



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA ENGENHARIA
AMBIENTAL

MARCO ANTÔNIO SILVA

**Pré-tratamento fúngico para a melhoria da biodegradabilidade
anaeróbia de água residuária da produção de café solúvel (ARCS)**

São Carlos - SP

2022

MARCO ANTÔNIO SILVA

Pré-tratamento fúngico para a melhoria da biodegradabilidade anaeróbia de água residuária da produção de café solúvel (ARCS)
(versão corrigida)

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Giovana Tommaso

São Carlos - SP

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues
Fontes da EESC/USP

S586p Silva, Marco Antônio
Pré-tratamento fúngico para a melhoria da biodegradabilidade anaeróbia de água residuária da produção de café solúvel (ARCS) / Marco Antônio Silva; orientadora Giovana Tommaso. -- São Carlos, 2022.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Ciências da Engenharia Ambiental -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2022.

1. P.ostreatatus. 2. Lacase. 3. Atracamento molecular. 4. Digestão anaeróbia. 5. Efluentes da produção de café solúvel. 6. Homologia comparativa. 7. Processo aeróbio.
I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **MARCO ANTONIO SILVA**.

Título da dissertação: “Pré-tratamento fúngico para a melhoria da biodegradabilidade anaeróbia de água residuária da produção de café solúvel (ARCS)”.

Data da defesa: 15/07/2022.

Comissão Julgadora

Resultado

Profa. Associada **Giovana Tommaso** (Orientadora) Aprovado
(Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/ FZEA-USP)

Profa. Dra. **Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic** Aprovado
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Dr. **Sérgio Luiz Moreira Neto** Aprovado
(BioBreyer)

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:

Prof. Titular **Marcelo Zaiat**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

DEDICATÓRIA

*À Deus, à Mãezinha Santíssima, à
Dona Hinácia, à Jurema, às minhas
mães, Telma e Ilma, e à minha
amada família.*

“Deus nunca irá colocá-lo onde não tenhas instrumentos para prosseguir. Segue e confie.”

Dona Hinácia

“Menino Índio, acredite, eu sempre estarei contigo, confie em sua Mãe, Mãe Jurema.”

Cabocla Jurema

AGRADECIMENTOS

À Deus e ao amigo Jesus pela oportunidade desta encarnação e por todas as coisas e pessoas que colocou em minha vida, essas foram suporte para realização desta conquista em meio de tantos obstáculos.

A Dona Hinácia, minha mentora espiritual, que sempre esteve ao meu lado, aconselhando-me, amando-me em sua infinita simplicidade e consolo singular.

A Cabocla Jurema, por seu afeto materno, direcionamento e proteção pelos lugares onde eu passei e ainda irei passar.

As minhas mães, Telma e Ilma, por toda dedicação e amor materno. Muito do que sou é devido essas mulheres por meio de singelos ensinamentos, bom... alguns gritos também (Ilma), mas fez parte. Ah, como eu sou grato! Eu amo vocês.

As minhas irmãs, Amélia e Milenna, por quem sinto enorme amor, e que sempre torceram pelo meu sucesso e minha evolução pessoal e profissional.

A minha amada afilhada, Maria Helena “PomPom”, com sua alegria e amor incondicional trouxe paz e união para a minha família de forma afável e colorida.

A minha família, Luiza, Conceiça, Gorete, Ana Flávia, Zezão, Domingos, Neyde, Léo, Izabel, e todo aquele, responsável pela torcida e alegria constante em minhas conquistas.

A minha avó, Maria (*in memorium*), a meu avô, Agripino (*in memorium*). Guardo grande afeto a estes nomes.

A minha orientadora, Giovana Tommaso, por todo empenho e ensinamentos que me proporcionou nesses dois anos. Agradeço a paciência e todo esse carinho singular. Agradeço toda a humanidade que teve comigo, e boas risadas. Espero um dia retribuir de alguma forma.

A minha co-orientadora, Glauciane, pelo acolhimento como filho, amigo e orientando, e que está comigo desde quando era IC na UFCG. Eu agradeço muito todo empenho e ensinamentos nesse trabalho, que só pôde ser realizado devido seu auxílio constante. A senhora formou um feliz pesquisador. Em meio de sua vida agitada e difícil, sempre soube ensinar e amar. Gratidão.

Ao professor Rafael Maia, que com sua genialidade me proporcionou abrilhantar minha pesquisa com um mundo infinito: a biologia computacional. Uma pessoa que possui meu respeito e admiração.

A professora Eliana Kamimura por permitir que eu conduzisse meus experimentos no Laboratório de Bioprocessos e pelos ensinamentos acerca dos Planejamentos de Experimentos, que foram essenciais para a construção desta pesquisa. Uma pessoa feliz e solícita, obrigado.

Ao Handray por todo seu auxílio no Laboratório de Bioprocessos, agradeço a atenção e disponibilidade.

Aos professores Rogers Ribeiro, Valéria Del Nery, Valdeir Arantes, e em especial, o professor Marcelo Zaiat, um excelente profissional e um ser humano ímpar, um exemplo a ser seguido.

À Marié, amiga para toda vida; obrigado por me ensinar tanto sobre digestão anaeróbia e pelas discussões tão gentis. Gratidão pelo auxílio na condução dos experimentos. Você é um grande ser humano e sou grato por existir.

Aos meus amigos do LBA: a Diana – “Canta uma música para mim, Di? Porfavorzinho, só uma?”; a Gilda – “Você já comeu? Tem que comer... Eu trouxe um bolinho para você. Coma!”; a Kyara – “Vamos trabalhar, Kyara, você não quer trabalhar? Vamo trabalhar...”; Danilo – “Dan, me dá uma carona?”; Gabriel – “Esse reator vai dar um trabalho...”. Foram as frases que eu mais falava para cada um. Obrigado por me aguentarem, eu sei que não é fácil. Foram felizes momentos, obrigado.

Aos meus amigos do mestrado, Mateus Cottorello (uma pessoa querida), Elias Gabriel, Bryan, Renan, pelos momentos de estudo e risadas.

Aos meus pupilos, Fabrício, que esteve comigo trabalhando no LBA; e ao José, do Laboratório de Microbiologia/UFCG, que foi incrível nas discussões sobre métodos e resultados *in silico*. Obrigado por dividirem o conhecimento de vocês.

Ao Arthur, que nesse período em Pirassununga, sempre limpou as bagunças e resquícios de experimentos em nossos Laboratórios no ZEA, muito obrigado.

A querida amiga e braço direito, Kamila Sotero, pessoa que esteve e está comigo em todos os momentos. Foram dois anos de muita alegria, momentos difíceis, e principalmente, de decisões. Gratidão por estar em todos os momentos. Pessoa a quem expressei minha gratidão e

admiração. A denço, Taliana Simões, que de uma forma singela e elegante, esteve torcendo por mim em todas minhas conquistas.

Ao meu amigo de infância, André, que sempre esteve disponível para me ouvir e que sempre me deu conselhos não muitos úteis. Eu agradeço pela compreensão e a pela nossa duradoura amizade.

A meus *roommates* de São Carlos, Anne, Amora, Tia Ma, Vini e Beli (por quem eu tenho um carinho gigantesco), e nossos felizes agregados Vina e Luciano. Que saudades de estar com vocês, nossos almoços, banhos de sol, nosso quintal, e muita, muita arte e felicidade. Na “Aquidapão”, eu estava em casa. Sou muito grato por estarem comigo em um momento tão delicado que a pandemia nos proporcionou. Gratidão!

A meus *roommates* de Pirassununga, Orlof, o Vy, Gabrielzinho, e nossos agregados, Mandi, Fordo e o Baseado, por todo carinho. Esses meses foram repletos de alegrias e cumplicidade. Espero em breve vê-los para assistirmos “Tropa de Elite”.

A todas as pessoas que a dança me presenteou nesses dois anos: no *Ballet Expressão*, a Carolinda, a Gabi, ao Jailton (Tom), a Bibelo (um ser maravilhoso), a Allane, ao Antônio, ao Dan; no *Ballet Theatre*, a Aline (uma amizade para toda vida), a Bela, a Rubya, a Vanessa, a Thaís. A dança sempre foi meu suporte para a vida, e vocês fizeram isso ser mais brilhante. Obrigado.

A meus amigos, frutos do UFCG, Kame, Taliana (Dêngo), Davi, Tácia, Laura e Caio, muito obrigado por estarem comigo nessa minha trajetória, foram bons momentos, em especial, quando caiu o dilúvio em Pirassununga em minha despedida haha. Somos bons e estranhos amigos.

A meus amigos, Carla (uma amiga excepcional), Biel (um grande amigo), Dudé, Alice, Lohan, Claudino, MB e Claudino, grato pela amizade e muitas risadas todas as vezes que nos reunimos.

Aos presentes que Santa Maria me concedeu: minha colega de trabalho, Silvana (=Silmara), meus estagiários, Cris, Artilheira do Amor, e Alex do Container; e a dona Ruth, por todo carinho, e por todos os salgadinhos de presente enquanto estava a concluir minha dissertação.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, processo 130739/2020-0, pelo fornecimento da bolsa de mestrado.

À Universidade de São Paulo, a Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), a Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), ao Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LBA) e ao Laboratório de Bioprocessos por contribuírem e possibilitarem minha formação como mestre em Ciências da Engenharia Ambiental.

A cada um que, de uma forma ou outra, diretamente ou indiretamente, esteve na construção dessa formação que se torna tão importante para mim, devido o momento em que foi construída. A pandemia pelo Covid-19 nos trouxe muitas perdas, e eu sou grato por essa vitória.

Muito obrigado!

EPÍGRAFE

“Reconhece-O, em tudo e todos, mediante
uma vida feliz, na tua condição de um filho
bem-amado.”

Joanna de Ângelis
Livro Vida Feliz, Cap. 200.

RESUMO

SILVA, M.A. **Pré-tratamento fúngico para a melhoria da biodegradabilidade anaeróbia de água residuária da produção de café solúvel (ARCS)**. 2022. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

A indústria do café representa grande importância comercial para muitos países emergentes, em especial, o Brasil. Entretanto, essa produção é responsável pela geração de grande quantidade de efluentes durante o processo produtivo industrial. A água residuária do café solúvel (ARCS) é de difícil degradação por possuir grande quantidade de matéria orgânica e componentes tóxicos, por isso há necessidade de aplicação de tratamento prévio dessa água residuária antes do descarte. O presente trabalho propôs o aumento da biodegradabilidade de compostos fenólicos totais (CFT) da ARCS a partir de três pilares: estudo *in silico*, isto é a avaliação de enzima lacase (enzima alvo) na modificação de estruturas tóxicas presentes na ARCS; estudo de processo aeróbio fúngico por *Pleurotus ostreatus* em estado sólido e líquido; e pelo estudo da biodegradabilidade anaeróbia da ARCS pré-tratada por *P. ostreatus*. A viabilidade do pré-tratamento foi determinada por estudo *in silico*, o que incluiu a construção de um modelo teórico da lacase de *P. ostreatus*, seguida por testes de atracamento molecular entre um modelo teórico da lacase e as moléculas presentes na ARCS. A tolerância de *P. ostreatus* à ARCS foi avaliada em meio sólido contendo a ARCS. A otimização da degradação dos componentes fenólicos da ARCS por *P. ostreatus*, *in vivo*, em meio líquido foi avaliada utilizando dois delineamentos experimentais: Plackett Burman (PB) e Planejamento Fatorial (PF). Após a escolha da condição de pré-tratamento, a biodegradabilidade anaeróbia da ARCS pré-tratada e da ARCS *in natura* foi determinada. Os estudos *in silico* indicaram que o modelo teórico da lacase apresentou boa qualidade e os testes de atracamento molecular demonstraram o potencial de degradação dos componentes da ARCS pela lacase, isto é, em todos os atracamentos moleculares foi observado o estabelecimento de pontes de hidrogênio, com exceção da cafeína. *P. ostreatus* foi capaz de crescer em presença de ARCS, tendo tolerado uma concentração de até 100%, além de descolorir a ARCS em meio BDA contendo 100% da água residuária. O PB e o PF indicaram que o tratamento da ARCS pelo basidiomiceto *P. ostreatus* promoveu a remoção de CFT da ARCS. Verificou-se no PB que a concentração de extrato de levedura apresentou efeito estatisticamente negativo sobre a redução de CFT enquanto o número de discos de crescimento micelial de *P. ostreatus*, o pH, agitação e a concentração inicial da ARCS favorecem a redução de CFT. No PF, somente a concentração inicial da ARCS foi estatisticamente significativa em relação a remoção de CFT. O pré-tratamento fúngico realizado em 15 dias promoveu a redução na produção de metano, sugerindo que o tempo de pré-tratamento possa ter promovido a metabolização de açúcares importantes para a biodegradabilidade anaeróbia e que o fungo pode ter produzido metabólitos secundários inibitórios para o consórcio microbiano na digestão anaeróbia.

Palavras-chave: atracamento molecular, digestão anaeróbia, efluentes da produção de café solúvel, homologia comparativa, lacase, *P. ostreatus*, processo aeróbio.

ABSTRACT

SILVA, M.A. 2022. **Fungal pretreatment to improve the anaerobic biodegradability of wastewater from soluble coffee production (SCWW)**. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

The coffee industry represents great commercial importance for many emerging countries, especially Brazil. However, this production is responsible for generating large amounts of effluents during the industrial production process. Soluble coffee wastewater (SCWW) is difficult to degrade because it has a large amount of organic matter and toxic components, so there is a need to apply pretreatment of this wastewater before disposal. The present work proposed to increase the biodegradability of total phenolic compounds (TPC) from SCWW based on three pillars: in silico study, that is, the evaluation of the laccase enzyme (target enzyme) in the modification of toxic structures present in SCWW; study of the aerobic fungal process by *Pleurotus ostreatus* in the solid and liquid state; and by studying the anaerobic biodegradability of SCWW pretreated by *P. ostreatus*. The feasibility of the pretreatment was determined by an in silico study, which included the construction of a theoretical model of the *P. ostreatus* laccase, followed by molecular docking tests between a theoretical model of the laccase and the molecules present in SCWW. The tolerance of *P. ostreatus* to SCWW was evaluated in a solid medium containing SCWW. The optimization of the degradation of the phenolic components of SCWW by *P. ostreatus*, in vivo, in a liquid medium was evaluated using two experimental designs: Plackett Burman (PB) and Factor Design (FD). After choosing the pretreatment condition, the anaerobic biodegradability of the pretreated and in natura SCWW was performed. The in silico studies indicated that the theoretical model of the laccase presented good quality, and the molecular docking tests demonstrated the potential for degradation of the SCWW components by the laccase; that is, in all molecular dockings, the establishment of hydrogen bonds was observed, with except for caffeine. *P. ostreatus* grew in the presence of SCWW, having tolerated a concentration of up to 100% and decolorized SCWW in a PDA medium containing 100% of the wastewater. The PB and FD indicated that the treatment of SCWW by the basidiomycete *P. ostreatus* promoted the removal of TPC from the SCWW. It was found in PB that the concentration of yeast extract had a statistically negative effect on the reduction of TPC. In contrast, the number of mycelial growth discs of *P. ostreatus*, pH, agitation, and the initial concentration of SCWW favored the reduction of TPC. In FD, only the initial concentration of SCWW was statistically significant for TPC removal. The fungal pretreatment carried out in 15 days promoted a reduction in methane production, suggesting that the pretreatment time may have promoted the metabolization of necessary sugars for anaerobic biodegradability and that the fungus could have produced secondary inhibitory metabolites for the consortium microbial in anaerobic digestion.

Keywords: anaerobic digestion, aerobic process, comparative homology, effluents from soluble coffee production, laccase, molecular docking, *P. ostreatus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Participação nas exportações, por origem, de café solúvel.....	4
Figura 2. Fluxograma do processamento do café solúvel.	5
Figura 3. Modo de ação de fungos de podridão branca.....	8
Figura 4. Fungo basidiomiceto <i>Pleutorus ostreatus</i>	9
Figura 5. Distribuição de 2626 patentes relacionadas com lacase depositadas de 2008-2019 de acordo com a classificação de palavras-chave e títulos de seção CA do banco de dados <i>SciFinder</i>	11
Figura 6. Resumo da metodologia.....	19
Figura 7. Etapas da modelagem comparativa para construção do modelo teórico 3D da lacase de <i>P. ostreatus</i>	20
Figura 8. Alinhamento múltiplo da lacase de <i>P. ostreatus</i> AOM73725.1 com as estruturas 1GYC, 5A7E, 2HRG e 4JHU.....	34
Figura 9. Domínios e pontes dissulfeto da estrutura do modelo tridimensional da lacase de <i>Pleurotus ostreatus</i> Lacc 4.	36
Figura 10. Validação dos modelos pelo gráfico de Ramachandran: distribuição dos resíduos de aminoácidos que compõem a estrutura tridimensional da lacase de <i>P. ostreatus</i>	38
Figura 11. Comparação entre os modelos <i>Lacc 4</i> e 4JHU, visualizada no software PyMOL..	39
Figura 12. Possíveis sítios de ligação vistos no Ghecom, calculados dentro de um raio de 4Å do modelo <i>Lacc 4</i>	41
Figura 13. Caracterização eletrostática do modelo <i>Lacc 4</i> , visualizada no software PyMOL.	42
Figura 14. Comparação entre o modelo <i>Lacc 4</i> e a estrutura 1KYA, visualizada no software PyMOL.....	43
Figura 15. Atracamento molecular entre a lacase de <i>Pleurotus ostreatus</i> e as estruturas da cadeia produtiva do café solúvel.....	47
Figura 16. Crescimento Micelial de <i>P. ostreatus</i> em concentrações crescentes de ARCS em ágar (agente solidificante).	52
Figura 17. Crescimento Micelial de <i>P. ostreatus</i> nas concentrações 0%, 10% e 100% em meio BDA.....	53
Figura 18. Descoloração da ARCS a partir da classificação de cores pelo espaço CIELAB durante 15 dias.....	55
Figura 19. Avaliação visual da descoloração do meio BDA em 100% da ARCS por <i>P. ostreatus</i> durante 15 dias.....	56
Figura 20. Atividade de lacase e compostos fenólicos totais em ARCS a 10%.....	57
Figura 21. Biomassa e Demanda Química de Oxigênio (DQO) em ARCS a 10%. a: biomassa (g 100mL ⁻¹); b: DQO mg DQO.L ⁻¹)	58
Figura 22. Diagramas de Pareto e significância das variáveis estudadas para o intervalo de confiança de 90%. A (Remoção de Compostos fenólicos) e B (Descoloração da ARCS).	60
Figura 23. Ensaio provenientes da matriz Plackett & Burman com 12 condições experimentais (E1-E12).	61
Figura 24. Perfil da concentração de CFT, matéria orgânica expressa em DQO, produção de lacase e pH durante a processo líquido em ARCS.	65

