

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

THAIANY DA SILVA SOARES

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POR
BASIDIOMICETOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS E COMPOSTOS DE
INTERESSE INDUSTRIAL**

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2023

THAIANY DA SILVA SOARES

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POR
BASIDIOMICETOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS E COMPOSTOS DE
INTERESSE INDUSTRIAL**

**BIOTRANSFORMATION OF AGRO-INDUSTRIAL WASTES BY
BASIDIOMYCETES FOR THE PRODUCTION OF ENZYMES AND COMPOUNDS
OF INDUSTRIAL INTEREST**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Área de Concentração: Tecnologias e Processos Ambientais.

Linha de Pesquisa: Processos Químicos e Biotecnológicos de Tratamento e Valorização de Resíduos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Giselle Maria Maciel

CURITIBA

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite que outros distribuam, remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que lhe atribuam o devido crédito pela criação original.



THAIANY DA SILVA SOARES

BIOTRANSFORMAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POR BASIDIOMICETOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS E COMPOSTOS DE INTERESSE INDUSTRIAL

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Ciência E Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologias E Processos Ambientais.

Data de aprovação: 28 de Abril de 2023

Dra. Giselle Maria Maciel, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Cristina Giatti Marques De Souza, Doutorado - Universidade Estadual de Maringá (Uem)

Dra. Josiane Aparecida Gomes Figueiredo, Doutorado - Universidade Estadual do Paraná (Unespar)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 28/04/2023.

Com muita satisfação dedico esta pesquisa em memória da minha avó e da minha tia, **Enedina e Edenize**, mulheres esplêndidas, exemplos de persistência e garra, que sempre me incentivaram e ajudaram na formação da minha educação.

À minha **família** e ao meu **namorado**, cujas presenças foram essenciais para a conclusão desta dissertação. Mas, acima de tudo, por todo o apoio, compreensão e principalmente o amor no decorrer dos meus estudos. Gratidão eterna a todos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, devo agradecimento à Deus e a todos os meus familiares que não estão mais presentes fisicamente comigo. Em especial a minha avó e a minha tia, Enedina e Edenize, por todas as bênçãos e proteções concedidas.

Aos meus pais, Claudionei e Rita, por todo sacrifício feito para me dar a melhor educação possível, por todo apoio, força, criação, a extrema paciência e amor que me deram. Graças a eles eu acredito que tenho forças e a capacidade de conquistar tudo o que anseio.

Agradeço aos meus irmãos, Náthaly e Leandro, assim como ao meu cunhado, Tiago, por sempre me apoiarem, estarem ao meu lado, pelo companheirismo de sempre e por todas as caronas fornecidas para a faculdade.

Aos meus sobrinhos, Arthur e Miguel, que contagiam meu dia com toda a alegria, amor e leveza. Tenho muita sorte por vocês estarem em minha vida.

A minha tia, Elenice, minha segunda mãe, que sempre me dá todo o apoio possível, acredita no meu potencial e por toda a educação/ensinamentos prestados ao decorrer da minha vida.

Aos meus primos, Aline e Carlos, que apesar da distância sempre se mostraram presentes, por toda motivação e apoio ao decorrer desses anos de estudo.

Ao meu namorado, Fábio Júnior, por toda atenção, carinho, compreensão das minhas ausências, paciência, amor e principalmente o companheirismo. Obrigada por me proporcionar a calma e a paz nos meus momentos mais difíceis, por sempre estar ao meu lado e por me dar uma segunda família.

Às minhas amigas, Nathally e Nicolly, por entenderem minha ausência nesses últimos anos, mas que apesar disso sabem que sempre estive e estarei ao lado delas. Obrigado meninas por sempre me motivarem e apoiarem.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Giselle, por todo conhecimento e ensinamentos proporcionados, pela imensa paciência, apoio e compreensão, e ao Prof. Dr. Charles, por todas as palavras de incentivo e apoio.

Aos meus companheiros de laboratório, em especial a Andressa, Morgana, Wédisley e Dayane, por todo conhecimento compartilhado, acolhimento e ajuda proporcionada. Mas, principalmente à Camila, por ter me ajudado a ingressar no programa, por todo o incentivado e por ser um exemplo para mim de mestra a ser seguido.

Aos membros que compuseram as bancas de qualificação e, por fim, o de dissertação, pelo aceite aos convites, por auxiliar e contribuir com a melhoria deste trabalho, em especial a

Prof.^a Dra. Josiane, por todo apoio, incentivo e conhecimento proporcionado durante toda a minha caminhada acadêmica.

Ao Laboratório Multiusuário de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), especialmente à Luana, Rafaela e ao Tobias, pelo auxílio prestado ao decorrer de todas as análises.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental e a CAPES (88887.675749/2022-00), por me disponibilizarem todos os recursos necessários e pela estrutura financeira para a realização deste trabalho.

“Sempre haverá uma outra montanha e eu sempre irei querer movê-la. Sempre será uma batalha difícil, às vezes eu terei que perder. Não se trata do quão rápido eu chegarei lá, não se trata do que está me esperando do outro lado, é a subida.”

(MILEY CYRUS)

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(MADRE TERESA)

RESUMO

SOARES, Thaiany da Silva. **Biotransformação de resíduos agroindustriais por basidiomicetos para produção de enzimas e compostos de interesse industrial**. 2023. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2023.

Os resíduos agroindustriais tornaram-se mais do que apenas uma questão ambiental ao longo dos anos. Eles são agora reconhecidos como uma fonte sustentável e de baixo custo de biopolímeros e produtos químicos industrialmente importantes. No entanto, operações de pré-tratamento, como processos biológicos, são necessárias para obter eficientemente os produtos pretendidos a partir dos resíduos. O uso de várias biomassas para adquirir simultaneamente mais produtos em um único lote se encaixa no conceito de biorrefinaria. Assim, este trabalho descreve o uso de seis resíduos agroindustriais em combinações desenhadas estatisticamente para avaliar a produção de enzimas (hidrolíticas e oxidativas) e liberação de açúcares redutores e compostos fenólicos, pelos fungos *Trametes villosa* e *Pycnoporus* sp., inoculados como *pellets* ou *plugs* miceliais. Ambos os fungos produziram concomitantemente celulases, pectinases e lacases em culturas semissólidas, bem como liberaram açúcares e fenólicos dos substratos, embora cada fungo tenha respondido de forma diferente às composições dos meios. *Pycnoporus* sp. foi o melhor produtor de celulases (0,58 FPU/mL como *plugs*), e *T. villosa* foi o melhor produtor de pectinases (7,58 U/mL como *plugs*) e lacases (1438 U/L como *pellets*). Os maiores valores de açúcares redutores totais e compostos fenólicos foram detectados nos extratos dos *plugs* de *Pycnoporus* sp. (37,12 mg/mL) e dos *plugs* de *T. villosa* (0,261 mg EAG/mL), respectivamente. O bagaço de uva (GP), a interação entre GP e bagaço de cana-de-açúcar e a adição de sulfato de cobre em meios de cultura foram considerados mais de uma vez como efeitos significativos e positivos para a produção de enzimas e outros produtos.

Palavras-chave: Otimização; *Trametes villosa*; *Pycnoporus* sp.; Enzimas Hidrolíticas; Enzimas Oxidativas; Açúcares Redutores; Compostos Fenólicos.

ABSTRACT

SOARES, Thaiany da Silva. **Biotransformation of agro-industrial wastes by basidiomycetes for the production of enzymes and compounds of industrial interest.** 2023. 107 f. Thesis (Master's in Environmental Science and Technology) – Federal University of Technology – Paraná, Curitiba, 2023.

Agro-industrial residues have become more than only an environmental issue over the years. They are now recognized as a sustainable and low-cost source of biopolymers and industrially important chemicals. However, pre-treatment operations, such as biological processes, are required to efficiently obtain the intended products from the residues. The use of various biomasses to simultaneously acquire more products in a single batch fits the concept of biorefinery. Thus, this paper describes the use of six agro-industrial residues in combinations designed statistically to evaluate the production of enzymes (hydrolytic and oxidative), and release of reducing sugars and phenolic compounds, by the fungi *Trametes villosa* and *Pycnoporus* sp. inoculated as mycelia pellets or mycelia discs. Both fungi concurrently produced cellulases, pectinases, and laccases in semi-solid cultures, as well as released sugars and phenolics from the substrates, though each fungus responded differently to media compositions. *Pycnoporus* sp. was the best producer of cellulases (0.58 FPU/mL as mycelia discs), and *T. villosa* was the best producer of pectinases (7.58 U/mL as mycelia discs) and laccases (1438 U/L as mycelia pellets). Highest values of total reducing sugars and phenolic compounds were detected in extracts from *Pycnoporus* sp. mycelia discs (37.12 mg/mL) and *T. villosa* mycelia discs (0.261 mg GAE/mL), respectively. Grape pomace (GP), the interaction between GP and sugarcane bagasse, and the addition of copper sulfate in culture media, were considered more than once as significant and positive effects to the production of enzymes and other products.

Keywords: Optimization; *Trametes villosa*; *Pycnoporus* sp.; Hydrolytic Enzymes; Oxidative Enzymes; Reducing Sugars; Phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aspecto macromorfológico do fungo <i>T. villosa</i> em crescimento em tronco de árvore em decomposição	25
Figura 2 – Aspecto macromorfológico do basidioma do fungo <i>Pycnoporus</i> sp. em tronco de árvore em decomposição	26
Figura 3 – Fluxograma com as principais etapas metodológicas desenvolvidas.....	37
Figura 4 – Fluxograma demonstrando as principais etapas metodológicas da manutenção dos macrofungos	38
Figura 5 – Produção dos inóculos fúngicos na forma de <i>pellets</i> e <i>plugs</i> . (A) <i>Pellets</i> . (B) <i>Plugs</i>	39
Figura 6 – Fluxograma das principais etapas metodológicas da produção dos inóculos fúngicos	39
Figura 7 – Componentes do meio de cultura. (A) Bagaço de uva. (B) Bagaço de cana-de-açúcar. (C) Borra de café. (D) Casca de arroz. (E) Resíduo de terra diatomácea. (F) Sulfato de cobre.....	41
Figura 8 – Fluxograma das principais etapas metodológicas da obtenção dos extratos brutos.....	42
Figura 9 – Fluxograma das principais etapas metodológicas da avaliação da atividade das celulases totais	43
Figura 10 – Fluxograma das principais etapas metodológicas da determinação da atividade das pectinases	44
Figura 11 – Fluxograma das principais etapas metodológicas da avaliação de lacases	45
Figura 12 – Fluxograma das principais etapas metodológicas da atividade de manganês peroxidase.....	45
Figura 13 – Fluxograma das principais etapas metodológicas da quantificação de açúcares redutores	46
Figura 14 – Fluxograma das principais etapas metodológicas da determinação de compostos fenólicos	47
Figura 15 – Diagrama de Pareto dos efeitos relacionados a produção de celulases totais por <i>T. villosa</i> (a) e <i>Pycnoporus</i> sp. (b) em <i>plugs</i>	50
Figura 16 – Diagrama de Pareto dos efeitos relacionados a produção de pectinases de <i>T. villosa</i> (a) e <i>Pycnoporus</i> sp. (b) em <i>plugs</i>	52
Figura 17 – Diagrama de Pareto dos efeitos relacionados a produção de lacases de nase	

por <i>T. villosa</i> (a) e <i>Pycnoporus</i> sp. (b) em <i>plugs</i>	54
Figura 18 – Diagrama de Pareto dos efeitos relacionados total de celulases totais por <i>Pycnoporus</i> sp. (b) em <i>pellets</i>	60
Figura 19 – Diagrama de Pareto dos efeitos relacionados a produção de pectinases por <i>T. villosa</i> (a) e <i>Pycnoporus</i> sp. (b) em <i>pellets</i>	61
Figura 20 – Diagrama de Pareto dos efeitos relacionados a produção de lacases de <i>T. villosa</i> (a) e <i>Pycnoporus</i> sp. (b) em <i>pellets</i>	62
Figura 21 – Diagrama de Pareto dos efeitos relacionados a quantidade de açúcares redutores em culturas inoculadas com <i>Pycnoporus</i> sp. em <i>pellets</i>	65
Figura 22 – Diagrama de Pareto dos efeitos relacionados a quantidade de compostos fenólicos em culturas inoculadas de <i>T. villosa</i> (a) e <i>Pycnoporus</i> sp. (b) em <i>pellets</i>	66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Matriz experimental do planejamento fatorial fracionário (2^{7-4}) para selecionar as variáveis significativas na produção de enzimas, e liberação de açúcares redutores (RS) e compostos fenólicos (PC), com inóculo fúngico na forma de *pellets* e *plugs*.....40
- Tabela 2** – Produção de celulase, pectinase e lacase por *plugs* de *T. villosa* (*Tv*) e *Pycnoporus* sp. (*Pyc*) em meios de cultura semissólidos com diferentes composições.....48
- Tabela 3** – Açúcares redutores (RS) e compostos fenólicos (PC) em controles abióticos e em extratos brutos de *T. villosa* (*Tv*) e *Pycnoporus* sp. (*Pyc*) inoculados como *plugs* em meios de cultura semissólidos compostos de acordo com a matriz experimental de planejamento fatorial fracionário.....56
- Tabela 4** – Produção de celulase, pectinase e lacase por *pellets* de *T. villosa* (*Tv*) e *Pycnoporus* sp. (*Pyc*) em meios de cultura semissólidos com diferentes composições.....58
- Tabela 3** – Açúcares redutores (RS) e compostos fenólicos (PC) em controles abióticos e em extratos brutos de *T. villosa* (*Tv*) e *Pycnoporus* sp. (*Pyc*) inoculados como *pellets* em meios de cultura semissólidos compostos de acordo com a matriz experimental de planejamento fatorial fracionário.....64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EC	Economia Circular
GEE	Gases de Efeito Estufa
Lip	Lignina Peroxidase
Mnp	Manganês Peroxidase
Lac	Lacase
CAGR	Taxa de Crescimento Anual Composta
CAZy	Enzimas Ativas para Carboidratos
GH	Glicosil Hidrolase
MCOs	Oxidases Multicobre
T1	Cobre tipo 1
T2	Cobre tipo 2
T3	Cobre tipo 3
LMS	Sistema Mediador de Lacase
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato)
HBT	1-hidroxibenzotriazol
NHPI	N-hidroxiftalimida
HIS	Histidina
ASP	Aspártico
ARG	Arginina
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
UV	Raios Ultravioleta
LABIOTEC	Laboratório de Biotecnologia
BDA	Ágar Batata Dextrose
MEA	Meio Extrato de Malte
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
FPU	Unidades de Papel Filtro
ABS	Absorbância
AG	Ácido Gálico
ANOVA	Análise de Variância
SB	Bagaço de cana-de-açúcar
WPI	Aparas de papel com tinta
UR	Casca de arroz

GP	Bagaço de uva
SCG	Borra de café
CS	Sulfato de cobre
RDE	Resíduos de terra diatomácea

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS.....	18
1.1.1 Objetivo geral.....	18
1.1.2 Objetivos específicos.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	20
2.2 FUNGOS DA PODRIDÃO-BRANCA.....	23
2.2.1 <i>Trametes villosa</i>	24
2.2.2 <i>Pycnoporus</i> sp.	25
2.3 ENZIMAS FÚNGICAS	27
2.3.1 Celulases.....	29
2.3.2 Pectinases	30
2.3.3 Enzimas ligninolíticas	32
2.3.3.1 Lacases	32
2.3.3.2 Manganês peroxidase	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 MACROFUNGOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	37
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
3.2.1 Produção de inóculos.....	38
3.2.2 Planejamento fatorial fracionário	39
3.2.3 Obtenção dos extratos brutos.....	41
3.3 AVALIAÇÃO DO EXTRATO BRUTO	42
3.3.1 Avaliação da atividade das celulases totais.....	42
3.3.2 Determinação da atividade das pectinases	43
3.3.3 Avaliação da atividade de lacases	44
3.3.4 Determinação da atividade de manganês peroxidase	45
3.3.5 Quantificação de açúcares redutores	46
3.3.6 Determinação de compostos fenólicos em microplaca.....	46
3.4 ANÁLISE DE DADOS	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1 INOCULAÇÃO EM <i>PLUGS</i>	48
4.1.1 Produção de celulases, pectinases e lacases.....	48

4.1.1.1 Produção de celulases.....	49
4.1.1.2 Produção de pectinases.....	51
4.1.1.3 Produção de lacases.....	53
4.1.2 Açúcares redutores e compostos fenólicos.....	55
4.2 <i>Pellets</i>	58
4.2.1 Produção de celulases, pectinases e lacases.....	58
4.2.1.1 Produção de celulases.....	58
4.2.1.2 Produção de pectinases.....	60
4.2.1.3 Produção de enzimas ligninolíticas.....	62
4.3 Açúcares redutores e compostos fenólicos.....	63
5 CONCLUSÃO.....	67
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	68
REFERÊNCIAS.....	69
APÊNDICE 1 - CRESCIMENTO FÚNGICO DE <i>T. VILLOSA</i> E <i>PYCNOPORUS</i> SP. INOCULADOS EM MEIO DE CULTURA SEMISSÓLIDO DE DUAS MANEIRAS DIFERENTES: <i>PELLETS</i> E <i>PLUGS</i>.....	82
APÊNDICE 2 - CURVA PADRÃO DE CELULASES TOTAIS MEDINDO GLICOSE DE 1 A 7 MG/ML.....	83
APÊNDICE 3 - CURVA PADRÃO DE PECTINASE MEDINDO ÁCIDO GALACTURÔNICO DE 2000 A 700 μM/ML.....	84
APÊNDICE 4 - CURVA PADRÃO DE CELULASES TOTAIS MEDINDO ÁCIDO GÁLICO DE 1,25 A 0,05 mM/ML.....	85
APÊNDICE 5 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE CELULASES TOTAIS POR <i>T. VILLOSA</i> NA FORMA DE <i>PLUGS</i>.....	86
APÊNDICE 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE CELULASES TOTAIS POR <i>PYCNOPORUS</i> SP. NA FORMA DE <i>PLUGS</i>.....	87
APÊNDICE 7 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE PECTINASES POR <i>T. VILLOSA</i> NA FORMA DE <i>PLUGS</i>.....	88
APÊNDICE 8 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE PECTINASES POR <i>PYCNOPORUS</i> SP. NA FORMA DE <i>PLUGS</i>.....	89
APÊNDICE 9 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE LACASES POR <i>T. VILLOSA</i> NA FORMA DE <i>PLUGS</i>.....	90
APÊNDICE 10 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE LACASES POR <i>PYCNOPORUS</i> SP. NA FORMA DE <i>PLUGS</i>.....	91

APÊNDICE 11 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES POR <i>T. VILLOSA</i> NA FORMA DE <i>PLUGS</i>	92
APÊNDICE 12 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES POR <i>PYCNOPORUS</i> SP. NA FORMA DE <i>PLUGS</i>	93
APÊNDICE 13 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR <i>T. VILLOSA</i> NA FORMA DE <i>PLUGS</i>	94
APÊNDICE 14 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR <i>PYCNOPORUS</i> SP. NA FORMA DE <i>PLUGS</i>	95
APÊNDICE 15 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE CELULASES TOTAIS POR <i>PYCNOPORUS</i> SP. NA FORMA DE <i>PELLETS</i>	96
APÊNDICE 16 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE PECTINASES POR <i>T. VILLOSA</i> NA FORMA DE <i>PELLETS</i>	97
APÊNDICE 17 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE PECTINASES POR <i>PYCNOPORUS</i> SP. NA FORMA DE <i>PELLETS</i>	98
APÊNDICE 18 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE LACASES POR <i>T. VILLOSA</i> NA FORMA DE <i>PELLETS</i>	99
APÊNDICE 19 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE LACASES POR <i>PYCNOPORUS</i> SP. NA FORMA DE <i>PELLETS</i>	100
APÊNDICE 20 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES POR <i>PYCNOPORUS</i> SP. NA FORMA DE <i>PELLETS</i>	101
APÊNDICE 21 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR <i>T. VILLOSA</i> NA FORMA DE <i>PELLETS</i>	102
APÊNDICE 22 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR <i>PYCNOPORUS</i> SP. NA FORMA DE <i>PELLETS</i>	103

1 INTRODUÇÃO

A concepção de economia linear é regida principalmente pelo uso de recursos fósseis, o qual apresenta um problema devido a sua não renovabilidade, e pelo seu fluxo em “pegar, fazer e descartar” (GIACOBBE *et al.*, 2018). Desse modo, os recursos da natureza vêm sendo explorados globalmente pelo homem por meio de diferentes atividades, como: aumento populacional, urbanização e industrialização, acarretando um aumento significativo da produção de variados resíduos (KUTHIALA *et al.*, 2022). São gerados por ano toneladas de diferentes resíduos e subprodutos oriundos de diversas atividades industriais, urbanas ou agrícolas, das quais a agrícola é a mais proeminente e amplamente gerada (DAI *et al.*, 2018).

No mundo, a agricultura é a atividade mais antiga e grandemente empregada, a qual contribui como o setor de imensa produção de biomassa. Esta atividade nas últimas décadas cresceu três vezes, em virtude das práticas da revolução verde, crescimento populacional e da expansão de terras por meio do desmatamento (DUQUE-ACEVEDO *et al.*, 2020). Com esse crescimento, diversos métodos agrícolas contribuem consideravelmente para o aumento da geração de alimentos, sendo este, cerca de 23,7 milhões de toneladas por dia mundialmente (KUTHIALA *et al.*, 2022).

Existem grandes preocupações e impactos ambientais gerados em virtude desse desenvolvimento, como: exploração de recursos, pressão sobre o meio ambiente, efeitos negativos sobre a água, o solo, saúde humana (DUQUE-ACEVEDO *et al.*, 2020), além da geração de gases de efeito estufa, que ocorre no decorrer do apodrecimento dos resíduos (BRANDÃO *et al.*, 2021). Globalmente são perdidos ou desperdiçados por ano, um terço dos alimentos, em torno de 1,3 bilhões de toneladas produzidas. As frutas, vegetais, raízes e tubérculos correspondem de 40 a 50% dessas perdas e desperdícios, ou seja, de 520 a 650 milhões de toneladas (RAVINDRAN *et al.*, 2018).

Em vista disso, essa economia linear recentemente começou a mudar para uma economia denominada circular (EC), que visa eliminar o desperdício e garantir o uso contínuo de recursos, mediante a reutilização, reparo e reciclagem. Criando desta forma, um sistema de ciclo fechado, o qual minimiza o uso de recursos e diminui a geração de resíduos, poluição e emissões de carbono (GEISSDOERFER *et al.*, 2017; VENKATESH *et al.*, 2022).

Os conceitos de economia circular e biorrefinaria impactaram positivamente a visão sobre disposição e reutilização de biomassas, considerando que esses substratos podem ser direcionados para a produção de energia, biocombustíveis e biotransformados em compostos

valiosos para a indústria, o que acaba trazendo efeitos desejáveis nos aspectos econômicos e ambientais (GEISSDOERFER *et al.*, 2017; TUYSUZ *et al.*, 2020).

Portanto, os resíduos agroindustriais devem ser valorizados. A sua revalorização é uma forma de mitigar seus impactos ambientais e dessa forma, tornar as indústrias alimentícias e outras mais sustentáveis (ISMAIL *et al.*, 2019). A composição desses resíduos, inclui três polímeros principais, sendo eles a celulose, hemicelulose e lignina, em conjunto com outros componentes orgânicos e inorgânicos, dando origem a lignocelulose. Esses compostos são considerados como sendo uma estrutura recalcitrante, que precisa ser hidrolisada/despolimerizada completamente em seus açúcares monoméricos consecutivos, para se tornarem utilizáveis durante o processo de bioconversão (IQBAL *et al.*, 2020).

Resíduos agroindustriais como bagaço de uva, casca de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e borra de café são bastante comuns em muitos países (especialmente no Brasil), e esses resíduos são fontes valiosas de polissacarídeos (celulose, hemicelulose, pectina), lignina e compostos fenólicos (PC) (a quantidade de cada componente varia de acordo com o recurso). A aplicação de processos microbianos para biotransformação desses resíduos pode resultar em produtos como enzimas (em resposta à composição de resíduos), açúcares redutores (RS) para fermentação e compostos químicos para a indústria farmacêutica/cosmética, por exemplo. Assim, a eficiência do processo dependerá principalmente da combinação entre a composição do meio e a adequação de um determinado microrganismo para crescer no meio e produzir/secretar metabólitos valiosos (BRANDÃO *et al.*, 2021; KUTHIALA *et al.*, 2022).

Os fungos da podridão branca, principalmente os que pertencem ao filo Basidiomycota, adquirem carbono através de açúcares e compostos aromáticos derivados de lignina, ou seja, contêm um significativo potencial em degradar ligninas e substâncias semelhantes à lignina. Esta degradação resulta em um enriquecimento de celulose, gerando desta forma resíduos esbranquiçados de decomposição (BILAL *et al.*, 2018; DEL CERRO *et al.*, 2021).

Além da capacidade em degradar a lignina, esses fungos possuem o potencial de degradar os outros dois principais componentes da parede celular das plantas (celulose e hemicelulose), provenientes de uma série de processos enzimáticos (hidrolases e oxidorreduções) e mecanismos não enzimáticos. Dispõem de um sistema oxidativo constituído por algumas oxirredutases extracelulares, metabólitos de baixo peso molecular e uma ação de oxigênio eficiente (ZHUO & FAN., 2021; SUYARDI *et al.*, 2022; KIJPORNYONGPAN *et al.*, 2022).

As enzimas possuem a capacidade de realizar alterações estruturais, toxicológicas e até a bioconversão destas biomassas em outros compostos, como RS, proteínas, minerais e moléculas bioativas. (KUTHAILA *et al.*, 202). O pool de enzimas produzidas e secretadas por esses fungos em meio de cultura está intimamente relacionado às condições de crescimento, método de inoculação e composição de substratos (ILÍC *et al.*, 2022; SHANKAR, SAINI & SHARMA *et al.*, 2021).

Além da produção enzimática, o custo do processo de produção é um dos fatores importantes para o ponto de vista industrial, visto que um terço deste custo é atribuído principalmente ao meio de cultura utilizado (ROJAS *et al.*, 2022). Tornando a otimização do meio de cultivo um fator significativo para diminuir os custos de produção e aumentar o seu rendimento (VIAYARAGHAVAN *et al.*, 2018).

A redução dos custos com o meio de cultivo seria alcançada através do uso de substratos alternativos de baixo custo, no caso o uso de resíduos agroindustriais (RESHMY *et al.*, 2022). Além do uso destes resíduos, a síntese simultânea de duas ou mais substâncias por fermentação microbiana contribui na redução dos custos associados ao tempo de energia, mão de obra e recursos (TUYSUZ *et al.*, 2020; ARYA *et al.*, 2022).

A otimização dos parâmetros do bioprocesso enzimático por meio de uma abordagem de um fator de cada vez, não proporciona interações precisas entre os fatores. O uso de métodos estatísticos em que os componentes do meio com efeito significativo na produção enzimática podem ser identificados e otimizados tornou-se um procedimento eficiente de otimização (VIAYARAGHAVAN *et al.*, 2018).

Este estudo descreve a utilização estatisticamente planejada de várias combinações de diferentes resíduos agroindustriais juntamente com outros componentes em meio de cultura para a produção simultânea de enzimas, RS e PC pelos basidiomicetos *T. villosa* e *Pycnoporus* sp., inoculados como *pellets* ou *plugs*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Utilizar resíduos agroindustriais como substratos para a produção de enzimas hidrolíticas, oxidativas e compostos de interesse industrial por *Trametes villosa* e *Pycnoporus* sp..

1.1.2 Objetivos específicos

- Produzir enzimas por cultivo semissólido utilizando resíduos agroindustriais, como: bagaço de uva e cana-de-açúcar, borra de café, casca de arroz, aparas de papel e resíduo de terra diatomácea;
- Otimizar a produção enzimática, de açúcares e compostos fenólicos por meio de delineamentos experimentais estatísticos e pelo uso de sulfato de cobre;
- Determinar a composição do meio e a forma de inoculação mais adequada para produção de enzimas e outros compostos;
- Avaliar a atividade de celulases, pectinases, lacases e manganês peroxidases;
- Avaliar a presença de outros produtos resultantes da ação fúngica/enzimática nos substratos, como açúcares redutores e compostos fenólicos no extrato bruto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

A indústria de alimentos e agricultura está em um desenvolvimento acelerado em virtude do crescimento populacional, resultando em uma geração de resíduos anual de aproximadamente 138 milhões de toneladas métricas de biomassa (RAVINDRAN *et al.*, 2018; KEE *et al.*, 2021), incluindo cascas de amendoim, farelo de arroz, palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e de outras frutas, resíduos vegetais e frutas, farelo de trigo, restos de folhas de algodão, entre outros (BHARATHIRAJA *et al.*, 2017). As frutas e vegetais estão entre as mais altas taxas de desperdício, em um ano metade da colheita não é aproveitada (COMAN *et al.*, 2020).

Os resíduos agroindustriais, podem ser divididos em duas classes: os resíduos de campo, no qual englobam os resíduos da pós-colheita das safras (folhas, vagens de sementes, caule, entre outros); e os resíduos do processo, nos quais estão presentes os resíduos do processamento da safra (sementes, bagaços, melaços, raízes, entre outros) (FAO, 2021). A geração destes resíduos, diferem dependendo do desenvolvimento econômicos dos países. Países considerados em desenvolvimento possuem uma perda acima dos 40%, resultante da pós-colheita ou ao decorrer dos processamentos das safras. Os desenvolvidos, apresentam uma perda menor que 40%, em virtude de desperdícios no varejo ou no nível do consumidor (FERRENTINO *et al.*, 2018).

