



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL
CÂMPUS APUCARANA E LONDRINA



RENATO PINHEIRO DORTE

**INVESTIGAÇÃO DE FUNGOS LIGNINOLÍTICOS NA PRODUÇÃO DE
LACASE UTILIZANDO LIGNINA KRAFT E BORRA DE CAFÉ**

DISSERTAÇÃO

LONDRINA

2019

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL
CÂMPUS APUCARANA E LONDRINA**

RENATO PINHEIRO DORTE

**INVESTIGAÇÃO DE FUNGOS LIGNINOLÍTICOS NA PRODUÇÃO DE LACASE
UTILIZANDO LIGNINA KRAFT E BORRA DE CAFÉ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Câmpus Apucarana e Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Feijó de Souza Daniel;
Co-orientador: Prof. Dr. Robert F.H. Dekker.

**LONDRINA
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

D719i Dorte, Renato Pinheiro
Investigação de fungos ligninolíticos na produção de lacase utilizando
lignina kraft e borra de café / Renato Pinheiro Dorte. Londrina : [s.n], 2019.
74 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Prof.^aDr.^a Juliana Feijó de Souza
Coorientador: Prof. Dr. Robert F. H. Dekker

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Londrina, 2019.
Bibliografia: f. 63-74

1. Lacase. 2. Enzimas de Fungos. 3. Borra de Café. 4. Compostos
Aromáticos. I. Souza, Juliana Feijó de, orient. II. Dekker, Robert F. H.,
coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. V. Título.

CDD: 628



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Pró-reitora de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
Campus Apucarana/Londrina



TERMO DE APROVAÇÃO

INVESTIGAÇÃO DE FUNGOS LIGNINOLÍTICOS NA PRODUÇÃO DE LACASE UTILIZANDO LIGNINA KRAFT E BORRA DE CAFÉ

por

RENATO PINHEIRO DORTE

Dissertação de mestrado apresentada no dia 14 de março de 2019 como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Câmpus Apucarana/Londrina, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O Candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho Aprovado.

**Prof. Dra. Juliana Feijó de Souza Daniel
(UTFPR Campus Londrina)**

**Prof. Dra. Luciana Furlaneto-Maia
(UTFPR Campus Londrina)**

**Prof. Dra. Maria Inês Rezende
(UEL)**

**Profa. Dra. Alessandra Furtado da Silva
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental**

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

Talvez ainda possa descer da árvore e voltar ao oceano.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Eliana Pinheiro e José Dorte, meus avós Layde Gasparini Pinheiro e Benedicto Siqueira Pinheiro e meu irmão Diego Pinheiro Dorte. Sem o apoio de vocês seria impossível continuar.

A todas as amizades que fiz ao longo deste período que ajudaram a tornar a jornada mais suportável, agradeço ao Álvaro Parra, Sergio M. Hoyos, Victor Frederice, Isadora Koszma, Nathalia Trevisan, Paulo C. Gonçalves Vitória Padilha, Layla Oliveira, Vcitor Figueiredo, Jessica Araujo, Maria Clara Lopes e Nayara de Oliveira. Assim como meus amigos do Laboratório QuiMiBio, Igor Shiraishi, Karoline Moraes, Paula Consoli, Thais Berto, Ana L. Trzeciak, Beatriz Redondo, Gabriela Pardino, Antonio Vital e Rafael Dourado.

A todos meus amigos que moram e moraram comigo e os que sempre nos visitam, também dedico meu agradecimento especial: Daniel H. dos Santos, Jefferson Felix, Carlos Ferreira, Emanuel Marcondes, Angelo Maximiano e Lucas A. Barbosa.

Não posso deixar de agradecer imensamente a ajuda fundamental de minha companheira de luta Laurênia de Moraes Castro por ter me apoiado em todos os momentos bons e principalmente nos momentos difíceis que passei. Sem você eu não teria chegado até onde cheguei e por você não vou parar aqui.

E por fim dedico este trabalho a você que está lendo esta pesquisa, se não fosse pelo seu interesse nada disso poderia existir. Vamos lá, não estamos sozinhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Professora Dra. Juliana Feijó de Souza Daniel por todo o tempo e esforço dedicado a mim e a este projeto, a sua ajuda foi de grande relevância para a conclusão desta pesquisa.

Também agradeço ao meu co-orientador Professor Dr. Robert F.H. Dekker que me inspirou a executar esta pesquisa e me ajudou com todas as etapas deste trabalho, sem sua ajuda e experiência seria impossível finalizar esta pesquisa.

Agradeço imensamente a Professora Dra. Aneli Barbosa-Dekker que sempre quando possível pôde me auxiliar durante toda a realização desta pesquisa, sua ajuda foi fundamental.

Gostaria de agradecer a todos do laboratório LAMBA, especialmente a Professora Dra. Alane e Professora Dra. Luciana Furlaneto-Maia que sempre se dispuseram a tirar dúvidas e oferecer qualquer ajuda sempre quando necessário.

Também agradeço a todos os membros do laboratório LETA, por sempre me convidarem para seus trabalhos de campo o que permitiu que eu coletasse material para minha pesquisa.

Agradeço imensamente ao Professor Dr. Edson Fontes de Oliveira, por todo o apoio e amizade além de confiar a mim parte da responsabilidade de monitorar o curso de extensão ao Pantanal, o que me permitiu conhecer um pouco desse maravilhoso bioma.

À Professora Dra. Alessandra Furtado da Silva dedico meu agradecimento especial a todo seu apoio e sem seu aceite não poderia ser possível a participação neste programa de mestrado.

Aos Professores Dr. Orlando de Carvalho, Dr. Sidney Lourenco e Dr. Janksyn Bertozzi que sempre disponibilizaram seu tempo e equipamentos para auxiliar meus experimentos.

Aos profissionais que trabalham na UTFPR-Londrina Rafael, Erika e Seu Zé assim como os profissionais do laboratório Multiusuário Thalita e Marcão que sempre ajudaram direta e indiretamente em minha pesquisa.

A Cia. Cacique de Café Solúvel da cidade de Londrina/PR que gentilmente disponibilizou a borra de café utilizada neste estudo.

Agradeço à banca avaliadora da qualificação e defesa, suas sugestões e críticas só vieram a somar neste trabalho.

Agradeço a ajuda fundamental concedida pela Fundação Araucária que sem a bolsa de estudos oferecida seria muito difícil concluir esta pesquisa.

RESUMO

DORTE, Renato Pinheiro. **Investigação de fungos ligninolíticos na produção de lacase utilizando lignina Kraft e borra de café.** 2019. 91 folhas. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2019.

Atualmente somos totalmente dependentes de compostos aromáticos, pois através deles inúmeros produtos necessários ao nosso dia a dia como fármacos e polímeros são obtidos. Nesse sentido, a principal fonte destes compostos são os combustíveis fósseis, contudo estima-se que a extração desta matéria prima se tornará inviável no decorrer dos próximos cinquenta anos, porém a lignina é uma alternativa abundante encontrada na biomassa vegetal que, de maneira sustentável, pode substituir o petróleo. No entanto, embora haja abordagens químicas e físicas para a degradação deste composto como a polpação Kraft e pirólise, esses métodos geram muitos resíduos poluentes. Para isso, abordagens menos impactantes como o biorefinamento utilizando enzimas fúngicas são uma alternativa promissora frente a legislações rígidas e o esgotamento de recursos naturais. Este trabalho visou selecionar as melhores cepas fúngicas disponíveis em diferentes locais do município de Londrina e Maringá (PR) para produção enzimática e degradação de substrato contendo lignina Kraft. A partir de espécimes coletadas (madeiras e corpos de frutificação) os fungos foram isolados, e submetidos a um processo de triagem, avaliando a taxa de crescimento dos fungos, alteração da cor do meio de cultivo e densidade bidimensional. O isolado com melhor resultado (JUMAD 054) foi selecionado para as etapas seguintes de cultivo. Além deste, o fungo *B. rhodina* foi selecionado como parâmetro para produção de lacase. O cultivo submerso (CSm) envolveu um meio líquido contendo lignina Kraft e sais mínimos de Vogel. Após um período de incubação de 15 dias obteve-se um extrato livre de células (ELC) que foi quantificado por oxidação utilizando o ácido 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic) (ABTS), contudo não foi possível obter atividade enzimática nos parâmetros de análise e cultivo realizados para o isolado JUMAD 054 e *Botryosphaeria rhodina*. O cultivo em estado sólido (CES) contendo borra de café, lignina Kraft e sais mínimos de Vogel como substrato, avaliou o isolado JUMAD 054 assim como o fungo *B. rhodina* após um processo de melhoramento e incubação de 12 dias. Assim foi possível obter uma atividade máxima de 118,660 U/mL no quinto dia para o isolado JUMAD 054 e um pico máximo de atividade para o fungo *B. rhodina* de 745,746 U/mL. Baseado nos resultados obtidos, sugere-se a continuidade do estudo com a análise da influência de mais variáveis para o cultivo de fungos ligninolíticos utilizando-se borra de café para a obtenção de lacase.

Palavras-chave: biorefinamento; valorização; lignina; fungos ligninolíticos, compostos aromáticos.

ABSTRACT

DORTE, Renato Pinheiro. **Investigation of ligninolytic fungi in laccase production using kraft lignin and coffee grounds**. 2019. 91 p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental) – Federal Technology University of Paraná. Londrina, 2019.

The world is totally dependent upon aromatic chemicals, through which numerous industrial products necessary for our day-to-day living are provided, e.g., in pharmaceuticals, bulk chemicals for synthesis of other chemicals, etc.. Today the main source of aromatic chemicals are derived from fossil fuels. It is estimated that the extraction of petroleum will become impracticable over the next fifty years due to its depletion. Lignin is an abundant alternative resource in the form of plant biomass, which is only sustainable through plantation forests, or as by-product materials from plant biomass biorefineries. Such uses will preserve and keep native forests intact. Lignin is a natural biopolymer found in the cell wall of vascular plants, and is made up of aromatic (85%) and phenolic (15%) structures. Lignin is built up of repeat structures comprising phenyl-propane (C6-C3) residues. This work aims to select the best fungal species available in Londrina-PR and surrounding biotopes for enzymatic production and substrate degradation containing Kraft lignin. The collected fungi were isolated, and underwent a screening process, evaluating the rate of inhibition, color change of the culture medium and two-dimensional density. The isolate with the best results (JUMAD 054) went to the next stages of cultivation, besides including a strain previously donated to the laboratory to serve as a parameter of analysis of enzymatic activity, *Botryosphaeria rhodina*. The submerged culture involved a liquid medium containing Kraft lignin and Vogel salts, after an incubation period a free cell extract was obtained which was quantified by oxidation using 2,2'-Azino-bis (3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic) (ABTS), however, it was not possible to obtain enzymatic activity in the analysis and culture parameters performed for the selected fungus. Solid-state cultivation containing coffee grounds, Kraft lignin and Vogel salts as substrate after an optimization process and 12 days of incubation showed a maximum activity of 118.660 U/mL on day 5 for isolate JUMAD 054 and one peak activity for *B. rhodina* fungus of 745,746 U/mL. Based on the results obtained, we suggest the continuity of the study with the analysis of the influence of more variables for the cultivation of ligninolytic fungi using coffee grounds to obtain laccase.

Keywords: biorefining; valuation; lignin; lignolytic fungi, aromatic compounds.

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura da celulose. Fonte: KLEMM et al. (2005)	4
Figura 2 – Estrutura da hemicelulose. a) estrutura das xilanas; b) estrutura das glucomananas. Fonte: SJÖSTRÖM (1993).....	4
Figura 3 - Aproveitamento de biomassa lignocelulosica através de bioconvesão, visando agregar valor. Fonte: Adaptado de KUMAR; GAUTAM; DUTT (2016).....	5
Figura 4 – Ilustração do complexo estrutural da biomassa vegetal. Fonte: Adaptado de KHATTAB; WATANABE (2019).	6
Figura 5 - Monômeros principais que fazem parte da composição da lignina. Fonte: Adaptado de ABDELAZIZ et al. (2016).....	7
Figura 6 - Representação da estrutura da lignina Kraft em comparação com a lignina nativa, O grau de O-metilação na lignina Kraft pode ser até 19%. Fonte: LANCEFIELD et al. (2018).	11
Figura 7 - Fluxograma dos processos realizados neste estudo. Fonte: Autoria própria.	27
Figura 8 - (a) Imagem de frasco Castellani e (b) ilustração de Tubo de ensaio nos quais os fungos isolados foram mantidos. Fonte: Autoria própria.	28
Figura 9 - Crescimento do micélio fúngico para avaliação do crescimento dos microrganismos. Fonte: adaptado de BIROLI et al. (2014).	31
Figura 10 - Sequência de transformação das imagens obtidas das placas de Petri contendo o micélio fúngico até a obtenção da imagem bicromática, possibilitando assim o calculo da diferença de pixels. Fonte: Autoria própria.....	32
Figura 11 - Comparação entre a densidade obtida de (a) JUMAD 66 (37,86 %) com a densidade obtida de (b) JUMAD 054 (47,46 %) e como 9,6% de diferença na sua densidade é pouco nítida. Fonte: Autoria própria.....	49
Figura 12 - Placas contendo meio sólido com 0,3 % de lignina Kraft com os microrganismos que apresentaram maior densidade micelial: JUMAD 054 (a1, a2,	

a3), JUMAD 42 (b1, b2, b3), JUMAD 66 (c1, c2, c3) e *B.rhodina* (d1, d2, d3). Linhas 1 e 2 são processo de tratamento da imagem através do programa Corel Draw, onde a primeira é o ajuste de tamanho dentro da régua (círculo vermelho) e a segunda é a remoção da imagem externa à régua além do ajuste de brilho, contraste e intensidade. Linha 3 é o tratamento feito pelo programa ImageTool, onde é obtido a porcentagem de pixels brancos de cada placa (JUMAD 054 = 47,46 %, JUMAD 042 = 43,98 %, JUMAD 066 = 37,86 %, *B. rhodina* = 23,64 %). Fonte: Autoria própria...50

Figura 13 - Placas contendo meio sólido VOGEL + lignina Kraft destacando-se a alteração da cor do meio apresentado pelo isolado JUMAD 039 (a – coloração preta) e JUMAD 032 (b) e ausência de alteração da cor do meio pelo fungo *B. rhodina* (c). Fonte: Autoria própria.....51

Figura 14 - Atividade de lacase produzida pelo fungo referência *B. rhodina* em cultivo em estado sólido contendo borra de café como matriz sólida em um período de 12 dias.....56

Figura 15 - Atividade de lacase melhorada produzida pelo fungo referência *B. rhodina* em cultivo em estado sólido contendo borra de café como matriz sólida e meio nutriente VOGEL.59

Figura 16 - Atividade de lacase melhorada de acordo com o fungo *B. rhodina* e produzida pelo isolado fúngico JUMAD 054 em cultivo em estado sólido contendo borra de café como matriz sólida e meio nutriente VOGEL.....60

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Variação da porcentagem dos tipos de ligações encontradas nas madeiras de Madeiras maciass e madeiras duras.	8
Tabela 2 - Grupos funcionais da lignina (por 100 unidades de C ₆ -C ₃).....	9
Tabela 3 - Exemplos do uso da lignina Kraft.....	12
Tabela 4 - Fungos da podridão branca degradadores da lignina.....	15
Tabela 5 - Alguns exemplos de aplicações utilizando fungos em cultivo em estado sólido.....	22
Tabela 6 - Trabalhos realizados com borra de café como matriz de cultivo para fungos degradadores da lignina.	25
Tabela 7 - Meio liquido de Vogel (1956) em 750 mL de água destilada.	30
Tabela 8 - Meio nutriente Czapek-DOX em 1000 mL de água destilada.	36
Tabela 9 - Isolados obtidos de amostras de corpos de frutificação e fragmentos de madeiras em decomposição, local de obtenção dos isolados e coordenadas geográficas.....	41
Tabela 10 - Porcentagem da densidade micelial, inibição e alteração da cor do meio dos 25 microrganismos que apresentaram os melhores resultados durante o processo de triagem e o fungo <i>B. rhodina</i>	52
Tabela 11 - Atividade da lacase produzida pelo fungo <i>B. rhodina</i> em cultivo submerso contendo meio nutriente VOGEL e lignina Kraft (condição 1) e Atividade enzimática da lacase do fungo <i>B. rhodina</i> permanecendo dois dias em meio VOGEL com glicose para em seguida adicionar meio contendo VOGEL e lignina Kraft (Condição 2).....	54
Tabela 12 - Atividade enzimática do fungo referência <i>B. rhodina</i> em cultivo estado sólido utilizando borra de café e meio nutriente Czapek-Dox; borra de café e meio nutriente VOGEL.	57

Tabela 13 - Atividade enzimática do fungo referência <i>B. rhodina</i> em cultivo estado sólido utilizando borra de café e meio nutriente Czapek-Dox; borra de café e meio nutriente VOGEL.....	58
--	----

SUMÁRIO

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO	1
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 UTILIZAÇÃO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	3
2.2 LIGNINA: DEFINIÇÃO, COMPOSIÇÃO E APROVEITAMENTO.....	5
2.3 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DA LIGNINA	10
2.3.1 Lignina Kraft.....	10
2.3.2 Lignina sulfonada	13
2.3.3. Polpa de sódio (Soda-AQ)	14
2.4 FUNGOS DEGRADADORES DE LIGNINA.....	14
2.5 <i>Botryosphaeria rhodina</i>	16
2.6 ENZIMAS DEGRADADORAS DA BIOMASSA VEGETAL	17
2.6.1 Propriedades da enzima lacase	18
2.7 PROCESSOS FERMENTATIVOS NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	20
2.7.1 Fermentação submersa	20
2.7.2 Fermentação em estado sólido	21
2.8 UTILIZAÇÃO DA BORRA DE CAFÉ COMO SUBSTRATO.....	24
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4 METODOLOGIA	27
4.1 COLETA, ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS EM LABORATÓRIO.....	27
4.3 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	29
4.3.1 Lignina Kraft	29

4.3.2 Borra de café.....	29
4.4 SELEÇÃO DOS FUNGOS LIGNINOLÍTICOS EM MEIO SÓLIDO CONTENDO LIGNINA KRAFT	29
4.4.1 Determinação da taxa de crescimento	29
4.4.2 Determinação da densidade micelial.....	31
4.4.3 Avaliação da alteração da cor do meio	32
4.5 CULTIVO SUBMERSO	33
4.5.1 Reativação das cepas em meio sólido	33
4.5.2 Preparo da suspensão de hifas e realização do cultivo	33
4.5.3 Interrupção do cultivo submerso e obtenção do extrato livre de células. ...	34
4.6 CULTIVOS EM ESTADO SÓLIDO	35
4.6.1 Preparo do inóculo	35
4.6.2 Cultivos em estado sólido.	35
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LACASE	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 COLETA E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS	40
5.2 SELEÇÃO DOS FUNGOS LIGNINOLÍTICOS EM MEIO SÓLIDO CONTENDO LIGNINA KRAFT	48
5.2.1 Avaliação da taxa de inibição.....	48
5.2.2 Avaliação da densidade micelial	48
5.2.3 Avaliação da alteração da cor do meio	50
5.3 CULTIVO SUBMERSO	53
5.4 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO.....	56
6 CONCLUSÃO	62
7 REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, os processos industriais utilizaram diversas matérias primas para a produção de bens de consumo e conseqüentemente acabam produzindo os mais variados tipos de resíduos industriais. Entre eles, a indústria cafeeira sempre encontrou dificuldades no descarte de seus resíduos, como casca, polpa e borra de café. Já a indústria papelreira separa da madeira a celulose e gera uma grande quantidade de lignina através do processo de polpação Kraft. Uma alternativa encontrada para a destinação destes resíduos é a queima, contudo, este método oferece um menor poder calorífico do que de outras fontes de combustíveis. Além disso, a lignina presente nesses resíduos constitui a maior fonte de compostos fenólicos do reino vegetal. Esta matriz fenólica possui o potencial de ser biotransformada em novos compostos aromáticos, o que abre uma oportunidade para o desenvolvimento de novos compostos de importância médica, alimentícia ou de materiais com benefícios socioeconômicos e ambientais.

As técnicas químicas e físicas existentes para a degradação da lignina são a polpação Kraft e pirólise, porém estes métodos geram resíduos com significativos problemas ambientais quando realizado em larga escala e descartados de forma inadequada.

Por outro lado, ao longo de milhões de anos, microrganismos decompositores da biomassa vegetal como bactérias e fungos da podridão branca evoluíram em constante contato com as primeiras plantas terrestres, garantindo a esses microrganismos a capacidade de fragmentar ou mineralizar a lignina utilizando seu sistema enzimático.

Atualmente existe uma vasta diversidade de fungos pertencentes ao filo basidiomiceto e ascomiceto que apresentam um potencial de degradação da lignina. Em países como o Brasil, com uma extensa biodiversidade, a possibilidade de encontrar novos espécimes com potencial enzimático de degradação deste composto é elevada.

Com isso, uma alternativa inovadora e ambientalmente amigável é a utilização da borra de café como substrato para crescimento de microrganismos para a produção de enzimas ligninolíticas. Uma vez que esta é um dos resíduos mais comuns encontrados na indústria cafeeira e de grande quantidade de lignina de

difícil tratamento. Além disso, os compostos fenólicos e a lignina presentes na borra de café podem atuar como indutores de enzimas ligninolíticas.

No entanto, a utilização eficiente da lignina requer a despolimerização da estrutura ligninolítica em compostos fenólicos e aromáticos de baixo peso molecular, uma alternativa de aplicação inovadora para a valorização da lignina é utilizar a enzima lacase. A lacase é uma multi-cobre oxidase que atua diretamente na degradação de compostos fenólicos e não fenólicos.