Figura 25. Biomassa de <i>P. ostreatus</i> ao fim de processo líquido em ARCS, em 15 dias.	66
Figura 26. Diagramas de Pareto e significância das variáveis estudadas para o intervalo de confiança de 90% em relação a remoção de CFT.	68
Figura 27. Diagramas de Pareto e significância das variáveis estudadas para o intervalo de confiança de 90% em relação a descoloração.	69
Figura 28. Recorte visual em Erlenmeyer de cada tratamento utilizado para a construção do Planejamento Fatorial após 15 dias de processo aeróbio submerso.	69
Figura 29. Fatorial 2^3 – Gráficos de superfície e curva de contorno: descoloração da ARCS por <i>P. ostreatus</i>	73
Figura 30. Fatorial 2^3 - rendimento da produção de lacase em ARCS por <i>P. ostreatus</i>	76
Figura 31. Produção acumulada de metano.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos da cadeia produtiva do café solúvel.....	24
Tabela 2. Delineamento Experimental Plackett-Burman apresentando os níveis para cada variável.	27
Tabela 3. Matriz do Delineamento Experimental – Plackett Burman.....	27
Tabela 4. Níveis de planejamento experimental.....	28
Tabela 5. Matriz do Delineamento Experimental – Planejamento Fatorial	28
Tabela 6. Sequências moldes pelo servidor BLASTp para a lacase de <i>P. ostreatus</i>	31
Tabela 7. Dados da validação dos modelos teóricos pelo gráfico de Ramachandran	38
Tabela 8. Dados da validação dos modelos teóricos pelo VERIFY 3D, ERRAT e PROVE. ..	39
Tabela 9. Aminoácidos que fazem parte dos sítios catalíticos 3 e 5 do modelo <i>Lacc</i> 4, obtidos por meio do Ghecom.	42
Tabela 10. Energia global e pontes de hidrogênio dos respectivos atracamentos moleculares.	45
Tabela 11. Parâmetros físico-químicos da ARCS.	50
Tabela 12. Análise Colorimétrica do efeito <i>P. ostreatus</i> em meio sólido (BDA + ARCS 100%)	55
Tabela 13. Matriz de Plackett & Burman codificada para o design com 12 condições experimentais (E1-E12) e três repetições do ponto central (PC1-PC3) com suas respectivas variáveis respostas	60
Tabela 14. Dados estatísticos obtidos após a realização dos ensaios para seleção de variáveis significativas para as variáveis resposta remoção de CFT e descoloração da ARCS.	61
Tabela 15. Remoção de Compostos Fenólico Totais (CFT) e de cor de ARCS por <i>P. ostreatus</i> após 15 dias de processo aeróbio submerso.	67
Tabela 16. Efeitos Principais e Interações na remoção de CFT da ARCS por <i>P. ostreatus</i>	67
Tabela 17. Efeitos Principais e Interações na descoloração da ARCS por <i>P. ostreatus</i>	68
Tabela 18. Coeficientes de regressão do fatorial 2^3 para avaliação do rendimento da remoção de CFT de ARCS por <i>P. ostreatus</i>	70
Tabela 19. Análise de Variância (ANOVA) para a remoção de CFT em ARCS por <i>P. ostreatus</i>	71
Tabela 20. Coeficientes de regressão do fatorial 2^3 para avaliação do rendimento descolorização da ARCS por <i>P. ostreatus</i>	71
Tabela 21. Análise de Variância (ANOVA) para a descoloração da ARCS por <i>P. ostreatus</i> . ..	72
Tabela 22. Coeficientes de regressão do fatorial 2^3 para avaliação do rendimento descolorização da ARCS por <i>P. ostreatus</i>	74
Tabela 23. Análise de Variância (ANOVA) para a descoloração da ARCS por <i>P. ostreatus</i> . ..	75

LISTA DE SIGLAS

A/M – Relação Alimento/Microrganismo

ABICS - Associação Brasileira da Indústria de Café Solúvel

ANOVA - Análise de Variância

ARAO – Água Residuária de Processamento de Azeite de Oliva

ARCS – Água Residuária de Café Solúvel

BDA – Batata-dextrose-ágar

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BLASTp - *Search Protein Databases Using a Protein Query*

BMP - *Biochemical Methane Potential*

C/N – Relação Carbono/Nitrogênio

CCIBt - Coleção de Cultura de Algas, Cianobactérias e Fungos

CFT – Compostos Fenólicos Totais

DA – Digestão Anaeróbia

DBO - Demanda Biológica de Oxigênio

DQO - Demanda Química de Oxigênio

EAG - Equivalentes de Ácido Gálico –

FID- Detector de Ionização de Chama

IBt - Instituto de Botânica

kW – Quilowatt

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NCD - Contribuição Nacional Determinada

PB – Plackett-Burman

PDB - *Protein Data Bank*

PF – Planejamento Fatorial

pH – Potencial Hidrogeniônico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. Café Solúvel	3
2.1.1. Água Residuária do Café solúvel: características	5
2.2. Fungos lignocelulolíticos e <i>Pleurotus ostreatus</i>	7
2.3. Enzimas do Complexo Ligninolítico: lacases	9
2.3.1. Aplicação da lacase na degradação de compostos fenólicos e não fenólicos	11
2.4. Bioinformática	13
2.4.1. Modelagem de Proteínas por Homologia Comparativa	14
2.4.2. Atracamento molecular	15
2.5. Digestão anaeróbia.....	16
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS	17
4. METODOLOGIA.....	18
4.1. Caracterização da água residuária do café solúvel (ARCS).....	19
4.2. Estudo <i>in silico</i>	19
4.2.1. Etapas dos estudos <i>in silico</i>	20
4.2.2. Identificação de moldes homólogos.....	20
4.2.3. Alinhamento Múltiplo e análise de sequências de aminoácidos.....	21
4.2.4. Construção e avaliação dos modelos teóricos de lacase de <i>P. ostreatus</i>	21
4.2.5. Validação dos modelos.....	22
4.2.6. Análise Estrutural dos modelos.....	22
4.2.7. Atracamento molecular entre a lacase <i>P. ostreatus</i> e compostos fenólicos.....	23
4.3. Estudo do pré-tratamento da ARCS usando fungo basidiomiceto.....	25
4.3.1. Inóculo de Basidiomiceto	25
4.3.2. Cultivo sólido de <i>P. ostreatus</i>	25
4.3.2.1. Tolerância do fungo a ARCS em meio sólido.....	25
4.3.2.2. Adaptação do fungo em meio sólido BDA	26
4.3.2.3. Descoloração da ARCS em meio sólido por <i>P. ostreatus</i>	26
4.3.3. Biotransformação da ARCS por <i>P. ostreatus</i> em meio líquido	26
4.3.3.1. Inóculo para o cultivo líquido – adaptação de <i>P. ostreatus</i> a ARCS.....	26
4.3.3.2. Pré-tratamento da ARCS em meio líquido - Delineamento Experimental – Plackett Burman (PB).....	27

4.3.3.3. Pré-tratamento da ARCS em meio líquido - Delineamento experimental – Planejamento fatorial (PF)	28
4.3.4. Análises físico-químicas e enzimática– avaliação de degradação da ARCS por <i>P. ostreatus</i>	29
4.4. Digestão Anaeróbia.....	29
4.4.1. Caracterização do inóculo.....	29
4.4.2. Pré-exposição do inóculo a ARCS	29
4.4.3. Determinação de Potencial Metanogênico	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. Estudos <i>in silico</i> – Construção do modelo teórico tridimensional da lacase de <i>P. ostreatus</i> e atracamento molecular	31
5.1.1. Identificação de moldes homólogos	31
5.1.2. Alinhamento Múltiplo e análise da sequência de aminoácidos	33
5.1.3. Construção dos modelos teóricos da lacase de <i>P.ostreatus</i>	37
5.1.4. Validação dos modelos.....	37
5.1.5. Análise estrutural do modelo teórico – <i>Lacc 4</i>	39
5.1.6. Atracamento Molecular entre a lacase de <i>Pleurotus ostreatus</i> e a estruturas da cadeia produtiva do café	44
5.2. Caracterização da água residuária do café solúvel	50
5.3. Estudo do tratamento da ARCS por meio do fungo <i>P. ostreatus</i>	50
5.3.1. Cultivo sólido de <i>P. ostreatus</i> em ARCS	50
5.3.1.1. Crescimento Micelial de <i>P. ostreatus</i> em diferentes meios de cultura	50
5.3.1.2. Descoloração do meio de cultura contendo ARCS (100%) por <i>P. ostreatus</i>	54
5.3.2. Biotransformação da ARCS por <i>P. ostreatus</i> em meio líquido	57
5.3.2.1. Avaliação da remoção de compostos fenólicos.....	57
5.3.2.2. Seleção de variáveis - Delineamento Experimental: Plackett-Burman (PB).....	58
5.3.2.3. Delineamento Experimental: Planejamento Fatorial 2 ³	62
5.4. Biodegradabilidade anaeróbia da ARCS.....	77
6. CONCLUSÕES.....	81
7. ESTUDOS FUTUROS PROPOSTOS.....	82
ANEXO 1 Crescimento do <i>P. ostreatus</i> em meio BDA durante 14 dias.....	83
ANEXO 2 – Crescimento de <i>P. ostreatus</i> em meio DBA contendo 100% da ARCS.	84
ANEXO 3 - Biomassa de <i>P. ostreatus</i> após 15 dias do Planejamento Fatorial 2 ³ : a. após fim de processo aeróbio; b. após secagem (massa seca).	85
REFERÊNCIAS	86

1. INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais populares no globo, configurando-se como o segundo produto mais comercializado, depois do petróleo. Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Café Solúvel - ABICS (2020), o Brasil é líder mundial na produção e exportação de café solúvel, consolidando-se no mercado global de café. Alvarez e Sarmiento (2016) reportam que a indústria de produção de café solúvel processa, aproximadamente, 100 toneladas de grãos de café por dia, obtendo uma produção diária de 40 toneladas de café solúvel.

Entretanto, essa produção é responsável pela geração de uma grande quantidade de efluentes durante o processo produtivo industrial. Durante a produção de café solúvel, é gerado um volume de água residuária, que pode variar entre 40 a 45L para cada quilograma de café processado (IBARRA-TAQUEZ et al., 2017). A água residuária de café solúvel (ARCS) possui alto potencial de poluição, sendo observadas altas demanda química de oxigênio (DQO) e demanda biológica de oxigênio (DBO). A água residuária também apresenta várias macromoléculas, tais como os polifenóis, taninos, cafeína (KOSTENBERG; MARCHAIM, 1993; MOSQUERA et al., 2019a). Em razão do acúmulo de nutrientes, como fósforo e nitrogênio, assim como potássio, além de coloração escura associada a presença de compostos fenólicos (SAXENA, 2016), a ARCS pode causar eutrofização de rios. Diante disso, métodos de mitigação devem ser estudados a fim de buscar soluções ambientalmente favoráveis e viáveis economicamente para gerenciamento dessa ARCS.

A digestão anaeróbia (DA) vem sendo pesquisada como alternativa para o tratamento de águas residuárias por apresentar baixo consumo de energia, baixa produção de lodo e a possibilidade de operação a partir de uma variedade de substratos (PENG et al., 2020; THANGAMANI; RAJAKUMAR; RAMANUJAM, 2010). Além disso, esse processo possui a vantagem de converter resíduos orgânicos em biogás (THANGAMANI; PARTHIBAN, 2011) com a possibilidade de geração de energia, consolidando-se em abrangência no setor político, social e econômico (TUCKER, 2014).

Segundo a Contribuição Nacional Determinada (NCD), o Brasil comprometeu-se a reduzir suas emissões de gases de efeito estufa em 37% até 2025 e 43% até 2030 em relação a níveis de 2005. Sendo assim, a otimização de processos biológicos para a produção de metano como fonte de energia elétrica, a partir da biodegradação anaeróbia da ARCS, poderá contribuir para que o Brasil possa atingir as metas de estabelecidas pelo NCD (BRAZIL, 2020).

Pesquisadores têm avaliado o uso da DA para tratamento da ARCS (DINSDALE; HAWKES; HAWKES, 1997b; PAREDES; MENDOZA; MOREIRA, 2018). Entretanto, a presença de substâncias tóxicas, principalmente compostos fenólicos, pode inibir etapas da DA (KOSTENBERG E MARCHAIM; 1993), e comprometer a eficiência na produção de metano durante o processo. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de pré-tratamentos que possam aumentar a biodegradabilidade e a biodisponibilidade de matéria orgânica para microrganismos anaeróbios, maximizando a produção de energia (PASSOS et al., 2018; RUGGERI et al., 2015).

Os fungos basidiomicetos de podridão branca são conhecidos por produzirem um aparato enzimático inespecífico capaz de degradar a lignina, bem como compostos fenólicos poluentes oriundos de matéria orgânica como clorofenóis, corantes azo e antraquinônicos, herbicidas, agrotóxicos (HENN et al., 2020; PATEL et al., 2019; SCHLOSSER, 2020). A aplicação desse tipo de tratamento *in vivo* requer baixo custo operacional, além de reduzir a toxicidade de efluentes sintéticos tóxicos e recalcitrantes (COELHO et al., 2020).

Dentre as enzimas envolvidas na degradação da lignina e de outros compostos orgânicos, destacam-se as lacases, que são enzimas ligninolíticas capazes de catalisar a oxidação de vários compostos aromáticos concomitantemente à redução de oxigênio molecular a água (JANUSZ et al., 2020). As lacases vêm sendo aplicadas para a degradação de diferentes tipos de compostos orgânicos recalcitrantes, como compostos fenólicos (BERNATS; JUHNA, 2018; KŘESINOVÁ et al., 2018), os corantes têxteis sintéticos (ALMEIDA et al., 2018; MOREIRA; MILAGRES; MUSSATTO, 2014) e organoclorados (COELHO et al., 2019), e por isso, são consideradas enzimas “*eco friendly*”, pois contribuem para o desenvolvimento de tecnologias verdes (RODRIGUEZ-COUTO, 2012; SENTHIVELAN; KANAGARAJ; PANDA, 2016).

Associadas a tratamentos enzimáticos, pesquisas de biologia computacional identificaram a viabilidade da lacase de fungos basidiomicetos em degradar compostos complexos (HONGYAN et al., 2019; VIDAL-LIMON et al., 2018), o que demonstra o potencial dessa enzima para aplicação no pré-tratamento de ARCS.

Considerando que os fungos são capazes de crescer sob condições de estresse ambiental, as quais geralmente limitam o crescimento bacteriano (MAGAN; FRAGOEIRO; BASTOS, 2010), e que fungos basidiomicetos produzem um complexo enzimático ligninolítico inespecífico capaz de degradar uma variedade de xenobióticos (MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2015; SINGH; GUPTA, 2020), a aplicação de basidiomicetos no pré-tratamento da ARCS apresenta-se promissora.

Os pré-tratamentos de biomassa lignocelulósica abrangem diversos métodos, como físicos, químicos, térmicos, biológicos. De forma genérica, esses métodos têm como finalidade aumentar a acessibilidade de estruturas de interesse industrial, como a celulose. Em busca de viabilidade econômica e métodos mais corretos ambientalmente, os tratamentos biológicos são mais economicamente viáveis do que os físicos e químicos, visto que consomem menos energia e, dependendo das condições operacionais, não produzem inibidores, além de não requererem de substâncias químicas (TIAN; FANG; GUO, 2012). O pré-tratamento de água residuária proveniente da produção industrial de café a partir de fungo basidiomiceto visa contribuir para futuras pesquisas no entendimento e sugestões do metabolismo e método operacional de *P. ostreatus* no tratamento da ARCS e nas possíveis consequências para a digestibilidade anaeróbia.

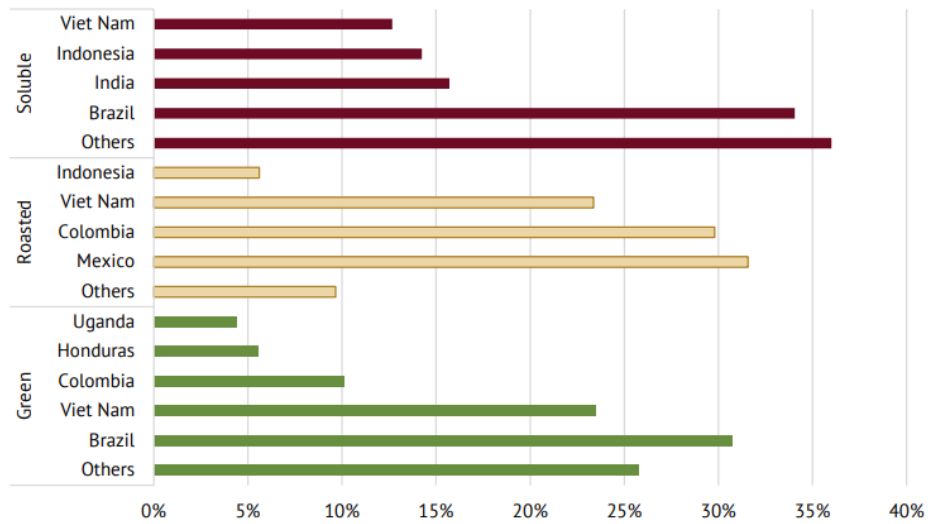
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Café Solúvel

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, configurando-se como o segundo produto mais consumido depois do petróleo. Estima-se que o consumo global de café aumente, principalmente nos continentes em que esta bebida não é consumida tradicionalmente, que são: África, Ásia e Oceania (SAMOGGIA; RIEDEL, 2019). O Brasil tem sido o maior produtor deste grão (CONAB, 2020), sendo que no levantamento da safra de 2020 o Brasil teve uma produção de 44,5 milhões de sacas de café, considerando a soma de café verde, solúvel, torrado e moído, representando ao país um novo recorde histórico das exportações, com um crescimento de 9,4% em relação ao volume total exportado em 2019 (ABICS, 2020).

Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Café Solúvel - ABICS (2020), o Brasil é líder mundial na produção e exportação de café solúvel. No período entre outubro de 2019 a junho de 2020, o Brasil exportou equivalente a 2,94 milhões de sacas (Figura 1), consolidando-se no mercado global, como demonstra o relatório sobre o mercado cafeeiro emitido pela Organização Internacional do Café (EMBRAPA, 2020). Essa grande produção de café ocorre majoritariamente em países em desenvolvimento como o Brasil, Colômbia, Costa Rica e Vietnã, contribuindo significativamente para o produto interno bruto desses países (DE LIMA et al., 2020). Além disso, tem-se os países Estados Unidos da América, as Filipinas, a Federação Russa, a Polônia, a Malásia e o Japão como maiores importadores de café solúvel.

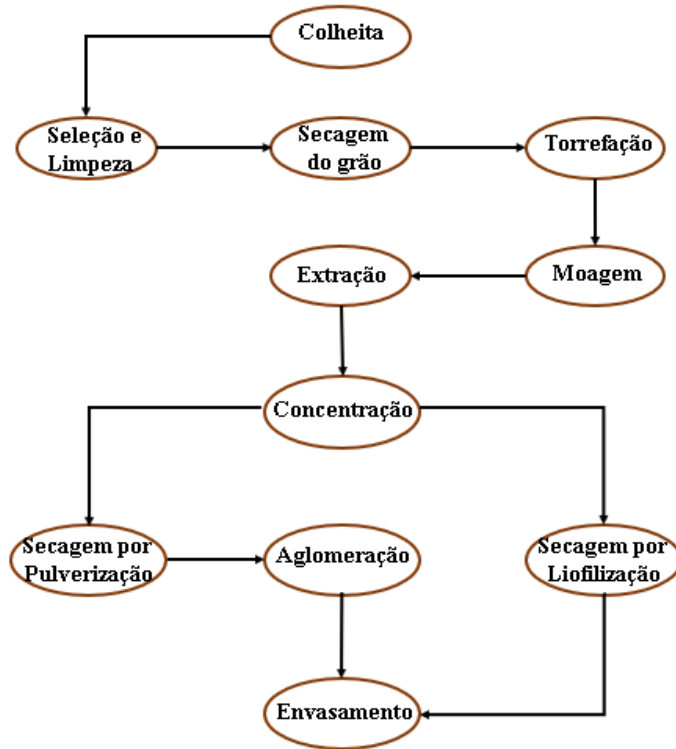
Figura 1. Participação nas exportações, por origem, de café solúvel.



Fonte: OIC (2020)

A produção do café solúvel é iniciada pela seleção e separação dos grãos de café, que após limpos e secos, por via mecânica ou solar, são torrados e moídos para o desenvolvimento do aroma, sabor e melhor extração das substâncias voláteis que são extraídas com água. A desidratação no processo é realizada por meio da pulverização (*spray drying*) ou liofilização (*freeze-drying*). Ao fim, ocorre a aglomeração e envasamento (Figura 2) (ISHWARYA; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2015).

Figura 2. Fluxograma do processamento do café solúvel.



Fonte: Modificado de ESTEVES (2006).

Além do aspecto econômico, Messina et al. (2015) relatam o potencial do café na qualidade de vida das pessoas, como por exemplo, pela atuação antioxidante a partir de suas propriedades bioquímicas. Além de aspectos benéficos do café solúvel são semelhantes aos do café torrado e moído.

A indústria de café solúvel processa, aproximadamente, 100 toneladas de grãos de café por dia, obtendo uma produção diária de 40 toneladas de café solúvel (ALVAREZ; SARMIENTO, 2016). Essa grande produção de café solúvel acarreta a geração de efluentes que correspondem em 60% em resíduos, constituídos pela borra do café e pela água residuária oriunda do processo de extração (ALVAREZ; SARMIENTO, 2016), com alta carga de poluição (ZARRINBAKSH et al., 2016).

