



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

CHRISTIANE ROSETO

**ESTUDO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS (LIGNOCELULÓSICAS) E SUAS
APLICAÇÕES EM BIONANOTECNOLOGIA**

**CAMPINAS
2019**

CHRISTIANE ROSETO

**ESTUDO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS (LIGNOCELULÓSICAS) E SUAS
APLICAÇÕES EM BIONANOTECNOLOGIA**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
Mestra em Química na Área de Química Orgânica**

Orientadora: Profa. Dra. Ljubica Tasic

**ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA CHRISTIANE ROSETO, E ORIENTADA PELA PROFA.
DRA. LJUBICA TASIC.**

**CAMPINAS
2019**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Erica Cristina de Carvalho Mansur - CRB 8/6734

R728e Roseto, Christiane, 1983-
Estudo de enzimas hidrolíticas (lignocelulósicas) e suas aplicações em bionanotecnologia / Christiane Roseto. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Ljubica Tasic.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Laranja. 2. Lignina. 3. Micro-organismos. 4. Enzimas. I. Tasic, Ljubica, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of hydrolytic enzymes (lignocellolics) and their applications in bionanotechnology

Palavras-chave em inglês:

Orange

Lignin

Microorganisms

Enzymes

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora:

Ljubica Tasic [Orientador]

Taicia Pacheco Fill

Nelson Eduardo Duran Caballero

Data de defesa: 22-03-2019

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-0414-8830>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0057216490029768>

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ljubica Tasic (Orientadora)

Profa. Dra. Taicia Pacheco Fill (IQ-UNICAMP)

Prof. Dr. Nelson Eduardo Duran Caballero (IB-UNICAMP)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna CHRISTIANE ROSETO, aprovada pela Comissão Julgadora em 22 de março de 2019.

À minha família e amigos por todo apoio.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar saúde e por colocar as pessoas certas no meu caminho para que eu pudesse realizar o mestrado e trabalhar simultaneamente.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Ljubica Tasic, por me acolher de braços abertos em seu grupo de pesquisa em um momento de transição em minha carreira. Agradeço pelos ensinamentos, orientação e companheirismo que fizeram com que eu pudesse concluir essa tarefa e enriquecer os meus conhecimentos.

Agradeço à minha família e meus pais (Carlos e Roseli) que me apoiaram durante o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço ao meu marido Sérgio, pela sua paciência e compreensão e por nunca deixar com que eu perdesse de vista os meus objetivos.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Química Biológica (LQB) pelo auxílio nos experimentos, aprendizado e apoio: Stephanie Fulaz, Dra. Melissa, Daniela Cypriano, Dra. Danijela, Guilherme Cruz, Dr. João Guilherme, Roney dos Santos, Tássia Brena, Natália Fregonesi, Amanda Costa, Verônica Queiroz, Lilian, Letícia Huan, Giovanna Grillo e William.

Agradeço aos colegas de trabalho da Camlin Fine Science (Jacqueline Nascimento, Luciano Monteiro e Marcone Silva), empresa que também me acolheu em um momento de transição de carreira onde pude amadurecer pessoalmente e profissionalmente.

Agradeço também aos funcionários do Instituto de Química da Unicamp por todo o auxílio e dedicação na condução de experimentos: Chico, Ricardo (HPLC), Cláudia (Infravermelho), Priscila (Espectrometria de Massas), Hugo (Microscopia) e Anderson/Gustavo (RMN).

“O único lugar aonde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.”
Albert Einstein

RESUMO

A produção de frutas cítricas ocorre em todos os países com clima tropical e subtropical e, entre eles, o Brasil é o maior produtor de laranja e de suco concentrado do mundo. Dessa produção, aproximadamente metade da laranja utilizada se torna resíduo, um resíduo atraente devido ao alto teor de celulose e pectina. A degradação desta biomassa e de outros resíduos da indústria agrícola via hidrólise por microrganismos resistentes à lignina, surge como uma opção interessante para a produção de etanol de segunda geração. O presente projeto visou: (A) isolar os microrganismos nativos da casca de laranja e (B) verificar a capacidade dos microrganismos isolados em degradar a biomassa na presença da lignina. A lignina foi isolada a partir da casca da laranja, purificada e caracterizada em sua forma *in natura* e após fermentação utilizando as técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear no estado sólido, espectroscopia no infravermelho, espectrometria de massas e microscopia eletrônica de varredura. Sendo também, aplicadas as técnicas de isolamento de microrganismos para a montagem de uma pequena coleção de microrganismos nativos da laranja. Após testes de triagem, os microrganismos foram selecionados conforme seu comportamento na presença de glicose, xilose e lignina e os microrganismos resistentes a altas concentrações de lignina e ativos no processo hidrolítico da celulose foram selecionados. Avaliou-se a morfologia das colônias isoladas e realizou-se a identificação filogenética através do sequenciamento da região D1/D2 26S, esperando-se encontrar uma coleção de microrganismos cujas propriedades possam ser exploradas na hidrólise e decomposição de biomassa de lignocelulose.

ABSTRACT

Citrus fruit production takes place in countries with a tropical and subtropical climate, among which, Brazil is the greatest orange and concentrated juice producer in the world. Approximately half of the fruit from the processing of orange juice presents an attractive residue due to the high content of cellulose and pectin. The degradation of this biomass and other residues of the agricultural industry by hydrolysis with microorganisms resistant to lignin appears as an interesting option for the production of second-generation ethanol. The present project aimed to: (A) isolate the native microorganisms from the orange peel and (B) verify the ability of isolated microorganisms to degrade the biomass in the presence of lignin. The lignin was isolated from the orange peels, purified and characterized by techniques such as solid state nuclear magnetic resonance spectroscopy, infrared spectroscopy, mass spectrometry and scanning electron microscopy. Also, applying the techniques of isolation of microorganisms was created a small collection of orange-native microorganisms. After screening, the microorganisms were selected according to their behavior in the presence of glucose, xylose and lignin. The microorganisms resistant to high concentrations of lignin and active in the hydrolytic process of cellulose were selected. The morphology of the isolated colonies was evaluated, and the phylogenetic identification was performed through D1 / D2 26S sequencing. It is expected explore better the microorganisms for efficient hydrolysis and decomposition of lignocellulosic biomass.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição de diferentes tipos de biomassa (ANDÉREZ FERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2018)	17
Tabela 2. Composição dos meios líquidos de cultura com glicose (G30) e xilose (X30)	28
Tabela 3. Composição dos meios líquidos de cultura com lignina (L20 e L30)	29
Tabela 4. Gradiente da fase móvel HPLC	33
Tabela 5. Parâmetros do eletrospray	33
Tabela 6. Atribuições dos sinais da lignina conforme correlação obtidas por RMN - HSQC da lignina extraída do bagaço da laranja in natura (BARROS <i>et al.</i> , 2018)	50

SUMÁRIO

1.	Introdução	13
1.1	Motivação	13
1.2	Composição do material lignocelulósico	15
1.2.1	Celulose	16
1.2.2	Hemicelulose	17
1.2.3	Pectina	18
1.2.4	Lignina	19
1.2.5	Composição da laranja	21
1.3	Degradação do material lignocelulósico	22
1.3.1	Bactérias	22
1.3.2	Bolores e leveduras	23
1.4	Enzimas hidrolíticas	24
2.	Objetivos	27
3.	Materiais e métodos	28
3.1	Isolamento dos microrganismos do bagaço da laranja e triagem	28
3.1.1	Avaliação morfológica das colônias	29
3.1.2	Avaliação do consumo de glicose e xilose e geração de etanol por HPLC	29
3.1.3	Análise filogenética	30
3.2	Isolamento e purificação da lignina	30
3.3	Caracterização estrutural da lignina	31
3.3.1	ATR-FTIR	32
3.3.2	NMR	32
3.3.3	Espectrometria de massas	32
3.3.4	Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	33
4.	Resultados e Discussão	34
4.1	Isolamento e triagem dos microrganismos	34
4.1.1	Avaliação do crescimento em meio líquido e toxicidade da lignina	36
4.1.2	Identificação filogenética	41
4.2.1	Caracterização estrutural da lignina	46
4.2.1.1	Modificações estruturais na lignina avaliadas por ATR-FTIR	51
4.2.1.2	Modificações estruturais na lignina avaliadas por NMR	52

4.2.1.3 Modificações estruturais na lignina avaliadas por HPLC-MS	55
4.2.1.4 Modificações estruturais na lignina avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM)	59
5. Conclusões	65
6. Referências	66
7. Anexos	71
7.1 Identificação filogenética da <i>C. parapsilosis</i> (M2)	71
7.2 Identificação filogenética da <i>C. parapsilosis</i> (M3)	76

1. Introdução

1.1 Motivação

Com o crescimento populacional a agricultura moderna vem utilizando com muita intensidade máquinas e insumos químicos nas plantações, visando uma maior produção de alimentos e consequentemente gerando uma maior quantidade de resíduos, os quais podem contaminar tanto a água quanto os solos se não forem corretamente descartados e/ou tratados. Em contrapartida as crescentes atividades industriais aumentaram a demanda por fontes renováveis de energia, os biocombustíveis, combustíveis que podem ser gerados a partir dos resíduos agrícolas, que são classificados em biomassas lenhosas e não lenhosas, conforme ilustrado na Figura 1 (TORRES; TARIFA, 02/2012).



Figura 1. Principais tipos de biomassa vegetais e processos de conversão utilizados para obtenção do produto final onde materiais lenhosos podem sofrer combustão direta e pirólise gerando, respectivamente, eletricidade e carvão. Os materiais lenhosos lignocelulósicos são utilizados para produção de polpa cítrica e biogás e os materiais não lenhosos oleoginosos são usados para produção do biogás e biocombustíveis (TORRES; TARIFA, 2012).

Dentre os biocombustíveis, o etanol de segunda geração (2G), ocupa uma posição de destaque (TORRES; TARIFA, 02/2012). Por essa razão, escolheu-se trabalhar com o resíduo proveniente da produção do suco de laranja, para a produção do etanol 2G, uma vez que o Brasil é o maior produtor de laranja do mundo, seguido pela China, Estados Unidos, União Europeia e México (“The World Citrus Industry - Encyclopedia of Life Support Systems”,) e grande parte da safra de laranja produzida é utilizada para produção de suco, que gera aproximadamente 50% de resíduos. Na safra de 2016/2017 o Brasil produziu 1,8 mil toneladas de suco de laranja, o que correspondente a cerca de 56% da produção mundial (NEVES; TROMBIN, 2017).

Após a extração do suco, o resíduo industrial, é geralmente transformado em polpa cítrica peletizada utilizada na alimentação do gado, mas também pode ser utilizado na produção do bioetanol, por se tratar de um resíduo lignocelulósico não lenhoso (Figura 1).

Na produção do bioetanol o processo de hidrólise do resíduo proveniente do processamento do suco de laranja (CPWO: *Citrus Processing Waste from Oranges*) pode ser realizado por enzimas utilizando, celulasas (endoglucanases e exoglucanases), pectinases e β -glicosidases e o processo de fermentação é conduzido por uma combinação de leveduras, apresentando excelentes rendimentos fermentativos para a produção de etanol (TSUKAMOTO; DURÁN; TASIC, 2013). As β -Glicosidases (BGL) e a β -D-glicohidrolase ou celobiase (EC 3.2.1.21), são enzimas capazes de hidrolisar a celobiose liberando a glicose. Já as celulasas são divididas em dois subgrupos compostos por endo-e exoglucanases. Endoglucanases clivam as cadeias gerando oligossacarídeos insolúveis com até seis glicoses, já as exoglucanases clivam ligações glicosídicas β 1 \rightarrow 4 gerando dissacarídeos (MARIÑO BOHÓRQUEZ; OTHERS, 2017).

Entretanto, a lignina oferece uma barreira física ao redor da celulose e da hemicelulose dificultando a ação de enzimas e, conseqüentemente, provocando a redução no rendimento fermentativo para produção de etanol 2G. Por esse motivo, enzimas capazes de degradar a lignina tornaram-se alvo de estudos ao longo dos últimos anos (OGEDA; PETRI; OTHERS, 2010).

Devido ao grande desafio envolvendo a hidrólise do material lignocelulósico e a inevitável geração de resíduos provenientes da obtenção do suco de laranja, torna-se importante o estudo de maneiras de promover a degradação da biomassa gerada.

1.2 Composição do material lignocelulósico

A biomassa lignocelulósica é composta por uma matriz dura e fibrosa, na qual as fibras flexíveis, a celulose, hemicelulose e a pectina são embebidas por uma matriz de lignina, conforme ilustrado na Figura 2 (KLEMM et al., 2005). A porcentagem de cada um dos componentes principais varia entre 30 a 50% para a celulose, 20 a 40% para a hemicelulose e 10 a 20% para a lignina (MIKA; CSÉFALVAY; NÉMETH, 2018).

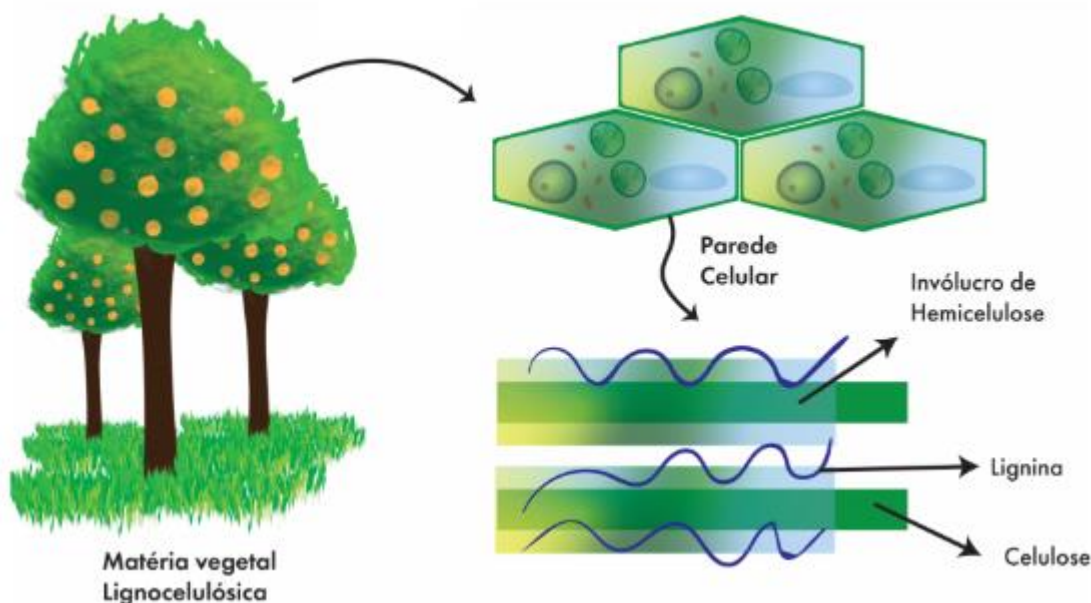


Figura 2. Recursos e composição da matéria vegetal lignocelulósica em que a parede celular é composta por um invólucro de hemicelulose, lignina e celulose (Adaptado de Mika *et al* 2018)

O conteúdo e a composição de açúcares presentes (pentoses e hexoses) influencia a produção teórica de etanol a partir do material lignocelulósico e a alta concentração de hexoses aponta para um recurso economicamente interessante.

A caracterização quali- e quantitativa dos componentes da biomassa é o primeiro passo quando se avalia o uso de biomassa e é indispensável na produção de biocombustíveis. A composição da biomassa depende de vários parâmetros como

a localidade, condições climáticas e o solo em que a planta cresce (SINGH; MAHANTA; BORA, 2017).

1.2.1 Celulose

A celulose é um homopolímero formado apenas por monômeros de β -glicose com fórmula molecular $(C_6H_{10}O_5)_n$ e com ligações (β 1 \rightarrow 4), conforme mostrado na Figura 3. A estrutura molecular possui duas extremidades: uma não redutora (Carbono 4) e uma redutora (Carbono 1, da última unidade da glicose na cadeia do polissacarídeo), conforme ilustrado na Figura 3:

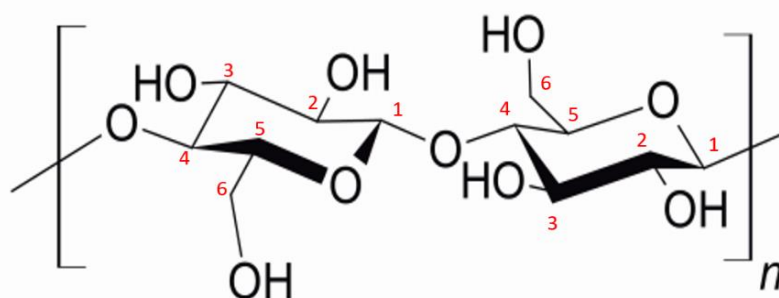


Figura 3. Representação gráfica da estrutura química da celulose, onde 1 a 6 representam números de carbono em unidade monomérica de β -D glicopirranose e n representa o número de monômeros (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008).

A celobiose é a unidade conformacional da celulose (4-O- β -D-glucopiranosil-D-glucopirranose) em que as moléculas de glicose encontram-se ligadas a 180° e se mantêm dessa forma através de ligações de hidrogênio inter e intracadeia, conforme ilustrado na Figura 4.

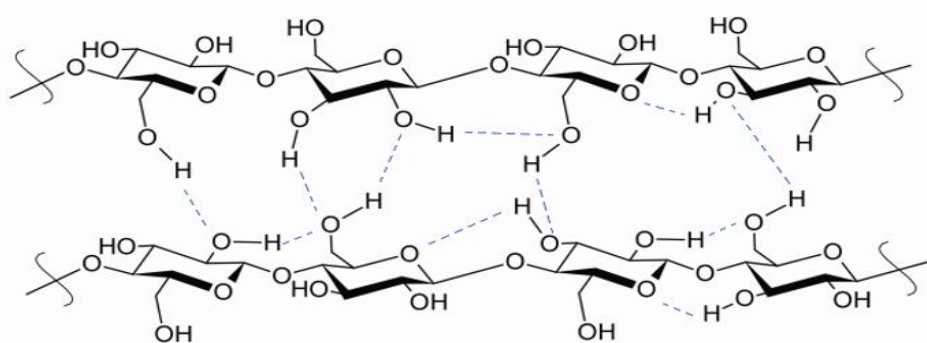


Figura 4. Representação gráfica das ligações de hidrogênio inter e intracadeia da celulose (RAMOS, 2003)

A celulose é o polímero orgânico mais comum e é considerado uma fonte renovável de matéria prima para aplicações tecnológicas ecologicamente sustentáveis (KLEMM et al., 2005).

1.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolímero formado por aldopentoses (xilose e arabinose), aldo-hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos. Uma das características deste polissacarídeo é a presença de diferentes unidades monoméricas que contribuem para a complexidade da estrutura e diferente composição desse heteropolímero (SANTOS et al., 2012).

Dependendo do tipo de biomassa, existe a predominância de certas estruturas na hemicelulose. Por exemplo, nas coníferas, também conhecidas como madeiras moles (*softwoods*) existe a predominância de galactoglucomanas. Nas madeiras duras (*hardwoods*) predominam as arabinoglucuroxilanas. Já em gramíneas, encontram-se xiloglucanas e arabionoglucuronoxilanas (ANDÉREZ FERNÁNDEZ et al., 2018). A composição de diferentes biomassas é descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Composição de biomassa das madeiras moles (*softwood*) e madeiras duras (*hardwood*) (ANDÉREZ FERNÁNDEZ et al., 2018)

Componente	Softwood (%)	Hardwood (%)
Celulose	38 ± 5	44 ± 6
Hemicelulose	25 ± 4	24 ± 6
<i>Galactoglucomanas</i>	17 ± 3	2,5 ± 1
<i>Arabinoglucuroxilanas</i>	8 ± 3	23 ± 7
Lignina	34 ± 7	24 ± 3

A estrutura química da xilana, componente presente na hemicelulose, encontra-se descrita na Figura 5 a seguir:

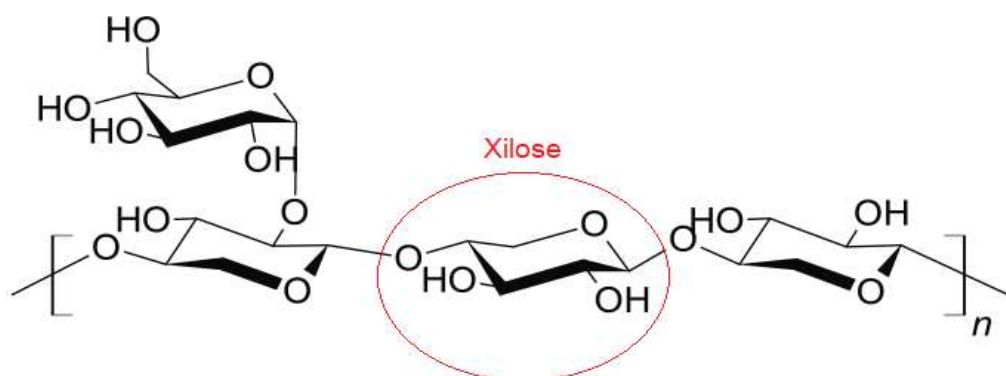


Figura 5. Representação gráfica da xilana composta predominantemente por monômeros de xilose em destaque onde n representa o número de monômeros (ANDÉREZ FERNÁNDEZ *et al.*, 2018).

1.2.3 Pectina

A **pectina** (Figura 6) é composta de oligo- e polissacarídeos contendo, predominantemente, resíduos de ácido galacturônico (SANTI; BERGER; DA SILVA, 2014). É responsável pelo controle da porosidade, adesão e ambiente iônico da parede celular vegetal. O ácido galacturônico auxilia nos mecanismos de defesa, pois é um componente essencial de elicitores ativos da parede celular. Os elicitores promovem o acúmulo de fitoalexinas, substâncias antimicrobianas de baixa massa molecular (CANTERI *et al.*, 2012).

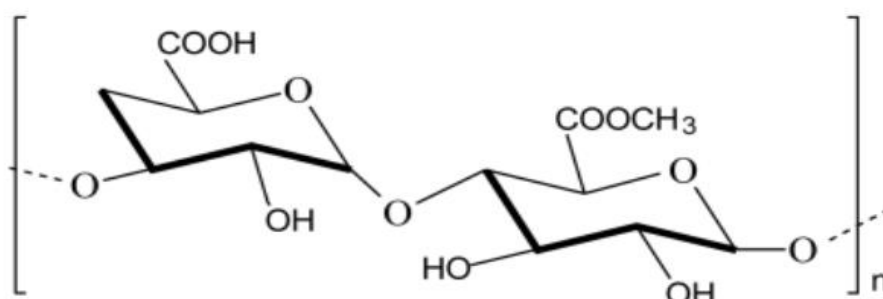


Figura 6. Ilustração da estrutura da pectina, onde ocorre a predominância de ácido D-Galacturônico e n representa o número de monômeros (SANTI; BERGER; DA SILVA, 2014).