O cultivo em estado sólido é uma opção para reutilização da borra de café para produção de uma gama variada de compostos incluindo as enzimas. Esses resíduos fornecem componentes estruturais (celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas) que podem viabilizar o desenvolvimento do microrganismo alvo.

O fungo *Botryosphaeria rhodina* possui potencial para aplicação ambiental devido à sua capacidade de produzir lacase, principalmente na presença de indutores, como o álcool veratrílico.

Com isso, este trabalho visa obter e selecionar novos isolados fúngicos com potencial na degradação da lignina Kraft e estudar a produção da enzima lacase usando a cultivo em estado sólido e o resíduo borra de café como substrato. O fungo *Botryosphaeria rhodina* e o isolado JUMAD 054 foram selecionados para a implementação da nova metodologia na matriz sólida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 UTILIZAÇÃO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica é toda matéria orgânica renovável de origem biológica que armazena energia solar na forma química podendo ser utilizada para abastecer processos bioenergéticos (NOCERA, 2017).

A quantidade de resíduos lignocelulósicos produzidos mundialmente resultantes da agricultura (palhas, cascas, sabugo de milho, bagaços de cana, etc.) e da agro-indústria (borra de café, palha de trigo, serragem de madeira, resíduos da indústria papelreira) e de outras fontes, está em torno de 150 bilhões de toneladas ano (DE JONG; GOSSELINK, 2014).

A biomassa lignocelulósica é constituída principalmente por três tipos de biopolímeros: celulose (30 a 60 %), hemiceluloses (20 a 40 %) e lignina (10 a 25 %), os quais estão unidos por ligações químicas covalentes e não covalentes (KUMAR; GAUTAM; DUTT, 2016). Constitui uma fonte renovável de energia e de outros produtos químicos, que ainda não estão sendo aproveitados adequadamente, visto que a grande maioria destes resíduos tem sido queimados globalmente (CHEN et al., 2018, CHEN; WAN, 2017, GILLET et al., 2017, SANCHEZ; DEMAIN, 2017, XIE; RAGAUSKAS; YUAN, 2016, ISIKGOR; BECER, 2015, PICART; DE MARÍA; SCHALLMEY, 2015, TEN; VERMERRIS, 2015, ZAKZESKI et al., 2010, JIA et al., 2010), ocasionando problemas ambientais. Mais da metade do carbono presente na biosfera encontra-se na forma de celulose, e, aproximadamente, 1 trilhão de toneladas são sintetizadas e degradadas a cada ano (MINTY; LIN, 2015).

A celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ é um homopolissacarídeo constituído por cadeias lineares de β -D-glucose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$, que estão vinculadas entre si por ligações de hidrogênio e formam as cadeias de celulose organizadas em microfibrilas, constituindo a forma cristalina da celulose *in natura* (Figura 1). As microfibrilas formam as fibras de celulose.

A celulose tem uma região organizada que é a parte cristalina, mais resistente a degradação; e uma outra parte amorfa (não muito organizada), mais facilmente degradável. As fibras de celulose estão imersas em uma matriz de hemiceluloses, lignina e pectina. A lignina e hemicelulose preenchem o espaço entre as microfibrilas

da parede celular na lamela media das plantas vasculares (KUMAR; GAUTAM; DUTT, 2016; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; AGBOR et al., 2011).

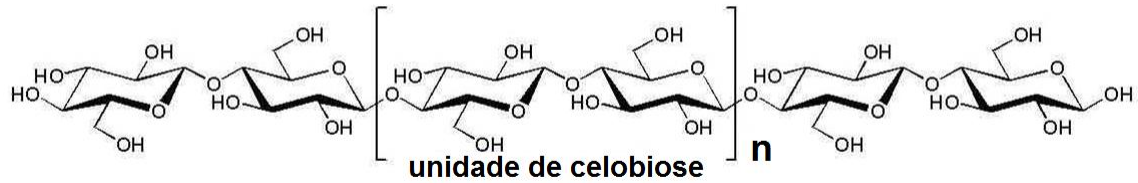


Figura 1 – Estrutura da celulose. Fonte: KLEMM et al. (2005)

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos ramificados constituídos por diferentes pentoses (D-xilose e L-arabinose) e hexoses (D-manose, D-galactose, D-glucose), sendo a xilose o monossacarídeo mais abundante (Figura 2) (JUTURU; WU, 2012). Existem diferentes tipos de hemiceluloses tais como são o xilanas, mananas, arabinanas e galactanas. As xilanas predominam entre as hemiceluloses e constitui o segundo polissacarídeo renovável mais abundante na natureza, ficando atrás somente da celulose e representa aproximadamente um terço de todo o carbono orgânico renovável do planeta (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

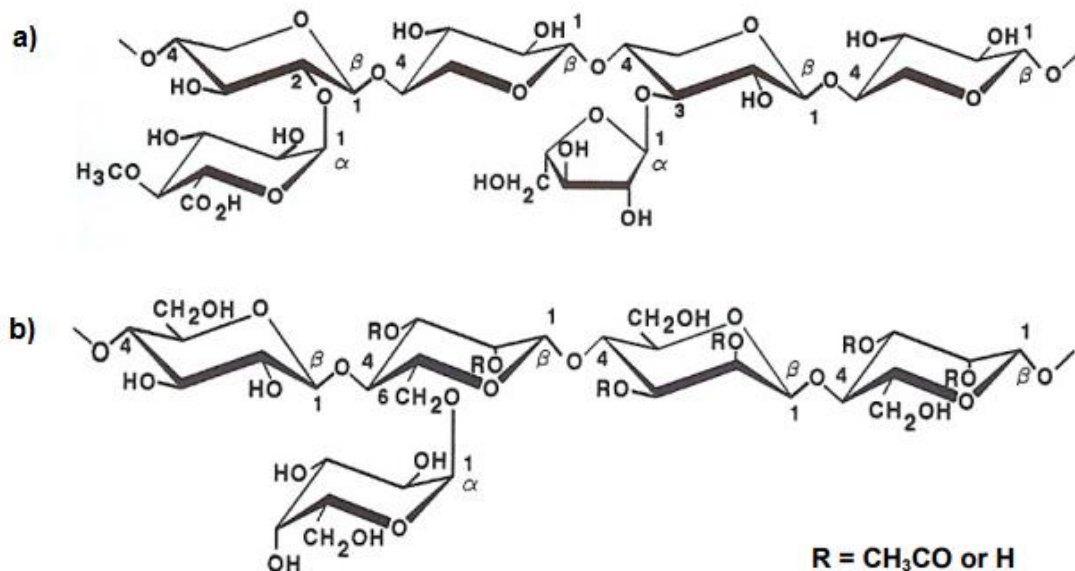


Figura 2 – Estrutura da hemicelulose. a) estrutura das xilanas; b) estrutura das glucomannanas. Fonte: SJÖSTRÖM (1993).

Na indústria, diversas vias de bioconversão podem ser utilizadas para o aproveitamento da biomassa vegetal, tais rotas podem ser observadas de forma sucinta na Figura 3.

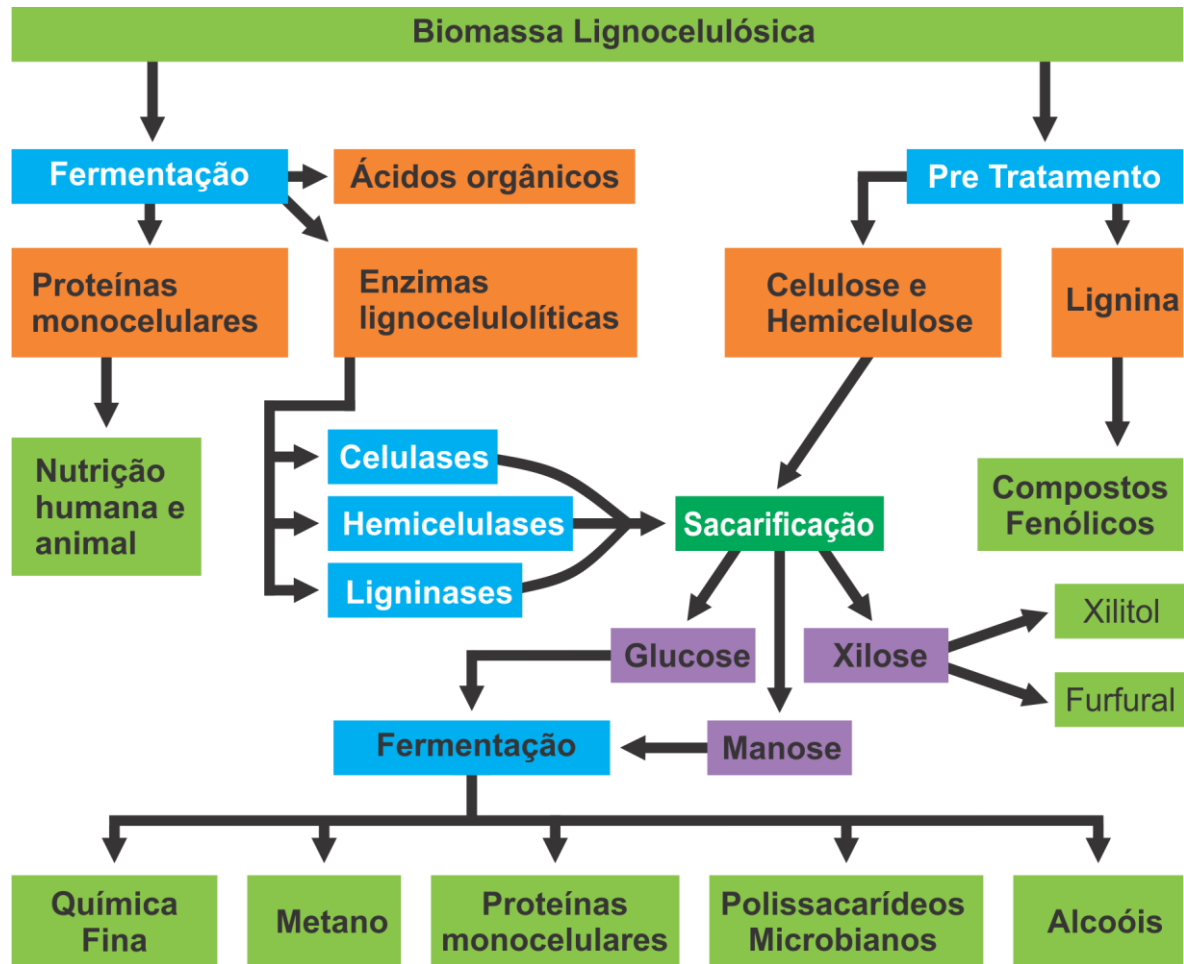


Figura 3 - Aproveitamento de biomassa lignocelulósica através de bioconversão, visando agregar valor. Fonte: Adaptado de KUMAR; GAUTAM; DUTT (2016).

Conforme citado anteriormente, a lignina constitui o um biopolímero muito importante dentro da biomassa lignocelulósica, e será descrita a seguir.

2.2 LIGNINA: DEFINIÇÃO, COMPOSIÇÃO E APROVEITAMENTO

O termo lignina foi introduzido por De Candolle em 1819 (apud Abdelaziz et al, 2016) e vem do Latim *Lignum* significando madeira. Este heteropolímero amorfo é o mais abundante na terra, depois da celulose (ABDELAZIZ et al., 2016), é ramificado ao acaso por unidades de fenilpropanois. Constitui um dos principais

componentes da biomassa vegetal, conjuntamente com a celulose e hemicelulose, sendo a maior fonte renovável de compostos fenólicos (DEVAPPA; RAKSHIT; DEKKER, 2015).

Nessa etapa cabe a ressalva sobre a diferença existente entre a lignina nativa e a lignina isolada, pois a estrutura e grupos funcionais podem ser modificados após sua extração e dependendo da fonte de lignina e das técnicas de isolamento utilizadas (HAO REN *et al.*, 2013).

Dessa forma a Figura 4 representa como a lignina nativa se relaciona com a celulose e a hemicelulose de forma intercalada nas paredes celulares das plantas:

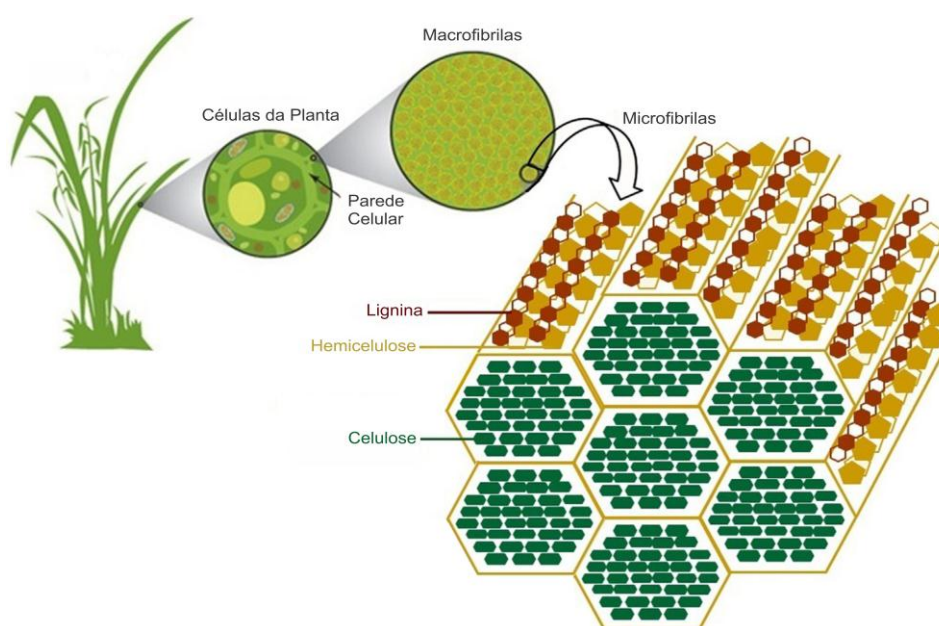


Figura 4 – Ilustração do complexo estrutural da biomassa vegetal. Fonte: Adaptado de KHATTAB; WATANABE (2019).

A lignina possui uma estrutura química irregular e ramificada, conferindo rigidez à parede celular e resistência a insetos e patógenos (ZAKZESKI *et al.*, 2010). Também protege contra os ataques químicos ou biológicos, visto que atua como um suporte estrutural às plantas (LU *et al.*, 2017)

A concentração da lignina nativa varia significativamente dentro dos diferentes grupos vegetais, uma grande fração deste biopolímero é encontrado nas madeiras das Gimnospermas (madeiras macias) e Angiospermas (madeiras duras) e pode variar de 25 a 32 % de sua biomassa seca dessas plantas (RAIS; ZIBEK, 2017).

Por sua vez, a estrutura da lignina é composta principalmente por unidades repetitivas de fenil-propano (C_6-C_3), cujos monômeros são compostos fenólicos de álcool *p*-coumarílico, coniferílico e sinapílico, conforme a Figura 5.

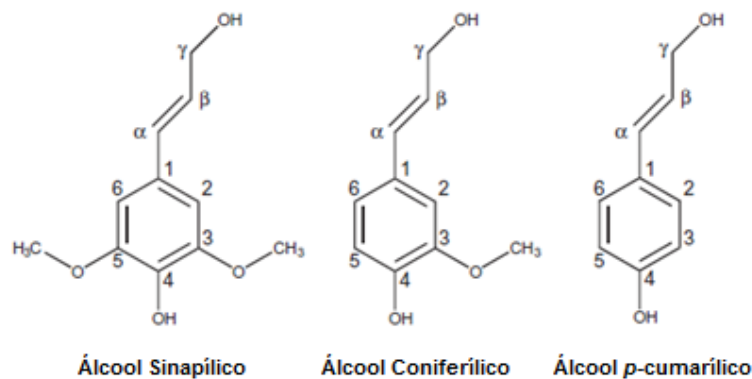


Figura 5 - Monômeros principais que fazem parte da composição da lignina. Fonte: Adaptado de ABDELAZIZ et al. (2016).

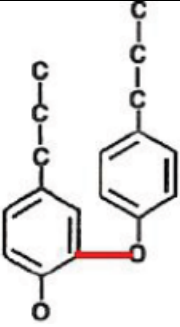
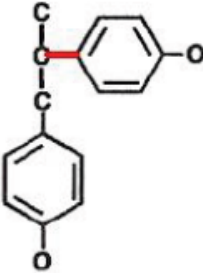
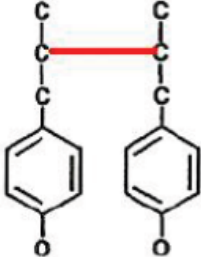
De acordo com Abdelaziz et al. (2016), estes monômeros estão conectados uns aos outros principalmente através de sete tipos de ligações: β -O-4, 5-5, β -5, β -1, α -O-4, 4-O-5 e β - β .

Assim como a proporção de lignina varia entre as diferentes espécies de plantas, a proporção dos monômeros que compõem a lignina nativa também varia dentro desses diferentes grupos. As madeiras macias são compostas principalmente de álcool coniferílico, enquanto que a lignina das madeiras duras contém álcoois coniferílico e sinapílico (DUVAL; LAWOKO, 2014). Os monômeros são unidos por diferentes ligações de forma aleatória (Tabela 1), resultando na formação de um biopolímero fenilpropanóide com alta resistência à despolimerização química e bioquímica (CHEN; WAN, 2017).

Os tipos de ligações dominantes entre os monômeros que compõem a lignina são a β -aril éter (β -O-4) como representado pela Tabela 1 (CHEN; WAN, 2017).

Tabela 1 - Variação da porcentagem dos tipos de ligações encontradas nas madeiras de Madeiras macias e madeiras duras.

Tipo de Ligação	Estrutura do Dímero	Porcentagem aproximada	
	Éter fenilpropano β -arílico	45-50	
β -O-4		Éter fenilpropano α -arílico	6-8
α -O-4		Fenilcoumaran	9-12
β -5		Bifenilo e dibenzodioxicina	18-25
5-5			

 <p>4-O-5</p>	Éter diaril	4-8
 <p>β-1</p>	1,2-diaril propano	7-10
 <p>β-β</p>	Estruturas ligadas a B-B	3

Fonte: Adaptado de CHRISTOPHER; YAO; JI (2014), CHAKAR; RAGAUSKAS (2004).

As unidades de fenilpropano da lignina são altamente metoxiladas (presença de grupos $\text{CH}_3\text{O}-$) na posição C-3 para as madeiras macias e C-3 e C-5 para as madeiras duras. O nível de metoxilação pode variar de conforme o tipo de madeira (Tabela 2) (CHRISTOPHER; YAO; JI, 2014).

Tabela 2 - Grupos funcionais da lignina (por 100 unidades de $\text{C}_6\text{-C}_3$).

Grupo funcional	Lignina de madeira macia (%)
Metoxi	90-95
Hidroxila fenólica	20-30
Hidroxila alifática	115-120
Carbonila	20

Fonte: CHAKAR; RAGAUSKAS (2004).

Na lignina Kraft mais de 50% das hidroxilas dos compostos aromáticos potencialmente reativos podem estar metoxiladas (HU et al., 2011). Isso é uma grande oportunidade para a exploração de lignina por meio de modificações químicas e biológicas, pois são grupos que estão disponíveis a modificações químicas ou biológicas (BASHTAN-KANDYBOVICH et al., 2012).

De modo geral a lignina nativa é constituída basicamente por 85% anéis aromáticos e 15% estruturas fenólicas. Com vários grupos funcionais contendo oxigênio em sua estrutura, e pode ser uma importante fonte de compostos aromáticos utilizados na indústria de medicamentos e alimentos (HAUPERT et al., 2012).

Para utilizar a lignina é necessário que ela passe por algum processo de extração e as três principais formas de extrair a lignina utilizada na indústria são mencionadas a seguir.

2.3 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DA LIGNINA

2.3.1 Lignina Kraft

A lignina Kraft vem do processo de polpatação Kraft. Esse nome decorre devido à força superior obtida pelo papel após esse processo (a palavra 'Kraft' tem origem na língua alemã significando 'Força'). A polpatação Kraft foi inventada por Carl F. Dahl em 1879 em Danzig, na Alemanha (BIERMANN, 1993) e em 1930, a recuperação e reutilização dos químicos inorgânicos utilizados durante o processo de polpatação só foi possível através da invenção da caldeira de recuperação por G. H. Tomlinson, permitindo reaproveitar grande parte dos reagentes empregados (SJÖSTRÖM, 1993), contudo a estrutura nativa da lignina acaba sofrendo alterações decorrentes deste processo (Figura 6).

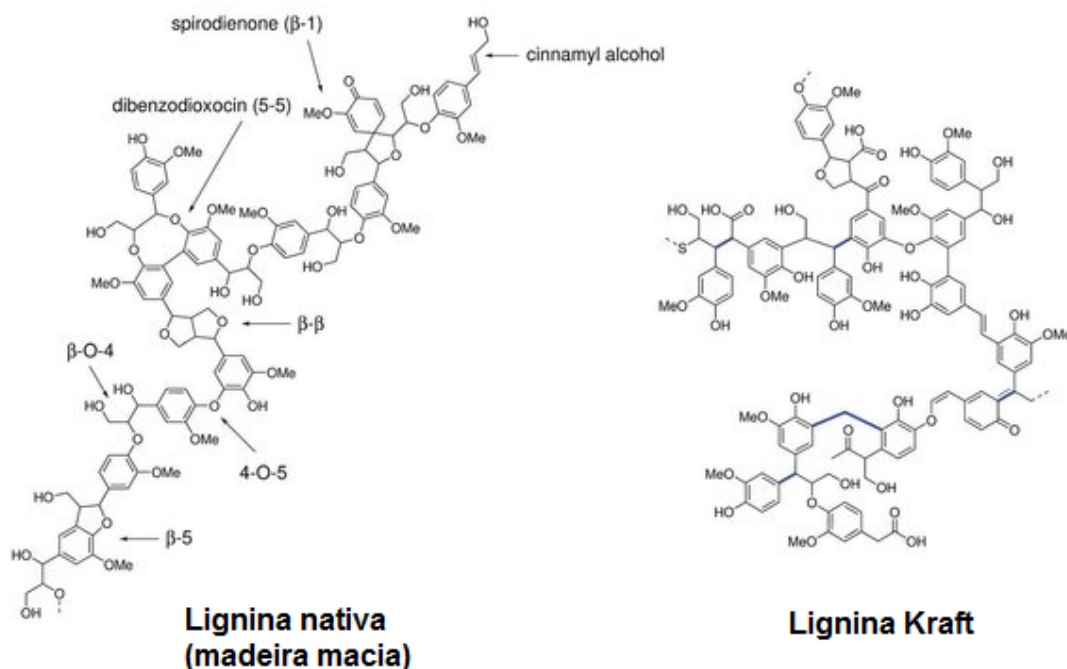


Figura 6 - Representação da estrutura da lignina Kraft em comparação com a lignina nativa, O grau de O-metilação na lignina Kraft pode ser até 19%. Fonte: LANCEFIELD et al. (2018).

