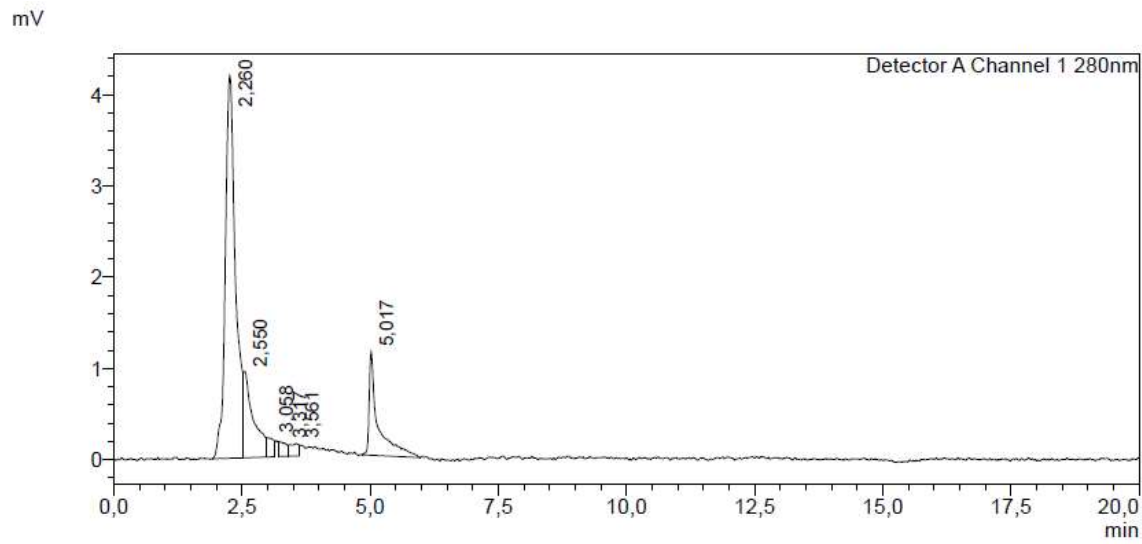


Figura 115 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Bagaço de cana coletado no Dia 21

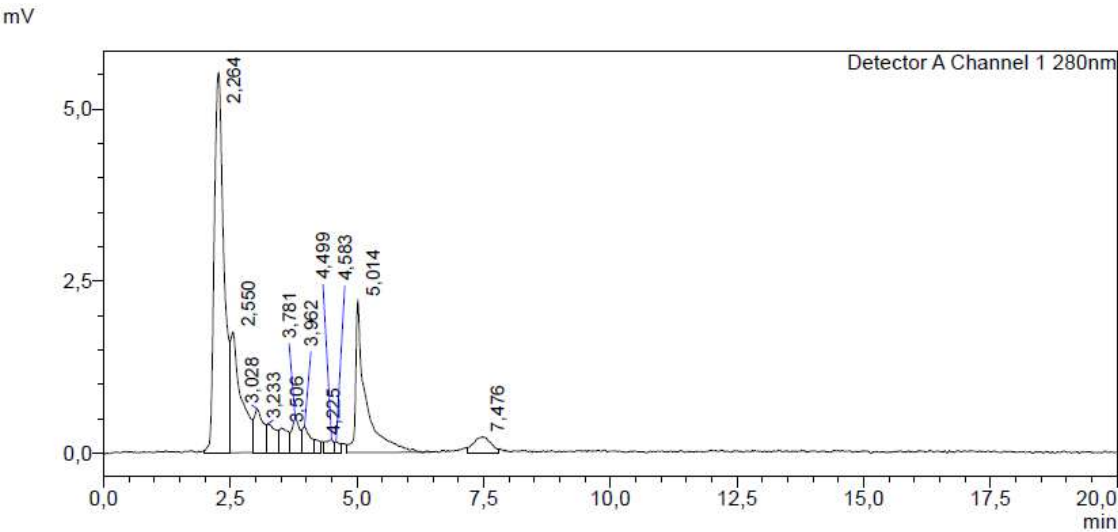


Figura 116 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Bagaço de cana coletado no Dia 21