Há uma tentativa de recuperação destes resíduos por métodos tradicionais, como compostagem e uso em rações animais. No entanto, apenas 25% (30 milhões de toneladas ao ano) do total de resíduos originados são reciclados, o restante é destinado em aterros sanitários como método de disposição mais barato ou são incinerados (KEE *et al.*, 2021). Na ausência desses métodos, descartes inadequados acarretam a produção de gases de efeito estufa (GEE), materiais particulados, fumaça, compostos voláteis e orgânicos (BRUYAN *et al.*, 2020), geração de odores, toxicidade para vidas aquáticas, podendo poluir águas superficiais e subterrâneas, além de afetar a qualidade do solo (NAYAK & BHUSHAN *et al.*, 2019). Portanto, esses efeitos são prejudiciais à saúde humana e animal, causando assim uma poluição ambiental (FERRENTINO *et al.*, 2018).

Essas práticas de descarte mostram o quão esses resíduos não são explorados de maneira adequada, pois podem gerar um retorno sustentável ao serem usados como materiais de construção para outros processos industriais (UNUOFIN *et al.*, 2019). Incrivelmente, eles

servem como matéria-prima para a geração de produtos de valor agregado ou como fontes de energia renováveis (RAVINDRAN *et al.*, 2018). Diante disso, a conversão desses resíduos de maneira econômica e eficaz em produtos de potencial industrial e comercial, reduzirá o impacto ambiental originado pelos resíduos (BHARATHIRAJA *et al.*, 2017).

Os resíduos da agroindústria são de caráter lignocelulósico, que apresentam uma fonte rica de compostos orgânicos de valor agregado em potencial, como os polissacarídeos de celulose, hemicelulose e lignina (BARCELOS *et al.*, 2020). Além desses nutrientes possuem também proteínas, lipídeos, pectinas, polifenóis (RAVINDRAN *et al.*, 2018), fibras, vitaminas, açúcares, minerais, entre outros (FERRENTINO *et al.*, 2018).

Por sua rica composição nutricional e pelos compostos bioativos, os resíduos agroindústrias tornam-se adequados para o crescimento de microrganismos, possibilitando assim o seu uso como substrato em processos fermentativos (FERRENTINO *et al.*, 2018). Em fungos, houve esse melhoramento no crescimento, devido a riqueza de açúcares (BARCELOS *et al.*, 2020), devido às ricas fontes de carbono, nitrogênio e fósforo (KUMAR *et al.*, 2021). Portanto, a utilização dos resíduos torna o processo mais econômico e a formação de bioprodutos mais interessantes, como biocombustíveis e compostos químicos de grande valor (antimicrobianos, pigmentos, antioxidantes e enzimas industriais) (SCHALCHLI *et al.*, 2017; UNUOFIN *et al.*, 2019).

Essas enzimas produzidas de maneira econômica, é um dos pré-requisitos, para o seu uso em processos industriais. Dessa forma, a utilização dos resíduos lignocelulósicos como substratos em cultivos microbianos é neste momento um campo ativo de pesquisa, que permite uma destinação melhor aos resíduos, um auxílio no fornecimento de nutrientes essenciais para uma produção enzimática mais eficiente, uma economia de energia e uma redução de descartes dos resíduos (SCHALCHLI *et al.*, 2017; CHAUHAN *et al.*, 2018).

Além da utilização dos resíduos como substratos para cultivos microbianos, a biomassa lignocelulósica pode ser utilizada como uma fonte para desenvolver processos de biorrefinarias, para a produção de biocombustíveis e outros produtos de valor agregado. Os resíduos agroindustriais apresentam uma composição estrutural de 15 a 25% de lignina, 20 a 40% de hemicelulose e 30 a 60% de celulose, dessa forma, a conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis utilizando a celulose é o principal fator para esse processo. Visto que o etanol produzido a partir da biomassa é atualmente utilizado como substituto parcial do combustível de petróleo, em virtude do seu alto número de octanas, baixas emissões e redução de custo, uma vez que a matéria-prima é barata, renovável e abundante (RESHMY *et al.*, 2022; JAMALUDIN *et al.*, 2013).

Ademais, os PC são considerados os metabólitos secundários de plantas, os quais estão presentes em muitas estruturas, algumas onipresentes. No entanto, outros são exclusivos a famílias ou espécies determinadas (MARTINS *et al.*, 2022). Eles podem ser encontrados principalmente em frutas, legumes, verduras, chá, vinho e café (ALARA *et al.*, 2021). Além das estruturas das plantas, os resíduos e subprodutos da cadeia produtiva de alimentos, são outras formas que apresentam PC. Um exemplo seria os resíduos da vinificação, que representam entre 20 a 30% do total de uvas processadas, permanecendo no bagaço, cerca de 70% dos polifenóis da uva (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021).

Existem cerca de 8.000 estruturas conhecidas, 10.000 PC relatados em plantas e 500 compostos descobertos em alimentos e bebidas, que possuem a função de defender a planta contra os raios ultravioleta (UV), patógenos e outros tipos de predadores, como também em proporcionar características organolépticas aos alimentos vegetais (ALARA *et al.*, 2021). Eles são uma família heterogênea, sintetizados pela via dos fenilpropanóides e possuem pelo menos um anel benzênico de seis carbonos ligado a um grupo hidroxila, formando desta maneira 1-hidroxibenzeno ou fenol. Essa é a base de todos os PC existentes (SALTVEIT, 2017; PAZ *et al.*, 2019; MARTINS *et al.*, 2022).

As moléculas de PC podem ser compreendidas em compostos simples, com baixo peso molecular, de um único anel aromático a taninos grandes, complexos e polifenóis diversificados (MARTINS *et al.*, 2022). Ademais, esses compostos existem de forma em que podem estar combinados com mono e polissacarídeos, ligados a um ou mais grupos fenólicos ou ocorrem como derivados (ésteres ou ésteres metílicos) (MINATEL *et al.*, 2017). Sendo assim, sua estrutura pode variar em ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanas (BONDAM *et al.*, 2022).

Os ácidos fenólicos são considerados a classe mais simples dos PC, sua estrutura é composta por um anel fenólico e uma função de ácido carboxílico (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021). Dependendo da posição do carbono, podem ser classificadas em dois grupos: ácidos hidroxibenzóicos, derivados do ácido benzóico e ácidos hidroxicinâmicos oriundos do ácido cinâmico. Por exemplo os ácidos cafeico e ferúlico (BONDAM *et al.*, 2022).

Os flavonoides é a classificação mais abundante, representada por uma estrutura básica de quinze átomos de carbono, formada em dois anéis benzênicos, unidos por um anel pirano heterocíclico (MARTINS *et al.*, 2022). Ademais, são subdivididos em sete classes de compostos, sendo elas: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanonois, isoflavonas, flavanóis e antocianidinas (BONDAM *et al.*, 2022). Cada classe possui suas diferenças na estrutura com base parcialmente no padrão e grau de hidroxilação, prenilação, glicosilação ou

metoxilação. Os compostos mais comuns são a quercetina, catequina, naringenina, cianidina-glicosídeo e daidzeína (ALARA *et al.*, 2021).

Os taninos podem ser classificados em dois tipos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados ou proantocianidinas. Os taninos hidrolisáveis são compostos por misturas de fenóis simples (ácidos elágico e gálico) com um carboidrato. Porém, quando submetidos a condições ácidas ou básicas, podem ser hidrolisados e resultar em ácidos fenólicos e moléculas de carboidratos, como o galotanino (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021). Os taninos condensados são originados a partir da condensação de dois ou mais monômeros de unidades flavan-3-ol. No entanto, ao serem aquecidos em solução alcoólica ácida, degradam-se em antocianidinas (ALARA *et al.*, 2021).

Os PC apresentam uma ampla diversidade de atividades biológicas e fisiológicas, obtendo assim vários benefícios para a saúde humana pelas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e antialérgicas. Em vista disso, esses compostos possuem o potencial de reduzir diversas doenças e enfermidades, como por exemplo doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e hipertensão. Os antioxidantes e antimicrobianos podem ser utilizados como conservantes e aditivos de alimentos. Além disso, tem aplicações também nas indústrias de cosméticos e embalagens, por contribuírem no envelhecimento precoce, proteção dos raios ultravioleta e na elaboração das embalagens (PAZ *et al.*, 2019; ALBUQUERQUE *et al.*, 2021; MAMARI, 2021).

2.2 FUNGOS DA PODRIDÃO-BRANCA

Os fungos da podridão-branca são organismos saprotróficos, pertencentes ao reino Fungi, agrupados principalmente no filo Basidiomycota e subfilo Agaricomycotina. Esse subfilo pode ser composto por quatro classes e 18 ordens, sendo os fungos da podridão branca encontrados por exemplo nas ordens Agaricales, Auriculariales, Hymenochaetales e Russulales. Porém, a grande maioria desses fungos pertencem à ordem Polyporales (MIR-TUTUSAUS *et al.*, 2018; KIJPORNYONGPAN *et al.*, 2022).

Os fungos da podridão-branca são comuns na natureza, principalmente em ecossistemas florestais, exercendo a função de decompositores primários, secundários e terciários da biomassa lignocelulósica nos ecossistemas; logo, são fundamentais para o ciclo global do carbono. Portanto, estão presentes em diversas plantas, desde pinheiros a videiras, deixando o material residual de madeiras duras com uma aparência "branqueada", úmida, macia

e semelhante a uma fibra (SINGH & SINGH, 2014; RYTIOJA *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2021).

Esses fungos são considerados únicos em seu potencial de degradação de todos os componentes da lignocelulose, em virtude da sua capacidade em sintetizar enzimas extracelulares hidrolíticas e oxidativas importantes (ELISASHVILI & KACHLISHVILI, 2009). Na natureza, os basidiomicetos conseguem quebrar de maneira eficaz as paredes celulares da madeira ou degradar simultaneamente todos os componentes presentes na parede celular (degradadores simultâneos) e ainda, pode remover a lignina das paredes celulares, liberando assim carboidratos mais facilmente metabolizáveis (hemicelulose e celulose). Os padrões micromorfológicos de degradação podem ser modificados dependendo das condições ambientais e das espécies de madeira (SINGH & SINGH, 2014).

2.2.1 *Trametes villosa*

O gênero *Trametes* é conhecido por englobar fungos da podridão branca, sendo o mesmo estabelecido por Fries, em 1835, como pertencente à família Polyporaceae, filo Basidiomycota e a classe Agaricomycetes. Este gênero compreende cerca de 850 registros, porém, a identificação a nível de espécie por métodos taxonômicos tradicionais é extremamente complicada devido a semelhanças nas características morfológicas. Entretanto, nos últimos 30 anos estudos taxonômicos foram realizados e aproximadamente 50 espécies do gênero são aceitas no mundo (ZHANG *et al.*, 2020; HAPUARACHCHI *et al.*, 2021; TOMÉ *et al.*, 2022).

Trametes é caracterizado por possuir um basidioma pileato, um himenóforo poróide, um sistema de hifas trimíticas com hifas generativas clampeadas, cilíndricas a elipsóides, com basidiósporos de paredes finas e esporos não amilóides, não dextrinóides, são saprófitos, portanto, causam a podridão branca em madeiras (FERREIRA *et al.*, 2018-a; OLOU *et al.*, 2020). Além disso, é um gênero cosmopolita, recorrente de quase todos os ecossistemas florestais, sendo constantemente encontrado em madeiras duras em decomposição de florestas temperadas do Norte e árvores decíduas (HAPUARACHCHI *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2020).

Estudos relatam que o gênero *Trametes* na natureza desempenha um papel importante no ciclo de carbono, como decompositores da madeira, na formação do solo, no equilíbrio dos ecossistemas florestais, bem como possui potencial em degradar concomitantemente todos os polímeros lignocelulósicos (TOMÉ *et al.*, 2022). Logo, demonstram um grande potencial para atividades de biorremediação, biodegradação, gestão de resíduos agrícolas, tratamento de águas residuais (HAPUARACHCHI *et al.*, 2021), descoloração de corantes azo, antraquinona e

trifenilmetano (CHO & RYU, 2015), além de serem usados tradicionalmente como produto medicinal em países do leste asiático (KNEŽEVIĆ *et al.*, 2018) e como biocatalisador em células de biocombustível enzimático (ZHANG *et al.*, 2020), tornando-os ecologicamente e economicamente importantes (HAPUARACHCHI *et al.*, 2021).

A espécie *T. villosa* (Figura 1) é conhecida como uma espécie comum do gênero *Trametes*, sendo no Brasil encontrada inclusive na região do semiárido. Este fungo, é considerado um dos mais propícios para a realização de despolimerização seletiva de compostos lignocelulósicos, em virtude da sua produção enzimática de lignina peroxidase (Lip), manganês peroxidase (Mnp) e lacase (Lac) (FERREIRA *et al.*, 2018-b; FERREIRA *et al.*, 2021), evidenciando assim o seu grande potencial para aplicações tecnológicas. Essa espécie possui a capacidade de mineralizar pentaclorofenol e hexaclorobenzeno no solo, como também degradar corantes sintéticos reativos (YAMANAKA *et al.*, 2008).

Figura 1 – Aspecto macromorfológico do fungo *T. villosa* em crescimento em tronco de árvore em decomposição.



FONTE: Naturalista (2021).

2.2.2 *Pycnoporus* sp.

Os fungos filamentosos do gênero *Pycnoporus* são considerados homobasidiomicetos saprotróficos causadores de apodrecimento da madeira (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Este gênero é mundialmente distribuído em zonas temperadas e tropicais (PINEDA-INSUASTI *et al.*, 2017), tipicamente encontrados em madeira morta de várias espécies, incluindo eucaliptos, árvores frutíferas, arbustos e pinheiros (BAYLISS *et al.*, 2007).

Pycnoporus é identificado por apresentar um basidiocarpo anual, séssil a efuso-reflexo, um sistema de hifas dimíticas ou trimíticas, hifas generativas com grampos, basídios

clavados de quatro esterigmatos e basidiósporos cilíndricos, levemente curvados, lisos e hialinos (LOMASCOLO *et al.*, 2011). Contudo, é um gênero intimamente relacionado com o *Trametes*, devido a sua morfologia semelhante em todos os seus caracteres, com exceção da coloração de seu basidiocarpo laranja-avermelhada (Figura 2) (RYVARDEN, 1991). Essa cor é originada por meio da síntese de vários pigmentos, como: fenoxazina-3-ona, cinabarina, tramesanguin e ácido cinnabarínico (SULLIVAN & HENRY, 1971).

Figura 2 - Aspecto macromorfológico do basidioma do fungo *Pycnoporus* sp. em tronco de árvore em decomposição.



FONTE: O autor (2017).

Em decorrência disso, quatro espécies de *Pycnoporus* foram distintas, originando um grupo monofilético dentro do clado *Trametes*. Sendo elas: *P. cinnabarinus*, localizada no hemisfério norte, *P. coccineus*, disseminado em países que fazem fronteira com os oceanos Índico e Pacífico, *P. sanguineus*, encontrado nos trópicos e subtropicais dos hemisférios norte e sul, e *P. puniceus* situado em áreas paleotropicals. (LOMASCOLO *et al.*, 2011; UZAN *et al.*, 2010; MIYAUCHI *et al.*, 2020)

O gênero *Pycnoporus* sp. apresenta fungos que possuem grande importância ambiental e biotecnológica, em virtude do seu potencial em degradar materiais lignocelulósicos, na regulação do ciclo do carbono (PINEDA-INSUASTI *et al.*, 2017), e por serem fontes de enzimas, incluindo altas atividade de lacases, celulasas e ligninases, as quais podem ser usadas em processos de biorremediação, como biotransformação de fármacos, metais pesados e corantes (LOMASCOLO *et al.*, 2011; SCARPA *et al.*, 2019). Além disso, *Pycnoporus* sp. podem ser utilizados na produção de metabólitos secundários com atividades antiviral, antioxidante, antifúngica, antibacteriana e antiparasitária (PORTZ *et al.*, 2022) e na síntese de biopolímeros (MIYAUCHI *et al.*, 2020).

Os fungos *Pycnoporus* sp. são considerados fáceis de serem cultivados em escala laboratorial e planta-piloto. Suas biomassas podem ser geradas com altos rendimentos em diversos substratos de carboidratos, do mesmo modo em que mantem essa produção em flutuações de pH e temperatura (LOMASCOLO *et al.*, 2011). Portanto, essas características despertam o interesse das indústrias para serem utilizados em processos biotecnológicos, nas degradações de resíduos agrícolas em açúcares fermentáveis, onde são úteis na produção de etanol e outros produtos biotecnológicos (PINEDA-INSUASTI *et al.*, 2017).

2.3 ENZIMAS FÚNGICAS

As enzimas são proteínas encontradas em organismos vivos e vírus, as quais possuem a capacidade de catalisar reações orgânicas e inorgânicas específicas (DHEVAGI *et al.*, 2021). A sequência, o número e a natureza dos aminoácidos que compõem enzimas são variadas e originam atividades e estabilidades de enzimas distintas (EL-GENDI *et al.*, 2021).

As enzimas podem ser encontradas em animais, plantas e microrganismos (MAMO *et al.*, 2020) e além de suas funções intrínsecas ligadas à manutenção da vida, elas podem ser utilizadas para a fabricação de mais de 700 produtos com uso comercial (DHEVAGI *et al.*, 2021).

As fontes provenientes de plantas e animais são ineficientes para as demandas industriais e as de fontes microbianas são conhecidas por serem mais econômicas (em termos de produção), escalonáveis e passíveis de manipulações genéticas (EL-GENDI *et al.*, 2021). Dentre os microrganismos produtores de enzimas, cerca de 60% das enzimas industriais são desenvolvidas a partir de fungos, 24% de bactérias, 4% de leveduras e 10% por plantas e animais (LOI *et al.*, 2021).

As enzimas provenientes de fungos apresentam aplicações industriais expressivas, em virtude dos altos rendimentos de produção em larga escala, facilidade de cultivo, produção simultânea de biomassa (PERAZA-JIMÉNEZ *et al.*, 2021), requisitos de purificação, separação mais fáceis (especialmente fungos filamentosos) e catálise eficiente (KANGO *et al.*, 2019).

Considerando o seu metabolismo, os fungos são heterotróficos quimio-organotróficos, podendo ser parasitas, simbiontes ou saprófitos. (DEVI *et al.*, 2020; SUMAN *et al.*, 2015). Eles possuem enzimas intracelulares ou endoenzimas, que ocorrem junto com a camada externa da membrana citoplasmática, e contribuem com a assimilação adicional dos nutrientes absorvidos, e as enzimas extracelulares ou exoenzimas, as quais são secretadas no ambiente (ANDLAR *et al.*, 2018; DHEVAGI *et al.*, 2021).

Fungos podem apresentar uma produção eficiente de diversas enzimas, como: amilases, proteases, glicosidasas, glicose oxidases, pectinases, celulases, lacases, ligninases, invertases, lipases, quitinases e xilanases, em condições de reações propícias (ZHAO *et al.*, 2017; KOUR *et al.*, 2019; VERMA *et al.*, 2019; YADAV *et al.*, 2015). Duas classes de enzimas são bastante comuns nos fungos da podridão branca: as hidrolíticas envolvidas na degradação de polissacarídeos, e as oxidativas, que degradam a lignina (ANDLAR *et al.*, 2018; DHEVAGI *et al.*, 2021).

Portanto, o cenário geral beneficia a produção e aplicação de enzimas fúngicas em larga escala, o que pode gerar lucros expressivos, considerando que a procura por essas enzimas tem aumentado nos últimos tempos (DHEVAGI *et al.*, 2021).

O mercado global de enzimas foi avaliado em US\$ 11,47 bilhões, em 2021, e está projetado para expandir a uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 6,5% de 2022 até 2030 (GRAND VIEW RESEARCH, 2020). A maioria das enzimas comerciais são hidrolíticas oriundas de fungos, sendo assim, responsáveis por 75% de toda a produção mundial de enzimas (LOI *et al.*, 2021).

Operações industriais vêm utilizando a biotecnologia enzimática, por ser um processo verde, eficiente e que serve como alternativa à catalise química, trazendo dessa maneira vantagens pela sua sustentabilidade e eficiência. Portanto, a catálise enzimática proporciona abordagens pertinentes a área de sustentabilidade ambiental, principalmente por possibilitar evitar o uso de produtos químicos perigosos e pela aplicação a nível industrial (DHEVAGI *et al.*, 2021; LOI *et al.*, 2021).

Cada enzima possui suas determinadas aplicações, sendo utilizadas nas áreas industriais e biotecnológicas, como alimentícia (panificação, processamento de bebidas e comidas), vinícola (manter a clareza, cor e os atributos organolépticos do vinho) (GRAND VIEW RES, 2020), de papel e celulose (biobranqueamento), têxtil (degradação de corantes têxteis), resíduos (destintamento de papeis), farmacêutica (antibióticos), biopolpação, desenvolvimento de ração para gado, de biocombustíveis, biorremediação (solos poluídos, degradação de xenobióticos, metais pesados e outros organopoluentes perigosos) e agrícola (biopesticidas, biofertilizantes e bioestimulantes) (KIRUBA & THATHEYUS, 2021; PERAZA-JIMÉNEZ *et al.*, 2021; SAINI & SHARMA, 2021). Com esse rápido crescimento do mercado de enzimas, há um grande interesse na busca por novos produtores de enzimas com características industriais ideais (EL-GENDI *et al.*, 2021).

2.3.1 Celulases

As enzimas celulolíticas (EC 3.2.1.4) são hidrolases capazes de hidrolisar a celulose até o seu monômero, a glicose (SINGHANIA *et al.*, 2021). O sistema enzimático das celulases é composto principalmente por três componentes complexos importantes: as exoglucanases/celobiohidrolases (EC3.2.1.91), endoglucanases/CMCases (EC 3.2.1.4) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (SALOMÃO *et al.*, 2019).

Segundo a descrição do banco de dados de enzimas ativas para carboidratos (CAZy), as endoglucanases compõem as famílias glicosil hidrolase (GH) (5-8, 12, 16, 44, 45, 48, 51, 64, 71, 74, 81, 87, 124 e 128), as exoglucanases estão englobadas às famílias GH (5-7 e 48) e as β -glicosidases compreendem as famílias GH (1, 3, 4, 17, 30 e 116) (COUTURIER *et al.*, 2016).

A endoglucanase é composta por 335 aminoácidos de cadeia longa e seu sítio ativo possui uma estrutura em conformação de fenda, a qual favorece a obtenção de substratos sem enovelamentos (SRIVASTAVA *et al.*, 2018). Esta enzima é responsável pela produção de celobiose com base na celulose, por meio de quebras nas ligações β -1,4-glicosídicas do arranjo interno. Sendo assim, são categorizadas como celulases de ação endo (SUKUMARAN *et al.*, 2021).

As exoglucanases apresentam 431 aminoácidos de cadeia longa de peptídeos e uma estrutura em forma de túnel no sítio ativo, a qual evita a re-adesão das moléculas separadas à estrutura cristalina celulósica. Além disso, são classificadas como celulases de ação exo, devido a seu potencial em cortar ligações β -1,4-glicosídicas das extremidades da cadeia celulósica. A clivagem da ligação glicosídica acontece via catálise ácido-base, tendo a atividade catalítica permeada por resíduos de ácido glutâmico ou aspártico. Dessa forma, o ciclo continua várias vezes com reações de hidrólise até que a enzima finalmente por fim se dissocie da fibra e recomeça a hidrólise em um novo ponto (SRIVASTAVA *et al.*, 2018; SUKUMARAN *et al.*, 2021).

A β -glicosidase é a enzima encarregada pela transformação de celo-oligossacarídeos em glicose. Portanto, esta ação sobre os oligossacarídeos é tida como uma etapa limitante da reação de hidrólise, visto que há a catalisação da quebra das ligações β -glicosídicas para liberar glicose. Além disso, esta enzima em conjunto com outras é capaz de gerar RS a partir da biomassa utilizada (SRIVASTAVA *et al.*, 2018; COUTURIER *et al.*, 2016).

Em resumo, a celulases tem como ciclo catalítico as endoglucanases hidrolisando aleatoriamente as ligações glicosídicas em regiões amorfas da celulose, originando assim oligossacarídeos com extremidades redutoras e não redutoras para ação das exoglucanases, que

irão clivar os oligossacarídeos em celobiose, para por fim, serem hidrolisados por β -glicosidases em glicose, formando moléculas de açúcar simples e aproveitáveis, como: glicose, galactose, xilose e frutose (MARQUES *et al.*, 2018; OKAL *et al.*, 2020).

Diante disso, as celulasas tornam-se uma enzima que oferece grandes contribuições em diversas áreas industriais, como nas têxteis, por contribuir em bioescovações, biopolimento, amaciamento de fibras e desbotamento de jeans; em indústrias de vinícola e cervejeira, no aperfeiçoamento do aroma, sabor e rendimento (SINGH *et al.*, 2021); as de celulose e papel, em biobranqueamentos, biopolpação, descascamento e remoção de tinta; bioetanol, por prover a hidrólise de biomassa; alimentícia, por aprimorar a textura, qualidade e rendimento, além de ser importante na gestão de resíduos, fabricação de ração animal, produção de protoplastos, engenharia genética e farmacêutica (SINGHAL *et al.*, 2022).

2.3.2 Pectinases

A pectinase é uma enzima amplamente distribuída na natureza, podendo ser encontrada em muitas plantas superiores, insetos, nematoides, protozoários, bactérias, fungos e leveduras (SHRESTHA *et al.*, 2021). No entanto, estudos relatam que 50% dessas enzimas são oriundas de fungos e leveduras, 35% de bactérias e 15% provenientes de vegetais ou animais (AMIN *et al.*, 2019). Os microrganismos demonstram ser um recurso muito mais vantajoso e ideal desses biocatalisadores, em virtude do seu rápido crescimento, grande biodiversidade, fermentação mais curta e disposição a modificações genéticas (JOHN *et al.*, 2020).

A pectinase (EC 3.2.1.15), também conhecida como enzimas pécticas ou pectinolíticas, possuem o potencial de hidrolisar várias substâncias pécticas complexas (SONALI *et al.*, 2020). Estas substâncias são compostas de heteropolímero natural, de natureza ácida, identificada principalmente em plantas e frutas (SHRESTHA *et al.*, 2021). Esta enzima transforma o ácido poligalacturônico (polímero pectato) em ácido monoglacturônico, quebrando abrindo as ligações glicosídicas e separando as ligações éster entre os grupos carboxila e metila (ENSHASY *et al.*, 2018).

As pectinases podem ser classificadas de várias formas, seja com base em seu mecanismo e local de ação, local de produção e aplicação em diferentes variações de pH e temperatura (SHRESTHA *et al.*, 2021).

Através do mecanismo de ação, há três categorias principais: as protopectinases ou pectinosinase (EC 3.2.1.99), desesterificantes (EC 3.1.1.11) e depolimerase (hidrolase e transeliminase). As protopectinases são responsáveis pela degradação das protopectinas

insolúveis em pectina solúvel polimerizada, na presença de água (MAHTO *et al.*, 2022), podendo ainda ser subdividida através da sua ação catalítica em protopectinase tipo A, a qual reagem em locais com ácido poligalacturônico ou sítio interno da protopectina insolúvel, e protopectinase tipo B, que responde no sítio das cadeias polissacarídicas ou fora da protopectina insolúvel, que liga a protopectina poligalacturônica, cadeia ácida e os componentes da parede celular (PATEL *et al.*, 2022).

As desesterificantes (EC 3.1.1.11) são incubadas de desesterificar a ligação de éster metílico da cadeia principal de galacturonan da pectina para formar ácido péctico e metanol (SHRESTHA *et al.*, 2021). Esta enzima pode ainda ser classificada em dois tipos com base nos grupos funcionais alvo, sendo elas: pectina metilesterase, encarregada de funcionar em mecanismo de cadeia simples, separando o grupo éster metílico da pectina, originando assim, metanol e modificando a pectina em pectato, e a pectina acetilesterase, cuja enzima catalisa a hidrólise de resíduos de acetil éster de pectina, liberando ácido péctico e acetato (SONALI *et al.*, 2020).

A depolimerase, pode ser agrupada conforme o seu mecanismo de clivagem da ligação glicosídica em hidrolases e liases. As hidrolases rompem a ligação glicosídica dos compostos pécticos, adicionando a molécula de água através da ponte de oxigênio. Porém, dependendo do substrato esta enzima pode ser classificada em duas: as poligalacturonases e em polimetilgalacturonases. As poligalacturonases despolimerizam o ácido péctico, sendo divididas em três tipos exopoligalacturonases, endopoligalacturonases e ramnogalacturonan. As exopoligalacturonases hidrolisam os ácidos pécticos liberando monogalacturonato, tendo como alvo os grupos terminais do substrato péctico, diminuindo desta forma o comprimento da cadeia. As endopoligalacturonases hidrolisam os ácidos poligalacturônicos e liberam ácidos oligogalacturônicos, acometendo aleatoriamente todos os elos da cadeia, e as ramnogalacturonan catalisam de maneira arbitrária dentro ou nos terminais não redutores da cadeia central. Já as polimetilgalacturonases irão despolimerizar a pectina (SONALI *et al.*, 2020; HAILE & AYELE, 2022).