Dessa forma, a lignina Kraft é o subproduto resultante do processo químico de polpação Kraft que vem sendo aplicado em cerca de 90% das indústrias papeleras ao redor do mundo devido a alta qualidade do produto final e capacidade de reaproveitamento dos reagentes químicos utilizados (SCHUTYSER et al., 2018), em geral o processo visa retirar o máximo de lignina da estrutura lignocelulósica deixando livre as microfibrilas de celulose e assim obter uma polpa de alta qualidade para viabilizar a produção de papel e outros produtos similares (CHAKAR; RAGAUSKAS, 2004).

A metodologia para a extração utilizando a polpação Kraft envolve primeiramente a fragmentação dos troncos de madeira em pequenas unidades chamadas de “chips”, que por sua vez é humidificada e pré-tratada com vapor, causando a expansão do ar contido no interior dos fragmentos. Logo após, ocorre a digestão por cozimento em alta temperatura e pressão dos chips pre-tratados pelo licor branco, constituído por uma solução aquosa de sulfeto de sódio (Na_2S) e hidróxido de sódio (NaOH) possibilitando a separação da lignina, hemicelulose e extrativos vegetais anteriormente ligados à celulose (USEPA, 1990). Após o cozimento é obtido um líquido chamado de licor negro, rico em lignina, compostos orgânicos provenientes da madeira, produtos químicos usados no processo de

digestão e água. Em seguida o licor é concentrado e queimado para a obtenção de energia na indústria (HARILA; KRIVILINNA, 1999).

Dessa forma, o licor negro é a principal fonte de lignina Kraft na indústria e esse subproduto tem grande potencial para aplicações biotecnológicas (BASHTAN-KANDYBOVICH et al., 2012), contudo devido ao grande potencial que a lignina Kraft oferece na obtenção de compostos com alto valor agregado, o processo de queima representa o desperdício de um valioso recurso.

Além da queima, a lignina Kraft pode ser separada do licor negro para propósitos de valorização deste subproduto através da precipitação ácida utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4) e dióxido de carbono (CO_2) para que o pH altamente alcalino da solução de licor negro baixe para pH 4.0 permitindo a precipitação da lignina. Possibilitando obter de maneira fácil a lignina através de filtração ou centrifugação (STRASSBERGER; TANASE; ROTHENBERG, 2014).

Durante o processo de cozimento a lignina Kraft se torna rica em grupos hidroxila devido principalmente a clivagens de ligações de éter arílico na lignina. As reações de condensação também colaboram para modificações na estrutura das ligninas dissolvidas e residuais. Essas condensações geralmente resultam na formação de ligações C-C e poucas ligações β -O-4. Contudo, devido ao uso de Na_2S , a lignina Kraft contém enxofre em pequenas quantidades, o que pode representar uma desvantagem para a funcionalização química, especialmente quando a catálise é necessária (CONSTANT et al., 2016, DUVAL; LAWOKO, 2014, AZADI et al., 2013, CHAKAR; RAGAUSKAS, 2004).

Sendo assim, a lignina é um subproduto que pode ter variadas aplicações (Tabela 3), porém, seu maior uso hoje é para obtenção de energia através de sua queima e apenas uma menor proporção é utilizada na indústria para outros fins (BASHTAN-KANDYBOVICH et al., 2012).

Tabela 3 - Exemplos do uso da lignina Kraft.

Uso Principal	Detalhes
Combustível (bioenergia)	Queima para a produção de energia após o processo de polpação Kraft
Aditivo para concreto	Com um efeito plastificante, o composto ligninolítico pode ser usado para

	aumentar a porosidade do concreto
Complemento alimentar animal	Usado para encapsular rações em “pellets”
Resinas e Adesivos	Lignina pode ser usada para substituir fenóis em vários tipos de adesivos e resinas
Produção de Vanilina	Vanilina pode ser obtida através do tratamento químico da lignina proveniente das coníferas
Produção de Químicos Aromáticos	Substitutos para os fenóis e outros
Gás Natural	Pode ser obtido gás natural da Lignina, no entanto sem sucesso comercial

Fonte: Adaptado de Abdelaziz et al. (2016)

2.3.2 Lignina sulfonada

A polpação sulfonada é o segundo processo químico mais importante de polpação, mas sua participação de mercado diminuiu drasticamente com a implementação do processo Kraft (<5%) por ser mais versátil e eficiente (ARO; FATEHI, 2017, SAAKE; LEHNEN, 2007).

A polpação de sulfonada pode ocorrer tanto em meios alcalinos quanto em pH neutro, ou condições acídicas, que são reguladas pela escolha dos sais (bi) sulfito. Independentemente do pH, as posições α -reativas são sulfonadas, levando a grupos benzil sulfonato (CALVO-FLORES et al., 2015, AZADI et al., 2013, BELGACEM; GANDINI, 2008).

A presença desses grupos sulfonatos aumenta a solubilidade da água, mesmo em pH baixo (ARO; FATEHI, 2017). O lignossulfonato resultante pode ser isolado, por exemplo, via ultrafiltração, extração ou precipitação e é geralmente obtida como um sal (Na^+ , NH_3^+ , Mg_2^+ , Ca_2^+) (SCHUTYSER et al., 2018). Os lignosulfonatos são tipicamente têm um maior teor de enxofre (4-8% em peso) em comparação com a lignina Kraft (ARO; FATEHI, 2017, MAGINA; MARQUES; EVTUGUIN, 2015, MARQUES et al., 2009).

2.3.3. Polpa de sódio (Soda-AQ)

O terceiro processo de polpação tradicional é a polpa de sódio. A diferença deste processo para o da polpação Kraft é a não utilização do sulfeto de sódio (Na_2S) (RINALDI et al., 2016). Devido à ausência de um nucleófilo forte, a despolimerização alcalina (NaOH) ocorre de forma menos eficiente, enquanto as reações concorrentes ocorrem em maior extensão. A polpa de sódio tem sido historicamente explorada para extrair lignina através de biomassas não lenhosas (palha, linho, cana-de-açúcar, etc.) (CALVO-FLORES et al., 2015, AZADI et al., 2013, SAAKE; LEHNEN, 2007).

A biomassa não lenhosa possui tipicamente um menor conteúdo de lignina, uma estrutura mais aberta e uma maior porção de ligações de éster alcali lábil. A eficiência deste método pode ser aumentada pela adição de antraquinona (AQ). A AQ promove a clivagem redutiva das ligações éter e simultaneamente limita a degradação dos carboidratos, operando como um “redox shuttle” (quinona-hidroquinona) (RAGNAR et al., 2014, FRANCIS et al., 2006). Uma grande vantagem da polpa de soda (-AQ) é a ausência de enxofre, em contraste com a lignina adquirida pelos processos anteriores e sulfonação além de ser tipicamente caracterizada por um baixo teor de ligações β -O-4 e poder ser isolada por precipitação (SCHUTYSER et al., 2018).

Contudo, na natureza existem organismos que através de processos enzimáticos podem separar e até biodegradar a lignina encontrada da matéria lignocelulósica com o objetivo de obter nutrientes necessários para seu metabolismo como bactérias e principalmente fungos (BUGG et al., 2011).

2.4 FUNGOS DEGRADADORES DE LIGNINA

A degradação da lignina tem sido estudada principalmente em basidiomicetos, classificados como fungos da podridão branca, devido à sua capacidade de degradar a lignina e hemicelulose, deixando apenas um material rico em celulose (que é de onde deriva o nome de podridão branca) e também existem os fungos basidiomicetos classificados como fungos da podridão marrom, que

degradam parcialmente a lignina dando preferencia aos polissacarídeos presentes na madeira (BRASIL, 2011, BUGG et al., 2011, FERNANDEZ-FUEYO et al., 2012)

Os fungos em geral são considerados eficientes produtores de enzimas degradadoras da lignina. Nestes organismos, três enzimas principais fazem parte de seu acervo ligninolítico: lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidase (SUKUMARAN; ABRAHAM; MATHEW, 2017).

Na literatura existem exemplos de diferentes gêneros com essa habilidade (GALAGAN et al., 2005; MARTINS et al., 2014; MARTINS et al., 2015, BERDY, 2005, MARTINEZ et al., 2004, TERAMOTO et al., 2004, SOLOMON et al., 1996 YANG et al., 2007) e as enzimas envolvidas assim como a porcentagem da degradação do substrato pode ser observado na tabela 4.

Tabela 4 - Fungos da podridão branca degradadores da lignina.

Fungo	Degradação		Referências
	da lignina (%)	Enzimas	
<i>Agaricus blazei</i>	-	Lacase	ULLRICH et al., 2005
<i>Anthracoxyllum discolour</i>	75	Manganês Peroxidase	ACEVEDO et al., 2011
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	100	-	BASHTAN-KANDYBOVICH et al., 2012;
	-	Lacase	DEKKER, BARBOSA, 2001
<i>CladosporiumBio-1</i>	35	Lacase	JIN, 2012
<i>Coriolus versicolor</i>	-	Lacase	KAWAI; UMEZAWA; HIGUCHI, 1988
	45,53	-	PANDEY; PITMAN, 2003
<i>Fusarium proliferatum</i>	19,6	-	REGALADO et al., 1997
<i>Lentinulae dodes</i>	18,39	-	ORIARAM; LABOSKY JR.; ROYSE, 1989
	18,39	-	ORIARAM; LABOSKY JR.; ROYSE, 1989
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	-	Lignina peroxidase	HIRATSUKA et al., 2005
	-	Lignina peroxidase	SHI et al., 2008
<i>Pleurotus ostreatus</i>	18,39	-	ORIARAM; LABOSKY JR.; ROYSE, 1989
<i>P. chrysogenum</i>	83,5	Lacase	RODRÍGUEZ et al., 1994

<i>Phellinus</i> sp.	36	MnP	ARUN, EYINI, 2011
<i>Trametes hirsuta</i>	-	Lacase	SHLEEV et al., 2004
	-	Lacase	SCHLOSSER; GREY; FRITSCHÉ, 1997
<i>Trametes versicolor</i>		Lacase	CASSLAND; JÖNSSON, 1999

* - (-) não citado.

Fonte: A autoria própria.

2.5 *Botryosphaeria rhodina*

O *B. rhodina* é um ascomiceto pertencente ao grupo Botryosphaeriaceae com comprovada capacidade de degradar e modificar por demetilação a lignina via produção de lacases ligninolíticas (BASHTAN-KANDYBOVICH et al., 2012, BARBOSA; DEKKER; HARDY, 1996). Esta espécie tem a capacidade de se desenvolver em uma grande variedade de compostos fenólicos (DEKKER, BARBOSA, 2001).

O gênero *Botryosphaeria* é constituído por fungos de hábitos endofíticos, habitando o interior de plantas, contudo tornam-se patogênicos quando a imunidade da planta baixa. Este fungo pode ser hospedeiro de uma ampla variedade de plantas agrícolas, florestais, ou outras de importância econômica e também ecológica, causando morte súbita dos galhos de árvores e raízes, assim como doenças em frutas antes do período da colheita (DEKKER et al 2007).

Os estudos de Vasconcelos et. al. (2000) mostraram que alguns compostos podem induzir ao aumento da atividade lacase deste fungo. O álcool veratrílico, adicionado ao meio de cultivo, elevou a produção de lacase em comparação ao meio sem a mesma (0,13 U/mL - 5,40 U/mL).

Rezende et al. (2005) avaliou a biodegradação do pesticida Scepter® contendo imazaquin como princípio ativo, utilizando o fungo *B. rhodina*. Este se desenvolveu na presença do herbicida, tanto em meio sólido como líquido. Através das análises cromatográficas foi constatada uma remoção de 80% do pesticida, demonstrando seu potencial biodegradador de compostos xenobióticos.

A lacase produzida por este microrganismo foi capaz de detoxificar pré-hidrolisados resultantes do tratamento hidrotérmico de fragmentos de álamo. Além

disso, compostos furânicos e fenólicos gerados a partir da degradação de hemicelulose e lignina foram reduzidos e removidos, e a remoção destes compostos foi bastante expressiva quando um mediador estava presente (VITHANAGE et al., 2015).

2.6 ENZIMAS DEGRADADORAS DA BIOMASSA VEGETAL

Como já mencionado, os fungos são organismos com capacidade para degradação de vários substratos devido ao seu grande acervo de enzimático que atua diretamente na celulose e hemicelulose, ramificações da hemicelulose e nas ligações entre a lignina e a celulose. Tal característica torna esses microrganismos, assim como suas enzimas alvo de estudos, devido a seu grande potencial em aplicações industriais (SWEENEY; XU, 2012).

As oxidases são frequentemente encontradas em microrganismos celulolíticos, em alguns casos em poucas quantidades, porém sua atuação é significativa juntamente com enzimas hidrolíticas participando do sistema oxidativo na degradação da lignocelulose (VANDEN WYMELENBERG et al., 2010). Como grande parte das enzimas oxidativas atuam na degradação de lignina, ela se torna um desafio para a conversão industrial da biomassa, pois ela não apenas aumentaria a acessibilidade da celulose e hemicelulose pelas enzimas, como também diminuiria a inibição enzimática causada por estas moléculas na etapa de hidrólise (JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

A lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase são as três enzimas mais importantes nos sistemas enzimáticos ligninolíticos (CHEN; SARKANEN; WANG, 2012, ZÁMOCKÝ; OBINGER, 2010, AGAPITO, 2007). São enzimas extracelulares com alto poder oxidativo, que capturam elétrons das moléculas de lignina, causando uma oxidação direta, já as lacases são multicobre oxidases que oxidam compostos fenólicos da lignina (BEY et al., 2011). Enquanto a lacase oxida diretamente os grupos fenólicos da lignina e indiretamente partes não fenólicas por auxílio de mediadores, a lignina peroxidase e manganês peroxidase oxidam diretamente as partes não fenólicas da lignina sem necessidade do auxílio de mediadores (SWEENEY; XU, 2012)

A lignina peroxidase oxida uma grande variedade de compostos aromáticos através do grupo heme em sua molécula além de ser capaz de atuar em compostos em que outras peroxidases não agem, clivando principalmente ligações C-C (CHEN; SARKANEN; WANG, 2012, HOFRICHTER et al., 2010, BACIOCCHI; FABBRI; LANZALUNGA, 2003).

A manganês peroxidase é capaz de oxidar compostos como o guaiacol, 2,6-dimetoxifenol, 4-metoxifenol, metil-hidroquinona, vermelho de fenol, e resíduos fenólicos em ligninas, mas não álcool veratrílico (RUBIA et al., 2002), ou subestruturas de lignina não fenólicas (HAMMEL; CULLEN, 2008).

A lacase (*p*-diphenol:dioxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) pertence a um grupo de enzimas chamadas polifenóis oxidases que contêm átomos de cobre no seu sítio ativo e são usualmente chamadas de oxidases de multicobre ou oxidases azuis. A lacase possui quatro átomos de cobre, um dos quais é responsável pela sua característica cor azul. Tipicamente, a catálise mediada por lacase ocorre com a redução do oxigênio para a água, acompanhada pela oxidação do substrato. As lacases são, portanto, oxidases que oxidam polifenóis (CANNATELLI; RAGAUSKAS, 2017, SHRADDHA et al., 2011).

2.6.1 Propriedades da enzima lacase

A lacase tem sido estudada desde o século XIX. Eles foram descobertas pela primeira vez na resina (laca) da árvore japonesa *Toxicodendron vernicifluum* (anteriormente *Rhus venicifera*), de qual o nome lacase foi tirado, mais tarde, foi demonstrado que as enzimas lacase eram amplamente distribuídas na natureza. Assim, a atividade desta enzima foi determinada em fungos, plantas superiores, bactérias e insetos (DWIVEDI et al., 2011; MESSERSCHMIDT; HUBER, 1990; KUNAMNENI, et al. 2007).

A primeira lacase bacteriana encontrada estava presente na *Azospirillum lipoferum* que vive nas raízes de plantas, em seguida as bactérias *Marinomonas mediterrânea*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Bacillus sphaericus* também apresentaram esta enzima (GIVAUDAN et al., 1993, CLAUS, 2004). A maioria das lacases bacterianas estudadas é intracelular, embora também existam lacases bacterianas extracelulares, Entre os fungos, lacases são particularmente abundantes

nos fungos da podridão branca que são os únicos organismos capazes de decompor os componentes da madeira em sua totalidade (RODRÍGUEZ-COUTO, 2018; SINGH ARORA; KUMAR SHARMA, 2010).

Os fungos que produzem lacase estão distribuídos nos filos Ascomycetos e Basidiomycetos, sendo particularmente abundantes em fungos de podridão branca e marrom que estão envolvidos no metabolismo de lignina (BRIJWANI; RIGDON; VADLANI, 2010). Como as lacases fúngicas possuem maior potencial redox (+800 mV) em comparação com plantas ou lacases bacterianas, estas estão sendo estudadas em diversas aplicações biotecnológicas, especialmente na degradação da lignina (ROSALES; RODRÍGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2007).

As lacases são codificadas por uma família de genes, cuja expressão pode ocorrer de forma constitutiva – normal ao metabolismo – ou indutiva – acentuada quando em condições apropriadas (KLONOWSKA et al. 2002). Usualmente a enzima origina-se no citoplasma e a ação sobre a lignina depende de sua secreção, entretanto, pouca atenção tem sido dada a tal mecanismo (MAYER; STAPLES 2002). Vale ressaltar que a produção da lacase por fungos é altamente afetada pelas condições do meio, como nutrientes, pH, temperatura e aeração (KAHRAMAN; GURDAL 2002).

Estas enzimas oxidam somente fenóis ou aminas aromáticas ou alifáticas com baixo potencial redox menor que elas mesmas (Ex.: <0,4 – 0,8V) ou pequenas o suficiente para entrar em seu sítio ativo (RODRÍGUEZ-COUTO, 2018). Contudo, com a ajuda de mediadores, atuam como aceptores de elétrons entre a lacase e o substrato alvo (FABBRINI; GALLI; GENTILI, 2002), fazendo com que a lacase possua a capacidade de oxidar um grande número de compostos que não são capazes de entrar em seus sítios ativos, por vezes até mesmo compostos não fenólicos que não são substratos naturais da lacase (D'ACUNZO; GALLI; MASCI, 2002; RODRÍGUEZ-COUTO, 2018). Tal característica, somada ao fato de que a lacase apenas necessita de oxigênio molecular comoceptor final de elétrons, configura a ela uma capacidade de oxidar uma grande variedade de substratos, contudo são incapazes de oxidar compostos com maior potencial redox, uma vez que a oxidação do substrato depende da diferença entre o potencial redox do substrato e o sítio ativo com átomo de cobre (SINGH ARORA; KUMAR SHARMA, 2010).

Devido à sua generalidade de ação, as lacases fúngicas são estudadas para diversas aplicações biotecnológicas industriais, dentre elas a transformação e degradação de lignina, produção de etanol, modificação de fibras da madeira, processamento alimentício, indústria têxtil, descoloração de corantes, síntese de produtos químicos e medicinais e bioremediação de solos e águas contaminadas (CANNATELLI; RAGAUSKAS, 2017, SINGH ARORA; KUMAR SHARMA, 2010, MAYER; STAPLES, 2002)

A atividade de lacases pode ser determinada por espectrofotometria, pelo monitoramento da coloração dos produtos de oxidação (BARBOSA; DEKKER; HARDY, 1996). A maioria dos testes utiliza guaiacol, 2,6-dimetoxifenol, siringaldazina ou o substrato sintético não fenólico ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico) (ABTS). Diferentemente dos substratos fenólicos, a oxidação do ABTS independe do pH e resulta na formação de um radical catiônico com coloração (ABTS•+) de alta estabilidade em solução (HOFER; SCHLOSSER, 1999).

Um exemplo do uso da lacase para a síntese orgânica de compostos é o trabalho da Schirmann et al. (2018) que realizou a síntese de três dímeros por acoplamento oxidativo via ligações C-C (dímeros I e II) e C-O (dímero III) a partir de 2,6-dimetoxifenol utilizando-se a lacase produzida pelo fungo *B. rhodina*.

Sobre a degradação de corantes os autores MA et al. (2014) conseguiram degradar o corante reativo laranja 16 em um efluente simulado da indústria têxtil, utilizando a lacase extraída de um fungo do gênero *Ganoderma*. Mais ainda, Levin et al. (2010) estudaram o efeito de diferentes fontes de nitrogênio e vitaminas na alteração da atividade enzimática e demonstraram como a lacase presente em alguns fungos estudados (*T. trogii*, *T. villosa* e *T. versicolor*) foi capaz de degradar o corante xylidine. Diorio et al. (2008) mostraram como o fungo *Trametes versicolor* foi capaz de degradar corante verde malaquita devido à ação da lacase.