A pectina é um dos principais componentes da parede celular vegetal e provavelmente a macromolécula mais complexa da natureza, uma vez que pode ser composta por até 17 monossacarídeos contendo mais de 20 ligações diferentes. A pectina é utilizada em alimentos como gelificante, estabilizante e espessante em bebidas lácteas e sorvetes. A maior parte da pectina usada pela indústria de alimentos origina-se de frutas cítricas, em especial a laranja (VORAGEN et al., 2009).

1.2.4 Lignina

A celulose e hemicelulose são entrelaçadas com uma substância amorfa, a **lignina**, uma macromolécula fenólica formada a partir da polimerização de três precursores principais: álcool *p*-cumarílico (H), álcool coniferílico (G) e álcool sinapílico (S) (Figura 7), os quais diferem entre si pelo grau de metoxilação (RAMOS, 2003; CHEN, 2014; BARROS et al., 2018).

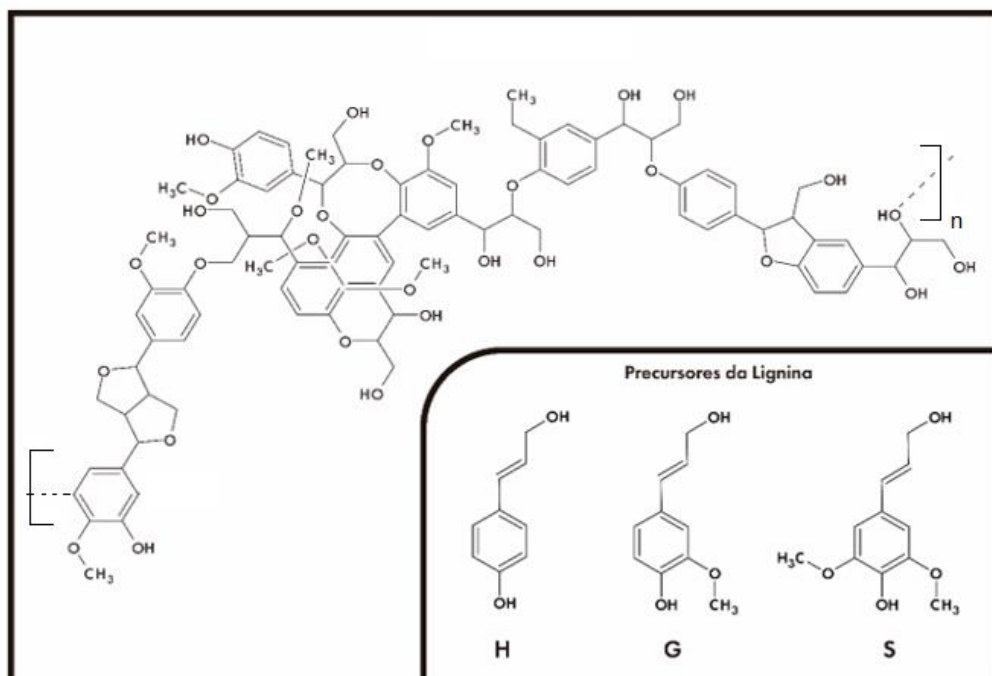


Figura 7. Estrutura química hipotética da lignina em que H, G e S representam os principais precursores do polímero (respectivamente álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico) e *n* representa o número de monômeros (BARROS et al., 2018).

O anel aromático dos três álcoois é chamado de *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), quando ele não é metoxilado, ou possui uma ou duas metoxilas, respectivamente (LOURENÇO; PEREIRA, 2018). Ligninas com maior metoxilação são menos condensadas devido a forças de repulsão de London e são mais susceptíveis à degradação (RAMOS, 2003).

A lignina tem sido objeto de pesquisas intensivas nos últimos séculos. Desde 1908 foram publicados cerca de 27 000 trabalhos relacionados ao tema incluindo livros, artigos e revistas (LOURENÇO; PEREIRA, 2018). A lignina foi estudada por Constant e colaboradores (2016) que observaram que a sua composição depende do tipo de substrato e do método usado para sua extração. Em geral, a lignina possui cerca de 1% de carboidratos (arabinose, xilano, galactano, glucanos e mananos) além de álcoois aromáticos derivados do fenol (CONSTANT et al., 2016).

A característica mais importante da lignina é a sua rigidez, a qual atua não apenas dando força ao tecido vegetal e aumentando a sua resistência, mas também impede o colapso dos elementos condutores de água devido à sua hidrofobicidade (RAMOS, 2003; LOURENÇO; PEREIRA, 2018). A lignina proporciona uma barreira física ao redor da celulose e da hemicelulose dificultando a ação de enzimas e, conseqüentemente, provoca a redução do rendimento fermentativo para a produção de etanol 2G. Por esse motivo, enzimas capazes de degradar a lignina tornaram-se alvo de estudo ao longo dos últimos anos (OGEDA; PETRI; OTHERS, 2010).

Devido à estrutura variável e a complexa organização das hemiceluloses com a celulose e lignina, a completa degradação da hemicelulose exige a ação combinada de diversas enzimas como endoenzimas, exoenzimas e enzimas auxiliares. Os principais grupos dessas enzimas são as xilanases, β -mananases, α -L-arabinofuranosidases, β -xilosidases, entre outros (OGEDA; PETRI; OTHERS, 2010; KIRK, 2018).

Na natureza, a degradação da lignocelulose ocorre pela ação conjunta de enzimas que promovem a hidrólise e a oxidação do material. Dentre as enzimas hidrolíticas, as xilanases apresentam ótimos resultados quando se refere ao clareamento e branqueamento. Embora não atuem diretamente na degradação da lignina, as xilanases degradam os xilanos, componentes majoritários da hemicelulose a qual encontra-se entrelaçada à lignina, tornando-a mais disponível para a ação de outras enzimas (WOOLRIDGE, 2014).

1.2.5 Composição da laranja

CONSTANT et al., 2016 reportaram 45,1% de carbono; 1,04% de nitrogênio, 5,95% de hidrogênio e 44,4% de oxigênio como composição elementar da casca de laranja seca e o bagaço de laranja seco contém: pectina (42,5%), açúcares solúveis (16,9%), celulose (9,21%), proteínas (6,5%), amido (3,75%), hemicelulose (10,5%), cinzas (3,5%), gordura (1,95%) e lignina (0,84%), conforme ilustrado na Figura 8 (RIVAS et al., 2008; CONSTANT et al., 2016):

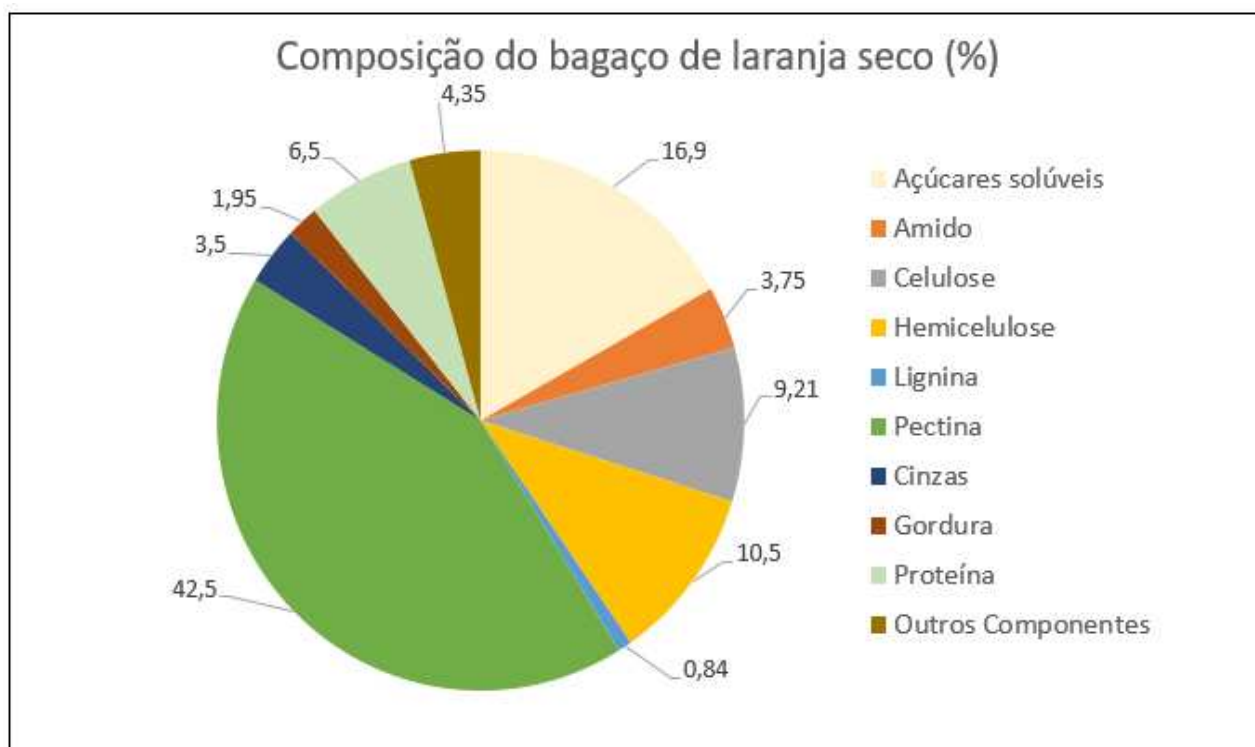


Figura 8. Composição do bagaço de laranja seco onde observa-se a presença de pectina (42,5%), açúcares solúveis (16,9%), celulose (9,21%), proteínas (6,5%), amido (3,75%), hemicelulose (10,5%), cinzas (3,5%), gordura (1,95%) e lignina (0,84%) (RIVAS et al., 2008; CONSTANT et al., 2016)

A biomassa proveniente da laranja possui baixo teor de lignina e alto teor de pectina, quando comparada com outros resíduos vegetais, como por exemplo o bagaço de cana o qual possui aproximadamente 7% de lignina (AWAN; TSUKAMOTO; TASIC, 2013; CYPRIANO; DA SILVA; TASIC, 2018)(LI; GE, 2011)(AWAN; TSUKAMOTO; TASIC, 2013; CYPRIANO; DA SILVA; TASIC, 2018). Muitos fatores podem influenciar o conteúdo de nutrientes presentes nos resíduos de laranja, incluindo o método de processamento e clima de cultivo. O Brasil é um país

tropical, o que faz com que as frutas levem menos tempo para crescer e amadurecer, gerando um menor tempo de maturação que pode levar a um menor teor de pectina nas frutas (AWAN; TSUKAMOTO; TASIC, 2013).

1.3 Degradação do material lignocelulósico

O processo envolvendo a degradação da lignina gera uma grande quantidade de produtos secundários aromáticos, os quais são tóxicos para a maioria dos microrganismos. (ASINA et al., 2017). Dentre esses componentes, destacam-se o furfural e hidroximetilfurfural, ambos gerados a partir da degradação térmica de açúcares (LIU et al., 2012).

Uma das vantagens da biodegradação em relação a degradação térmica, é a possibilidade do processo ocorrer a temperaturas mais baixas e próximas da do ambiente, temperatura ideal para atuação das enzimas (ASINA et al., 2017).

Para sobreviver, os microrganismos desenvolveram, durante o curso da evolução, mecanismos fisiológicos para lidar com uma variedade de fatores ambientais. Um desses mecanismos é o saprofitismo, o qual consiste na alimentação proveniente de matérias em decomposição, sendo que a degradação é auxiliada pela liberação de enzimas capazes de hidrolisar a matéria orgânica (DE SOUZA, 2013).

A degradação do material lignocelulósico pode ser realizada por bactérias, fungos e leveduras. A degradação bacteriana é mais restrita a substratos contendo baixos teores de lignina, uma vez que a maioria das bactérias são pouco resistentes a esse componente devido a sua toxicidade ((DE SOUZA, 2013).

1.3.1 Bactérias

Dentre as bactérias estudadas, destaca-se a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), um patógeno Gram-negativo, responsável pelo cancro cítrico, que produz um coquetel de enzimas capazes de degradar o material lignocelulósico da casca da laranja (AWAN; TSUKAMOTO; TASIC, 2013) e teve seu genoma completamente sequenciado em 2002 por SILVA e colaboradores, cujo trabalho apontou para a biossíntese de enzimas celulósicas, hemicelulósicas e pectinolíticas (DA SILVA et al., 2002).

1.3.2 Bolores e leveduras

Dentre os fungos destacam-se a *Trichoderma reesei* devido à sua grande capacidade de produção de celulasas e o *Aspergillus niger* pelas suas inúmeras aplicações industriais. A fermentação da cana de açúcar usando leveduras para obtenção de etanol é um processo bem conhecido e consolidado. A levedura mais comumente utilizada na fermentação do açúcar presente na cana é a *Saccharomyces cerevisiae*. Ela é capaz de transformar a glicose em etanol, porém, não consegue fermentar pentoses, como xilose e arabinose (AWAN; TSUKAMOTO; TASIC, 2013). Entretanto existem algumas leveduras capazes de fermentar as pentoses, como a *Pichia stipitis*, a *Candida shehatae* e a *Pachysolen tannophilus* (DE SOUZA, 2013).

A *Candida athensensis* SB18 é capaz de produzir xilitol com excelente rendimento e produtividade a partir da xilose. Porém, compostos fenólicos afetam negativamente o seu desempenho fermentativo, pois reduzem a atividade da xilose redutase. Dentre os compostos estudados, o fenol e o siringil são os mais nocivos para a *Candida athensensis* SB18 (ZHANG et al., 2012).

OBASI e colaboradores (2014) estudaram a incidência de leveduras no suco de laranja e notaram algumas espécies predominantes, dentre as quais: a *Candida krusei* (56,86%), a *Rhodotorula minuta* (19,60%), a *Candida zeylanoides* (7,84%), a *Candida parapsilosis* (5,88%), a *Geotrichum capitatum* (3,92%), a *Candida lusitaniae* (1,96%), a *Candida norvegensis* (1,96%) e a *Kodamea ohmer* (1,96%). Sendo demonstrado que todas as espécies de *Candida* encontradas no suco possuem os genes da xilose redutase e da xilitol hidrogenase, responsáveis pela fermentação da xilose (OBASI et al., 2014).

A *Candida parapsilosis* foi inicialmente descrita por ASHFORD em 1928 como uma espécie de *Monilia* encontrada em pacientes que sofriam de diarreia. Porém, em 1932 foi reclassificada por LANGERON e TALICE como *Candida parapsilosis* (CORDEIRO et al., 2017). Trata-se de uma das espécies mais abundantes presentes em suco de laranja, conforme estudo realizado por ARIAS e colaboradores (2002), onde foram observados os seguintes microrganismos: a *Candida parapsilosis* (55%), a *Candida intermedia* (28%), a *Clavispora lusitaniae* (12%), a *Saccharomyces cerevisiae* (12%), a *Candida tropicalis* (8%), a *Candida zeylanoides* (8%) e a *Torulaspora delbrueckii* (8%) (ARIAS et al., 2002).

TSUKAMOTO e colaboradores (2013) isolaram vinte microrganismos da casca da laranja, dentre os quais a *Candida parapsilosis* apresentou um maior rendimento na produção de bioetanol a partir dos resíduos de citros (TSUKAMOTO; DURÁN; TASIC, 2013).

Diante da avaliação da literatura, resolveu-se isolar os microrganismos presentes na casca da laranja e seguir os ensaios apenas com as culturas com aparência morfológica de leveduras.

1.4 Enzimas hidrolíticas

As enzimas têm sido utilizadas - na forma de leveduras - desde a antiguidade, para a produção de pães, cervejas e outras bebidas fermentadas. Na década de 1960, o uso delas iniciou-se em larga escala industrial e, desde então, o número de processos têm crescido. Atualmente, as enzimas são largamente utilizadas no mercado de nutrição animal para aumentar a digestibilidade e disponibilidade de nutrientes. Dessa forma, o crescimento do mercado é atribuído ao aumento da população mundial e, conseqüentemente, na maior demanda por alimentos de origem animal (MANISHA; YADAV, 2017).

De acordo com o relatório do mercado de enzimas, espera-se um crescimento de 9,6% na Ásia no período entre 2017 e 2022. A Ásia apresenta a maior perspectiva de crescimento do mercado, seguida pela América do Norte, Europa, América do Sul e África, conforme ilustrado na Figura 9.

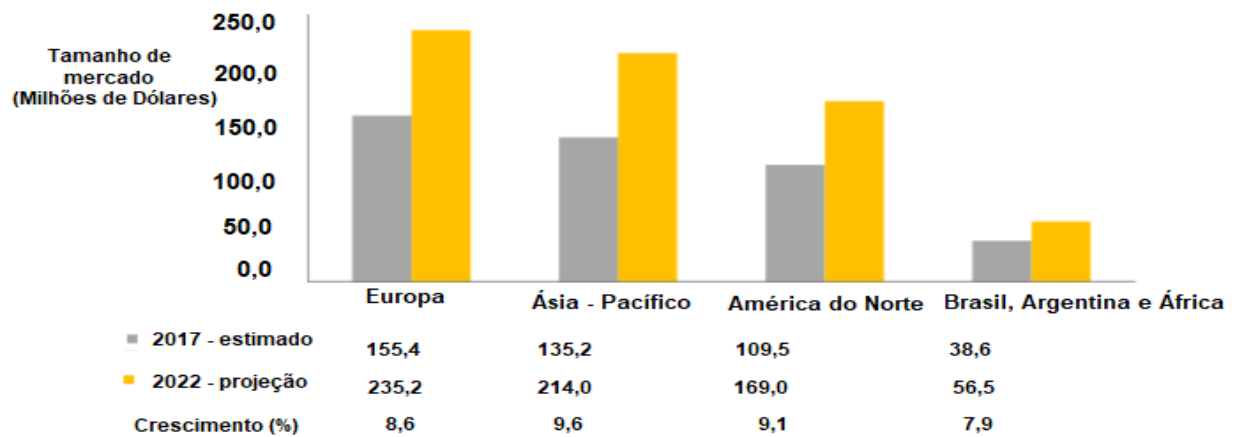


Figura 9. Tamanho do mercado de enzimas projetado para 2022 em que a Ásia apresenta maior estimativa de crescimento, seguido por América do Norte, Europa e Brasil, Argentina e África (MARKETS, 2017).

Entre os diversos tipos de enzimas, as xilanases ocupam a maior fração do mercado (*market share*), conforme apresentado na Figura 10 (MARKETS, 2017).

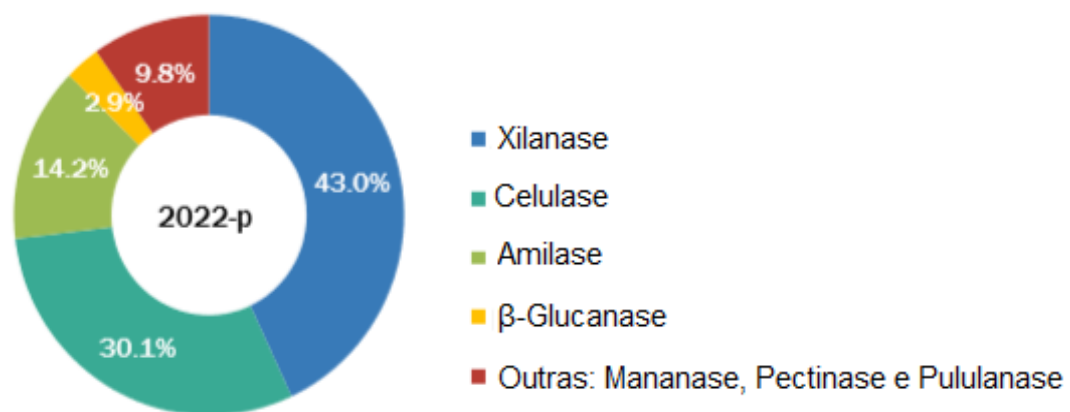


Figura 10. Fração do mercado (*market share*) estimado para enzimas em 2022 indicando que xilanases e celulosas representam a maioria do mercado, seguido por amilase e β -glucanase (MARKETS, 2017).

Cada uma das enzimas (Figura 10) é capaz de degradar uma fração do material lignocelulósico, por exemplo, presente em rações destinados à alimentação animal. As xilanases destacam-se pela capacidade de degradar tanto a hemicelulose como as xilanas em pentoses e hexoses, melhorando a digestibilidade de plantas e reduzindo a espessura do trato gastrointestinal, o que promove uma maior absorção de nutrientes. Por outro lado, as celulases são responsáveis pela degradação da celulose e das fibras (MARKETS, 2017). O material lignocelulósico é composto por lignina, uma macromolécula fenólica, a qual pode ser degradada por lacases. Lacase é um grupo de enzimas hidrolíticas que catalisam a oxidação de diversos compostos aromáticos, em especial fenólicos através da formação de radicais fenólicos livres (DURÁN et al., 2002). Podem ser produzidas por diferentes tipos de microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras, apresentando grande variação no seu peso molecular e estrutura. A maioria dos trabalhos reportados pela literatura referem-se à lacases provenientes de fungos e leveduras, porém, estudos recentes apontam a presença cada vez maior de lacases provenientes de bactérias (DE GONZALO et al., 2016).

O maior aproveitamento nutricional e energético promovido pelo uso de enzimas faz com que uma quantidade menor de alimento seja necessária para promover o ganho de peso ideal para o abate, aumentando a conversão alimentar e a produtividade (MARKETS, 2017).

Outra aplicação do uso de enzimas hidrolíticas é a utilização na produção de etanol 2G a partir do material lignocelulósico que consiste em resíduo subaproveitado. A maior demanda energética e a procura por soluções com menor impacto ambiental fizeram com que diversos pesquisadores procurassem microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas capazes de degradar o material lignocelulósico e produzir etanol 2G de modo economicamente viável. Dessa forma, o presente trabalho será focado no estudo de enzimas hidrolíticas devido a sua capacidade de promover a hidrólise do material lignocelulósico.

2. Objetivos

Nosso principal objetivo foi isolar alguns microrganismos presentes no bagaço da laranja capazes de degradar o material lignocelulósico em altas concentrações de lignina e com maior afinidade para xilose.

Como objetivos específicos destacam-se:

- Isolar, purificar e caracterizar a lignina do bagaço da laranja;
- Isolar leveduras presentes no bagaço da laranja e avaliar o seu crescimento em meios contendo xilose, glicose e lignina em diferentes concentrações;
- Selecionar microrganismos capazes de crescer na presença de xilose e elevadas concentrações de lignina;
- Avaliar modificações estruturais na lignina e geração de metabólitos após a fermentação com o microrganismo escolhido;
- Identificação filogenética do(s) microrganismo(s) com melhor desempenho.