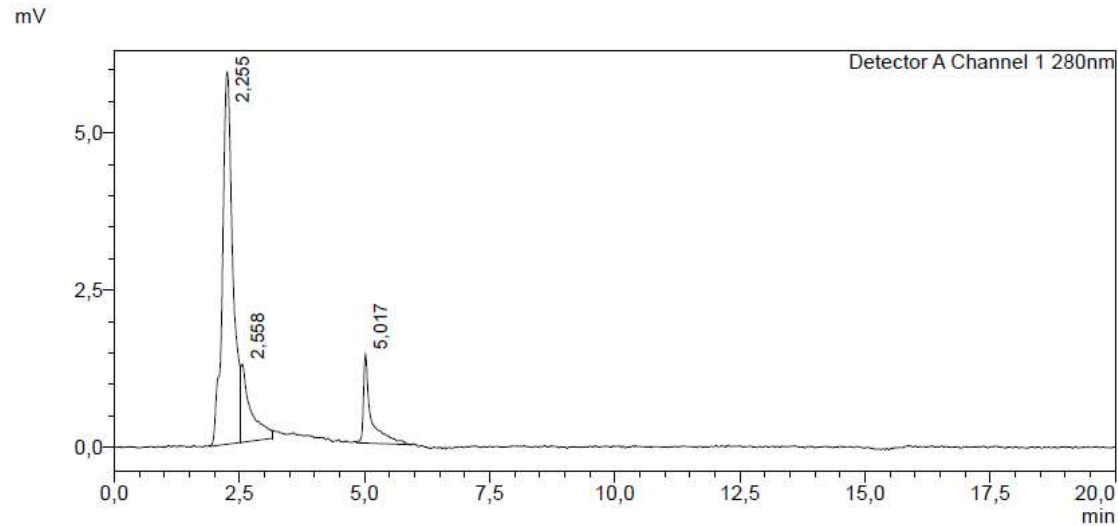


Figura 117 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Bagaço de cana coletado no Dia 21

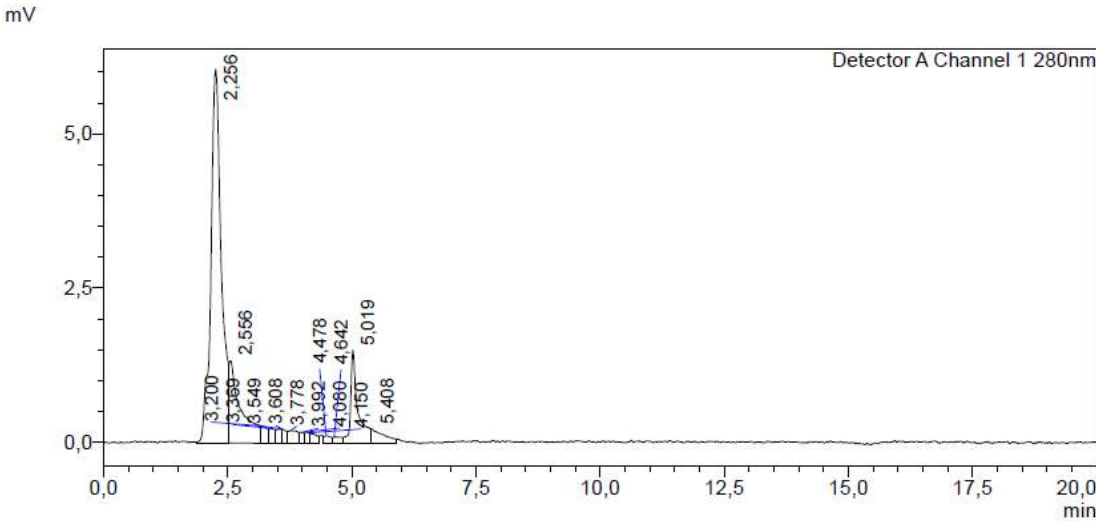


Figura 118 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Bagaço de cana coletado no Dia 21