2.7 PROCESSOS FERMENTATIVOS NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

2.7.1 Fermentação submersa

No cultivo submerso (CSm), ou do inglês SmF (Submerged Fermentation) o fungo ou bactéria se encontra suspenso em uma solução aquosa, sendo sua grande vantagem a possibilidade de agitação e controle do meio de cultura (GERVAIS; MOLIN, 2003). Neste o meio de cultivo os nutrientes e outros produtos estão dissolvidos na solução de forma homogênea, o garante um relativo controle do ritmo de crescimento do microrganismo alvo (MITCHELL; LONSANE, 1992).

Para Raimbault (1998) a facilidade de controlar e medir os parâmetros do meio de cultivo durante o processo fermentativo facilita o uso de organismos menos tolerantes a variáveis para este meio. Esta técnica fermentativa é melhor aplicada quando bactérias são os microrganismos alvo, por demandarem uma maior umidade de meio.

Além disso, o cultivo submerso oferece uma melhor difusão do microrganismo no meio e pode ser facilmente aplicável em larga escala, por outro lado esta técnica oferece algumas complicações, como sua complexidade operacional, alto consumo de energia e a grande produção de efluentes (DORIYA et al., 2016)

2.7.2 Fermentação em estado sólido

A origem do cultivo em estado sólido (CES) data da produção de pães no antigo Egito além de ser uma metodologia de cultivo utilizada desde a antiguidade em países Asiáticos (RAIMBAULT, 1998).

O cultivo em estado sólido, ou do inglês SSF (solid state fermentation) consiste no crescimento do organismo em uma matriz insolúvel com partículas solidas com pouca água, que permite o crescimento do microrganismo (PANDEY et al., 2000). Pode-se aplicar substratos naturais que fornecem energia para o organismo em cultivo ou matrizes inertes com o aditivo de solução nutrientes este método possui algumas outras vantagens em relação ao cultivo em estado sólido, como o tempo de cultivo ser mais curto e do CES ser aplicado somente para organismos que tolerem uma baixa umidade de meio (PANDEY, 2003).

A matriz deve conter umidade suficiente de forma a permitir o crescimento do microrganismo alvo. A quantidade máxima de umidade vai variar de acordo com a matriz utilizada devido à distintas propriedades de cada material na adsorção de água (MITCHELL et al., 2003).

O CES fornece diversas vantagens em relação a CSm, sendo a economia a que mais se destaca, dessa forma nos últimos anos aumentou sua utilização para a produção de inúmeros metabólitos de interesse comercial com resíduos agroindustriais como substrato (MATHEW *et al.*, 2016). Este tipo de processo de cultivo de microrganismos se torna financeiramente interessante para países com abundância de biomassa e resíduos agroindustriais, que podem ser usados como matérias-primas baratas (IFEANYI *et al.*, 2016) e como destaca a Tabela 5 existem diversas aplicações para os mais variados tipos de substratos a serem utilizados.

Tabela 5 - Alguns exemplos de aplicações utilizando fungos em cultivo em estado sólido.

MICROORGANISMO	APLICAÇÃO/ PRODUTO/ PROCESSO	SUBSTRATO	REFERÊNCIA
<i>Trichoderma reesei</i> e <i>Endomycopsis</i> <i>fibuliger</i>	Enriquecimento protéico	Palha de trigo	LAUKEVICS et al. (1984)
<i>Aspergillus niger</i>	Amiloglucosidase	Farelo de trigo e farinha de milho	GHILDYAL et al. (1985)
<i>Trichoderma reesei</i> e <i>Sporotrichum</i> <i>cellulophilum</i>	Celulase	Farelo de trigo	KIM et al. (1985)
<i>Phanerochaete</i> <i>chrysosporium</i>	Delignificação	Madeira de vidoeiro (bétula)	MUDGETT; PARADIS (1985)
<i>Bacillus licheniformis</i>	α -amilase	Farelo de trigo	LONSANE; RAMESH (1990)
<i>Trametes versicolor</i> e <i>Pleurotus ostreatus</i>	Delignificação	Palha de trigo	VALMASEDA et al. (1991)
<i>Schwanniomyces</i> <i>castellii</i>	Etanol	Meio líquido adsorvido em bagaço de cana	SAUCEDO- CASTAÑEDA et al. (1992a)
<i>Aspergillus niger</i>	Protease	Farelo de trigo	PADMANABH AN et al. (1993)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	β -galactosidade	Soro de leite desproteinado adsorvido em grits de milho ou farelo de trigo	BECERRA; GONZÁLEZ SISO (1996)
<i>Staphylococcus sp.</i> e <i>Kluyveromyces</i>	Inulinase	Farelos de arroz e trigo,	SELVAKUMA R; PANDEY

<i>marxianus</i>		bagaço de côco e farinha de milho	(1999)
<i>Gibberela fujikuroi</i>	Ácido giberélico	Meio líquido adsorvido em amberlite	GELMI et al. (2002)
<i>Aspergillus niger</i>	Ácido cítrico	Bagaço de mandioca	PRADO et al. (2004)
<i>Bacillus coagulans</i>	Xilanase	Fibra de soja	HECK et al. (2005)
<i>Flammulina velutipes</i>	Cogumelo Comestível	Cascas de café	LEIFA; PANDEY; SOCCOL (2001)
<i>Marasmiellus palmivorus</i>	Otimização da produção de lacase	Folhas de abacaxi	CHENTHAMA RAKSHAN et al. (2017)
<i>Neurospora crassa</i>	Produção de α - amilase	Borra de café	MURTHY; MADHAVAN NAIDU; SRINIVAS (2009)
<i>Aspergillus, Mucor, Penicillium purpurogenum e Neurospora crassa</i>	Remoção de compostos fenólicos	Borra de café	MACHADO et al. (2012)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Produção de LiP e MnP	Borra de café	NUGRAH; YUN (2013)

Fonte: Autoria própria.

Vários estudos destacam o cultivo em estado sólido com na produção de biocompostos quando comparado com o cultivo submerso. Outra grande vantagem deste tipo de cultivo em estado sólido em comparação com o cultivo submerso é o baixo custo operacional devido à utilização de compostos agroindustriais e agroindustriais. O baixo volume de água usado também é um importante fator econômico e ambiental (MUSSATO et al. 2012), o que pode vir a ter grande potencial para substituir, por exemplo o cultivo submerso nas indústrias, para a produção de metabólitos com interesse de mercado (ROBINSON et al., 2001).

No entanto, estes sistemas podem apresentar alguns problemas como o surgimento e gradientes de temperatura, umidade, oxigênio e nutrientes. Além disso, estes processos apresentam algumas desvantagens tais como: a utilização apenas de microrganismos que se desenvolvam em baixos níveis de umidade, dificuldades no controle e monitoramento dos parâmetros de cultivo, necessidade de elevadas

concentrações de inoculo, pré-tratamento do substrato e dificuldades no escalonamento do processo (PANDEY *et al.*, 2000; MITCHELL *et al.*, 2000).

2.8 UTILIZAÇÃO DA BORRA DE CAFÉ COMO SUBSTRATO

Das várias espécies do gênero *Coffea*, apenas *C. arabica* e *C. canephora* var. *robusta* são cultivados para produção comercial. Eles são comumente referidos como Arábica e Robusta, sendo que o primeiro representa 70% e 75% da produção total (WINTGENS, 2012).

Ultimamente o café tem sido a segunda maior *commodity* na bolsa de valores após o petróleo, e a elevada demanda por seu uso gera uma grande quantidade de resíduos (GIROTTI *et al.*, 2017).

A borra de café é um resíduo sólido gerado após a extração com água quente a qual são submetidos os grãos de café torrados e moídos ou o resíduo sólido gerado no processo de produção industrial do café solúvel (BRAVO *et al.*, 2011). É estimado que a cada 1000 kg de café processado, 650 kg de borra de café é gerado como resíduo, e para cada 1 kg de café solúvel produzido, 2 kg desse mesmo resíduo é obtido (MURTHY; MADHAVA NAIDU, 2012).

A destinação dessa quantidade de resíduo gera preocupação com a disposição ou reutilização da borra de café decorrente da sua característica altamente poluente (CRUZ *et al.*, 2012). Se descartado no meio ambiente, a borra de café apresenta um grande risco de contaminação, pois contém cafeína, taninos e polifenóis (MURTHY; MADHAVA NAIDU, 2012).

A característica que mais se evidencia na borra de café é o elevado teor de umidade adquirido no processo de extração industrial que em alguns casos chega a 70%. Após a extração do café solúvel, a borra de café possui em média 45,3 % de carboidratos totais, de 12 a 15 % de lipídeos, 13% de proteínas e 1 % de compostos fenólicos (MUSSATTO *et al.*, 2011).

Quanto aos polissacarídeos, é possível encontrar uma significativa fonte de galactomananas, arabinogalactanas e celulose (BALLESTEROS; TEIXEIRA; MUSSATTO, 2017) e mesmo após a preparação do café solúvel, 70% do total de seus polissacarídeos permanecem na borra de café (ARYA; RAO, 2007).

Nos estudos de Pujol et al. (2013) a quantidade de lignina em sua estrutura chega a 20%.

A borra de café é um resíduo agroindustrial abundante formado principalmente durante a produção de café em pó (ROUSSOS et al., 1995). Neste estudo demonstrou-se sua aplicabilidade para a produção enzimática de lacase. O mesmo também ocorreu em outros trabalhos utilizando a borra de café e gerando uma significativa atividade (Tabela 19).

Tabela 6 - Trabalhos realizados com borra de café como matriz de cultivo para fungos degradadores da lignina.

Autor	Enzima	Atividade	Fungo
PANDEY et al. (2000)	-	-	-
PARANI; EYINI (2012)	Lacase	5,53 U/mL	<i>Pleurotus eous</i>
NUGRAHA; YUN (2013)	LiP	0.9 U/mL;	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
	MnP	0.11 U/mL;	
	Lacase	5.87 U/mL	
MACHADO et al. (2012)	-	-	<i>Aspergillus sp; Mucor sp; Penicillium sp; Neurospora sp</i>
MURTHY; MADHAVA NAIDU; SRINIVAS (2009)	Amilase	3908 U/g	<i>Neurospora crassa</i>
CHENTHAMARAKSHAN et al. (2017)	Lacase	667.4 U/mL	<i>Marasmiellus palmivorus</i>
LEIFA; PANDEY; SOCCOL (2001)	-	-	<i>Flammulina velutipes</i>

Fonte: A autoria própria.

Dessa forma, devido à grande concentração de polissacarídeos, aminoácidos e polifenóis na borra de café além de seu baixo custo de obtenção, fazem desse resíduo um bom candidato a degradações biológicas, pois há uma necessidade urgente de idéias práticas e inovadoras para explorar todo o potencial sustentável de resíduos agroindustriais, como a borra de café (CAMPOS-VEGA et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar isolados com potencial de degradação da lignina e implementar uma alternativa para o reaproveitamento da borra de café como matriz no cultivo em estado sólido para a produção de lacase.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar novas linhagens fúngicas a partir de madeiras em decomposição;
- b) Avaliar a produção de lacase do fungo *Botryosphaeria rhodina* na presença de meio nutriente Vogel e lignina Kraft utilizada no cultivo submerso e em cultivo em estado sólido;
- c) Desenvolvimento de uma metodologia para utilização da borra de café como substrato para produção enzimática de lacase.

4 METODOLOGIA

A Figura 7 exibe o fluxograma das etapas realizadas neste estudo, desde a coleta do material para isolamento dos fungos, a seleção dos microrganismos, os cultivos em meio líquido e em meio sólido e a avaliação da atividade de lacase.

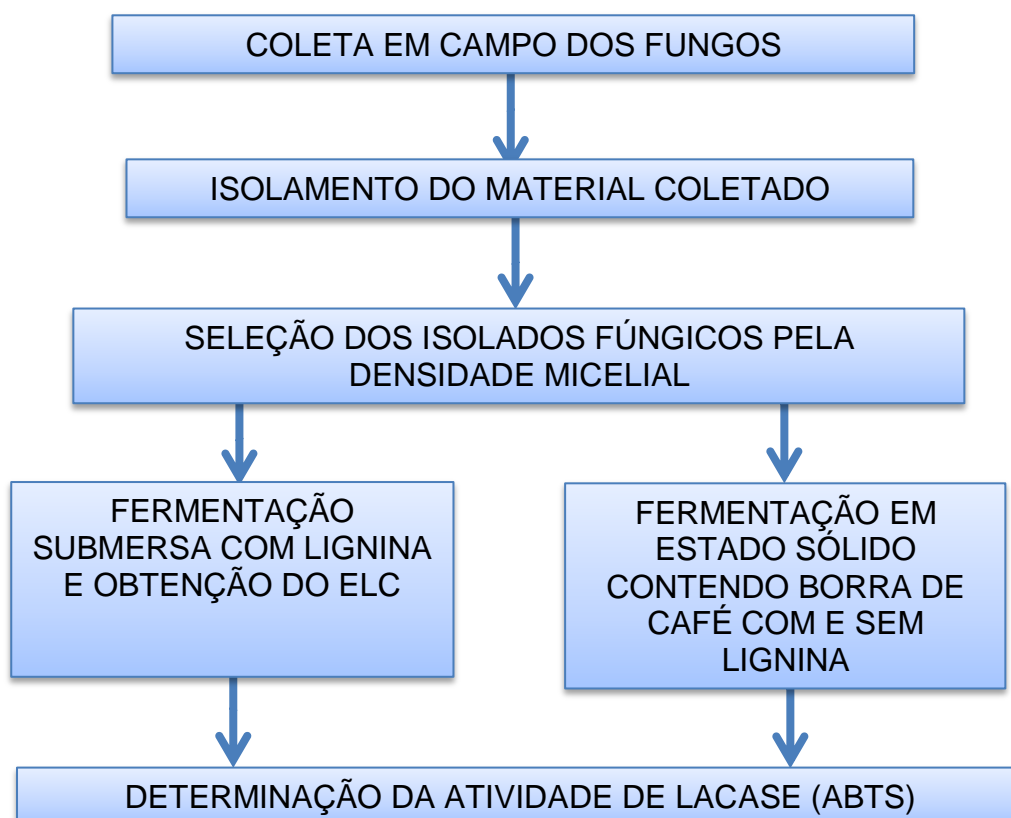


Figura 7 - Fluxograma dos processos realizados neste estudo. Fonte: Autoria própria.

4.1 COLETA, ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS EM LABORATÓRIO

Os isolados fúngicos utilizados neste trabalho, foram coletados em oito locais do estado do Paraná, majoritariamente nos municípios de Londrina, Maringá e um organismo obtido em Caiobá. As coordenadas dos locais foram obtidas pelo GPS Garmin eTrex HC Series®. A coleta priorizou apenas o basidiocarpo e ascocarpos de fungos sobre matéria vegetal em decomposição como troncos e folhas considerados fungos da podridão branca e marrom (BARRASA, 2014).

No campo, os espécimes foram coletados manualmente com auxílio de estilete e canivetes e acondicionados em sacos plásticos devidamente etiquetados para o transporte até o laboratório. Vale mencionar que foram fotografadas imagens dos microrganismos (*in situ*) utilizando réguas como escalas visando uma posterior identificação morfológica.

O fungo ascomiceto *B. rhodina* foi isolado de um cancro de eucalipto e selecionado como ligninolítico por possuir comprovada capacidade de produção de lacase por BARBOSA; DEKKER; HARDY (1996) e para esta pesquisa foi gentilmente cedido pela Professora Dra. Aneli Barbosa-Dekker.

O isolamento foi realizado retirando-se um pequeno fragmento do basidiocarpo e submetendo-o a uma assepsia externa com álcool 70 %, hipoclorito de sódio e água estéril, respectivamente. Em seguida os respectivos fragmentos foram inoculados em meio sólido contendo meio Batata, Dextrose e Agar (BDA) (Kasvi®) e Extrato de Malte e Ágar (MEA) (Kasvi®) e incubados durante 4 dias à 28 °C. Os isolados foram transferidos sucessivamente para meios BDA e MEA até a obtenção de colônias puras (HERNÁNDEZ-LUNA et al. 2007; EMBRAPA, 2011).

Os isolados foram mantidos em tubos de ensaio com meio sólido inclinado, meio de BDA junto ao qual foi adicionado óleo mineral de forma a manter os esporos fúngicos viáveis (RODRIGUES; LÍRIO; LACAZ, 1992). Para a manutenção permanente, plugs (discos) de 5 mm cobertos de hifas de cada cepa foram transferidos para água destilada esterilizada, conforme descrito por Castellani (1967) (Figura 8). Todos os isolados foram mantidos na micoteca do laboratório QuiMiBio com a codificação JUMAD (referentes a fungos degradadores de madeira), mais o número para a ordem de cada exemplar coletado.



Figura 8 - (a) Imagem de frasco Castellani e (b) ilustração de Tubo de ensaio nos quais os fungos isolados foram mantidos. Fonte: Autoria própria.

4.3 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

4.3.1 Lignina Kraft

A lignina utilizada neste trabalho foi obtida de um processo de polpação Kraft de gimnospermas em uma indústria papeleira

4.3.2 Borra de café

A borra de café foi obtida da extração de sólidos solúveis para a produção de café solúvel, que foi gentilmente cedida pela Cia. Caciue de Café Solúvel – Londrina/PR.

Em laboratório a secagem da borra foi realizada pela sua distribuição uniforme em bandeja e levada à estufa em temperatura de 70 °C. Duas vezes ao dia durante dois dias a borra de café foi revolvida para acelerar o processo de secagem. Este processo era dado como concluído até que o peso da borra se estabilizasse. O material foi acondicionado em embalagens plásticas seladas a vácuo e armazenados em geladeira a temperatura de 4 °C.

4.4 SELEÇÃO DOS FUNGOS LIGNINOLÍTICOS EM MEIO SÓLIDO CONTENDO LIGNINA KRAFT

4.4.1 Determinação da taxa de crescimento

Para a determinação da taxa de crescimento foi utilizado um pré inoculo com 20 mL de meio sólido contendo meio mínimo de sais Vogel (VOGEL, 1956), Dextrose e Ágar (VGA) para oferecer um melhor controle dos elementos presentes no meio de cultivo.

Este meio mínimo de sais, descrito por Vogel foi utilizado como meio basal para desenvolvimento dos cultivos foi preparado e concentrado em uma solução 50x para estocagem e diluído na hora do preparo. Os constituintes do meio de Vogel estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - Meio líquido de Vogel (1956) em 750 mL de água destilada.

COMPOSTO	QUANTIDADE
Citrato de sódio (5H ₂ O)	150 g
KH ₂ PO ₄ anidro	250 g
NH ₄ NO ₃ anidro	100 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	10 g
CaCl ₂ .2 H ₂ O	5 g
Elementos traços*	5 mL
Solução de Biotina	2,5 mL

*Solução de elementos traços foi constituída de:

Ácido cítrico (H₂O) – 5 g

ZnSO₄.7H₂O – 5 g

Fe(NH₄)(SO₄).6H₂O – 1 g

CuSO₄.5H₂O – 0,25 g

MnSO₄.H₂O – 0,25 g

H₃BO₃ anidro – 0,05 g

Na₂MoO₄.2H₂O – 0,05 g

Em seguida, um plug com 5 mm de diâmetro foi retirado da periferia das placas do pré-inoculo contendo micélio e inoculado em novas placas de Petri com 90 mm de diâmetro com meio de cultura sólido de Vogel (VOGEL e ágar) contendo 0,3% de Lignina Kraft como única fonte de carbono (HERNÁNDEZ-LUNA et al. 2007):

Durante um período de sete dias em BOD à 28 °C foram realizadas medições do halo de crescimento do micélio fúngico e realizado o cálculo da média do diâmetro das quatro seções das colônias fúngicas de cada isolado em centímetros por dia (Figura 9) e as médias de crescimento do tratamento e controle foram

utilizadas para obter a taxa de crescimento de cada colônia, conforme a equação 1 (FRIGAS, 2002; TARIQ et. al, 2010).