As liases ou transeliminases, desempenham a separação transeliminativa dos polímeros de pectato ou pectinato. Além disso, clivam a ligação glicosídica em C4 (o quarto carbono na unidade de ácido galactuônico) e removem um átomo de hidrogênio em C5, originando um produto insaturado (SONALI *et al.*, 2020). As liases também são classificadas em dois tipos: a pectina liase e pectato liase. A pectina liase são responsáveis por catalisar a molécula de pectina e o pectato liase por transelimina o ácido péctico. Ambas as enzimas de pectina e pectato liase podem ser subdivididas em exo e endoenzimas. As endopectina liases

(EC 4.2.2.10) e endopectato liases (EC 4.2.2.2) separam aleatoriamente as moléculas de pectina e ácido péctico, diminuindo assim o comprimento da cadeia. Em comparação, as exopectina liases e exopectato liase (EC 4.2.2.9) ao decorrer da reação, removem as unidades terminais de ácido galacturônico em substratos (PATEL *et al.*, 2022).

De acordo com a temperatura, as pectinases podem ser definidas em psicrófilicas, mesófilicas e termófilicas. Nas indústrias, comumente são mais exploradas as pectinases mesófilas, devido seu funcionamento ideal entre a faixa de temperatura de 20 a 50 °C (SHRESTHA *et al.*, 2021). Contudo, pectinases mesófilas não podem ser utilizadas em indústrias com processos que ocorrem em temperaturas muito baixas ou altas. Dessa forma, as enzimas extremófilas são as melhores alternativas, visto que possuem atividades novas e podem diminuir os custos de energia (JOHN *et al.*, 2020).

Com base nas alterações do pH e em suas aplicações, a pectinase pode apresentar duas categorias: pectinase acidófila e pectinase alcalofílica. As enzimas ativas em ambientes ácidos, são produzidas principalmente por bactérias e tem prevalência em uso de indústrias cervejeiras, na clarificação e extração de suco de frutas. Já as enzimas ativas em ambientes alcalinos são formadas por fungos e possuem amplas aplicações nas indústrias, como degomagem de fibras, tratamento de resíduos, processamento de materiais têxteis e de papel, e na melhoria da qualidade do chá preto (JOHN *et al.*, 2020; MAHTO *et al.*, 2022).

Devido ao seu potencial em catalisar uma ampla variedade de reações, a pectinase torna-se um biocatalisador extremamente importante para aplicações nos setores comerciais (AMIN *et al.*, 2019). As aplicações da pectinase são utilizadas em diversos processos industriais convencionais, como na degomagem/retificação de fibras vegetais liberianas em indústrias têxteis, tratamento de águas residuais em indústrias de processamento de citrinos e de drogas em indústrias farmacêuticas, biolimpeza de fibras de algodão (SHRESTHA *et al.*, 2021), fusão de protoplastos, extração de óleos essenciais (MAHTO *et al.*, 2022), aditivo na alimentação de aves (SONALI *et al.*, 2020), acelera a fermentação do chá e destrói a propriedade de formação de espuma dos pós de chá instantâneo e são usados na fermentação do café para remover o revestimento mucilaginoso dos grãos de café (OUMER & ABATE, 2018).

2.3.3 Enzimas ligninolíticas

2.3.3.1 Lacases

A lacase foi descrita pela primeira vez por Yoshida (1883) a partir do látex de uma árvore de laca japonesa, *Toxicodendron vernicifluum*. Uma década depois, Bertrand e Laborde

(1896) descobriram a existência de lacase em fungos e 100 anos após essa descoberta, Bertrand (1985) conseguiu isolá-la e caracterizá-la como uma oxidase que continha um metal em seu sítio ativo (WANG *et al.*, 2019; UPADHYAY *et al.*, 2016).

Por um tempo esta enzima foi atribuída exclusivamente a plantas superiores e fungos, contudo, atualmente é onipresente na natureza, sendo encontrados mais de 100 lacases pertencentes a fungos Basidiomycetes, Ascomycetes e Deuteromicetos, além de existir em diversas plantas, como pêssigo, sicômoro e choupo, como também pode ser encontrado em bactérias, insetos, líquens, esponjas e também há atividade semelhante à lacase em ostras, e em bibliotecas de metagenoma de rúmen bovino (RIVERA-HOYOS *et al.*, 2013; MATE & ALCALDE, 2016; AGRAWAL & VERMA, 2020; DEBNATH & SAHA, 2020).

As lacases (EC 1.10.3.2, p-difenol: dióxido de oxidoredutase) são glicoproteínas extracelulares pertencentes à superfamília das oxidases multicobres (MCOs) azuis (AGRAWAL & VERMA, 2020), possuem uma diversidade de formas que variam entre monoméricas, homotetraméricas, heterodiméricas e multiméricas. Além disso, o seu peso molecular pode ser de 50 a 130 quilodaltons, conforme o organismo, sendo que as lacases fúngicas contêm cerca de 10 a 30% de carboidrato. Essa porção de carboidrato é responsável pela estabilidade conformacional da proteína, por proteger da ação de proteólise e de inativações por radicais (AGRAWAL *et al.*, 2018).

As lacases fúngicas não possuem ainda uma função biológica muito clara, no entanto, sabe-se que estão envolvidas em atividades de esporulação, resistência dos esporos, produção de pigmentação, processos de defesa/proteção, morfogênese, interações fungo planta-patógeno/hospedeiro, virulência, patogênese vegetal, homeostase de cobre e ferro, formação de corpo de fruto, renovação de húmus, sendo sua principal função a biodegradação de lignina, celulose e hemicelulose em dióxido de carbono, ou seja, contribui com o ciclo de carbono da biosfera (RIVERA-HOYOS *et al.*, 2013; MATE & ALCALDE, 2016; UPADHYAY *et al.*, 2016; JANUSZ *et al.*, 2020).

Essa enzima comumente apresenta de dois a quatro átomos de cobre por molécula de proteína, que irão realizar a catálise das reações de oxidação (UPADHYAY *et al.*, 2016). Em vista disso, a oxidação dos substratos inicia-se por meio da redução do oxigênio molecular, que resultará na formação de duas moléculas de água. Cada molécula de oxigênio reduzido equivale a quatro de substrato oxidado, sem a formação de peróxido de hidrogênio. Sendo assim, as lacases são conhecidas por serem catalisadoras sustentáveis (RIVERA-HOYOS *et al.*, 2013).

Os quatro átomos de cobre presentes na lacase são compostos por cobre tipo 1 (T1), cobre tipo 2 (T2) e cobre tipo 3 (T3). O cobre tipo 1 é considerado um sítio mononuclear e é

responsável pela cor azul da enzima, em contrapartida, os cobres tipo 2 e 3 constituem um cluster trinuclear, onde há um cobre T2 e dois cobres T3 (MATE & ALCALDE, 2016). Portanto, a oxidação dos substratos acontece em T1 e os elétrons que são extraídos, são transportados até T2/T3 por meio de uma rota conservada de transferência de elétrons His-Cys-His e assim, o oxigênio molecular é reduzido em água (DEBNATH & SAHA, 2020).

O potencial redox das lacases é bastante diverso, dentre elas a lacase fúngica obtêm o maior potencial se comparado com as de origem bacteriana ou vegetal. As lacases fúngicas possuem um potencial médio para fungos ascomicetos e alto de fungos basidiomicetos da podridão branca (MATE & ALCALDE, 2016). Desta forma, o potencial redox participa ativamente nas ações de cinética geral e da parte energética da taxa de elétrons que ocorre ao decorrer da oxidação dos substratos (AGUSTIN *et al.*, 2021).

Outra grande característica das lacases é o fato de poderem oxidar uma vasta variedade de substratos, incluindo compostos aromáticos (orto e para-difenóis, fenóis substituídos com metoxi, diaminas e benzenotióis), íons metálicos (Mn^{2+}) e organometálicos ($[W(CN)_8]^{4-}$), Fe (EDTA)²⁻ (MATE & ALCALDE, 2016). Contudo, compostos não fenólicos, como aminas aromáticas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, corantes sintéticos, antibióticos, entre outros, também podem ser oxidados por meio de um sistema mediador de lacase (LMS), usando mediadores, por exemplo 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato) (ABTS), 1-hidroxibenzotriazol (HBT) e N-hidroxiftalimida (NHPI) (DEBNATH & SAHA, 2020; JANUSZ *et al.*, 2020).

Em vista destas características, a lacase é uma enzima vantajosa para a eliminação de toxinas naturais ou sintéticas que transcorrem na natureza (JANUSZ *et al.*, 2020). Dessa forma, há um grande interesse por parte dos setores industriais, ambientais e biotecnológicos (AGRAWAL *et al.*, 2018), para serem usados em aplicações como: biobranqueamento na produção de papel, transformação de antibióticos e esteroides no setor de biofármacos, descoloração e desintoxicação de efluentes têxteis, clarificação de bebidas (WANG *et al.*, 2019; AGRAWAL & VERMA, 2020), detectores de fenol pela nanobiotecnologia, exploração de energia pela produção de etanol, em pastas de dentes, enxaguante bucal, desodorantes estabilização de vinhos e sucos, entre outras aplicações. No entanto, as lacases não possuem uma eficiência total em condições adversas (AGRAWAL *et al.*, 2018).

2.3.3.2 Manganês Peroxidase

A manganês peroxidase (EC 1.11.1.13) foi descoberta pela primeira vez no fungo *Phanerochaete chrysosporium* por Glenn & Gold (1985) e, Paszcznski, Huynh e Crawford (1986) (SURYADI *et al.*, 2022). Esta enzima é considerada uma glicoproteína dependente de peróxido de hidrogênio, pertencente à família das oxidorreduções contendo grupo heme como cofator (SAINI & SHARMA, 2021).

A manganês peroxidase possui potencial extracelular amplamente difundidas, sendo encontradas em diversos fungos, pertencentes à classe Basidiomycetes, bactérias e algas (KUMAR & CHANDRA, 2020; KUMAR & AURORA, 2022). Esta enzima apresenta um peso molecular variando entre 32 a 75 quilodaltons, com 350 resíduos de aminoácidos e contém 43% de identidade com sequências de lignina peroxidase (CHOWDHARY *et al.*, 2018; SURYADI *et al.*, 2022).

Existem diferentes manganês peroxidase na natureza com propriedades divergentes, que dependem da fonte e isoforma. Dessa maneira, em fungos da podridão branca podem ser classificadas por meio do comprimento de sua cauda C-terminal em tipos: curto, longo ou extralongo. (KUMAR & AURORA, 2022). Além disso, não possuem especificidade, tendo capacidade de oxidar substratos com alto potencial redox (TEMPORITI *et al.*, 2022).

A estrutura molecular da manganês peroxidase é composta por dois íons Ca^{2+} e cinco elementos de ponte dissulfeto, os quais são responsáveis em manter a estrutura do sítio ativo e a estabilidade térmica da enzima (CHANG *et al.*, 2021). No seu sítio ativo consta vários aminoácidos, como: ligante de histidina proximal (HIS), H-ligado a um resíduo de ácido aspártico (ASP) e uma bolsa de ligação de peroxidase lateral distal, altamente conservada, contendo resíduos catalíticos de His e arginina (ARG). Ademais, os seus mutantes exibem a existência de apenas um sítio de ligação ao Mn^{2+} , no qual é constituído por duas moléculas de água, três ligantes ácidos e um propionato de heme (KUMAR & CHANDRA, 2020; KUMAR & AURORA, 2022).

A manganês peroxidase tem como função primária oxidar e converter Mn^{2+} em Mn^{3+} , utilizando o peróxido como oxidante (SAINI & SHARMA, 2021). Portanto, o ciclo catalítico desta enzima tem seu início quando o grupo heme da enzima transfere dois elétrons para a peroxidase de hidrogênio em seu estado de repouso, por clivar a ligação O-O da enzima peróxido, ocasionando assim na produção de água e composto I. Em seguida, o composto I oxida o Mn^{2+} e produz o composto II, um radical livre, e o Mn^{3+} . Por fim, o composto II catalisa a oxidação de Mn^{2+} para formar Mn^{3+} , proporcionando que a enzima volte à sua forma original

e a formação da segunda molécula de água (KUMAR & CHANDRA, 2020; KUMAR & AURORA, 2022).

Os íons formados de Mn^{3+} quelados podem agir como mediadores de transferência de carga S-S, proporcionando desta maneira a oxidação de vários substratos fenólicos, como: fenóis simples, aminas, lignina fenólica e diversos corantes (CHOWDHARY *et al.*, 2018). Mas, de forma semelhante à enzima lacase, o sistema catalítico da manganês peroxidase, necessita de outros pequenos produtos químicos para servirem de mediadores na clivagem de compostos não fenólicos. O ácido gálico é um exemplo de mediador redox utilizados em reações catalisadas por esse enzima, que proporciona a melhora das descolorações de corantes (GAO *et al.*, 2022).

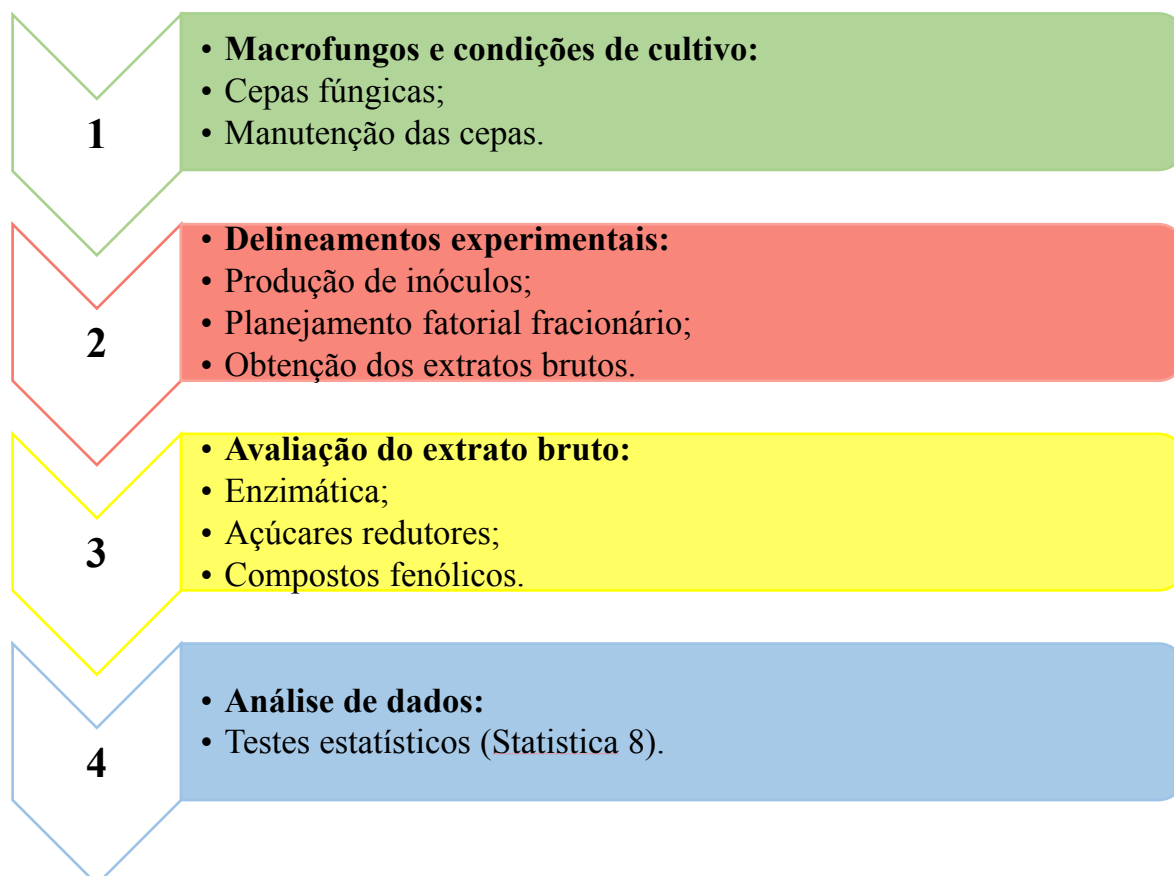
Devido a sua versatilidade catalítica e capacidade de atuar na oxidação de uma ampla variedade de compostos, há inúmeras aplicações em várias áreas industriais, como as de papel, celulose, têxtil, alimentos, biocombustíveis (KUMAR & AURORA, 2022), em sistemas de defesa antioxidante, no combate de complicações oriundas de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BILAL *et al.*, 2018), tratamentos de resíduos, biorremediação de poluentes industriais (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, clorofenóis) (TEMPORITI *et al.*, 2022), produção de aromas naturais, destilaria, biopolpação (CHOWDHARY *et al.*, 2018) e degradação de micotoxinas (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Em vista disso, a melhora na produção desta enzima é importante para a contribuição de novas alternativas de degradação de biomassa ambientalmente sustentáveis e na diminuição do custo de energia/produtos químicos utilizados nas indústrias (CHOWDHARY *et al.*, 2018).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O processo metodológico foi desenvolvido seguindo as etapas descritas no fluxograma da Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma com as principais etapas metodológicas desenvolvidas.



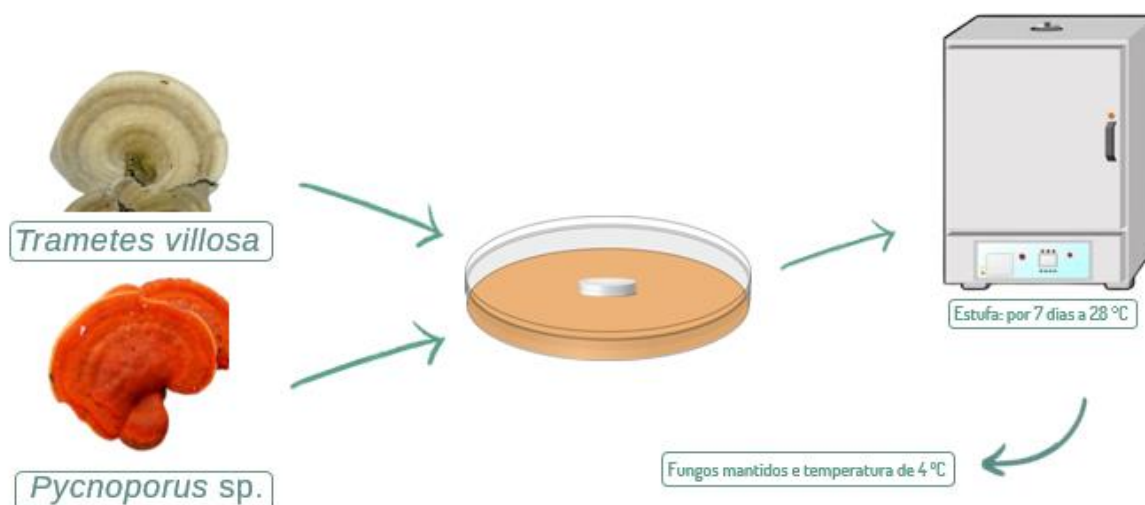
FONTE: O autor (2023).

3.1 MACROFUNGOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As espécies fúngicas *T. villosa* e *Pycnoporus* sp., fornecidas pelo banco de cepas do Laboratório de Biotecnologia (LABIOTEC) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – campus Curitiba, foram utilizadas nas etapas de cultivo e produção de enzimas.

As cepas fúngicas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Ágar Batata Dextrose (BDA) e armazenados em estufa controlada durante sete dias, a uma temperatura de 28 °C (MOLDES *et al.*, 2004). Após o período de incubação, o fungo foi mantido em temperatura de 4 °C, para sua preservação (Figura 4).

Figura 4 – Fluxograma demonstrando as principais etapas metodológicas da manutenção dos macrofungos.



FONTE: O autor (2023).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Produção de inóculos

A produção dos inóculos fúngicos foi realizada na forma de “*pellets*” e “*plugs*”, para comparação de produção enzimática e da liberação de açúcares e PC (Figura 5). Inicialmente, para a produção em forma de “*pellets*”, um disco de meio de cultura de 11 mm foi removido de placas de Petri contendo o micélio fúngico (placas que estavam armazenadas a 4 °C) e transferido para uma nova placa de Petri contendo Ágar Extrato de Malte. Em seguida, esta nova placa foi incubada em estufa no decorrer de sete dias, a 28 °C. Após o tempo de cultivo, foram retirados desta placa, quatro discos de meio de cultura colonizados, também de 11 mm, e transferidos para os frascos Erlenmeyers de 250 ml contendo 80 ml de meio extrato de malte 2% (MEA) (20 g de extrato de malte, 20 g de dextrose e 1 g de peptona), os quais foram posicionados em incubadora (Shaker) com agitação orbital a 135 rpm, por sete dias, a uma temperatura de 28 °C (Figura 6).

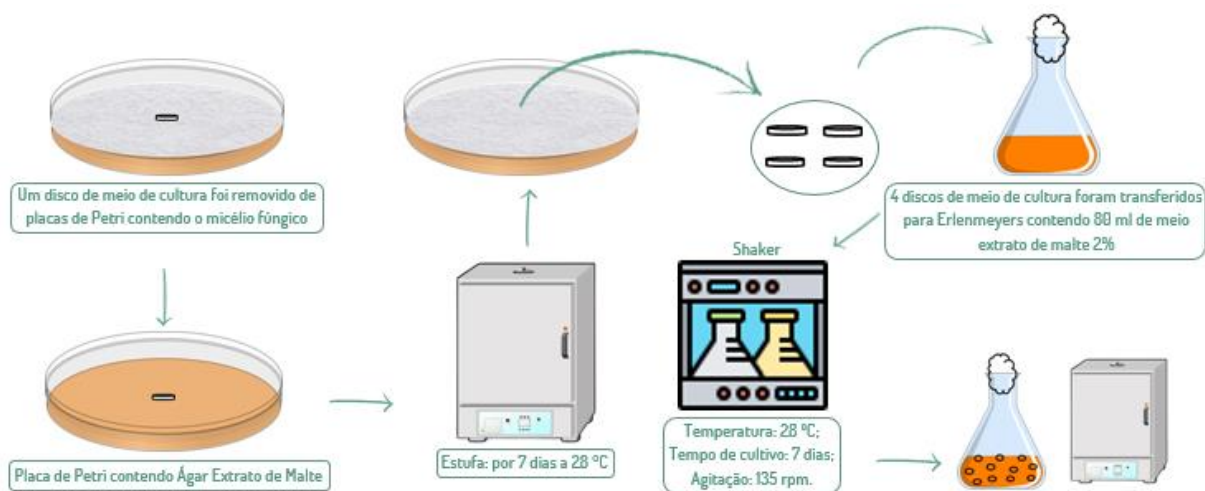
Por fim, foram adicionadas em cada frasco de Erlenmeyer contendo 63 mL de meio para a produção de composições diferenciadas, aproximadamente 10 g de *pellets* úmidos e os frascos foram incubados em estufa por um período de sete dias, a 28 °C (ESPELETA, 2014). No entanto, para a produção em forma de *plugs* foram inseridos 5 discos de meio de cultura de 11 mm, dos quais também foram removidos de placas de Petri contendo o micélio fúngico.

Figura 5 – Produção dos inóculos fúngicos na forma de *pellets* e *plugs*. (A) *Pellets*. (B) *Plugs*.



FONTE: O autor (2023).

Figura 6 – Fluxograma das principais etapas metodológicas da produção dos inóculos fúngicos.



FONTE: O autor (2023).

3.2.2 Planejamento fatorial fracionário

Um planejamento experimental fatorial fracionário com pontos centrais em triplicata, do tipo Plackett-Burman, $2^{(7-4)}$, foi realizado com o intuito de avaliar os efeitos dos componentes do meio de cultura (Figura 7) sobre a produção de enzimas, RS e PC. No total, foram realizados 11 experimentos com composições diferenciadas de meio de cultura (ROGALSKI *et al.*, 1991; JOHANSSON *et al.*, 1993). Esses meios de cultura foram compostos seguindo a matriz experimental (Tabela 1), por meio de duas concentrações (máximas e mínimas), sendo eles: bagaço de uva bordô seco, *Vitis labrusca*, concedidas a partir do processo de fabricação de vinhos, onde foram cultivadas, colhidas e processadas na região de Toledo-PR, bagaço de cana de açúcar, adquirido pela empresa Costa Bioenergia, de Umuarama-Paraná,

borra de café, cedida pela empresa Café Iguaçu de Cornélio Procópio-PR, casca de arroz, coletada em uma fazenda experimental na cidade de Botucatu-São Paulo, aparas de papel, resíduo de terra diatomácea, obtido de uma cervejaria localizada no município de Campo Largo-PR e sulfato de cobre e por fim, os pontos centrais dos determinados componentes.

Tabela 1 – Matriz experimental do planejamento fatorial fracionário (2^{7-4}) para selecionar as variáveis significativas na produção de enzimas, e liberação de açúcares redutores (RS) e compostos fenólicos (PC), com inóculo fúngico na forma de *pellets* e *plugs*.

Composição do meio	Bagaço de uva (g/L)	Bagaço de cana-de-açúcar (g/L)	Borra de café (g/L)	Casca de arroz (g/L)	Aparas de papel (pedaço - 1x1 cm)	Resíduo de terra diatomácea (g/L)	Sulfato de cobre (mM)
1	1	10	1	10	5	10	1
2	5	10	1	1	1	10	5
3	1	20	1	1	5	5	5
4	5	20	1	10	1	5	1
5	1	10	10	10	1	5	5
6	5	10	10	1	5	5	1
7	1	20	10	1	1	10	1
8	5	20	10	10	5	10	5
9 (c)	3	15	6	6	3	8	3
10 (c)	3	15	6	6	3	8	3
11 (c)	3	15	6	6	3	8	3

FONTE: O autor (2022). (c): pontos centrais.

Figura 7 – Componentes do meio de cultura. (A) Bagaço de uva. (B) Bagaço de cana-de-açúcar. (C) Borra de café. (D) Casca de arroz. (E) Resíduo de terra diatomácea. (F) Sulfato de cobre.

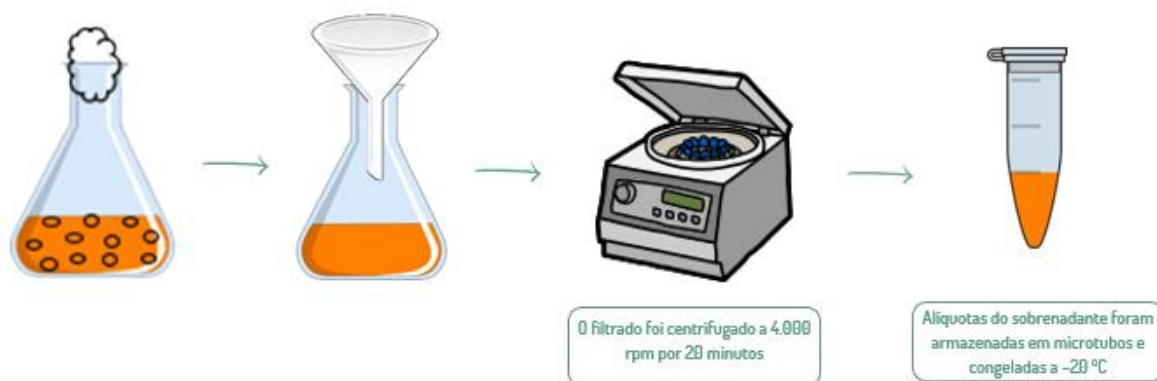


FONTE: O autor (2023).

3.2.3 Obtenção dos extratos brutos

Depois do período de sete dias em estufa, os meios de cultura passaram por um processo de filtração com o auxílio de funis e papel filtro de 12,5 de diâmetro e gramatura de 80 g/m², com a finalidade de separar a biomassa fúngica do extrato produzido. Em seguida, o filtrado foi centrifugado a 4.000 rpm por 20 minutos e as alíquotas do sobrenadante foram armazenadas em microtubos e congeladas a -20 °C até o momento da análise das atividades enzimáticas (Figura 8) (SANTI, 2005).

Figura 8 – Fluxograma das principais etapas metodológicas da obtenção dos extratos brutos.



FONTE: O autor (2023).