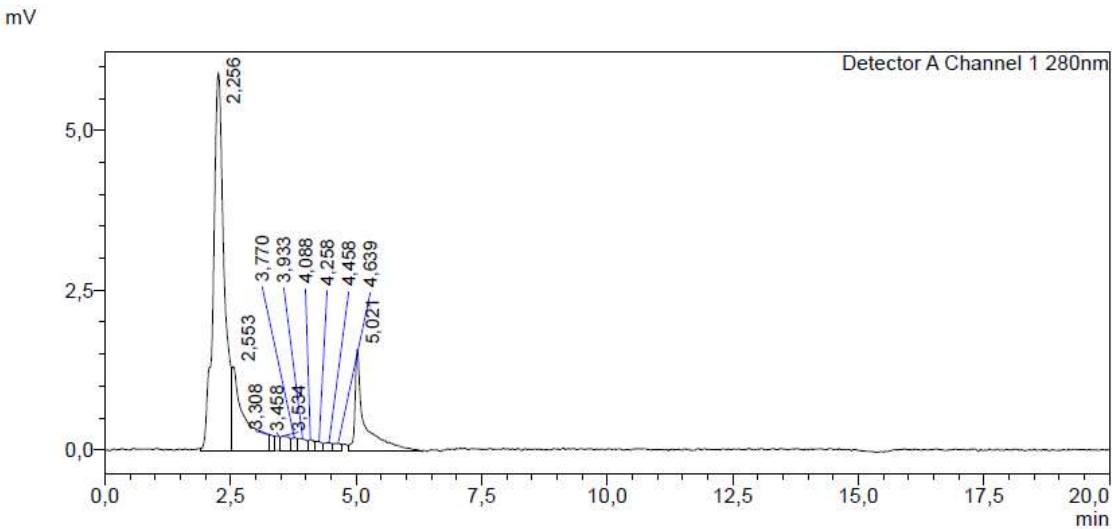


Figura 119 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Bagaço de cana coletado no Dia 21

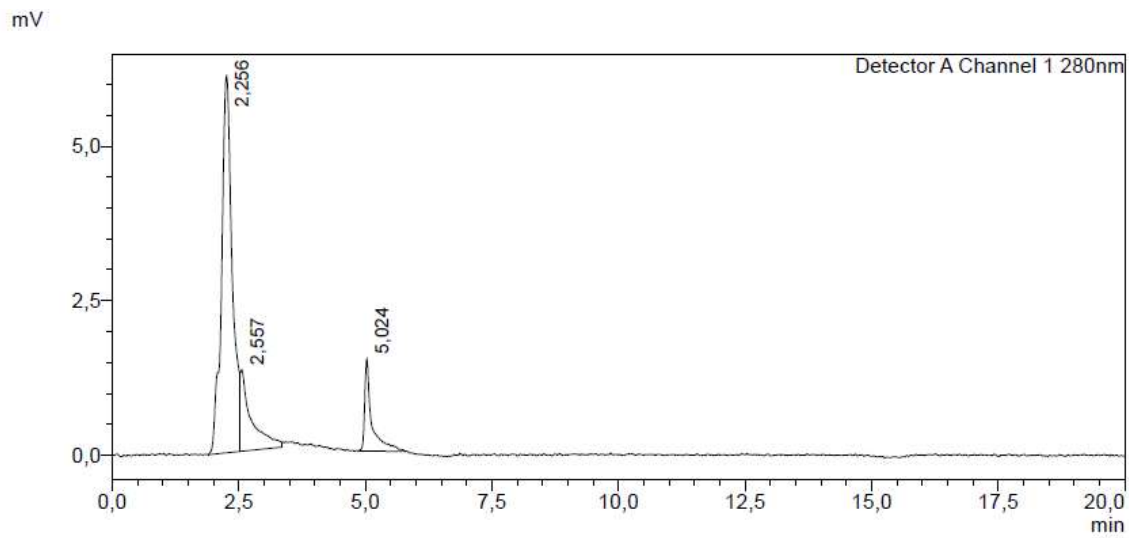


Figura 120 – Cromatograma (HPLC) da amostra cinco de Bagaço de cana coletado no Dia 21

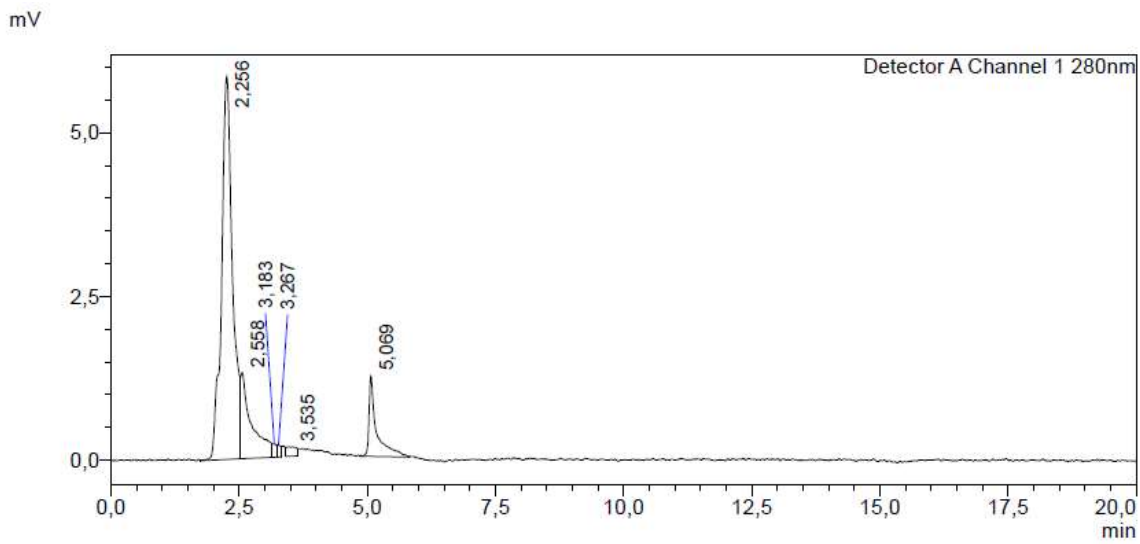


Figura 121 – Cromatograma (HPLC) do Controle de Bagaço de cana coletado no Dia 28