3. Materiais e métodos

3.1 Isolamento dos microrganismos do bagaço da laranja e triagem

Realizou-se o isolamento das culturas a partir do bagaço de laranja industrial não estéril, conforme descrito por (TSUKAMOTO; DURÁN; TASIC, 2013). Pequenos pedaços de casca de laranja foram incubados de 24-48 h a 30 °C. em placas de Petri estéreis contendo meio sólido YPD - *Yeast extract* - *Peptone* - *Dextrose* (20 g L⁻¹ de glicose, 10 g L⁻¹ extrato de levedura, 20 g L⁻¹ peptona, 15 g L⁻¹ ágar e 30 mg mL⁻¹ de cloranfenicol). Após a incubação, as colônias que cresceram isoladas foram selecionadas e transferidas para outra placa de Petri contendo meio sólido YPD e novamente incubadas a 30 °C por 24 h. O esgotamento foi repetido mais quatro vezes a fim de garantir que a colônia fosse de apenas um microrganismo. Após o isolamento, as colônias resultantes foram avaliadas de acordo com sua morfologia, e aquelas identificadas como leveduras foram empregadas no ensaio fermentativo.

Para a fermentação em meio líquido, preparou-se um pré-inóculo a partir de uma colônia em 20 mL de YPD e seguida por incubação por 20 h a 30 °C. Uma fração da cultura foi armazenada em freezer a -20 °C e -80 °C com glicerol 85% estéril para ser utilizada posteriormente. O restante foi centrifugado por 10 min a 5000 rpm, lavado com água destilada estéril e suspenso em água estéril conforme descrito por (MARTINS et al., 2018). Em seguida, a cultura foi inoculada contendo 25 mL de meio mínimo contendo glicose ou xilose, conforme indicado na Tabela 2:

Tabela 2. Composição dos meios líquidos de cultura com glicose (G30) e xilose (X30)

Componentes	Meio G30 (g L ⁻¹)	Meio X30 (g L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	2,0	2,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0	2,0
MgSO ₄ 7H ₂ O	1,0	1,0
Uréia	0,3	0,3
CaCl ₂	0,3	0,3
Glicose	30,0	0,0
Xilose	0,0	30,0

Os inóculos com leitura em espectrofotômetro a 600 nm inicial igual a 1,0 foram incubados a 30 °C por 48 h e amostras foram retiradas nos seguintes tempos: 0; 1,5; 6; 24; 30 e 48 h para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

do consumo de glicose e produção de etanol. O crescimento foi acompanhado durante 24 h.

Posteriormente, realizou-se a avaliação do comportamento dos microrganismos em meio contendo lignina em duas concentrações: 20 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹. O preparo do pré-inóculo e inóculo foram realizados conforme descrito anteriormente. A incubação foi estendida para 164 h a fim de avaliar, por meio de plaqueamento em meio sólido YPD, a resistência das culturas frente altas concentrações de lignina. A composição dos meios contendo lignina encontram-se descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Composição dos meios líquidos de cultura com lignina (L20 e L30)

Componentes	Meio L20 (g L ⁻¹)	Meio L30 (g L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	2,0	2,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0	2,0
MgSO ₄ 7H ₂ O	1,0	1,0
Uréia	0,3	0,3
CaCl ₂	0,3	0,3
Lignina	20,0	30,0

3.1.1 Avaliação morfológica das colônias

Após o término da fermentação em meio contendo lignina, avaliou-se a morfologia das células macroscopicamente. A avaliação visual das colônias em placas de Petri contendo meio sólido YPD foi conduzida usando microscópio óptico com objetiva de 40 vezes.

3.1.2 Avaliação do consumo de glicose e xilose e geração de etanol por HPLC

As quantidades de etanol e de glicose dos caldos fermentativos, foram determinadas utilizando o HPLC da marca *Alliance* (*Waters, EUA*) com uma pré-coluna *SH-G* (6 x 50 mm) *Shodex de 1011* e uma coluna semelhante (300 mm x 8 mm) (*Showa Denko*, Japão) e um detector de índice de refração (*Model-2414, Waters, EUA*). Manteve-se a temperatura da coluna a 50 °C e utilizou-se ácido sulfúrico (0,005 mol L⁻¹, desgaseificado) como fase móvel com um fluxo de 0,6 mL min⁻¹. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 5000 rpm, filtradas com filtro de PTFE de 0,45 µm e

mantidas em *vials* de HPLC. Para construção das curvas de calibração, os padrões foram adquiridos da *Synth* ou *Sigma Aldrich*.

3.1.3 Análise filogenética

As placas de Petri contendo os microrganismos selecionados devido ao melhor desempenho foram encaminhadas para o CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Química, Biológicas e Agrícolas) para análise filogenética. Cada amostra foi repicada e o seu DNA genômico foi extraído utilizando o protocolo de extração de DNA com fenol (AAMIR et al., 2015). Após a extração do DNA, amplificou-se a região D1/D2 (DNAr 26S) por PCR usando os *primers* NL-1m e NL-4m, os quais são complementares à região D1/D2. Após amplificação a amostra foi purificada em coluna (*GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit, GE Healthcare*) e sequenciamento foi conduzido em sequenciador automático *AB13500XL Series (Applied Biosystem)*. As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados do *CBS-Knaw* e *Genbank*.

3.2 Isolamento e purificação da lignina

Realizou-se o isolamento da lignina a partir do bagaço de laranja *in natura* e da polpa cítrica peletizada conforme procedimento descrito por (BARROS et al., 2018) e colaboradores (2018).

Submeteu-se o material de partida a uma extração sequencial para obter a lignina purificada Primeiramente pesou-se 100 g do bagaço e realizou-se a extração dos óleos essenciais com 500 mL de éter de petróleo durante 1 h 30 min em extrator do tipo *Soxhlet*, em seguida alterou-se o solvente para metanol (500 mL) para extrair os bioflavonóides durante 4 h e o sólido restante foi seco. Após a secagem, o bagaço foi misturado com água destilada em ebulição (1000 mL) em um erlenmeyer durante 1 h para remoção dos açúcares livres solúveis, pectina solúvel em água e proteínas. Em uma próxima etapa, utilizou-se uma solução de HCl (0,05 mol L⁻¹) em ebulição para remover a pectina solúvel em ácido, mantendo o erlenmeyer sob agitação durante 1 h. Após filtração e lavagem com água quente, o resíduo foi submetido à remoção de pectina solúvel em meio alcalino utilizando uma solução de NaOH 0,3% (m/v) em ebulição durante 1 h.

Na sequência a extração da lignina foi realizada em meio alcalino utilizando uma solução de NaOH 3% (*m/v*) em ebulição sob agitação durante 1 h e foi obtido, por filtração a vácuo, um líquido castanho avermelhado contendo a lignina. Em seguida adicionou-se ao líquido lentamente uma solução de H₂SO₄ 10% (*v/v*) até pH 5,5. Utilizando filtração a vácuo, obteve-se um líquido castanho avermelhado no filtrado. Posteriormente, adicionou-se lentamente uma solução de H₂SO₄ 10% ao licor até pH 5,5. A solução foi deixada novamente sob agitação durante 10 min e posteriormente houve uma nova adição de H₂SO₄ 10% até pH 3,0. Neste ponto, observaram-se sinais claros de precipitação, a mistura foi deixada em geladeira a 10 °C durante 16 h para precipitação completa e a lignina foi obtida após filtração a vácuo e lavada com pequenas porções de água, acetona e álcool *iso*-propílico.

A recristalização foi realizada utilizando NaOH 3% (*m/v*), e precipitação com H₂SO₄ 10%(*m/v*), sendo que a lignina foi filtrada a vácuo, lavada com pequenas porções de água, acetona e álcool *iso*-propílico e o sólido foi liofilizado para remoção completa da água.

Após o término da secagem pesou-se a lignina extraída e purificada a fim de calcular o rendimento final do processo.

3.3 Caracterização estrutural da lignina

A caracterização estrutural da lignina foi obtida através de duas técnicas analíticas: espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) e ressonância magnética nuclear (NMR). Já as modificações estruturais na lignina devido à ação enzimática foram avaliadas utilizando as técnicas de ATR-FTIR, NMR, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) e microscopia eletrônica de varredura (SEM).

3.3.1 ATR-FTIR

As amostras de lignina seca, antes e depois da fermentação, foram submetidas à análise por ATR- FTIR. Foi utilizado o espectrofotômetro da Agilent *CARY 630* ATR com 64 varreduras, resolução de 4 cm^{-1} e janela espectral de 4000 a 400 cm^{-1} . Uma pequena quantidade de amostra foi inserida sobre o prisma do equipamento e prensada com um pistão de diamante.

3.3.2 NMR

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) da lignina foram obtidos num espectrômetro *Bruker AVANCE III* 600 MHz equipado com uma sonda de 5 mm (TBI) a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Aproximadamente 20 mg de lignina purificada foram dissolvidas em *DMSO-*d*6* (39,5 ppm) com auxílio de banho de ultrassom (30 min), seguida por filtração simples. O espectro bidimensional (*HSQC, Heteronuclear Single Quantum Coherence*) foi obtido no mesmo equipamento com sonda TBI padrão, 256 varreduras para f_2 e 4k de f_1 , com 2 segundos de atraso.

Já nos experimentos de CP/MAS ^{13}C NMR no estado sólido foram as amostras liofilizadas usando o instrumento *Bruker AMX-300 MHz* (*Bruker, Billerica, MA, EUA*) operando a 7,05 T e 75,47 MHz com polarização cruzada (*Cross Polarization - CP*) e rotação do ângulo mágico (MAS). A aquisição da sequência de pulso foi realizada usando uma taxa de 3000 Hz, um pulso de 90° para 1,5 ms e um pulso de contato de 800 ms. O número de scans foi de 10.000 e o atraso de 3.0 s foi usado para repetições (MARINÓ et al., 2015).

3.3.3 Espectrometria de massas

O sobrenadante obtido por centrifugação após o processo de fermentação foi submetido à análise por HPLC-MS/MS, usando um cromatógrafo líquido de ultra eficiência (*Acquity*) acoplado ao espectrômetro de massas (*Micromass Quattro MicroTM API*), com fonte de ionização por *electrospray* e analisador triplo quadrupolo, ambos da marca *Waters*. Antes da aplicação no equipamento o sobrenadante foi diluído com metanol levemente acidificado (0,1%) e agitado em vortex por cerca de 1 min . Sendo utilizada a coluna BEH C18 contendo partículas de $1,7\text{ }\mu\text{m}$ e com

dimensões 2,1 x 50 mm, com fluxo de 0,35 mL min⁻¹ e eluição por gradiente, conforme Tabela 4.

Tabela 4. Gradiente da fase móvel HPLC

Tempo (minutos)	Água com 0,025% de NH ₄ OH	Acetonitrila com 0,025% de NH ₄ OH
0	90%	10%
12	5%	95%
13	90	10
15	90	10

A razão massa: carga (m/z) iniciou-se em 100 Da até 1000 Da. A fonte de ionização por *electrospray* teve seus parâmetros ajustados de acordo com a Tabela 5 e os resultados foram avaliados usando o software do equipamento (*MassLynx*).

Tabela 5. Parâmetros do *electrospray*

Parâmetro	Valor
Capilar	3,0 kV
Extrator	3 V
Temperatura da fonte	120 °C
Temperatura de dessolvatação	400 °C
Fluxo de gás de dessolvatação	800 L h ⁻¹
Fluxo de gás do cone	50 L h ⁻¹

3.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

O microscópio eletrônico (*JSM-6360LV*, *JEOL*, Japão) foi utilizado para analisar as amostras de lignina. O recobrimento das amostras foi realizado através da fixação em um suporte com o auxílio de uma fita de carbono autocolante. As imagens foram obtidas utilizando uma voltagem de aceleração de 5 KV, e as imagens foram ampliadas 8000 e 500 vezes.

4. Resultados e Discussão

4.1 Isolamento e triagem dos microrganismos

No total foi possível isolar 8 leveduras e 17 fungos, a partir da incubação de pequenos pedaços de casca de laranja em meio YPD sólido contendo cloranfenicol (30 mg mL^{-1}) e conforme mencionado anteriormente, foram utilizadas apenas as leveduras nesse trabalho, que foram replicadas em placa de Petri contendo meio YPD sólido e cloranfenicol (30 mg mL^{-1}) por quatro vezes a fim de obter colônias isoladas (Figura 11).

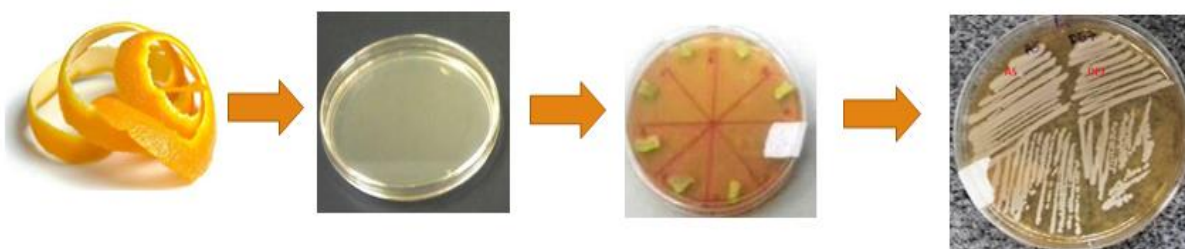


Figura 11. Esquema do isolamento de microrganismos da casca da laranja, da esquerda para a direita tem-se a casca de laranja, meio de cultura utilizado no esgotamento e triagem, incubação de pequenos pedaços de laranja e culturas obtidas através do isolamento sequencial.

A avaliação morfológica das culturas foi realizada macroscopicamente observando o crescimento das colônias em placas de Petri e microscopicamente observando os aspectos das colônias em microscópio óptico com objetiva de 40 vezes, conforme ilustrado na Figura 12.

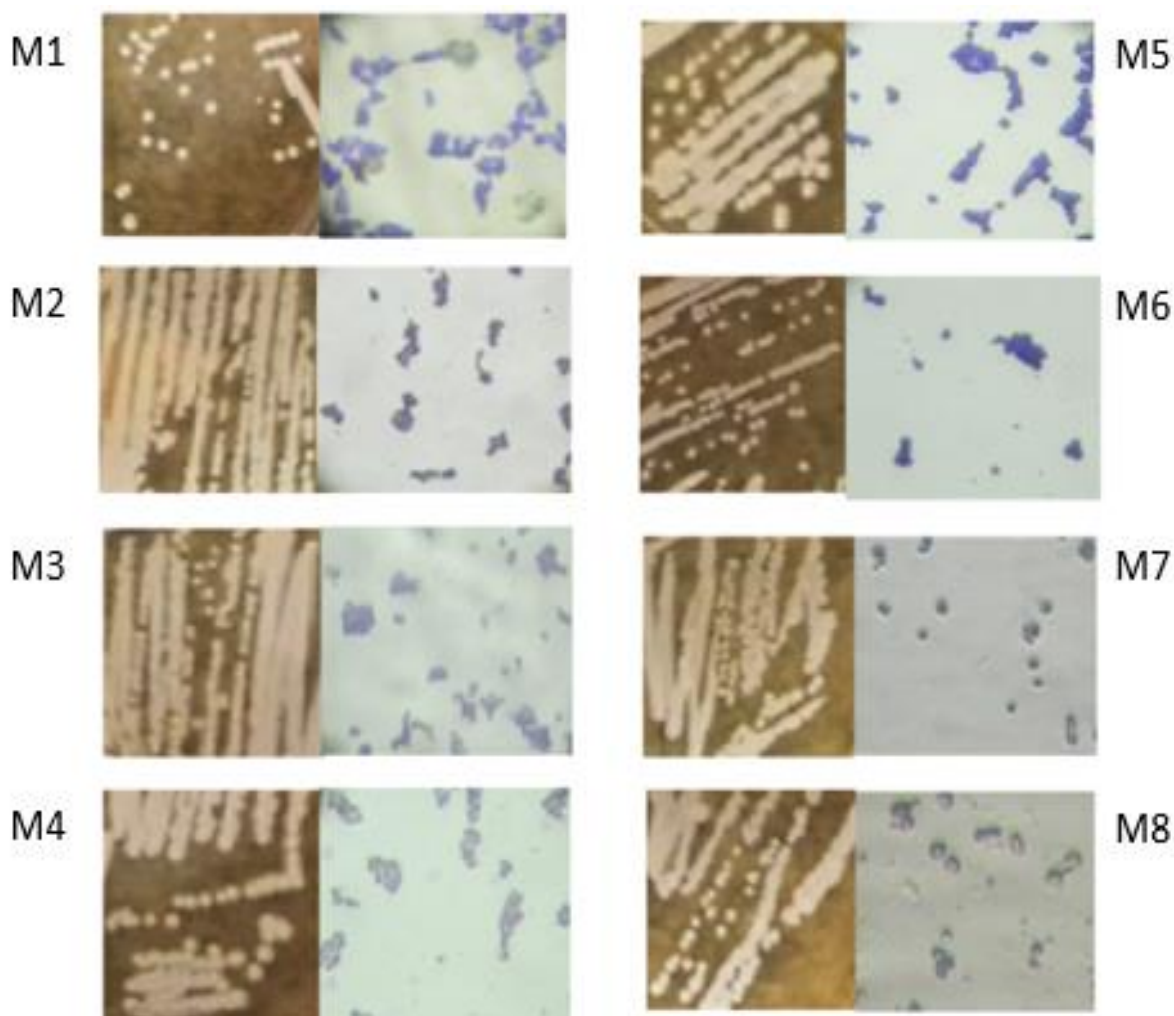


Figura 12. Morfologia das colônias visualizadas em placa de Petri (à esquerda) e no microscópio óptico com objetiva de 40 vezes, onde M1 a M8 representam os microrganismos isolados a partir da casca da laranja (à direita).

As avaliações realizadas indicaram a presença de cultura unicelular arredondada com alguns brotamentos, o que sugere a presença de leveduras, as quais foram identificadas usando-se a letra M (Microrganismo) seguido de um número de 1 a 8. A identificação foi confirmada posteriormente através da análise filogenética dos microrganismos selecionados que apresentaram maior desempenho na etapa de hidrólise da biomassa.

Dessa forma, o experimento seguiu com o pequeno banco de células obtido, totalizando oito microrganismos, os quais tiveram o seu comportamento avaliado na presença de glicose e xilose (ambas na concentração de 30 g L^{-1} , meios líquidos denominados respectivamente como G30 e X30) e na presença de lignina em

duas concentrações distintas, 20 e 30 g L⁻¹, em meios líquidos denominados respectivamente L20 e L30.

4.1.1 Avaliação do crescimento em meio líquido e toxicidade da lignina

Avaliando o crescimento dos microrganismos testados medido a partir da absorbância em 600 nm (A_{600}) em um espectrofotômetro pôde-se notar que a maioria dos microrganismos triados preferiram a glicose como fonte de carbono, com exceção do microrganismo denominado M2 o qual apresentou um crescimento estatisticamente maior na presença de xilose (Figura 13). Nota-se também que após 1,5 h de fermentação em meios contendo glicose e xilose como fonte de carbono (meios G30 e X30) a concentração de açúcares medida por HPLC decaiu por volta de 5 g L⁻¹.

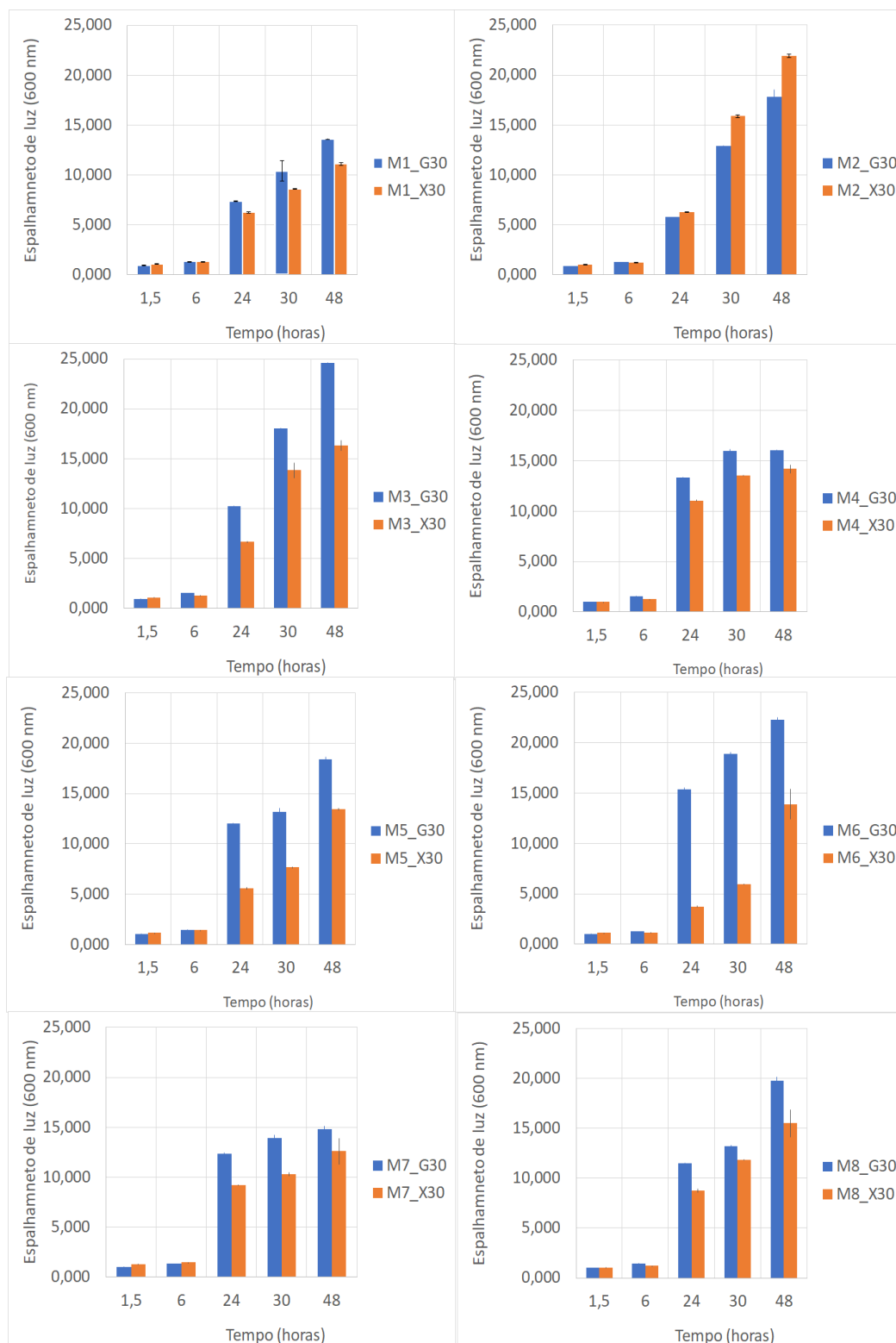


Figura 13. Resultados da avaliação de crescimento dos microrganismos isolados da casca da laranja medido a partir da absorbância em 600 nm (A_{600}) dos meios líquidos contendo glicose na concentração de 30 g L⁻¹ (G30) e xilose na concentração de 30 g L⁻¹ (X30); onde M1 a M8 são microrganismos isolados da casca da laranja

Outra observação realizada foi que em 30 h de fermentação em meio G30, o microrganismo M2 foi o que menos consumiu glicose ($7,774 \text{ g L}^{-1}$), quando comparado com os demais microrganismos avaliados (Figura 14).