3.3 AVALIAÇÃO DO EXTRATO BRUTO

3.3.1 Avaliação da atividade das celulases totais

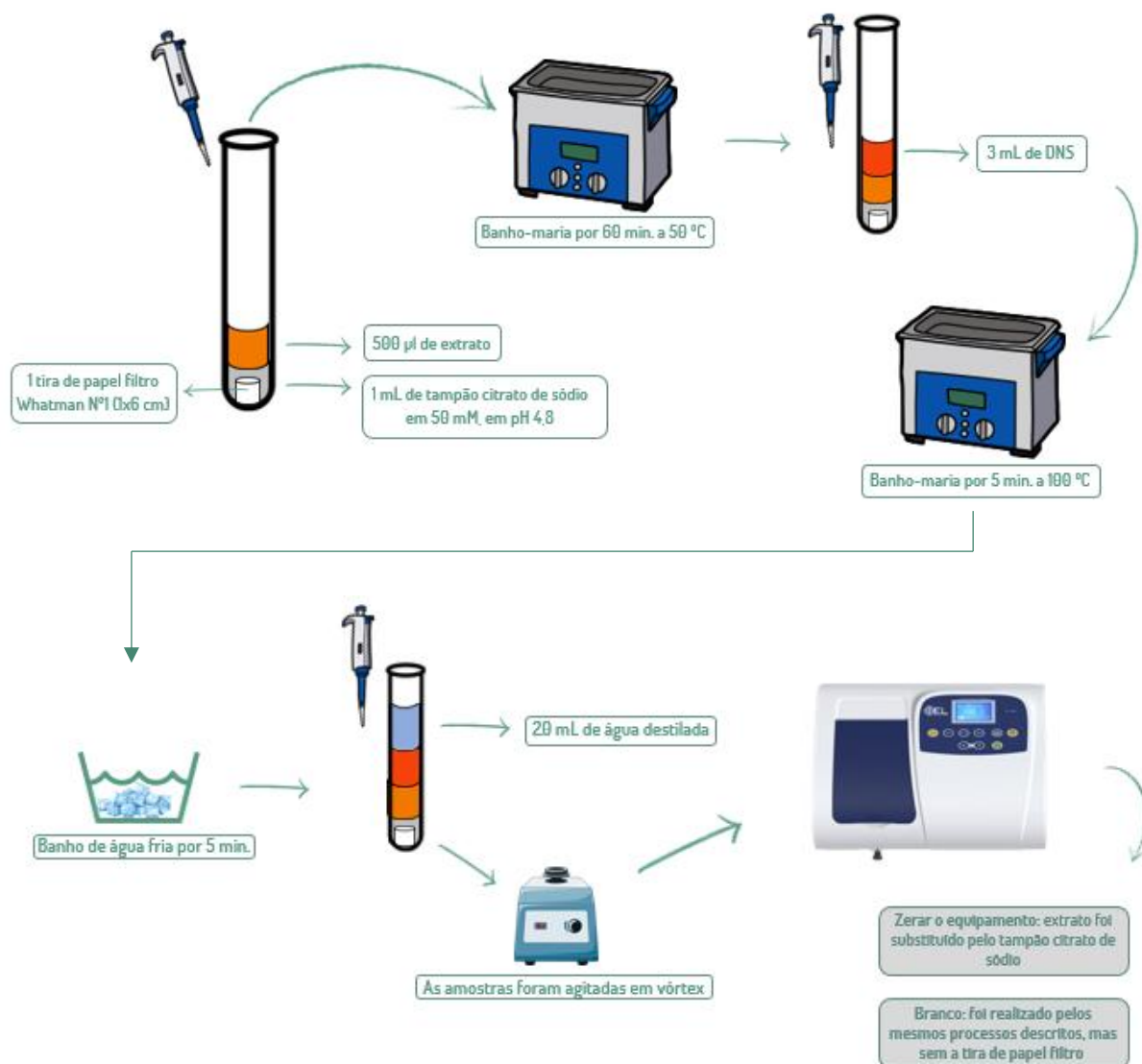
Em um tubo de ensaio foi pipetado 1 mL de tampão citrato de sódio em 50 mM, em pH 4,8, 500 µl do extrato e inserido uma tira de papel filtro Whatman N°1, com as dimensões de 1x6 cm. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex e depositados em banho-maria durante 60 minutos, uma temperatura de ± 50 °C, para a realização da reação. Após o período determinado, foi adicionado 3 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) às amostras e todos os tubos foram colocados em banho-maria fervente, por 5 minutos. Ao final do tempo estipulado, os tubos foram transferidos para um banho de água fria e 20 mL de água destilada foi acrescido as amostras. Por fim, foi agitado novamente em vórtex, para então ser realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm.

Ao decorrer da leitura, para zerar o equipamento, o extrato foi substituído pelo tampão citrato de sódio e o branco foi realizado pelos mesmos processos descritos nas amostras, mas sem a tira de papel filtro (Figura 9). Para a avaliação destas enzimas, foi necessária a realização de uma curva analítica de glicose, com sete concentrações, sendo elas: 1 a 7 mg/1 mL (Apêndice 2).

Seguindo a metodologia adaptada de Ghose (1987), os resultados obtidos por meio da subtração do branco da amostra foram comparados com a curva padrão gerada, e a atividade enzimática foi determinada pela seguinte equação, onde o FPU é considerado as unidades de papel de filtro:

$$\text{FPU} = \text{mg de glicose liberada} \times 0,185 \text{ unidades/ml}$$

Figura 9 – Fluxograma das principais etapas metodológicas da avaliação da atividade das celulases totais.



FONTE: O autor (2023).

3.3.2 Determinação da atividade das pectinases

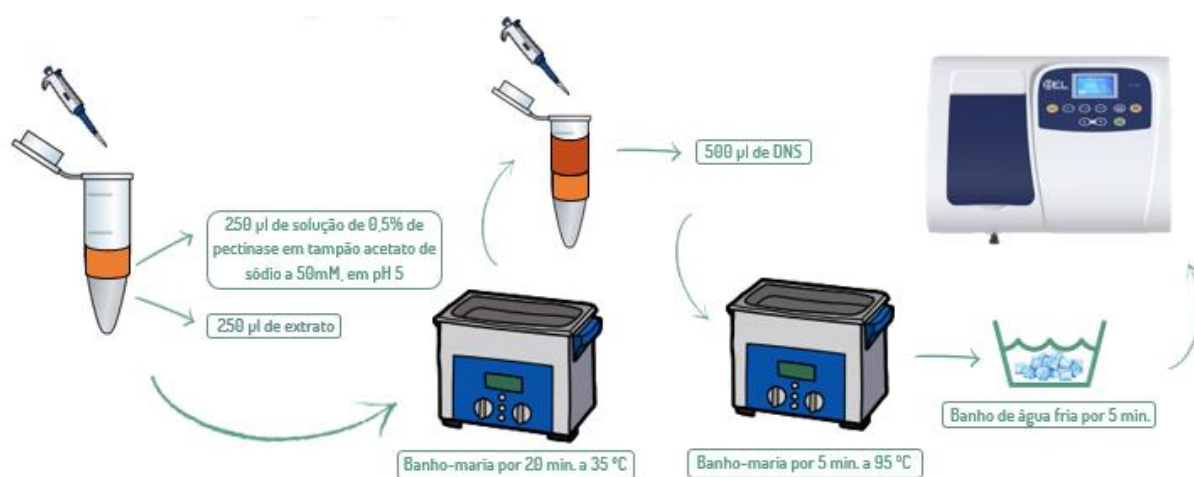
As atividades das pectinases foram estabelecidas por meio da atividade da poligalacturonase, conforme a metodologia de Biz *et al.* (2014), sendo utilizado neste estudo pequenos volumes.

Em um microtubo foi adicionado 250 µl do extrato e 250 µl da solução de 0,5 % de pectinase em tampão acetato de sódio a 50 mM, em pH 5, para então serem agitadas em vórtex e colocados em banho-maria por um período de 20 minutos a ± 35 °C, para a realização da reação enzimática. Em seguida, foi adicionado 500 µl de DNS as amostras e incubou-se novamente em banho-maria fervente, em um período de 5 minutos. Ao final do tempo de

incubação, os microtubos foram resfriados em banho de gelo, agitados novamente em vórtex e a leitura da absorbância das amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 540nm.

Para a leitura das amostras foi necessário um branco composto por 250 μ l de água destilada, no lugar da quantidade de extrato e 250 μ l da solução de 0,5 % de pectinase em tampão acetato de sódio a 50 mM, em pH 5, e o zero constituído por 500 μ l de água destilada, para substituir o extrato e a solução (Figura 10). Os resultados foram comparados com uma curva analítica de ácido galacturônico, com seis concentrações: 2 mM, 1,5 mM, 1 mM, 0,9 mM, 0,8 mM e 0,7 mM/10 mL (Apêndice 3).

Figura 10 – Fluxograma das principais etapas metodológicas da determinação da atividade das pectinases.

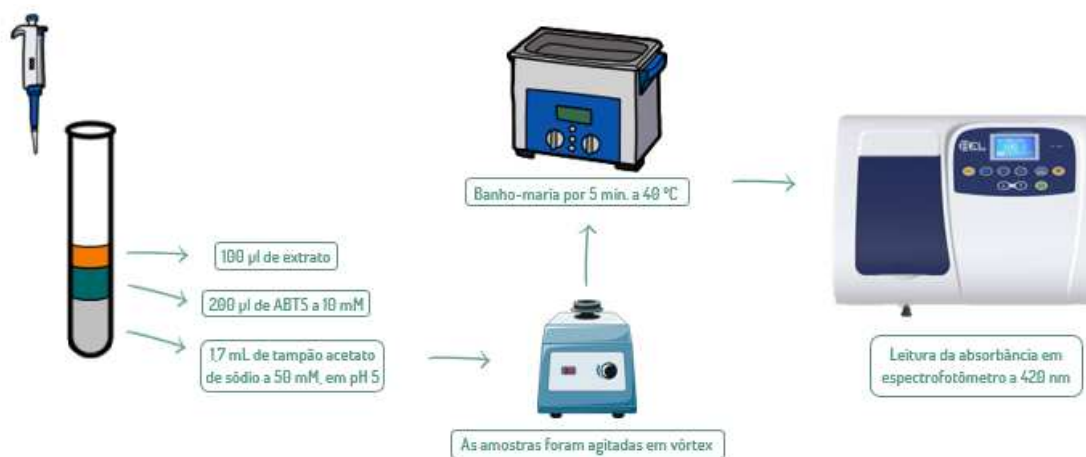


FONTE: O autor (2023).

3.3.3 Avaliação da atividade de lacases

A atividade de lacases foi determinada por meio da oxidação do ABTS. Assim sendo, foram colocados em tubos de ensaio 1,7 mL de tampão acetato de sódio a 50 mM, em pH 5, 200 μ L de ABTS a 10 mM e 100 μ L de cada extrato obtido. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex e colocados em banho-maria em uma temperatura de $\pm 40^{\circ}\text{C}$, por 5 minutos. Após esse período, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 420nm. Para zerar o equipamento, o extrato foi substituído pelo tampão acetato de sódio e a atividade de lacase expressa em U/L (Figura 11) (HOU *et al.*, 2004).

Figura 11 – Fluxograma das principais etapas metodológicas da avaliação de lacases.



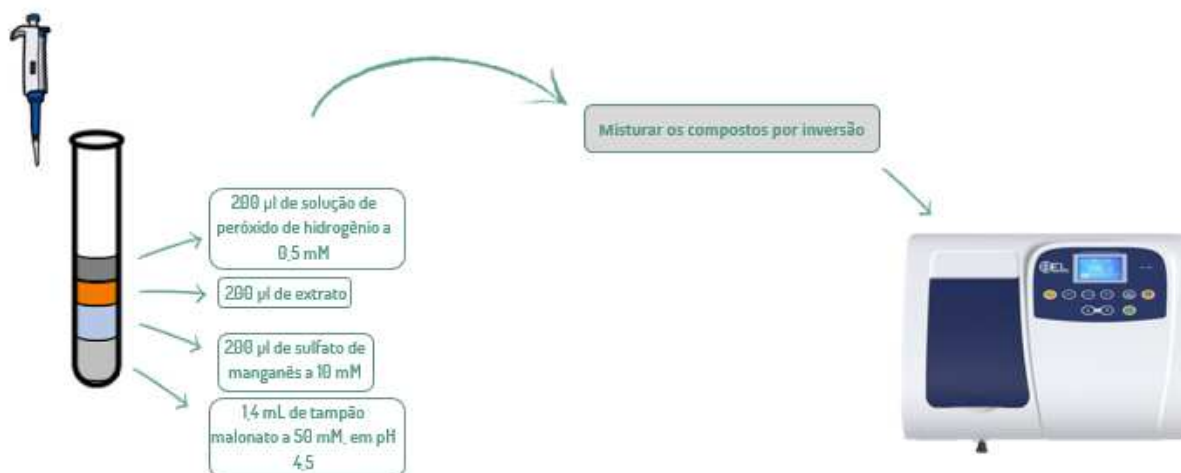
FONTE: O autor (2023).

3.3.4 Determinação da atividade de manganês peroxidase

Em um tubo de ensaio adicionou-se 1,4 mL de tampão malonato a 50 mM, em pH 4,5, 200 µl de solução de sulfato de manganês a 10 mM e 200 µl de extrato. A reação é iniciada após acrescentar 200 µl de solução de peróxido de hidrogênio a 0,5 mM, e logo depois misturou-se os compostos por inversão do tudo de ensaio. Por fim, a amostra foi transferida para uma cubeta de quartzo e feita a leitura em espectrofotômetro em 270 nm.

Seguindo a metodologia de Rodríguez *et al* (1999), o zero ou o branco é o próprio conteúdo da amostra, porém sem o peróxido de hidrogênio (Figura 12). A cinética da reação foi monitorada por 5 minutos e observado o aumento linear de absorvância pelo tempo decorrido e a atividade enzimática expressa em U/L.

Figura 12 – Fluxograma das principais etapas metodológicas da atividade de manganês peroxidase.

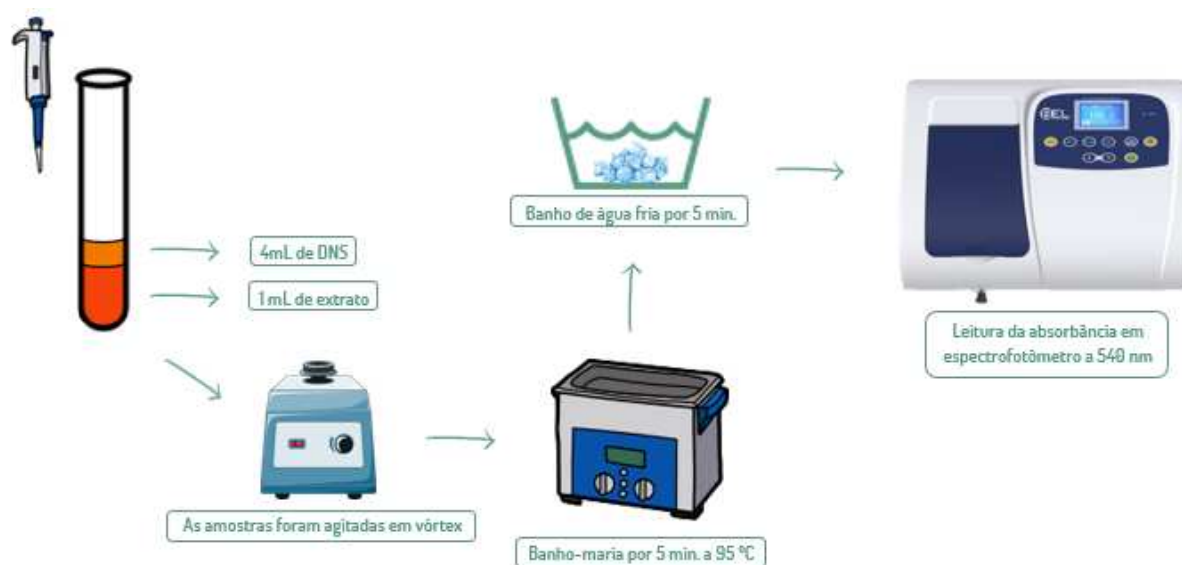


FONTE: O autor (2023).

3.3.5 Quantificação de açúcares redutores

A determinação de RS foi feita através da metodologia de Miller (1959). Primeiramente, foi adicionado 1 mL de cada extrato obtido em 4 mL de DNS em tubos de ensaio. Em seguida, os tubos foram agitados por 30 segundos em vórtex e posteriormente depositados em banho-maria fervente, por um período de 5 minutos. Depois do tempo decorrido, as amostras foram transferidas para um banho de gelo por mais 5 minutos e ao alcançar a temperatura ambiente, foram feitas as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro a 540 nm (Figura 13). Uma curva de calibração de glicose foi realizada em um intervalo de concentração de 1 a 7 mg/mL. A curva obtida está apresentada no Apêndice 2.

Figura 13 – Fluxograma das principais etapas metodológicas da quantificação de açúcares redutores.



FONTE: O autor (2023).

3.3.6 Determinação de compostos fenólicos em microplaca

Em microtubos foram adicionados 100 µl de extrato e 200 µl do reagente Folin-Ciocalteu (F-C) a 10%. Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex e em seguida, foi colocado 800 µl de carbonato de sódio a 700 mM. Os microtubos foram então depositados ao abrigo de luz, em temperatura ambiente por um período de 2 horas. Após o tempo decorrido, 200 µl de cada amostra foram transferidas para uma microplaca e realizada a leitura da absorvância em uma leitora de microplaca a 767 nm, de acordo com a metodologia proposta por Ainsworth e Gillespie (2007).

Para a análise do zero ou branco, os microtubos foram compostos pelos mesmos reagentes das amostras, apenas alterando os 100 µl de extrato por metanol a 95% (v/v) (Figura

14). Além disso, foi realizada uma curva de calibração de ácido gálico entre os intervalos de 1,25 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,1 mM e 0,05 mM/ 1mL de metanol a 95% (v/v). A curva obtida está apresentada no Apêndice 4.

Figura 14 – Fluxograma das principais etapas metodológicas da determinação de compostos fenólicos.



FONTE: O autor (2023).

3.4 ANÁLISE DE DADOS

Testes estatísticos foram realizados para avaliar os principais efeitos e interações entre os tratamentos, como também foi analisado a significância estatística ($p < 0,05$) de possíveis diferenças entre as amostras de controle e as experimentais, e a presença ou ausência de fatores na produção de enzimas, usando o software Statistica 8 (STATSOFT, 2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dois fungos filamentosos utilizados neste estudo, *T. villosa* e *Pycnoporus* sp., foram inoculados em meio de cultura semissólido de duas formas diferentes: em *pellets* e em *plugs* (Apêndice 1). Os meios continham resíduos agroindustriais em combinações e concentrações variadas de acordo com a matriz experimental, originados de um planejamento fatorial fracionário. Os resultados das atividades enzimáticas, liberação de RS e PC são apresentados para cada método de inoculação. Em decorrência deste procedimento, os resultados obtidos em ambos os fungos representam a média dos experimentos em triplicata da produção.

4.1 INOCULAÇÃO EM PLUGS

4.1.1 Produção de celulases, pectinases e lacases

Atividades de celulase, pectinase e lacase foram detectadas nos extratos brutos de ambos os fungos (*T. villosa* e *Pycnoporus* sp., Tabela 2), porém cada fungo respondeu diferentemente quanto ao perfil enzimático em relação à composição dos meios de cultura (fatores e níveis).

Table 2 – Produção de celulase, pectinase e lacase por *plugs* de *T. villosa* (*Tv*) e *Pycnoporus* sp. (*Pyc*) em meios de cultura semissólidos com diferentes composições.

Composição do meio	Celulase (FPU/mL)		Pectinase (U/mL)		Lacase (U/L)	
	<i>Tv</i>	<i>Pyc</i>	<i>Tv</i>	<i>Pyc</i>	<i>Tv</i>	<i>Pyc</i>
1	0.24	0.28	3.18	2.30	743.22	155.18
2	0.43	0.58	5.70	6.08	34.54	N.D.
3	0.32	0.48	6.17	6.54	N.D.	N.D.
4	0.21	0.26	2.19	1.84	149.65	344.88
5	0.53	0.20	7.58	N.D.	N.D.	64.05
6	0.21	0.23	1.26	0.71	132.46	204.91
7	0.20	0.23	1.67	0.71	147.38	168.98
8	0.27	0.25	1.94	1.11	319.05	117.57
9 (c)	0.20	0.45	1.35	7.44	165.89	39.66
10 (c)	0.22	0.51	1.58	6.72	170.07	39.60
11 (c)	0.21	0.56	1.25	7.13	213.34	39.42

(c): pontos centrais; N.D.: valores não detectados.

A produção de lacases não foi detectada em alguns extratos brutos de *T. villosa* e *Pycnoporus* sp.. As atividades de celulase e pectinase foram detectadas na maioria dos extratos brutos (exceto na atividade de pectinase em uma amostra (composição 5) de *Pycnoporus* sp.). De forma geral, a composição dos meios afetou significativamente a produção das enzimas (por exemplo, as atividades da lacase apresentaram uma grande variação entre amostras do mesmo fungo).

4.1.1.1 Produção de celulases

A forma de inoculação em *plugs* para *T. villosa* demonstrou que a composição 5 foi a que obteve maior atividade enzimática de 0,53 FPU/mL e a menor a 7, com um resultado de 0,20 FPU/mL, inferior à média dos pontos de controle de 0,21 FPU/mL. Porém, para o isolado *Pycnoporus* sp. a composição do meio 2 foi a que demonstrou resultados mais altos, com 0,58 FPU/mL e os demais apresentaram resultados menores que a quantidade detectada pelos controles de 0,54 FPU/mL.

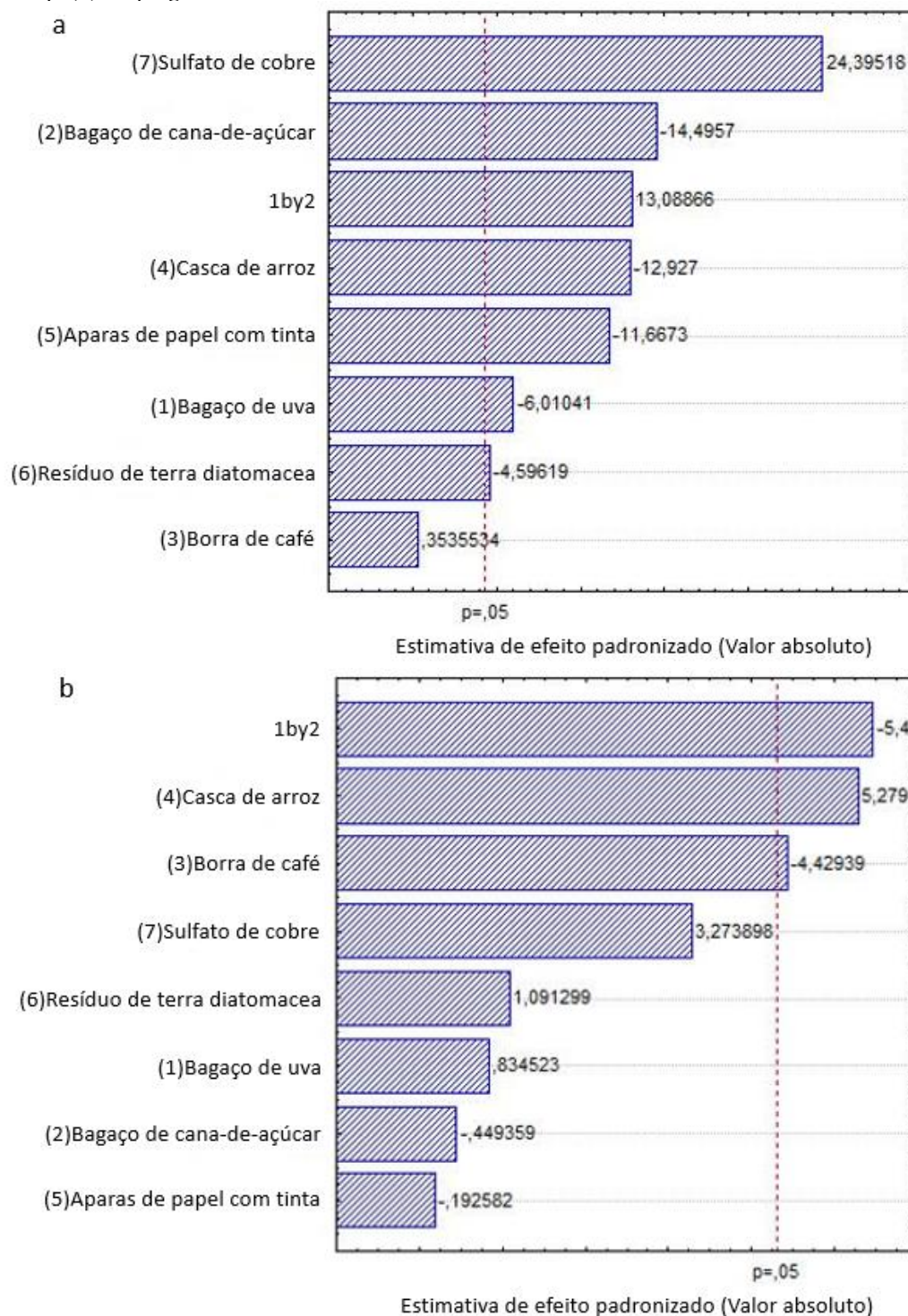
De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 15-a), pode-se perceber que a produção de celulase foi significativamente afetada por todos os fatores, exceto a borra de café (SCG); entretanto, um efeito positivo sobre a produção da enzima só foi alcançado pelo sulfato de cobre (CS) e pela interação entre bagaço de cana (SB) e bagaço de uva (GP), significando que níveis mais elevados desse fator contribuem para maior produção de celulase pelo fungo. Porém, em *Pycnoporus* sp. (Figura 15-b) apenas a interação entre bagaço de cana (SB) e bagaço de uva (GP), a casca de arroz (UR) e a borra de café (SCG) obtiveram efeitos significativos sob a produção da enzima, sendo a UR o único efeito positivo (Fig. S6-B).

Os valores dos coeficientes de determinação apresentados nas Tabelas ANOVA (Apêndice 5 e 6) demonstram que o modelo de duas interações descreveu bem os dados referentes à produção de celulase para ambos os fungos.

O arsenal celulolítico dos fungos é bastante complexo, e geralmente mais de um tipo de celulase é secretado para despolimerizar a celulose (dependendo da composição intrínseca do substrato) (FALKOSKI *et al.*, 2012; OKAL *et al.*, 2020). Outras enzimas capazes de oxidar a lignina (por exemplo lacases) podem ter atuado antes ou durante a produção de celulase em substratos como GP e UR (ambos tiveram efeito positivo na produção de celulase) para permitir o acesso a celulose e seus açúcares.

O fato do cobre ter um efeito positivo sobre a produção de cellulases (principalmente em culturas de *T. villosa*) será investigado. Payne *et. al* (2015) revisou muitos dos diferentes aspectos relacionados às celulases fúngicas e sua capacidade de quebrar a celulose das plantas. Algumas glicosil hidrolases têm o cobre como metal ativo, tornando-se enzimas dependentes de cobre. As polissacarídicas monooxigenases líticas (LPMOs) utilizam cobre, oxigênio e um agente redutor para clivar ligações glicosídicas e oxidar celulose. Essas enzimas podem, inclusive, atuar sinergicamente com glicosídeos hidrolases para degradação de celulose.

Figura 15 - Diagrama de Pareto dos efeitos relacionados a produção de celulasas totais por *T. villosa* (a) e *Pycnoporus* sp. (b) em *plugs*.



As atividades de papel filtro (U/mL) apresentadas para a produção de celulase neste trabalho foram superiores aos valores relatados por outros autores. Isso possivelmente está relacionado à indução da produção de celulasas totais pelos fungos cultivados em meios contendo resíduos agroindustriais. No estudo de Coniglio *et al* (2020), uma cepa de *T. villosa*

inoculada como *plugs* em meio Czapek atingiu 133,1 U/L (cerca de 0,13 U/mL) de atividade de celulase em papel filtro.

Falkoski *et al* (2012) avaliaram a produção de celulases por uma linhagem de *Pycnoporus sanguineus* inoculada na forma de *plugs* em meio contendo espigas de milho como única fonte de carbono, sendo detectada atividade máxima de 0,25 U/mL de papel de filtro nos extratos brutos após 120 h de cultivo submerso. No trabalho realizado por Rodríguez *et al* (2019), a composição dos meios de cultura afetou sobremaneira a produção de celulase por *Irpex lacteus* e *P. sanguineus*. Segundo os autores, a presença de fosfato monobásico (KH_2PO_4) em meios de cultura influenciou positivamente a produção de celulases por *P. sanguineus*, o que produziu uma atividade de papel de filtro de 29 U/L (em torno de 0,029 U/mL) em condições ótimas.

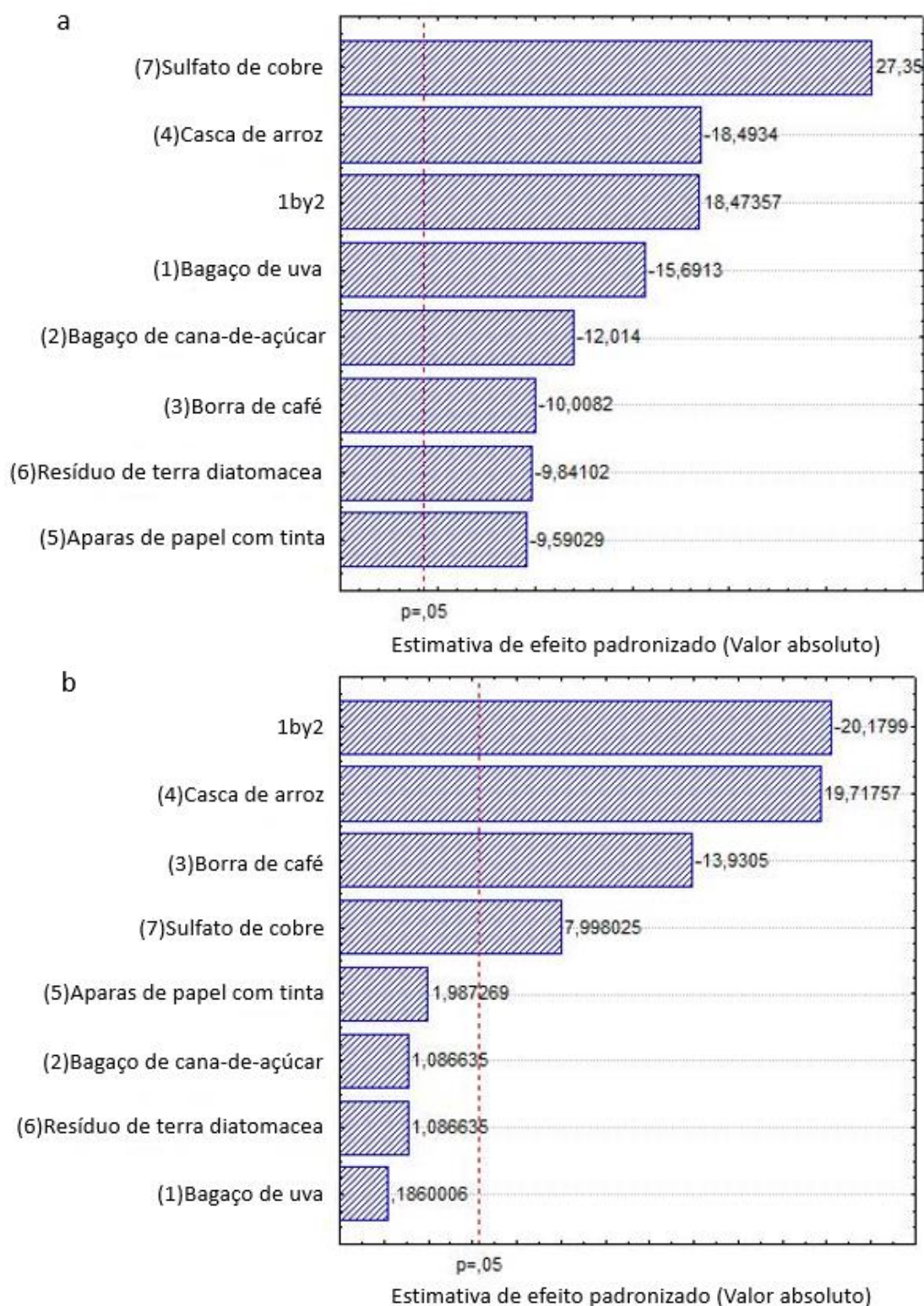
Quando inoculada na forma de *plugs*, a cepa de *Pycnoporus* sp. apresentou estar mais adaptada às diferentes composições dos meios de cultura e produziu atividade enzimática mais elevado de celulases na maioria dos meios do que a cepa de *T. villosa* (exceto na composição do meio 5).