2.1.1. Água Residuária do Café solúvel: características

Estima-se que a produção de café solúvel pode gerar 2400 a 2700 L de água residual por saca de café processado, caracterizados por alto teor de DQO, DBO, além de polifenóis, taninos, cafeína (IBARRA-TAQUEZ et al., 2017; KOSTENBERG; MARCHAIM, 1993; MOSQUERA et al., 2019a). Além da elevada carga orgânica, uma das grandes problemáticas na descarga da

ARCS nos corpos hídricos é a coloração (geralmente marrom escura) e o acúmulo de nutrientes, como fósforo, nitrogênio e potássio (SAXENA, 2016), que pode causar eutrofização dos recursos hídricos por impossibilitar a realização de fotossíntese no ambiente aquático, criando assim, uma condição anaeróbia nos corpos d'águas (IJANU; KAMARUDDIN; NORASHIDDIN, 2020).

Mosquera et al. (2019a) caracterizaram a ARCS, em 28 amostras da água residuária industrial, como ácido (4 - 6,5), com alto valor de DQO, variando entre 2400 a 8500 mg L⁻¹, e concentração média de taninos de 757 mg L⁻¹. Em pesquisa realizada por Mosquera et al. (2019b), a ARCS foi caracterizado como neutro (7,4), com valor de DQO de 2400 mg L⁻¹, apresentando concentração de taninos de 145 mg L⁻¹. Entende-se que as características da ARCS não depende somente do processo produtivo intrínseco, como o tipo de processo de extração e secagem desenvolvidos e das técnicas utilizadas na remoção dos sólidos (LAWRENCE et al., 2004), mas também, do condicionamento dessa água residuária até a fase de tratamento.

Essa água residuária tem na composição várias moléculas, destacando-se lignina, polissacarídeos, taninos e polifenóis (PUJOL et al., 2013). Outros compostos que podem ser encontrados na ARCS são as melanoidinas, os alcaloides como a cafeína ou trigonelina e os ácidos clorogênicos (VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2011). Muitas destas substâncias, quando lançadas no meio ambiente, dificultam a degradação natural da matéria orgânica que as acompanha (NOVITA, 2016).

Vignoli et al. (2014) identificaram a presença de cafeína e ácido 5-cafeilquímico, isômero do ácido clorogênico, em grãos de café utilizados em indústria de café solúvel. Ainda, Manchón et al. (2013) avaliou a presença de compostos fenólicos em 17 tipos de cafés solúveis comerciais observando a presença de cafeína, ácido clorogênico e ácido caféico. Em pesquisa realizada por Magalhães et al. (2016) foi observada a presença de cafeína e de três principais compostos fenólicos, ácido caféico, catequina e ácido clorogênico, em borra de café oriunda de processo industrial.

A cafeína é uma substância presente no café e que sofre pequenas perdas durante o processo de torra em função da sua estabilidade térmica (FARAH, 2012). Diferentemente do ácido clorogênico que pode ter perda de até 90% de sua concentração inicial (TRUGO; MACRAE, 1986), sendo que aproximadamente 50% desses ácidos podem ser convertidos em ácido quínico livre e compostos fenólicos de baixa massa molecular.

Sengupta *et al.* (2020) apresentam vários métodos de tratamento de degradação de efluentes proveniente da cadeia produtiva do café, sendo estes físico-químico como floculação e coagulação, processo de oxidação avançado, adsorção, como também tratamento biológico a partir de biorreatores, avaliando o potencial de tecnologias e desafios econômicos nas aplicações.

Embora vários métodos físico-químicos e biológicos tenham sido desenvolvidos a fim de remover os compostos tóxicos da água residuária, como por exemplo, a oxidação avançada como pré-tratamento da digestão anaeróbia da ARCS (MOSQUERA *et al.*, 2019a) e a oxidação de Fenton e coagulação/floculação em conjunto com a digestão anaeróbia de água residuária do beneficiamento de café (BARROS *et al.*, 2020), ainda há necessidade de explorar outros métodos que sejam menos agressivos ao meio ambiente e que tenham um balanço financeiro mais viável.

2.2. Fungos lignocelulolíticos e *Pleurotus ostreatus*

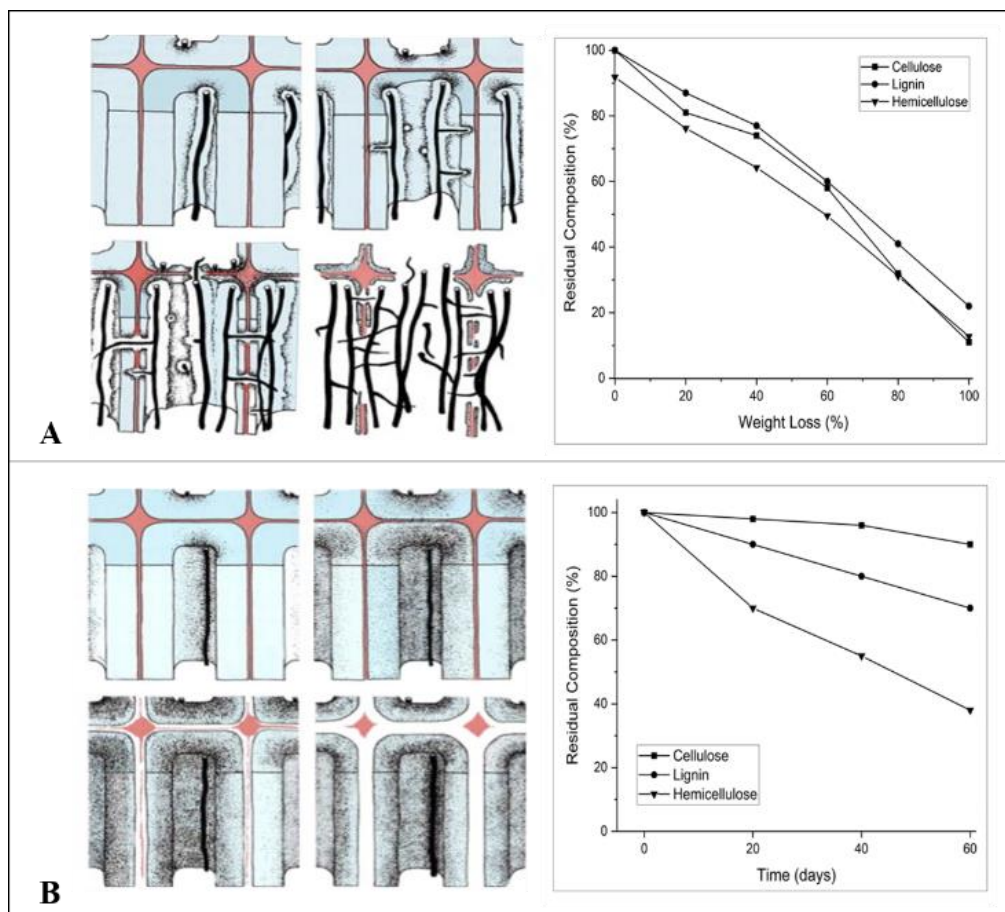
Os principais fungos lignocelulolíticos pertencem aos filos Ascomycota e Basidiomycota, e fungos filamentosos, sendo que, os principais decompositores encontram-se entre os basidiomicetos com mais de 48 mil espécies descritas, com destaque para o subfilo Agaricomycotina pela eficiência na produção de enzimas lignocelulolíticas (FROESE, 2016). Os três grandes grupos de decompositores de madeira são: os fungos de causadores da podridão branca, podridão parda e podridão mole, também conhecidos como podridão branda. Os dois primeiros grupos encontram-se entre os Basidiomycota, e o demais pertence aos Ascomycota (LUNDELL *et al.*, 2014).

Os fungos causadores da podridão parda são capazes por metabolizar principalmente polissacarídeos, entre eles, celulose, hemicelulose e pectina, mas estes não têm aparato enzimático para a degradação completa da lignina, conseguindo apenas oxidá-la parcialmente, transformando-a em um resíduo amorfo, marrom e quebradiço de coloração pardacenta. Os fungos de podridão mole possuem metabolismo similar, entretanto conseguem degradar a lignina e polissacarídeos, entretanto em velocidades muito baixas (CASTRO, 2020; WENG; PENG; HAN, 2021).

Os fungos de podridão branca são basidiomicetos eficientes em degradar todos os componentes da madeira, isto é, a celulose, hemicelulose e lignina, transformando-os completamente em CO₂ e H₂O, ou seja, até a mineralização. Esses fungos podem ser classificados quanto modo de ação (Figura 3) em simultâneo, quando degradam todos os

componentes da madeira, em que é observada a erosão progressiva da parede celular; e em seletivos, quando degradam a lignina para obter acesso aos polímeros de carboidratos das células vegetais de parede (MAGALHÃES et al., 2016; SCHWARZE, 2007).

Figura 3. Modo de ação de fungos de podridão branca.



Legenda: A. decomposição da madeira de modo simultâneo a partir do fungo *Fomes fomentarius*: inicialmente, ocorre a degradação imediata por meio de hifas, sendo observada que a parede celular é progressivamente degradada do lúmen para fora, atingindo a lignina e polissacarídeos; B. exemplo de modo de ação seletiva por *Heterobasidion annosum*: ocorre a deslignificação seletiva da madeira a partir da difusão de hifas na parede secundária espalhadas pelo lúmen, inicialmente tem-se a degradação da hemicelulose e lignina dentro da parede celular, entretanto, a celulose permanece intacta.

Fonte: Adaptado de Cowling (1961) e Schwarze (2007).

Os fungos basidiomicetos causadores da podridão branca apresentam um aparato enzimático apropriado para a degradação de lignina, que também é capaz de atuar na degradação de diversos compostos orgânicos. As principais enzimas do complexo ligninolítico de basidiomicetos são a Lignina Peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14), Peroxidase dependente do Manganês (MnP, EC 1.11.1.13) e Lacase (EC 1.10.3.2), além das enzimas acessórias como a Peroxidase versátil (EC 1.11.1.16), glioxal oxidase (EC 1.2.3.5), aril álcool oxidase (EC

1.1.3.7), oxalato decarboxilase (EC 4.1.1.2) e cytochrome P-450 monooxygenase (EC 1.14.14.1) (BILAL et al., 2017).

O uso de basidiomicetos em processos biotecnológicos vem crescendo cada vez mais, com destaque na biodegradação de substâncias poluentes ao meio ambiente, como os organoclorados (COELHO et al., 2019; MOREIRA-NETO et al. 2021). Entre os fungos basidiomicetos, destaca-se o fungo *Pleurotus ostreatus* que já foi utilizado na biodegradação de corantes têxteis e catiônicos (MORALES-ÁLVAREZ et al., 2016; PRATHEEBAA; PERIASAMY; PALVANNAN, 2013), lindano (RIGAS et al., 2005), efluente hospitalar (PALLI et al., 2017), sulfonamidas (MAYANS et al., 2021), compostos fenólicos (DA SILVA et al., 2009; HUBLIK; SCHINNER, 2000; KOSHY; CHANDRAN; NAMBISAN, 2012; KŘESINOVÁ et al., 2018), herbicida (MAIA PEREIRA et al., 2013) e na deslignificação de bagaço de cana de açúcar (KARP et al., 2015).

Pleurotus ostreatus é um basidiomiceto que produz cogumelos comestíveis com um alto valor nutricional, sendo que comercialmente é conhecido como cogumelo ostra (Figura 4). Essa espécie destaca-se pela produção de enzimas como lacases, lignina peroxidase, manganês peroxidase e peroxidase versátil (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020).

Figura 4. Fungo basidiomiceto *Pleutorus ostreatus*.



Fonte: VIEIRA; RESOURCES; MARQUES (2014).

2.3. Enzimas do Complexo Ligninolítico: lacases

As enzimas ligninolíticas podem ser obtidas por fungos basidiomicetos, e vêm despertando interesse industrial devido ao potencial de aplicação biotecnológica em diversas áreas. Entre essas enzimas, destaca-se a lacase, (EC 1.10.3.2, p-difenol: dioxigênio oxidoreductase) que é responsável pela oxidação de estruturas fenólicas presentes na lignina. A

inespecificidade dessa enzima possibilita a metabolização de diversos contaminantes orgânicos em águas residuárias (SCHLOSSER, 2020). A lacase realiza a oxidação de substratos ao radical livre correspondente ao passo que reduz oxigênio à água (JANUSZ et al., 2020; MARTÍNKOVÁ et al., 2016; SINGH; GUPTA, 2020).

A produção de enzimas ligninolíticas por basidiomicetos pode ser influenciada por fatores como a relação C/N, fontes de carbono facilmente metabolizáveis (BETTIN et al., 2014), ação dos indutores enzimáticos como o sulfato de cobre (SENTHIVELAN; KANAGARAJ; PANDA, 2016; YANG et al., 2017) e atuação de surfactantes, como tween 80 que combinados com a lacase, pode aumentar a oxidação e despolimerização da lignina (HOFRICHTER, 2002). Assim, estudos para a otimização da produção de enzimas ligninolíticas precisam ser realizados (FARIA et al., 2015). Durante a cinética de produção de lacase por basidiomicetos é observada acidificação do meio (GALHAUP et al., 2002; MATHEUS et al., 2003), que tem sido atribuída a produção de ácidos orgânicos tais como ácido oxálico e ácido fórmico (MÄKELÄ et al., 2002; UNUOFIN; OKOH; NWODO, 2019).

Além disso, Bettin et al. (2014) observaram que fenol, siringaldazina, vanilina, ácido benzoico e ácido gálico são indutores da atividade de lacase de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001, assim como, foi verificada a ação do ácido tânico como indutor da atividade de lacase do basidiomiceto *Coriolopsis galica* (CARBAJO et al., 2002).

Por outra via, lacases são cobre polifenol oxidases que atuam sobre compostos fenólicos na presença de oxigênio, enquanto reduzem oxigênio molecular à água. Estudos apontam que na presença de agentes mediadores redox, as lacases também catalisam a oxidação de compostos não fenólicos (DARONCH et al., 2020).

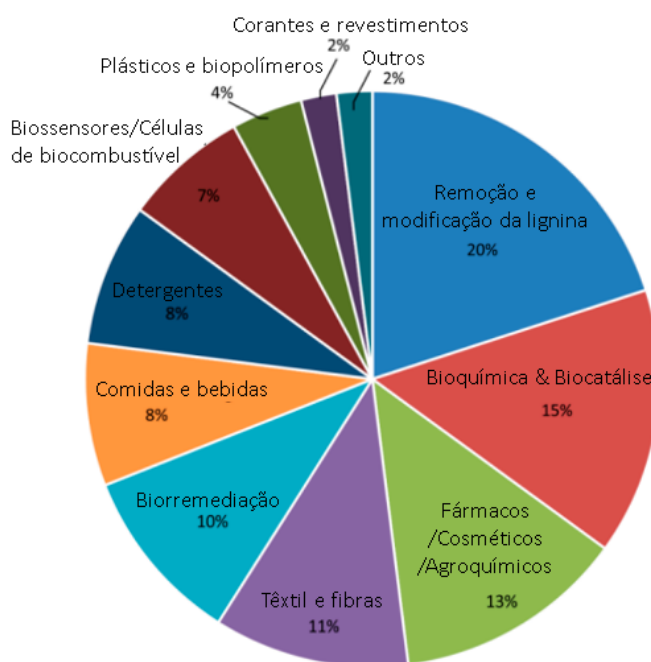
A lacase foi descrita pela primeira vez por Yoshida (1883), tendo sido obtida da árvore japonesa *Rhus vernicifera*, mas só foi caracterizada como uma oxidase contendo cobre por Bertrand (1986), sendo dessa forma, uma das enzimas mais antigas já descritas. As lacases já foram isoladas a partir de diversos organismos, dentre eles plantas (ARCURI, 2016), bactérias (HOYOS, 2019), insetos (KRAMER et al., 2001) e fungos (GOLVEIA et al., 2021).

As lacases são conhecidas como multicobre oxidases, pois possuem três a quatro átomos de cobre distribuídos entre três sítios de ligações (DARONCH et al., 2020; SINGH; GUPTA, 2020), que estão divididos em Cobre Tipo 1 (T1) e Cobres Tipo 2 e 3 (T2 e T3). O Cobre T1 (cobre azul) catalisa a transferência de elétron do substrato e confere a cor azul típica à proteína, este transfere os elétrons para os sítios T2 e T3 (receptores de elétrons), em que o oxigênio molecular é reduzido à água (REN et al., 2021; SINGH; GUPTA, 2020).

A inespecificidade da lacase permite que ela seja aplicada em diferentes processos industriais (Figura 4), que vão desde a produção de bebidas e alimentos até a biorremediação de solos e efluentes (BEHBAHANI; NOSRATI; MORADI, 2019), degradação de efluentes das indústrias têxteis (NAVADA; KULAL, 2020), papelarias (SHARMA et al., 2020) e farmacêuticas (MASJOURI et al., 2021).

Figura 5. Distribuição de 2626 patentes relacionadas com lacase depositadas de 2008-2019 de acordo com a classificação de palavras-chave e títulos de seção CA do banco de dados

SciFinder.



Fonte: Modificado de ZERVA; SIMI; TOPAKAS, (2019).

2.3.1. Aplicação da lacase na degradação de compostos fenólicos e não fenólicos

As lacases são reconhecidas pelo potencial de aplicação em processos de biorremediação, entretanto, devido ao potencial redox relativamente baixo ($\leq 0,8$ V), em comparação com outras enzimas ligninolíticas, as lacases podem ter a ação limitada a somente oxidação da parte fenólica da lignina (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020). Para expandir a ação catalizadora, têm sido utilizados mediadores redox para ampliar a atividade catalítica da lacase para as estruturas não fenólicas da lignina, e de poluentes recalcitrantes (BARRECA et al., 2003; PARRA GUARDADO et al., 2019).

Dentre desses mediadores, Parra Guardado et al. (2019) observaram a mineralização de poluentes persistentes oriundos da indústria farmacêutica a partir de lacase dos basidiomicetos *Pycnoporus sanguineus* CS43, *Trametes versicolor* e *Myceliophthora thermophila* utilizando os mediadores redox siringaldeído e ácido p-cumárico. Barneto et al. (2012) verificaram a otimização da ação catalítica de lacase no processado de remediação de resíduo da indústria de papel a partir do uso de nove compostos fenólicos naturais: ácido p-cumárico, vanilina, acetovanilona, acetosiringona, siringaldeído, coniferaldeído, ácido ferúlico, ácido sinápico, e sinapil aldeído.

Torres et al. (2016) identificaram três compostos fenólicos em água residuária da cadeia produtiva do café: ácido caféico, catequina e galocatequina. Já, na polpa de café foram identificados compostos fenólicos como taninos, ácido clorogênico e ácido caféico (CORRÊA et al., 2020; RATTAN et al., 2015). Nesse sentido, entende-se que a utilização da enzima lacase é uma proposta promissora para a degradação de estrutura fenólicas e não fenólicas, não somente pela natureza de sua ação catalítica, mas também, pela possibilidade da ARCS possuir compostos funcionais que podem agir como mediadores enzimáticos favoráveis para a biodegradação pela enzima.

Os compostos fenólicos podem causar o amargor no café, além de limitarem a fermentação dos grãos e em processos de tratamentos biológicos de subprodutos gerados. Na busca de mitigar fatores limitantes do processamento dos grãos de café, a lacase de *T. versicolor* foi utilizada como agente oxidante de compostos fenólicos resultando em grãos de melhor qualidade em termos de concentração de fenóis (FACHNIAR et al., 2020) e como pré-tratamento da casca e polpa de café de compostagem (NAZILAH et al., 2020). O fungo *Pleurotus ostreatus* foi avaliado na eficácia da remediação de água residual oriundo da produção de cogumelos em polpa de café tendo sido capaz de crescer na água residual sem diluição e de descolorir 77,8%, além de diminuir parâmetros como DQO e polifenóis em 78,9% e 92%, respectivamente (RODRÍGUEZ PÉREZ et al., 2008).

Os estudos de Fachniar et al. (2020); Nazilah et al., (2020) e Rodríguez Pérez et al. (2008) foram os únicos encontrados que usam basidiomicetos na degradação de compostos fenólicos oriundos da indústria de café. Não foi encontrado pelos proponentes nenhum trabalho com o uso de fungos basidiomicetos no tratamento da ARCS.