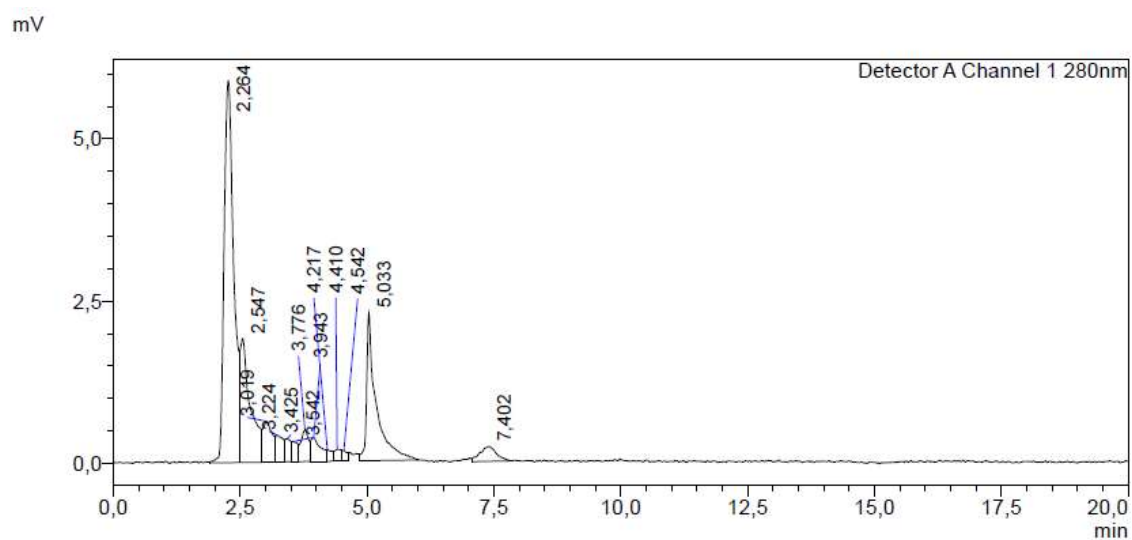


Figura 122 – Cromatograma (HPLC) da amostra um de Bagaço de cana coletado no Dia 28

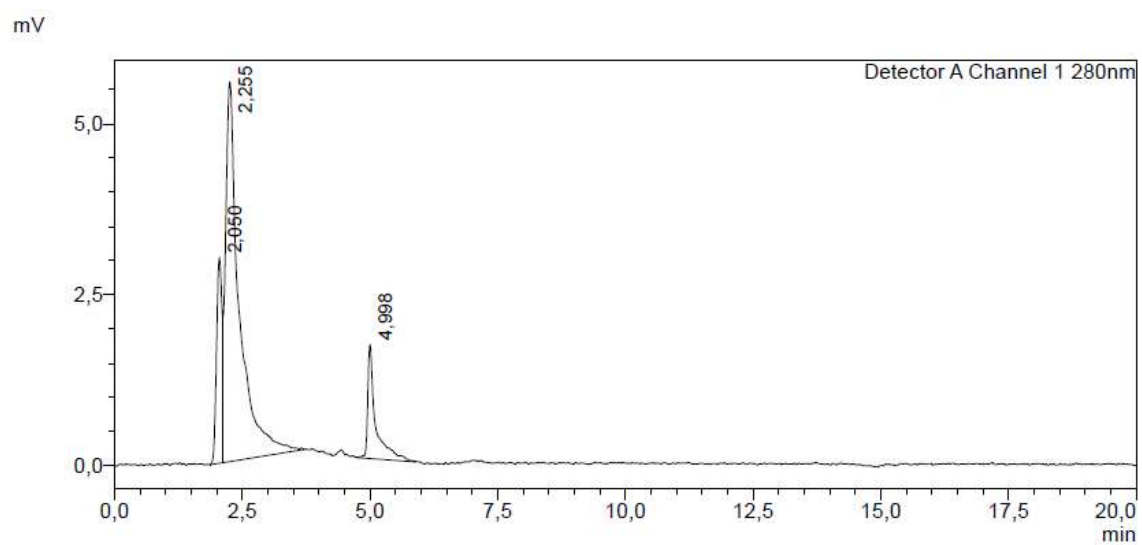


Figura 123 – Cromatograma (HPLC) da amostra dois de Bagaço de cana coletado no Dia 28