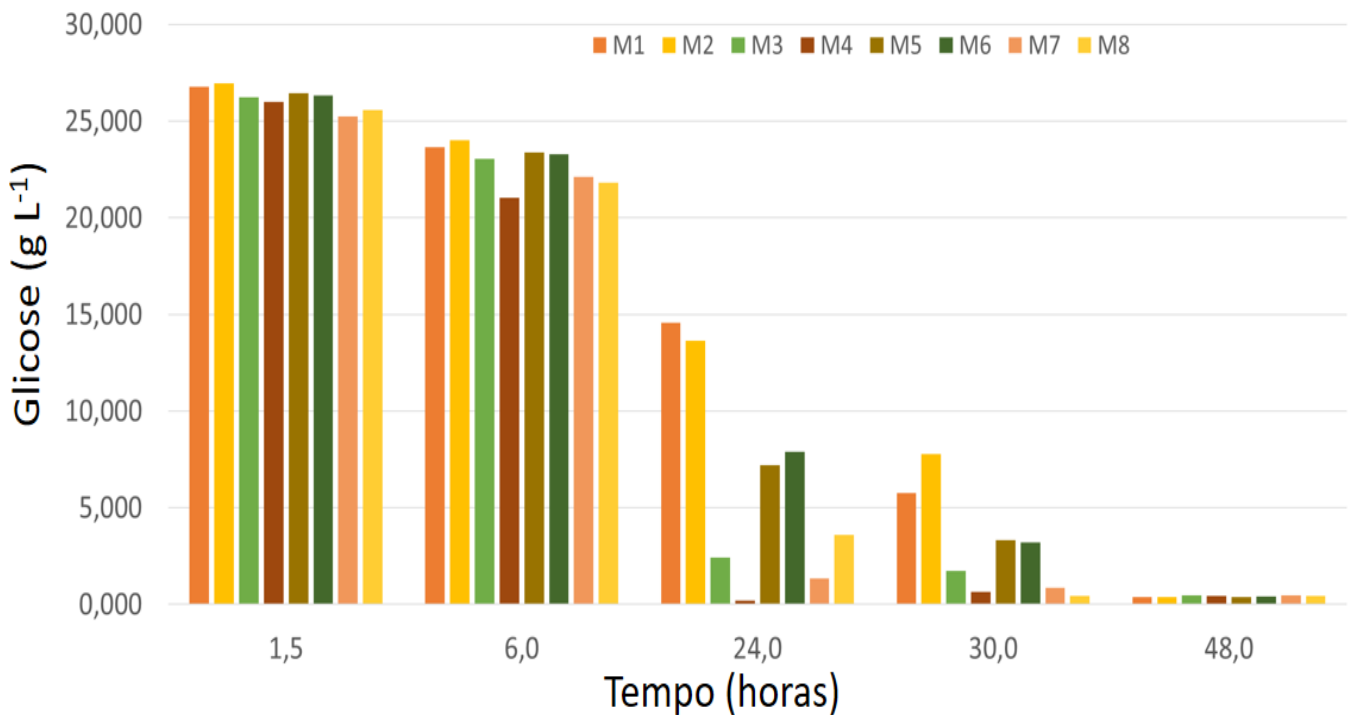


Figura 14. Consumo da glicose pelos microrganismos isolados da casca de laranja no meio contendo concentração inicial de glicose igual a 30 g L^{-1} (onde M1 a M8 são microrganismos isolados da casca da laranja)

O consumo de xilose (meio X30) também foi avaliado por HPLC e se mostrou mais lento quando comparado com o consumo de glicose, conforme mostrado na Figura 15:

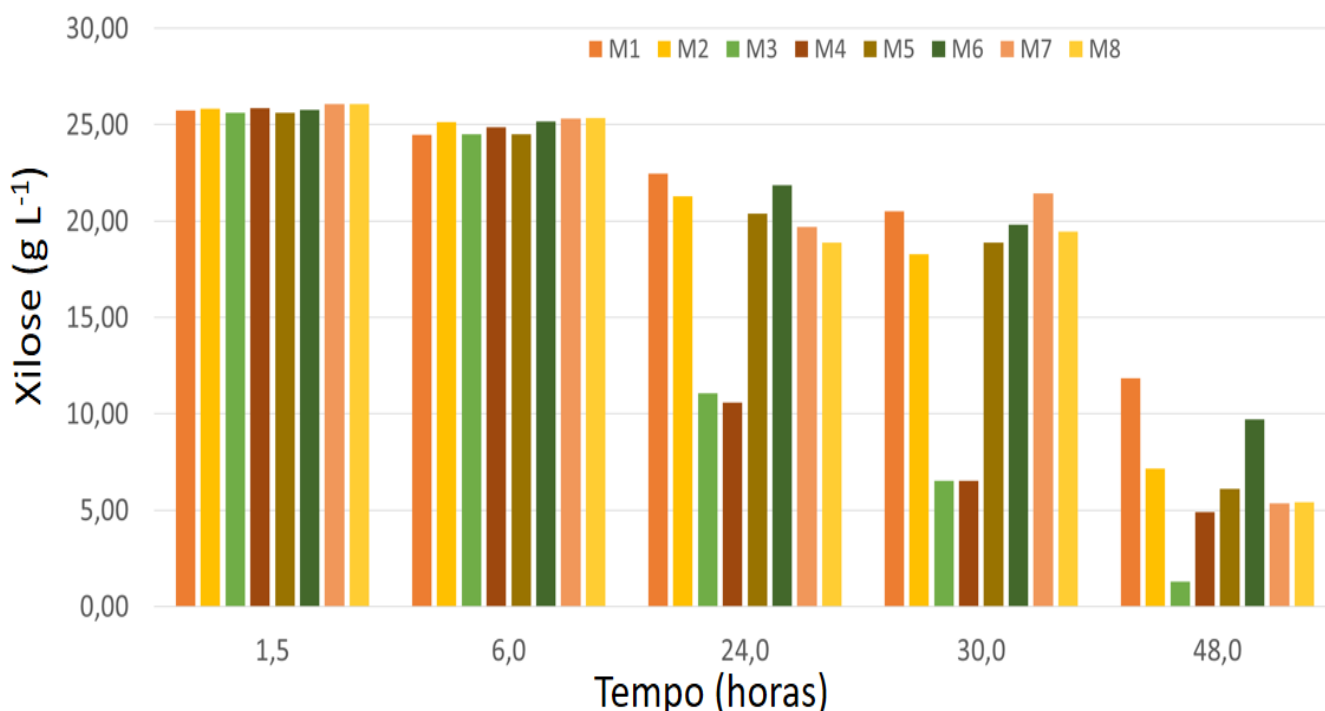


Figura 15. Consumo da xilose pelos microrganismos isolados da casca de laranja no meio contendo concentração inicial de xilose igual a 30 g L⁻¹ (onde M1 a M8 são microrganismos isolados da casca da laranja)

Ao avaliarmos o consumo de xilose após o término da fermentação (48 h) foi possível notar que o microrganismo denominado M3 foi o que apresentou o maior consumo de xilose. Já o M2, microrganismo que apresentou um baixo consumo de glicose em 30 h de fermentação, apresentou um consumo intermediário de xilose no final do processo, mostrando-se um microrganismo interessante para avaliações posteriores, igualmente ao M3.

O crescimento dos microrganismos na presença de elevadas concentrações de lignina (20 e 30 g L⁻¹) foi realizado no decorrer de 164 h de fermentação com o objetivo de avaliar a toxicidade da lignina frente a esses organismos. Os resultados obtidos (Figura 16) mostram que o crescimento de microrganismo praticamente dobrou ao longo desse período, ou seja, atingindo uma A₆₀₀ por volta de 7 e chegando a valores próximos a 15 no final do experimento. A A₆₀₀

inicial em meios contendo lignina foi bem maior que a absorbância inicial dos meios contendo apenas glicose e xilose. Isso ocorreu devido à coloração marrom da lignina, porém, a quantidade adicionada de inóculo inicialmente foi a mesma em todos os experimentos.

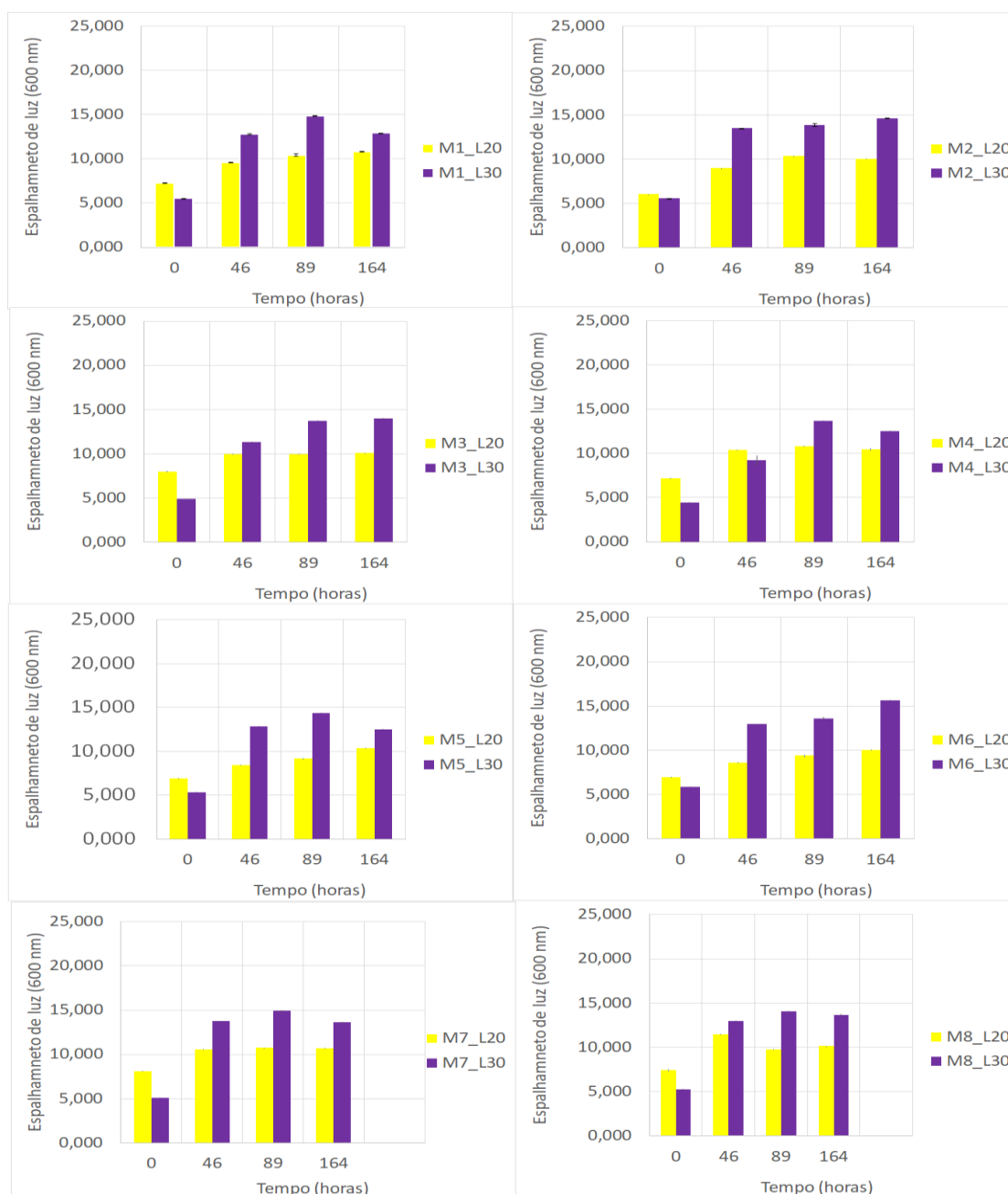


Figura 16. Resultados da avaliação de crescimento de microrganismos isolados da casca da laranja medido a partir da absorbância em 600 nm (A_{600}) dos meios líquidos contendo lignina na concentração de 20 g L⁻¹ (L20) e 30 g L⁻¹ (L30). Onde M1 a M8 são microrganismos isolados da casca da laranja.

A fim de avaliar a toxicidade da lignina para os microrganismos isolados da casca de laranja, coletou-se uma pequena amostra após o término da fermentação e avaliou-se o crescimento das culturas através do plaqueamento em meio YPD sólido após 20 h de incubação a 30 °C, conforme Figura 17.

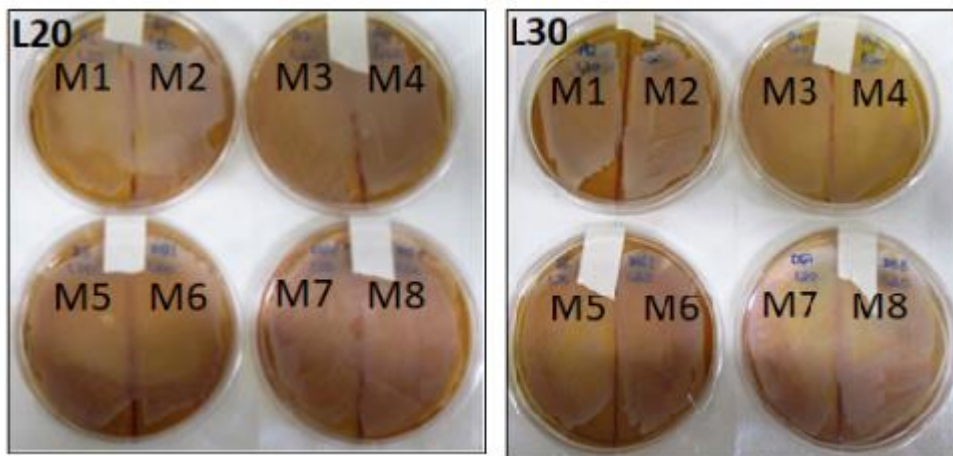


Figura 17. Plaqueamento em meio YPD sólido das colônias (M1 a M8) após fermentação em meio mínimo contendo altas concentrações de lignina, 20 g L⁻¹ (à esquerda) e 30 g L⁻¹ (à direita)

Os resultados do plaqueamento (Figura 17) indicaram que a lignina não é tóxica para as cepas selecionadas, uma vez que ocorreu o crescimento de todas as culturas plaqueadas em meio sólido.

Diante desses resultados foram escolhidos os microrganismos M2 e M3 para darem continuidade aos experimentos. O microrganismo M3 foi escolhido devido ao seu desempenho superior em relação aos demais na fermentação da xilose. Já o microrganismo M2 foi escolhido devido à preferência pela xilose ao invés da glicose.

4.1.2 Identificação filogenética

A fim de realizar a identificação filogenética dos microrganismos escolhidos (M2 e M3), realizou-se a análise do sequenciamento de genes ribossomais. Duas regiões são frequentemente utilizadas (18S e 26S) sendo a 26S foi escolhida por apresentar alto grau de conservação e baixa taxa de variabilidade, mostrando-se suficiente para identificação da espécie (PEREIRA, 2009):

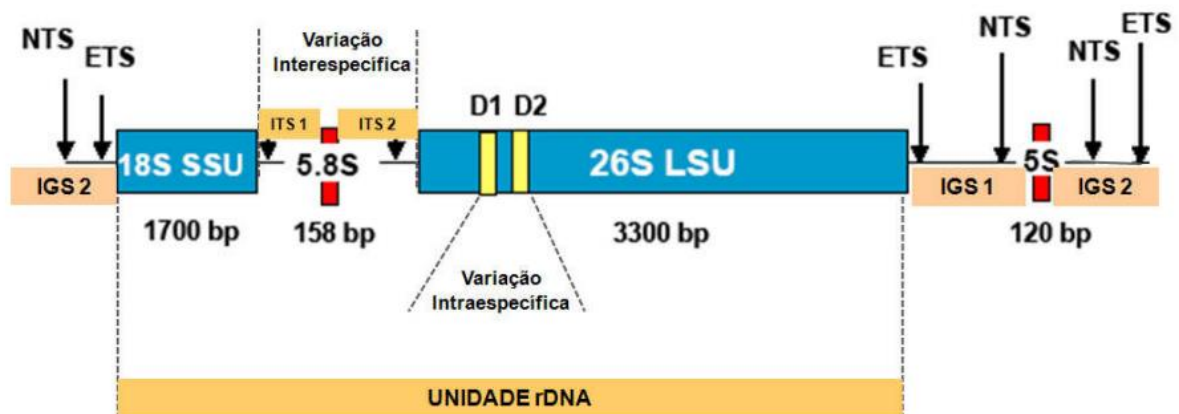


Figura 18. Representação dos genes 18S e 26S, duas regiões frequentemente utilizadas no sequenciamento do DNA ribossomal, sendo que a 26S é a mais conservada (PEREIRA, 2009)

O sequenciamento e a análise filogenética foram realizados pelo CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) demonstrando que as colônias isoladas denominadas M2 e M3 são muito similares com a *Candida parapsilosis* (Figuras 19 e 20).

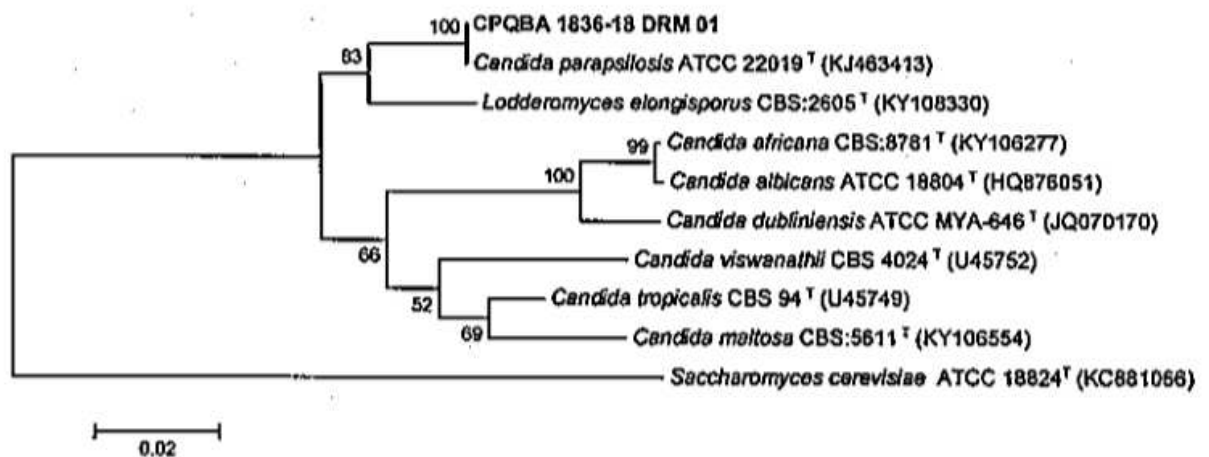


Figura 19. Árvore filogenética que demonstra as relações evolutivas entre a sequência parcial da região D1/D2 do DNA ribossomal da amostra CPQBA 1836-18 DRM 01 (referente ao M2) e as sequências de linhagens de microrganismos relacionados presentes nas bases de dados GenBank e CBS-Knaw.

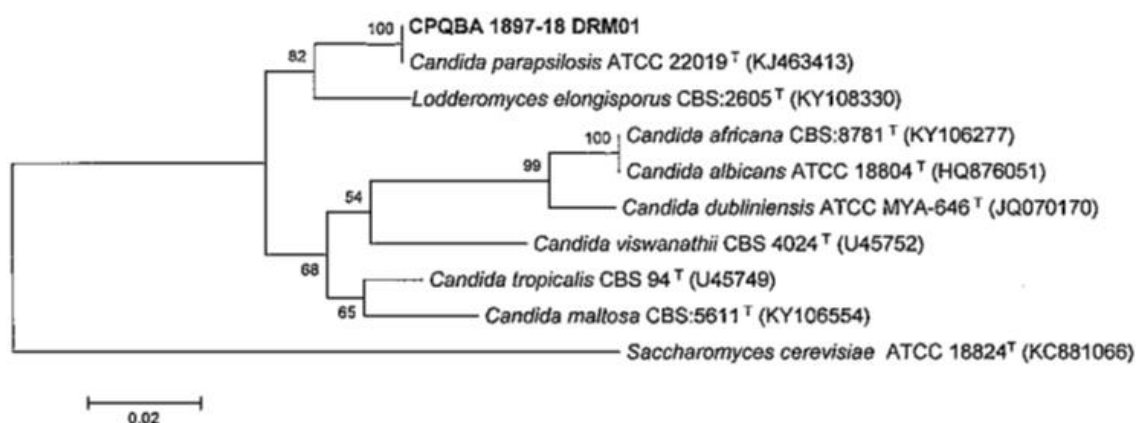


Figura 20. Árvore filogenética que demonstra as relações evolutivas entre a sequência parcial da região D1/D2 do DNA ribossomal da amostra CPQBA 1836-18 DRM 01 (referente ao M3) e as sequências de linhagens de microrganismos relacionados presentes nas bases de dados GenBank e CBS-Knaw.

Embora o presente estudo tenha utilizado a casca da laranja ao invés do suco da fruta, pode-se considerar que a *Candida parapsilosis* é um microrganismo comumente encontrado na laranja (ARIAS et al., 2002; OBASI et al., 2014), demonstrando resultados coerentes com os obtidos por esse trabalho de mestrado uma vez que a avaliação filogenética dos microrganismos M2 e M3 analisados indicou que trata-se da *Candida parapsilosis* (Anexo 1 e 2).

A sequência de nucleotídeos obtidas para cada um dos microrganismos analisados pelo CPQBA foi avaliada usando-se o programa *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*). Esse programa compara a sequência de nucleotídeos com um banco de dados e, baseado em sequências de genes de organismos da mesma árvore genética, o software é capaz de identificar sequências de DNA que são conservadas entre diferentes espécies, bem como as que são exclusivas de uma espécie ou outra. O software também é capaz de identificar pequenas variações genéticas presentes na mesma espécie, responsáveis geralmente por características fenotípicas. Como observaremos a seguir, a mesma espécie consome glicose em taxas diferentes, indicando que uma possui melhor desempenho do que a outra nesse quesito, provavelmente por apresentar maior expressão das enzimas correspondentes.