2.4. Bioinformática

A compreensão do modo de ação das proteínas possui cada vez mais importância nos estudos ambientais, no que diz respeito a tratamento de efluentes, assim como, em outras aplicabilidades, como em tratamento de doenças, controle biológico. Concomitantemente, a proteômica busca esse entendimento bioquímico em enzimas específicas, suas respectivas interações moleculares e quais serão suas implicações para o entendimento bioquímico (GUIDO et al. 2018). Por essa razão, a prospecção e estudo de estrutura tridimensional por meio de métodos computacionais visa, além do entendimento genômico de proteínas, estreitar a determinação de sequência de aminoácidos e a resolução de estruturas proteicas a partir de métodos experimentais.

Bioinformática é uma ciência que pode ser definida pela aplicação de técnicas computacionais para gestão e compreensão de dados biológicos, em especial para a predição de morfologia e fisiologia de genes, assim como, o entendimento evolutivo de genomas de diversas macromoléculas. Além disso, essa ciência vem contribuir para o estudo da funcionalidade e modo de ação das proteínas e enzimas. Concomitante, o desenvolvimento de métodos estatísticos, matemáticos e computacionais apresentam-se de forma ágil propelindo a disponibilidade e aplicabilidade de milhares de dados biológicos, esses que vêm sendo produzidos exponencialmente com o avanço da biotecnologia (SOUZA, 2008).

Os dados biológicos obtidos por centros de pesquisa são depositados em banco de dados públicos gerenciados por uma curadoria específica sendo compilados de forma adequado e de fácil acesso para pessoas físicas, como pesquisadores, e instituições privadas ou públicas, como universidades. Os principais bancos de dados públicos são: NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), o EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) e o DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*). Além disso, tem-se o PDB (*Protein Data Bank*) como principal banco internacional para depósito de estruturas tridimensionais de macromoléculas, como proteínas e RNAs, que impulsionou a criação da sub-área da bioinformática estrutural devido ao exponencial aumento de estruturas 3D com informações a nível molecular e atômico (DIAS; TAVEIRA, 2011; MAIA, 2014).

O uso de métodos computacional para elucidação de proteínas tem se tornado cada vez mais aparente no meio científico visando a obtenção de estruturas tridimensionais devido as limitações que os métodos experimentais, como a cristalografia de raio-X e a ressonância magnética nuclear (RMN), ainda apresentam problemas na determinação da estrutura proteica

como a quantidade de material biológico para análise, ineficiência na cristalização, além do custo e tempo operacional quando comparado ao método computacional (FILHO; 2013).

2.4.1. Modelagem de Proteínas por Homologia Comparativa

A modelagem de biomoléculas por meio da técnica de homologia comparativa permite a construção de estrutura tridimensional de uma proteína a partir da sequência primária de aminoácidos. Essa técnica ocorre por meio de auxílio de um molde, definido como uma estrutura conhecida de uma proteína homóloga com a condição de apresentar uma identidade superior a 25% entre as estruturas proteicas, ou seja, entre a proteína alvo e a proteína molde (DING; DOKHOLYAN, 2006).

A modelagem por homologia comparativa tem como base o processo de evolução biológica. Inicialmente são verificados o grau de homologia entre as estruturas proteínas considerando as semelhanças estruturais e fisiológicas, as regiões conservadas (geralmente, α -hélices, folhas β e alças) e as diferenças estruturais entre as proteínas homólogas, normalmente nas áreas externas que ligam componentes da estrutura secundária (KOONIN; GALPERIN, 2003).

A modelagem de proteínas por homologia comparativa é realizada por diversos programas, com destaque para o MODELLER[®] (método de modelagem pela satisfação de restrições espaciais) e o Swiss Model[®] (método de modelagem pela união de corpos rígidos), que são os mais utilizados na construção de modelos de estruturas tridimensionais. Em seguida, esses modelos são submetidos a validação com o objetivo de escolha do melhor modelo construído pelo respectivo programa a partir de critérios estruturais e estereoquímicos (SLIWOSKI et al., 2014).

O programa PROCHECK[®] é a principal ferramenta na validação de estrutura proteica construída a partir da técnica de homologia comparativa, por meio de avaliação estereoquímica. Essa ferramenta permite a avaliação de cada resíduo de aminoácido e da estrutura global, ou seja, de todo enovelamento da estrutura proteica, a angulação e distorções formadas na estrutura, assim como, as ligações moleculares entre os resíduos. Os parâmetros utilizados no programa são de acordo com Morris et al. (1992) que busca melhores indicadores para análises quanto a qualidade de proteínas.

O Gráfico de Ramachandran, obtido a partir do PROCHECK, configura-se, possivelmente, como o mais útil indicador da qualidade de uma proteína, devido ao uso de diagramas de contorno estérico indicando os resíduos que se encontram em regiões

energeticamente favoráveis e desfavoráveis, além de detectar erros brutos na estrutura proteica. O *output* é definido por meio de simulações e traduzidas pela distribuição de resíduos em regiões definidas, sendo elas: mais favoráveis, permitidas, generosamente permitidas e não permitidas. As regiões “mais favoráveis” são consideradas as mais importantes, pois há um entendimento diretamente proporcional do percentual de resíduos convergidos para essa região por meio da simulação com estruturas de melhor qualidade (LASKOWSKI et al., 1993).

2.4.2. Atracamento molecular

As técnicas de biologia computacional podem prever a probabilidade de degradação dos substratos pelas enzimas (HSU et al., 2012). Isso favorece a redução do número de testes laboratoriais, com consequente diminuição de investimento de tempo e de dinheiro para localização e identificação de moléculas ambientalmente viáveis para o tratamento enzimático de compostos xenobióticos (THAKURIA; JUNGAI; ADHIKARI, 2015). A técnica de atracamento molecular apresenta como vantagem a rapidez de resposta computacional, bem como a compreensão do funcionamento de enzimas (AWASTHI et al., 2015). Estudos com atracamento molecular têm confirmado a inespecificidade das lacases à substratos (SINGH et al., 2016).

Estudos *in silico* realizados com a lacase de basidiomicetos tem confirmado a inespecificidade dessa enzima pela demonstração da interação molecular entre a enzima lacase e os seguintes substâncias: fenol (LIU et al., 2018; ZHANG et al., 2012), cafeato de metila, metil ferulato e p-cumarato de metila (CONCEIÇÃO et al., 2020), bisfenol A (HONGYAN et al., 2019), isômeros nonilfenol e octilfenol (MO et al., 2018) e corantes sintéticos (BALLAMINUT et al., 2019; MORALES-ÁLVAREZ et al., 2018).

Ainda, estudos de atracamento molecular têm apontado a probabilidade das lacases degradarem diversas moléculas recalcitrantes, como compostos heterocíclicos (HUANG et al., 2019; SAADATI et al., 2018), além de outros compostos fenólicos como corantes azoicos e antraquinônicos, bisfenóis e clorofenóis (HONGYAN et al., 2019; HSU et al., 2012; VIDAL-LIMON et al., 2018).

Ainda não há relatos das estruturas fenólicas presente na ARCS, entretanto, entende-se que a ARCS pode possuir características químicas similares aos efluentes da cadeia produtiva do café, sendo válida a análise de atracamento molecular de moléculas fenólicas conhecidas com a enzima lacase.

2.5. Digestão anaeróbia

A Digestão anaeróbia é um processo biológico de conversão de diversos tipos de matérias orgânicas em produtos mais simples, sendo caracterizada pela vantagem de baixa produção e estabilidade de lodo (LV; SCHANBACHER; YU, 2010; THANGAMANI; RAJAKUMAR; RAMANUJAM, 2010), propiciando ainda, a obtenção de subproduto energético, o gás metano, componente do biogás. .

O processo da digestão anaeróbia pode ser dividido em quatro etapas, sendo elas: a. hidrólise: em que ocorre a transformação de compostos orgânicos complexos, como, proteínas, carboidratos e lipídios em compostos orgânicos mais simples, como, aminoácidos, açúcares e ácidos graxo, pela ação de bactérias hidrolíticas; b. acidogênese: os produtos da etapa anterior são metabolizados em dióxido de carbono, hidrogênio e intermediários que podem ser ácidos graxos de cadeia curta (eg. Ácido acético, butírico, propiônico, fórmico e láctico), álcoois (eg. etanol, metanol, butanol e o glicerol) e cetonas; c. acetogênese: os ácidos de cadeia curta, álcoois e cetonas formados na acidogênese são convertidos em acetato, ácido acético, hidrogênio e dióxido de carbono, e; d. metanogênese: ocorre à formação de metano e dióxido de carbono pelas arqueas metanogênicas (KUNZ; STEINMENTZ; AMARAL, 2019).

A ARCS vem sendo utilizado como fonte de geração de biogás (PAREDES; MENDOZA; MOREIRA, 2018) e desde o final do século passado, quando algumas pesquisas avaliaram o processo de DA arque-as ARCS, sendo observada uma lacuna até meados de 2016 (DINSDALE; HAWKES; HAWKES, 1997a, 1997b; NOVITA, 2016). Todos os trabalhos apontaram para a possibilidade de produção de metano digerindo tal água residuária. No entanto, Kostenberg e Marchaim (1993) e Mosquera et al. (2019a) verificaram elevado potencial tóxico da ARCS sob o consórcio anaeróbico que pode ser justificado pela presença de alta concentração de fibras e compostos tóxicos fenólicos.

Os fungos basidiomicetos vêm sendo utilizados para o pré-tratamento de material lignocelulósico a fim de aumentar a produção de metano advindo na DA (ATELGE et al., 2020). Rouches et al. (2016) relataram a eficiência do uso de pré-tratamento biológicos na otimização da produção metanogênica, com destaque para uso de fungos de podridão branca, que obtiveram altos percentuais de rendimento energético. O fungo *P. ostreatus* já foi testado como tratamento biológico de biomassas lignocelulósicas obtendo degradação significativa da lignina e hemicelulose com favorável rendimento metanogênico quando comparado ao resíduo sem pré-tratamento (KAINTHOLA et al., 2019; MUSTAFA et al., 2017; MUSTAFA;

POULSEN; SHENG, 2016; SUKSONG et al., 2020). Os trabalhos descritos demonstram a importância do uso de fungos basidiomicetos na otimização da produção de metano por DA.

A *Rainforest Alliance* publicou resultados de um projeto que teve como objetivo a produção de energia elétrica pela transformação de metano a partir de biodegradação de água residual da cadeia produtiva do café. Como resultado, obtiveram uma geração média de 200.000 kW em 4 anos, tendo como consequência, segundo o diretor técnico da usina de biogás, uma economia de US\$ 40 mil anuais. Os resultados da pesquisa são expressivos e economicamente viáveis. Contudo, vale ressaltar que a pesquisa deixa lacunas sobre o processo da arqueas e os subprodutos gerados no processo, como a toxicidade pela água residual tratado e do lodo produzido (TUCKER, 2014).

Projetos como esse demonstram a importância da busca de otimização de processos anaeróbios para o tratamento de águas residuárias agroindustriais, não somente pela mitigação do impacto causado pela incorreta disposição da água residual e pela geração de energia, mas também, pela questão social e ambiental, visto que famílias de zona rural foram beneficiadas pela substituição da queima de lenha pelo biogás. A expansão de pesquisa acerca da ARCS faz-se necessária a fim de possibilitar a ampliação de reaproveitamento com beneficiamento energético e social.

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

Hipótese geral: A utilização de fungo basidiomiceto possibilitará a melhoria da biodegradabilidade da ARCS pela diminuição da concentração de compostos fenólicos totais, com consequente aumento energético do processo da DA.

Objetivo

- Avaliar o potencial do fungo basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* em reduzir compostos fenólicos da ARCS e consequentemente melhorar a eficiência na produção de metano por meio da DA.

Hipótese secundária 1: As análises *in silico* indicarão possibilidade de ação da enzima ligninolítica (lacase) produzida pelo fungo basidiomiceto *P. ostreatus* na degradação dos compostos alvo presentes em efluentes da cadeia produtiva do café;

Objetivos

- Construir o modelo teórico da lacase de *P. ostreatus* pelo método de homologia comparativa;

- Avaliar *in silico* o potencial da lacase de *P. ostreatus* em degradar compostos alvo presentes em efluentes da cadeia produtiva do café por meio de estudos de atracamento molecular.

Hipótese secundária 2: O fungo *P. ostreatus* tolerará as condições adversas da ARCS e crescerá em meio sólido contendo a ARCS.

Objetivo

- Avaliar o potencial do fungo *P. ostreatus* em crescer e descolorir meio sólido contendo ARCS.

Hipótese secundária 3: O uso de mediadores da lacase de *P. ostreatus* potencializará a biodegradação dos compostos fenólicos da ARCS que atuam como inibidores da DA;

Objetivo

- Avaliar o potencial do fungo *P. ostreatus* em biodegradar *in vivo* os compostos fenólicos da ARCS, em meio líquido;

Hipótese secundária 4: A ARCS pré-tratada melhorará o desempenho de produção metanogênica por DA quando comparada com a ARCS sem pré-tratamento.

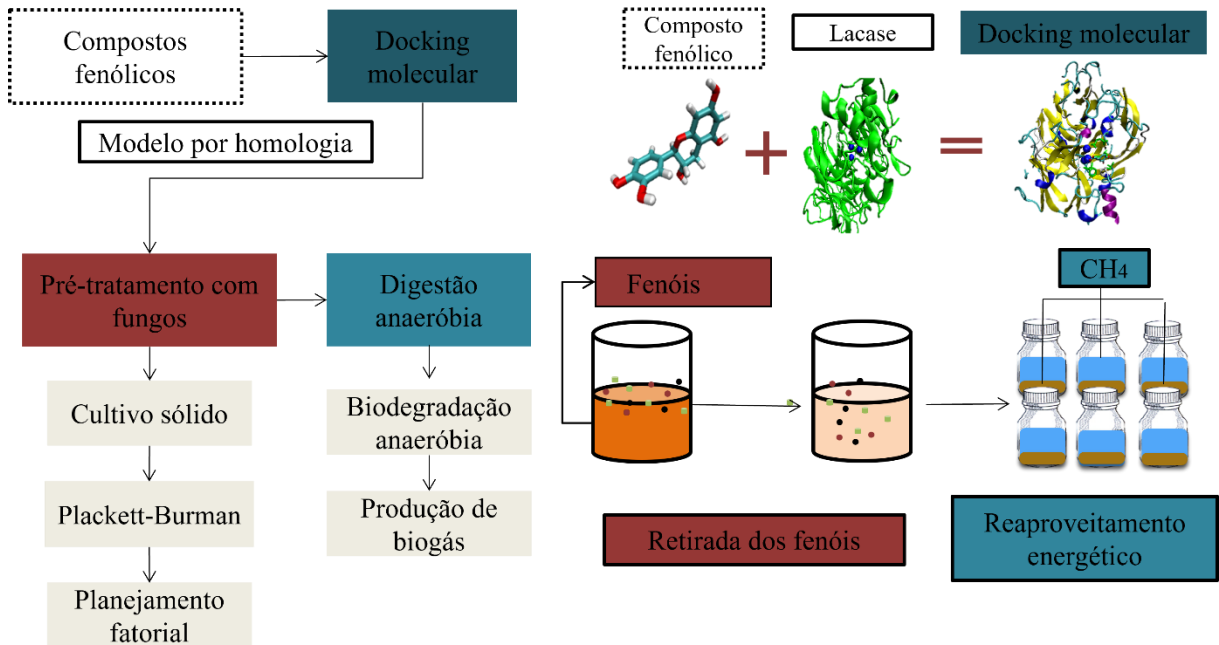
Objetivo

- Avaliar a eficiência do pré-tratamento fúngico pela determinação do potencial metanogênico.

4. METODOLOGIA

A água residuária de café solúvel (ARCS) foi oriunda da produção industrial de café solúvel, cedida pela empresa Cocam Cia – Catanduva, SP. A primeira etapa do estudo constituiu-se na construção do modelo teórico da lacase de *P. ostreatus* e pelo estudo da interação molecular – por meio da biologia computacional - entre a enzima lacase e compostos alvo presente em efluentes da cadeia produtiva do café. O estudo em laboratório iniciou-se com a caracterização da água residuária do processo produtivo do café solúvel. O estudo do tratamento fúngico iniciou-se pelo cultivo do fungo em meio sólido contendo ARCS. Após isso, construiu-se curva de crescimento de fungo *P. ostreatus*, seguido de planejamentos experimentais a fim de se obter a melhor condição de biodegradação da ARCS (Figura 6), seguido da avaliação da produção metanogênica a partir da ARCS tratada e não tratada.

Figura 6. Resumo da metodologia.



Fonte: o autor.

4.1. Caracterização da água residuária do café solúvel (ARCS)

A fim de caracterizar a ARCS foram avaliados os seguintes parâmetros: matéria orgânica expressa em DQO – mg L^{-1} , fósforo total – g L^{-1} , nitrogênio – mg L^{-1} , pH, sólidos suspensos totais – g L^{-1} (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV) (APHA, 2012), concentração de ácidos voláteis – mg L^{-1} (DILALLO; ALBERTSON, 1961), alcalinidade (RIPLEY; BOYLE; CONVERSE, 1986), CFT, expressos em equivalentes de ácido gálico – EAG (BRAVO et al., 2013) e açúcares totais (BLUNDI; GADÊLHA, 2001).

4.2. Estudo *in silico*

A sequência proteica utilizada na construção da estrutura tridimensional da lacase de *Pleurotus ostreatus* por modelagem comparativa foi obtida do banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) sob GenBank, identificada como AOM73725.1, contendo 525 aminoácidos.

```

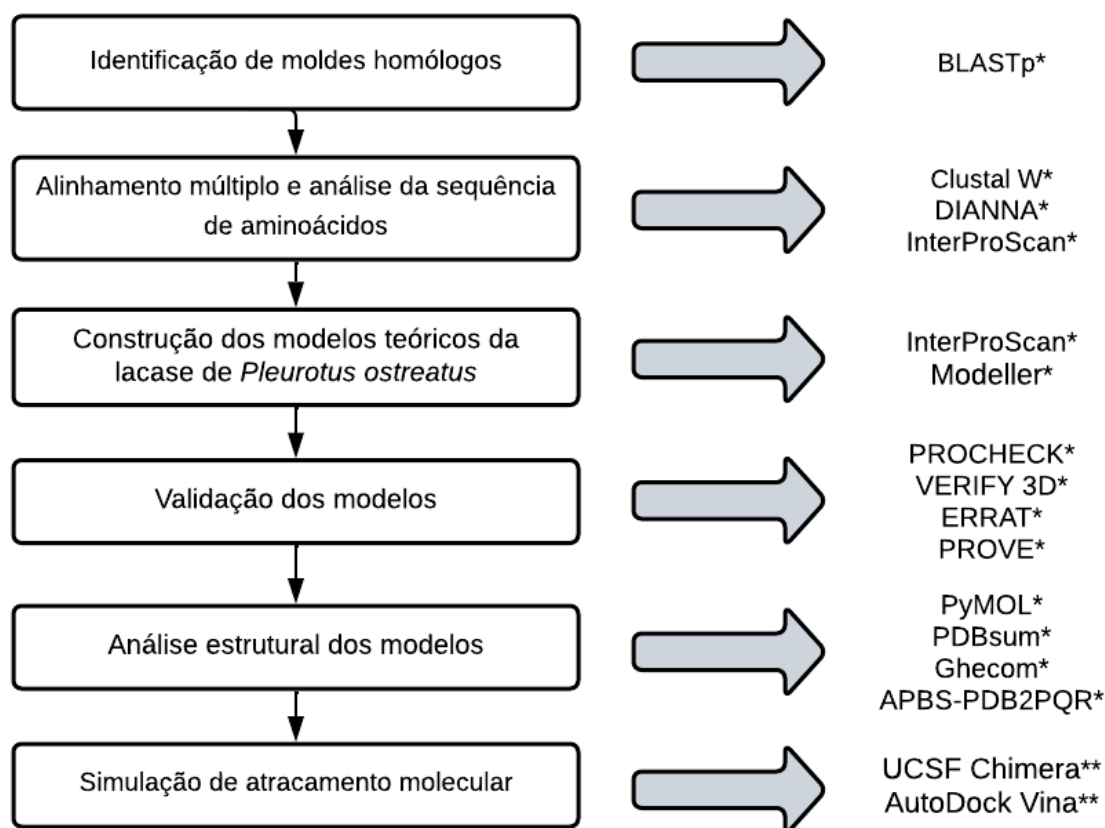
>AOM73725.1 Laccase [Pleurotus ostreatus]
MALFFRALACLVVVAITNAYGASVGNNAIYIANKVIAPDGFERSGVLGTAAGVDVTGPLIRGFKGNRFRNLVINQ
LSDSSMLKTTSIHWHGFFQEGSSWADGPAFVTQCPIASGDSFLYDFRVPDQAGTFWYHAHLSTQYCDGLRGAFVVYD
LLDPHRLRYLVDNDDTVITLADWYHTVAPQAGLVPVPDSTLINGRGRYAGGPTVPLALIRVLWGKIRFRLVSLSCD
PNYTFSIDGHKMTIIEVDGVNTPKPLEVDSIQIFAGQRYSFVLHANQRIANYWIRANPNLGRGFEGGLNSAILRYYG
APNQDPTTTEGTSTNPLIETNLVPLRNAGAPGVPGVGNADVNINLAMAFFPSLQFTINGAPWTSPTSPVLLQIISG
ASSAADLLPPGSVYALPRNKVVELSIPALAVGGPHPIHLHGHVFDVVRSA GSTYNYRNPVRRD VVSTGTGSDNVTI
RFKTDNPGPWFHLCHIDWHLEIGLAVVFAEDTASTARQRPQSWSDLCPIYDSLTEEQKGGIV

```

4.2.1. Etapas dos estudos *in silico*

Após a obtenção da sequência proteica da lacase de *P. ostreatus* foram realizadas técnicas de bioinformática para construção e validação do modelo teórico da lacase, assim como, para a simulação de atracamento molecular, como mostrado na Figura 7.