4.1.1.2 Produção de pectinases

Atividades máximas para *plugs* foram detectadas no meio 5 para *T. villosa* (7,58 U/mL) e nos pontos centrais para *Pycnoporus* sp. (7,44 U/mL). Embora o meio de composição 5 tenha sido o melhor para a produção de pectinases por *T. villosa*, a enzima não foi detectada neste meio quando cultivado com *plugs* de *Pycnoporus* sp.. De acordo com Schmitz *et al* (2019), os fungos reconhecem as diferentes estruturas da parede celular vegetal e estas podem regular a indução de genes pectinolíticos e, conseqüentemente, a produção de pectinases. Os autores afirmam que a identificação dos fatores que contribuem para o crescimento microbiano em substratos complexos aumenta a viabilidade dos processos de biorrefinaria.

Todos os fatores foram significativos para a produção de pectinases pelos *plugs* de *T. villosa* (Figura 16-a e Apêndice 7), embora apenas o CS e a interação entre SB e GP tenham apresentado efeito positivo sobre a produção enzimática. A produção de pectinases pelos *plugs* de *Pycnoporus* sp. foi afetada pela interação entre SB e GP, UR (efeito positivo), SCG e CS (efeito positivo) (Figura 16-b e Apêndice 8).

Figura 16 - Diagrama de Pareto dos efeitos relacionados a produção de pectinases de *T. villosa* (a) e *Pycnoporus* sp. (b) em *plugs*.



O teor de pectina no bagaço de uva varia de acordo com a literatura científica (de 3,9 % a 9-11 %), dependendo da variedade de uva e do método de quantificação (SOUSA *et al.*, 2014; SPINEI & OROIAN, 2023). Entretanto, a presença de pectina em maior quantidade no bagaço

de uva (WILLIAMS *et al.*, 2019), quando comparada a outros resíduos, pode ter estimulado a produção de pectinases. Essas enzimas poderiam atuar removendo pectina dos substratos, afrouxando a matriz da parede celular (revelando camadas de celulose e hemicelulose) e liberando açúcares monoméricos para o fungo (LARA-MARQUEZ *et al.*, 2011).

No estudo de Carvalho *et al* (2020), a produção de poligalacturonases (uma pectinase) por *Moniliophthora pernicioso* (um basidiomiceto) foi influenciada pela composição do meio, principalmente pela adição de fontes fermentáveis de carbono e extratos de cacau (que aumentaram a secreção enzimática). Falkoski *et al* (2012) relataram uma produção significativa de poligalacturonase (18,53 U/mL) por uma linhagem de *P. sanguineus* em meio de cultura com espigas de milho como fonte de carbono.

A maioria dos estudos sobre produção e otimização de pectinases está focada em espécies de *Aspergillus*, embora a investigação de pectinases de outras fontes fúngicas seja de interesse industrial (uma vez que as enzimas podem apresentar características bioquímicas diferentes). Além disso, a presença de pectinase em um coquetel enzimático pode contribuir para a despolimerização de biomassas, liberação de açúcares e produção de etanol (SHRESTHA *et al.*, 2021), e a utilização de resíduos agroindustriais como indutores da produção de pectinases é econômica e ambientalmente desejável.

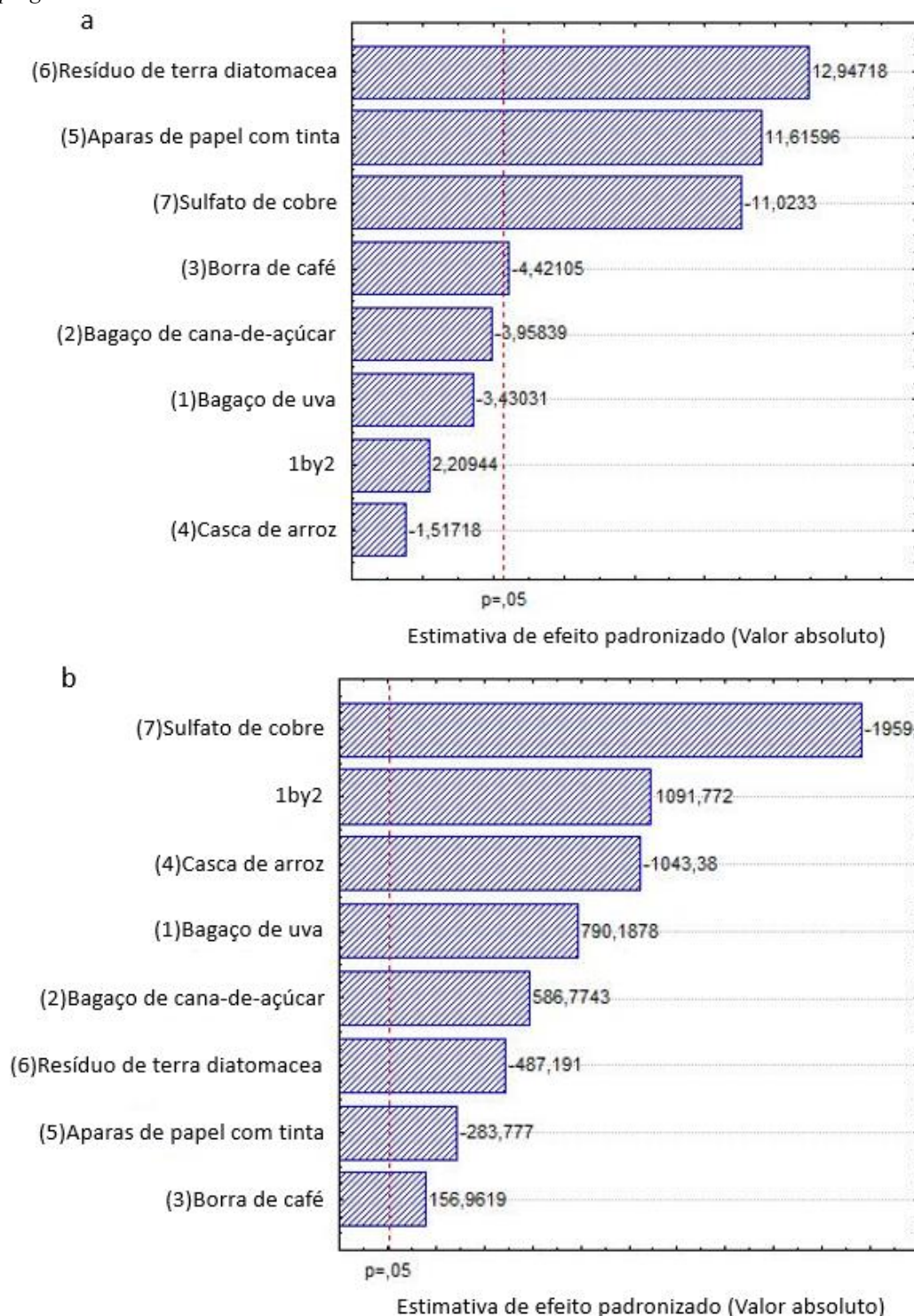
4.1.1.3 Produção de lacases

A lacase foi a principal enzima ligninolítica detectada nos extratos brutos, e a atividade máxima da lacase foi de 743,22 U/L (meio 1) e 344,88 U/L (meio 4) para *T. villosa* e *Pycnoporus* sp., respectivamente. Não foi detectada atividade de lacase em meio de composição 3 e 5 para *T. villosa*, e em *Pycnoporus* sp. o meio 2 e o 3.

A produção de lacases em *plugs* de *T. villosa* foi significativamente influenciada pelo resíduo de terra de diatomácea (RDE), resíduos de papel com tinta (WPI), CS e SCG, embora os efeitos positivos tenham sido relacionados exclusivamente ao RDE e WPI (Figura 17-a).

RDE é uma fonte barata de peptídeos (aminoácidos) para o crescimento de fungos e desenvolvimento de biomassa, uma vez que as leveduras são os principais componentes deste resíduo da cervejaria (DESSALEW *et al.*, 2017). De acordo com González-Bautista *et al* (2019) a fonte de nitrogênio pode afetar a expressão da lacase por fungos da podridão branca. A adição de fontes complexas de nitrogênio orgânico pode estimular a produção de lacase.

Figura 17 - Diagrama de Pareto dos efeitos relacionados a produção de lacases de *T. villosa* (a) e *Pycnoporus* sp. (b) em *plugs*.



Todos os fatores foram significativos para a produção de lacases pelos *plugs* de *Pycnoporus* sp. (Figura 17-b), e efeitos positivos foram induzidos pela interação entre SB e GP, GP, SB e SCG. Os dados ajustaram-se bem ao modelo com duas interações, resultando em valores de R² de 0,99 (Apêndice 9 e 10).

Segundo o estudo realizado por Gonzáles-Bautista *et al* (2019), a adição de polpa de café ao meio de cultura induziu atividade lacase de *P. sanguineus*, mas apenas até certo ponto (a adição de uma alta quantidade de polpa de café inibiu a produção de lacase, o que poderia estar relacionado aos PC). Em vista disso, a não detecção de atividade de lacase nos meios de composição 3 para ambos os fungos, pode estar relacionado à quantidade inicial de PC em meio de cultura, maior concentração de sulfato de cobre, alta produção de celulases e pectinases ou combinação de mais de um fator.

No controle abiótico do meio 3 (Tabela 3), a concentração inicial de PC é a maior dentre os demais meios. A concentração e a presença de certos PC, individualmente ou em combinação, podem inibir o crescimento fúngico, diminuir a produção de lacase ou inibir a atividade da lacase ligando-se ao sítio ativo da enzima (GONZÁLEZ-BAUTISTA *et al.*, 2019).

O sulfato de cobre é um conhecido indutor da produção de lacase por fungos da podridão branca (MOTA *et al.*, 2015; RODRÍGUEZ *et al.*, 1999) envolvidos no nível de regulação transcricional (COLLINS & DOBSON, 1997), porém em uma determinada faixa de concentração. Os estudos realizados por Valle *et al* (2014) relataram diferentes respostas de *Lentinus crinitus* quanto às concentrações de sulfato de cobre e produção de lacase. Em meio de cultura contendo menor concentração de nitrogênio, a adição de 300 mM de CUSO_4 inibiu a expressão da lacase pelo fungo. Assim como no trabalho realizado por Camarero *et al* (2012), verificaram que concentrações milimolares de CUSO_4 aumentaram a atividade de lacase em uma cepa de *S. cerevisiae* geneticamente modificada como hospedeiro heterólogo para expressar e secretar uma lacase originalmente produzida por *Pycnoporus cinnabarinus*, porém apenas abaixo de 4 mM (quando o cobre se tornou tóxico para a célula e reduziu a produção de lacase).

Quando altas atividades celulases e pectinases estão presentes nos extratos brutos, a produção de lacase é ausente ou muito baixa para ambos os fungos (Tabela 3). Isso pode estar relacionado não apenas à composição do meio, mas também à liberação de RS pela ação de celulases e pectinases causando uma repressão catabólita na produção de lacases. Segundo Umar *et al* (2022), a produção de lacase por fungos pode ser inibida dependendo da concentração de açúcares no meio de cultura.

4.1.2 Açúcares redutores e compostos fenólicos

Os maiores valores de RS nos controles abióticos (Tabela 3) foram detectados nos meios 8 (10,10 mg/mL) e 4 (9,5 mg/mL). Ambos os meios foram formulados com os maiores teores

de GP, SB e UR (Tabela 2). PC não foram detectados na maioria dos extratos dos controles abióticos, exceto nas amostras das composições 1, 3, 5 e 7 (Tabela 3). Os extratos abióticos dos meios 1 e 3 apresentaram a maior concentração inicial de PC (especificamente 0,117 mg EAG/mL para a composição 1 e 0,195 mg EAG/mL para a composição 3).

Tabela 3 – Açúcares redutores (RS) e compostos fenólicos (PC) em controles abióticos e em extratos brutos de *T. villosa* (*Tv*) e *Pycnoporus* sp. (*Pyc*) inoculados como *plugs* em meios de cultura semissólidos compostos de acordo com a matriz experimental de planejamento fatorial fracionário.

Composição do meio	Controles abióticos		<i>Plugs</i>			
	RS (mg/mL)	PC (mg GAE/mL)	RS (mg/mL)		PC (mg GAE/mL)	
			<i>Tv</i>	<i>Pyc</i>	<i>Tv</i>	<i>Pyc</i>
1	3.21	0.117	9.21	7.48	0.037	0.066
2	6.43	N.D.	19.59	21.21	0.239	0.215
3	3.82	0.195	20.78	23.20	0.257	0.158
4	9.50	N.D.	6.24	5.23	0.243	0.123
5	4.25	0.014	27.86	3.58	0.261	0.021
6	7.40	N.D.	3.29	5.32	0.080	0.057
7	6.54	0.049	5.15	4.53	0.134	0.061
8	10.10	N.D.	7.41	5.69	0.194	0.012
9 (c)	7.76	N.D.	5.55	37.12	0.138	0.155
10 (c)	7.76	N.D.	7.21	30.78	0.140	0.148
11 (c)	7.0	N.D.	6.02	31.16	0.130	0.135

(c): pontos centrais; N.D.: não detectado porque os valores eram muito baixos.

Em meios inoculados com *plugs*, os teores de RS foram maiores nas composições 1, 2 e 3 para *T. villosa* e *Pycnoporus* sp., em comparação com os controles abióticos. A liberação de RS em meios inoculados com *plugs* foi maior no meio 5 para *T. villosa* (27,86 mg/mL) e nos pontos centrais (composições 9, 10 e 11) para *Pycnoporus* sp. (37,12 mg/mL).

Todos os fatores influenciaram a quantidade de RS em meios cultivados com *plugs* de *T. villosa* (Apêndice 11), porém apenas o CS e as interações entre SB e GP foram positivas. Os fatores significativos para os níveis de açúcares detectados nas culturas com *Pycnoporus* sp. foram a UR (efeito positivo) e a interação entre SB e GP (Apêndice 12).

Alguns desses efeitos podem estar relacionados à composição intrínseca dos substratos (maior teor de açúcares livres e poliméricos, e lignina) e sua capacidade de induzir a produção de enzimas (que atuarão sobre os substratos e liberarão açúcares monoméricos ou simples para os fungos). Assim, a celulose é o principal componente das lignoceluloses (correspondendo a cerca de 30 a 50% do peso seco da biomassa) e uma ótima fonte de açúcares, quando despolimerizada por fungos.

Assim, a maior atividade da pectinase (e uma atividade média da celulase) foi observada nos extratos brutos de um meio composto por níveis nos pontos centrais (composição 9,10 e 11) inoculados por *plugs* de *Pycnoporus* sp.. Além disso, o GP também foi significativo (o que

pode induzir a produção de pectinase), como componente individual ou em interação com o SB, para a liberação de açúcares com ambos os fungos.

Segundo Williams *et al* (2019), os açúcares solúveis em água e polissacarídeos complexos são encontrados nas células da uva, que compõem o GP. Assim, este resíduo é uma fonte potencial de açúcares para processos fermentativos (SCHMITZ *et al.*, 2019). Nos extratos de *T. villosa* em *plugs*, as maiores atividades de celulases e pectinases foram observadas no meio 5 (embora a lacase não tenha sido detectada nesta composição do meio). Além disso, o CS afetou positivamente a liberação de açúcares do meio com *plugs* de *T. villosa*.

A importância do SC para a liberação de açúcares em meio inoculado com *T. villosa* pode estar relacionada à indução e produção de lacases ou celulases (como mencionado anteriormente neste trabalho). Portanto, o pool de enzimas produzido por ambos os fungos pode estar relacionado à liberação de açúcares nos extratos brutos.

Nas culturas inoculadas com *plugs* de *T. villosa*, a maior concentração de PC foi detectada no meio 5 (0,261 mg EAG/mL) e a menor concentração no meio 1 (0,037 mg EAG/mL). Quanto aos *plugs* de *Pycnoporus* sp., a maior concentração de fenólicos foi observada no meio 2 (0,215 mg EAG/mL) e a menor concentração no meio 8 (0,012 mg EAG/mL).

Nas culturas com *T. villosa*, todos os fatores foram significativos para a produção/liberação de PC. Entretanto, os efeitos positivos foram atribuídos ao CS, SB, GP e à interação entre SB e GP (Apêndice 13). Para *Pycnoporus* sp. (Apêndice 14), os efeitos significativos foram SCG (efeito negativo), interação entre SB e GP (efeito negativo), RH (efeito positivo) e WPI (efeito negativo).

SB e RH são ricos em teor de lignina, e sua oxidação por lacases (e outras enzimas) produzidas por fungos da podridão branca contribui para a liberação de PC individual (monômeros de lignina) em extratos brutos. Coniglio *et al.*, (2020) e Pattnaik *et al.*, (2021), relatam em seu estudo que a lignina presente no bagaço de cana-de-açúcar é fonte de grandes quantidades de PC, incluindo compostos valiosos como o ácido ferúlico.

Assim, a presença de PC em diferentes concentrações nos extratos de *T. villosa* e *Pycnoporus* sp. pode estar relacionada ao fato de que Basidiomycetes comumente produzem e utilizam esses compostos, geralmente em resposta às condições ambientais. Esses fungos podem modular o conteúdo de fenólicos em seu próprio micélio de acordo com a composição dos meios de cultura (GAMBATO *et al.*, 2016), utilizar o PC como mediador em reações oxidativas enzimáticas (por exemplo, reações de lacase), oligomerizar o PC (ZHANG *et al.*,

2023) e produzir enzimas capazes de liberar fenólicos de substratos ligninolíticos (SILVA *et al.*, 2022), principalmente para acessar açúcares de celuloses e hemiceluloses.

4.2 Pellets

4.2.1 Produção de celulases, pectinases e lacases

Atividades de celulase, pectinase e lacase foram detectadas nos extratos brutos de ambos os fungos (*T. villosa* e *Pycnoporus* sp., Tabela 4), no entanto, cada fungo respondeu de forma diferente em termos de perfis enzimáticos em relação à composição dos meios de cultura (fatores e níveis).

Table 4 – Produção de celulase, pectinase e lacase por *pellets* de *T. villosa* (*Tv*) e *Pycnoporus* sp. (*Pyc*) em meios de cultura semissólidos com diferentes composições.

Composição do meio	Celulase (FPU/mL)		Pectinase (U/mL)		Lacase (U/L)	
	<i>Tv</i>	<i>Pyc</i>	<i>Tv</i>	<i>Pyc</i>	<i>Tv</i>	<i>Pyc</i>
1	N.D.	0.24	1.88	1.12	166.86	148.98
2	N.D.	0.26	1.01	1.35	1438.01	209.73
3	N.D.	0.23	1.10	1.13	568.04	337.30
4	0.24	0.35	0.95	1.61	424.91	98.78
5	0.20	0.31	0.95	0.86	334.30	216.39
6	N.D.	0.32	N.D.	0.97	285.58	275.25
7	0.20	0.28	N.D.	0.78	257.58	453.24
8	0.22	0.42	1.02	1.21	882.05	355.64
9 (c)	0.20	0.27	0.92	1.08	370.19	233.68
10 (c)	0.22	0.23	0.98	0.94	325.01	194.50
11 (c)	0.22	0.23	1.15	1.14	389.89	231.60

(c): pontos centrais; N.D.: valores não detectados.

Pycnoporus sp. produziu as três enzimas simultaneamente em todas as composições dos meios de cultura quando inoculadas como *pellets*; As atividades de celulase e pectinase não foram detectadas em alguns extratos brutos de *T. villosa* em *pellets*.

4.2.1.1 Produção de cellulases

O isolado *T. villosa* apresentou atividades enzimáticas semelhantes em *pellets*, de uma média de 0,21 FPU/mL em todos os meios de composição onde obteve produção, inclusive nos três pontos de controle. O *Pycnoporus* sp. com a inoculação em forma de *pellets*, obteve nos controles uma média de atividade enzimática de 0,24 FPU/mL. Sendo assim, a composição de

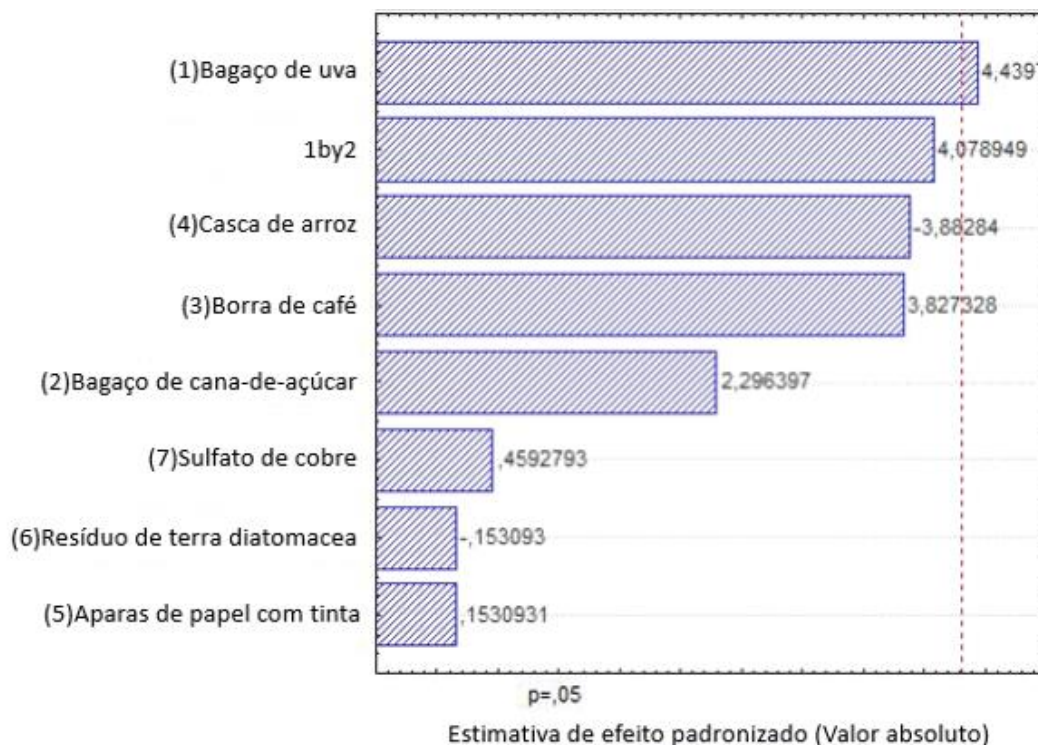
meio 8 proporcionou a maior atividade de 0,42 FPU/mL e a composição número 3 a menor de 0,23 FPU/mL, ou seja, uma quantidade inferior que a detectada pelos pontos centrais. Portanto, observa-se que para este isolado o meio de composição com as concentrações máximas para todos os fatores foram as mais adequadas para a produção de celulases totais e obteve atividades enzimáticas maiores que as detectadas em *T. villosa*.

Yoon *et al* (2019) inocularam os *pellets* homogeneizados de micélio de *P. sanguineus* em meio composto de SB pré-tratado com NaOH e observaram baixa produção de celulase em termos de atividade de papel filtro (em torno de 0,015 U/mL). Segundo Irbe *et al* (2014), uma cepa de *T. versicolor* foi inoculada como micélio homogeneizado em meio líquido e sólido (ambos contendo farelo de trigo como componente principal) e produziu 0,08 U/mL e 0,10 U/mL de celulases como atividade de papel filtro.

Os valores de produção de celulase relatados por esses autores são muito inferiores aos valores observados neste trabalho, principalmente em culturas de *P. sanguineus*. Um estudo cinético seria necessário para avaliar melhor a produção de celulase em intervalos adicionais (dias) e diferentes substratos enzimáticos devem ser usados para determinar atividades específicas do complexo celulolítico produzido pelos fungos (conforme discutido na seção 4.1.1.1).

De acordo com o gráfico de Pareto (Figura 18) para a produção de celulase a partir de *pellets* de *Pycnoporus* sp., apenas o GP apresentou efeito significativo em $p < 0,05$ sobre a produção da enzima pelo fungo. O efeito do GP foi positivo, significando que níveis mais elevados desse fator contribuem para maior produção de celulase pelo fungo. Também foi realizada análise de variância (ANOVA) (Apendice 15), e o modelo de duas interações resultou no maior valor do coeficiente de determinação ($R^2 = 0,97$).

Figura 18 - Diagrama de Pareto dos efeitos relacionados a produção total de celulases totais por *Pycnoporus* sp. em *pellets*.



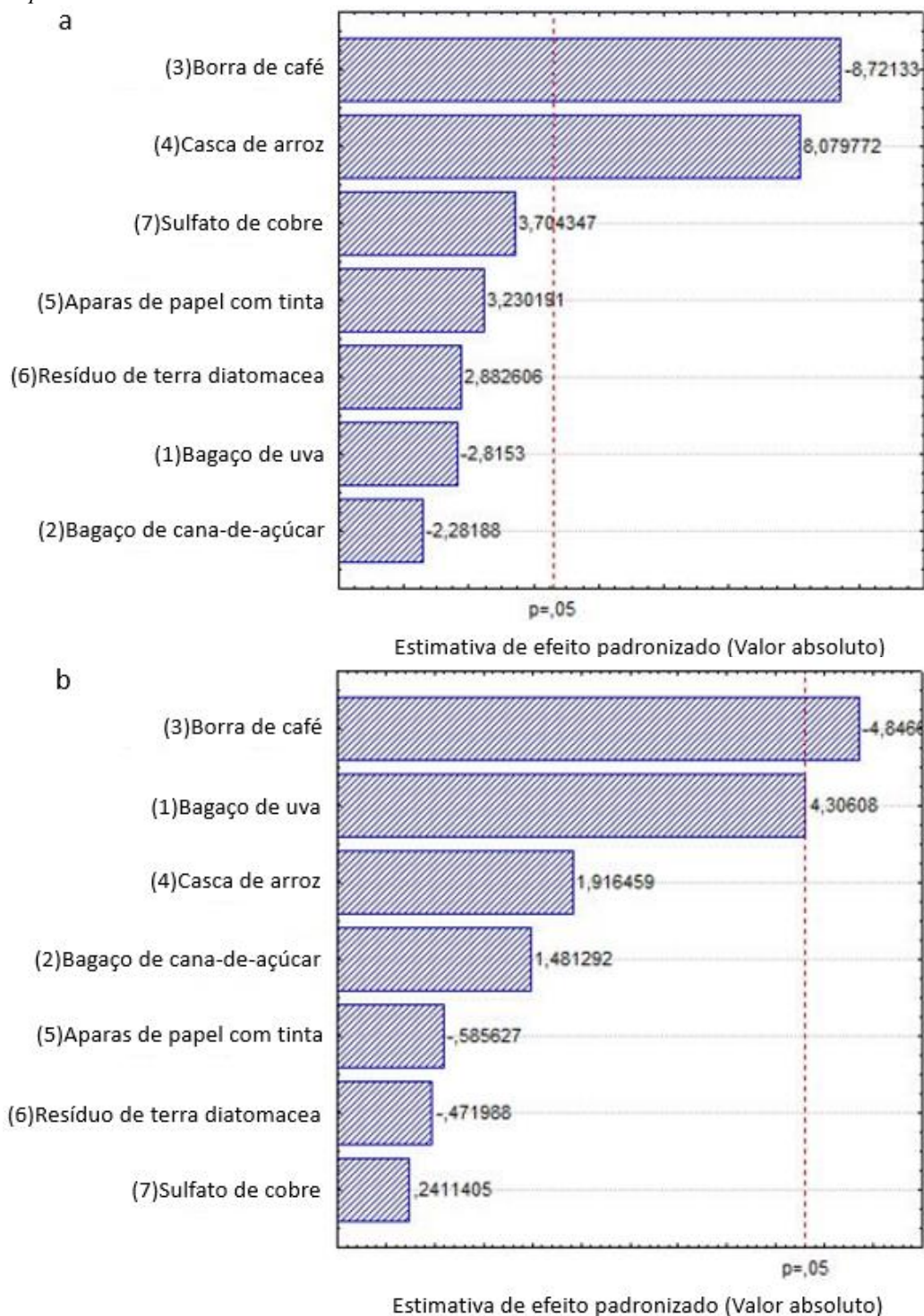
4.2.1.2 Produção de pectinases

A maior atividade das pectinases obtidas por *pellets* foi observada no meio 1 cultivado por *T. villosa* (1,88 U/mL), mais elevada que as médias obtidas nos controles de 1,02 U/mL, embora a enzima não tenha sido detectada em algumas composições de meios (6 e 7, onde o menor valor de casca de arroz é combinada com a maior quantidade de borra de café). As pectinases foram produzidas em todas as combinações de meios por *pellets* de *Pycnoporus* sp., tendo a maior atividade de 1,61 U/mL (meio 4) e expôs um resultado ligeiramente mais alto que *T. villosa* para os controles de 1,05 U/mL.