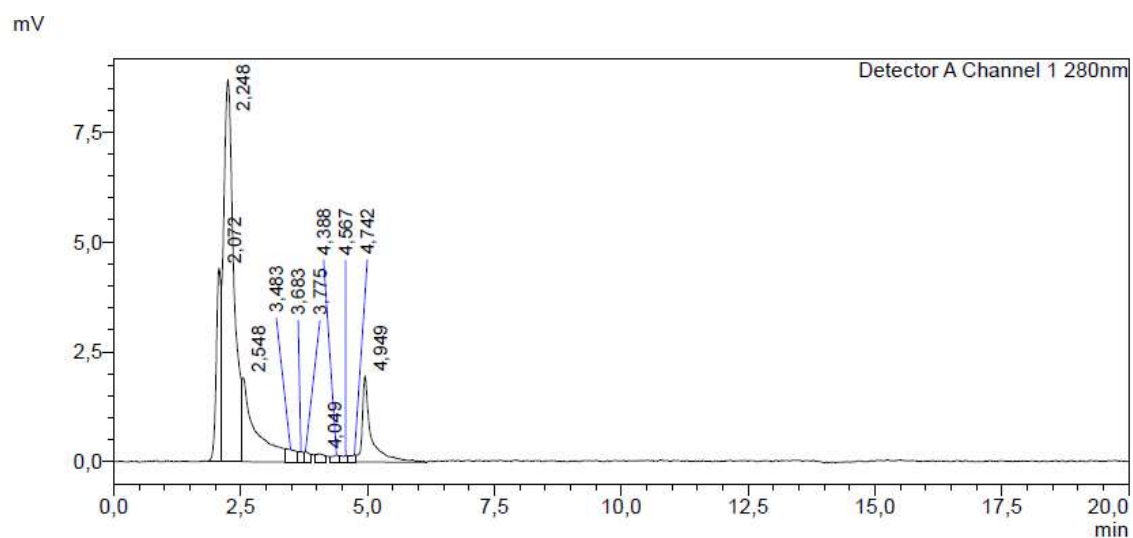


Figura 124 – Cromatograma (HPLC) da amostra três de Bagaço de cana coletado no Dia 28

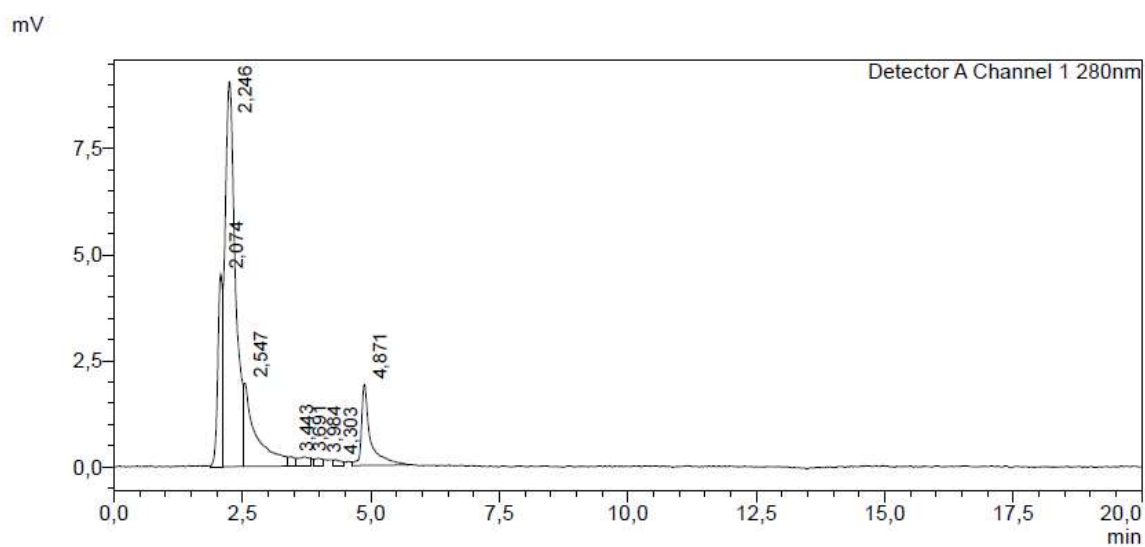


Figura 125 – Cromatograma (HPLC) da amostra quatro de Bagaço de cana coletado no Dia

28