Figura 7. Etapas da modelagem comparativa para construção do modelo teórico 3D da lacase de *P. ostreatus*.



Legenda: servidores que serão utilizados: * para cada etapa da construção do modelo teórico da lacase *P. ostreatus*; ** para o atracamento molecular.

4.2.2. Identificação de moldes homólogos

Os moldes homólogos à sequência de aminoácidos referente a lacase de *Pleurotus ostreatus* foram submetidas ao programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)

disponível no site do NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> - que utiliza o algoritmo BLASTp (*Search Protein Databases Using a Protein Query*) para realizar análises de sequências existentes de sensibilidade comparável presentes no PDB (*Protein Data Bank*) (ALTSCHUL et al., 1990; RSCB, 2020). A seleção das estruturas proteicas homólogas no BLASTp foi baseada no grau de identidade sequencial. Para a seleção de proteínas para o alinhamento múltiplo das sequências foram considerados ainda, *Query coverage*, *Evalue*, resolução da proteína molde, *R-factor* (*R-Value Free*).

4.2.3. Alinhamento Múltiplo e análise de sequências de aminoácidos

As sequências selecionadas pelo servidor BLASTp, foram submetidas ao servidor Clustal W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) para a realização do alinhamento múltiplo da sequência da lacase de *P. ostreatus* com as demais sequências molde selecionadas a fim de verificar a identificação de resíduos similares e conservados dos moldes em relação a lacase de *P. ostreatus*. As sequências de aminoácidos lacase de *P. ostreatus* e os demais moldes homólogos foram submetidos ao servidor DIANNA (FERRE; CLOTE, 2005) para verificar a ocorrência de pontes dissulfeto nas estruturas analisadas. A análise da sequência de aminoácidos da lacase de *P. ostreatus* foi feita para identificar a presença de domínios conservados por meio do software InterProScan (ZDOBNOV; APWEILER, 2001).

4.2.4. Construção e avaliação dos modelos teóricos de lacase de *P. ostreatus*

O software InterProScan (ZDOBNOV; APWEILER, 2001) foi utilizado para analisar a presença de peptídeos sinais na sequência de aminoácidos da lacase de *P. ostreatus* AOM73725.1.

O programa Modeller versão 10.2 (ŠALI; BLUNDELL, 1993; MARTÍ-RENOM et al., 2000; WEBB; SALI, 2016) foi utilizado para a construção dos modelos teóricos da lacase utilizando como molde as estruturas com PDB ID 1GYC, 2HRG, 5A7E e 4JHU. Para cada molde foram construídos 200 modelos, a seleção do melhor modelo foi feita baseando-se no DOPE score, que é uma pontuação que representa a energia de um modelo indicando os valores energéticos que medem a estabilidade relativa das estruturas em relação a outras estruturas da mesma proteína. Quanto menor o valor do DOPE score melhor a qualidade do modelo, pois pontuações menores indicam que o modelo é mais estável. Dentre os 200 modelos construídos, foi escolhido o modelo com menor valor para cada molde.

4.2.5. Validação dos modelos

Após a construção dos modelos teóricos da lacase, foram realizadas as respectivas validações por meio de 4 algoritmos independentes no servidor SAVES (<https://saves.mbi.ucla.edu/>): servidor PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) (Análise do gráfico de Ramachandran, que mostra a distribuição de todos os aminoácidos de cada modelo considerando as regiões mais favoráveis (em vermelho), regiões adicionais permitidas (em amarelo), regiões generosamente permitidas (em bege), regiões não permitidas (em branco)); VERIFY 3D (BOWIE; LUTHY; EISENBERG, 1991) (avaliação da compatibilidade entre a estrutura tridimensional da proteína com sua própria sequência de aminoácidos, sendo necessário que pelo menos 80% dos aminoácidos tenham pontuação maior ou igual a 0,2 no perfil 3D/1D); servidor ERRAT (COLOVOS; YEATES, 1993; MESSAOUDI; BELGUITH; BEN HAMIDA, 2013) (análise das frequências relativas de interações não covalentes entre os vários tipos de átomos, para um modelo ser considerado de alta qualidade, geralmente são aceitos valores de fator de qualidade geral (*overall quality factor*) superiores a 50); PROVE (PONTIUS; RICHELLE; WODAK, 1996) (comparação entre os volumes atômicos e os conjuntos de valores padrão pré-calculados, resultados entre 0 e 1% indica modelo possui valor ideal, na faixa de 1% a 5% margem de aviso (*warning*), resultados acima de 5% indica modelos falhos (*fail*). Em todas as análises, com exceção do Prove, quanto mais alto o valor, melhor a qualidade do modelo.

4.2.6. Análise Estrutural dos modelos

Para análise estrutural, foi feita a sobreposição da estrutura do melhor modelo criado (*Lacc 4*) com o seu molde homólogo (4JHU) e o cálculo RMSD (*Root Mean Squared Deviation*) no sistema de gráficos moleculares do PyMOL, versão 1.2r3pre, Schrödinger, LLC. Além disso, foi feita a análise estrutural no PDBsum (LASKOWSKI et al., 2018) para identificar as estruturas secundárias presentes na estrutura do modelo *Lacc 4*. Também foi feita a análise do sítio ativo da estrutura da lacase: o sítio mononuclear do Cu T1 é o local onde a oxidação do substrato ocorre (OSIPOV et al., 2014; JEON et al., 2012; MATE; ALCALDE, 2017; MAESTRE-REYNA et al., 2015; JONES; SOLOMON, 2015; CHATZIKONSTANTINOOU et al., 2018; WANG et al., 2015; HUBLIK; SCHINNER, 2000), sendo então o local em que ocorre a interação entre o ligante e a lacase, a partir disso, para a simulação de atracamento molecular foi feita a busca dos bolsões próximos ao Cu T1 no

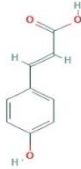
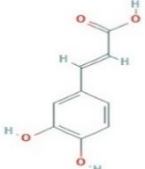
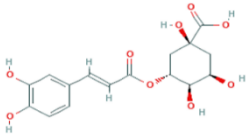
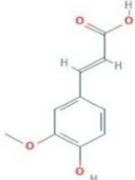
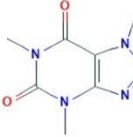
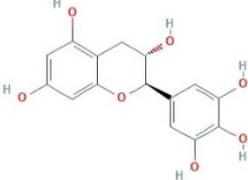
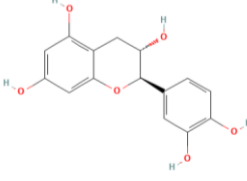
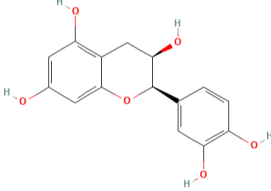
servidor Ghecom (KAWABATA; GO, 2007), em seguida, foi realizada a caracterização eletrostática, a partir da construção do mapa de superfície eletrostática no software APBS-PDB2PQR (<https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr>).

O campo de forças utilizado foi o CHARMM (MIYAZAWA et al., 2017). O pH 8,0 foi utilizado para a construção do mapa de superfície eletrostática, conforme descrito para a protonação do modelo da lacase de *P. ostreatus* POXA1b, que foi construído a partir do modelo PDB ID 1GYC e refinado por meio do estudo de dinâmica molecular (GIACOBELLI et al., 2017). O PyMOL foi utilizado para visualizar a superfície eletrostática, e para comparar os aminoácidos que fazem parte do sítio ativo do modelo criado *Lacc 4* com a estrutura da lacase de *Trametes versicolor* PDB ID 1KYA (BERTRAND et al., 2002), que foi obtida experimentalmente, para confirmação dos aminoácidos que compõem o sítio ativo do modelo.

4.2.7. Atracamento molecular entre a lacase *P. ostreatus* e compostos fenólicos

As estruturas tridimensionais dos componentes moleculares utilizados na técnica de atracamento molecular foram obtidas a partir da identificação de compostos da borra comercial de café (MAGALHÃES et al., 2016), e dos grãos (VIGNOLI et al., 2014) durante a cadeia produtiva do café solúvel, em água residuária do beneficiamento de café (TORRES et al., 2016), e do café solúvel de variados tipos (MANCHÓN et al., 2013). Portanto, os compostos alvo que foram avaliados no estudo de atracamento molecular com o modelo teórico da lacase de *P. ostreatus* criado pela técnica de modelagem por homologia foram: ácido clorogênico, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, catequina, galocatequina, cafeína e epicatequina. As informações sobre os compostos estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Compostos da cadeia produtiva do café solúvel

Compostos alvo	PubChem ID	Forma molecular	Massa molecular (g mol ⁻¹)	Estrutura Química
Ácido p-cumárico	637542	<u>C₉H₈O₃</u>	164.16	
Ácido cafeico	689043	<u>C₉H₈O₄</u>	180.16	
Ácido clorogênico	1794427	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.31	
Ácido ferúlico	445858	<u>C₁₀H₁₀O₄</u>	194.18	
Cafeína	2519	<u>C₈H₁₀N₄O₂</u>	194.19	
Calocatequina	65084	<u>C₁₅H₁₄O₇</u>	306.27	
Catequina	9064	<u>C₁₅H₁₄O₆</u>	290.27	
Epicatequina	72276	<u>C₁₅H₁₄O₆</u>	290,27	

Fonte: (PUBCHEM, 2022)

Legenda: PubChem ID – número de identificação da molécula no bando de dados de moléculas gerenciado pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Os arquivos com as coordenadas atômicas (pdb) do modelo teórico da lacase e dos compostos fenólicos foram submetidos ao software UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004) para a preparação da simulação de atracamento. Por meio da ferramenta Dock Prep foi realizada a adição de hidrogênio e das cargas. O dimensionamento do *grid* foi feito de acordo com o tamanho do bolsão próximo ao Cu T1 do modelo *Lacc 4*, tendo como base o bolsão de ligação da estrutura 3D 1KYA com o objetivo de abranger os aminoácidos do sítio ativo, possuindo tamanho X=14,6736 Å, Y=25,613 Å, Z=12,9 Å, e centrado nas coordenadas X=5,04339 Å, Y=-44,7222 Å, Z=-23,1315 Å.

O número de atracamentos por cada ligante foi 10, a exaustividade da pesquisa foi definida para 8 e a diferença máxima de energia (kcal mol⁻¹) foi 3. Após o preparo, avaliou-se o atracamento molecular no AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2009), o atracamento feito foi do tipo semirrígido/semiflexível e a análise dos atracamentos ocorreu no Discovery Studio (Versão 20.1.0.19295).

4.3. Estudo do pré-tratamento da ARCS usando fungo basidiomiceto

4.3.1. Inóculo de Basidiomiceto

O basidiomiceto *P. ostreatus* está depositado na Coleção de Cultura de Algas, Cianobactérias e Fungos (CCIBt) do Instituto de Botânica, IBt, da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente do Estado de São Paulo, sob a numeração 2347. O isolado foi mantido por repiques sucessivos em BDA a 28°± 2 C durante 7 dias. Discos de 0,7 cm de diâmetro foram utilizados como inóculo.

4.3.2. Cultivo sólido de *P. ostreatus*

4.3.2.1. Tolerância do fungo a ARCS em meio sólido

Os ensaios de cultivo sólido em ARCS foram conduzidos em placas de Petri para avaliar a capacidade do fungo *P. ostreatus* em crescer em concentrações crescentes da ARCS, e assim proporcionar adaptação do basidiomiceto à ARCS (MARTIRANI et al., 1996). O meio de cultura foi constituído de ARCS, diluída com água destilada para estabelecer concentrações, em valores percentuais, de 25, 50, 75 e 100, e ágar (18g L⁻¹). Dois tipos de tratamentos foram avaliados: a. com esterilização (121 °C a 1atm/15min), e; b. sem esterilização da ARCS (FOUNTOULAKIS et al., 2002).

4.3.2.2. Adaptação do fungo em meio sólido BDA

O crescimento radial de *P. ostreatus* foi avaliado em meio BDA esterilizado (121 °C a 1atm/15min) e em meio BDA solubilizado em ARCS, diluída convenientemente com água destilada para estabelecer concentrações, em valores percentuais de 10% e 100%, por meio da medida do crescimento micelial ao longo do tempo. A velocidade média micelial foi quantificada segundo Zárate-Salazar et al. (2020), determinada pela razão entre o raio de uma Placa de Petri (40 mm) e o tempo, em dias, necessário para colonização de *P. ostreatus*. Os ensaios de cultivo sólido em ARCS foram conduzidos em placas de Petri e incubadas a 28°C e inoculadas com um disco de crescimento (Ø 0,7 cm) de *P. ostreatus*.

4.3.2.3. Descoloração da ARCS em meio sólido por *P. ostreatus*

O ensaio com 100% da ARCS em meio BDA foi caracterizado em termos de descrição quantitativa da cor. As coordenadas de cor L*, a* e b* foram medidas em colorímetro (Hunterlab ColorQuest, XE) com o sistema de cores CIELAB (CLYDESDALE, 1991). Os valores de L* indicam a luminosidade da amostra, variando entre 0 (preto) a 100 (branco), sendo que, valores próximos ao centro indicam cores opacas ou cinzas, enquanto, valores próximos as extremidades indicam cores vivas, vibrantes. Os valores de a*: positivos e negativos, representam vermelho e verde, respectivamente. Os valores de b*: positivos e negativos, indicam amarelo e azul, respectivamente. A partir dessas coordenadas é possível realizar o cálculo de croma (C*) e ângulo de matriz (H°). Os valores do ângulo de matriz representam 0 para vermelho, 90 para amarelo, 180 para verde e 270 para azul. O cálculo de croma e do ângulo de matriz foram calculados a partir das equações 1 e 2.

$$C = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}; \text{Equação 1}$$

$$H^\circ = \arctang \frac{a^*}{b^*}; \text{Equação 2}$$

4.3.3. Biotransformação da ARCS por *P. ostreatus* em meio líquido

4.3.3.1. Inóculo para o cultivo líquido – adaptação de *P. ostreatus* a ARCS

P. ostreatus foi adaptado a ARCS pelo cultivo em meio BDA sólido (batata-dextrose-ágar) (34g L⁻¹) ARCS (sem diluição) (MARTIRANI et al., 1996). Discos de 0,7 cm de diâmetro de crescimento micelial foram utilizados como inóculo dos delineamentos experimentais – Plackett Burman e Planejamento Fatorial.

4.3.3.2. Pré-tratamento da ARCS em meio líquido - Delineamento Experimental – Plackett Burman (PB)

Para os ensaios em meio líquido foram utilizados Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100mL de meio reacional. O estudo em meio líquido foi iniciado pela aplicação do delineamento experimental Plackett-Burman, a fim de identificar os fatores mais significativos no início do processo de experimentação (PLACKETT; BURMAN, 1946). As variáveis independentes foram estudadas em dois níveis (-1 e +1). Todos os fatores com seus respectivos níveis estão representados na Tabela 2. As variáveis respostas foram: a remoção de CFT e a descoloração. A significância de cada variável foi determinada pela aplicação do teste *t* de Student em nível de significância de 90%. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA com o software *Statistica* (Versão 13.5.0.17). Como controle foram feitos ensaios sem inoculação. Os ensaios foram mantidos a 28°C durante 7 dias (EL-ZAHER et al., 2021).

Tabela 2. Delineamento Experimental Plackett-Burman apresentando os níveis para cada variável.

VARIÁVEIS INDEPENDENTES	(-1)	(0)	(+1)
Extrato de Levadura (g.L ⁻¹)	0	1	2
Sulfato de Cobre (mM)	0	0,5	1
Sulfato de Manganês (mM)	0	0,5	1
Tween (%)	0	1	2
pH	4	5	6
Agitação (rpm)	0	60	120
ARCS (%)	30	50	70
Discos de crescimento micelial (un.)	2	4	6

Tabela 3. Matriz do Delineamento Experimental – Plackett Burman

Ensaio	ExtLev	CuSO ₄	MnSO ₄	Tween	pH	Agitação	ARCS	Discos
1	+1(2)	-1(0)	+1(1)	-1(0)	-1(4)	-1(0)	+1(70)	+1(6)
2	+1(2)	+1(1)	-1(0)	+1(2)	-1(4)	-1(0)	-1(30)	+1(6)
3	-1(0)	+1(1)	+1(1)	-1(0)	+1(6)	-1(0)	-1(30)	-1(2)
4	+1(2)	-1(0)	+1(1)	+1(2)	-1(4)	+1(120)	-1(30)	-1(2)
5	+1(2)	+1(1)	-1(0)	+1(2)	+1(6)	-1(0)	+1(70)	-1(2)
6	+1(2)	+1(1)	+1(1)	-1(0)	+1(6)	+1(120)	-1(0)	+1(6)
7	-1(0)	+1(1)	+1(1)	+1(2)	-1(4)	+1(120)	+1(70)	-1(2)
8	-1(0)	-1(0)	+1(1)	+1(2)	+1(6)	-1(0)	+1(70)	+1(6)
9	-1(0)	-1(0)	-1(0)	+1(2)	+1(6)	+1(120)	-1(30)	+1(6)
10	+1(2)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	+1(6)	+1(120)	+1(70)	-1(2)
11	-1(0)	+1(1)	-1(0)	-1(0)	-1(4)	+1(120)	+1(70)	+1(6)

12	-1(0)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	-1(4)	-1(0)	-1(30)	-1(2)
13	0(1)	0(0,5)	0(0,5)	0(1)	0(5)	0(60)	0(50)	0(4)
14	0(1)	0(0,5)	0(0,5)	0(1)	0(5)	0(60)	0(50)	0(4)
15	0(1)	0(0,5)	0(0,5)	0(1)	0(5)	0(60)	0(50)	0(4)

Legenda: ExtLev: extrato de levedura; Discos: Discos de crescimento micelial (un.)

4.3.3.3. Pré-tratamento da ARCS em meio líquido - Delineamento experimental – Planejamento fatorial (PF)

As variáveis ARCS, pH e Tween 80 foram submetidas a um planejamento fatorial 2^3 composto por 9 tratamentos, sendo 8 tratamentos fatoriais (+1 e -1) com triplicata ponto central. As variáveis com os respectivos níveis e a matriz do planejamento experimental estão apresentadas nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As variáveis dependentes avaliadas foram: biomassa fúngica, atividade de lacase, concentração de matéria orgânica expressa em DQO, e concentração de CFT.

Os ensaios foram avaliados a cada 3 dias durante 21 dias. A cada três dias, uma alíquota, 1% do volume útil (volume), foi retirada para avaliação das variáveis respostas. Os efeitos das variáveis respostas sobre as variáveis dependentes, bem como a interação entre elas, serão avaliados pelo software *Statistica* (Versão 13.5.0.17).