Candida parapsilosis strain CDC317 annotated contig 006110

Sequence ID: [HE605209.1](#) Length: 957321 Number of Matches: 1Range 1: 325703 to 326201 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
902 bits(488)	0.0	496/499(99%)	3/499(0%)	Plus/Minus
Query 1	AAAgtctcaaatttgaaatctg	GCACTTTCA	GTTGTA	ATTTGAAGAAGGTATC 60
Sbjct 326201	AAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTCA	GTTGTA	ATTTGAAGAAGGTATC 326142	
Query 61	TTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTT	GGAACAGAACGT	CACAGAGGGTGAGAATCCC 120	
Sbjct 326141	TTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTT	GGAACAGAACGT	CACAGAGGGTGAGAATCCC 326082	
Query 121	GTGCGATGAGATGTCCCAGACCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAA	180		
Sbjct 326081	GTGCGATGAGATGTCCCAGACCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAA	326022		
Query 181	TGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTC-ATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAG	239		
Sbjct 326021	TGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAG	325962		
Query 240	CGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAA-GaactttgaaaagagaGTGAAAAAGTACgt	298		
Sbjct 325961	CGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGT	325902		
Query 299	gaaattgttgaaagggAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTCTCG	358		
Sbjct 325901	GAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTCTCG	325842		
Query 359	GGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGAGCGGTAGGATAAGTGCAAAG	418		
Sbjct 325841	GGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGAGCGGTAGGATAAGTGCAAAG	325782		
Query 419	AAATGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTGTCGATACTGCCAGCTTAGACTG	478		
Sbjct 325781	AAATGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTGTCGATACTGCCAGCTTAGACTG	325722		
Query 479	AGGACTGCGGCT-CGGCCT	496		
Sbjct 325721	AGGACTGCGGCTTCGGCCT	325703		

Figura 21. Representação do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) da *C. parapsilosis* (M2)

Candida parapsilosis strain PM1076 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [MH704191.1](#) Length: 601 Number of Matches: 1

Range 1: 32 to 572 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
959 bits(519)	0.0	535/542(99%)	3/542(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGG	60		
Sbjct 32	GGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGG	91		
Query 61	TATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGAACAGAACGTACAGAGGGTGAGAA	120		
Sbjct 92	TATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGAACAGAACGTACAGAGGGTGAGAA	151		
Query 121	TCCCGTGCGATGAGATGTCCAGACCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTG	180		
Sbjct 152	TCCCGTGCGATGAGATGTCCAGACCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTG	211		
Query 181	GGAATGC -GATCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCG	239		
Sbjct 212	GGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCG	271		
Query 240	ATAGCGAACCAAGTACAGTGATGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGT	299		
Sbjct 272	ATAGCGAACCAAGTACAGTGATGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGT	331		
Query 300	ACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGG -TTGAGATCAGACTTGGTATTTGTATGTTACTCT	358		
Sbjct 332	ACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTGTATGTTACTCT	391		
Query 359	CTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGAGCGGTAGGATACGTGC	418		
Sbjct 392	CTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGAGCGGTAGGATAAGTGC	451		
Query 419	AAAGAAATGTGGCACTGCTTCGGTACTCTGTTATAGTCTTTGTCGATACATGCCAGCTTA	478		
Sbjct 452	AAAGAAATGTGGCACTGCTTCGGTACTCTGTTATAGTCTTTGTCGATAC -TGCCAGCTTA	510		
Query 479	GACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCCGTCTT	538		
Sbjct 511	GACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCCGTCTT	570		
Query 539	GA 540			
Sbjct 571	GA 572			

Figura 22. Representação do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) da *C. parapsilosis* (M3)

A avaliação do *BLAST* (Figuras 21 e 22) dos dois microrganismos com melhor desempenho indicou que se tratam de duas cepas de *C. parapsilosis*, sendo o M2 a cepa CDC 317 e o M3 a cepa PM 1076. Devido ao fato de serem duas cepas diferentes do mesmo microrganismo, observa-se um comportamento diferenciado em meios contendo glicose e xilose, conforme discutido anteriormente.

4.2.1 Caracterização estrutural da lignina

A lignina da casca da laranja foi isolada com sucesso em um rendimento de 0,65%, valor próximo ao reportado na literatura (BARROS et al., 2018). Esse resultado indica que ambos os substratos utilizados (bagaço de laranja *in natura* e polpa cítrica peletizada) apresentaram baixo teor de lignina.

Visando avaliar possíveis modificações estruturais na molécula de lignina após condução de ensaios fermentativos em meio L20 e L30, algumas técnicas analíticas, como ATR-FTIR, NMR, MS e SEM foram utilizadas.

Dentre diversas técnicas analíticas que podem ser empregadas, escolheu-se o ATR-FTIR (*Attenuated Total Reflection with Fourier Transform Infrared Spectroscopy*). A espectroscopia de infravermelho é uma técnica baseada na vibração molecular em frequências específicas e diferentes intensidades. A ATR-FTIR é uma técnica não destrutiva de análise da amostra em que há um contato direto entre a amostra a ser analisada e o cristal, não sendo necessário nenhum tipo de preparo prévio. O feixe incide sobre o cristal excitando a superfície da amostra a qual emite fótons em comprimentos de ondas específicos. Em seguida, o equipamento registra o comprimento de onda do fóton emitido e sua intensidade (STARK; YELLE; AGARWAL, 2016). Para caracterização da lignina utilizou-se o infravermelho médio, o qual compreende comprimentos de onda entre 4000 e 400 cm^{-1} . Os espectros de infravermelho obtidos nessa região (Figura 23) apresentaram bandas características da molécula estudada, como estiramento -OH (3400 cm^{-1}), grupos metílicos (2800 a 3000 cm^{-1}), estiramento C=O conjugados (1700 cm^{-1}), estiramento do anel aromático (1500 a 1515 cm^{-1}) e a presença de polissacarídeos indicada pela presença de uma forte banda em 1000 cm^{-1} . Grupos siringil livres não são visualizados em 1300 cm^{-1} (estiramento C-O do anel siringil) indicando que os mesmos encontram-se ligados ao polímero de lignina (ZHANG et al., 2016).

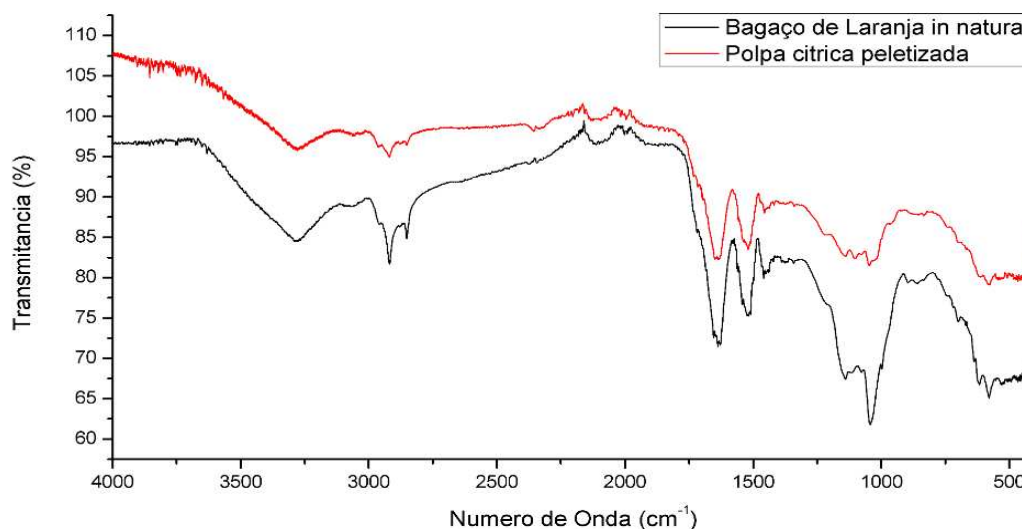


Figura 23. Espectros de ATR-FTIR da lignina obtida do bagaço da laranja *in natura* (em linha preta) e da polpa cítrica peletizada (em linha vermelha).

NADA et al., 1998 descreveram a lignina com as propriedades semelhantes as observadas para a lignina da laranja, quando analisaram os espectros da lignina da casca de arroz, em que foram observando os grupos -OH alifático e -OH fenólico, além de estiramentos de álcool - primário ou secundário. No estudo reportado por BARROS e colaboradores (2018) quanto a caracterização da lignina do bagaço da laranja observa-se resultado semelhante ao obtido no presente trabalho indicando que a lignina foi isolada com sucesso.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) fornece informações estruturais sobre a lignina. Alguns núcleos atômicos são capazes de absorver a energia de determinada radiação eletromagnética e a técnica analisa a frequência correspondente à essa energia medindo o tempo que os núcleos levam para retornar ao estado inicial (tempo de relaxação). Para a lignina os núcleos mais utilizados são o de carbono (^{13}C) e hidrogênio (^1H), sendo que o espectro de ^1H se estende até 10 ppm à medida que o espectro de ^{13}C se estende até 200 ppm, fornecendo maiores informações estruturais sobre a lignina (STARK; YELLE; AGARWAL, 2016).

Os dados de caracterização estrutural da lignina por ^1H NMR estão sumarizados na Figura 24.

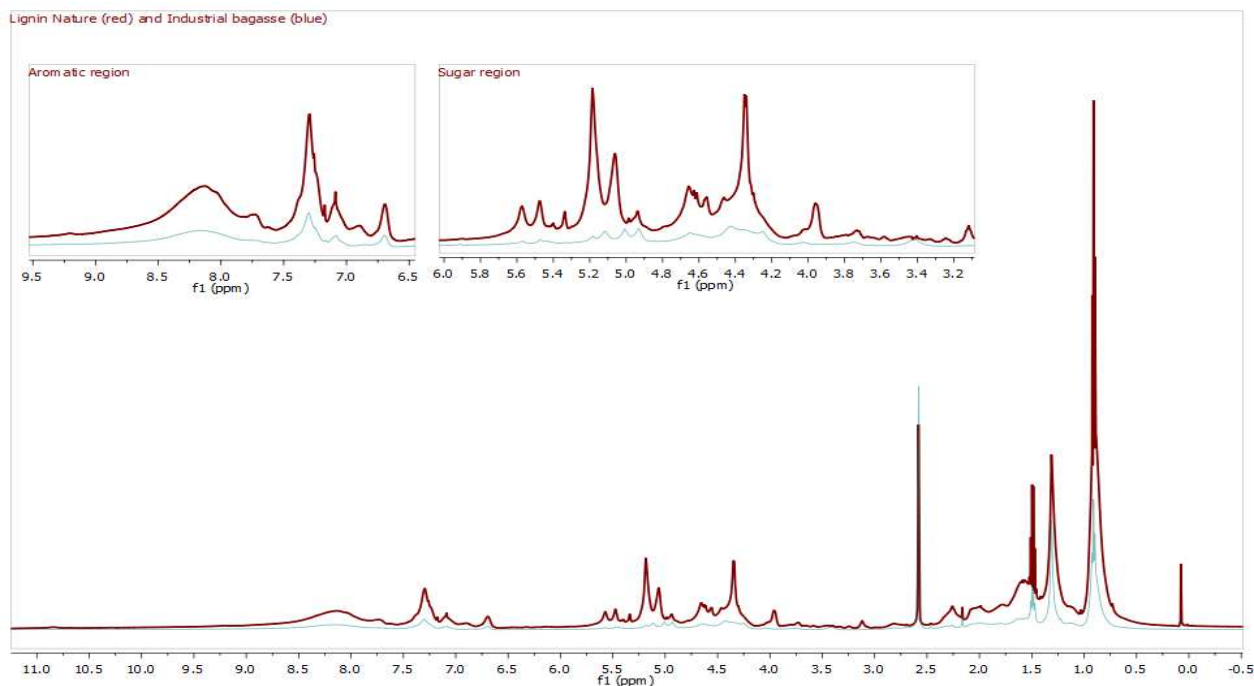


Figura 24. Espectros de ^1H NMR da lignina extraída do bagaço de laranja *in natura* (vermelho) e da polpa cítrica peletizada (azul) com supressão do sinal de água (WATERGATE).

Observando-se os espectros de ^1H NMR (Figura 24), pode-se dizer que o mesmo possui duas regiões que caracterizam a lignina, sendo a primeira região com deslocamentos químicos entre 3,20 e 6,00 ppm, que correspondente aos açúcares e a segunda região com deslocamento químico entre 6,50 e 8,05 ppm correspondente a compostos aromáticos (LOURENÇO; PEREIRA, 2018).

Para a caracterização da estrutura da lignina, foram obtidos espectros de NMR em 2D e o mapa de contorno HSQC que está apresentado na Figura 25.

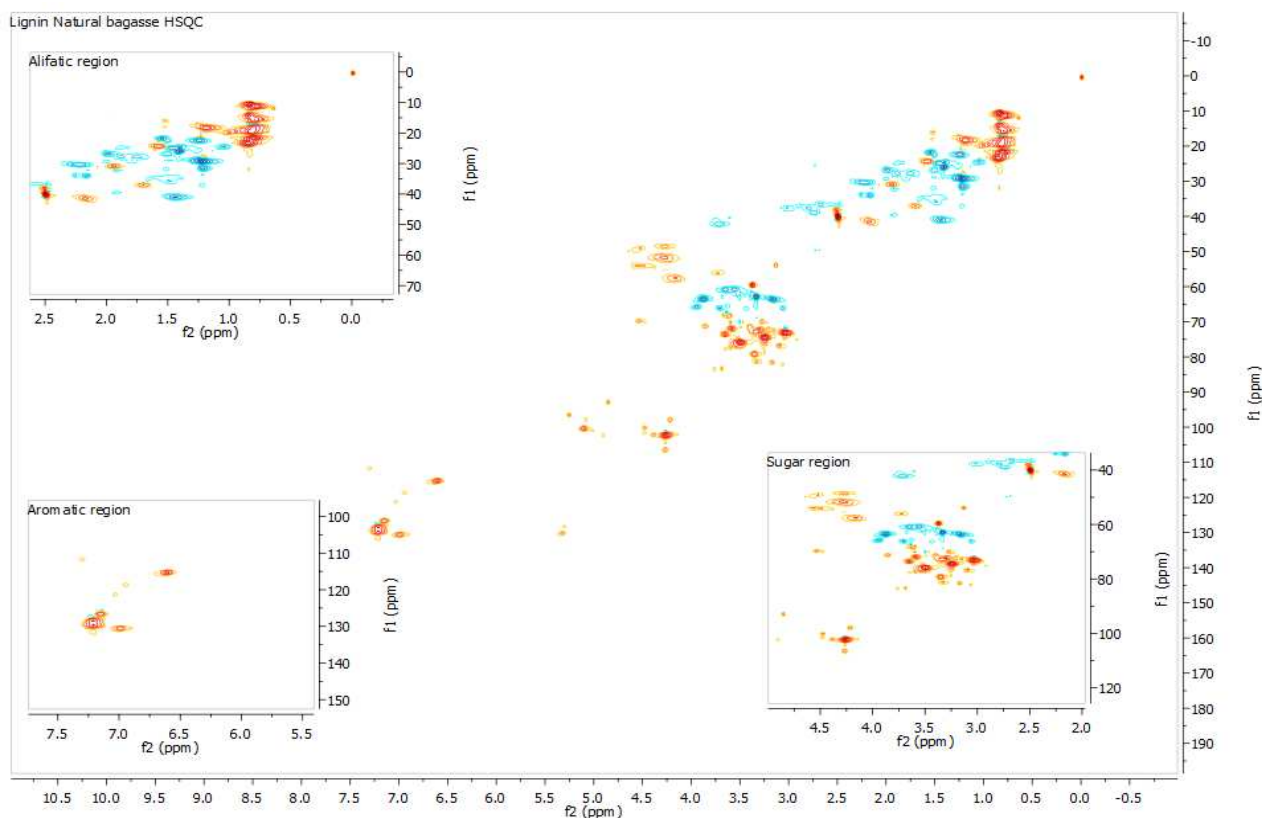


Figura 25. Mapa de contorno HSQC da lignina extraída do bagaço de laranja *in natura* mostrando a presença de regiões características de açúcares (canto inferior à direita), região de compostos aromáticos (canto inferior à esquerda) e região alifática (canto superior à esquerda)

Analisando os espectros de HSQC, nota-se a predominância de três regiões, dentre as quais:

Região 1. Compreende deslocamentos químicos entre 0,50 e 2,50 (^1H) e 10,00 a 40,00 (^{13}C) que correspondem à compostos alifáticos altamente blindados da lignina.

Região 2. Compreende deslocamentos químicos entre 2,50 e 4,50 (^1H) e 40,00 a 120,00 (^{13}C) que correspondem aos açúcares residuais que não foram removidos durante as etapas de purificação da lignina.

Região 3. Compreende deslocamentos químicos entre 6,50 e 7,50 (^1H) e 110,00 a 140,00 (^{13}C) que correspondem à porção aromática da lignina, onde ocorre a predominância de compostos fenólicos.

Devido à estrutura específica e complexa da lignina, os espectros HSQC são frequentemente utilizados para avaliação estrutural, conforme dados organizados na Tabela 6 onde são comparados os deslocamentos químicos obtidos no presente trabalho com os dados da literatura (BARROS et al., 2018).

Tabela 6. Atribuições dos sinais da lignina conforme correlações obtidas por NMR - HSQC da lignina extraída do bagaço da laranja *in natura* (BARROS et al., 2018)

Atribuição	¹³ C (ppm) Experimental	¹ H (ppm) Experimental	¹³ C (ppm) Literatura	¹ H (ppm) Literatura
Guaiacil	55,65	3,76	55,52	3,75
	62,11	3,83	62,87	3,71
	115,14	6,65	115,31	6,61
Siringil	130,73	6,91	130,31	6,74
	130,33	7,00	130,40	6,99
<i>p</i> -Hidroifenil	127,95	7,20	126,60	7,15
	128,65	7,22	128,44	7,21
Resinol	62,95	3,34	62,96	3,28
	100,24	4,47	100,94	4,53
Lactona	101,76	4,49	100,92	4,22
	102,33	4,40	101,42	4,26
Xilano	73,16	3,03	72,12	3,16
	72,59	3,31	72,59	3,30
OH terminal	69,71	3,50	69,67	3,50
	124,43	5,06	121,65	5,33

A análise dos dados apresentados na Tabela 6 indica grande similaridade entre os dados obtidos experimentalmente para a lignina com os reportados na literatura (BARROS et al., 2018). Dessa forma, pode-se dizer que a lignina foi isolada e purificada com sucesso a partir do bagaço da laranja *in natura*.

4.2.1.1 Modificações estruturais na lignina avaliadas por ATR-FTIR

Foram avaliadas possíveis modificações estruturais na lignina presentes nos meios L20 e L30 após a fermentação com *C. parapsilosis* por ATR-FTIR e os resultados obtidos se encontram na Figura 26.

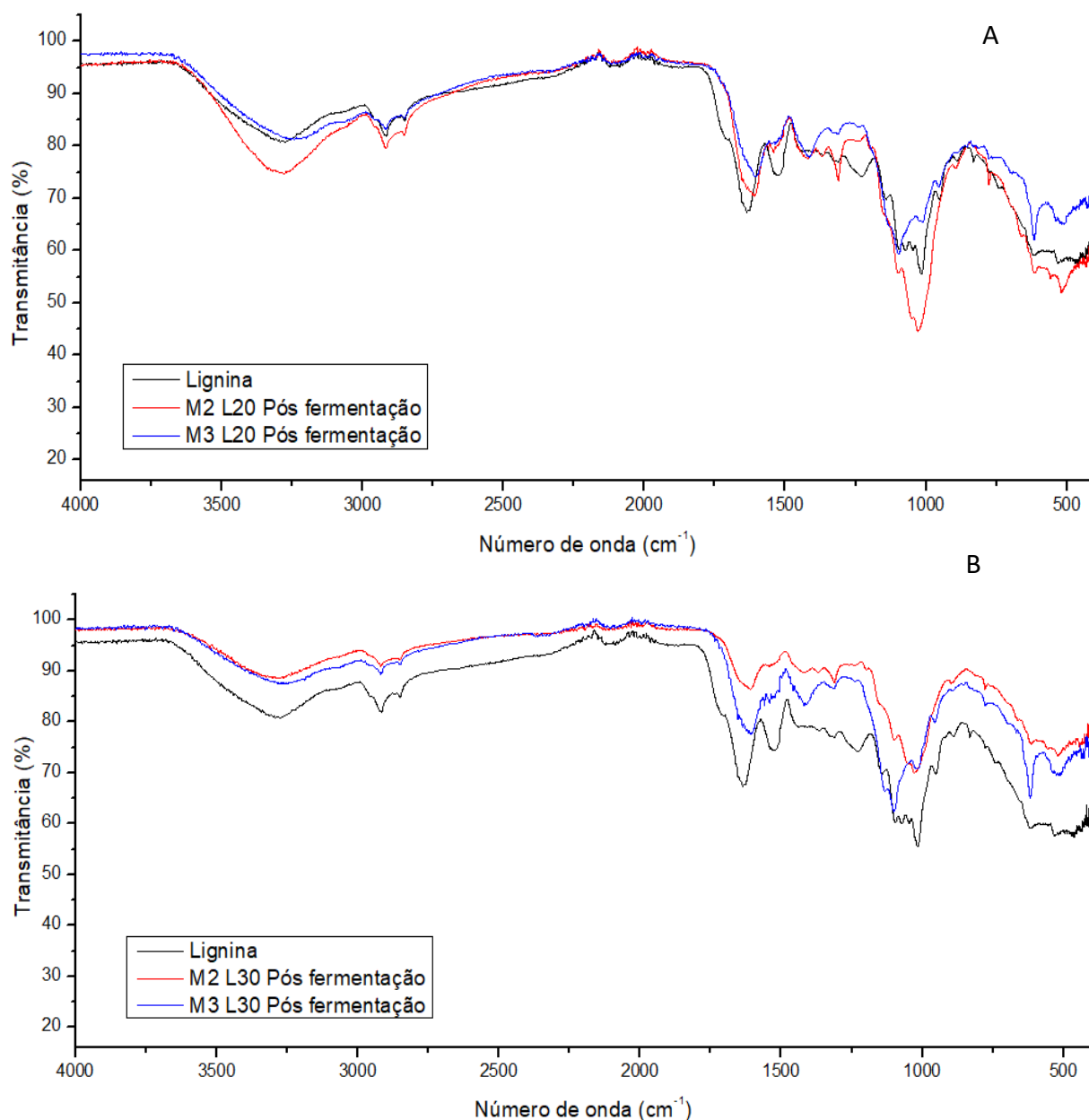


Figura 26. Espectros de ATR-FTIR da lignina antes e depois da fermentação com *C. parapsilosis* (M2 e M3), em que em **A**) se tem as mudanças estruturais após a fermentação no meio L20 e em **B**) se tem mudanças estruturais após a fermentação no meio L30.

Os espectros de ATR-FTIR obtidos (Figura 26) apresentaram bandas características dos produtos de degradação, como diminuição da presença dos grupos C=O conjugados (1700 cm^{-1}) e presença de grupos siringil livres evidenciado por bandas finas por volta de 1300 cm^{-1} nos meios após a fermentação com *C. parapsilosis* (ZHANG et al., 2016). Observou-se também nos meios após fermentação com M3, além da diminuição da presença dos grupos C=O conjugados, o surgimento de uma banda fina por volta de 700 cm^{-1} , a qual pode ser atribuída à deformação C-H fora do plano dos álcoois fenólicos que dão origem à lignina (Unidades H, G e S). Essas alterações indicam que ocorreram mudanças estruturais na lignina, ocasionadas pela ação de enzimas como lignina peroxidase e/ou lacases produzidas pelos microrganismos (ZHANG et al., 2016; LOURENÇO; PEREIRA, 2018)

4.2.1.2 Modificações estruturais na lignina avaliadas por NMR

Os compostos gerados pós fermentação presentes no sobrenadante foram avaliados através de CP/MAS ^{13}C NMR conforme Figura 27.