Os diagramas de Pareto (Figura 19-a e 19-b) para ambos os fungos inoculados como *pellets* demonstram que a SCG afetou significativamente a produção de pectinases; entretanto, o efeito foi negativo, ou seja, o menor nível desse resíduo nos meios de cultura, resulta em melhor produção da enzima (o que pode ser observado a partir dos dados da Tabela 1 e 4).

O estudo realizado por Ilić *et al.* (2022), a SCG também não foi adequada para estimular a produção de pectinases em culturas de estado sólido por diferentes fungos da podridão branca. O alto teor de lignina (32,5% - 39,1%) e o baixo teor de pectina (0,01%) podem ter contribuído para a baixa produção de pectinases por *Pycnoporus* sp. (LEVASSEUR *et al.*, 2014; MUSSATO *et al.*, 2011).

Figura 19 -Diagrama de Pareto dos efeitos relacionados a produção de pectinases por *T. villosa* (a) e *Pycnoporus* sp. (b) em *pellets*.



O GP também foi significativo na produção de pectinases pelos *pellets* de *Pycnoporus* sp., podendo estar atuando como indutor, considerando que em composições de meios com a concentração máxima desse fator, a produção de pectinases foi maior mesmo na presença de teores máximos de SCG. Efeitos significativos também podem ser observados nas tabelas ANOVA (Apêndice 16 e 17) com dados ajustados por um modelo polinomial sem interações,

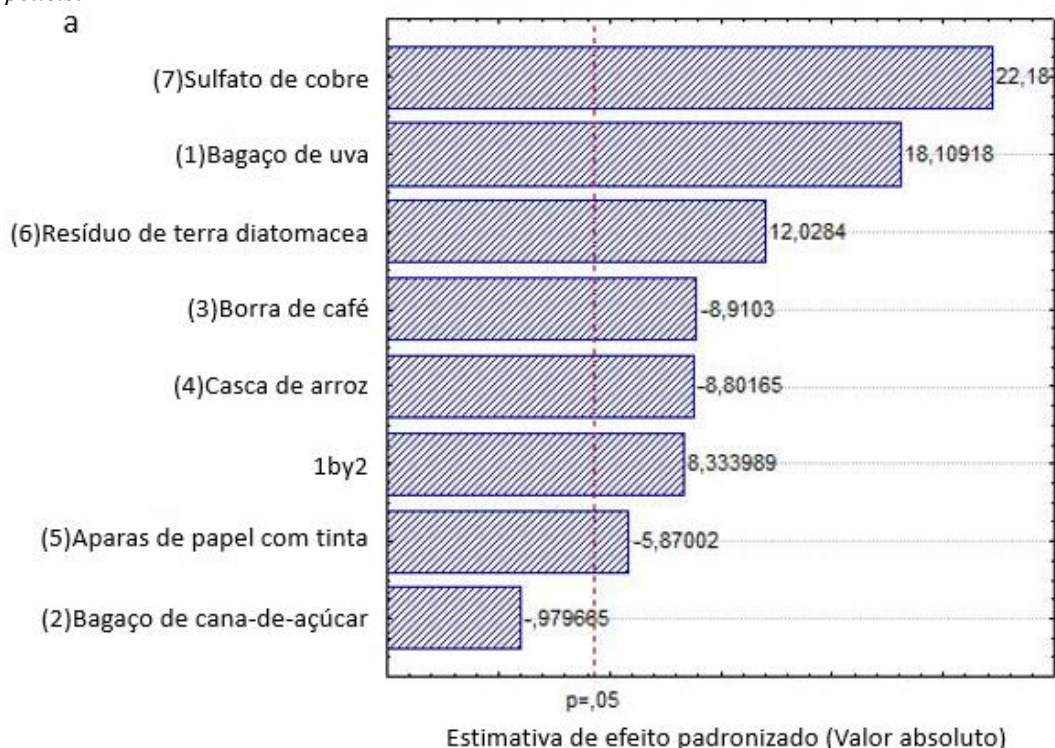
resultando em valores de coeficiente de determinação (R²) de 0,97 e 0,94 para os *pellets* de *T. villosa* e *Pycnoporus* sp., respectivamente.

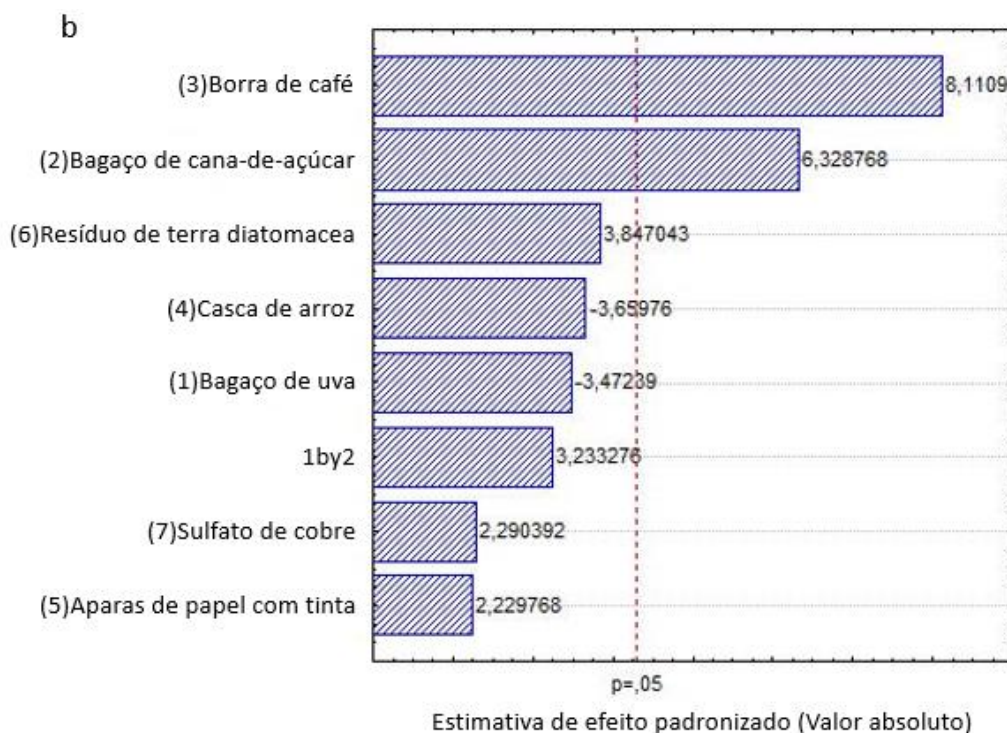
4.2.1.3 Produção de enzimas ligninolíticas

A lacase foi a principal enzima ligninolítica detectada nos extratos brutos, e uma grande variação na atividade da lacase foi observada entre os fungos e na composição dos meios. A maior produção de lacase com *pellets* foi detectada nos extratos de *T. villosa* cultivados no meio 2 (1438 U/L), que foi 3,2 vezes maior do que a melhor produção alcançada com *Pycnoporus* sp. (453 U/L). Portanto, *T. villosa* foi a mais adaptada para produzir lacases quando inoculada como *pellets* nas condições aplicadas neste trabalho (Tabela 4). De acordo com o trabalho realizado por González-Bautista *et al* (2020), baixas quantidades de inóculo poderiam melhorar a atividade lacase de *P. sanguineus*. Isso pode ser avaliado em estudos futuros com *P. sanguineus* na composição do meio 7.

Os gráficos de Pareto (Figura 20), o SB e a SCG (em níveis máximos) influenciaram a produção de lacase pelos *pellets* de *Pycnoporus* sp.. Ao mesmo tempo, todos os fatores (principalmente SC) foram significativos para os pellets de *T. villosa*, exceto SB. Entretanto, a interação do GP com a SB foi positiva para a produção da enzima em cultura de *T. villosa*.

Figura 20 - Diagrama de Pareto dos efeitos relacionados a produção de lacases de *T. villosa* (a) e *Pycnoporus* sp. (b) em *pellets*.





A relevância do SC e das biomassas ligninolíticas na composição de meios para a produção de lacases foi discutida anteriormente neste trabalho (Seção 4.1.1.3). Ademais, os dados ajustaram-se bem ao modelo com duas interações, resultando em valores de R^2 0,998 e 0,990 para *T. villosa* e *Pycnoporus* sp., respectivamente, conforme demonstrado nas tabelas ANOVA (Apêndice 18 e 19).

A MnP foi detectada apenas em extratos de meios de cultura inoculados com micélios de *T. villosa* (composições 5, 6, 7 e 8, resultando em 8,42, 17,84, 27,64 e 12,92 U/L, respectivamente). A presença de SCG em sua maior concentração pode ter contribuído para a produção dessa enzima pelo fungo. No entanto, mais estudos são necessários para entender completamente o efeito do resíduo na secreção de MnP.

4.3 Açúcares redutores e compostos fenólicos

Em geral, os extratos brutos dos meios de cultura inoculados em *pellets* de *Pycnoporus* sp. apresentaram maiores concentrações de RS, quando comparados aos *pellets* de *T. villosa* (Tabela 5). Os valores de RS nos meios inoculados com *pellets* de *T. villosa* foram, em sua maioria, menores do que os observados nos controles abióticos, exceto no meio 3 (valores semelhantes). Isso pode significar que o fungo está consumindo apenas os açúcares que estão prontamente disponíveis em meios para o crescimento da biomassa, ou liberando-os lentamente durante o tempo de cultivo e consumindo essencialmente para sua sobrevivência. Assim, a

inoculação deste fungo na forma de *pellets* em meios de cultura sem agitação não favorecerá o crescimento substancial de *T. villosa* (visualmente (Apêndice 1), o micélio não estava completamente desenvolvido na superfície do meio como foi observado com os *pellets* de *Pycnoporus* sp.) e uma liberação significativa de RS dos substratos.

Tabela 5 – Açúcares redutores (RS) e compostos fenólicos (PC) em controles abióticos e em extratos brutos de *T. villosa* (*Tv*) e *Pycnoporus* sp. (*Pyc*) inoculados como *pellets* em meios de cultura semissólidos compostos de acordo com a matriz experimental de planejamento fatorial fracionário.

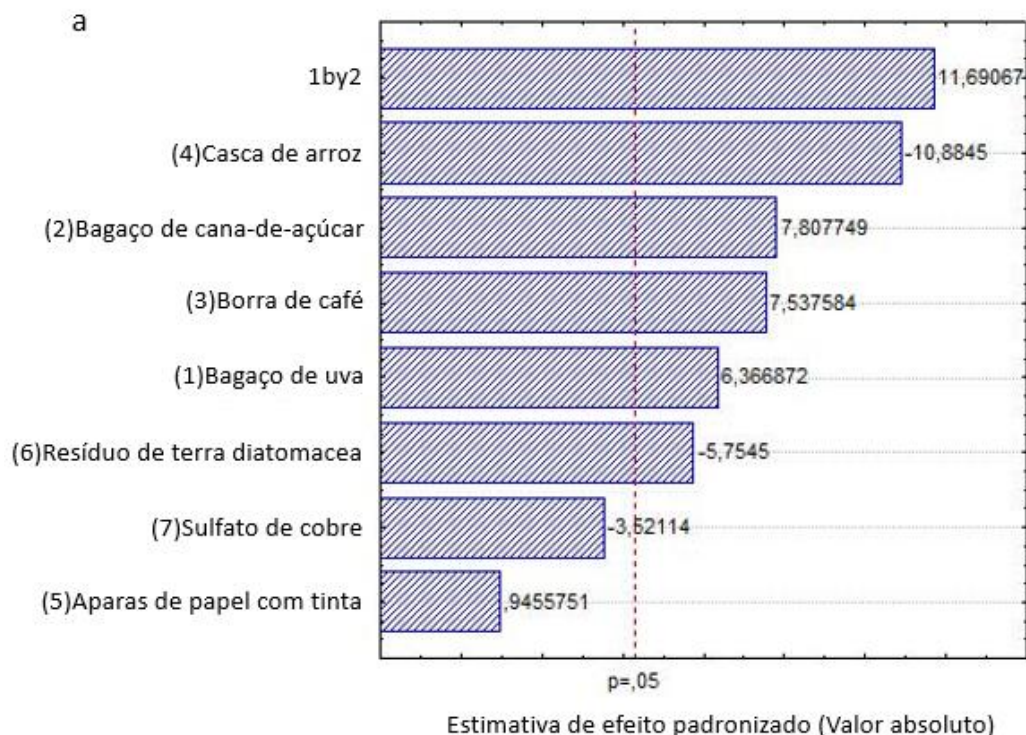
Composição do meio	Controles abióticos		<i>Pellets</i>			
	RS (mg/mL)	PC (mg GAE/mL)	RS (mg/mL)		PC (mg GAE/mL)	
			<i>Tv</i>	<i>Pyc</i>	<i>Tv</i>	<i>Pyc</i>
1	3.21	0.117	2.44	7.50	0.103	0.091
2	6.43	N.D.	4.60	4.05	0.083	0.128
3	3.82	0.195	3.91	6.31	0.093	0.086
4	9.50	N.D.	4.25	12.77	0.121	0.172
5	4.25	0.014	2.72	9.95	0.055	0.069
6	7.40	N.D.	2.47	8.98	0.085	0.083
7	6.54	0.049	2.93	7.52	0.060	0.088
8	10.10	N.D.	4.84	12.55	0.108	0.102
9 (c)	7.76	N.D.	2.66	6.20	0.084	0.104
10 (c)	7.76	N.D.	2.80	5.52	0.093	0.110
11 (c)	7.0	N.D.	2.99	5.52	0.081	0.125

(c): pontos centrais; N.D.: não detectado porque os valores eram muito baixos.

Nos extratos de *Pycnoporus* sp., obtidos de meios inoculados com *pellets*, a quantidade de RS foi superior à concentração inicial observada nos controles abióticos (exceto no meio 2 e pontos centrais (9, 10 e 11)). Os extratos com maiores valores de RS das culturas de *Pycnoporus* sp. com *pellets* foram observados nas composições dos meios 4 e 8, correspondendo a 12,77 mg/mL e 12,55 mg/mL, respectivamente. A avaliação estatística dos dados de RS determinados nos extratos brutos dos *pellets* de *Pycnoporus* sp., demonstrou que todos os fatores foram significativos ($p < 0,05$) para os teores de RS nos meios de cultura, exceto CS e WPI (Figura 20 e Apêndice 20).

Assim, a maior atividade da pectinase e a segunda maior atividade da celulase foram detectadas nos extratos do meio 4, que foi inoculado com *pellets* de *Pycnoporus* sp. (Tabela 4). Além disso, o GP foi significativo, como componente individual ou em interação com SB, para a liberação de açúcares com ambos os fungos. Williams *et al* (2019), relata em sua pesquisa que os açúcares solúveis em água e polissacarídeos complexos são encontrados nas células da uva, que compõem o GP. Assim, este resíduo é uma fonte potencial de açúcares para processos fermentativos (SCHMITZ *et al.*, 2019).

Figura 21 - Diagrama de Pareto dos efeitos relacionados a quantidade de açúcares redutores em culturas inoculadas com *Pycnoporus* sp. em *pellets*.



Além disso, nos extratos dos meios 1 e 3 inoculados com *pellets* de ambos os fungos os níveis de PC foram inferiores aos respectivos controles abióticos, e resultados semelhantes foram observados nos extratos do meio 1 inoculados com *plugs*. Entretanto, todas as outras composições de meios inoculadas com *pellets* ou *plugs* resultaram em maiores quantidades de compostos fenólicos nos extratos brutos.

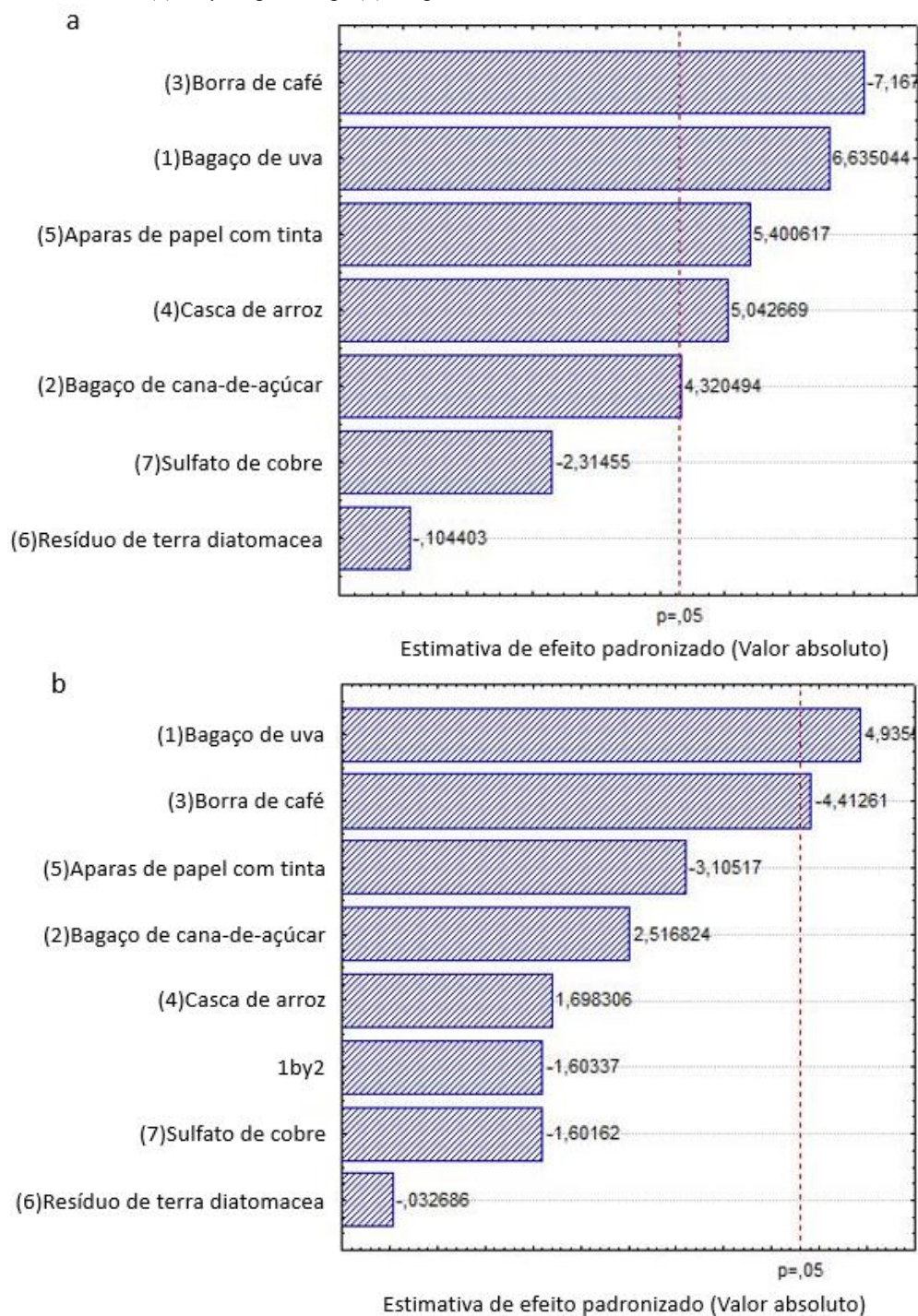
Os teores de PC nos extratos brutos dos meios 1 e 3 inoculados com *pellets* de ambos os fungos, foram inferiores aos seus respectivos controles abióticos. Entretanto, todas as demais composições de meios inoculadas com *pellets* resultaram em maiores quantidades de PC nos extratos brutos.

Os maiores e menores valores de PC foram detectados nos extratos dos meios 4 e 5, respectivamente, para *T. villosa* (0,121 e 0,055 mg EAG/mL) e *Pycnoporus* sp. (0,172 e 0,069 mg EAG/mL).

Todos os fatores foram significativos para os *pellets* de *T. villosa* (Figura 21-a e Apêndice 21), exceto CS e RDE, e os mais significativos foram o SCG (embora o efeito tenha sido negativo, pois menores concentrações de PC foram observadas nos maiores níveis desse resíduo) e GP (efeito positivo). Dois fatores foram significativos nos extratos obtidos com *pellets* de *Pycnoporus* sp., GP (efeito positivo) e SCG (efeito negativo) (Figura 21-b e Apêndice 22). No GP, PC são encontrados no vacúolo das células da uva e ligados a biopolímeros da

parede celular (WILLIAMS *et al.*, 2019). Enzimas fúngicas podem liberar esses compostos fenólicos em extratos brutos por degradação da parede celular vegetal.

Figura 22 - Diagrama de Pareto dos efeitos relacionados a quantidade de compostos fenólicos em culturas inoculadas de *T. villosa* (a) e *Pycnoporus* sp. (b) em *pellets*.



5 CONCLUSÃO

Os fungos *T. villosa* e *Pycnoporus* sp. demonstraram a capacidade de produzir enzimas, liberar açúcares redutores e compostos fenólicos sob diferentes condições, apresentando alta adaptabilidade em meios compostos simultaneamente por diversos substratos agroindustriais. Entretanto, a produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas pelos fungos foi afetada pela composição de cada substrato e sua mistura nos meios de cultura. Quando inoculadas como *plugs*, ambas as cepas produziram atividades semelhantes de pectinase (7,58 U/mL para *T. villosa* e 7,44 U/mL para *Pycnoporus* sp.) e celulase total (atividade de papel filtro de 0,58 U/mL para *Pycnoporus* sp. e 0,53 U/mL para *T. villosa*) em diferentes composições de meios, embora *T. villosa* tenha produzido títulos mais altos de lacase em geral. Quando inoculada como *pellets*, *Pycnoporus* sp. produziu a maior atividade de pectinases (1,88 U/mL) e celulase (atividade de papel filtro de 0,42 U/mL) em comparação com *T. villosa*. Entretanto, *T. villosa* produziu a maior atividade de lacase (1.438 U/L). A presença de atividade pectinases nos extratos brutos contribuiu para a liberação de açúcares redutores dos resíduos agroindustriais. Além de *Pycnoporus* sp. ter sido a melhor linhagem para liberação de açúcares redutores das biomassas, correspondendo a 37,12 mg/mL na forma de *plugs* e 12,77 mg/mL na forma de *pellets*. O bagaço de uva, o bagaço de cana-de-açúcar em interação com o bagaço de uva e o sulfato de cobre foram componentes significativos do meio para a produção de enzimas e liberação de açúcares e fenólicos pelos fungos. Assim, a utilização de diferentes resíduos agroindustriais para o cultivo de fungos da podridão branca mostrou-se uma alternativa potencial para o manejo da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias, conferindo um processo mais sustentável, custo-efetivo, para obtenção em um único lote de enzimas e compostos valiosos de interesse industrial.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar a produção enzimática por meio de cores de luzes diferentes;
- Realizar a cinética de produção das enzimas;
- Separar e purificar proteínas e açúcares presentes nos extratos brutos produzidos;
- Investigar a forma de co-cultivo fúngico dos isolados para obtenção de maior atividade enzimática, e liberação de açúcares redutores e compostos fenólicos;
- Quantificar compostos fenólicos por análise de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);

REFERÊNCIAS

- AGUSTIN, M. B.; CARVALHO, D. M.; LAHTINEN, M. H.; HILDEN, K.; LUNDELL, T.; MIKKONEN, K. S. Laccase as a tool in building advanced lignin-based materials. **Chem. Sus. Chem.**, v. 14, p. 1-22, 2021.
- AGRAWAL, K.; CHATURVEDI, V.; VERMA, P. Fungal laccase discovered but yet undiscovered. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 4, 2018.
- AGRAWAL, K.; VERMA, P. Multicopper oxidase laccases with distinguished spectral properties: a new outlook. **Heliyon**, v. 6, 2020.
- AINSWORTH, E. A.; GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 875-877, 2007.
- ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU, C. I. Extraction of phenolic compounds: a review. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 200-214, 2021.
- ALBUQUERQUE, B. R.; HELENO, S. A.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. **Food Funct.**, v. 12, p. 14-29, 2021.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. Phylum Basidiomycota order Aphyllophorales, Polypores, Chantarelles, tooth fungi, coral fungi and corticioids. **Wiley and sons Inc.**, p. 563–597, 1996.
- AMIN, F.; BHATTI, H. N.; BILAL, M. Recent advances in the production strategies of microbial pectinases – a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 1017-1026, 2019.
- ANDLAR, M.; REZIC, T.; MARDETKO, N.; KRACHER, D.; LUDWIG, R.; SANTEK, B. Lignocellulose degradation: an overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. **Eng. Life Sci.**, v. 18, p. 768–778, 2018.
- ARYA, P. S.; YAGNIK, S. M.; RAJPUT, K. N.; PANCHAL, R. R.; RAVAL, V. H. Valorization of agro-food wastes: ease of concomitant-enzymes production with application in food and biofuel industries. **Bioresource Technology**, v. 361, 2022.
- BARCELOS, M. C. S.; RAMOS, C. L.; KUDDUS, M.; RODRIGUEZ-COUTO, S.; SRIVASTAVA, N.; RAMTEKE, P. W.; MISHRA, P. K.; MOLINA, G. Enzymatic potential for the valorization of agro-industrial by-products. **Biotechnology Letters**, v. 42, p. 1799-1827, 2020.
- BAYLISS, K. L.; FOSTER, C.; DELL, B.; HARDY, G. E. ST. J. *Pycnoporus cinnabarinus* is pathogenic on living *Paulownia* trees. **Australasian Plant Pathology**, v. 36, p. 53-55, 2007.
- BILAL, M.; RASHEED, T.; IQBAL, H. M. N.; YAN, Y. Peroxidases-assisted removal of environmentally-related hazardous pollutants with reference to the reaction

mechanisms of industrial dyes. **Science of The Total Environment**, v. 644, p. 1-13, 2018.

BIZ, A.; FARIAS, F. C.; MOTTER, F. A.; PAULA, D. H.; RICHARD, P.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. Pectinase activity Determination: na early deceleration in the release of reducing sugars throws a spanner in the works!. **Plos One**, v. 10, n. 9, 2014

BHARATHIRAJA, S.; SURIYA, J.; KRISHNAN, M.; MANIVASAGAN, P.; KIM, S. K. Chapter six – Production of enzymes from agricultural wastes and their potential industrial applications. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 80, p. 125-148, 2017.

BONDAM, A. F.; SILVEIRA, D. D.; SANTOS, J. P.; HOFFMANN, J. F. Phenolic compounds from coffee by-products: extraction and application in the food and pharmaceutical industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 123, p. 172-186, 2022.

BRANDÃO, A. S.; GONÇALVES, A.; SANTOS, J. M. R. C. A. Circular bioeconomy strategies: from scientific research to commercially viable products. **Journal of Cleaner Production**, v. 295, 2021.

BRUYAN, N.; NARZARI, R.; GOGOI, L.; BORDOLOI, N.; HILOIDHARI, M.; PALSANIYA, D. R.; DEB, U.; GOGOI, N.; KATAKI, R. Chapter two – valorization of agricultural wastes for multidimensional use. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, p. 41-78, 2020.

CAMARERO, S.; PARDO, I.; CAÑAS, A. I.; MOLINA, P.; RECORD, E.; MARTÍNEZ, A. T. Engineering platforms for directed evolution of laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 5, p. 1370-1384, 2012.

CARVALHO, A. F. A.; FIGUEIREDO, F. C.; CAMPIONI, T. S.; PASTORE, G. M.; NETO, P. O. Improvement of some chemical and biological methods for the eficiente production of xylanases, xylooligosaccharides and linocellulose from sugar cane bagasse. **Biomass and Bioenergy**, v. 143, 2020.

CHANG, Y.; YANG, D.; LI, R.; WANG, T.; ZHU, Y. Textile dye biodecolorization by manganese peroxidase: a review. **Molecules**, v. 26, 2021.

CHAUHAN, P. S.; GORADIA, B.; JHA, B. Optimization and up scaling of ionic liquid tolerant and thermo-alkali stable laccase from a marine *Staphylococcus arlettae* S1-20 using tea waste. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 86, p. 1-8, 2018.

CHO, K. S.; RYU, H. W. Biodecolorization and biodegradation of dye by fungi: a review. **Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng. J.**, v. 30, p. 203-222, 2015.

CHOWDHARY, P.; SHUKLA, G.; RAJ, G.; FERREIRA, L. F. R.; BHARAGAVA, R. N. Microbial manganese peroxidase: a ligninolytic enzyme and its ample opportunities in research. **SN Applied Sciences**, 2018.

COLLINS, P. J.; & DOBSON, A. D. W. 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 3444–3450, 1997.

COMAN, V.; TELEKY, B-E.; MITREA, L.; MARTĂU, G. A.; SZABO, K.; CĂLINOIU, L-F.; VODNAR, D. C. Chapter five – bioactive potential of fruit and vegetable wastes. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 91, p. 157-225, 2020.