Tabela 4. Níveis de planejamento experimental

VARIÁVEL INDEPENDENTES	-1	0	+1
ARCS (%)	50	75	100
pH	6	6,5	7
Tween 80 (%)	0	1	2

Tabela 5. Matriz do Delineamento Experimental – Planejamento Fatorial

Ensaio	ARCS (%)	pH	Tween 80 (%)
1	50 (-1)	6 (-1)	0 (-1)
2	100 (+1)	6 (-1)	0 (-1)
3	50 (-1)	7 (+1)	0 (-1)
4	100 (+1)	7 (+1)	0 (-1)
5	50 (-1)	6 (-1)	2 (+1)
6	100 (+1)	6 (-1)	2 (+1)
7	50 (-1)	7 (+1)	2 (+1)
8	100 (+1)	7 (+1)	2 (+1)
9	75 (0)	6,5 (0)	1 (0)

9'	75 (0)	6,5 (0)	1 (0)
9''	75 (0)	6,5 (0)	1 (0)

4.3.4. Análises físico-químicas e enzimática– avaliação de degradação da ARCS por *P. ostreatus*

A biomassa foi separada do meio líquido por meio de filtração, em membrana de Nylon 0,45 µm, previamente seca até massa constante. A biomassa (g) retida no filtro foi quantificada pela medida de biomassa seca após secagem a 105 °C, por 24 horas. No filtrado foram determinados: atividade da enzima lacase, pH, concentração de matéria orgânica será expressa em DQO, segundo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012) e a concentração de CFT, expressos em equivalentes de ácido gálico – EAG, segundo Bravo et al. (2013).

A atividade de lacase foi determinada pela oxidação do ABTS a 420nm (ϵ : 36.000 M⁻¹. cm⁻¹) em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,8, de acordo com Ballaminut e Matheus (2007). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de produto por minuto.

O pH será mensurado utilizando um pH digital, previamente calibrado.

4.4. Digestão Anaeróbia

4.4.1. Caracterização do inóculo

Para realização dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia foi utilizado inóculo oriundo da Ambev (Jaguariúna/SP) que foi submetido às seguintes análises de caracterização: Sólidos Totais (ST), Sólidos Totais Voláteis (STV), Sólidos Totais Fixos (STF), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV), conforme metodologia apresentada no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012).

4.4.2. Pré-exposição do inóculo a ARCS

O inóculo foi submetido à pré-exposição à ARCS até que a resposta de produção metanogênica foi condizente com a redução de matéria orgânica consumida no final do ensaio. Os ensaios foram encerrados quando a produção diária de metano, durante três dias consecutivos foi menor que 1% do volume acumulado de metano, de acordo com Holliger et al. (2016). Os ensaios foram conduzidos em frascos de 100 mL com 2/3 do volume útil, sendo

que os sólidos totais voláteis foram acertados a fim de que a relação A/M (alimento, em termos de DQO e microrganismo, em termos de STV) em cada ensaio fosse igual a 0,5, advindo da etapa de pré-exposição.

O fornecimento de substrato foi de 1000 mgDQO L⁻¹ em demanda química de oxigênio, com aproximadamente 100 mgDQO L⁻¹ de compostos fenóis totais, o que equivaleu a 10% em termos de concentração da ARCS. A escolha dessa concentração de substrato baseou-se em pesquisas nas quais foram utilizados substratos fenólicos, entre eles, a água residuária de café solúvel (MOSQUERA et al., 2019b), água residuária do beneficiamento de café (DE OLIVEIRA; BRUNO, 2013), e fase aquosa liquefação hidrotérmica da borra de café (DIAS et al., 2021). Nessas pesquisas, foi observado que a concentração de substrato escolhida não é inibitória para a metanogênese.

Os ensaios foram realizados em triplicata. Os parâmetros que foram analisados nos ensaios de biodegradabilidade foi a concentração de matéria orgânica expressa em DQO demanda e análise de biogás.

4.4.3. Determinação de Potencial Metanogênico

A digestão anaeróbia da ARCS foi estudada por meio de ensaios de determinação de potencial metanogênico – BMP, do inglês, *biochemical methane potential*. Os ensaios de BMP tiveram como amostras, em triplicata: a. branco (ensaio contendo a ARCS sem pré-tratamento) b. ensaios testes: ensaio 1 (50% da ARCS em pH inicial 6,5), ensaio 2 (100% ARCS em pH inicial 6,5), ensaio 3 (50% ARCS em pH inicial de 7,5) e ensaio 4 (100% ARCS em pH inicial 7,5).

Os ensaios que continham o tween 80 foram desconsiderados para avaliação devido a contribuição de matéria orgânica no processo. Vale ressaltar que essas condições são aquelas utilizadas no pré-tratamento fúngico. Após o fim do pré-tratamento esses ensaios foram conduzidos para biodegradabilidade anaeróbia sob as seguintes condições: matéria orgânica expressa em DQO em 2,5 gDQO L⁻¹, neutralidade (pH 7), e em estado termofílico (37°C).

Os ensaios foram encerrados quando a produção diária de metano, durante três dias consecutivos for menor que 1% do volume acumulado de metano, descontando a produção metanogênica dos ensaios brancos (HOLLIGER et al., 2021). Os ensaios foram conduzidos em frascos de 100 mL com 2/3 do volume útil, sendo que os sólidos totais voláteis foram acertados a fim de que a relação A/M (alimento, em termos de DQO e microrganismo, em termos de STV) em cada ensaio fosse igual a 0,5, advindo da etapa de pré-exposição.

O parâmetro analisado nos ensaios de biodegradabilidade foi a produção de biogás por transdução de pressão e análise de sua composição por cromatografia gasosa durante o ensaio. A produção de biogás foi monitorada por transdução de pressão. A composição do biogás foi analisada em cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo GC-2010 - equipado com detector de ionização de chama (FID), coluna HP INNOWAY de 30m x 0,25mm (diâmetro interno) x 0,25µm (espessura do filme).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudos *in silico* – Construção do modelo teórico tridimensional da lacase de *P. ostreatus* e atracamento molecular

5.1.1. Identificação de moldes homólogos

As sequências de lacases de estruturas tridimensional conhecidas e depositadas no PDB, identificadas pelo BLASTp e que apresentaram os maiores valores de *Max score* com a lacase de *P. ostreatus* AOM73725.1, estão apresentadas na tabela 6.

Tabela 6. Sequências moldes pelo servidor BLASTp para a lacase de *P. ostreatus*.

Microrganismo	PDB ID	Max Score	Identidade (%)	Resolução (Å)	R-V
<i>Trametes versicolor</i>	1GYC	649	64,55	1,90	0,212
<i>Coriolopsis gallica</i>	4A2D	639	63,55	2,30	0,228
<i>Coriolopsis gallica</i>	4A2F	639	63,55	1,90	0,224
<i>Coriolopsis trogii</i>	2HRG	638	62,95	1,58	0,192
<i>Coriolopsis gallica</i>	5A7E	638	63,15	1,50	0,183
<i>Aspergillus oryzae</i>	6H5Y	635	62,95	2,30	0,203
<i>Coriolopsis caperata</i>	4JHU	629	63,07	1,89	0,210
<i>Trametes coccinea</i>	5NQ8	624	63,25	2,00	0,173

Legenda: PDB ID: identificação da proteína no Protein Data Bank; *Max Score*: pontuação de alinhamento mais alta (*bit-score*) entre a sequência alvo e as sequências presentes no PDB; IDENTIDADE: porcentagem de aminoácidos da sequência molde que são idênticos aos da sequência alvo; RES: resolução do modelo em ångströms; R-V: *R-Value Free (R-factor)*.

As estruturas tridimensionais de lacase apresentadas na Tabela 6 foram obtidas pelo método de difração de raio X apresentando valores de *e-value* de aproximadamente 0 e *Query coverage* (porcentagem de cobertura do alinhamento) entre 94% e 97%. Na Tabela 6 é possível verificar que as sequências identificadas pelo BLASTp possuem identidade superior a 60% com a sequência da lacase de *P. ostreatus* AOM73725.1. Segundo Chung e Subbiah (1996), estruturas que possuam mais de 30 % de identidade são indicadas para construção de modelos

por homologia comparativa, sendo que nos casos em que a identidade é superior a 50% há drástica redução da divergência de regiões funcionais (FISER, 2017). Considerando esse quesito, todas as lacases da Tabela 6 poderiam ser utilizadas como molde para a construção do modelo teórico da lacase de *P. ostreatus*.

Todas as sequências proteicas apresentadas na Tabela 6 pertencem à superfamília de cupredoxina - CL19115 (Tabela 6). Além disso, os microrganismos produtores de tais biomoléculas são pertencentes do filo *Basidiomycota*, com exceção do fungo *Aspergillus oryzae* pertencente ao filo *Ascomycota*. Segundo Janusz et al. (2020), as lacases de fungos apresentam regiões altamente conservadas.

A identidade entre as sequências de aminoácidos é um fator relevante para a escolha de um molde, no entanto, esse parâmetro não leva em consideração diferenças estruturais (ÁLVAREZ-MACHANCOSES; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ; KLOCZKOWSKI, 2020). Desta forma, também foram analisados outros fatores para a escolha dos moldes homólogos, tais como composição estrutural (monômeros/dímeros) e dos sítios de cobre, *max score*, resolução e *r-values*.

A lacase de *P. ostreatus* é constituída de estrutura monomérica (HUBLIK; SCHINNER, 2000; PALMIERI et al., 1997; MANSUR et al., 2003), dessa forma, a estrutura com PDB ID 5NQ8 que é homodiméricas (ORLIKOWSKA et al., 2018) foi descartada como possíveis moldes para a estrutura alvo. Além disso, a lacase de *P. ostreatus* AOM73725.1 possui 4 átomos de cobre, sendo um, Cu T2, dessa forma, os moldes que possuem apenas três átomos de cobre como é o caso das lacases de *Coriolopsis gálica* (PDB ID 4A2D e 4A2F), que não contém o cobre do tipo 2 (DE LA MORA et al., 2015) foram descartadas como possíveis moldes.

A estrutura PDB ID 1GYC apresentou melhor resultado de *max score* com valor de 649 (Tabela 6). As estruturas denominadas PDB ID 5A7E, 2HRG, 4JHU e 1GYC, apresentam resolução de 1,50 Å, 1,58 Å, 1,89 Å e 1,90 Å, e *R-Value* de 0,183, 0,192, 0,210 e 0,212 respectivamente, conforme Tabela 6. Segundo Maia, De Araújo Campos e De Moraes Filho (2021), quanto menor o valor numérico atribuído à resolução de uma estrutura 3D, melhor é a sua qualidade, sendo que valores inferiores a 2,0 Å são considerados de excelente resolução e com melhor qualidade. A partir disso, a estrutura PDB ID 6H5Y foi descartada como possível molde por apresentar resolução superior a 2,0 Å.

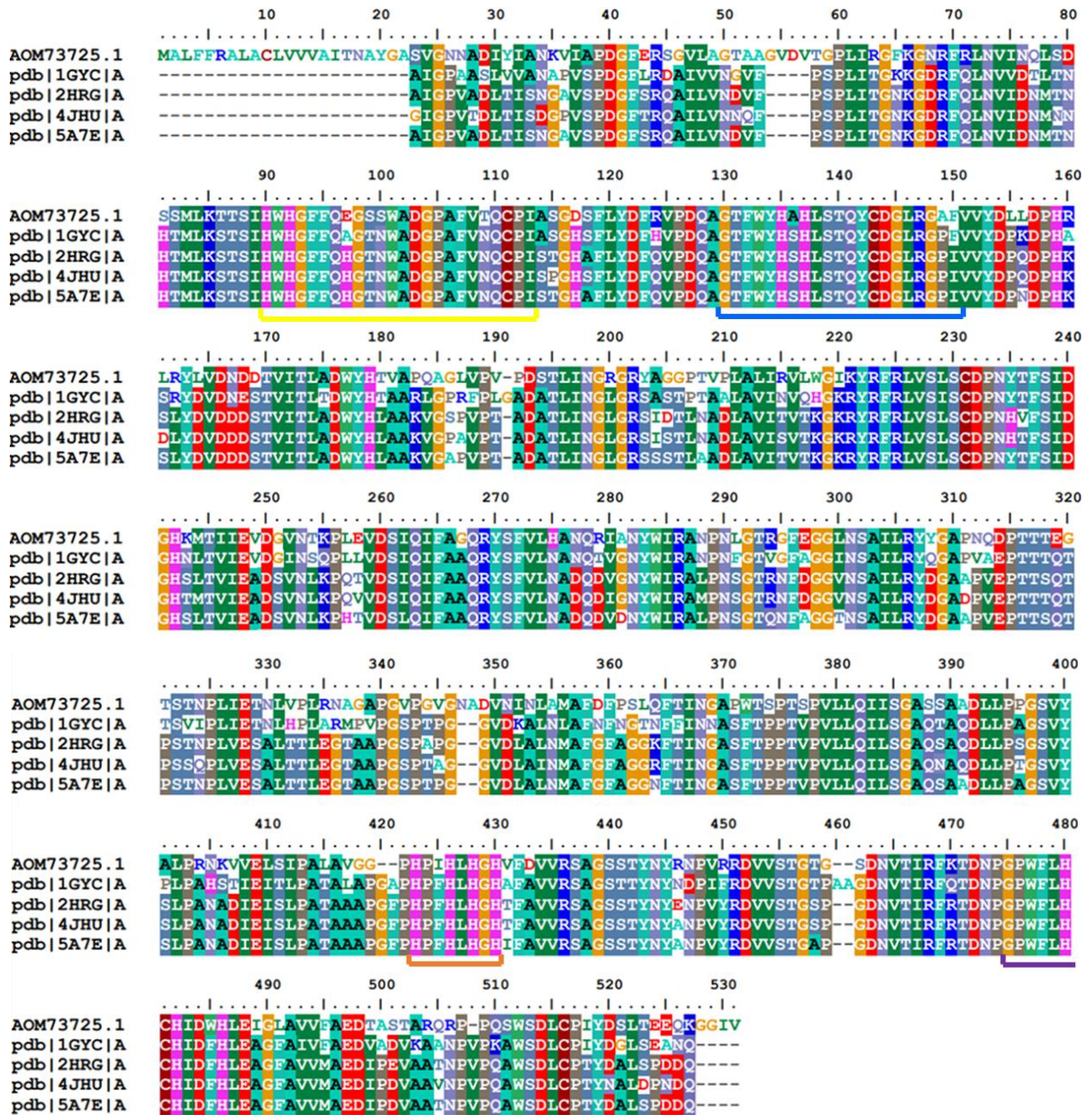
Sendo assim, as sequências identificadas como homólogas e selecionadas com base nos critérios apresentados foram as 1GYC, 2HRG, 5A7E e 4JHU, que foram isoladas a partir dos

respectivos fungos: *Trametes versicolor*, *Coriolopsis trogii*, *Coriolopsis gálica* e *Coriolopsis caperata*.

5.1.2. Alinhamento Múltiplo e análise da sequência de aminoácidos

O alinhamento múltiplo entre a sequência de aminoácidos a lacase de *P. ostreatus* AOM73725.1 e as estruturas identificadas como 1GYC, 5A7E, 2HRG e 4JHU feitas no servidor Clustal W mostrou que existem regiões conservadas em todas as estruturas avaliadas (Figura 8) (PIONTEK; ANTORINI; CHOINOWSKI, 2002; DE LA MORA et al., 2012; MATERA et al., 2008; GLAZUNOVA et al., 2015).

Figura 8. Alinhamento múltiplo da lacase de *P. ostreatus* AOM73725.1 com as estruturas 1GYC, 5A7E, 2HRG e 4JHU.



Legenda: As regiões sublinhadas e coloridas em amarelo, azul, laranja e roxo correspondem às regiões conservadas das lacases, respectivamente, L1, L2, L3 e L4. *(asterisco) – indica posições que possuem um único resíduo totalmente conservado; ;(dois pontos) – indica a conservação entre grupos de propriedades fortemente semelhantes; .(ponto) – indica a conservação entre grupos de propriedades fracamente semelhantes.

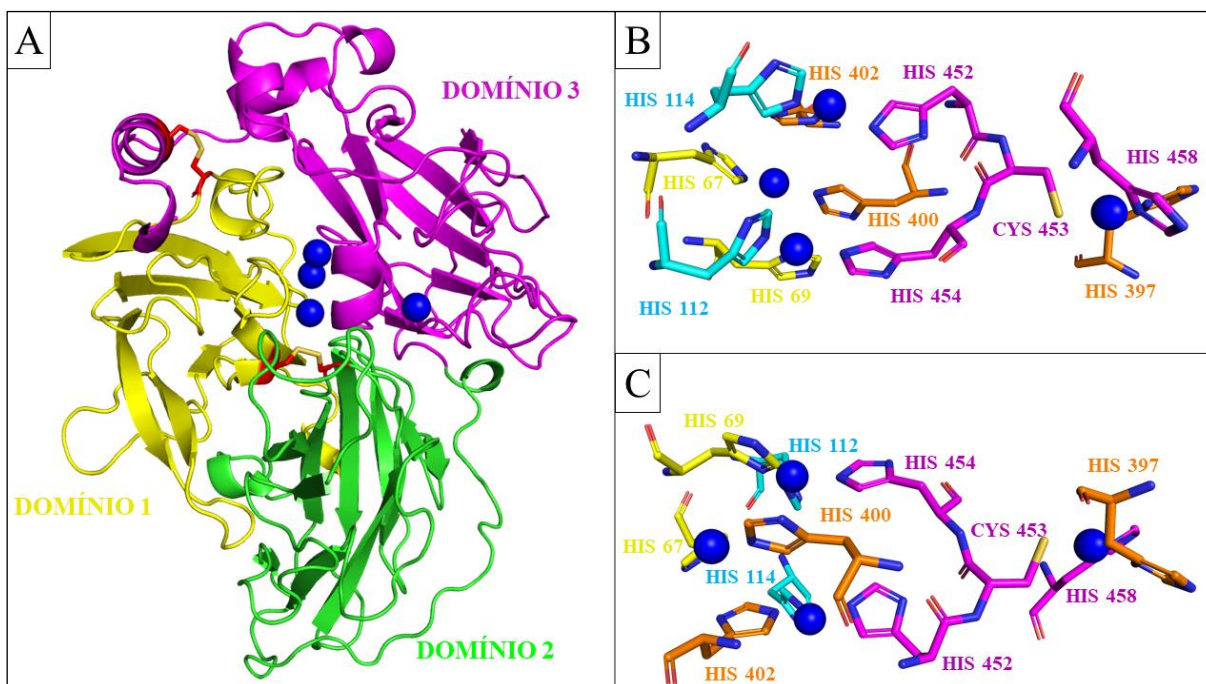
As lacases fúngicas possuem regiões com alta conservação distribuída ao longo da sequência de aminoácidos das proteínas (Figura 8), possuindo alto percentual de similaridade, o que é esperado para lacases, já que é amplamente distribuída entre diferentes grupos de seres vivos (JANUSZ et al., 2020). No alinhamento múltiplo entre a lacase de *P. ostreatus* AOM73725.1 e as estruturas 1GYC, 5A7E, 2HRG e 4JHU foram identificadas quatro regiões

conservadas, que são designadas como as regiões L1, L2, L3 e L4. Um total de 10 histidinas e 1 cisteína, que ligam-se aos cobres do sítio de ligação, são conservadas em todas as multi-cobre oxidases, sendo que nas lacases, esses resíduos estão alojados nas quatro regiões conservadas supracitadas, e que são compostas pelos seguintes aminoácidos: L1 (H-W-H-G-X₉-D-G-X₅-QCPI), L2 (G-T-X-W-Y-H-S-H-X₃-Q-Y-C-X-D-G-L-X-G-X-(FLIM)), L3 (H-P-X-H-L-H-G-H) e L4 (G-(PA)-W-X-(LFV)-HCHI-DAE-X-H-X₃-G-(LMF)-X₃-(LFM))¹ (Figura 9B e 9C), o resíduo X representa um resíduo indefinido, enquanto os resíduos entre parênteses representam um resíduo parcialmente conservado (KUMAR *et al.*, 2003).