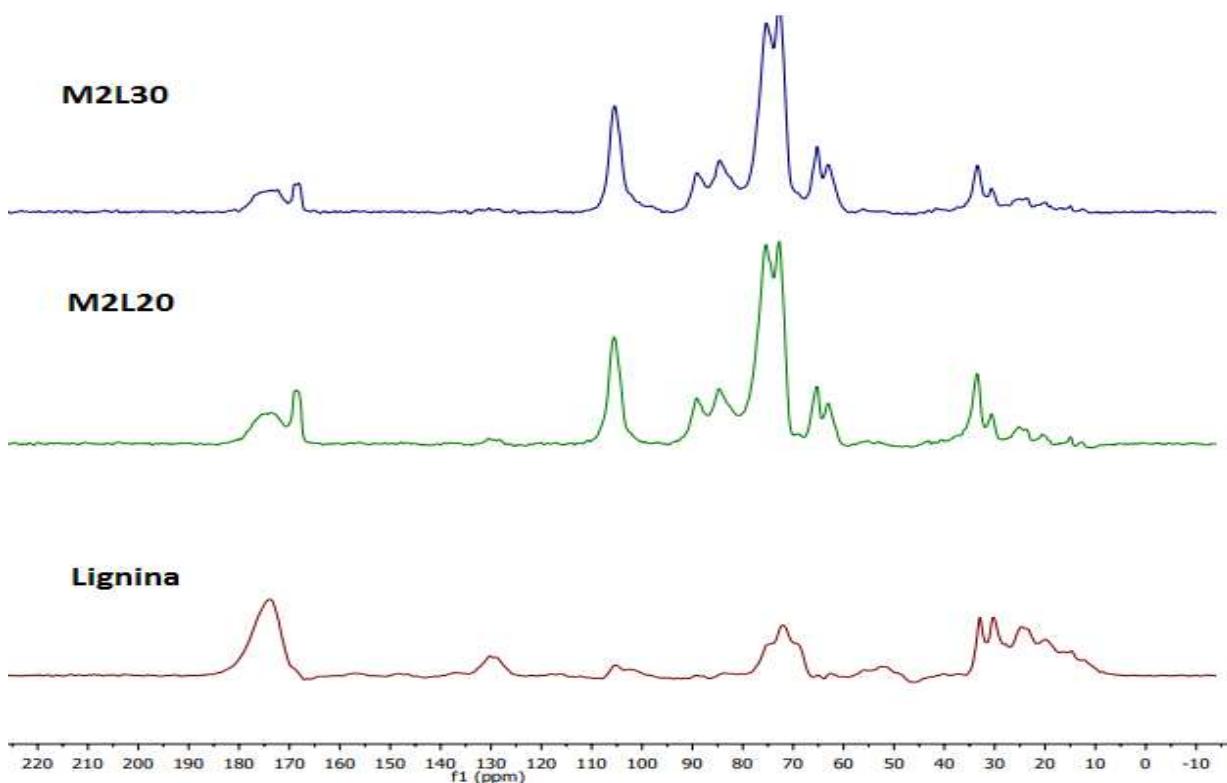


Figura 27. Espectros de CP/MAS ^{13}C NMR da lignina antes e depois da fermentação com *C. parapsilosis* (M2)

A lignina *in natura* analisada por CP/MAS ^{13}C NMR apresentou três regiões características nos espectros conforme observado anteriormente por HSQC, a porção alifática (10 a 40 ppm), região de polissacarídeos (40 a 120 ppm) e a porção aromática (110 a 140 ppm). Sendo também observada a redução do sinal entre 170 e 180 ppm, indicativo da oxidação da molécula e diminuição dos grupos $\text{C}=\text{O}$ de ácidos carboxílicos (MARIÑO; REZENDE; TASIC, 2018).

Comparando-se os espectros de CP/MAS ^{13}C NMR da lignina *in natura* com os meios pós fermentação observa-se o *fingerprint* entre 60 e 110 ppm que indica a presença de celulose (Figura 28), a qual provavelmente foi liberada após a quebra da molécula de lignina. (MARIÑO; REZENDE; TASIC, 2018).

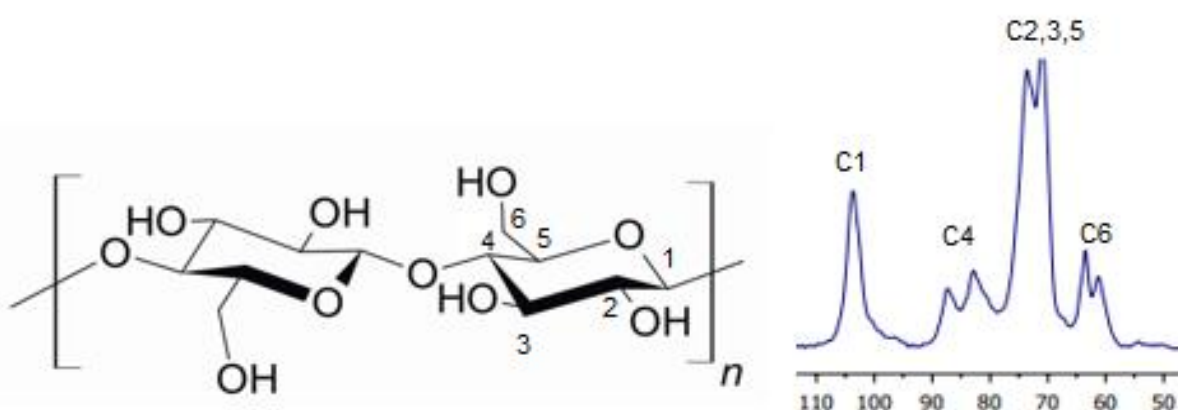


Figura 28. Representação da estrutura química da celulose à esquerda e a atribuição dos sinais da celulose utilizando CP-MAS ^{13}C NMR à direita.

Após a fermentação com *C. parapsilosis* (M3) não é observado o *fingerprint* entre 60 e 110 ppm que indica a presença de celulose (Figura 29). Porém, observou-se a redução do sinal entre 170 e 180 ppm, indicando a oxidação da molécula e a diminuição dos grupos $\text{C}=\text{O}$ de ácidos carboxílicos (MARIÑO; REZENDE; TASIC, 2018).

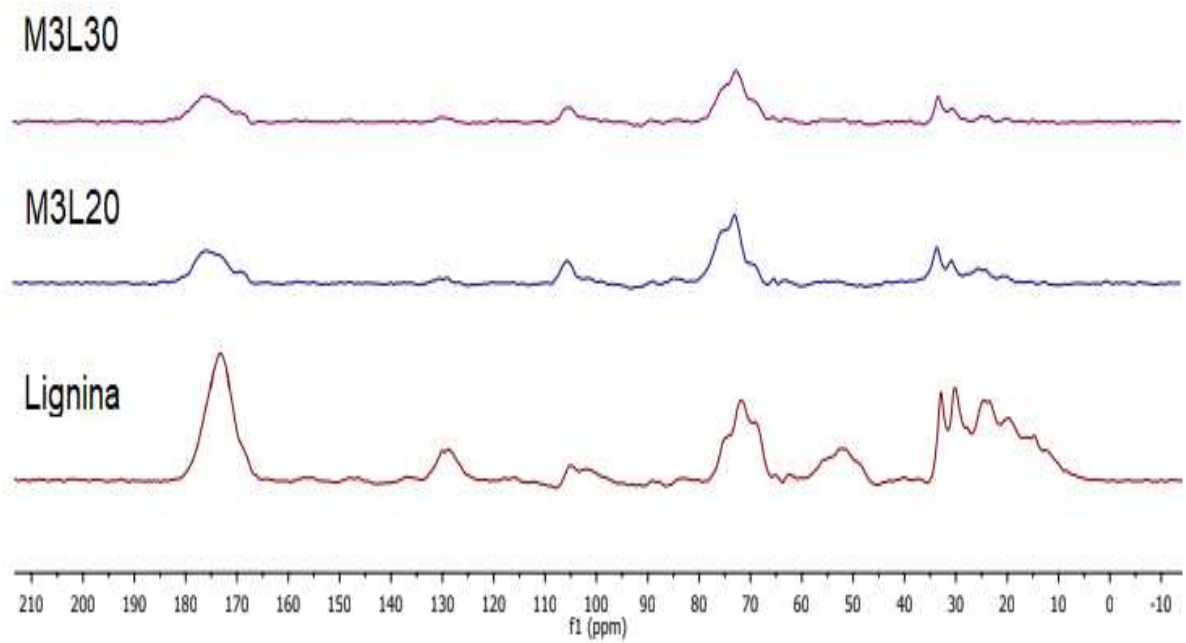


Figura 29. Espectros de CP/MAS ^{13}C NMR da lignina antes e depois da fermentação com *C. parapsilosis* (M3)

4.2.1.3 Modificações estruturais na lignina avaliadas por HPLC-MS

A espectrometria de massas é uma técnica analítica baseada na conversão da amostra em íons os quais são separados de acordo com a razão massa/carga (m/z), que é frequentemente acoplada cromatografia líquida e gasosa como método de separação dos analitos. A fonte de ionização é considerada como sendo uma célula eletrolítica com corrente controlada na qual o potencial elétrico aplicado no capilar metálico (kV) promove a migração de cargas para a interface entre o capilar e a solução, formando uma dupla camada elétrica. Desse modo, são formadas gotas carregadas e, à medida que o solvente evapora, o tamanho das gotas diminui resultando no aumento da repulsão eletrostática entre as cargas formais e diminuição da tensão superficial, formando um spray de partículas carregadas (CROTTI et al., 2006; PITT, 2009).

Existem dois tipos de ionização por *electrospray*: modo negativo e modo positivo. No modo negativo $(M-H)^-$ adiciona-se à fase móvel acetonitrila e/ou metanol que favorecem a desprotonação dos analitos e no modo positivo $(M-H)^+$ utilizam-se fases móveis como o ácido fórmico e ácido acético, que promovam a protonação dos analitos.

A literatura recomenda para a análise da lignina a utilização do modo de ionização negativo devido à facilidade da molécula perder íons H^+ provocada pela sua estabilização radicalar devido à grande presença de anéis aromáticos (EVTUGUIN; AMADO, 2003). ZANG e colaboradores (2016) identificaram diversos produtos de degradação da lignina usando fonte de ionização por *electrospray* no modo negativo, dentre os quais: acetofenona (120 g mol^{-1}), vanilina (152 g mol^{-1}), 4-metoxi-benzaldeído (136 g mol^{-1}), bis(2-etilexil)ftalato (391 g mol^{-1}) e tetracosano (338 g mol^{-1}), cujas estruturas químicas e massas molares se encontram na Figura 30.

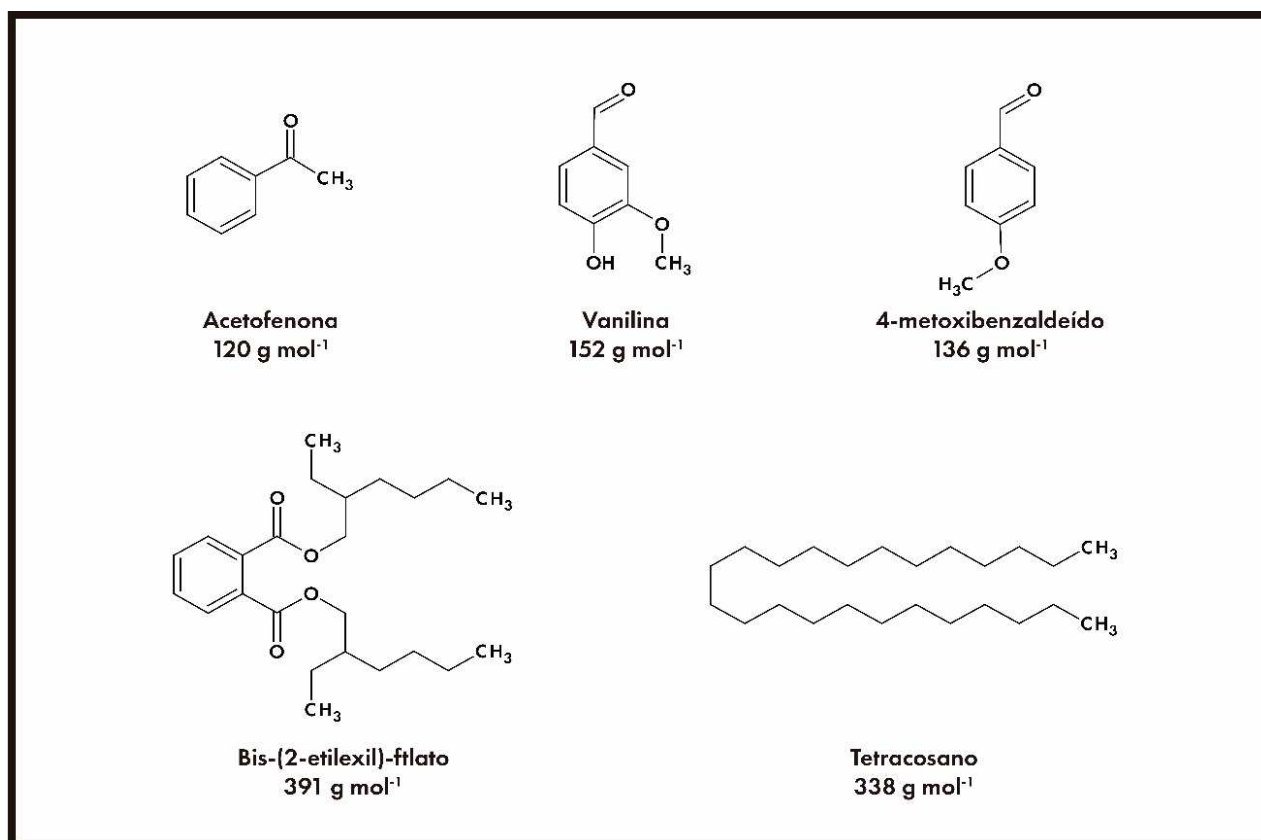


Figura 30. Produtos da degradação da lignina dentre os quais acetofenona (120 g mol⁻¹), vanilina (152 g mol⁻¹), 4-metoxi-benzaldeído (136 g mol⁻¹), bis(2-etilexil)ftalato (391 g mol⁻¹) e tetracosano (338 g mol⁻¹) (ZANG, 2016)

Avaliando-se os espectros de massas obtidos (Figuras 31 e 32), nota-se a presença de um pico com intensidade constante com m/z igual a 151 o qual pode ser atribuído à vanilina desprotonada. O resultado obtido indica que os microrganismos avaliados não são capazes de degradar a vanilina.

Meio L20

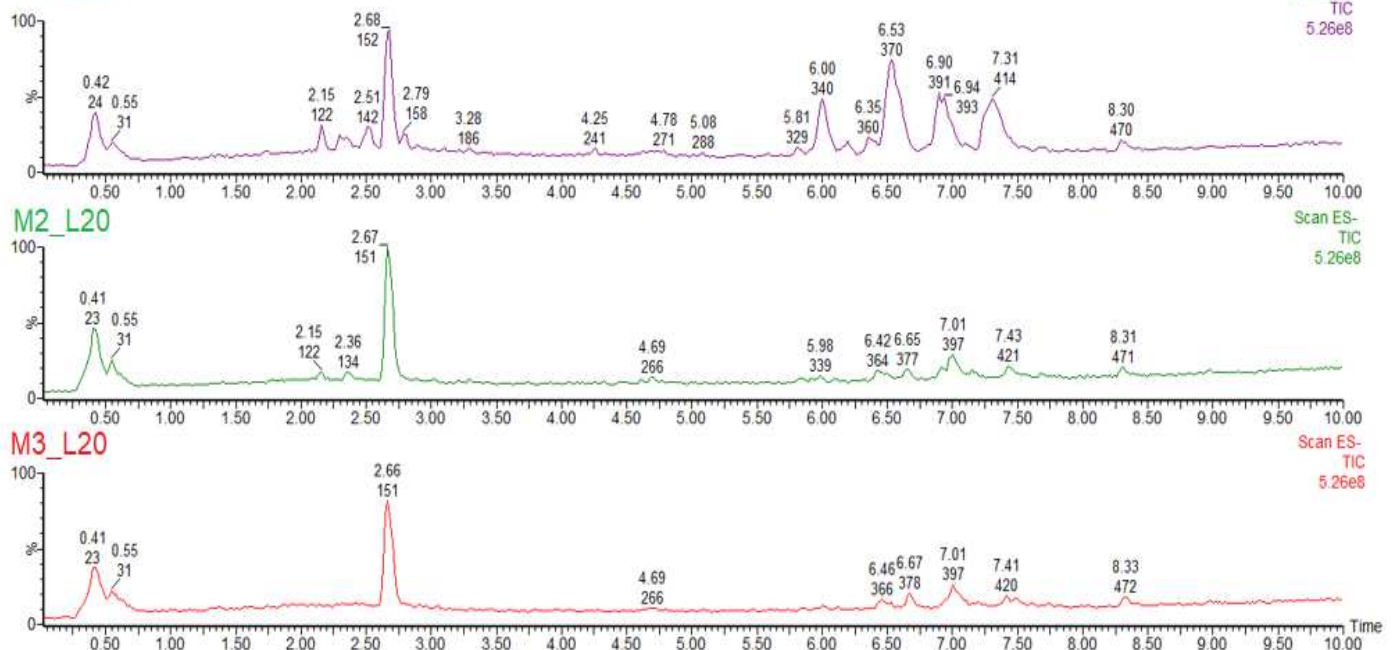


Figura 31. Cromatograma com analisador de massas (modo negativo) do meio L20 antes e depois da fermentação com duas cepas de *C. parapsilosis* (M2 e M3)

Meio L30

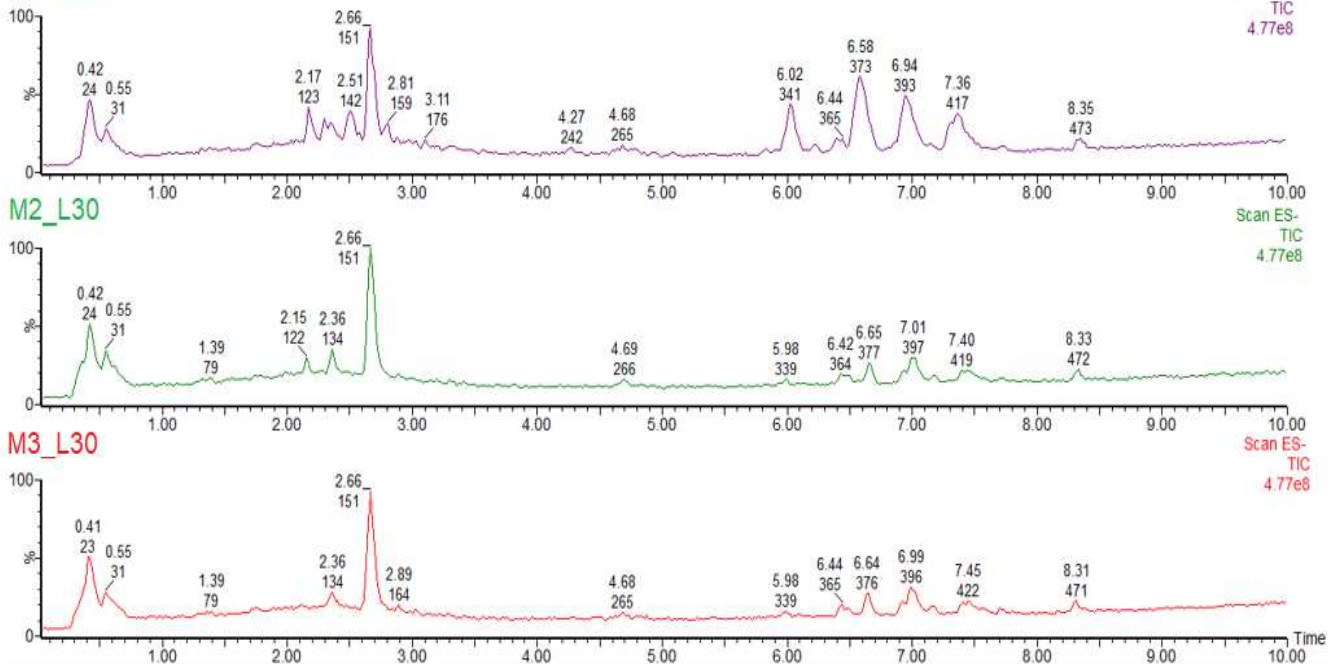


Figura 32. Cromatograma com analisador de massas (modo negativo) do meio L30 antes e depois da fermentação com duas cepas de *C. parapsilosis* (M2 e M3)

PROTHMANN e colaboradores (2018) identificaram diversos oligômeros da lignina dentre os quais o dímero $C_{22}H_{13}O_6$ (Figura 33) o qual possui perda neutra de 18 (água), 44 (CO_2) e 48 (formaldeído + água). Esse íon foi detectado apenas nos meios antes da fermentação mostrando que ocorreram alterações estruturais nessa estrutura dimérica da lignina.

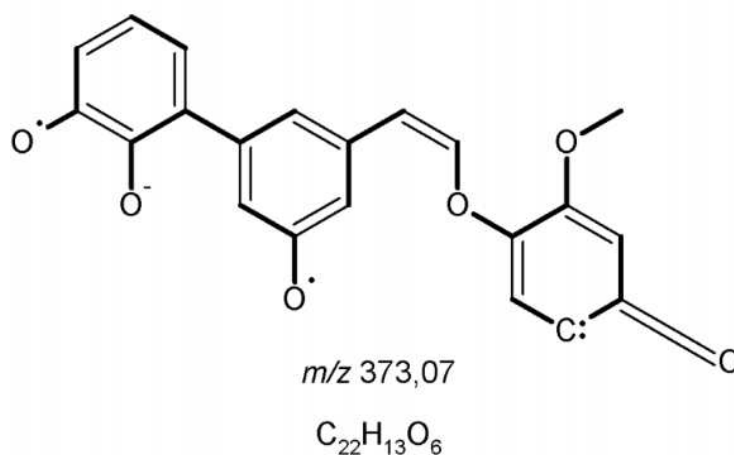


Figura 33. Estrutura química de um dos dímeros da lignina de fórmula molecular $C_{22}H_{13}O_6$

Outra estrutura dimérica da lignina observada apenas nos meios antes da fermentação foi a estrutura de fórmula molecular $C_{22}H_{11}O_4$ descrita na Figura 34.