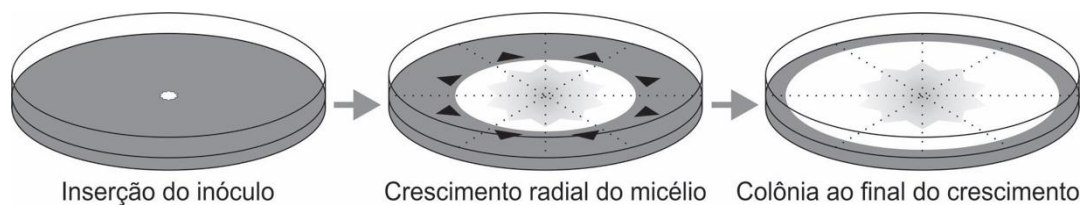


Figura 9 - Crescimento do micélio fúngico para avaliação do crescimento dos microrganismos. Fonte: adaptado de BIROLI et al. (2014).

$$\% \text{Crescimento} = \left[1 - \left(\frac{\text{Tratamento}}{\text{Controle}} \right) \right] \cdot 100 \quad \text{Equação 1}$$

4.4.2 Determinação da densidade micelial

Neste estudo, a densidade do micélio foi obtida com o uso conjunto dos softwares Image Tool 3.0 e Corel Draw X6, onde a estimativa é analisada de forma bidimensional e bicromática através do tratamento de imagens digitais tiradas sempre sob as mesmas condições de luz artificial, originando, assim, a relação da porcentagem de pixels brancos e pixels pretos e resultando, então, o valor da densidade micelial, como ilustradas na Figura 10 (VALE; FERNANDES FILHO; LIBERATO, 2003; PAZOTI; PESSOA; BRUNO, 2006; JORGE; SILVA, 2009):

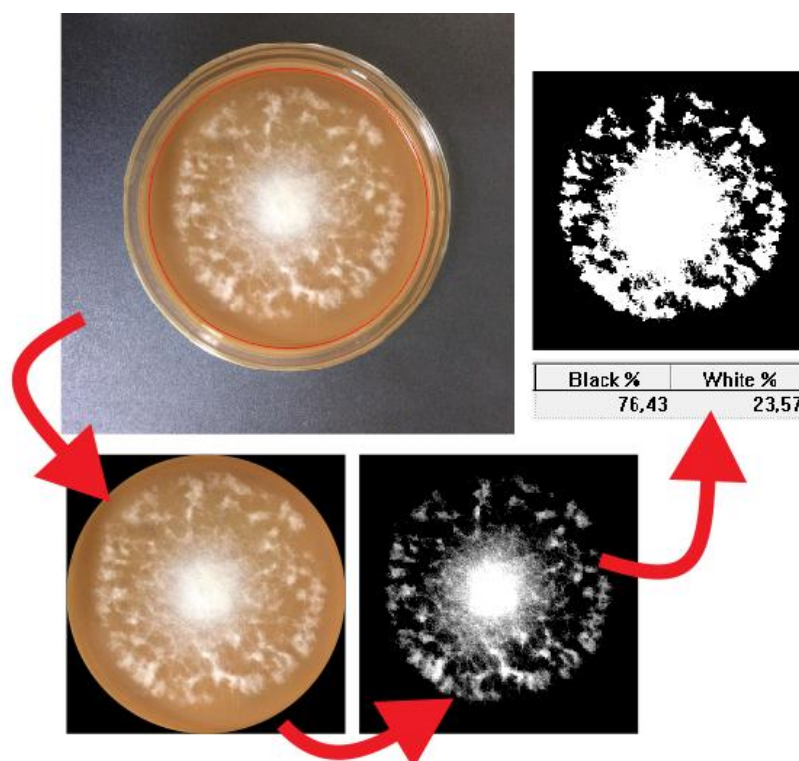


Figura 10 - Sequência de transformação das imagens obtidas das placas de Petri contendo o micélio fúngico até a obtenção da imagem bicromática, possibilitando assim o cálculo da diferença de pixels. Fonte: Autoria própria.

O isolado fúngico com maior densidade micelial será selecionado para dar início ao cultivo submerso e cultivo em estado sólido, juntamente com o fungo *B. rhodina*, organismo de referência.

4.4.3 Avaliação da alteração da cor do meio

As alterações no meio sólido, como a produção de pigmentos e alteração da cor da lignina Kraft são indicativos da biotransformação do meio. A produção de pigmentos pode indicar a ação de metabólitos secundários, voltados à biotransformação do substrato (EASTWOOD et al., 2011). O embranquecimento é indicativo de uma possível degradação das substâncias orgânicas originais, gerando outros compostos sem cor (BELMONTE et al., 2006).

Desse modo, as placas contendo os isolados fúngicos em meio sólido contendo lignina Kraft foram acompanhadas por até 7 dias, analisando-se a existência de modificação na coloração do meio.

4.5 CULTIVO SUBMERSO

Sabendo que a lignina Kraft apresenta elevada resistência a degradações, o experimento do cultivo submerso ocorreu em duas condições: A primeira condição para avaliar a produção de lacase pelo *B. rhodina* e os isolados selecionados nas etapas anteriores em um período de 15 dias. A segunda condição ocorreu para avaliar se o crescimento fúngico do *B. rhodina* com fonte extra de carbono dois dias antes do cultivo com lignina Kraft aumentaria a produção de lacase.

4.5.1 Reativação das cepas em meio sólido

Sob condições estéreis, em fluxo laminar vertical, o fungo referência *B. rhodina* assim como os isolados JUMAD 054; JUMAD 040; JUMAD 042b; JUMAD 047b; JUMAD 066 foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA durante 4 dias para que fossem reativados e em seguida transferidos para meio VGA em placa de Petri e incubados por 4 dias em BOD à 28 °C para posteriormente inocular a suspensão de hifas.

4.5.2 Preparo da suspensão de hifas e realização do cultivo

Após quatro dias de crescimento em meio VGA, em condições estéreis no fluxo laminar vertical, utilizando a alça de inoculação os micélios foram retirados das placas de Petri e transferidos para o meio líquido.

A suspensão de hifas foi constituída por 25 mL de meio líquido com 1,0 % de glucose e VOGEL em um frasco Erlenmeyer com volume de 125 mL. Após quatro dias de cultivo no shaker à 180 RPM à 28 °C, o conteúdo do frasco com o micélio foi transferido para um tubo Falcon estéril de 50mL e centrifugado a 6000 RPM na centrífuga Solab SL -707 ®;.

Em seguida ocorreu um processo de lavagem e dispersão dos micélios, utilizando uma solução NaCl 0,9% em um tubo Falcon estéril e agitando-a com uma esfera de vidro em seu interior para facilitar a dispersão dos micélios. A lavagem foi

realizada para retirar a maioria dos resíduos do meio líquido e a dispersão ocorreu para homogeneizar o micélio e facilitar sua inoculação da seguinte forma:

- a) **condição 1:** Retiraram-se alíquotas de 5,0 mL da solução homogênea do fungo *B. rhodina* e de cada isolado selecionado contendo micélio de dentro do tubo Falcon para cada um dos 15 frascos Erlenmeyers para o tratamento de cada isolado com 25 mL de meio de cultivo líquido constituído por VOGEL, Dimetilsufóxido (DMSO) 4,0 % e Lignina Kraft 0,5 %. Os frascos foram incubados em shaker a 180 RPM, durante um período máximo de 15 dias à temperatura de 28 °C;
- b) **condição 2 (somente para *B. rhodina*):** retiraram-se alíquotas de 5,0 mL da solução homogênea do fungo *B. rhodina* contendo micélio de dentro do tubo Falcon para 3 frascos Erlenmeyers, primeiramente com 12 mL de meio nutriente contendo 0,5 % de glicose e incubados em shaker a 180 RPM. Após 2 dias foi adicionado mais 12,5 mL constituído por VOGEL, DMSO 4,0 % e KL 0,5 % (DMSO e lignina Kraft concentrados para 25 mL de meio). Os frascos foram incubados em shaker a 180 RPM, durante um período de 7 dias à temperatura de 28 °C.

4.5.3 Interrupção do cultivo submerso e obtenção do extrato livre de células.

Tanto para a condição 1, quanto para a condição 2, os frascos com os cultivos foram retirados assepticamente nos dias 3, 5, 7, e 10, em triplicatas. Em seguida duas alíquotas de 2 mL de cada cultivo foram armazenados em congelador à -4 °C em tubos Eppendorfs para posteriores estudos.

Para obtenção do ELC, os cultivos foram centrifugados a 6000 RPM na centrífuga Solab SL -707®; e filtrados em filtros Whatman n° 1 e mantidos constantemente refrigerados em caixa de gelo para a realização dos ensaios enzimáticos. Todos os ensaios enzimáticos ocorreram logo após interrupção dos meios de cultivos.

4.6 CULTIVOS EM ESTADO SÓLIDO

Para o experimento de cultivo em estado sólido, primeiramente foi necessário estabelecer quais variáveis induziriam o fungo referência *B. rhodina* a produzir mais lacase. Dessa forma o experimento foi dividido em 3 pré experimentos, chamados aqui de **etapas**: A primeira para indicar qual dia oferece o pico de produção de lacase; a segunda para obter o meio nutriente que auxilia melhor o microrganismo para produção enzimática e a terceira etapa para decidir qual combinação entre borra de café e lignina Kraft oferece melhor capacidade do fungo produzir lacase.

4.6.1 Preparo do inoculo

O fungo *B. rhodina* e o isolado selecionado foram transferidos para placas BDA durante quatro dias para que fossem reativados e em seguida transferidos para o inoculo, contendo meio VGA em placa de Petri e incubados por 4 dias em BOD à 28 °C.

4.6.2 Cultivos em estado sólido.

Primeira condição: Ocorreu para obter qual dia de cultivo oferece o pico de produção de lacase pelo fungo referência *B. rhodina*.

Em condições estéreis no fluxo laminar vertical, foram adicionados em frascos Erlenmeyers 17,5 g de borra de café como matriz sólida e 25 mL de água destilada, em seguida a umidade dos meios foi ajustada para 70 % (porcentagem que não é possível mais observar H₂O livre no meio de cultivo) e esterilizada a 121 °C durante 30 minutos.

Após isso, sob condições estéreis no fluxo laminar vertical e utilizando a alça de inoculação, foram adicionados três plugs do inoculo contendo micélios do fungo referência *B. rhodina* para seus respectivos frascos em triplicatas contendo borra de café (RODRÍGUEZ-COUTO, 2018), frascos controle não foram inoculados.

A interrupção dos cultivos ocorreu nos dias 3, 5, 7, 10 e 12.

Segunda condição: Com o dia de cultivo que oferece o pico de produção de lacase, a etapa dois do cultivo em estado sólido teve como objetivo selecionar o melhor meio nutriente para produção de lacase para o fungo referência *B. rhodina*.

Em condições estéreis, no fluxo laminar vertical, foram adicionados em frascos Erlenmeyers 17,5 g de borra de café como matriz sólida, 25 mL de água destilada e na primeira triplicata em seu controle foi adicionado meio nutriente Czapek-DOX (Tabela 8). Na segunda triplicata, com seu controle, foi adicionado meio nutriente VOGEL. Em seguida a umidade dos meios foram ajustadas para 70 % e esterilizadas a 121 °C durante 30 minutos.

Em seguida, sob condições estéreis no fluxo laminar vertical e utilizando a alça de inoculação, foram adicionados três plugs do inóculo contendo micélios do fungo referência *B. rhodina* para seus respectivos cultivos em estado sólido.

Tabela 8 - Meio nutriente Czapek-DOX em 1000 mL de água destilada.

COMPOSTO	QUANTIDADE
KH ₂ PO ₄	1,0 g
FeSO ₄	0,01 g
NaNO ₃	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
KCl	1,0 g

Fonte: VENKATESAGOWDA et al. (2015).

Terceira condição: Com o dia de cultivo e meio nutriente determinados para oferecer a maior produção de lacase, a etapa três ocorreu para decidir qual combinação entre borra de café e lignina Kraft oferece melhor condições para o fungo referência *B. rhodina* produzir lacase de acordo com as seguintes variações: (1:0) borra:lignina Kraft; (1:1) borra:lignina Kraft e (0:1) borra:lignina Kraft da seguinte forma:

- I. Concentração 1:0 (borra: lignina Kraft), em condições estéreis no fluxo laminar vertical, foram adicionados em frascos Erlenmeyers 17,5 g de borra de café como matriz sólida, 25 mL de água destilada e meio nutriente VOGEL;
- II. Concentração 1:1 (borra: lignina Kraft), em condições estéreis no fluxo laminar vertical, foram adicionados em frascos Erlenmeyers 8,75 g de borra de café e

8,75 g de lignina Kraft como matriz sólida, 25 mL de água destilada e meio nutriente VOGEL;

- III. Concentração 0:1 (borra: lignina Kraft), em condições estéreis no fluxo laminar vertical, foram adicionados em frascos Erlenmeyers, foi adicionado somente 17,5 g de lignina Kraft como matriz sólida, 25 mL de água destilada e meio nutriente VOGEL.

Em seguida a umidade dos meios foi ajustada para 70 % e esterilizados a 121 °C durante 30 minutos.

Nas três etapas foi necessário realizar a extração das enzimas dos meios de cultivo, para isso o conteúdo foi suspenso em 52,5 mL de tampão citrato-fosfato (pH 6,0) 0,25 mM e agitado durante uma hora a 180 RPM. Os sólidos foram separados por filtração utilizando filtros Whatman n°1 e armazenados a uma temperatura de -4 °C. O ELC obtido após a filtração foi mantido constantemente refrigerado em caixa de gelo para a realização do ensaio enzimático. Todos os ensaios enzimáticos ocorreram logo após interrupção dos meios de cultivos.

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LACASE

A atividade da Lacase foi determinada utilizando o ATBS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) como substrato, conforme Dekker e Barbosa, (2001). Para este procedimento é necessário uma solução contendo a enzima alvo, que neste caso é o ELC presentes nos tubos Eppendorfs previamente acondicionados em refrigerador, uma solução tampão (50 mM) citrato-fosfato (McIlvaine's) com pH 3,0 e em uma cubeta de 1 mL a leitura da absorbância ocorre no comprimento de onda de 420 nm utilizando o espectrofotômetro UV-VIS. O tempo de incubação foi de 5 minutos à 50 °C em banho Maria. Em alguns experimentos também foram utilizados 10 e 15 minutos de incubação na tentativa de detectar uma oxidação do ABTS tardia pela lacase.

Além da leitura do tratamento que é a leitura da reação contendo ABTS, Tampão e ELC, também é necessário realizar a leitura dos controles da enzima (C1) e ABTS (C2), que ocorrem da seguinte forma (BARBOSA; DEKKER; HARDY, 1996).

Tratamento:

- a) 50 μL de ABTS;
- b) 150 μL de solução tampão 50 mM citrato-fosfato pH 3,0;
- c) 50 à 800 μL do extrato livre de células (Quando necessário devem ser diluídos);
- d) completa-se o restante com água destilada até obter 1000 μL de volume final.

C1:

- a) mesma quantidade de ELC usada no tratamento;
- b) 150 μL de solução tampão;
- c) água destilada até completar 1000 μL .

C2:

- a) 800 μL de água destilada;
- b) 50 μL de substrato ABTS;
- c) 150 μL da solução tampão.

A unidade de lacase foi definida como o número de μmols do substrato ABTS oxidados por minuto por mL da solução contendo a enzima e calculada de acordo com a Equação 2:

$$\textit{Atividade da Lacase} \left(\frac{U}{\text{mL}} \right) = \frac{AT - (AC_1 + AC_2)}{\varepsilon} \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{1}{t} \cdot F_d \cdot 1000 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

U/mL = unidade de lacase por mL de substrato;

AT = absorvância do tratamento;

AC1 = absorvância de C1;

AC2 = absorvância de C2;

t = tempo de incubação;

V = volume de enzima;

Fd = Fator de diluição da solução enzimática;

ϵ = coeficiente de extinção molar do substrato (para o ABTS, $\epsilon = 36.000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COLETA E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

Foram realizadas nove coletas em nove localidades diferentes no estado do Paraná: (i) na área urbana de Londrina-PR; (ii) em Caiobá-PR; (iii) no campus da Universidade Estadual de Londrina (UEL); (iv) no campus da Universidade Estadual de Maringá (UEM); (v) no Parque do Ingá; (vi) nos ribeirões Cafezal, Cambé e Taquara (município de Londrina) e (vii) no Parque Estadual Mata dos Godoy (Tabela 10).

Na cidade de Londrina, seis amostras do corpo de frutificação dos fungos foram coletadas no ano de 2016 e 2017 (duas amostras no lago Igapó), dessas todas tiveram isolamento bem sucedido. Em Caiobá, no ano de 2016, uma amostra foi coletada e isolada.

No Campus da Universidade Estadual de Londrina 19 amostras foram coletadas nos dias 08 de maio e 25 de agosto de 2017, no entanto apenas 13 tiveram o isolamento bem sucedido. No campus da Universidade Estadual de Maringá, das 4 amostras que foram coletadas no dia 01 de setembro de 2017, 3 conseguiram ser isoladas. No Parque do Ingá foram coletadas 25 amostras nos dias 15 de maio e 01 de setembro de 2017 e foram isolados 18 fungos. Nos ribeirões Taquara, Cambé e Cafezal, um total de 7 amostras foram coletadas nos dias 07 e 08 de julho de 2017 e 8 isolados foram obtidos. No Parque Estadual Mata dos Godoy, no dia 17 de setembro de 2017, 4 amostras foram coletadas resultando em 6 isolados.

Do total de 64 amostras de microrganismos fúngicos e fragmentos de madeiras em decomposição foram obtidos 54 isolados fúngicos, conforme a tabela 9.

Tabela 9 - Isolados obtidos de amostras de corpos de frutificação e fragmentos de madeiras em decomposição, local de obtenção dos isolados e coordenadas geográficas.

Amostras/coordenadas e linhagens isoladas	Amostras/coordenadas e linhagens isoladas
Londrina e Caiobá/ PR – Ano de 2016	
<p>Amostra 01</p>   <p>JUMAD 001</p> <p>S23°20'29.3" W51°10'04,4"</p>	<p>Amostra 02</p>   <p>JUMAD 002</p> <p>25°51'00.1" 48°33'28.3"</p>
<p>Amostra 03</p>   <p>JUMAD 005</p> <p>23°23'06.2" 51°04'39.5"</p>	<p>Amostra 04</p>   <p>JUMAD 006</p> <p>23°19'67.5" 51°10'09.2"</p>
Campus da Universidade Estadual de Londrina/PR- Dia 08/05/17	
<p>Amostra 01</p>   <p>JUMAD 007</p> <p>23°19'67,5" 51°11'67,3"</p>	<p>Amostra 09</p>   <p>JUMAD 015</p> <p>S23°19'68.9" W51°11'75,1"</p>
Parque Ingá – Maringá/ PR – Dia 15/05/17	
<p>Amostra 07</p>   <p>JUMAD 026a;</p> <p>S23°25'46.1" W51°55,77.4"</p>	<p>Amostra 13</p>   <p>JUMAD 032</p> <p>S23°25'51.1" W51°55'75.8"</p>



W51°13'36.3"

Amostra 07



S23°36'47.3"
W51°16'23.1"



JUMAD 042a;



JUMAD 042b

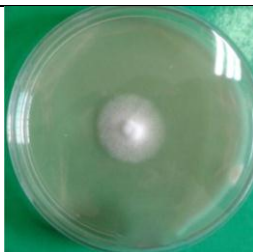
W51°16'23.1"

Campus da Universidade Estadual de Londrina/PR - Dia 25/08/17

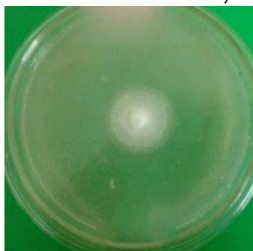
Amostra 01



S23°19'68.9"
W51°11'75.1"



JUMAD 043a;



JUMAD 043b

Amostra 03



S23°19'68.9"
W51°11'75.1"



JUMAD 045a

Amostra 05



23°19'68.9"
W51°11'75.1"



JUMAD 047b

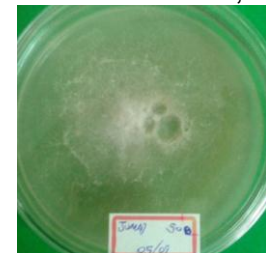
Amostra 08



S23°19'68.9"
W51°11'75.1"



JUMAD 050a;



JUMAD 050b

Amostra 09



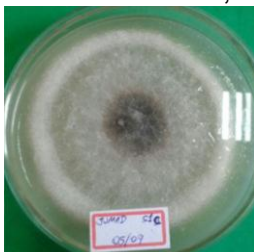
S23°19'68.9"
W51°11'75.1"



JUMAD 051a;



JUMAD 051b;

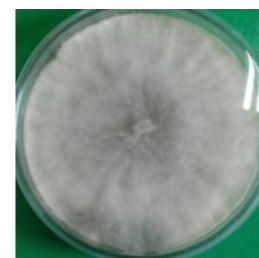


JUMAD 051c

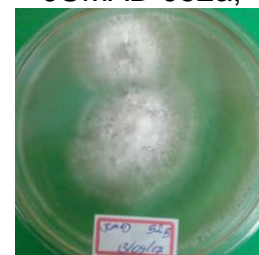
Amostra 10



S23°19'68.9"
W51°11'75.1"



JUMAD 052a;



JUMAD 052b;

Campus da Universidade Estadual de Maringá/PR – Dia 01/09/17

Amostra 01



S23°24'28.5"
W51°56'08.7"



JUMAD 053

Amostra 02



S23°24'28.5"
W51°56'08.7"



JUMAD 054

Amostra 04



S23°24'13.9"
W51°56'23.7"



JUMAD 056

Parque Ingá – Maringá/PR – Dia 01/09/17

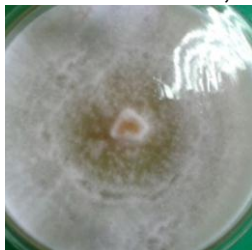
Amostra 01



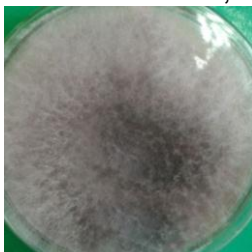
S23°25'34.6"
W51°55'56.7"



JUMAD 057a;



JUMAD 057b;



JUMAD 057c

Amostra 02



S23°25'36.6"
W51°55'55.6"



JUMAD 058b

Amostra 03



S23°25'37.6"
W51°55'56.1"



JUMAD 059a;



JUMAD 059b

Amostra 05



S23°25'38.9"
W51°55'55.0"



JUMAD 061

Amostra 06



S23°25'41.0"
W51°55'54.7"



JUMAD 062

Amostra 08



S23°25'36.7"
W51°55'51.4"



JUMAD 064c

Amostra 10



S23°25'35.1"
W51°55'44.8"



JUMAD 066

Amostra 11



S23°25'35.1"
W51°55'44.8"



JUMAD 067

Amostra 12



S23°25'35.1"
W51°55'44.8"



JUMAD 068a;



JUMAD 068b

Reserva Estadual Mata dos Godoy/PR – Dia 17/09/17

Amostra 01



S23°27'31.1"
W51°15'05.8"

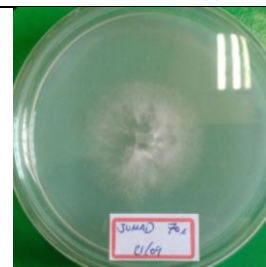


JUMAD 069b

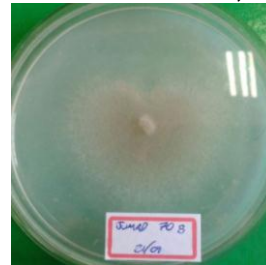
Amostra 02



S23°27'31.1"
W51°15'05.8"



JUMAD 070a;



JUMAD 070b

Amostra 04



S23°27'29.7"
W51°15'05.9"

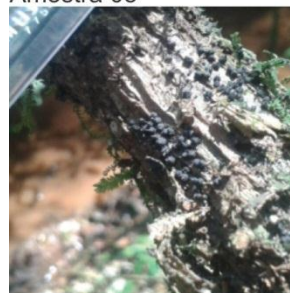


JUMAD 072a;



JUMAD 072b

Amostra 05



S23°27'28.4"
W51°15'05.5"



JUMAD 073

Lago Igapó – Londrina/PR - Dia 11/10/17

Amostra 01



S23°19'36.0"
W51°10'34.2"

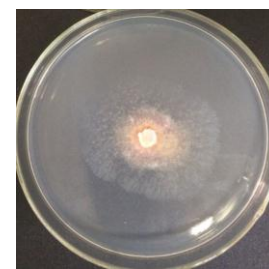


JUMAD 074

Amostra 02



S23°41'12.4"
W51°17'08.8"



JUMAD 075

Fonte: Autoria própria.