As estruturas com PDB ID 1GYC, 5A7E, 2HRG e 4JHU possuem apenas cinco resíduos de cisteína em suas sequências de aminoácidos, já a sequência da lacase de *P. ostreatus* AOM73725.1 possui seis cisteínas. Além disso, no alinhamento múltiplo é possível identificar que essas cisteínas estão localizadas em posições conservadas, sendo elas: 111, 143, 231, 481, 516 (usando a lacase de *P. ostreatus* AOM73725.1 como referência no alinhamento). Análise no servidor DIANNA identificou, que todas as sequências de aminoácidos possuem duas pontes dissulfeto em posições iguais no alinhamento, com exceção da sequência com PDB ID 5A7E com apenas uma, uma entre os domínios 1 e 3 e a outra entre os domínios 1 e 2 (Figura 9A). Fu *et al.* (2020) avaliaram sequências de aminoácidos das lacases de *Amylostereum areolatum*, tendo observado que quase todas as sequências analisadas continham cinco resíduos de cisteína e pelo menos uma ponte dissulfeto. Geralmente, as cisteínas são conservadas entre proteínas relacionadas, e o padrão de conectividade das cisteínas pode indicar que as proteínas possuem estrutura tridimensional semelhante (THANGUDU *et al.*, 2008), sendo então notório a semelhança estrutural entre a lacase de *P. ostreatus* AOM73725.1 e as sequências analisadas.

¹ Abreviatura de uma letra dos aminoácidos: A – Alanina; C – Cisteína; D – Ácido Aspártico; E – Ácido Glutâmico; F – Fenilalanina; G – Glicina; H – Histidina; I – Isoleucina; K – Lisina; L – Leucina; M – Metionina; N – Asparagina; P – Prolina; Q – Glutamina; R – Arginina; S – Serina; T – Treonina; V – Valina; W – Triptofano; Y – Tirosina.

Figura 9. Domínios e pontes dissulfeto da estrutura do modelo tridimensional da lacase de *Pleurotus ostreatus* Lacc 4.



Legenda: **A:** Em amarelo: Domínio 1; Em verde: Domínio 2; Em roxo: Domínio 3; Esferas em azul: átomos de cobre; Em vermelho: resíduos de cisteínas que formam as duas pontes dissulfeto. **B:** Zoom na região dos átomos de cobre mostrando a interação com os resíduos das regiões conservadas da lacase. Em azul: átomos de cobre; Em amarelo: região L1; Em ciano: região L2; Em laranja: região L3; Em roxo: região L4. **C:** Outro ângulo de visão dos átomos de cobre, demonstrando que não há sobreposição dos átomos.

A lacase ora estudada é uma proteína que possui três domínios conservativos de cobre-oxidases, característico das lacases fúngicas, que são regiões conservadas da família das lacases. É importante ressaltar que nestas regiões encontram-se os sítios de ligação dos íons de cobre responsáveis catálise enzimática (GIARDINA et al., 2010). Após análise no software InterProScan (ZDOBNOV; APWEILER, 2001) identificou-se que o domínio I da lacase de *Pleurotus ostreatus* é composto por 97 resíduos (57-154), o domínio II possui 140 resíduos, (169-309), e o domínio III é composto por 122 resíduos (372-494) (Figura 9). De acordo com Sitarz, Mikkelsen e Meyer (2016), o sítio do CU T1 localiza-se em bolsão na superfície da enzima, na interface do domínio 3, enquanto o sítio trinuclear de cobre (T2/T3) são posicionados entre os domínios 1 e 3, os quais fornecem os resíduos ligantes para a coordenação dos átomos de cobre.

5.1.3. Construção dos modelos teóricos da lacase de *P. ostreatus*

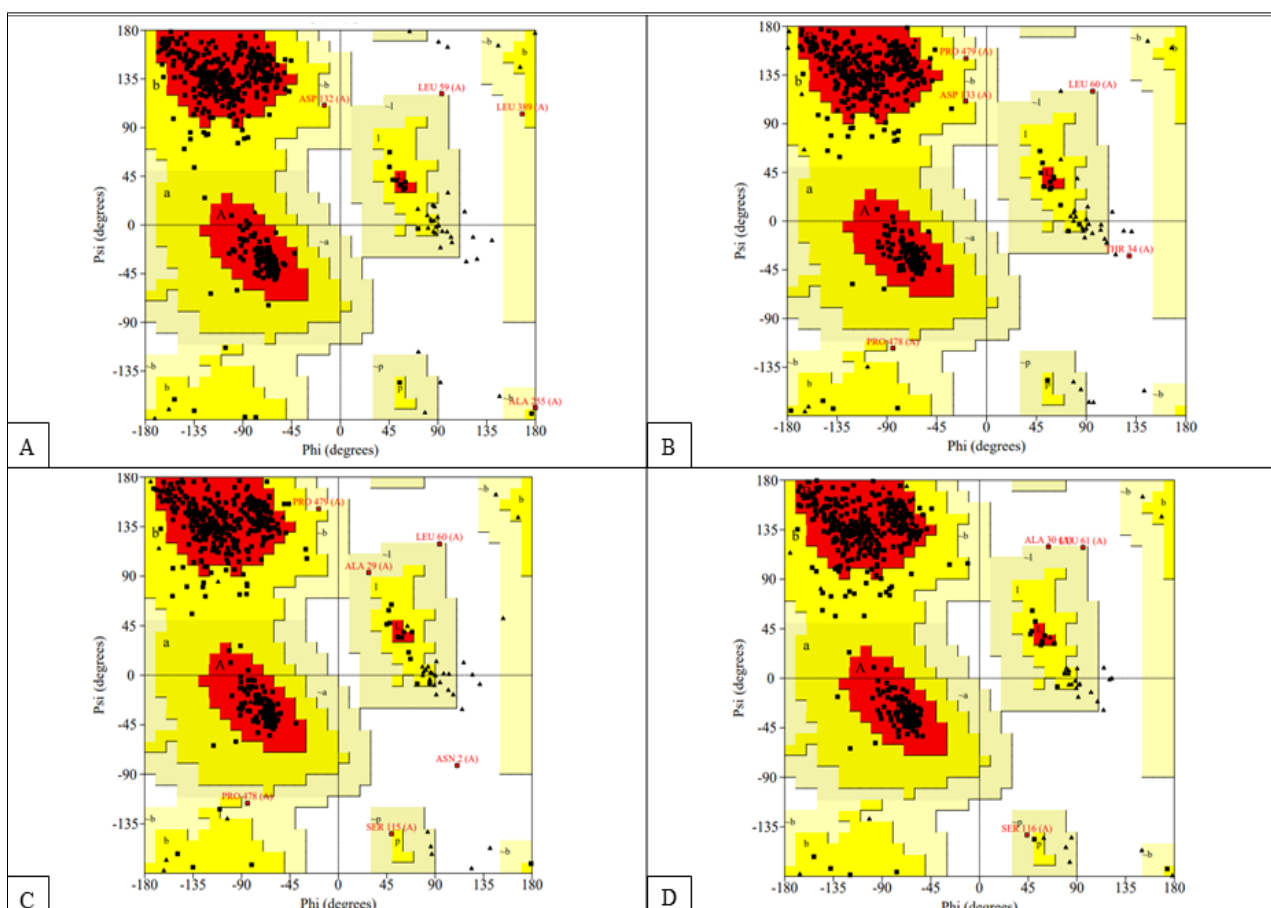
Os 21 resíduos no início da sequência de aminoácidos da lacase de *P. ostreatus* (AOM73725.1) constituem um peptídeo sinal, conforme análise no InterProScan, como esse peptídeo não faz parte das regiões conservadas das lacases, ocorre então a formação de um gap no início do alinhamento (Figura 8). Dessa forma, os modelos criados tiveram a sequência de peptídeo sinal retirada manualmente. Wallner e Elofsson (2005) identificaram perdas de coordenadas dos modelos nas regiões N-terminal e C-terminal nos programas Swiss-Model, 3D-JIGSAW e Builder devido a ocorrência de gaps nessas regiões.

Dentre os 200 modelos teórico da lacase de *P. ostreatus* construídos para cada molde, foram selecionados os com melhores valores de DOPE score, sendo obtido os seguintes valores: 1GYC (*Lacc 1*) = -59394,08594; 2HRG (*Lacc 2*) = -59596,25781; 5A7E (*Lacc 3*) = -59448,48047; e 4JHU (*Lacc 4*) = -60823,17578.

5.1.4. Validação dos modelos

Os modelos apresentaram alta qualidade estereoquímica e pequenas diferenças entre si (Figura 10), sendo que os modelos *Lacc 3* e *Lacc 1* obtiveram 91,1 e 91,0% de aminoácidos em regiões mais favoráveis respectivamente, e somente 0,2% de resíduos nas regiões desfavoráveis. Já no modelo *Lacc 4* obteve 90,1% de aminoácidos na zona energeticamente favorável, e foi o único modelo com 0,0% nas regiões desfavoráveis. O modelo *Lacc 2* foi o único que apresentou menos de 90% dos aminoácidos nas regiões mais favoráveis (Tabela 7).

Figura 10. Validação dos modelos pelo gráfico de Ramachandran: distribuição dos resíduos de aminoácidos que compõem a estrutura tridimensional da lacase de *P. ostreatus*



Legenda: A- modelo *Lacc 1*; B- modelo *Lacc 2*; C- modelo *Lacc 3*; D- modelo *Lacc 4*. Áreas vermelhas – Regiões mais favoráveis; Áreas amarelas – Regiões adicionais permitidas; Áreas bege – Regiões generosamente permitidas; Áreas brancas; Regiões não permitidas.

Tabela 7. Dados da validação dos modelos teóricos pelo gráfico de Ramachandran

Modelo	Sequência molde	RDMF (%)	RDAP (%)	RDGP (%)	RDNP (%)
<i>Lacc 1</i>	1GYC	91,0	8,0	0,7	0,2
<i>Lacc 2</i>	2HRG	89,9	9,2	0,7	0,2
<i>Lacc 3</i>	5A7E	91,1	8,2	0,5	0,2
<i>Lacc 4</i>	4JHU	90,1	9,2	0,7	0,0

Legenda: RDMF – resíduos distribuídos em regiões mais favoráveis [A,B,L]; RDAP – resíduos distribuídos em regiões adicionais permitidas [a, b, l, p]; RDRA - resíduos distribuídos em regiões generosamente permitidas [~a, ~b, ~l,~p]; RDRN - resíduos distribuídos em regiões não permitidas.

Um modelo criado pela técnica de homologia pode ser validado pelo gráfico de Ramachandran, que considera fatores estereoquímicos, sendo que modelos com excelente qualidade apresentam mais de 90% de resíduos em regiões energeticamente mais favoráveis,

dessa forma, os modelos *Lacc 1*, *Lacc 3* e *Lacc 4* obtidos nessa pesquisa são considerados bons em termos estereoquímicos (LASKOWSKI et al., 1993).

Todos os modelos apresentaram alta semelhança entre a estrutura 3D e a sequência de aminoácidos (estrutura 2D), obtendo-se valores superiores a 94% no Verify. A frequência relativa de interações não covalentes entre os vários tipos de átomos apresentou valores superiores a 60 no Errat, demonstrando a alta qualidade dos modelos. Os resultados da comparação entre os volumes atômicos e os conjuntos de valores padrão pré-calculados no PROVE mostraram que dos quatro modelos criados, apenas o modelo *Lacc 2* apresentou porcentagem superior a 5%, sendo considerado falho (Tabela 8) (BOWIE; LUTHY; EISENBERG, 1991; MESSAOUDI; BELGUITH; BEN HAMIDA, 2013; PONTIUS; RICHELLE; WODAK, 1996; COLOVOS; YEATES, 1993).

Tabela 8. Dados da validação dos modelos teóricos pelo VERIFY 3D, ERRAT e PROVE.

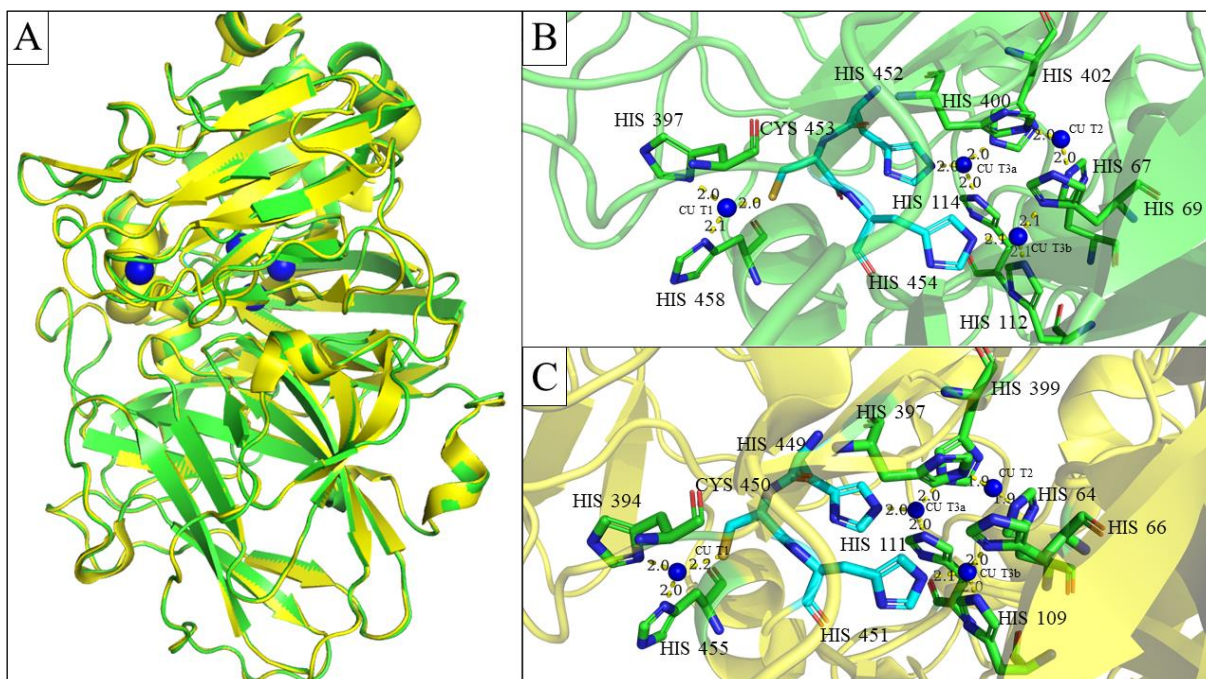
Modelo	Sequência molde	VERIFY 3D (%)	ERRAT	PROVE (%)
<i>Lacc 1</i>	1GYC	97,58	74,13	4,9
<i>Lacc 2</i>	2HRG	97,18	61,88	5,8
<i>Lacc 3</i>	5A7E	94,77	72,19	3,7
<i>Lacc 4</i>	4JHU	98,39	66,33	3,7

O modelo *Lacc 4* foi o único que apresentou simultaneamente mais de 90% dos aminoácidos nas regiões mais favoráveis, 0% de aminoácidos nas regiões não permitidas, associado às melhores pontuações no Verify 3D e no Prove, com 98,39% e 3,7%, respectivamente, dessa forma, foi selecionado para os testes *in silico*.

5.1.5. Análise estrutural do modelo teórico – *Lacc 4*

A sobreposição do modelo *Lacc 4* e a estrutura PDB ID 4JHU mostra a semelhança entre o modelo criado e a estrutura nativa (Figura 11A), comprovado pelo cálculo do RMSD, com pontuação de 0,102. Além disso, ambas estruturas 3D tiveram semelhança nas localizações dos átomos de cobre, e na distância entre o nitrogênio do resíduo e o cobre (Figura 11B e 11C), com o Cu T1 se localizado próximo a superfície da proteína.

Figura 11. Comparação entre os modelos *Lacc 4* e 4JHU, visualizada no software PyMOL.



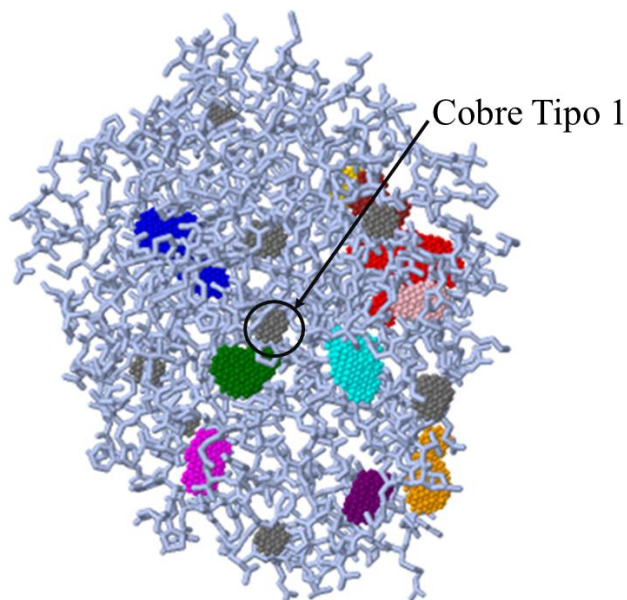
Legenda: **A:** Sobreposição do modelo *Lacc 4* e da estrutura 4JHU. Em verde: modelo *Lacc 4*; Em amarelo: estrutura PDB ID 4JHU; Esferas azuis: átomos de cobre. **B:** Sítio ativo do modelo *Lacc 4*. **C:** Sítio ativo da estrutura PDB ID 4JHU. Em azul: átomos de cobre, com as distâncias até os aminoácidos. Nos aminoácidos – Em azul: nitrogênio; Em verde: carbono; Em vermelho: oxigênio; Em amarelo: sulfeto; Em azul claro: sequência His-Cys-His.

Além disso, é possível observar a semelhança entre as estruturas na sequência altamente conservada His-Cys-His (Figura 11B e 11C), a conservação dos aminoácidos é importante, pois após a oxidação do substrato, os elétrons abstraídos dos substratos são então transferidos do Cu T1, por meio da sequência de aminoácidos His-Cys-His altamente conservada, para a região trinuclear T2/T3, onde os elétrons finalmente reduzem o O₂ a H₂O (OSIPOV et al., 2014; JEON et al., 2012; MATE; ALCALDE, 2017; MAESTRE-REYNA et al., 2015; JONES; SOLOMON, 2015; CHATZIKONSTANTINOOU et al., 2018; WANG et al., 2015).

A análise estrutural do modelo teórico da lacase de *P. ostreatus Lacc 4* demonstrou que a estrutura possui 7 folhas β , 8 grampos β , 8 protuberâncias β , 31 fitas β , 12 hélices, 3 interações hélice-hélice, 66 alças β , 7 alças γ , 2 pontes dissulfeto, além dos 4 átomos de cobre. O alto número de fitas β fazem com que haja a formação das chaves gregas em cada um dos domínios do modelo *Lacc 4*, as quais estão estabilizadas por pontes de hidrogênio entre as folhas β . Os domínios característicos da lacase apresentam uma arquitetura semelhante a uma chave grega (barril β) com duas folhas β , cada uma composta por quatro fitas, o que torna os domínios da estrutura estáveis. Normalmente a estrutura é estabilizada por meio da formação de pontes dissulfeto entre os domínios (MOT; SILAGHI-DUMITRESCU, 2012), como pode ser observada na figura 9A.

Na Figura 12 são identificados os possíveis sítios de ligação do modelo teórico da lacase de *P. ostreatus Lacc 4*. Verifica-se os sítios 3 e 5 são os mais próximos ao Cu T1, e, portanto, são os mais prováveis sítios ativos da proteína. Os aminoácidos que compõem os sítios 3 e 5 estão listados na Tabela 9.

Figura 12. Possíveis sítios de ligação vistos no Ghecom, calculados dentro de um raio de 4Å do modelo *Lacc 4*.



Legenda: Em vermelho: sítio 1; Em azul: sítio 2; Em verde: sítio 3; Em amarelo: sítio 4; Em ciano: sítio 5.