CONIGLIO, R. O.; DÍAZ, G. V.; FONSECA, M. I.; CASTRILLO, M. L.; PICCINNI, F. E.; VILLALBA, L. L.; *et al.* Enzymatic hydrolysis of barley straw for biofuel industry using a novel strain of *Trametes villosa* from Paranaense rainforest. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 50, n.8, p. 753–762, 2020.

COUTURIER, M.; BENNATI-GRANIER, C.; URIO, M. B.; RAMOS, L. P.; Fungal enzymatic degradation of cellulose. **Springer International Publishing**, 2016.

DAI, Y.; SUN, Q.; WANG, W.; LU, L.; LIU, M.; LI, J.; YANG, S.; SUN, Y.; ZHANG, K.; XU, J.; ZHENG, W.; HU, Z.; YANG, Y.; GAO, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, X.; GAO, F.; ZHANG, Y. Utilizations of agricultural waste as adsorbent for the removal of contaminants: a review. **Chemosphere**, v. 211, p. 235-253, 2018.

DEBNATH, R.; SAHA, T. An insight into the production strategies and applications of the ligninolytic enzyme laccase from bacteria and fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, p. 101645, 2020.

DEL CERRO, C.; ERICKSON, E.; DONG, T.; WONG, A. R.; EDER, E. K.; PURVINE, S. O.; MITCHELL, H. D.; WEITZ, K. K.; MARKILLIE, L. M.; BURNET, M. C. *et al.* Intracellular pathways for lignin catabolism in white-rot fungi. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 118, n. 9, 2021.

DESSALEW, G.; BEYENE, A.; NEBIYU, A.; & RUELLE, M. L. Use of industrial diatomite wastes from beer production to improve soil fertility and cereal yields. **Journal of Cleaner Production**, v. 157, p. 22-29, 2017.

DEVI, R.; KAUR, T.; KOUR, D.; RANA, K. L.; YADAV, A.; YADAV, N. A. Beneficial fungal communities from different habitats and their roles in plant growth promotion and soil health. **Microb. Biosyst.**, v. 5, p.21–47, 2020.

DHEVAGI, P.; RAMYA, A.; PRIYATHARSHINI, S.; THANUJA, G.; AMBREETHA, S.; NIVETHA, A. Chapter 11: industrially important fungal enzyme: productions and applications. **Recent Trends in Mycological Research**, Fungal Biology, p. 263-309, 2021.

DUQUE-ACEVEDO, M.; BELMONTE-UREÑA, L. J.; CORTÉS-GARCÍA, F. J.; CAMACHO-FERRE, F. Agricultural waste: review of the evolution, approaches and perspectives on alternative uses. **Glob. Ecol. Conserv.**, v. 22, 2020.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot *Basidiomycetes*. **Journal of Biotechnology**, v. 144, p. 37-42, 2009.

EL-GENDI, H.; SALEH, A. K.; BADIERAH, R.; REDWAN, E. M.; EL-MARADNY, Y. A.; EL-FAKHARANY, E. M. A. Comprehensive insight into fungal enzymes: structure, classification, and their role in mankind's challenges. **J. Fungi**, v. 8, n. 1, 2021.

Enzymes market size, share & trends analysis report by product (lipases, polymerases & nucleases, carbohydrase), by type (industrial, specialty), by source (plants, animals), by region, and segment forecasts, 2022 – 2030. **Grand View Research**, 2020. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>>. Acesso em: 24 de julho de 2022.

ENSHASY, H. A. E.; ELSAYED, E. A.; SUHAIMI, N.; MALEK, R. A.; ESAW, M. Bioprocess optimization for pectinase production using *Aspergillus niger* in a submerged cultivation system. **Microbial Biotechnology**, 2018.

ESPELETA, A. F. ***Aspergillus terreus* isolamento, identificação e avaliação da capacidade catalítica na redução de cetonas pró-quirais**. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2014.

FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; DE ALMEIDA, M. N. et al. Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 166, p. 1586–1603, 2012.

FERREIRA, D. S. S.; SANTANA, C. S.; SANTANA, I. B.; ARAÚJO, J. S. C.; SOUZA, B. C.; LEITE, F. H. A. Functional annotation and comparative modeling of ligninolytic enzymes from *Trametes villosa* (SW.) Kreisel for biotechnological applications. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 2021.

FERREIRA, D. S. S.; KATO, R. B.; MIRANDA, F. M.; PINHEIRO, K. C.; FONSECA, P. L. C.; TOMÉ, L. M. R.; VAZ, A. B. M.; BADOTTI, F.; RAMOS, R. T. J.; BRENIG, B.; AZEVEDO, V. A. C.; BENEVIDES, R. G.; GÓES-NETO, A. Draft genome sequence of *Tramete villosa* (SW.) Kreisel CCMB561, a tropical white-rot basidiomycota from the semiarid region of Brazil. **Data in Brief**, v. 18, p. 1581-1587, 2018.

FERREIRA, F. L.; DALL'ANTONIA, C. B.; SHIGA, E. A.; ALVIM, L. J.; PESSONI, R. A. B. Sugarcane bagasse as a source of carbon for enzyme production by filamentous fungi. **Hoehnea**, v. 45, p. 134–142, 2018.

FERRENTINO, G.; ASADUZZAMAN MD.; SCAMPICCHIO, M. M. Current technologies and new insights for the recovery of high valuable compounds from fruits by-products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 3, p. 386-404, 2018.

GAMBATO, G.; TODESCATO, K.; PAVÃO, E. M.; SCORTEGAGNA, A.; FONTANA, R. C.; SALVADOR, M.; CAMASSOLA, M. Evaluation of productivity and antioxidant

profile of solid-state cultivated macrofungi *Pleurotus albidus* and *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 46-51, 2016.

GAO, Y.; SHAH, K.; KWOK, I.; WANG, M.; ROME, L. H.; MAHENDRA, S. Immobilized fungal enzymes: innovations and potential applications in biodegradation and biosynthesis. **Biotechnology Advances**, v. 57, 2022.

GEISSDOERFER, M.; SAVAGET, P.; BOCKEN, N. M. P.; HULTINK, E. J. The circular economy – a new sustainability paradigm?. **J. Clean Prod.**, v. 143, p. 757–768, 2017.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, p.257-268, 1987.

GIACOBBE, S.; PEZZELLA, C.; LETTERA, V.; SANNIA, G.; PISCITELLI, A. Laccase pretreatment for agrofood wastes valorization. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 59-65, 2018.

GONZÁLEZ-BAUTISTA, E.; ALARCÓN-GUTIERREZ, E.; DUPUY, N.; GAIME-PERRAUD, I.; ZIARELLI, F.; & FARNET-DA-SILVA, A. M. Influence of yeast extract enrichment and *Pycnoporus sanguineus* inoculum on the dephenolisation of sugar-cane bagasse for production of second-generation ethanol. **Fuel**, v. 260, 2020.

HAILE, S.; AYELE, A. Pectinase from microorganisms and its industrial applications. **The Scientific World Journal**, p. 1-15, 2022.

HAPUARACHCHI, K. K.; KARUNARATHNA, S. C.; XU, X-H.; DUTTA, A. K.; PHENGSSINTHAM, P.; HYDE, K. D.; WEN, T-C. A review on bioactive compounds, beneficial properties and biotechnological approaches of *Trametes* (Polyporaceae, Polyporales) and a new record from Laos. **Chiang Mai J. Sci.**, v. 48, n. 3, p. 674-698, 2021.

HOU, H.; ZHOU, J.; WANG, J.; DU, C.; YAN, B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye **Process. Biochem.**, v. 39, n. 11, p. 1415-1419, 2004.

ILIĆ, N.; DAVIDOVIĆ, S.; MILIĆ, M. et al. Valorization of lignocellulosic wastes for extracellular enzyme production by novel Basidiomycetes: screening, hydrolysis, and bioethanol production. **Biomass Conv. Bioref.**, 2022.

IRBE, I.; ELISASHVILI, V.; ASATIANI, M. D.; JANBERGA, A.; ANDERSONE, I.; ANDERSONS, B. Lignocellulolytic activity of *Coniophora puteana* and *Trametes versicolor* in fermentation of wheat bran and decay of hydrothermally modified hardwoods. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 86, p. 71–78, 2014.

ISMAIL, B. B.; PU, Y.; FAN, L.; DANDAGO, M. A.; GUO, M.; LIU, D. Characterizing the phenolic constituents of baobab (*Adansonia digitata*) fruit shell by LC-MS/QTOF and their *in vitro* biological activities. **Sci. Total Environ.**, v. 694, 2019.

IQBAL, N.; AGRAWAL, A.; DUBEY, S.; KUMAR, J. Role of decomposers in agricultural waste management. **Biotechnological Applications of Biomass**, 2020.

JAMALUDIN, S. I. S.; KADIR, S. A. S. A.; KRISHNAN, J.; SAFRI, N. H. M. Optimization of enzymatic hydrolysis of kitchen waste using response surface methodology (RSM) for reducing sugar production. **Business Engineering and Industrial Applications Colloquium (BEIAC)**, 2013.

JANUSZ, G.; PAWLIK, A.; SWIDERSKA-BUREK, U.; POLAK, J.; SULEJ, J.; JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; PASZCZYNSKI. Laccase properties, physiological functions, and evolution. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 966, 2020.

JOHANSSON, T.; WELINDER, K. G.; NYMANN, P. O. Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 1, p. 57–62, jan.1993.

JOHN, J.; KAIMAL, S.; SMITH, M. L.; RAHMAN, P. K. M.; CHELLAM, P. V. Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 1086-1099, 2020.

KANGO, N.; JANA, U. K.; CHOUKADE, R. Fungal enzymes: sources and biotechnological applications. **Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology**, p. 515-538, 2019.

KEE, S. H.; CHIONGSON, J. B. V.; SALUDES, J. P.; VIGNESWARI, S.; RAMAKRISHNA, S.; BHUBALAN, K. Bioconversion of agro-industry sourced biowaste into biomaterials via microbial factories – a viable domain of circular economy. **Environmental Pollution**, v. 271, p. 116311, 2021.

KIJPORNYONGPAN, T.; SCHWARTZ, A.; YAGUCHI, A.; SALVACHÚA, D. Systems biology-guided understanding of white-rot fungi for biotechnological applications: a review. **IScience**, v. 25, 2022.

KIRUBA, N. J. M.; THATHEYUS, A. J. Chapter 18: fungi, fungal enzymes and their potential application as biostimulants. **Microbiome Stimulants for Crops**, p. 305-314, 2021.

KNEŽEVIĆ, A.; STAJIĆ, M.; TESEVIĆ, V. Antioxidative, antifungal, cytotoxic and antineurodegenerative activity of selected *Trametes* species from Siberia. **Plos One**, v. 13, n. 8, 2018.

KOUR, D.; RANA, K. L.; KAUR, T.; SINGH, B.; CHAUHAN, V. S.; KUMAR, A. *et al.* Extremophiles for hydrolytic enzymes productions: biodiversity and potential biotechnological applications. **Bioprocessing for Biomolecules Production**, p. 321–372, 2019.

KUMAR, A.; SINGH, A. K.; BILAL, M.; CHANDRA, R. Sustainable production of thermostable laccase from agro-residues waste by *Bacillus aquimaris* AKRCo2. **Catalysis Letters**, 2021.

KUMAR, A.; CHANDRA, R. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. **Heliyon**, v. 6, 2020.

KUMAR, A.; AURORA, P. K. Biotechnological applications of manganese peroxidases for sustainable management. **Front. Environ. Sci.**, v. 10, 2022.

KUTHIALA, T.; THAKUR, K.; SHARMA, D.; SINGH, G.; KHATRI, M.; ARYA, S. K. The eco-friendly approach of cocktail enzyme in agricultural waste treatment: a comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 209, p. 1956-1974, 2022.

LARA-MARQUEZ A.; ZAVALA-PARAMO, M.; LOPEZ-ROMERO, E.; CALDERON-CORTES, N.; LOPEZ-GOMEZ, R.; CONEJO-SAUCEDO, U. *et al.* Cloning and characterization of a pectin lyase gene from *Colletotrichum lindemuthianum* and comparative phylogenetic/structural analyses with genes from phytopathogenic and saprophytic/opportunistic microorganisms. **BMC Microbiology**, v.11,n. 260, 2011.

LEVASSEUR, A.; LOMASCOLO, A.; CHABROL, O. *et al* The genome of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: a basidiomycete model with a versatile arsenal for lignocellulosic biomass breakdown. **BMC Genomics**, v. 15, n.486, 2014.

LOI, M.; GLAZUNOVA, O.; FEDOROVA, T.; LOGRIECO, A. F.; MULÉ, G. Fungal Laccases: The Forefront of Enzymes for Sustainability. **J. Fungi**, v. 7, n. 12, 2021.

LOMASCOLO, A.; UZAN-BOUKHRIS, E.; HERPOËL-GIMBERT, I.; SIGOILLOT, J.; LESAGE-MEESSEN. Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 1129-1149, 2011.

MAHTO, R. B.; YADAV, M.; MUTHURAJ, M.; SHARMA, A. K.; BHUNIA, B. Biochemical properties and application of a novel pectinase from a mutant strain of *Bacillus subtilis*. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2022.

MAMARI, H. H. A. Phenolic compounds: classification, chemistry, and updated techniques of analyses and synthesis. **Open Science Journals**, 2021.

MAMO, J.; GETACHEW, P.; SAMUEL-KURIA, M.; ASSEFA, F. Application of milk-clotting protease from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 MN726447 and *Bacillus subtilis* SMDFS 2B MN715837 for danbo cheese production. **J. Food Qual.**, v. 1, p. 1–12, 2020.

MATE, D. M.; ALCALDE, M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. **Microbial Biotechnology**, v. 10, p. 1457-1467, 2016.

MARQUES, N. P.; PEREIRA, J. C.; GOMES, E.; SILVA, R.; ARAÚJO, A. R.; FERREIRA, H.; RODRIGUES, A.; DUSSÁN, J.; BOCCHINI, D. A. Cellulases and

xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 66-75, 2018.

MARTINS, C. C.; RODRIGUES, R. C.; MERCALI, G. D.; RODRIGUES, E. New insights into non-extractable phenolic compounds analysis. **Food Research International**, v. 157, 2022.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MINATEL, I. O.; BORGES, C. V.; FERREIRA, M. I.; GOMEZ, H. A.; CHEN, C. O.; LIMA, G. P. P. Phenolic compounds: functional properties, impact of processing and bioavailability. **Biological Activity**, 2017.

MIR-TUTUSAUS, J. A.; BACCAR, R.; CAMINAL, G.; SARRÁ, M. Can White-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review. **Water Research**, v. 138, p. 137-151, 2018.

MIYAUCHI S.; HAGE, H.; DRULA, E.; LESAGE-MEESSEN, L.; BERRIN, J.; NAVARRO, D.; FAVEL, A.; CHADULI, D.; GRISEL, S. *et al.* Conserved white-rot enzymatic mechanism for wood decay in the basidiomycota genus *Pycnoporus*. **DNA Research**, v. 27, 2020.

MOLDES, D.; LORENZO, M.; SANROM, M. A. Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. **Biotechnology Letters**, n. 1990, p. 327–330, 2004.

MOTA, T. R.; KATO, C. G.; PERALTA, R. A.; BRACHT, A.; DE MORAIS, G. R.; BAESSO, M. L.; DE SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Decolourization of Congo Red by *Ganoderma lucidum* Laccase: Evaluation of Degradation Products and Toxicity. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 226, n. 10, 2015.

MUSSATTO, S. I.; MACHADO, E. M. S.; MARTINS, S. *et al* Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. **Food Bioprocess Technol.**, v. 4, p. 661–672, 2011.

Fotos de *Trametes villosa*. **Naturalista**, 2021. Disponível em: <https://www.naturalista.mx/taxa/328309-Trametes-villosa/browse_photos>. Acesso em: 28 de outubro de 2021.

NAYAK, A.; BHUSHAN, B. An overview of the recent trends on the waste valorization techniques for wood wastes. **Journal of Environmental Management**, v. 233, p. 352-370, 2019.

OKAL, E. J.; ASLAM, M. M.; KARANJA, J. K.; NYIMBO, T. J. Mini review: advances in understanding regulation of cellulase enzyme in white-rot basidiomycetes. **Microbial Pathogenesis**, v. 147, 2020.

OLIVEIRA, F. K.; SANTOS, L. O.; BUFFON, J. G. Mechanism of action, sources, and application of peroxidases. **Food Research International**, v. 143, 2021.

OLOU, B. A.; KRAH, F-S.; PIEPENBRING, M.; YOROU, N. S.; LANGER, E. Diversity of *Trametes* (Polyporales, Basidiomycota) in tropical Benin and description of new species *Trametes parvispora*. **MycoKeys**, v. 65, p. 25-47, 2020.

OUMER, O. J.; ABATE, D. Comparative studies of pectinase production by *Bacillus subtilis* strain BTK 27 in submerged and solid-state fermentations. **BioMed. Research International**, p. 1-10, 2018.

PATEL, V. B.; CHATTERJEE, S.; DHOBLE, A. S. A review on pectinase properties, application in juice clarification, and membranes as immobilization support. **Journal of Food Science**, v. 87, p. 3338-3354, 2022.

PATTNAIK, B.; SARANGI, P. K.; JENA, P. K.; SAHOO, H. P. BHATIA, L. Production of phenolic flavoring compounds from sugarcane bagasse by *Lactobacillus acidophilus* MTCC 10307. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 23, 2021.

PAYNE, C. M.; KNOTT, B. C.; MAYES, H. B.; HIMMEL, H. H. M. E.; SANDGREN, M.; STÅHLBERG, J.; BECKHAM, G. T. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 3, 2015.

PAZ, A.; COSTA-TRIGO, I.; TUGORES, F.; MÍGUEZ, M.; MONTAÑA, J.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotransformation of phenolic compounds by *Bacillus aryabhatai*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, p. 1671-1679, 2019.

Perda e desperdício de alimentos. **FAO – Food and agriculture organization of the united nations**, 2021. Disponível em: < <https://www.fao.org/food-loss-and-food-waste/flw-data>>. Acesso em: 11 de novembro de 2021.

PERAZA-JIMÉNEZ, K.; ROSA-GARCÍA, S.; HUIJARA-VASCONSELOS, J. J.; REYES-ESTEBANEZ, M.; GÓMEZ-CORNELIO, S. Enzymatic bioprospecting of fungi isolated from a tropical rainforest in Mexico. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 22, 2021.

PINEDA-INSUASTI, J. A.; GÓMEZ-ANDRADE, W. E.; DUARTE-TRUJILLO, A. S.; SOTO-ARROYAVE, C. P.; PINEDA-SOTO, C. A.; FIERRO-RAMOS, F. J.; MORA-MUÑOZ, E. S.; ÁLVAREZ-RAMOS, S. E. Producción de *Pycnoporus* spp. y sus metabolitos secundarios: Una revisión. **ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar**, v. 51, n. 2, p. 60-69, 2017.

PORTZ, T. M.; MIORANZA, T. M.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J. Substrate with lignocellulosic residues for *Pycnoporus sanguineus* cultivation. **Rev. Caatinga**, v. 35, n. 2, 2022.

RAVINDRAN, R.; HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. **Bioengineering**, v. 5, n. 4, p. 93, 2018.

RESHMY, R.; PHILIP, E.; MADHAVAN, A.; SIROHI, R.; PUGAZHENDHI, A.; BINOD, P.; AWASTHI, M. K.; VIVEK, N.; KUMAR, V.; SINDHU, R. Lignocellulose in future biorefineries: strategies for cost-effective production of biomaterials and bioenergy. **Bioresour. Technol.**, v. 344, 2022.

ROJAS, F. L.; ZAPATA, P.; RUIZ-TIRADO, L. Agro-industrial waste enzymes: perspectives in circular economy. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 34, 2022.

RODRÍGUEZ, E.; PICKARD, M. A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. **Curr. Microbiol.**, v. 38, n. 1, p. 27-32, 1999.

RODRÍGUEZ, M. D.; PAIVA, I. M. A.; CASTRILLO, M. L.; ZAPATA, P. D.; & VILLALBA, L. L. KH₂PO₄ improves cellulase production of *Irpex lacteus* and *Pycnoporus sanguineus*. **Journal of King Saud University-Science**, v. 31, n. 4, p. 434-444, 2019.

ROGALSKI *et al.* Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture conditions. **Acta Microbiologica Polonica**, v. 40, n. 3/4, p. 221-234, 1991.

RIVERA-HOYOS, C. M.; MORALES-ÁLVAREZ, E. D.; POUTOU-PIÑALES, R. A.; PEDROZA-RODRÍGUEZ, A. M.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; DELGADO-BOADA, J. M. Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**, v. 27, p. 67-82, 2013.

RYTIOJA, J.; HILDÉN, K.; YUZON, J.; HATAKKA, A.; VRIES R. P.; MAKELA, M. R. Plant-polysaccharide-degrading enzymes from basidiomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 614–649, 2014.

RYVARDEN, L. Genera of polypores, nomenclature and taxonomy. **Fungiflora**, 1991.

SAINI, S.; SHARMA, K. K. Fungal lignocellulolytic enzymes and lignocellulose: a critical review on their contribution to multiproduct biorefinery and global biofuel research. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 2304-2319, 2021.

SALOMÃO, G. S. B.; AGNEZI, J. C.; PAULINO, L. B.; HENCKER, B.; LIRA, T. S.; TARDIOLI, P. W.; PINOTTI, L. M. Production of cellulases by solid state fermentation using natural and pretreated sugarcane bagasse with different fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 1-6, 2019.

SALTVEIT, M. E. Synthesis and metabolism of phenolic compounds. **Fruit and Vegetable Phytochemicals**, p. 115-124, 2017.

SANTI, L. **Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais.** Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

- SANTOS, T. L.; TAVARES, O. C. H.; LOPES, S. A.; ELIAS, S. S.; BERBARA, R. L. L.; GARCÍA, A. C. Environmental implications of the organic matter structure for white-rot fungus *Pleurotus eryngii* growth in a tropical climate. **Fungal Biology**, v. 125, p. 845-859, 2021.
- SCARPA, J. C. P.; MARQUES, N. P.; MONTEIRO, D. A.; MARTINS, G. M.; PAULA, A. V.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.; GOMES, E.; BOCCHINI, D. A. Saccharification of pretreated sugarcane bagasse using enzymes solution from *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 and cellulosic ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v 141, 2019.
- SCHALCHLI, H.; HORMAZÁBAL, E.; RUBILAR, O.; BRICEÑO, G.; MUTIS, A.; ZOCCOLO, G. J.; DIEZ, M. C. Production of ligninolytic enzymes and some diffusible antifungal compounds by white-rot fungi using potato solid wastes as the sole nutrient source. **Appl. Microbiol.**, v. 123, n. 4, p. 886-895, 2017.
- SHRESTHA, S.; RAHMAN, M. S.; QIN, W. New insights in pectinase production development and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 9069-9087, 2021.
- SILVA, E. A.; MENDES, T. D.; PACHECO, T. F. *et al.* Colonization of oil palm empty fruit bunches by basidiomycetes from the Brazilian cerrado: enzyme production. **Energy Sci. Eng.**, v. 10, n. 1189– 1201, 2022.
- SINGH, A. P.; SINGH, T. Biotechnological applications of wood-rotting fungi: a review. **Biomass and Bioenergy**, v. 62, p. 198-206, 2014.
- SINGH, A.; BAJAR, S.; DEVI, A.; PANT, D. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. **Bioresource Technology Reports**, v. 14, 2021.
- SINGHAL, A.; KUMARI, N.; GHOSH, P.; SINGH, Y.; GARG, S.; SHAH, M. P.; JHA, P. K.; CHAUHAN, D. K. Optimizing cellulase production from *Aspergillus flavus* using response surface methodology and machine learning models. **Environmental Technology & Innovation**, v. 27, 2022.
- SINGHANIA, R. R.; RUIZ, H. A.; AWASTHI, M. K.; DONG, C.; CHEN, C.; PATEL, A. K. Challenges in cellulase bioprocess for biofuel applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 151, 2021.
- SCHMITZ, K.; PROTZKO, R.; ZHANG, L. *et al.* Spotlight on fungal pectin utilization—from phytopathogenicity to molecular recognition and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 103, p. 2507–2524, 2019.
- SONALI, S.; RANJAN, R. J.; KERRY, D. G.; THATOI, H.; SAHOO, S. L. Biochemical prospects of various microbial pectinase and pectin: an approachable concept in pharmaceutical bioprocessing. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, 2020.
- SOUSA, E. C.; UCHÔA-THOMAZ, A. M. A.; CARIOCA, J. O. B. *et al.* Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera* L.), Benitaka

variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 135-142, 2014.

SPINEI, M.; OROIAN, M. Structural, functional and physicochemical properties of pectin from grape pomace as affected by different extraction techniques. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 224, p. 739-753, 2023.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P. K.; GUPTA, V. K.; MOLINA, G.; RODRIGUEZ-COUTO, S.; MANIKANTA, A.; RAMTEKE, P. W. Applications of fungal cellulases in biofuel production: advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2379-2386, 2018.

STATSOFT INC. Statistica data analysis system version 8.0. Tulsa: **Statsoft Inc.**, 2007.

SUKUMARAN, R. K.; CHRISTOPHER, M.; KOOLOTH-VALAPPIL, P.; SREEJARAJU, A.; MATHEW, R. M.; SANKAR, M.; PUTHIYAMADAM, A.; ADARSH, V.; ASWATHI, A.; REBINRO, V.; ABRAHAM, A.; PANDEY, A. Addressing challenges in production of cellulases for biomass hydrolysis: targeted interventions into the genetics of cellulase producing fungi. **Bioresource Technology**, v. 329, 2021.

SULLIVAN, G.; HENRY, E. D. Occurrence and distribution of phenoxazinone pigments in the genus *Pycnoporus*. **J. Pharmaceutical Sci.**, v. 60, p. 1097–1098, 1971.

SUMAN, A.; VERMA, P.; YADAV, A. N.; SAXENA, A. K. Bioprospecting for extracellular hydrolytic enzymes from culturable thermotolerant bacteria isolated from manikaran thermal springs. **Res. J. Biotechnol.**, v. 10, p. 33–42, 2015.

SURYADI, H.; JUDONO, J. J.; PUTRI, M. R.; ECLESSIA, A. D.; ULHAQ, J. M.; AGUSTINA, D. N.; SUMIATI, T. Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi. **Heliyon**, v. 8, 2022.

TEMPORITI, M. E. E.; NICOLA, L.; NIELSEN, E.; TOSI, S. Fungal enzymes involved in plastics biodegradation. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, 2022.

TOMÉ, L. M. R.; SILVA, F. F.; FONSECA, P. L. C.; PEREIRA, T. M.; AZEVEDO, V. A. C.; BRENIG, B.; BADOTTI, F.; GÓES-NETO, A. Hybrid assembly improves genome quality and completeness of *Trametes villosa* CCMB561 and reveals a huge potential for lignocellulose breakdown. **J. Fungi**, v. 8, n. 2, p. 142, 2022.

TUYSUZ, E.; GONUL-BALTACI, N.; OMEROGU, M. A.; ADIGUZEL, A.; TASKIN, M.; OZKAN, H. Co-production of amylase and protease by locally isolated thermophilic bacterium *Anoxybacillus rupiensis* T2 in sterile and non-sterile media using waste potato peels as substrate. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 12, p. 6793-6802, 2020.

UNUOFIN, J. O.; OKOH, A. I.; NWODO, U. U. Utilization of agroindustrial wastes for the production of laccase by *Achromobacter xylosoxidans* HWN16 and *Bordetella*

bronchiseptica HSO16. **Journal of Environmental Management**, v. 231, p. 222-231, 2019.

UMAR, A.; & AHMED, S. Optimization, purification and characterization of laccase from *Ganoderma leucocontextum* along with its phylogenetic relationship. **Sci Rep.**, v. 12, n. 1, 2022.

UPADHYAY, P.; SHRIVASTAVA, R.; AGRAWAL, P. K. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. **Biotech.**, v. 6, n. 15, 2016.

UZAN, E.; NOUSIAINEN, P.; BALLAND, V.; SIPILA, J.; PIUMI, F.; NAVARRO, D.; ASTHER, M.; REGISTRO, E.; LOMASCOLO, A. High redox potential laccases from the ligninolytic fungi *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* suitable for white biotechnology: from gene cloning to enzyme characterization and applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 2199-2213, 2010.

VALLE, J. S.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SANTANA, T. T.; ALMEIDA, P. H.; PEREIRA, A. M.; LINDE, G. A. *et al* Optimum conditions for inducing laccase production in *Lentinus crinitus*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 8544-8551, 2014.

VENKATESH, G. Circular bio-economy-paradigm for the future: systematic review of scientific journal publications from 2015 to 2021. **Circular Economy and Sustainability**, v. 2, p. 231-279, 2022.

VERMA, P.; YADAV, A. N.; KHANNAM, K. S.; MISHRA, S.; KUMAR, S.; SAXENA, A. K. *et al*. Appraisal of diversity and functional attributes of thermotolerant wheat associated bacteria from the peninsular zone of India. **Saudi J. Biol. Sci.**, v. 26, p. 1882–1895, 2019.

VIAYARAGHAVAN, P.; KUMAR, S. J.; ARASU, M. V.; AL-DHABI, N. A. Simultaneous production of commercial enzymes using agro industrial residues by statistical approach. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, v. 99, p. 2685-2696, 2018.

YADAV, A. N.; SACHAN, S. G.; VERMA, P.; TYAGI, S. P.; KAUSHIK, R.; SAXENA, A. K. Culturable diversity and functional annotation of psychrotrophic bacteria from cold desert of Leh Ladakh (India). **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 31, p. 95–108, 2015.