O isolamento dos fungos foi realizado por repiques sucessivos em meio BDA ou MEA. Embora fossem usados antibióticos durante a etapa de isolamento, ocorreram problemas de contaminações com microrganismos ambientais como bactérias, leveduras e principalmente outros fungos (*Aspergillus* sp. e *Trichoderma* sp). É importante destacar a importância de uma correta manipulação e assepsia das amostras

Todos os isolados foram preservados em água destilada estéril e em tubos de ensaio contendo BDA em triplicata e depositados na coleção de cultura do grupo QuiMiBio UTFPR-Londrina.

A criação de uma coleção de fungos representa uma importante fonte de recursos biológicos, pois poderão viabilizar inúmeros projetos de pesquisa nas linhas de fármacos, controle ambiental e biotecnologia, além de disponibilizar informações sobre a biodiversidade fúngica (CAMARA et al., 2008).

A partir da obtenção desses isolados fúngicos foi possível iniciar o processo de seleção dos melhores linhagens de acordo com sua capacidade de crescimento em meio contendo lignina Kraft como única fonte de carbono.

5.2 SELEÇÃO DOS FUNGOS LIGNINOLÍTICOS EM MEIO SÓLIDO CONTENDO LIGNINA KRAFT

5.2.1 Avaliação da taxa de inibição

Dos 54 fungos isolados, 21 cresceram na presença de lignina Kraft em relação ao controle, indicando uma boa capacidade de desenvolvimento em meio sólido na presença desse composto (Tabela 14).

No trabalho de Shiraishi (2017), de nove isolados fúngicos avaliados, apenas quatro cresceram na presença de lignina Kraft (0,3 %) utilizando-se metodologia semelhante.

Os microrganismos que não apresentaram inibição quando testados em meio sólido possuem uma maior facilidade de crescimento na presença de lignina Kraft, indicando potencial capacidade de quebrar a matriz ligninolítica (BIROLI et. at. 2014).

5.2.2 Avaliação da densidade micelial

Depois de 7 dias de cultivo, os dentre os 21 isolados fúngicos selecionados na etapa anterior, os isolados que apresentaram densidade acima de 20% são: JUMAD 054; JUMAD 042b; JUMAD 066; JUMAD 069b; JUMAD 040; JUMAD 047b; JUMAD 072 e JUMAD 075.

Abaixo deste valor, se torna pouco expressiva a área ocupada da placa de Petri pelos micélios.

A vantagem da avaliação da densidade micelial se mostrou na sensibilidade de diferenciar dois isolados fúngicos com crescimento micelial similar, como mostra

a Figura 11, onde uma diferença de densidade de quase 10 % passaria despercebida a olho nu.

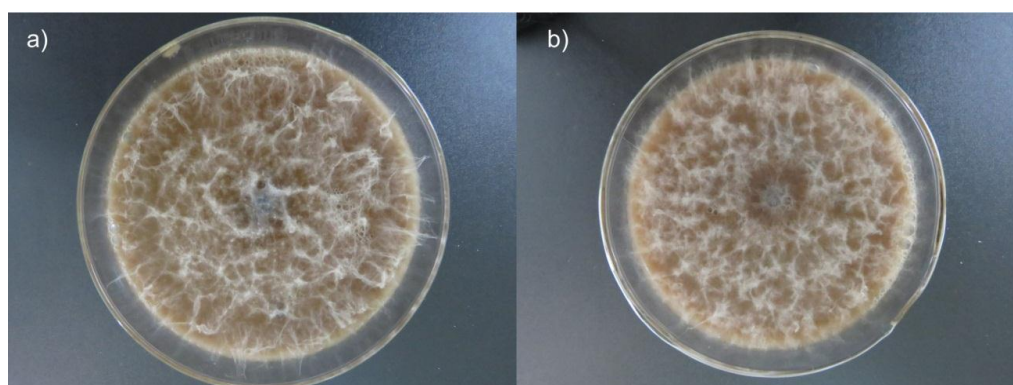


Figura 11 - Comparação entre a densidade obtida de (a) JUMAD 66 (37,86 %) com a densidade obtida de (b) JUMAD 054 (47,46 %) e como 9,6% de diferença na sua densidade é pouco nítida. Fonte: Autoria própria.

A morfologia do microrganismo pode ser alterada quando comparado seu crescimento em diferentes meios de cultivos (MERT; DIZBAY, 1977; ZAFRA; ABSALÓN; CORTÉS-ESPINOSA, 2015), uma vez que a densidade dos micélios e de suas ramificações são amplamente controladas pelas condições nutricionais e ambientais (ISLAM et al., 2017), portanto foi elaborado um teste que quantifique de forma quantitativa a densidade micelial.

No estudo de Bernardi et al. (2013), a densidade micelial foi medida levando-se em consideração a observação visual em três categorias, porém, tais observações podem apresentar variações dependendo do avaliador que realiza a análise, uma vez que o conceito usado no trabalho supra citado de *muita* ou *pouca* densidade pode ser subjetivo.

Outra dificuldade na observação visual é que para descrever quantitativamente se um micélio fúngico está se desenvolvendo pode-se levar em consideração, através de medições, o quanto o micélio ocupa de área disponível na placa de Petri. No entanto o micélio pode crescer de forma esparsa e ocupar uma área grande ou pode crescer de forma densa e ocupada uma área pequena.

Sendo assim é pouco assertivo categorizar o crescimento micelial dessa forma e vale mencionar que a dificuldade aumenta mais ainda quando o micélio não se desenvolve radialmente.

Por esse aspecto, uma maneira precisa para quantificar a densidade micelial é através de softwares quantificadores do micélio fúngico, como oQUANT de

importante aplicação na fitopatologia (VALE et al., 2003). Mas outros softwares também podem ser mencionados, como o Citrusvis (PAZOTI; PESSOA; BRUNO, 2006), AFSoft (JORGE; SILVA, 2009) e R (MENDES REIS; GONÇALVES OLIVEIRA; GONÇALVES LOPES, et al., 2017)

Dessa forma os fungos que apresentaram melhores resultados de densidade micelial foram os isolados JUMAD 054, JUMAD 042b e JUMAD 066 (Figura 12).

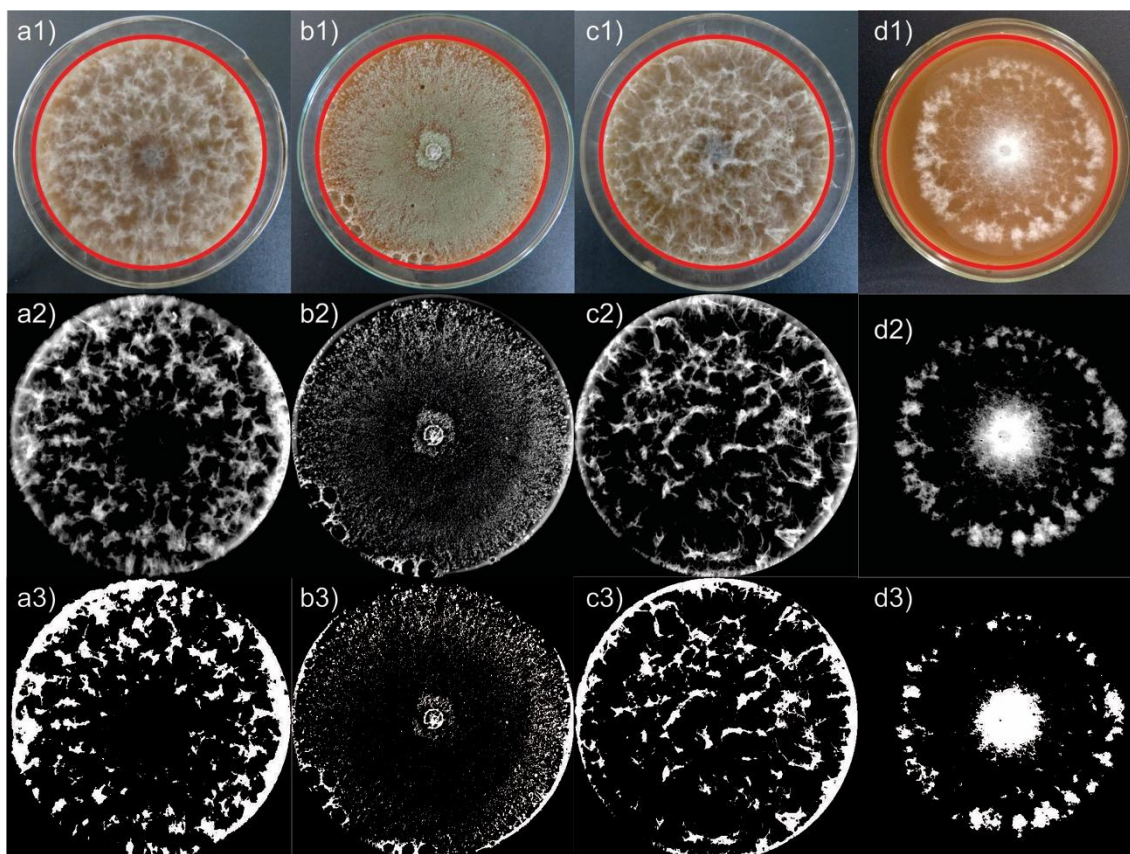


Figura 12 - Placas contendo meio sólido com 0,3 % de lignina Kraft com os microrganismos que apresentaram maior densidade micelial: JUMAD 054 (a1, a2, a3), JUMAD 42 (b1, b2, b3), JUMAD 66 (c1, c2, c3) e *B.rhodina* (d1, d2, d3). Linhas 1 e 2 são processo de tratamento da imagem através do programa Corel Draw, onde a primeira é o ajuste de tamanho dentro da régua (círculo vermelho) e a segunda é a remoção da imagem externa à régua além do ajuste de brilho, contraste e intensidade. Linha 3 é o tratamento feito pelo programa ImageTool, onde é obtido a porcentagem de pixels brancos de cada placa (JUMAD 054 = 47,46 %, JUMAD 042 = 43,98 %, JUMAD 066 = 37,86 %, *B. rhodina* = 23,64 %). Fonte: Autoria própria.

5.2.3 Avaliação da alteração da cor do meio

Nos meios de tratamento contendo lignina Kraft, os fungos JUMAD 66, JUMAD 69b, JUMAD 72a, JUMAD 36, JUMAD 68a, JUMAD 41a, JUMAD 26a,

JUMAD 32, JUMAD 26b e JUMAD 62 apresentaram alterações avermelhadas na coloração do substrato (Figura 13), que pode ser um indicativo da biotransformação da lignina Kraft e esta alteração pode estar relacionada com os produtos de degradação da lignina (BASHTAN-KANDYBOVICH et al., 2012; EASTWOOD et al., 2011).

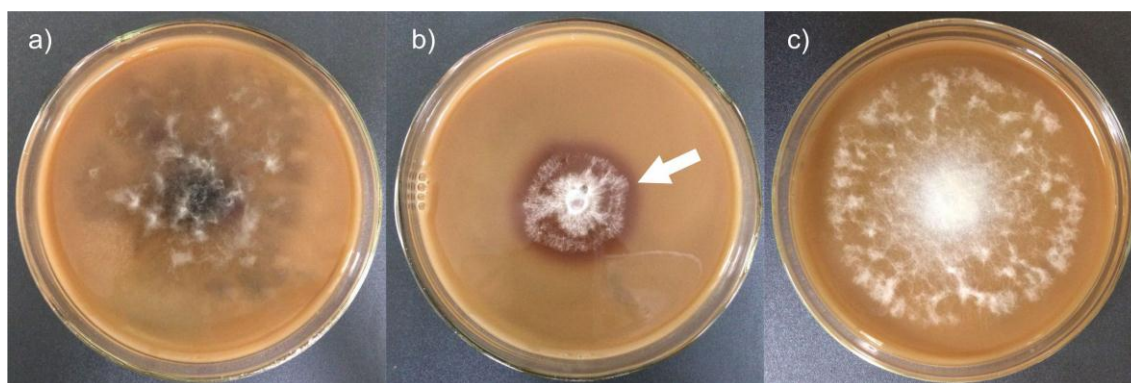


Figura 13 - Placas contendo meio sólido VOGEL + lignina Kraft destacando-se a alteração da cor do meio apresentado pelo isolado JUMAD 039 (a – coloração preta) e JUMAD 032 (b) e ausência de alteração da cor do meio pelo fungo *B. rhodina* (c). Fonte: Autoria própria.

Já nos fungos JUMAD 054, JUMAD 051b e JUMAD 039 foi possível notar a presença da coloração preta no meio sólido contendo lignina Kraft, sendo um indicativo da produção de melanina. A presença desta coloração pode ser interpretada como um estresse ao meio contendo lignina Kraft (EISENMAN & CASADEVALL, 2012)

Os valores de densidade micelial e presença ou ausência na alteração da cor do meio de cultivo são apresentados na Tabela 10.

Embora o fungo *B. rhodina* não se destaque na taxa de crescimento, densidade micelial e alteração da cor do meio de cultivo, Bashtan-Kandybovich et al. (2012) demonstram sua eficiência em degradar a lignina. Além disso, Dekker et al. (2002) demonstram sua capacidade de produção de lacase, justificando a utilização deste fungo para a implementação nos meios de cultivo submerso e cultivo em estado sólido.

Tabela 10 - Porcentagem da densidade micelial, inibição e alteração da cor do meio dos 25 microrganismos que apresentaram os melhores resultados durante o processo de triagem e o fungo *B. rhodina*.

Nº	Isolados	Densidade micelial (%)	Taxa de inibição (%)	Alteração da cor do meio
1	JUMAD 054	*47,46	3,52	preta
2	JUMAD 042b	*43,98	4,96	ausente
3	JUMAD 066	*37,86	2,35	avermelhada
4	JUMAD 069b	35,74	5,96	avermelhada
5	JUMAD 040	33,20	3,51	ausente
6	JUMAD 047b	33,15	4,85	ausente
7	JUMAD 072a	23,72	18,31	avermelhada
8	JUMAD 075	20,50	0	avermelhada
9	JUMAD 050b	16,01	15,49	ausente
10	JUMAD 036	12,84	9,44	avermelhada
11	JUMAD 068a	12,06	10,69	avermelhada
12	JUMAD 051b	11,46	*26,16	preta
13	JUMAD 067	9,84	0	ausente
14	JUMAD 041a	7,60	13,15	avermelhada
15	JUMAD 026a	6,36	17,96	avermelhada
16	JUMAD 007	6,23	18,13	ausente
17	JUMAD 002	5,24	0	avermelhada
18	JUMAD 001	5,22	0	avermelhada
19	JUMAD 032	4,63	0,51	avermelhada
20	JUMAD 026b	4,56	*30,04	avermelhada
21	JUMAD 015	3,79	20,00	ausente
22	JUMAD 039	3,41	*25,13	preta
23	JUMAD 062	3,26	21,19	avermelhada
24	JUMAD 074	1,22	11,45	Ausente
	** <i>B. rhodina</i>	23,64	12,43	ausente

* - Melhores resultados de cada coluna;

** - Fungo referência utilizado.

Destaca-se que a densidade micelial foi utilizada como critério principal para a seleção de um isolado fúngico utilizado nas etapas seguintes, uma vez que a taxa de inibição utilizando réguas não quantifica de forma precisa o desenvolvimento dos micélios fúngicos, necessitando a aplicação de softwares (PAUL; THOMAS, 1998). Assim reforça-se a afirmação de que uma vez que tais medições se tornam difíceis, isto é, devido a não uniformidade das colônias, é preferencialmente indicado usar análises digitais de micélios fúngicos, pois diminuem o tempo de leitura e aumentam a precisão (MENDES REIS; GONÇALVES OLIVEIRA; GONÇALVES LOPES, et al., 2017).

Portanto foi possível constatar neste teste preliminar que os isolados fúngicos JUMAD 054; JUMAD 40; JUMAD 42b; JUMAD 47b e JUMAD 66 possuem maior potencial em se desenvolver no meio contendo lignina Kraft e produzir enzimas ligninolíticas. Assim esses microrganismos, juntamente com o fungo referência *B.rhodina* foram selecionados para realizar o experimento de cultivo submerso.

5.3 CULTIVO SUBMERSO

Na condição 1, através de cultivo submerso, foi possível obter o ELC do fungo *B. rhodina* e calculou-se a atividade da enzima lacase nos dias de cultivo 5, 7, 10 e 12 (Tabela 11). Para a separação do micélio do ELC, os cultivos foram centrifugados e filtrados em papel Whatman nº1, no entanto o ELC se mostrou demasiadamente opaco, implicando na elevada taxa de absorbância quando eram realizadas leituras no comprimento de onda de 420 nm.

Os isolados JUMAD 054; JUMAD 40; JUMAD 42b; JUMAD 47b e JUMAD 66 não apresentaram atividade de lacase nas condições estudadas. Contudo, este método avaliou somente a atividade da enzima lacase, vale mencionar que embora as lacases são abundantes nos fungos da podridão branca (RODRÍGUEZ-COUTO, 2018; SINGH ARORA; KUMAR SHARMA, 2010), além desta enzima, existem outras enzimas oxidativas como as lignina peroxidase e manganês peroxidase (BEY et al., 2011).

Para a condição 2, o fungo *B. rhodina* permaneceu dois dias em meio nutriente contendo 0,5 % de glicose e após esse período foi possível notar um

crescimento dos micélios. Após adicionar 12,5 mL de meio contendo lignina Kraft não foi mais possível notar este crescimento micelial até o sétimo dia de cultivo. No final deste sétimo dia foi quantificada a atividade enzimática do fungo *B. rhodina*, conforme a Tabela 11.

Tabela 11 - Atividade da lacase produzida pelo fungo *B. rhodina* em cultivo submerso contendo meio nutriente VOGEL e lignina Kraft (condição 1) e Atividade enzimática da lacase do fungo *B. rhodina* permanecendo dois dias em meio VOGEL com glicose para em seguida adicionar meio contendo VOGEL e lignina Kraft (Condição 2)

Cultivo submerso lignina Kraft + <i>B. rhodina</i> (Condição 1)	
Tempo de Cultivo	Atividade media (U/mL)
5 dias	0,014 ± 0,008
7 dias	0,001 ± 0,008
10 dias	0,002 ± 0,013
15 dias	0,001 ± 0,000
Cultivo submerso lignina Kraft + <i>B. rhodina</i> (Condição 2)	
7 dias	0,063 ± 0,055

Como não se constatou significativa atividade de lacase em nenhum dos dias de cultivo do *B. rhodina*, alterou-se o tempo de permanência do ELC com o ABTS e tampão no banho aquecido em todos os dias de cultivo para cinco, dez e quinze minutos na tentativa de obter uma leitura tardia da oxidação do ABTS pela lacase, no entanto não foi observada atividade desta enzima.

Sempre após a extração do ELC, notou-se uma grande opacidade do meio de cultivo, o que pode ter dificultado a leitura da oxidação do ABTS no comprimento de onda de 420 nm. Nos trabalhos realizados por Dekker e Barbosa (2001) e Dekker et al. (2002), a absorvância dos controles do ensaio enzimático ficaram abaixo dos valores obtidos neste experimento, evidenciando que um ELC opaco pode vir a dificultar ou inviabilizar a leitura da atividade enzimática no comprimento de onda utilizado.

Nos trabalhos de BARBOSA; DEKKER; HARDY (1996) utilizando o fungo referência *B. rhodina*, mesmo utilizando glicose em meio nutriente, a produção de lacase foi baixa (80 U/L), quando comparando com a presença de indutores como o álcool veratrílico (4600 U/L).

Embora seja esperada uma baixa produção enzimática nos dias finais do cultivo, devido à sensibilidade das enzimas às alterações químicas, térmicas e pH

(PACHECO; SOARES, 2014) além da exaustão de nutrientes, durante todo o período do cultivo não foi possível obter um perfil de produção de lacase como relatados na literatura.

Para Santos et al. (2018), a lignina pode restringir a ação de enzimas liberando compostos inibidores. Contudo neste trabalho não foram realizados testes para constatar estes inibidores.

Descartando o solvente utilizado como possível inibidor, Brzonova et al., (2017a) demonstraram que fungos são capazes de crescer em uma concentração de 5 % de dimetilsufóxido em meio sólido, além do mais os autores afirmam que o DMSO é o solvente orgânico mais adequado para solubilizar a lignina Kraft por ser bioquimicamente inerte, fungos não são capazes de utilizá-lo como fonte alternativa de energia.