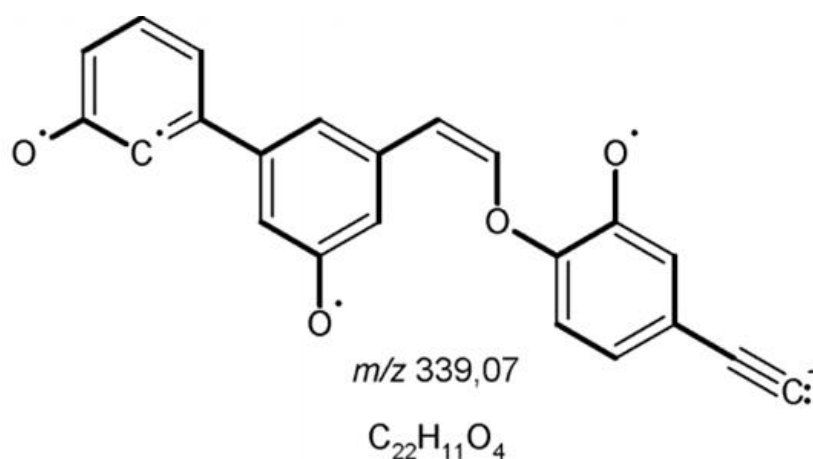


Figura 34. Estrutura química de um dos dímeros da lignina de fórmula molecular $C_{22}H_{11}O_4$

Dessa forma, foi possível concluir utilizando a técnica de HPLC-MS (modo *scan*) que os microrganismos selecionados foram capazes de degradar pelo menos duas estruturas diméricas da lignina ilustradas nas Figuras 33 e 34. Os produtos de degradação não foram observados, pois provavelmente encontram-se em concentração abaixo do limite de detecção da técnica analítica utilizada.

4.2.1.4 Modificações estruturais na lignina avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A microscopia eletrônica de varredura (SEM do Inglês – *Scanning Electron Microscopy*) é capaz de fornecer informações microestruturais de amostras sólidas em escala nanométrica. A técnica baseia-se na incidência de feixes focalizados elétrons os quais interagem com os elétrons presentes na amostra. Os elétrons emitidos devido à essa interação podem ser focalizados em campos eletromagnéticos, formando imagens. Para que o feixe de elétrons interaja com a amostra, ela deve ser condutora, característica que pode ser obtida através do preparo da amostra por recobrimento (NAGATANI; T, 1987).

A microscopia eletrônica de varredura é frequentemente utilizada para a caracterização da biomassa após algum tipo de tratamento capaz de gerar danos à matriz estudada e, por esse motivo, foi uma das técnicas escolhidas para avaliação de alterações estruturais na lignina pós fermentação com os microrganismos denominados M2 e M3 (*C. parapsilosis*).

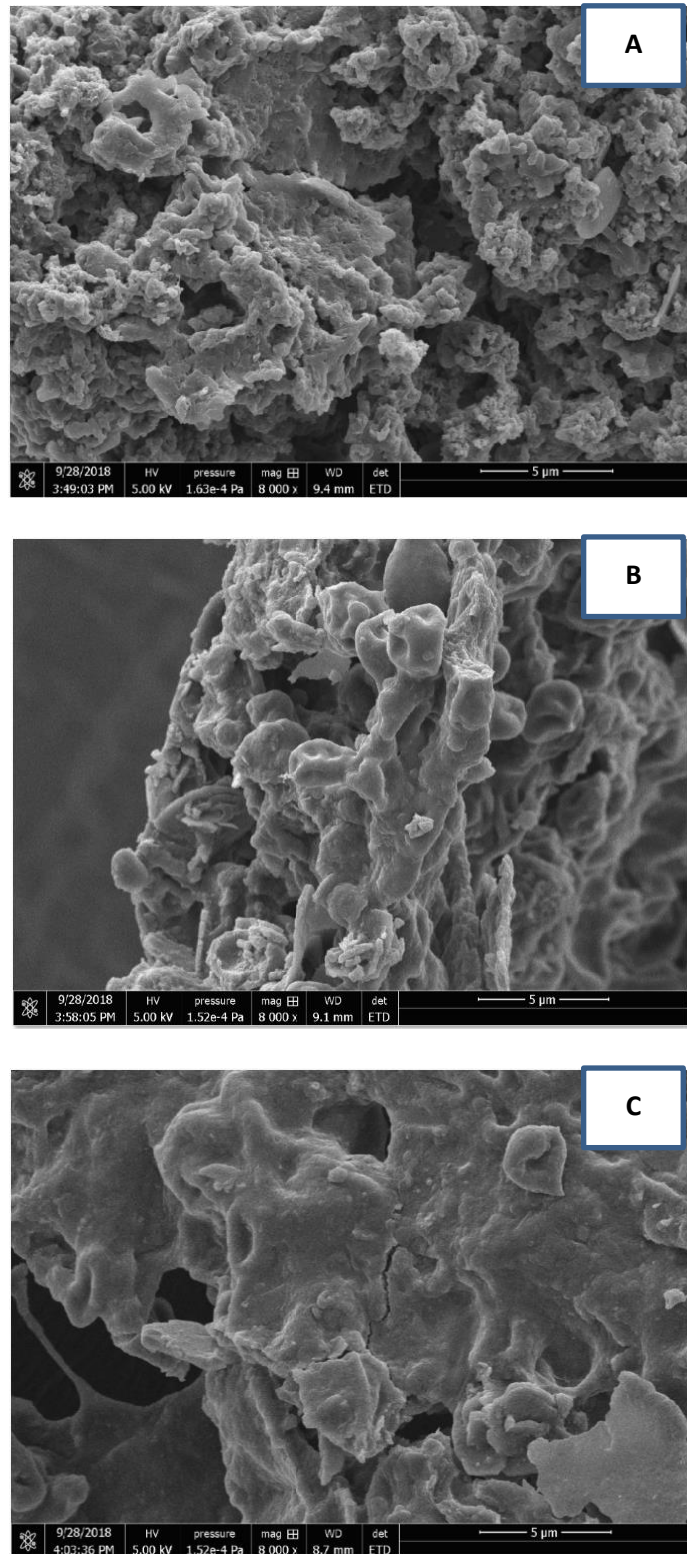


Figura 35. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) das amostras de lignina *in natura* (a), Meio com 20 g L⁻¹ de lignina após fermentação com *C. parapsilosis* (M2) (b) e Meio com 30 g L⁻¹ de lignina após fermentação com *C. parapsilosis* (M2) (c) – escala das imagens: 5 µm.

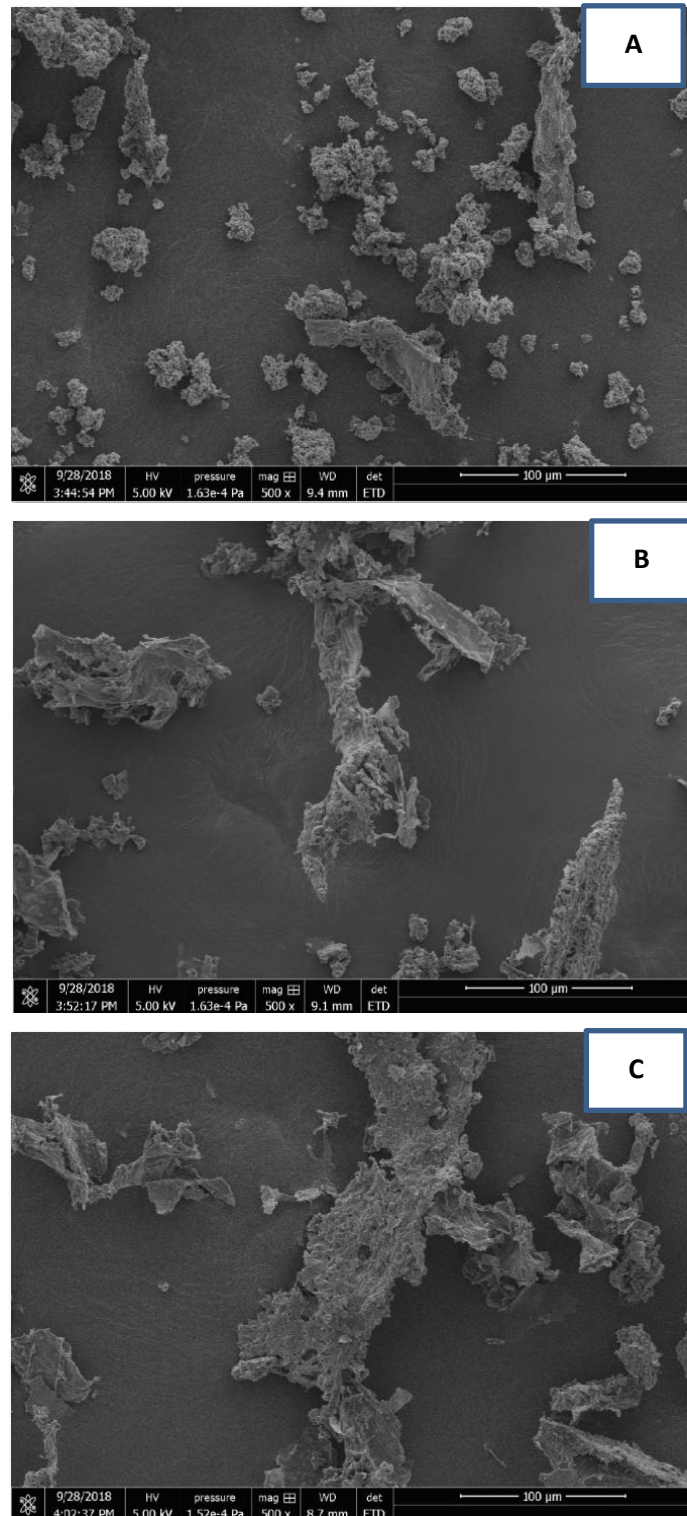


Figura 36. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) das amostras de lignina *in natura* (a), Meio com 20 g L⁻¹ de lignina após fermentação com *C. parapsilosis* (M2) (b) e Meio com 30 g L⁻¹ de lignina após fermentação com *C. parapsilosis* (M2) (c) - escala das imagens: 100 µm

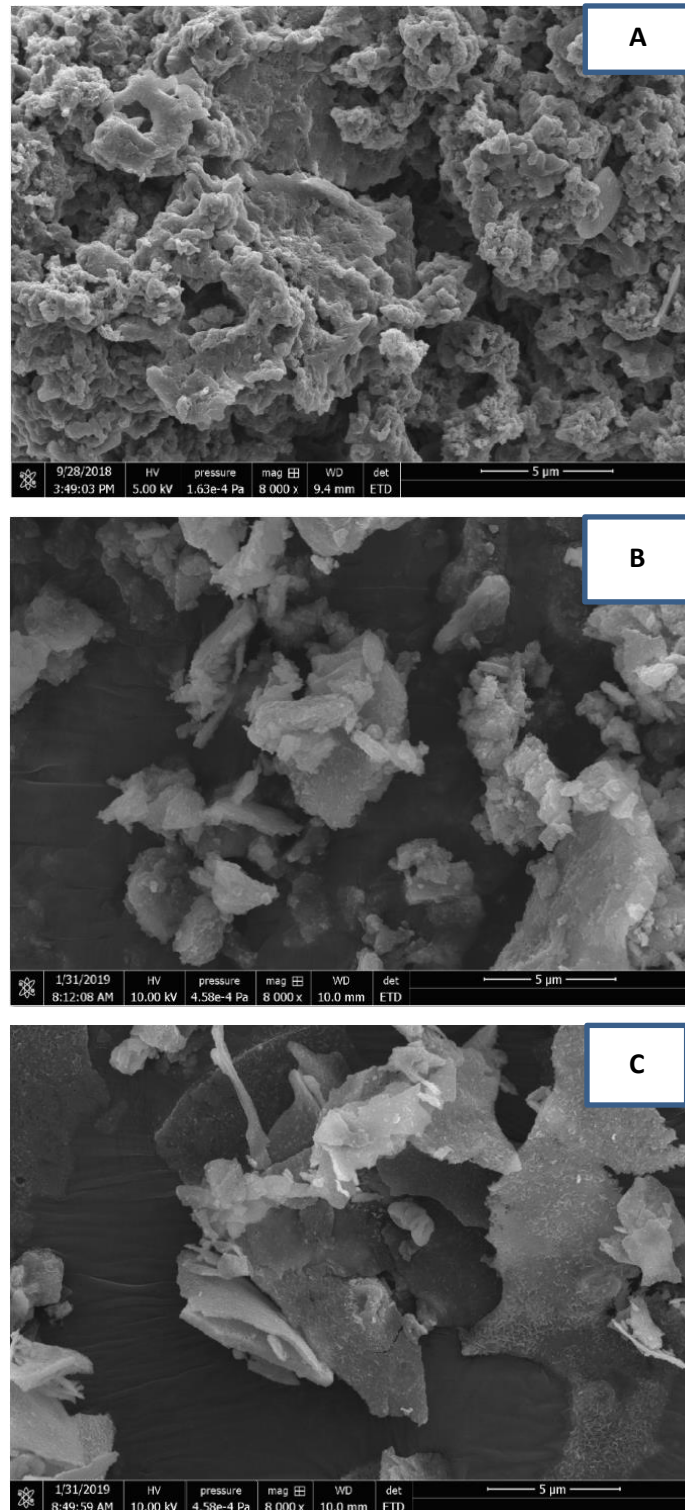


Figura 37. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) das amostras de lignina *in natura* (a), Meio com 20 g L⁻¹ de lignina após fermentação com *C. parapsilosis* (M3) (b) e Meio com 30 g L⁻¹ de lignina após fermentação com *C. parapsilosis* (M3) (c) - escala das imagens: 5 μm

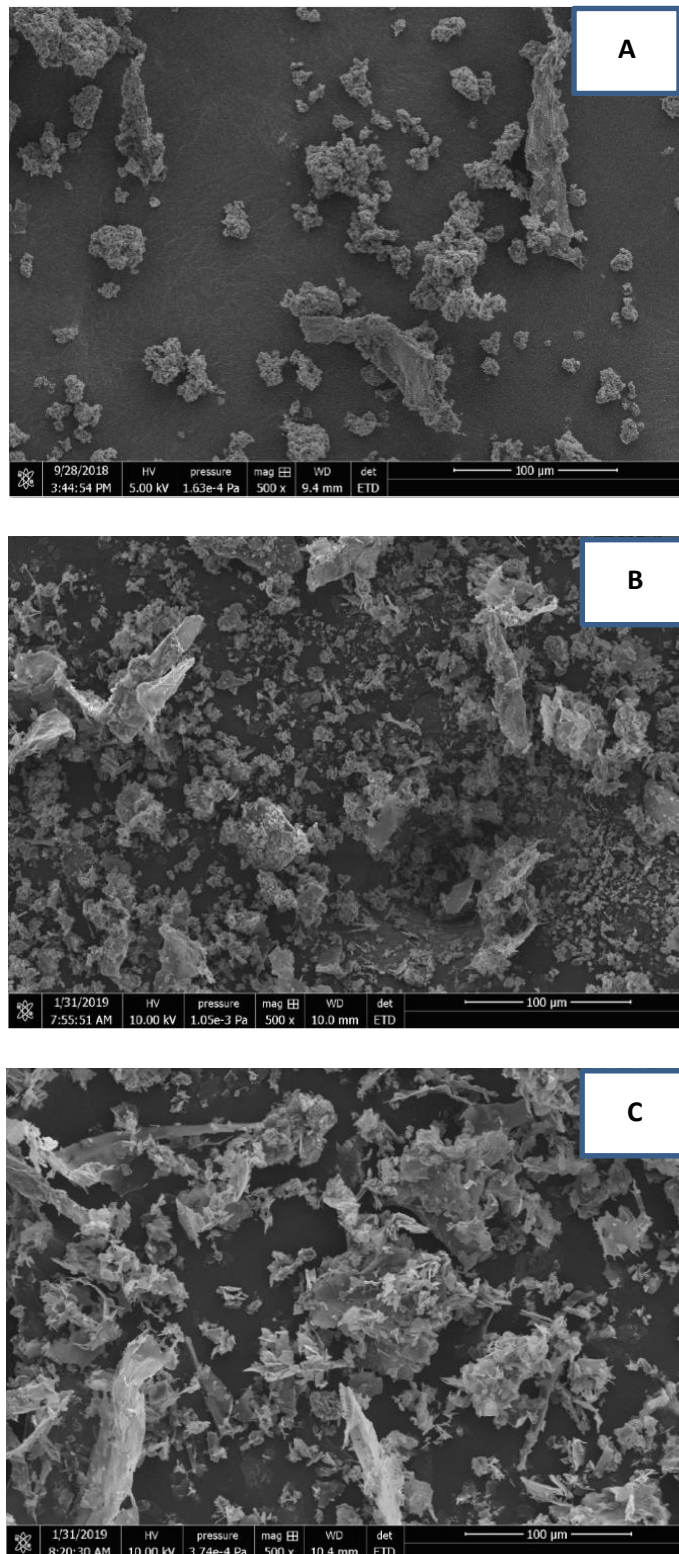


Figura 38. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) das amostras de lignina *in natura* (a), Meio com 20 g L⁻¹ de lignina após fermentação com *C. parapsilosis* (M3) (b) e Meio com 30 g L⁻¹ de lignina após fermentação com *C. parapsilosis* (M3) (c) - escala das imagens: 100 µm

Observando as Figuras 35 a 38 notou-se que o processo fermentativo utilizando *C.parapsilosis* promoveu a quebra, achatamento e alongamento da estrutura lignocelulósica. Resultados semelhantes foram obtidos por MILÉO (2015) ao estudar reações de degradação da lignina provocada por diferentes tipos de tratamentos (MILÉO, 2015).

5. Conclusões

A lignina foi isolada da casca de laranja e de pellets de polpa cítrica e purificada com sucesso, apresentando um rendimento de 0,65%, valor próximo ao indicado pela literatura. As avaliações estruturais por espectroscopia de ressonância magnética nuclear e por infravermelho, indicaram a presença de regiões e bandas específicas da lignina.

Os microrganismos isolados do bagaço de laranja *in natura* apresentaram capacidade para degradar xilose e suportam elevadas concentrações de lignina (20 e 30 g L⁻¹) sem que a mesma provocasse mortalidade das células. Dentre os oito microrganismos selecionados, notou-se que o M2 se destacou ao apresentar um maior crescimento em meio contendo xilose ao invés de glicose, além do M3 que apresentou o maior crescimento em meio contendo xilose. Dessa forma, ambos foram encaminhados para análise filogenética no CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) e identificados como a levedura - *Candida parapsilosis*.

Comparando-se os espectros de ATR-FTIR da lignina com o meio fermentado usando o microrganismo *C. parapsilosis* em duas concentrações da lignina (20 e 30 g L⁻¹), notou-se que ocorreram modificações estruturais na lignina, destacando-se a redução da banda correspondente à carbonila conjugada.

Em relação aos dados de CP/MAS ¹³C NMR, notou-se um aumento na intensidade dos sinais nos meios após fermentação correspondentes à celulose indicando a degradação da lignina ao longo do processo fermentativo. A degradação da lignina promove a liberação da celulose, sendo possível detectar essa modificação por NMR.

Através das análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas verificou-se a degradação de dois dímeros da lignina reportados pela literatura. Realizou-se apenas o *scan* das amostras (MS¹), dessa forma, trabalhos posteriores podem ser realizados para explorar melhor os produtos formados. Também se observou que os microrganismos utilizados não são capazes de degradar a vanilina, pois a mesma possui um sinal constante antes e depois da fermentação.

Através da microscopia eletrônica de varredura (SEM) notou-se que os microrganismos promoveram a quebra, achatamento e alongamento da estrutura lignocelulósica.

6. Referências

AAMIR, S. et al. A rapid and efficient method of fungal genomic DNA extraction, suitable for PCR based molecular methods. **Plant Pathology & Quarantine Journal of Fungal Biology**, v. 5, p. 74–81, 2015.

ANDÉREZ FERNÁNDEZ, M. et al. Hemicelluloses from stone pine, holm oak, and Norway spruce with subcritical water extraction – comparative study with characterization and kinetics. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 133, p. 647–657, 2018.

ARIAS, C. R. et al. Yeast species associated with orange juice: Evaluation of different identification methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1955–1961, 2002.

ASINA, F. N. U. et al. Microbial treatment of industrial lignin: Successes, problems and challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 77, p. 1179–1205, 2017.

AWAN, A. T.; TSUKAMOTO, J.; TASIC, L. Orange waste as a biomass for 2G-ethanol production using low cost enzymes and co-culture fermentation. **RSC Advances**, v. 3, p. 25071–25078, 2013.

BARROS, C. H. N. et al. Soda lignin from Citrus sinensis bagasse: extraction, NMR characterization and application in bio-based synthesis of silver nanoparticles. **Energy, Ecology and Environment**, v. 3, p. 87–94, 2018.

CANTERI, M. H. G. et al. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, p. 149–157, 2012.

CHEN, H. Chemical composition and structure of natural lignocellulose. **Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice**. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 25–71, 2014.

CONSTANT, S. et al. New insights into the structure and composition of technical lignins: A comparative characterisation study. **Green Chemistry: An International**

Journal and Green Chemistry Resource: GC, v. 18, p. 2651–2665, 2016.

CORDEIRO, R. de A. et al. Candida parapsilosis complex in veterinary practice: A historical overview, biology, virulence attributes and antifungal susceptibility traits. **Veterinary Microbiology**, v. 212, p. 22–30, 2017.

CROTTI, A. E. M. et al. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, p. 287–292, 2006.

CYPRIANO, D. Z.; DA SILVA, L. L.; TASIC, L. High value-added products from the orange juice industry waste. **Waste Management**, v. 79, p. 71–78, 2018.

DA SILVA, A. C. R. et al. Comparison of the genomes of two Xanthomonas pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, p. 459–463, 2002.

DE GONZALO, G. et al. Bacterial enzymes involved in lignin degradation. **Journal of Biotechnology**, v. 236, p. 110–119, 2016.

DE SOUZA, W. R. Microbial degradation of lignocellulosic biomass. In _____ **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**, p. 207 – 247, 2013.

DURÁN, N. et al. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 907–931, 2002.

EVTUGUIN, D. V.; AMADO, F. M. L. Application of electrospray ionization mass spectrometry to the elucidation of the primary structure of lignin. **Macromolecular Bioscience**, v. 3, p. 339–343, 2003.

KIRK, T. K. Lignin biodegradation: Microbiology, chemistry, and potential applications, **CRC Press**, v. 1, p. 1 – 50, 2018.

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie**, v. 44, p. 3358–3393, 2005.

LIU, L.P. et al. Construction of EGFP-labeling system for visualizing the infection process of *Xanthomonas Axonopodis* Pv. Citri in planta. **Current microbiology**, v. 65, p. 304–312, 2012.

LI, Z.; GE, Y. Extraction of lignin from sugar cane bagasse and its modification into a high performance dispersant for pesticide formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1866–1871, 2011.

LOURENÇO, A.; PEREIRA, H. Compositional variability of lignin in biomass. In _____ **Lignin - Trends and Applications**, p. 65 – 98, 2018.

MANISHA; YADAV, S. K. Technological advances and applications of hydrolytic enzymes for valorization of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1727–1739, 2017.

MARIÑO BOHÓRQUEZ, M. A. et al. Caracterização de nanocelulose do bagaço de laranja e imobilização de enzimas hidrolíticas visando seu aproveitamento durante a etapa da hidrólise de celulose. (<http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/330742>)

MARIÑO, M. et al. Enhanced materials from nature: Nanocellulose from citrus waste. **Molecules** , v. 20, p. 5908–5923, 2015.