YAMANAKA, R.; SOARES, C. F.; MATHEUS, D. R.; MACHADO, K. M. G. Lignolytic enzymes produced by *Tramete villosa* CCB176 under different culture conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 78-84, 2008.

YOON, L. W.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M.; PATAH, M. F. A.; TEOH, W. H. Process intensification of cellulase and bioethanol production from sugarcane bagasse via an integrated saccharification and fermentation process. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, 2019.

WANG, F.; XU, L.; ZHAO, L.; DING, Z.; MA, H.; TERRY, N. Fungal laccase production from lignocellulosic agricultural wastes by solid-state fermentation: a review. **Microorganisms**, v. 7, p. 665, 2019.

WILLIAMS, D. L.; SCHÜCKEL, J.; VIVIER, M. A.; BUFFETTO, F. & ZIETSMAN, A. J. Grape pomace fermentation and cell wall degradation by *Kluyveromyces marxianus* Y885. **Biochemical Engineering Journal**, v. 150, p. 107282, 2019.

ZHAO, L.; YUAN, Z.; KAPU, N. S.; CHANG, X. F.; BEATSON, R.; TRAJANO, H. L. *et al.* Increasing efficiency of enzymatic hemicellulose removal from bamboo for production of high-grade dissolving pulp. **Bioresour. Technol.**, v. 223, p. 40–46, 2017.

ZHANG, Y.; WANG, J.; YAJUN, C.; ZHOU, M.; WANG, W.; GENG, M.; XU, D. Comparative genomics uncovers the genetic diversity and synthetic biology of secondary metabolite production of *Trametes*. **Mycrobiology**, v. 48, n. 2, p. 104-114, 2020.

ZHANG, L.; DENG, Z.; QIU, T.; YANG, W.; ZHU, F.; YE, X. Characterisation of a laccase isolated from *Trametes hirsuta* and its application in the oligomerisation of phenolic compounds. **Fungal Biology**, v. 127, n. 1-2, p. 872-880, 2023.

ZHUO, R.; FAN, F. A comprehensive insight into the application of white rot fungi and their lignocellulolytic enzymes in the removal of organic pollutants. **Science of the total environment**, v. 778, p. 116132, 2021.

APÊNDICE 1 – CRESCIMENTO FÚNGICO DE *T. VILLOSA* E *PYCNOPORUS* SP. INOCULADOS EM MEIO DE CULTURA SEMISSÓLIDO DE DUAS MANEIRAS DIFERENTES: *PELLETS* E *PLUGS*



a



b

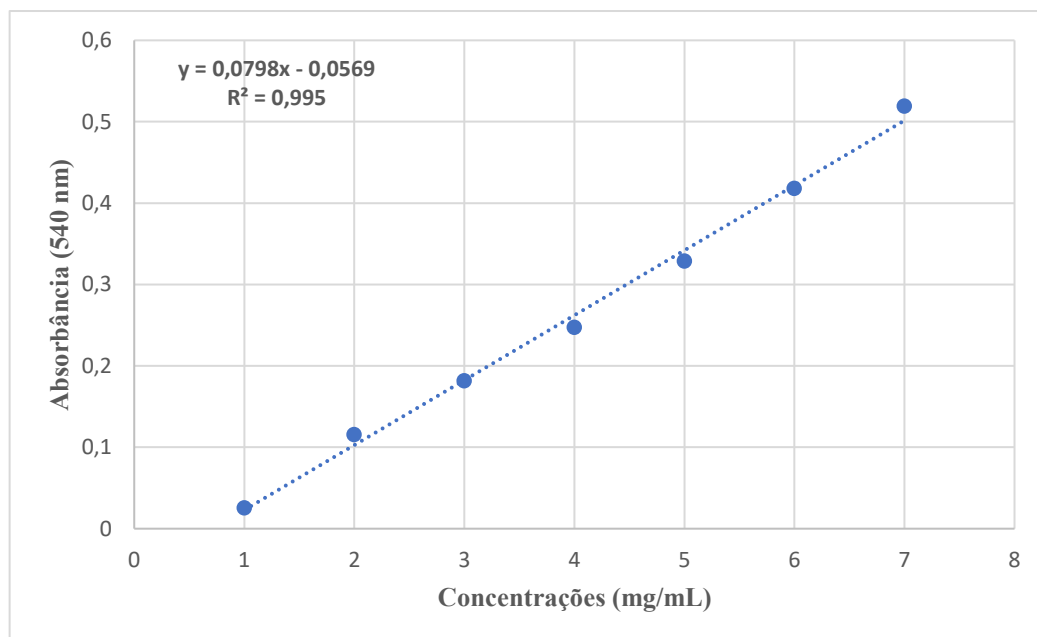


c

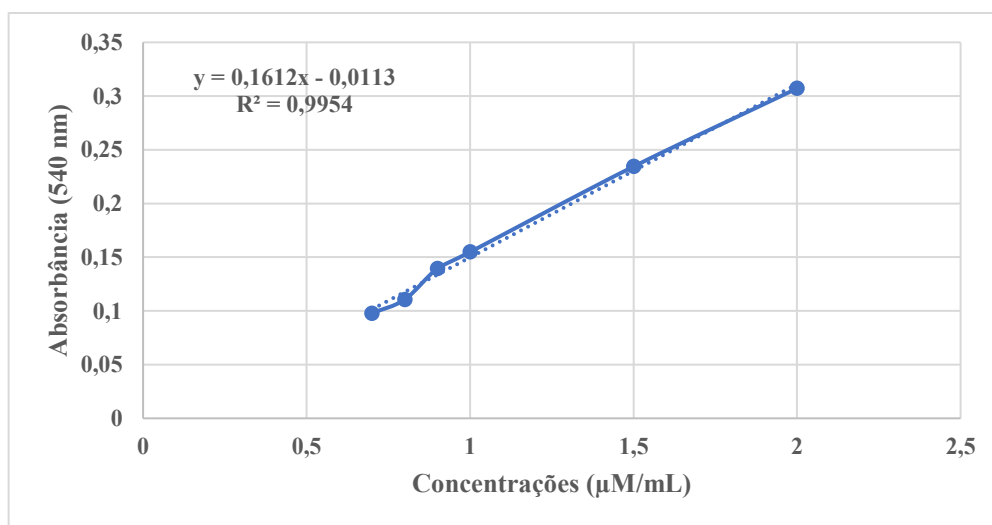


d

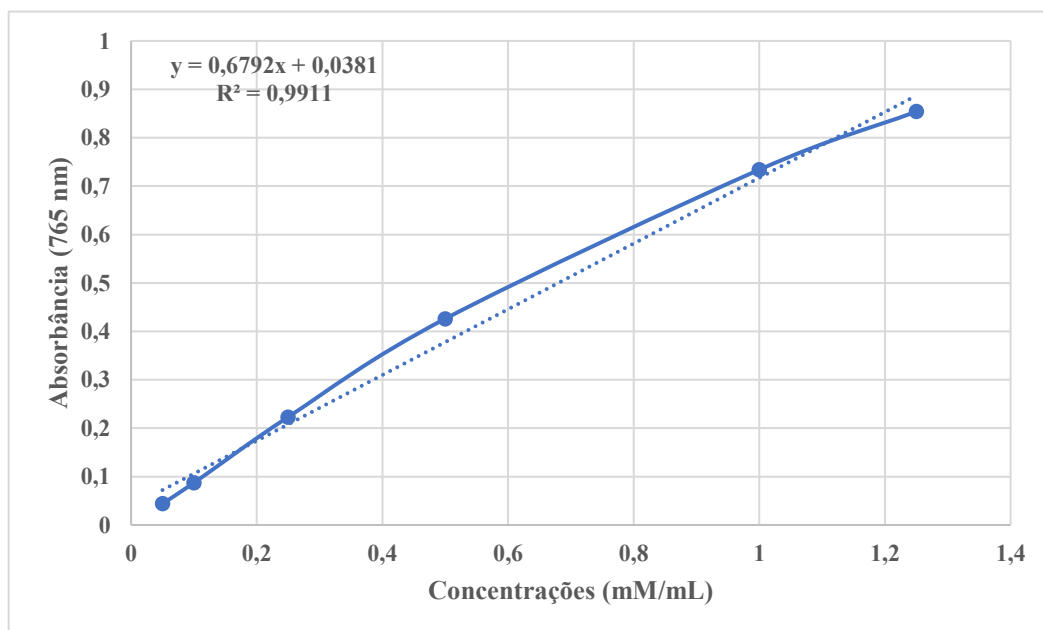
APÊNDICE 2 – CURVA PADRÃO DE CELULASES TOTAIS MEDINDO GLICOSE DE 1 A 7 MG/ML



APÊNDICE 3 – CURVA PADRÃO DE PECTINASE MEDINDO ÁCIDO GALACTURÔNICO DE 2000 A 700 $\mu\text{M}/\text{ML}$



**APÊNDICE 4 – CURVA PADRÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS MEDINDO
ÁCIDO GÁLICO DE 1,25 A 0,05 mM/ML**



APÊNDICE 5 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE CELULASES TOTAIS POR *T. VILLOSA* NA FORMA DE *PLUGS*

ANOVA; Var.: Celulases totais; R-sqr: ,99832; Adj: ,99161; 2**(7-4) design; MS Puro Erro: ,0001
DV: Celulases totais

	SS	df	MS	F	p
(1) Bagaço de uva (g/L)	0,003613	1	0,003613	36,1250	0,026583
(2) Bagaço de cana-de-açúcar (g/L)	0,021012	1	0,021012	210,1250	0,004725
(3) Borra de café (g/L)	0,000013	1	0,000013	0,1250	0,757464
(4) Casca de arroz (g/L)	0,016711	1	0,016711	167,1081	0,005931
(5) Aparas de papel (1x1 cm)	0,016711	1	0,016711	136,1250	0,007266
(6) Resíduo de terra diatomácea (g/L)	0,013613	1	0,013613	21,1250	0,044221
(7) Sulfato de cobre (mM)	0,002112	1	0,002112	595,1250	0,001676
1 por 2	0,017131	1	0,017131	171,3129	0,005787
Puro Erro	0,000200	2	0,000100		
Total SS	0,119255	10			

APÊNDICE 6 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE CELULASES TOTAIS POR *PYCNOPORUS* SP. NA FORMA DE *PLUGS*

ANOVA; Var.: Celulases totais; R-sqr: ,97253; Adj: ,86265; 2**(7-4) design; MS Puro Erro: ,003033
DV: Celulases totais

	SS	df	MS	F	p
(1) Bagaço de uva (g/L)	0,002113	1	0,002113	0,31530	0,630974
(2) Bagaço de cana-de-açúcar (g/L)	0,000613	1	0,000613	0,09142	0,790928
(3) Borra de café (g/L)	0,059513	1	0,059513	19,61951	0,047377
(4) Casca de arroz (g/L)	0,084545	1	0,084545	27,87203	0,034056
(5) Aparas de papel (1x1 cm)	0,000113	1	0,000113	0,01679	0,908755
(6) Resíduo de terra diatomácea (g/L)	0,003612	1	0,003612	0,53918	0,539192
(7) Sulfato de cobre (mM)	0,032513	1	0,032513	4,85261	0,158489
1 por 2	0,090639	1	0,090639	27,88107	0,031875
Puro Erro	0,006067	2	0,003033		
Total SS	0,220855	10			

**APÊNDICE 7 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO
DE PECTINASES POR *T. VILLOSA* NA FORMA DE *PLUGS***

ANOVA; Var.: Pectinases; R-sqr: ,99891; Adj: ,99456; 288(7-4) design; MS Puro Erro: ,0286333
DV: Pectinases

	SS	df	MS	F	p
(1) Bagaço de uva (g/L)	7,05001	1	7,05001	246,2170	0,004037
(2) Bagaço de cana-de-açúcar (g/L)	4,13281	1	4,13281	144,3357	0,006857
(3) Borra de café (g/L)	2,86801	1	2,86801	100,1634	0,009837
(4) Casca de arroz (g/L)	9,79274	1	9,79274	342,0049	0,002911
(5) Aparas de papel (1x1 cm)	2,63351	1	2,63351	91,9737	0,010699
(6) Resíduo de terra diatomácea (g/L)	2,77301	1	2,77301	96,8456	0,010168
(7) Sulfato de cobre (mM)	21,41851	1	21,41851	748,0272	0,001334
1 por 2	9,77178	1	9,77178	341,2728	0,002917
Puro Erro	0,05727	2	0,02863		
Total SS	52,65649	10			

**APÊNDICE 8 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO
DE PECTINASES POR *PYCNOPORUS* SP. NA FORMA DE *PLUGS***

ANOVA; Var.: Pectinases; R-sqr: ,99891; Adj: ,99891; 2**(7-4) design; MS Pure Error: ,0286333
DV: Pectinases

	SS	df	MS	F	p
(1) Bagaço de uva (g/L)	0,00451	1	0,00451	0,0346	0869601
(2) Bagaço de cana-de-açúcar (g/L)	0,15401	1	0,15401	1,1808	0,390720
(3) Borra de café (g/L)	25,31161	1	25,31161	194,0579	0,005114
(4) Casca de arroz (g/L)	50,71022	1	50,71022	388,7827	0,002562
(5) Aparas de papel (1x1 cm)	0,51511	1	0,51511	3,9492	0,185247
(6) Resíduo de terra diatomácea (g/L)	0,15401	1	0,15401	1,1808	0,390720
(7) Sulfato de cobre (mM)	8,34361	1	8,34361	63,9684	0,015275
1 por 2	53,11610	1	53,11610	407,2280	0,002447
Puro Erro	0,26087	2	0,13043		
Total SS	92,29949	10			

APÊNDICE 9 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE LACASES POR *T. VILLOSA* NA FORMA DE *PLUGS*

ANOVA; Var.: Lacases; R-sqr: ,99677; Adj: ,98385; 2**(7-4) design; MS Puro Erro: 690,2113 DV: Lacases

	SS	df	MS	F	p
(1) Bagaço de uva (g/L)	8121,8	1	8121,8	11,7671	0,075486
(2) Bagaço de cana-de-açúcar (g/L)	10814,8	1	10814,8	15,6688	0,058296
(3) Borra de café (g/L)	13490,7	1	13490,7	19,5457	0,047543
(4) Casca de arroz (g/L)	1588,8	1	1588,8	2,3018	0,268507
(5) Aparas de papel (1x1 cm)	93130,6	1	93130,6	134,9306	0,007330
(6) Resíduo de terra diatomácea (g/L)	115699,7	1	115699,7	167,6295	0,005913
(7) Sulfato de cobre (mM)	83869,7	1	83869,7	121,5131	0,008129
1 por 2	3369,4	1	3369,4	4,8816	0,157758
Puro Erro	1380,4	2	690,2		
Total SS	427333,9	10			

APÊNDICE 10 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE LACASES POR *PYCNOPORUS* SP. NA FORMA DE *PLUGS*

ANOVA; Var.: Lacases; R-sqr: 1; Adj: 1; 2**(7-4) design; MS Puro Erro: ,0156 DV: Lacases					
	SS	df	MS	F	p
(1) Bagaço de uva (g/L)	9740,6	1	9740,6	624397	0,000002
(2) Bagaço de cana-de-açúcar (g/L)	5371,1	1	5371,1	344304	0,000003
(3) Borra de café (g/L)	384,3	1	384,3	24637	0,000041
(4) Casca de arroz (g/L)	16982,9	1	16982,9	1088650	0,000001
(5) Aparas de papel (1x1 cm)	1256,3	1	1256,3	80529	0,000012
(6) Resíduo de terra diatomácea (g/L)	3702,7	1	3702,7	237355	0,000004
(7) Sulfato de cobre (mM)	59915,1	1	59915,1	3840712	0,000000
1 por 2	18594,7	1	18594,7	1191965	0,000001
Puro Erro	0,0	2	0,02		
Total SS	110834,3	10			

**APÊNDICE 11 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO
DE AÇÚCARES REDUTORES POR *T. VILLOSA* NA FORMA DE *PLUGS***

ANOVA; Var.: Açúcares redutores; R-sqr: ,99776; Adj: ,98881; 2**(7-4) design; MS Puro Erro: ,7321
DV: Açúcares redutores

	SS	df	MS	F	p
(1) Grape pomace (g/L)	87,5826	1	87,5826	119,6320	0,008256
(2) Sugar cane bagasse (g/L)	51,8671	1	51,8671	70,8470	0,013823
(3) Spent coffee grounds	18,3315	1	18,3315	25,0396	0,037693
(4) Rice husk (g/L)	67,2856	1	67,2856	91,9076	0,010706
(5) Waste paper with ink (1x1 cm)	41,1778	1	41,1778	56,2462	0,017318
(6) Residual Diatomaceous earth (g/L)	35,3220	1	35,3220	48,2475	0,020104
(7) Copper sulfate (mM)	334,7578	1	334,7578	457,2569	0,002180
1 by 2	67,7006	1	67,7006	92,4746	0,010641
Pure Error	1,4642	2	0,7321		
Total SS	654,3217	10			

APÊNDICE 12 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES POR *PYCNOPORUS* SP. NA FORMA DE *PLUGS*

ANOVA; Var.: Açúcares redutores; R-sqr: ,98484; Adj: ,9242; 2**(7-4) design; MS Puro Erro: 12,6436 DV: Açúcares redutores

	SS	df	MS	F	p
(1) Bagaço de uva (g/L)	0,224	1	0,224	0,01780	0,906203
(2) Bagaço de cana-de-açúcar (g/L)	0,140	1	0,140	0,01110	0,925680
(3) Borra de café (g/L)	180,500	1	180,500	14,2760	0,063453
(4) Casca de arroz (g/L)	1236,797	1	1236,797	97,8200	0,010069
(5) Aparas de papel (1x1 cm)	6,372	1	6,372	0,50400	0,551358
(6) Resíduo de terra diatomácea (g/L)	0,312	1	0,312	0,02470	0,889593
(7) Sulfato de cobre (mM)	121,057	1	121,057	9,5746	0,090491
1 por 2	1279,233	1	1279,233	101,1763	0,009740
Puro Erro	25,287	2	12,644		
Total SS	1668,027	10			

APÊNDICE 13 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR *T. VILLOSA* NA FORMA DE *PLUGS*

ANOVA; Var.: Compostos fenólicos; R-sqr: ,99902; Adj: ,9951; 2**(7-4) design; MS Puro Erro: ,000028 DV: Compostos fenólicos

	SS	df	MS	F	p
(1) Bagaço de uva (g/L)	0,000561	1	0,000561	20,04020	0,046451
(2) Bagaço de cana-de-açúcar (g/L)	0,005565	1	0,005565	198,7545	0,004994
(3) Borra de café (g/L)	0,001431	1	0,001431	51,11160	0,019009
(4) Casca de arroz (g/L)	0,002979	1	0,002979	106,3933	0,009269
(5) Aparas de papel (1x1 cm)	0,011935	1	0,011935	426,2545	0,002338
(6) Resíduo de terra diatomácea (g/L)	0,007021	1	0,007021	250,7545	0,003964
(7) Sulfato de cobre (mM)	0,026106	1	0,026106	932,3616	0,001071
1 por 2	0,003025	1	0,003025	108,0294	0,009130
Puro Erro	0,000056	2	0,000028		
Total SS	0,057099	10			

APÊNDICE 14 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR *PYCNOPORUS* SP. NA FORMA DE *PLUGS*

ANOVA; Var.: Compostos Fenólicos; R-sqr: ,99509; Adj: ,97544; 2**(7-4) design; MS Puro Erro: ,000103 DV: Compostos fenólicos

	SS	df	MS	F	p
(1) Grape pomace (g/L)	0,001275	1	0,001275	12,3799	0,072144
(2) Sugar cane bagasse (g/L)	0,000003	1	0,000003	0,0303	0,877758
(3) Spent coffee grounds	0,021115	1	0,021115	205,0012	0,004843
(4) Rice husk (g/L)	0,008459	1	0,008459	82,1251	0,011959
(5) Waste paper with ink (1x1 cm)	0,002016	1	0,02016	19,5740	0,047479
(6) Residual Diatomaceous earth (g/L)	0,000003	1	0,000003	0,0303	0,877758
(7) Copper sulfate (mM)	0,001225	1	0,001225	11,8944	0,074766
1 by 2	0,009465	1	0,009465	91,8974	0,010707
Pure Error	0,000206	2	0,000103		
Total SS	0,041947	10			

**APÊNDICE 15 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA
PRODUÇÃO DE CELULASES TOTAIS POR *PYCNOPORUS* SP. NA FORMA DE
*PELLETS***

ANOVA; Var.: Celulases totais; R-sqr: ,97059; Ad:.85297 (2**(7-4) design); MS Puro Erro: ,0005333
DV: Celulases totais

	SS	df	MS	F	p
(1) Bagaço de uva (g/L)	0,010513	1	0,010513	19,71094	0,047172
(2) Bagaço de cana-de-açúcar (g/L)	0,002812	1	0,002812	5,27344	0,148515
(3) Borra de café (g/L)	0,007813	1	0,007813	14,64844	0,061987
(4) Casca de arroz (g/L)	0,008041	1	0,008041	15,07644	0,060383
(5) Aparas de papel (1x1 cm)	0,000013	1	0,000013	0,02344	0,892376
(6) Resíduo de terra diatomácea (g/L)	0,000012	1	0,000012	0,02344	0,892376
(7) Sulfato de cobre (mM)	0,000112	1	0,000112	0,21094	0,691121
1 por 2	0,008874	1	0,008874	16,63782	0,055177
Puro Erro	0,001067	2	0,000533		
Total SS	0,036273	10			

**APÊNDICE 16 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA
PRODUÇÃO DE PECTINASES POR *T. VILLOSA* NA FORMA DE *PELLETS***

ANOVA; Var.: Pectinase; R-sqr: ,97538; Adj: ,91792; 2**(7-4) design; MS Puro Erro: ,0142333 DV:

Pectinase

	SS	df	MS	F	p
(1) Bagaço de uva (g/L)	0,112812	1	0,112812	7,92594	0,106407
(2) Bagaço de cana-de-açúcar (g/L)	0,074113	1	0,074113	5,20697	0,150005
(3) Borra de café (g/L)	1,082610	1	1,082610	76,06161	0,012894
(4) Casca de arroz (g/L)	0,929191	1	0,929191	65,28271	0,014975
(5) Aparas de papel (1x1 cm)	0,148512	1	0,148512	10,43413	0,083947
(6) Resíduo de terra diatomácea (g/L)	0,118271	1	0,118271	8,309420	0,102223
(7) Sulfato de cobre (mM)	0,195313	1	0,195313	13,72219	0,065767
1 por 2	0,038529	1	0,038529	2,70699	0,241647
Puro Erro	0,028467	2	0,014233		
Total SS	2,720873	10			

**APÊNDICE 17 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA
PRODUÇÃO DE PECTINASES POR *PYCNOPORUS* SP. NA FORMA DE *PELLETS***

ANOVA; Var.: Pectinase; R-sqr: ,94606; Adj: 82018; 2**(7-4) design; MS Puro Erro: ,0105333 DV:

Pectinase

	SS	df	MS	F	p
(1) Bagaço de uva (g/L)	0,195313	1	0,195313	18,54233	0,049926
(2) Bagaço de cana-de-açúcar (g/L)	0,023112	1	0,023112	2,19422	0,276706
(3) Borra de café (g/L)	0,247430	1	0,247430	23,49024	0,040032
(4) Casca de arroz (g/L)	0,038687	1	0,038687	3,672810	0,195363
(5) Aparas de papel (1x1 cm)	0,003613	1	0,003613	0,34296	0,617406
(6) Resíduo de terra diatomácea (g/L)	0,002347	1	0,002347	0,22277	0,683420
(7) Sulfato de cobre (mM)	0,000612	1	0,000612	0,05815	0,831914
1 por 2	0,008051	1	0,008051	0,76430	0,474178
Puro Erro	0,021067	2	0,010533		
Total SS	0,539764	10			

**APÊNDICE 18 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA
PRODUÇÃO DE LACASES POR *T. VILLOSA* NA FORMA DE *PELLETS***

ANOVA; Var.: Lacase; R-sqr: ,99835; Adj: ,99173; 2**(7-4) design; MS Puro Erro: 1106,456 DV:

Lacase	SS	df	MS	F	p
(1) Bagaço de uva (g/L)	362854	1	362854,0	327,9425	0,003035
(2) Bagaço de cana-de-açúcar (g/L)	1062	1	1061,9	0,9597	0,430557
(3) Borra de café (g/L)	87845	1	87845,5	79,3935	0,012362
(4) Casca de arroz (g/L)	85716	1	85716,1	77,4690	0,012664
(5) Aparas de papel (1x1 cm)	38125	1	38125,3	34,4571	0,027816
(6) Resíduo de terra diatomácea (g/L)	160085	1	160085,6	144,6823	0,006841
(7) Sulfato de cobre (mM)	544691	1	544691,4	492,2847	0,002025
1 por 2	76849	1	76849,3	69,4554	0,014094
Puro Erro	2213	2	1106,5		
Total SS	1338570	10			

**APÊNDICE 19 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA
PRODUÇÃO DE LACASES POR *PYCNOPORUS* SP. NA FORMA DE *PELLETS***

ANOVA; Var.: Lacases; R-sqr: ,9903; Adj: 95152; 2**(7-4) design; MS Puro Erro: 485,9681 DV:

Lacases

	SS	df	MS	F	p
(1) Bagaço de uva (g/L)	5859,6	1	5859,57	12,05752	0,073864
(2) Bagaço de cana-de-açúcar (g/L)	19464,6	1	19464,63	40,05331	0,024069
(3) Borra de café (g/L)	31970,4	1	31970,35	65,78694	0,014863
(4) Casca de arroz (g/L)	6509,0	1	6508,96	13,39381	0,067220
(5) Aparas de papel (1x1 cm)	2416,2	1	2416,17	4,97186	0,155528
(6) Resíduo de terra diatomácea (g/L)	7192,2	1	7192,20	14,79974	0,061410
(7) Sulfato de cobre (mM)	2549,3	1	2549,34	5,24589	0,149129
1 por 2	5080,3	1	5080,35	10,45408	0,083807
Puro Erro	971,9	2	485,97		
Total SS	100231,8	10			

**APÊNDICE 20 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA
PRODUÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES POR *PYCNOPORUS* SP. NA FORMA
DE *PELLETS***

ANOVA; Var.: Açúcares redutores; R-sqr: ,99627; 2**(7-4) design; MS Puro Erro: ,1541333 DV:
Açúcares redutores

	SS	df	MS	F	p
(1) Bagaço de uva (g/L)	6,24811	1	6,24811	40,5371	0,023792
(2) Bagaço de cana-de-açúcar (g/L)	9,39611	1	9,39611	60,9609	0,016011
(3) Borra de café (g/L)	8,75711	1	8,75711	56,8152	0,017149
(4) Casca de arroz (g/L)	18,26069	1	18,26069	118,4734	0,008335
(5) Aparas de papel (1x1 cm)	0,13781	1	0,13,781	0,8941	0,444175
(6) Resíduo de terra diatomácea (g/L)	5,10401	1	5,10401	33,1143	0,028896
(7) Sulfato de cobre (mM)	1,91101	1	1,91101	12,3984	0,072047
1 por 2	21,06566	1	21,06566	136,6717	0,007237
Puro Erro	0,30827	2	0,15413		
Total SS	82,58202	10			

**APÊNDICE 21 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA
PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR *T. VILLOSA* NA FORMA DE
*PELLETS***

ANOVA; Var.: Açúcares redutores; R-sqr: ,983; Adj: ,94333; 2**(7-4) design; MS Puro Erro: ,000021
DV: Açúcares redutores

	SS	df	MS	F	p
(1) Bagaço de uva (g/L)	0,000925	1	0,000925	44,02381	0,039690
(2) Bagaço de cana-de-açúcar (g/L)	0,000392	1	0,000392	18,66667	0,086741
(3) Borra de café (g/L)	0,001079	1	0,001079	51,37322	0,034941
(4) Casca de arroz (g/L)	0,000534	1	0,000534	25,42852	0,801085
(5) Aparas de papel (1x1 cm)	0,000613	1	0,000613	29,16667	0,058173
(6) Resíduo de terra diatomácea (g/L)	0,000000	1	0,000000	0,01090	0,926376
(7) Sulfato de cobre (mM)	0,000112	1	0,000112	5,35714	0,146680
1 por 2	0,000021	1	0,000021	1,00590	0,421517
Puro Erro	0,000042	2	0,000021		
Total SS	0,003713	10			

**APÊNDICE 22 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DA
PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR *PYCNOPORUS* SP. NA FORMA
DE *PELLETS***

ANOVA; Var.: Compostos fenólicos; R-sqr: ,97103; Adj: ,85517; 2**(7-4) design; MS Puro Erro:
,000117 DV: Compostos fenólicos

	SS	df	MS	F	p
(1) Bagaço de uva (g/L)	0,002850	1	0,002850	24,36004	0,0398684
(2) Bagaço de cana-de-açúcar (g/L)	0,000741	1	0,000741	6,33440	0,128203
(3) Borra de café (g/L)	0,002278	1	0,002278	19,47115	0,047712
(4) Casca de arroz (g/L)	0,000337	1	0,000337	2,88424	0,231547
(5) Aparas de papel (1x1 cm)	0,001128	1	0,001128	9,64209	0,089940
(6) Resíduo de terra diatomácea (g/L)	0,000000	1	0,000000	0,00107	0,976894
(7) Sulfato de cobre (mM)	0,000300	1	0,000300	2,56517	0,250400
1 por 2	0,000301	1	0,000301	2,57079	0,250041
Puro Erro	0,000234	2	0,000117		
Total SS	0,008078	10			