Brzonova et al. (2017b) demonstraram que o DMSO pode até facilitar a biotransformação da lignina, e não se agrega nem modifica a estrutura da lignina, podendo ser separada desta através do uso de solventes. Combinando estes argumentos, o DMSO não foi o responsável pela inibição do crescimento dos fungos em meio líquido.

Nota-se que na condição 2, a atividade de lacase foi relativamente maior quando comparada com a produção de lacase do dia sete da condição 1, e quando realizado o teste de significância entre os valores das réplicas obtidos da condição 1 e 2 no durante o dia sete de cultivo, nota-se que há uma diferença significativa ($p = 0,194$). Portanto o aumento da biomassa fúngica, por prévia indução de glucose, auxilia na produção de lacase em cultivo submerso utilizando lignina Kraft como substrato.

Dessa forma podemos constatar que a baixa produção de lacase utilizando a cultivo submerso e lignina Kraft como substrato foi devida à limitação de fontes de carbono para este experimento em específico.

A partir do cultivo submerso, verificou-se que apenas o organismo de referência, *B. rhodina*, apresentou atividade de lacase significativa. Dessa forma, para a próxima etapa foram utilizados apenas o isolado fúngico JUMAD 054, que apresentou a maior densidade micelial, e o organismo de referência.

5.4 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

Para os experimentos de cultivo em estado sólido, foram realizados pré-experimentos divididos em três distintas etapas. Na primeira, ocorreu o cultivo em estado sólido que consistiu em estabelecer qual dia oferece a maior produção de produção de lacase para o fungo referência *B. rhodina*, dessa forma podemos obter o seguinte perfil de produção enzimática de acordo com a figura 14.

Figura 14 - Atividade de lacase produzida pelo fungo referência *B. rhodina* em cultivo em estado sólido contendo borra de café como matriz sólida em um período de 12 dias.

Através da primeira etapa foi possível obter um perfil de produção enzimática e constatar início da produção de lacase no dia 3 com 3,372 U/mL, atingindo o pico de produção no dia dez, onde foi possível obter 49,500 U/mL e no dia doze a produção desta enzima começa a diminuir baixando para 28,750 U/mL.

Nos estudos de Parani e Eyini (2012), embora tenham utilizado um período máximo de cultivo de 40 dias, foi possível constatar uma curva de produção enzimática análoga à obtida nesta pesquisa. Estes autores analisaram vários fungos através de cultivo, em estado sólido, utilizando borra de café como matriz sólida sem a adição de meios nutrientes e obtiveram pico máximo de produção de lacase com o fungo *Pleurotus flabellatus* + *Pleurotus eous* no vigésimo dia de cultivo (8.8 U/mL, baseado em 10 gramas de borra) baixando para 3.0 U/mL no quadragésimo dia.

Para Nugraha e Yun (2013) utilizando borra de café como matriz sólida, a maior produção de lacase foi obtida após 15 dias de incubação (0,11 U/mL) para o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, embora não adicionando meios nutrientes, os autores realizaram os cultivos a uma temperatura de 30 °C.

Após a determinação do dia ocorreu a maior produção da enzima lacase, a segunda etapa consistiu em selecionar o melhor meio nutriente para produção desta enzima pelo fungo referência *B. rhodina* e dessa forma obtemos o seguinte resultado de acordo com a Tabela 12:

Tabela 12 - Atividade enzimática do fungo referência *B. rhodina* em cultivo estado sólido utilizando borra de café e meio nutriente Czapek-Dox; borra de café e meio nutriente VOGEL.

Tempo de Cultivo	Atividade média (U/mL)
CULTIVO BORRA + CZPK-DOX + <i>B. rhodina</i>	
10 dias	412,444 ± 16,342
CULTIVO BORRA + VOGEL + <i>B. rhodina</i>	
10 dias	557,500 ± 34,962

Dessa forma, com a adição de meios nutrientes verificou-se um desenvolvimento e produção enzimática significativa, quando comparado com os resultados do cultivo na ausência desses nutrientes (49,500 U/mL), sendo possível dar continuidade às próximas etapas.

Foi possível notar que o fungo *B. rhodina*, a produção de lacase no dia dez foi significativamente maior (26 %) na presença de meio nutriente VOGEL (557,500 U/mL), quando comparado ao meio nutriente Czapek-DOX (412,444 U/mL) e 11,3 vezes maior na presença de VOGEL do que quando comparado à produção de lacase sem o meio nutriente. Isso pode ser explicado devido à presença de sulfato de cobre na composição do meio nutriente VOGEL, pois a produção de lacase pode ser aumentada significativamente dependendo dos nutrientes presentes que influenciam sua produção, incluindo traços de cobre, elemento essencial para a produção desta enzima multicobre oxidase (DEKKER et al., 2007).

De acordo com a literatura, a concentração necessária de cobre para estimular a produção de lacase pode variar entre as diferentes espécies fúngicas,

indo de 0,00 e 40g Cu/mL e chegando até concentrações de 320 g Cu/mL (GALHAUP; HALTRICH, 2001).

Na pesquisa de Machado et al. (2012) utilizando borra de café como matriz sólida e meio nutriente Czapek-Dox, viabilizaram o cultivo de sete cepas fúngicas pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* e *Neurospora*, embora não tenham realizado testes de atividade enzimáticas, puderam evidenciar o crescimento e liberação de compostos fenólicos neste meio de cultivo.

Dekker et al. (2007) constataram que o fungo *B. rhodina* foi capaz de se desenvolver e produzir lacase utilizando óleo de soja como fonte de carbono quando o meio nutriente VOGEL estava presente.

Dessa forma, então selecionamos o meio VOGEL, o qual foi o melhor meio nutriente para a produção da enzima lacase pelo fungo *B. rhodina*.

Com o melhor meio nutriente selecionado, a próxima etapa (Tabela 13) consistiu em obter o perfil de produção de lacase pelo fungo *B. rhodina* no cultivo em estado sólido utilizando borra de café e de lignina Kraft.

Tabela 13 - Atividade enzimática do fungo referência *B. rhodina* em cultivo estado sólido utilizando borra de café e meio nutriente Czapek-Dox; borra de café e meio nutriente VOGEL.

Tempo de Cultivo	Atividade media (U/mL)
FERMENTAÇÃO BORRA+VOGEL+B.rhodina	
10 dias	972,889 ± 24,513
FERMENTAÇÃO BORRA+LIGNINA KRAFT+VOGEL+B.rhodina	
10 dias	581,444 ± 72,753
FERMENTAÇÃO LIGNINA KRAFT+ VOGEL+B.rhodina	
10 dias	0,000 ± 0,000

Podemos notar com esses resultados que a produção de lacase na ausência de lignina Kraft foi maior quando a lignina estava presente, sendo possível destacar uma alta produção de lacase (972,889 U/mL). Contudo, quando é adicionada a mesma proporção de lignina Kraft à borra de café, a produção foi de 581,444 U/mL, diminuindo para zero quando somente a lignina Kraft faz parte da matriz sólida deste cultivo em cultivo em estado sólido.

Sendo assim é possível constatar que a lignina Kraft não aumentou a atividade de enzima lacase pelo fungo *B. rhodina*. No experimento com apenas a

lignina Kraft como substrato para o cultivo em estado sólido, não foi possível notar o crescimento micelial do fungo, e o fungo não foi capaz de utilizar a lignina Kraft para se desenvolver. Embora a limitação de nutrientes durante o desenvolvimento de microrganismos possa oferecer uma baixa produção de lacase (RAVENKAR; LELE, 2006), não houve essa limitação no meio contendo borra de café combinado com lignina Kraft.

Segundo Fan e Soccol (2005), a borra de café é constituída por 12,2 % de proteínas, 17,9 % de lipídios, 18,4 % de celulose, 6,3 % de cinzas, 49,8 % de extratos não nitrogenados, dentre outros compostos. Portanto, a borra de café oferece uma boa base nutricional para o desenvolvimento de fungos (MURTHY et al., 2009; MACHADO et al., 2012; NUGRAH; YUN, 2012).

Com os dados obtidos nas três etapas anteriores, foi possível realizar o cultivo da cultivo em estado sólido do fungo *B. rhodina* utilizando 17,5 g de borra de café como matriz sólida, 25 mL de água e meio nutriente VOGEL (Figura 15).

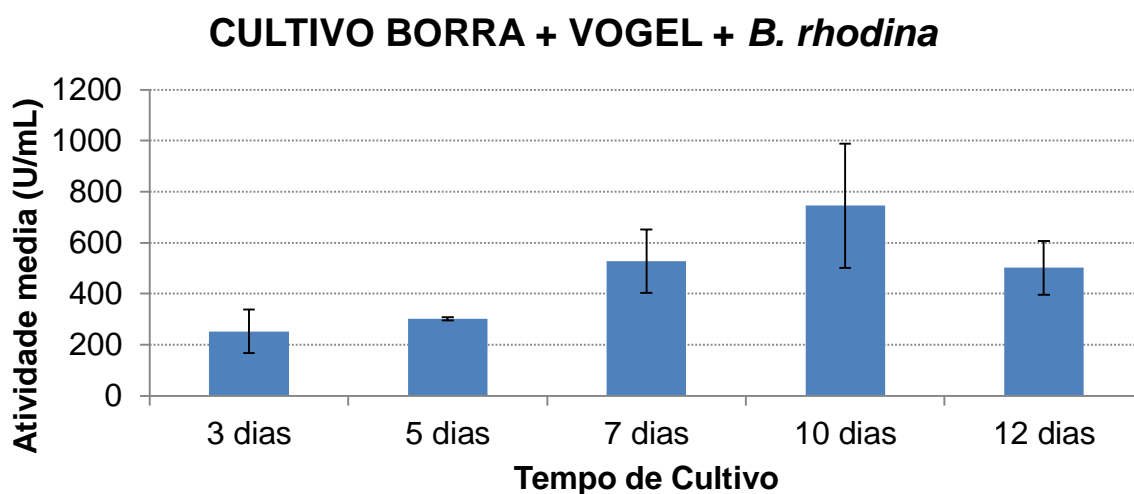


Figura 15 - Atividade de lacase melhorada produzida pelo fungo referência *B. rhodina* em cultivo em estado sólido contendo borra de café como matriz sólida e meio nutriente VOGEL.

Partindo das variáveis melhoradas foi possível obter um perfil de produção enzimática, onde o início da produção de lacase ocorrida no dia três foi de 252,648 U/mL, atingindo o pico de produção no dia dez, onde foi possível obter 745,746 U/mL. Diferente do teste realizado na etapa 1 sem a adição de meio nutriente

VOGEL (49,500 U/mL) e no dia doze a produção desta enzima diminuiu para 502,408 U/mL.

Com o melhoramento das variáveis para o fungo referência *B. rhodina*, foi possível realizar o mesmo cultivo utilizando 17,5 g de borra de café como matriz sólida, 25mL de água e meio nutriente VOGEL para o isolado JUMAD 054 (Figura 16):

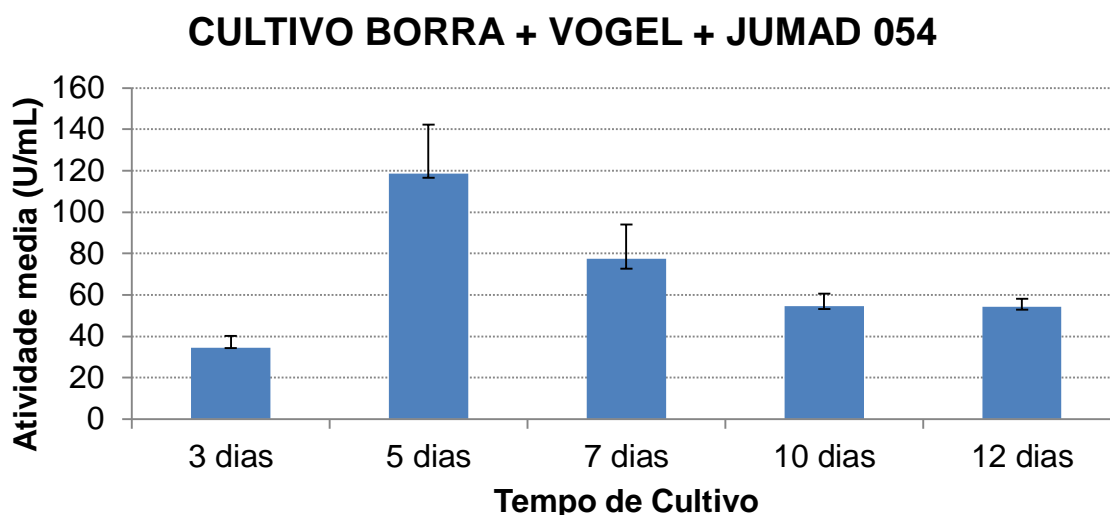


Figura 16 - Atividade de lacase melhorada de acordo com o fungo *B. rhodina* e produzida pelo isolado fúngico JUMAD 054 em cultivo em estado sólido contendo borra de café como matriz sólida e meio nutriente VOGEL.

Com os resultados obtidos é possível afirmar que selecionar os meios de cultivo apropriados é essencial para o processo de melhoramento. O aumento da produção da enzimática ocorreu como mencionado em Chenthamarakshan et al. (2017), em que o envolvimento de muitos fatores no cultivo em estado sólido pode levar ao melhoramento da produção da lacase.

Diferente do perfil enzimático obtido com o fungo *B. rhodina*, o isolado JUMAD 054 atuou de modo distinto, neste caso o início da produção de lacase no terceiro dia foi de 34,388 U/mL, contudo diferente do microrganismo referência o pico de produção ocorreu no dia cinco obtendo 118,660 U/mL, e no dia doze a produção desta enzima caiu para 54,284 U/mL. O novo isolado JUMAD 054 produziu uma quantidade inferior de lacase em relação ao fungo referência *B. rhodina*, contudo o melhoramento foi realizada somente para o fungo referência.

Para a aplicação de lacase em processos industriais, é necessária uma grande quantidade desta enzima, destaca-se então a importância do uso da borra de café como matriz sólida para a produção desta enzima quando comparada com o cultivo submerso contendo lignina.

Suas propriedades físico-químicas oferecem um suporte para o desenvolvimento do fungo similar ao encontrado em seu habitat natural favorecendo o seu desenvolvimento, além de ser fonte de ácidos ferúlicos e ácidos *p*-coumarílicos, conhecidos por estimular a produção de lacase (NEIFAR et al., 2009). Além disso outros estudos indicaram elevada atividade antioxidante a qual foi atribuída à presença de compostos fenólicos, ácidos clorogênicos e flavonóides (BRAVO et al., 2011; MUSSATO et al., 2011) e que foram de forma bem-sucedida utilizadas tanto pelo fungo *B. rhodina* quanto para o isolado JUMAD 054.

Leifa et al. (2001) sugerem que o uso de borra de café para a alimentação pecuária é inviável por possuir componentes que podem ser tóxicos para o gado, sugerindo alternativas de biodegradação para a eliminação desses compostos.

Uma vez que o custo de produção de enzimas é o maior fator limitante para usar a lacase em uma escala industrial, o uso de rejeitos agroindustriais não somente diminui o custo, como também auxilia na solução para um problema ambiental (GÓMEZ et al., 2005).

Outra vantagem do uso da lacase é sua baixa especificidade de substrato além de ser biodegradável, o que a torna adequada para o desenvolvimento biotecnológico eficiente e sustentável de empresas interessadas no manejo correto de seus rejeitos (OSMA et al., 2010).

6 CONCLUSÃO

Foi possível isolar 54 cepas fúngicas à partir das amostras coletas em campo, o que possibilitou realizar a seleção do fungo JUMAD 54 durante a etapa de triagem.

Os resultados obtidos pelos testes no cultivo em estado sólido indicaram alta produção de lacase em relação aos testes de cultivo submerso, sendo a maior produção pelo fungo JUMAD 054 no dia 5 (118,660 U/mL) e pelo fungo *B. rhodina* no dia 10 (745,746 U/mL) ficando de acordo com estudos anteriores realizados com o fungo ascomiceto *B. rhodina*.

A utilização da borra de café se mostrou satisfatória, sendo de fácil obtenção fornecendo nutrientes base para a proliferação de microrganismos a serem estudados, contudo a utilização de meios nutrientes se faz necessário quando a obtenção de maiores quantidades de enzimas são o objetivo. Além disso, como a borra de café possui limitações em seu tratamento, o reuso deste rejeito como suporte para produção enzimática é promissora em aplicações biotecnológicas.

Neste sentido, este estudo fornece relevantes contribuições para dar continuidade às pesquisas que visam a seleção de fungos ligninolíticos através de métodos praticos de seleção e produção enzimática, uma vez que o cultivo em estado sólido é de fácil aplicação e reprodução. Além de que a quantificação da atividade enzimática neste meio é facilmente empregada utilizando a metodologia já aplicada em cultivos submersos.

7 REFERÊNCIAS

ABDELAZIZ, O. Y. et al. Biological Valorization of Low Molecular Weight Lignin. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1318–1346, dez. 2016.

ACEVEDO, F. et al. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by the Chilean White-Rot Fungus *Anthracozyllum Discolor*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, n. 1, p. 212–219, jan. 2011.

AGAPITO, M.S.M. **Tratamento de efluente de produção de pasta kraft por *Trametes versicolor***. 120 f. Dissertação (Mestrado em Gestão Ambiental) – Departamento de Ambiente e Ordenamento, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2007.

AGBOR, V. B. et al. Biomass Pretreatment: Fundamentals toward Application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675–685, nov. 2011.

ARO, T.; FATEHI, P. Production and Application of Lignosulfonates and Sulfonated Lignin. **ChemSusChem**, v. 10, n. 9, p. 1861–1877, 9 maio 2017.

ARYA, M.; RAO, L. J. M. An Impression of Coffee Carbohydrates. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 1, p. 51–67, jan. 2007.

AZADI, P. et al. Liquid Fuels, Hydrogen and Chemicals from Lignin: A Critical Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 506–523, maio 2013.

BACIOCCHI, E.; FABBRI, C.; LANZALUNGA, O. Lignin Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Nonphenolic Trimeric Lignin Model Compounds: Fragmentation Reactions in the Intermediate Radical Cations. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 68, n. 23, p. 9061–9069, nov. 2003.

BALLESTEROS, L. F.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Extraction of Polysaccharides by Autohydrolysis of Spent Coffee Grounds and Evaluation of Their Antioxidant Activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 258–266, fev. 2017.

BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; HARDY, G. E. S. Veratryl Alcohol as an Inducer of Laccase by an Ascomycete, *Botryosphaeria* Sp., When Screened on the Polymeric Dye Poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 93–96, ago. 1996.

BASHTAN-KANDYBOVICH, I.; VENKATESAGOWDA, B.; BARBOSA, A.M., MALEK, L., DEKKER, R.F., Modification of kraft lignin by biological demethylation. **J FOR**. 2012;2:16–27.

BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. **Monomers, polymers and composites from renewable resources**. Amsterdam; Boston: Elsevier, 2008.

BEY, M. et al. Heterologous Expression of *Pycnoporus Cinnabarinus* Cellobiose Dehydrogenase in *Pichia Pastoris* and Involvement in Saccharification Processes. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 113, 2011.

BIERMANN, C. J. **Essentials of pulping and papermaking**. San Diego: Academic Press, 1993.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Publicações - Enzimas oxidativas microbianas envolvidas na biodegradação da lignocelulose: produção, características bioquímicas e importância biotecnológica. 2011.

BRIJWANI, K.; RIGDON, A.; VADLANI, P. V. Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1–10, 2010.

BRZONOVA, I. et al. Fungal Biotransformation of Insoluble Kraft Lignin into a Water Soluble Polymer. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 56, n. 21, p. 6103–6113, 31 maio 2017a.

BRZONOVA, I. et al. Production of Lignin Based Insoluble Polymers (Anionic Hydrogels) by *C. Versicolor*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, dez. 2017b.

BUGG, T. D. H. et al. Pathways for Degradation of Lignin in Bacteria and Fungi. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 12, p. 1883, 2011.

CALVO-FLORES, F. G. et al. **Lignin and lignans as renewable raw materials: chemistry, technology and applications**. Chichester, West Sussex, United Kingdom: John Wiley and Sons, Inc, 2015.

CAMPOS-VEGA, R. et al. Spent Coffee Grounds: A Review on Current Research and Future Prospects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 1, p. 24–36, set. 2015.

CANNATELLI, M. D.; RAGAUSKAS, A. J. Two Decades of Laccases: Advancing Sustainability in the Chemical Industry. **The Chemical Record**, v. 17, n. 1, p. 122–140, jan. 2017.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in sterile distilled water. Further search. **J. Trop.** v.70, p. 181-184, 1967.

CHAKAR, F. S.; RAGAUSKAS, A. J. Review of Current and Future Softwood Kraft Lignin Process Chemistry. **Industrial Crops and Products**, v. 20, n. 2, p. 131–141, set. 2004.

CHEN, J. et al. Production of Flocculants, Adsorbents, and Dispersants from Lignin. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 868, 10 abr. 2018.

CHEN, Y.; SARKANEN, S.; WANG, Y.-Y. Lignin-Degrading Enzyme Activities. In: HIMMEL, M. E. (Ed.). **Biomass Conversion**. Totowa, NJ: Humana Press, p. 251–268. 2012.

CHEN, Z.; WAN, C. Biological Valorization Strategies for Converting Lignin into Fuels and Chemicals. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 610–621, jun. 2017.

CHENTHAMARAKSHAN, A. et al. Optimization of Laccase Production from *Marasmiellus Palmivorus* LA1 by Taguchi Method of Design of Experiments. **BMC Biotechnology**, v. 17, n. 1, dez. 2017.