MARIÑO, M. A.; REZENDE, C. A.; TASIC, L. A multistep mild process for preparation of nanocellulose from orange bagasse. **Cellulose** , v. 25, p. 5739–5750, 2018.

MARKETS, M. A. Feed enzymes market by type. **Feed Enzymes Market: Global Forecast to 2022**, p. 52, 2017

MARTINS, G. M. et al. The isolation of pentose-assimilating yeasts and their xylose fermentation potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 162–168, 2018.

MIKA, L. T.; CSÉFALVAY, E.; NÉMETH, Á. Catalytic conversion of carbohydrates to initial platform chemicals: Chemistry and sustainability. **Chemical reviews**, v. 118, p. 505–613, 2018.

MILÉO, P. C. Estudo do uso de ligninas como agente compatibilizante em compósitos de polipropileno reforçados com celulose de bagaço e palha de cana-de-açúcar. (http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97131/tde-05082015-152125/publico/BIT15005_C.pdf)

NADA, A.-A. M. A. et al. Infrared spectroscopy of some treated lignins. **Polymer degradation and stability**, v. 62, p. 157–163, 1998.

NAGATANI, T. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field-emission source and in-lens system. **Scanning microscopy**, v. 1, p. 901–909, 1987.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G. **Anuário da citricultura 2017**, 2017

OBASI, B. C. et al. Isolation and identification of yeast associated with fermented orange juice. **The International Journal of Engineering and Science (IJES)**, v. 3, p. 64–69, 2014.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S.; et al. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, p. 1549–1558, 2010.

PEREIRA, L. F. Identificação e caracterização de levedura do gênero *Lachancea* Kurtzman isolada de mosto de alambique da zona da mata do estado de Pernambuco. (<http://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/412>)

PITT, J. J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. **The Clinical Biochemist Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists**, v. 30, p. 19–34, 2009.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863–871, 2003.

RIVAS, B. et al. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, p. 2380–2387, 2008.

SANTI, L.; BERGER, M.; DA SILVA, W. O. B. Pectinases e pectina: Aplicação comercial e potencial biotecnológico. **Revista Caderno Pedagógico**, v. 11, n. 1, 2014.

SANTOS, F. A. et al. Potential of sugarcane straw for ethanol production. **Química Nova**, v. 35, p. 1004–1010, 2012.

SINGH, Y. D.; MAHANTA, P.; BORA, U. Comprehensive characterization of lignocellulosic biomass through proximate, ultimate and compositional analysis for bioenergy production. **Renewable Energy**, v. 103, p. 490–500, 2017.

STARK, N. M.; YELLE, D. J.; AGARWAL, U. P. 4 - Techniques for characterizing lignin. In _____ **Lignin in Polymer Composites**, p. 49–66, 2016

SPREEN, H.; The World Citrus Industry. **Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)**. (<http://www.eolss.net/sample-chapters/c10/E1-05A-39-00.pdf>)

TORRES, G.; TARIFA, L. R. M. Aproveitamento de resíduos agrícolas. **BRT Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas**. p. 1 -22, 2012

TSUKAMOTO, J.; DURÁN, N.; TASIC, L. Nanocellulose and bioethanol production from orange waste using isolated microorganisms. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 1537–1543, 2013.

VORAGEN, A. G. J. et al. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, p. 263 - 275 , 2009.



WOOLRIDGE, E. Mixed enzyme systems for delignification of lignocellulosic biomass. **Catalysts**, v. 4, p. 1–35, 2014.

ZHANG, J. et al. Effects of lignin-derived phenolic compounds on xylitol production and key enzyme activities by a xylose utilizing yeast *Candida Athensis* SB18. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 369–378, 2012.

ZHANG, L. et al. Determining lignin degradation in white-rot fungi-treated sacrau poplar: lignin structural changes and degradation compound analysis. **BioResources**, v. 11, p. 3972–3986, 2016.

7. Anexos

7.1 Identificação filogenética da *C. parapsilosis* (M2)

 UNICAMP FMQ-07 Emissão: GGQ	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS RELATÓRIO TÉCNICO	 CPQBA CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/4

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 1836/18 DRM	PÁGINA: 1 de 5
------------------------------------	----------------

1 – DADOS CADASTRAIS DA EMPRESA SOLICITANTE

RAZÃO SOCIAL: Unicamp/IQ/DQO		
ENDEREÇO: Rua José de Castro, 126		
CIDADE: Campinas	UF: SP	CEP: 13083861
CNPJ/CPF: 46.068.425/0001-33	INSCRIÇÃO ESTADUAL: ---	

2 – DADOS DAS AMOSTRAS

IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO: fermento	No. CPS: 192/2018
TOTAL DE AMOSTRAS: 1	LOCAL DE PRODUÇÃO: não se aplica
LOTE:	VALIDADE:

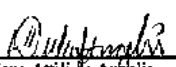
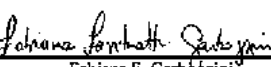

3 – ENSAIOS

ENSAIOS REALIZADOS: identificação de microrganismo
NÚMERO DOS PROCEDIMENTOS (E/R)
PTMDRM-19

4 – EXECUÇÃO DOS ENSAIOS

DIVISÃO Recursos Microbianos CPQBA – UNICAMP AV. Alexandre Cavellatto, 999 - Vila Betel - Paulínia - SP - CEP: 13140-000	
RESPONSÁVEL PELO ENSAIO: Derlene A. Angelis	
DATA DO RECEBIMENTO DA AMOSTRA	25/09/2018
PERÍODO REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS	DE: 05/10/2018 A 29/10/2018
DATA DE EMISSÃO DO RELATÓRIO	

CPQBA - UNICAMP, 29 de outubro de 2018


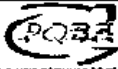
 Derlene A. Angelis RESPONSÁVEL PELO ENSAIO	 Fabiana F. Garbógini COORDENADORA DA DIVISÃO	 Marta C. Teixeira Duarte DIRETORA DO CPQBA
--	---	--

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br

 UNICAMP FMQ-07 Emissor: GQG	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS RELATÓRIO TÉCNICO	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/4	
	NÚMERO PROCESSO: CPQBA 1836/18 DRM		
	PÁGINA: 2 de 5		

I – Identificação molecular de leveduras

1. Objetivos

Identificação molecular de 1 (uma) linhagem de levedura utilizando sequenciamento e análise de distância genética baseada na sequência parcial do gene ribossomal 26S.

2. Amostra recebida

Amostra	Descrição do Cliente
CPQBA 1836-18 DRM 01	19/09/18 YPP 30°C M2

2- Metodologia utilizada

- **Repique da amostra.** A amostra recebida foi repicada em placa de Petri contendo meio de cultura apropriado.
- **Extração de DNA genômico.** O DNA genômico das culturas foi extraído utilizando o protocolo de extração de DNA com fenol (Aamir et al 2015).
- **Amplificação da região D1/D2 (DNAr 26S).** A metodologia consistiu na amplificação da região D1/D2 (DNAr 26S) pela metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram NL-1m e NL-4m, complementares às extremidades da região D1/D2.
- **Sequenciamento.** Os fragmentos amplificados foram a seguir purificados em coluna (GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit, GE Healthcare) e submetidos diretamente ao sequenciamento em sequenciador automático AB13500XL Series (Applied Biosystem). Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram NL-1 e NL-4.
- **Análise de distância genética.** As sequências parciais do gene RNAr 26S obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *consensus* (sequência consenso única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados do CBS-Knaw (<http://www.westerdijk.institute.nl/Collections/DefaultInfo.aspx?Page=1/home>) e do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Foram então selecionadas sequências de micro-organismos relacionados ao isolado desconhecido para construção do dendograma. As sequências de DNA foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) dentro do BioEdit 7.2.6 (Hall, T.A. 1999) e as análises de distância genética foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). A matriz de distância foi calculada com o modelo de Kimura (1980) e a construção do dendograma a partir das distâncias genéticas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software incluído no programa MEGA 6.0.

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetada sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometer. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.



FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br

938

[Handwritten signature]

 UNICAMP FMQ-07 Emissão: GGQ	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS	 CPQBA CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/4
	RELATÓRIO TÉCNICO	

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 1836/18 DRM	PÁGINA: 3 de 5
---	-----------------------

3- Resultados

- As colônias isoladas obtidas em cultivo para a amostra **CPQBA 1836/18 DRM 01** apresentaram aspecto homogêneo, sem evidências de contaminação.
- Os fragmentos do gene DNAr 26S foram amplificados e sequenciados com sucesso a partir do DNA genômico extraído da amostra **CPQBA 1836/18 DRM 01**.
- O dendograma de distância genética construído a partir das sequências recuperadas da base de dados do GenBank e da amostra **CPQBA 1836-18 DRM 01** está apresentado na Figura 1.
- A sequência parcial do gene DNAr 26S obtidas para a amostra **CPQBA 1836-18 DRM 01** está apresentada no Anexo I.
- Os resultados de identificação estão apresentados abaixo:

Amostra	Descrição do Cliente	Identificação
CPQBA 1836-18 DRM 01	19/09/18 YPP 30°C M2	<i>Candida parapsilosis</i> (Ashford) Langeron & Talice 1932

4- Comentários

A sequência parcial da região D1/D2 (DNAr 26S) da amostra **CPQBA 1836/18 DRM-01** apresentou 100% de similaridade com as sequências da mesma região do operon ribossomal de representantes da espécie *Candida parapsilosis*, depositadas no banco de dados GenBank e no banco de dados do CBS-Knaw.

A análise filogenética (Figura 1) recuperou a amostra **CPQBA 1836/18 DRM-01** em um agrupamento robusto com a linhagem Tipo *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Assim, os resultados das análises realizadas nas bases de dados e da filogenia sugerem a identificação final da amostra **CPQBA 1836/18 DRM-01** como *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice 1932.



Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetada sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

PHONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br

[Handwritten signatures and initials]

 UNICAMP FMQ-07 Emissão: GGO	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS RELATÓRIO TÉCNICO	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/4
NÚMERO PROCESSO: CPQBA 1836/18 DRM		PÁGINA: 4 de 5

5- Referências Bibliográficas

- Aamir S., Sutar S., Singh S.K., Baghela A. (2015) A rapid and efficient method of fungal genomic DNA extraction, suitable for PCR based molecular methods. *Plant Pathology & Quarantine* 5(2): 74-81.
- Deniz, S., Franke, I., Schmidt, M., Sobek, H., Seth, O. Rapid Screening by Direct Colony PCR Using the FastStart PCR Master. *Biochemica* NO. 1 2006 (adaptado pelo laboratório de biologia molecular da DRM)
- Kimura, M. 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Scherer & Stevens (1987). Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 25:675-679.
- Sulo P, Szabóová D, Bielík P, Poláková S, Šoltys K, Jatzová K, Szemes T. (2017). The evolutionary history of *Saccharomyces* species inferred from completed mitochondrial genomes and revision in the 'yeast mitochondrial genetic code'. *DNA Research*. 24(6):571-583.
- Thompson, J.D. Higgins, D.G. Gibson, T.J. Clustal, W. 1994. Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.


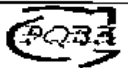
Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vedado seu uso parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentadas são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cnpesq@cpqba.unicamp.br

[Handwritten signature]

 UNICAMP FMQ-07 Emissão: GGQ	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS RELATÓRIO TÉCNICO	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/4	
	<table border="1"> <tr> <td>NÚMERO PROCESSO: CPQBA 1836/18 DRM</td> <td>PÁGINA: 5 de 5</td> </tr> </table>		NÚMERO PROCESSO: CPQBA 1836/18 DRM
NÚMERO PROCESSO: CPQBA 1836/18 DRM	PÁGINA: 5 de 5		

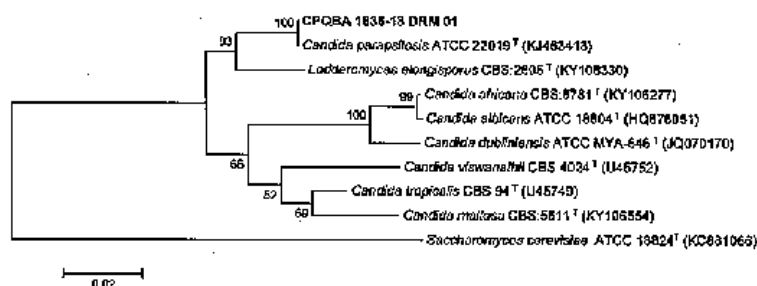


Figura 1. Dendrograma utilizando o método *Neighbor-joining*, baseado em distância genética demonstrando a relação entre a sequência parcial do gene ribossomal 26S da amostra CPQBA 1836-18 DRM 01 e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados Genbank e CBS-Knaw.

Anexo I. Sequência parcial do gene DNAr 26S da amostra analisada.

>consensus1836

```
AAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAGAGAGGTATCTTTGGGCTCGGCTCTTGTCT
ATGTTTCTTGGAAACAGAACCTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGTCCGAGACCTATGTAAAGTTCCCTTCGA
AGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAG
CGAACCAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGG
GCCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTCTCGGGGGTGGCCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGA
GCGGTAGGATAAGTGCAAAGAAATGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTTTATAGTCTTTGTGATACCTCCAGCTTAGACTG
AGGACTGCGGCTCGGCCT
```

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vedada sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.


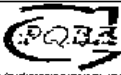
FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: compes@cpqba.unicamp.br

[Handwritten signatures and initials]

7.2 Identificação filogenética da *C. parapsilosis* (M3)

 UNICAMP FMQ-07 Emissão: GGQ	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS RELATÓRIO TÉCNICO	 CENTRO DE PESQUISA EM QUÍMICA, BIOTECNOLOGIA E AGRICULTURA Edição/Revisão: 2/4

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 1897/18 DRM	PÁGINA: 1 de 6
------------------------------------	----------------

1 – DADOS CADASTRAIS DA EMPRESA SOLICITANTE

RAZÃO SOCIAL: Unicamp/IQ/DQO		
ENDEREÇO: Rua José de Castro, 126		
CIDADE: Campinas	UF: SP	CEP: 13083861
CNPJ/CPF: 46.068.425/0001-33	INSCRIÇÃO ESTADUAL: ...	

2 – DADOS DAS AMOSTRAS

IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO: não informado		No.CPS: 257/2018
TOTAL DE AMOSTRAS: 1	LOCAL DE PRODUÇÃO: não informado	
LOTE:	VALIDADE:	

3 – ENSAIOS

ENSAIOS REALIZADOS: Identificação de microrganismos por análise de sequência de operon ribossomal
NÚMERO DOS PROCEDIMENTOS (E/R)
PADRM10

4 – EXECUÇÃO DOS ENSAIOS

DIVISÃO Recursos Microbianos CPQBA – UNICAMP AV. Alexandre Cazellato, 999 - Vila Betel - Paulínia - SP - CEP: 13140-000	
RESPONSÁVEL PELO ENSAIO: Derlene A. Angelis	
DATA DO RECEBIMENTO DA AMOSTRA	03/12/2018
PERÍODO REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS	DE: 03/12/2018 A 18/01/2019
DATA DE EMISSÃO DO RELATÓRIO	

CPQBA - UNICAMP, 18 de janeiro de 2019


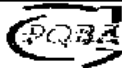
 Derlene A. Angelis RESPONSÁVEL PELO ENSAIO	 Valéria M. Merzel COORDENADOR DA DIVISÃO	 Marta Cristina T. Duarte DIRETOR DO CPQBA
--	--	---

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetada sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br

 UNICAMP FMQ-07 Emissão: GGO	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/4
	RELATÓRIO TÉCNICO	

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 1897/18 DRM

PÁGINA: 2 de 6

I – Identificação molecular de leveduras

1. Objetivos

Identificação molecular de 1 (uma) linhagem de levedura utilizando sequenciamento e análise de distância genética baseada na sequência parcial do gene ribossomal 26S.

2. Amostra recebida

Amostra	Descrição do Cliente
CPQBA 1897-18 DRM 01	M3 26/4

2- Metodologia utilizada


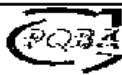
- **Repique da amostra.** A amostra recebida foi repicada em placa de Petri contendo meio de cultura apropriado.
- **Extração de DNA genômico.** O DNA genômico da cultura foi extraído utilizando o protocolo de extração de DNA com fenol (Aamir et al 2015).
- **Amplificação da região D1/D2 (DNAr 26S).** A metodologia consistiu na amplificação da região D1/D2 (DNAr 26S) pela metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram NL-1m e NL-4m, complementares às extremidades da região D1/D2.
- **Sequenciamento.** Os fragmentos amplificados foram a seguir purificados em coluna (GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit, GE Healthcare) e submetidos diretamente ao sequenciamento em sequenciador automático ABI3500XL Series (Applied Biosystem). Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram NL-1 e NL-4.
- **Análise de distância genética.** As sequências parciais do gene RNAr 26S obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *consensus* (sequência consenso única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do CBS-Knaw (<http://www.westerdijk.nl/>). Foram então selecionadas sequências de micro-organismos relacionados ao micro-organismo desconhecido para construção do dendograma. As sequências de DNA foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) dentro do BioEdit 7.2.6 (Hall, T.A. 1999) e as análises de distância genética foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). A matriz de distância foi calculada com o modelo de Kimura (1980) e a construção do dendograma a partir das distâncias

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos utilizados, sendo vedado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentadas são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: campesq@cpqba.unicamp.br

 UNICAMP FMQ-07 Emissão: GGQ	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS RELATÓRIO TÉCNICO	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/4

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 1897/18 DRM	PÁGINA: 3 de 6
------------------------------------	----------------

genéticas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software incluído no programa MEGA 6.0.

3- Resultados

- As colônias isoladas obtidas em cultivo para a amostra CPQBA 1897/18 DRM 01 apresentaram aspecto homogêneo, sem evidências de contaminação.
- Os fragmentos do gene DNAr 26S foram amplificados e sequenciados com sucesso a partir do DNA genômico extraído da amostra CPQBA 1897/18 DRM 01.
- O dendrograma de distância genética construído a partir das sequências recuperadas da base de dados do GenBank da amostra CPQBA 1897-18 DRM 01 está apresentado na Figura 1.
- A sequência parcial do gene DNAr 26S obtidas para a amostra CPQBA 1897-18 DRM 01 está apresentada no Anexo I.
- Os resultados de identificação estão apresentados abaixo:

Amostra	Descrição do Cliente	Identificação
CPQBA 1897-18 DRM 01	M3 26/4	<i>Candida parapsilosis</i> (Ashford) Langeron & Talice 1932

4- Comentários

A sequência parcial da região D1/D2 (DNAr 26S) da amostra CPQBA 1897/18 DRM-01 apresentou 100% de similaridade com as sequências da mesma região do operon ribossomal de representantes da espécie *Candida parapsilosis*, depositadas no banco de dados GenBank e no banco de dados do CBS-Knaw.

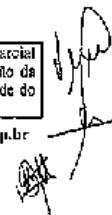
A análise de distância genética (Figura 1) recuperou a amostra CPQBA 1897/18 DRM-01 em um agrupamento robusto com a linhagem Tipo *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Assim, os resultados das análises realizadas nas bases de dados e da filogenia sugerem a identificação final da amostra CPQBA 1897/18 DRM-01 como *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice 1932.



Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetada sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometerem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

PHONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br



 UNICAMP FMD-07 Emissão: GGQ	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/4
CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS		
RELATÓRIO TÉCNICO		

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 1897/18 DRM	PÁGINA: 4 de 6
------------------------------------	----------------

5- Referências Bibliográficas

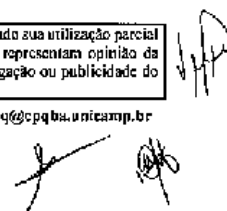
- Aamir S., Sutar S., Singh S.K., Baghela A. (2015) A rapid and efficient method of fungal genomic DNA extraction, suitable for PCR based molecular methods. *Plant Pathology & Quarantine* 5(2): 74-81.
- Deniz, S., Franke, L., Schmidt, M., Sobek, H., Seth, O. Rapid Screening by Direct Colony PCR Using the FastStart PCR Master. *Biochemica* NO. 1 2006 (adaptado pelo laboratório de biologia molecular da DRM)
- Kimura, M. 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Tamura K., Dudley J., Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Scherer & Stevens (1987). Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 25:675-679.
- Sulo P, Szabóová D, Bielek P, Poláková S, Šoltys K, Jazová K, Szemes T. (2017). 'The evolutionary history of *Saccharomyces* species inferred from completed mitochondrial genomes and revision in the 'yeast mitochondrial genetic code'. *DNA Research*. 24(6):571-583.
- Thompson, J.D. Higgins, D.G. Gibson, T.J. Clustal, W. 1994. Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.



Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetada sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

PHONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: conpesq@cpqba.unicamp.br



 UNICAMP FMQ-07 Emissão: GGO	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS RELATÓRIO TÉCNICO	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS
	Edição/Revisão: 2/4	

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 1897/18 DRM

PÁGINA: 5 de 6

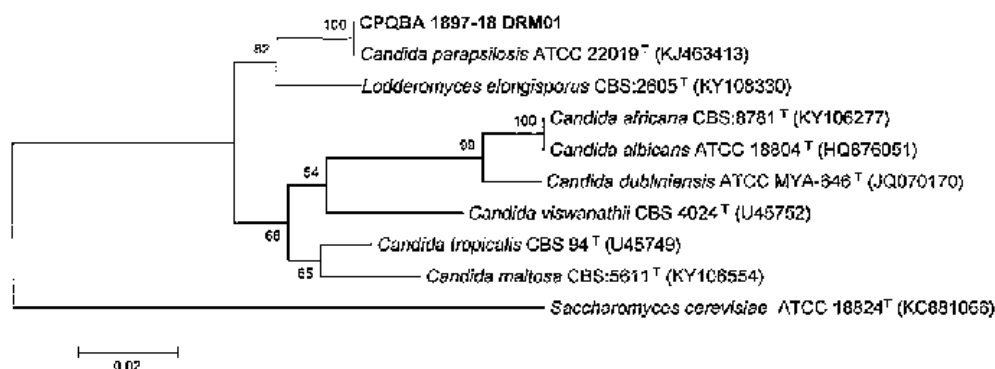



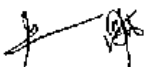
Figura 1. Dendrograma utilizando o método *Neighbor-joining*, baseado em distância genética demonstrando a relação entre a sequência parcial do gene ribossomal 26S da amostra CPQBA 1897-18 DRM 01 e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados Genbank e CBS-Knaw.



Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: centpesq@cpqba.unicamp.br

 UNICAMP FMQ-07 Emissão: GGQ	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS RELATÓRIO TÉCNICO	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/4
---	--	--

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 1897/18 DRM

PÁGINA: 6 de 6

Anexo I. Sequência parcial do gene DNAr 26S da amostra analisada.

GGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGT
 CTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAAACAGAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGTCCC
 AGACCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCC
 ATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAACAATTT
 TGAAGAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTG
 TATGTTACTCTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTAACGGGCCAGCATCAGTTTGAGCGGTAGGATAAGTGC
 AAAGAAATGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTGTGATAGTCCAGCTTAGACTGAGGACTG
 CGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCTTGA

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentadas são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br