CHRISTOPHER, L. P.; YAO, B.; JI, Y. Lignin Biodegradation with Laccase-Mediator Systems. **Frontiers in Energy Research**, v. 2, 31 mar. 2014.

CLAUS, H. Laccases: Structure, Reactions, Distribution. **Micron**, v. 35, n. 1–2, p. 93–96, jan. 2004.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3–23, jan. 2005.

CONSTANT, S. et al. New Insights into the Structure and Composition of Technical Lignins: A Comparative Characterisation Study. **Green Chemistry**, v. 18, n. 9, p. 2651–2665, 2016.

D'ACUNZO, F.; GALLI, C.; MASCI, B. Oxidation of Phenols by Laccase and Laccase-Mediator Systems: Solubility and Steric Issues. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 21, p. 5330–5335, nov. 2002.

DE JONG, E.; GOSSELINK, R. J. A. Lignocellulose-Based Chemical Products. In: **Bioenergy Research: Advances and Applications**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 277–313.

DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 81–88, 2001

DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; AL, E. Influence of Nutrients on Enhancing Laccase Production by *Botryosphaeria Rhodina* MAMB-05. **International Microbiology**, n. 10, p. 177–185, 2007.

DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; SARGENT, K. The Effect of Lignin-Related Compounds on the Growth and Production of Laccases by the Ascomycete, *Botryosphaeria* Sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 3, p. 374–380, mar. 2002.

DEVAPPA, R. K.; RAKSHIT, S. K.; DEKKER, R. F. H. Forest Biorefinery: Potential of Poplar Phytochemicals as Value-Added Co-Products. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 681–716, nov. 2015.

DOELLE, H. W., MITCHELL, D. A., ROLZ, C. E. Solid State Cultivation. New York, **Elsevier Applied Science**, p.1-13, 1992.

DORIYA, K. et al. Solid-State Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of L-Asparaginase. In: **Advances in Food and Nutrition Research**. [s.l.] Elsevier, 78p. 115–135. 2016.

DOS SANTOS, A. C. et al. Lignin–Enzyme Interactions in the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. **Trends in Biotechnology**, nov. 2018.

DUVAL, A.; LAWOKO, M. A Review on Lignin-Based Polymeric, Micro- and Nano-Structured Materials. **Reactive and Functional Polymers**, v. 85, p. 78–96, dez. 2014.

DWIVEDI, U. N. et al. Structure–Function Relationship among Bacterial, Fungal and Plant Laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 117–128, fev. 2011.

EASTWOOD, D.C. et al. The Plant Cell Wall–Decomposing Machinery Underlies the Functional Diversity of Forest Fungi. **Science Express**, v. 333, n. 6051, p. 762-765, 2011.

FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Comparing the Catalytic Efficiency of Some Mediators of Laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, n. 5–6, p. 231–240, fev. 2002.

FERNANDEZ-FUEYO, E. et al. Comparative Genomics of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* Provide Insight into Selective Ligninolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 14, p. 5458–5463, 3 abr. 2012.

FRANCIS, R. C. et al. Soda Pulping of Hardwoods Catalyzed by Anthraquinone and Methyl Substituted Anthraquinones. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 26, n. 2, p. 141–152, jul. 2006.

GALAGAN, J.E., CALVO, S.E., CUOMO, C., MA, L.-J., WORTMAN, J.R., BATZOGLOU, S., LEE, S.-I., BAŞTÜRKMEN, M., SPEVAK, C.C., CLUTTERBUCK, J. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature**, V.438, p.1105–1115. 2005

GALHAUP, C., AND HALTRICH, D. 2001. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 225-232, 2001.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solidstate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, n. 1, p. 85-1, 2003.

GILLET, S. et al. Lignin Transformations for High Value Applications: Towards Targeted Modifications Using Green Chemistry. **Green Chemistry**, v. 19, n. 18, p. 4200–4233, 2017.

GIVAUDAN, A. et al. Polyphenol Oxidase in *Azospirillum Lipoferum* Isolated from Rice Rhizosphere: Evidence for Laccase Activity in Non-Motile Strains of *Azospirillum Lipoferum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 108, n. 2, p. 205–210, abr. 1993.

GÓMEZ, J. et al. Chestnut Shell and Barley Bran as Potential Substrates for Laccase Production by *Coriopsis Rigida* under Solid-State Conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 68, n. 3, p. 315–319, jun. 2005.

HAMMEL, K.; CULLEN, D. Role of Fungal Peroxidases in Biological Ligninolysis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 349–355, jun. 2008.

HAO REN, XIN DAI, HUAMIN ZHAI, ZHULAN LIU, SHIGETOSHI OMORI. comparison of bamboo native lignin and alkaline lignin modified by phase-separation method. **Cellulose chemistry and technology**. V. 49 (5-6), 429-438. 2015

HARILA, P.; KIVILINNA, V.A. Biosludge incineration in a recovery boiler. *Water Science Technology*, v. 40, p. 195–200, 1999.

HAUPERT, L. J. et al. Characterization of Model Compounds of Processed Lignin and the Lignome by Using Atmospheric Pressure Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Fuel**, v. 95, p. 634–641, maio 2012.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to Enhance the Digestibility of Lignocellulosic Biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10–18, jan. 2009.

HIRATSUKA, N. et al. Metabolic Mechanisms Involved in Hydroxylation Reactions of Diphenyl Compounds by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete Chrysosporium*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 3, p. 241–246, maio 2005.

HOFRICHTER, M. et al. New and Classic Families of Secreted Fungal Heme Peroxidases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 871–897, jul. 2010.

HU, L. et al. Predicting Protein Phenotypes Based on Protein-Protein Interaction Network. **PloS One**, v. 6, n. 3, p. e17668, 10 mar. 2011.

IFEANYI, N. et al. Bioconversion of Agricultural and Food Processing Wastes to Value-Added Products Using Solid State Fermentation Technology. A Review. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 11, n. 05, p. 68–71, maio 2016.

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for the Production of Bio-Based Chemicals and Polymers. **Polymer Chemistry**, v. 6, n. 25, p. 4497–4559, 2015.

ISLAM, M. R. et al. Morphology and Mechanics of Fungal Mycelium. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13070, 12 out. 2017.

JANUSZ, G. et al. Fungal Laccase, Manganese Peroxidase and Lignin Peroxidase: Gene Expression and Regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 1, p. 1–12, jan. 2013.

JIA, S. et al. Cleaving the BO₄ Bonds of Lignin Model Compounds in an Acidic Ionic Liquid, 1-H-3-Methylimidazolium Chloride: An Optional Strategy for the Degradation of Lignin. **ChemSusChem**, v. 3, n. 9, p. 1078–1084, 30 jul. 2010.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of Lignocellulose: Formation of Inhibitory by-Products and Strategies for Minimizing Their Effects. *Bioresource Technology*, v. 199, p. 103–112, jan. 2016.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial Xylanases: Engineering, Production and Industrial Applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1219–1227, nov. 2012.

KAHRAMAN, S. S.; GURDAL, I. H. Effect of Synthetic and Natural Culture Media on Laccase Production by White Rot Fungi. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 3, p. 215–217, maio 2002.

KAWAI S, UMEZAWA T, SHIMADA M, HIGUCHI T. Aromatic ring cleavage of 4,6-di(tert-butyl)guaiacol, a phenolic lignin model compound, by laccase of *Coriolus versicolor*. **FEBS Lett.** 1988.

KHATTAB, S. M. R.; WATANABE, T. Bioethanol From Sugarcane Bagasse: Status and Perspectives. In: **Bioethanol Production from Food Crops**. [s.l.] Elsevier, 2019.

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 30 maio 2005.

KLONOWSKA, A. et al. Characterization of a Low Redox Potential Laccase from the Basidiomycete C30: LAC2 from the Basidiomycete C30. *European Journal of Biochemistry*, v. 269, n. 24, p. 6119–6125, dez. 2002.

KUMAR, A.; GAUTAM, A.; DUTT, D. Biotechnological Transformation of Lignocellulosic Biomass into Industrial Products: An Overview. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 07, n. 03, p. 149–168, 2016.

LANCEFIELD, C. S. et al. Identification of a Diagnostic Structural Motif Reveals a New Reaction Intermediate and Condensation Pathway in Kraft Lignin Formation. **Chemical Science**, v. 9, n. 30, p. 6348–6360, 2018.

LEIFA, F.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Production of *Flammulina velutipes* on coffee husk and coffee spent-ground. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 2, p. 205–212, jun. 2001.

LEVIN, L.; MELIGNANI, E.; RAMOS, A. M. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by

selected culture filtrates. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4554–4563, 2010.

LU, Y. et al. Structural Characterization of Lignin and Its Degradation Products with Spectroscopic Methods. **Journal of Spectroscopy**, v. 2017, p. 1–15, 2017.

MA, L. et al. Efficient decolorization and detoxification of the sulfonated azo dye Reactive Orange 16 and simulated textile wastewater containing Reactive Orange 16 by the white-rot fungus *Ganoderma* sp. En3 isolated from the forest of Tzu-chin Mountain in China. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 1–9, jan. 2014.

MACHADO, E. M. S. et al. Growth of Fungal Strains on Coffee Industry residues with Removal of Polyphenolic Compounds. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 87–90, jan. 2012.

MAGINA, S.; MARQUES, A. P.; EVTUGUIN, D. V. Study on the residual lignin in *Eucalyptus globulus* sulphite pulp. **Holzforschung**, v. 69, n. 5, 1 jan. 2015.

MARQUES, A. P. et al. Structure of Lignosulphonates from Acidic Magnesium-Based Sulphite Pulping of *Eucalyptus Globulus*. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 29, n. 4, p. 337–357, 30 nov. 2009.

MARTINS, T.M., NUNEZ, O., GALLART-AYALA, H., LEITAO, M.C., GALCERAN, M.T., PEREIRA, C.S. New branches in the degradation pathway of monochlorocatechols by *Aspergillus nidulans*: a metabolomics analysis. **J. Hazard. Mater.** 268, 264–272. 2014.

MARTINEZ, D. et al. Genome Sequence of the Lignocellulose Degrading Fungus *Phanerochaete Chrysosporium* Strain RP78. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 695–700, jun. 2004.

MARTINS, T.M., HARTMANN, D.O., PLANCHON, S., MARTINS, I., RENAUT, J., PEREIRA, C.S. The old 3-oxoadipate pathway revisited: new insights in the catabolism of aromatics in the saprophytic fungus *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet. Biol.** 74, 32–44, 2015.

MATHEW, J. J. et al. Comparative study of the activity of amylase produced by *Aspergillus niger* through solid state fermentation (ssf) using various starchy materials. **Indian Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 3, p. 79–90, 2016.

MAYER, A. M., STAPLES, R. C. LACCASE: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, p. 551–565, 2002.

MCCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S. T. Actinomycetes as Agents of Biodegradation in the Environment — a Review. **Gene**, v. 115, n. 1–2, p. 189–192, jun. 1992.

MCLAUGHLIN, C. P.; MAGEE, T. R. A. The Determination of Sorption Isotherm and the Isothermic Heats of Sorption for Potatoes. **Journal of Food Engineering**, v. 35, n. 3, p. 267–280, fev. 1998.

MENDES REIS, M.; GONÇALVES OLIVEIRA, F.; GONÇALVES LOPES, É. M. Analysis of Reference Evapotranspiration of Janaúba, Mg. **Idesia (Arica)**, n. ahead, p. 0–0, 2016.

MERT, H. H.; DIZBAY, M. The Effect of Osmotic Pressure and Salinity of the Medium on the Growth and Sporulation of *Aspergillus Niger* and *Paecilomyces Lilacinum* Species. **Mycopathologia**, v. 61, n. 2, p. 125–127, jan. 1977.

MESSERSCHMIDT, A.; HUBER, R. The Blue Oxidases, Ascorbate Oxidase, Laccase and Ceruloplasmin Modelling and Structural Relationships. **European Journal of Biochemistry**, v. 187, n. 2, p. 341–352, jan. 1990.

MINTY, J. J.; LIN, X. N. Engineering Synthetic Microbial Consortia for Consolidated Bioprocessing of Lignocellulosic Biomass into Valuable Fuels and Chemicals. In: **Direct Microbial Conversion of Biomass to Advanced Biofuels**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 365–381.

MITCHELL, D. A., BEROVIC, B. & KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 68: 61- 138, 2003.

MITCHELL, D. A., KRIEGER, N., STUART, D. M. & PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation. II: Rational approaches for bioreactor design and operation. **Process Biochemistry**, 35: 1211-1225, 2000.

MURTHY, P. S.; MADHAVA NAIDU, M.; SRINIVAS, P. Production of α -Amylase under Solid-State Fermentation Utilizing Coffee Waste. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, n. 8, p. 1246–1249, ago. 2009.

MURTHY, P. S.; MADHAVA NAIDU, M. Sustainable Management of Coffee Industry By-Products and Value Addition—A Review. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 66, p. 45–58, set. 2012.

NEIFAR, M. et al. Effect of Culturing Processes and Copper Addition on Laccase Production by the White-Rot Fungus *Fomes Fomentarius* MUCL 35117. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 73–78, jul. 2009.

NOCERA, D. G. Solar Fuels and Solar Chemicals Industry. *Accounts of Chemical Research*, v. 50, n. 3, p. 616–619, 21 mar. 2017.

NUGRAHA, R.; YUN, H. S. Enzymatic activity of *Phanerochaete chrysosporium* using Coffee Ground Waste as substrate in Solid State Fermentation. **Biology Engineering, INHA University Namgu Incheon, Korea**, 2013.

OSMA JF, TOCA-HERRERA JL, RODRÍGUEZ-COUTO S. Uses of laccases in the food industry. **Enzyme Res.** p. 1-8. 2010.

PANDEY, A. et al. Biotechnological Potential of Coffee Pulp and Coffee Husk for Bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 2, p. 153–162, out. 2000.

PANDEY, A. Solid-State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 81–84, mar. 2003.

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C.R., NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Curr. Sci.** V.77 (1), p. 149–162. 1999

PANDEY, K. K., PITMAN, A. J. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. **Int Biodeterior Biodegradation** 52:151–160, 2003

PARANI, K.; EYINI, M. **PRODUCTION OF LIGNINOLYTIC ENZYMES DURING SOLID STATE FERMENTATION OF COFFEE PULP BY SELECTED FUNGI.** [s.d.].

PAUL, G. C.; THOMAS, C. R. Characterisation of mycelial morphology using image analysis. In: SCHÜGERL, K. (Ed.). **Relation Between Morphology and Process Performances.** Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 60p. 1–59, 1998.

PAZOTI, M. A; PESSOA, J. D. C.; BRUNO, O. M. Citrusvis – Um sistema de visão computacional no combate à mancha preta em citros. Laranja, **Codeirópolis**, v. 27, n. 2, PP 273-286, 2006.

PICART, P.; DE MARÍA, P. D.; SCHALLMEY, A. From gene to biorefinery: microbial β -etherases as promising biocatalysts for lignin valorization. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 4 set. 2015.

RAGNAR, M. et al. Pulp. In: WILEY-VCH VERLAG GMBH & CO. KGAA (Ed.). **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.** Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Journal of Biotechnology**, v.1, p.1-15, 1998.

RAIS, D.; ZIBEK, S. Biotechnological and Biochemical Utilization of Lignin. In: Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017.

REGALADO, V., RODRIGUEZ, A., PERESTELO, F., CARNICERO, A., DE LA FUENTE, G., FALCON, M. A. Lignin degradation and modification by the soil-inhabiting fungus *Fusarium proliferatum*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 63:3716–8, 1997

REZENDE, M. I.; BARBOSA, A. M.; VASCONCELOS, A. F. D.; HADDAD, R.; DEKKER, R. F. H. Growth and production of laccases by the ligninolytic fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina*, cultured on basal medium containing the herbicide, Scepter® (Imazaquin) *J. Basic Microbiol.* v.45, n.6, p.460-469, 2005

RINALDI, R. et al. Paving the Way for Lignin Valorisation: Recent Advances in Bioengineering, Biorefining and Catalysis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, n. 29, p. 8164–8215, 11 jul. 2016.

RODRÍGUEZ-COUTO, S. Solid-State Fermentation for Laccases Production and Their Applications. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. [s.l.] Elsevier, p. 211–234, 2018.

ROSALES, E.; RODRÍGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M. A. Increased Laccase Production by *Trametes Hirsuta* Grown on Ground Orange Peelings. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1286–1290, abr. 2007.

RUBIA, T. de la et al. Characterization of Manganese-Dependent Peroxidase Isoenzymes from the Ligninolytic Fungus *Phanerochaete Flavidio-Alba*. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 8, p. 547–554, out. 2002.

SAAKE, B.; LEHNEN, R. Lignin. In: WILEY-VCH VERLAG GMBH & CO. KGAA (Ed.). **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic Residues: Biodegradation and Bioconversion by Fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185–194, mar. 2009.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Useful Microbial Enzymes—An Introduction. In: **Biotechnology of Microbial Enzymes**. [s.l.] Elsevier, p. 1–11. 2017.

SCHIRMANN, J. G. et al. Selective Control for the Laccase-Catalyzed Synthesis of Dimers from 2,6-Dimethoxyphenol: Optimization of 3,3',5,5'-Tetramethoxy-Biphenyl-4,4'-Diol Synthesis Using Factorial Design, and Evaluation of Its Antioxidant Action in Biodiesel. **Applied Catalysis A: General**, v. 555, p. 88–97, abr. 2018.

SCHLOSSER, D., GREY, R., HOEFER, C., SCHNEEGASS, I., GUENTHER, K., FASSLER, D. Method for purification waters polluted with widely varying phenolic compound concentrations. **Ger Offen**. 1999.

SCHUTYSER, W. et al. Chemicals from Lignin: An Interplay of Lignocellulose Fractionation, Depolymerisation, and Upgrading. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 3, p. 852–908, 2018.

SHI, J.; CHINN, M.; SHARMASHIVAPPA, R. Microbial Pretreatment of Cotton Stalks by Solid State Cultivation of *Phanerochaete Chrysosporium*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6556–6564, set. 2008.

SHIRAISHI, I. S. Análise do perfil de metabólitos resultante da modificação enzimática da lignina Kraft pelos isolados fúngicos Br-274 e JUMAD002. UTFPR. 30 jun. 2017.

SHRADDHA et al. Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–11, 2011.

SINGH ARORA, D.; KUMAR SHARMA, R. Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 6, p. 1760–1788, mar. 2010.

SJÖSTRÖM, E. Wood chemistry: fundamentals and applications. 2nd ed ed. San Diego: Academic Press, 1993.

STRASSBERGER, Z.; TANASE, S.; ROTHENBERG, G. The Pros and Cons of Lignin Valorisation in an Integrated Biorefinery. **RSC Adv.**, v. 4, n. 48, p. 25310–25318, 2014.

SUKUMARAN, R. K.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K. Enzymes for Bioenergy. In: SUGATHAN, S.; PRADEEP, N. S.; ABDULHAMEED, S. (Ed.). **Bioresources and Bioprocess in Biotechnology**. Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 3–43.

SWEENEY, M. D.; XU, F. Biomass Converting Enzymes as Industrial Biocatalysts for Fuels and Chemicals: Recent Developments. **Catalysts**, v. 2, n. 2, p. 244–263, 12 abr. 2012.

TEN, E.; VERMERRIS, W. Recent Developments in Polymers Derived from Industrial Lignin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 24, 20 jun. 2015.

TERAMOTO, H.; TANAKA, H.; WARIISHI, H. Degradation of 4-Nitrophenol by the Lignin-Degrading Basidiomycete Phanerochaete Chrysosporium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 3, p. 312–317, 1 dez. 2004.

USEPA. Compilation of Air Pollutant Emission Factors. Wood Products Industry. Chemical Wood Pulping, 1990.

VANDEN WYMELENBERG, A. et al. Comparative Transcriptome and Secretome Analysis of Wood Decay Fungi Postia Placenta and Phanerochaete Chrysosporium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 11, p. 3599–3610, 1 jun. 2010.

VENKATESAGOWDA, B. et al. Solid-State Fermentation of Coconut Kernel-Cake as Substrate for the Production of Lipases by the Coconut Kernel-Associated Fungus Lasiodiplodia Theobromae VBE-1. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 129–142, mar. 2015.

VASCONCELOS, A. F. D, BARBOSA A. M., DEKKER R. F. H., SCARMINIO, I. S., REZENDE, M. I. Optimization of laccase production by Botryosphaeria sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method, **Process Biochemistry**, vol. 35, no. 10, pp. 1131–1138, 2000.

VITHANAGE, L. N. G. et al. Value Adding of Poplar Hemicellulosic Prehydrolyzates: Laccase Production by Botryosphaeria Rhodina MAMB-05 and Its Application in the Detoxification of Prehydrolyzates. **BioEnergy Research**, v. 8, n. 2, p. 657–674, jun. 2015.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for Neurospora (medium N). *Microbial Genetics Bulletin*, v. 13, p. 42–43, 1956.

WINTGENS, J. N. (ed.). **Coffee: growing, processing, sustainable production: a guidebook for growers, processors, traders, and researchers**. Second, updated edition ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012.

XIE, S.; RAGAUSKAS, A. J.; YUAN, J. S. Lignin Conversion: Opportunities and Challenges for the Integrated Biorefinery. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 161–167, jun. 2016.

ZAFRA, G.; ABSALÓN, A. E.; CORTÉS-ESPINOSA, D. V. Morphological Changes and Growth of Filamentous Fungi in the Presence of High Concentrations of PAHs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 937–941, set. 2015.

ZAKZESKI, J. et al. The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 6, p. 3552–3599, 9 jun. 2010.

ZÁMOCKÝ, M.; OBINGER, C. Molecular Phylogeny of Heme Peroxidases. In: TORRES, E.; AYALA, M. (Ed.). **Biocatalysis Based on Heme Peroxidases**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 7–35. 2010.