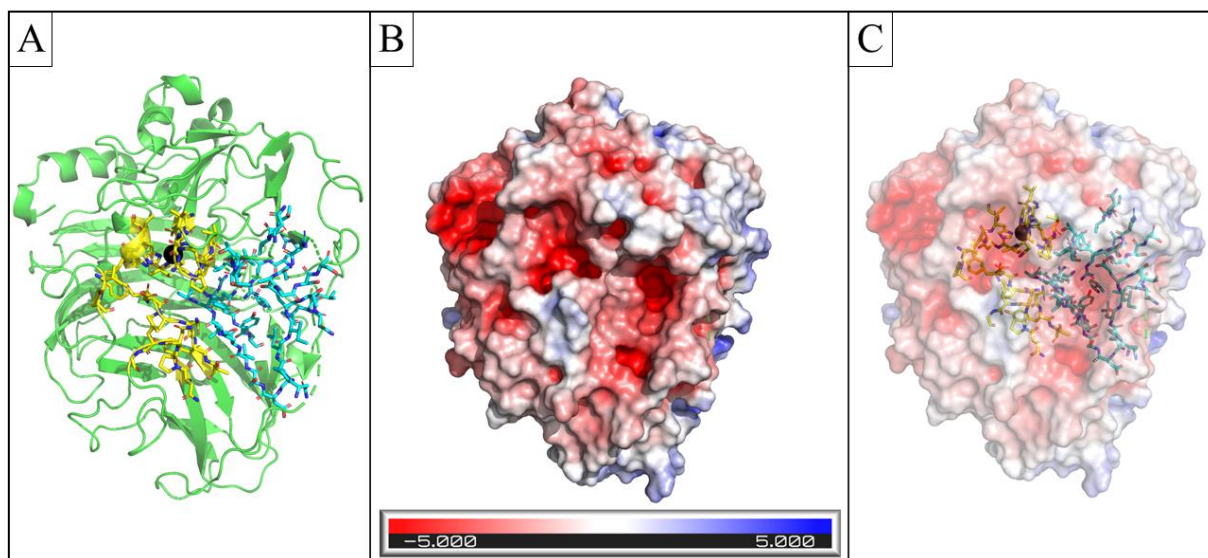
Na Tabela 9 nota-se que o sítio 5 é composto por 41 resíduos, sendo 18 apolares, além de não conter nenhum dos aminoácidos que interagem com os átomos de cobre. Por outra via, diversos aminoácidos, que caracteristicamente são conhecidos por interagirem com os átomos de cobre no sítio catalítico das lacases são encontrados no sítio 3, sendo que os aminoácidos HIS 397, CYS 453, HIS 458 interagem com o Cu T1, enquanto as HIS 452 e HIS 454 interagem com os cobres T3a e T3b, respectivamente (Figura 11b). Além disso, o sítio 3 é composto por 35 resíduos de aminoácidos, dos quais 21 são apolares (sendo que o sítio 3 possui maior porcentagem de resíduos hidrofóbicos), os quais possuem importante papel para o sítio catalítico das lacases, pois quando uma região hidrofóbica fica próxima ao íon de cobre causa uma relativa desestabilização do estado do cobre oxidado Cu^{2+} sobre o estado do cobre reduzido Cu^{1+} , resultando em um maior potencial redox do cobre correspondente (GUNNE et al., 2014).

Tabela 9. Aminoácidos que fazem parte dos sítios catalíticos 3 e 5 do modelo *Lacc 4*, obtidos por meio do Ghecom.

Sítio 3	Sítio 5
VAL 165; PRO 166; CYS 207; ASP 208; PRO 209; ASN 210; TYR 211; THR 212; GLN 239; PHE 241; ALA 242; GLY 243; ASN 264; PRO 265; ASN 266; LEU 267; GLY 268; VAL 393; GLY 394; GLY 395; PRO 396; HIS 397; PRO 398; ILE 399; VAL 428; SER 429; THR 430; HIS 452; CYS 453; HIS 454; ILE 455; ASP 456; TRP 457; HIS 458; LEU 459.	VAL 225; VAL 235; ASP 236; SER 237; ILE 238; GLN 239; ILE 240; PHE 241; ALA 242; GLY 243; GLN 244; ARG 245; TYR 246; SER 247; ASN 300; PRO 301; LEU 302; ILE 303; GLU 304; THR 305; ASN 306; LEU 307; VAL 308; ARG 410; SER 411; ALA 412; GLY 413; SER 414; SER 415; ARG 424; ARG 425; ASP 426; VAL 427; VAL 428; SER 429; TYR 430; GLY 431; TYR 432; ASN 436; VAL 437; THR 438.

Ambos os sítios localizam-se em regiões eletronegativas (Figura 13). Em um estudo realizado com a lacase de *Trametes versicolor*, notou-se que em um complexo lacase-substrato, o substrato se liga em um pequeno bolso carregado negativamente perto do Cu T1. As cargas negativas desse local podem ter significado funcional, uma vez que podem estabilizar radicais catiônicos que são formados durante o ciclo catalítico (PIONTEK; ANTORINI; CHOINOWSKI, 2002).

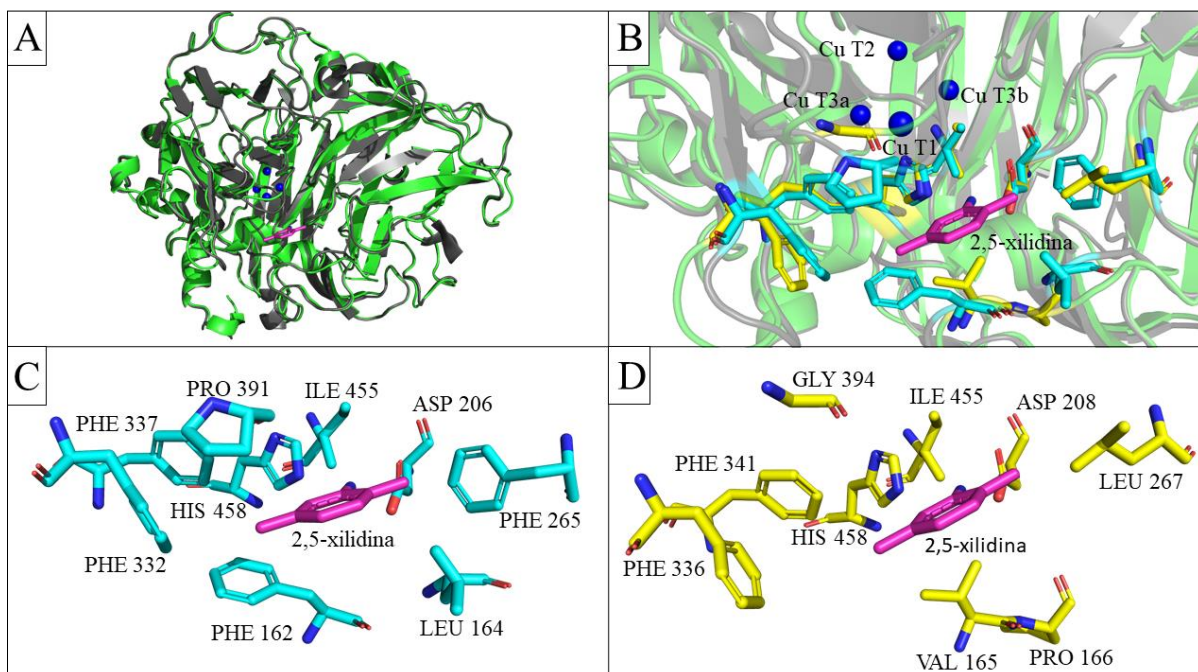
Figura 13. Caracterização eletrostática do modelo *Lacc 4*, visualizada no software PyMOL.



Legenda: **A**: resíduos que compõe os sítios 3 e 5. **B**: Superfície eletrostática do modelo *Lacc 4*. **C**: Sobreposição da superfície eletrostática sobre os sítios 3 e 5. Em verde: estruturas secundárias; Em amarelo: sítio 3; Em ciano: sítio 5; Superfície eletrostática varia entre as cargas positivas (azul), cargas neutras (branco) e cargas negativas (vermelho).

As características do sítio 3 demonstram que provavelmente este seja o sítio catalítico do modelo *Lacc 4*. A estrutura da lacase de *Trametes versicolor* com PDB ID 1KYA, utilizada para confirmação dos aminoácidos que compõem o sítio ativo do modelo *Lacc 4* (Figura 14), foi determinada pelo método de difração de raio X e possui resolução de 2.40 Å, com enzima cristalizada ligada à 2,5-xilidina, que foi usada como indutor da lacase na cultura do fungo. A sobreposição das estruturas mostrou que ambas as estruturas possuem grande similaridade estrutural, com diversas regiões altamente conservadas (Figura 14A), inclusive na região do sítio ativo, visto que os aminoácidos próximos a 2,5-xilidina no modelo 1KYA são similares aos aminoácidos do sítio 3 (Figura 14B). Comparando-se a estrutura da lacase obtida experimentalmente com o modelo teórico *Lacc 4* é possível sugerir que o sítio 3 é muito possivelmente o sítio ativo do modelo *Lacc 4*.

Figura 14. Comparação entre o modelo *Lacc 4* e a estrutura 1KYA, visualizada no software PyMOL.



Legenda: A - Sobreposição das estruturas cristalográfica 1KYA (cinza escuro) e do modelo teórico *Lacc 4* (verde). Esferas azuis: átomos de cobre; Em rosa: 2,5-xilidina. B - Zoom na região do sítio ativo com a sobreposição dos resíduos das duas estruturas próximos a 2,5-xilidina. Em ciano: aminoácidos da estrutura 1KYA; Em amarelo: aminoácidos do modelo *Lacc 4*. C - Aminoácidos da estrutura 1KYA próximos a 2,5-xilidina. D - Aminoácidos da estrutura *Lacc 4* próximos a 2,5-xilidina.

Entre os resíduos da estrutura 1KYA que interagem com a 2,5-xilidina estão a HIS 458 e a ASP 206 que estão envolvidos na transferência de elétrons e prótons (BERTRAND et al., 2002), os quais são conservados e estão presentes no modelo da lacase *Lacc 4* como HIS 458 e a ASP 208 (Figura 14C e 14D). Já os demais aminoácidos próximos a 2,5-xilidina sofrem

algumas mutações, sendo que os aminoácidos PHE 162, LEU 164, PHE 265 e PRO 391 da estrutura 1KYA foram substituídos por VAL 165, PRO 166, LEU 267 e GLY 394 no modelo *Lacc 4* (Figura 14C e 14D). Mohamad, Ong e Ripen (2008) analisaram os resíduos do sítio ativo da estrutura 1KYA e observaram que alguns resíduos presentes no sítio de ligação são aminoácidos apolares, como os aminoácidos PHE 162, LEU 164, PHE 265, PHE 332, PHE 337 e PRO 391, e na maioria dos casos, esses aminoácidos são substituídos por outros aminoácidos também apolares, como também foi visto na comparação entre os aminoácidos do sítio ativo das estruturas 1KYA e *Lacc 4*, com os aminoácidos substitutos sendo a valina, leucina e a glicina, todos apolares.

5.1.6. Atracamento Molecular entre a lacase de *Pleurotus ostreatus* e as estruturas da cadeia produtiva do café

A Tabela 10 apresenta os resultados dos atracamentos moleculares entre o modelo teórico da lacase de *P. ostreatus* (*Lacc 4*) e os compostos alvo da cadeia produtiva do café solúvel, com as respectivas energias livres de ligação. A energia de ligação foi negativa para todos os compostos alvos, indicando que a reação de degradação dos compostos fenólicos pela lacase é termodinamicamente viável (BALLAMINUT et al., 2019; HSU et al., 2012; SRIDHAR et al., 2013; SRINIVASAN et al., 2019).

Em todos os atracamentos moleculares foi observado o estabelecimento de pontes de hidrogênio, com exceção da cafeína, como demonstram a Tabela 10 e as Figuras 15 e 16. Segundo Joy et al. (2006), as interações de hidrogênio possuem papel fundamental na estabilização de reação entre a enzima e o substrato (composto alvo), demonstrando o potencial da lacase de degradar ou biotransformar os compostos analisados. Energia de ligação negativa e a ocorrência de interações de hidrogênio são indicativos da ação de degradação enzimática de poluentes (BALLAMINUT et al., 2019; HONGYAN et al., 2019; HSU et al., 2012).

Na Tabela 10 é possível verificar a posição das pontes de hidrogênio em cada um dos atracamentos moleculares e as respectivas distâncias entre os aminoácidos terminais e os compostos alvo, sendo observado a formação de pontes de hidrogênio com o aminoácido ASP 208 em seis compostos (ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, calocatequina, catequina e epicatequina), além disso, houve a formação de pontes de hidrogênio com o resíduo HIS 458 em três compostos (ácido cafeico, ácido clorogênico e calocatequina). A ocorrência de interações entre o ligante e a lacase envolvendo esses dois resíduos, é muito importante, porque esses aminoácidos estão envolvidos na transferência de elétrons e prótons (BERTRAND

et al., 2002). As interações de hidrogênio entre os resíduos ASP 208 e HIS 458 e cada um dos ligantes ocorreu por meio de uma interação com a hidroxila (OH) do grupo fenol do ligante, sendo sempre uma interação com resíduo-hidrogênio (Tabela 10, Figuras 16). Mehra, Meyer e Kepp (2018) também identificaram a formação de pontes de hidrogênio envolvendo o grupo OH do composto 2,6-dimetilfenol com os aminoácidos ASP 206 e HIS 458 da estrutura com PDB ID 1KYA, o que demonstra que a interação entre o fenol e a lacase provavelmente ocorre por meio da interação com a hidroxila do grupo fenol.

Tabela 10. Energia global e pontes de hidrogênio dos respectivos atracamentos moleculares.

Compostos alvo	Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)	Número de pontes de hidrogênio	Posição dos resíduos	Distância aa-Terminal (Å)
Ácido caféico	-5,2 a -4,1	3	ASN 210 -O	3,27
			PRO 396 -H	2,91
			HIS 458 -H	4,69
Ácido clorogênico	-5,6 a -4,5	6	2 ASP 208 -H	2,68; 2,78
			GLY 268 -O	3,09
			2 ARG 270 -O	2,87; 3,20
			HIS 458 -H	2,56
Ácido ferúlico	-4,9 a -3,7	1	ASP 208 -H	2,14
Ácido p-cumárico	-4,7 a -3,7	2	ASP 208 -H	5,23
			ASN 266 -O	4,41
Cafeína	-3,7 a -3,4	0	-	-
Calocatequina	-5,6 a -4,4	3	ASP 208 -H	4,71
			ASN 266 -O	5,21
			HIS 458 -H	4,52
Catequina	-5,9 a -4,4	1	ASP 208 -H	5,29
Epicatequina	-5,7 a -4,2	4	ASP 208 -H	2,35
			2 ASN 210 -O	2,87; 3,23
			PRO 396 -H	2,32

Na figura 15A observa-se o atracamento molecular entre a lacase de *P. ostreatus* e o ácido caféico, que indica a possível ação catalítica oxidativa de transferência no sítio de ligação T1, a partir dos resíduos ASN 210, PRO 396 e HIS 458.

Além das pontes de hidrogênio citadas anteriormente, é possível observar outras interações moleculares (Figura 16A), como por exemplo, interações amida-Pi empilhado, Pi-aquila e Pi-sigma não sendo verificada a existência de nenhuma interação desfavorável.

No atracamento molecular entre a lacase de *P. ostreatus* e o ácido clorogênico, (Figura 16B) e o ácido ferúlico (Figura 15C) verifica-se uma interação Pi-sigma envolvendo o resíduo LEU 267. Sendo que para o ácido ferúlico identificou-se ainda uma interação aquila e carbono-hidrogênio com o resíduo PRO 396, e uma amida-Pi empilhado com a GLY 395.

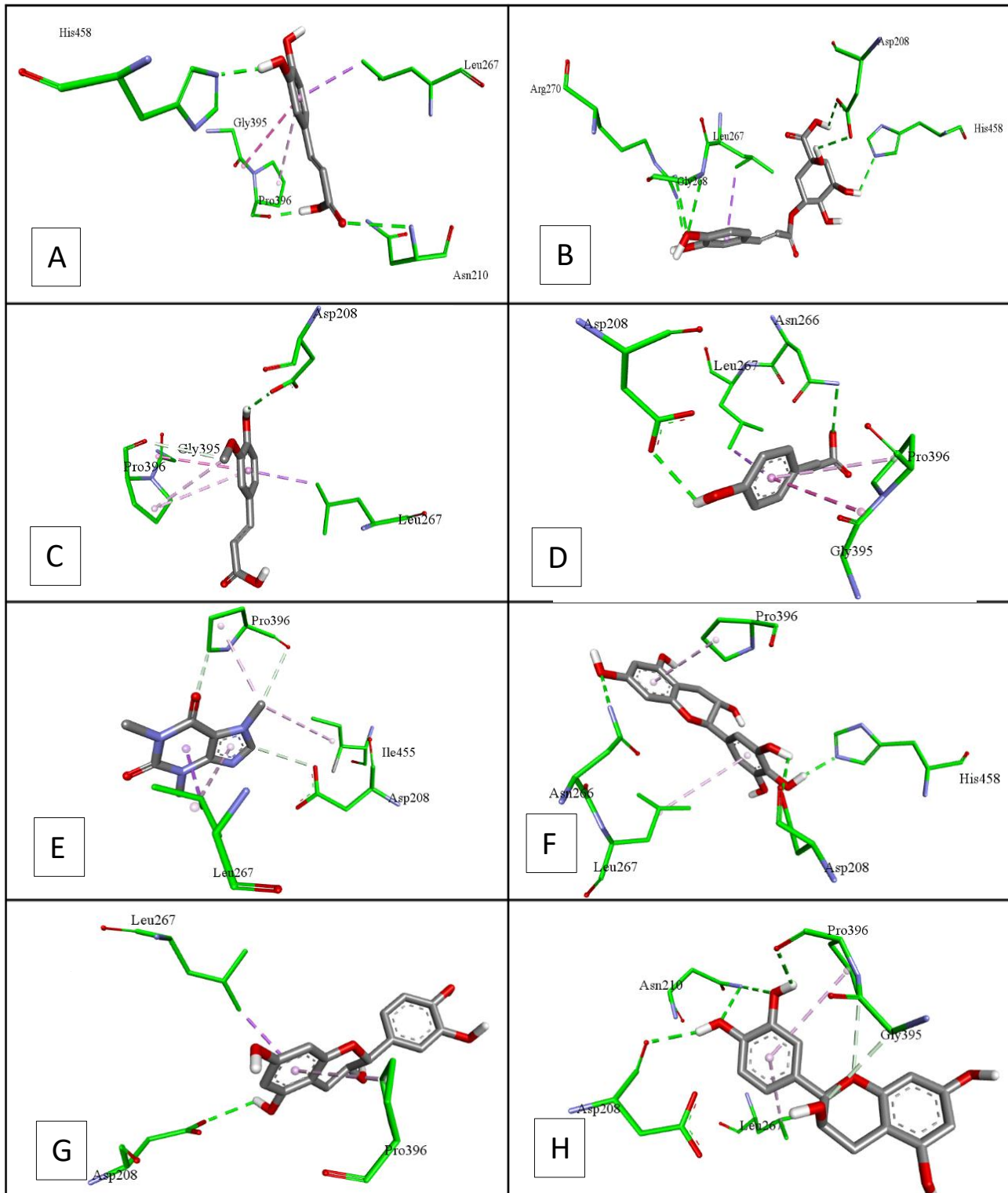
No atracamento com o ácido p-cumárico (Figura 15D) ocorreu uma ligação do tipo Pi-sigma com a LEU 267, além da formação de uma interação amida-Pi empilhado com a GLY 395 e uma Pi-aquila com a PRO 396. Na Figura 15F, verifica-se que na ancoragem molecular com o ligante calocatequina foi verificada a presença de duas ligações do tipo Pi-aquila, envolvendo os resíduos LEU 267 e PRO 396.

A Figura 15G demonstra as interações moleculares entre a lacase e a catequina, sendo observada uma interação Pi-aquila com o resíduo PRO 396 e uma Pi-sigma com a LEU 267. Já, nas análises com o ligante epicatequina (Figura 15H) ocorre uma interação Pi-aquila com o resíduo LEU 267 e duas interações carbono-hidrogênio envolvendo os resíduos GLY 395 e PRO 396.








Entre as interações entre a lacase e a cafeína (Figura 15E) estão interações alquil, Pi-aquila, Pi-sigma, interações carbono-hidrogênio. Não houve a formação de pontes de hidrogênio, no entanto, houve estabelecimento de quatro interações de Van der Waals, que são determinantes para a formação de complexos proteína-ligante, sendo relevantes para o reconhecimento molecular entre o ligante e os aminoácidos do bolsão de ligação de uma proteína alvo (BITENCOURT-FERREIRA; VEIT-ACOSTA; DE AZEVEDO, 2019).

A biologia computacional apresenta-se de forma positiva na compreensão de biomoléculas estudadas no presente trabalho. As análises de atracamento molecular demonstram a possibilidade de atuação da enzima lacase a partir de *P. ostreatus* na biodegradabilidade de compostos tóxicos presentes na ARCS, isto é, a aplicação de processo *in vivo* na remoção de CFT.

Figura 15. Atracamento molecular entre a lacase de *Pleurotus ostreatus* e as estruturas da cadeia produtiva do café solúvel.



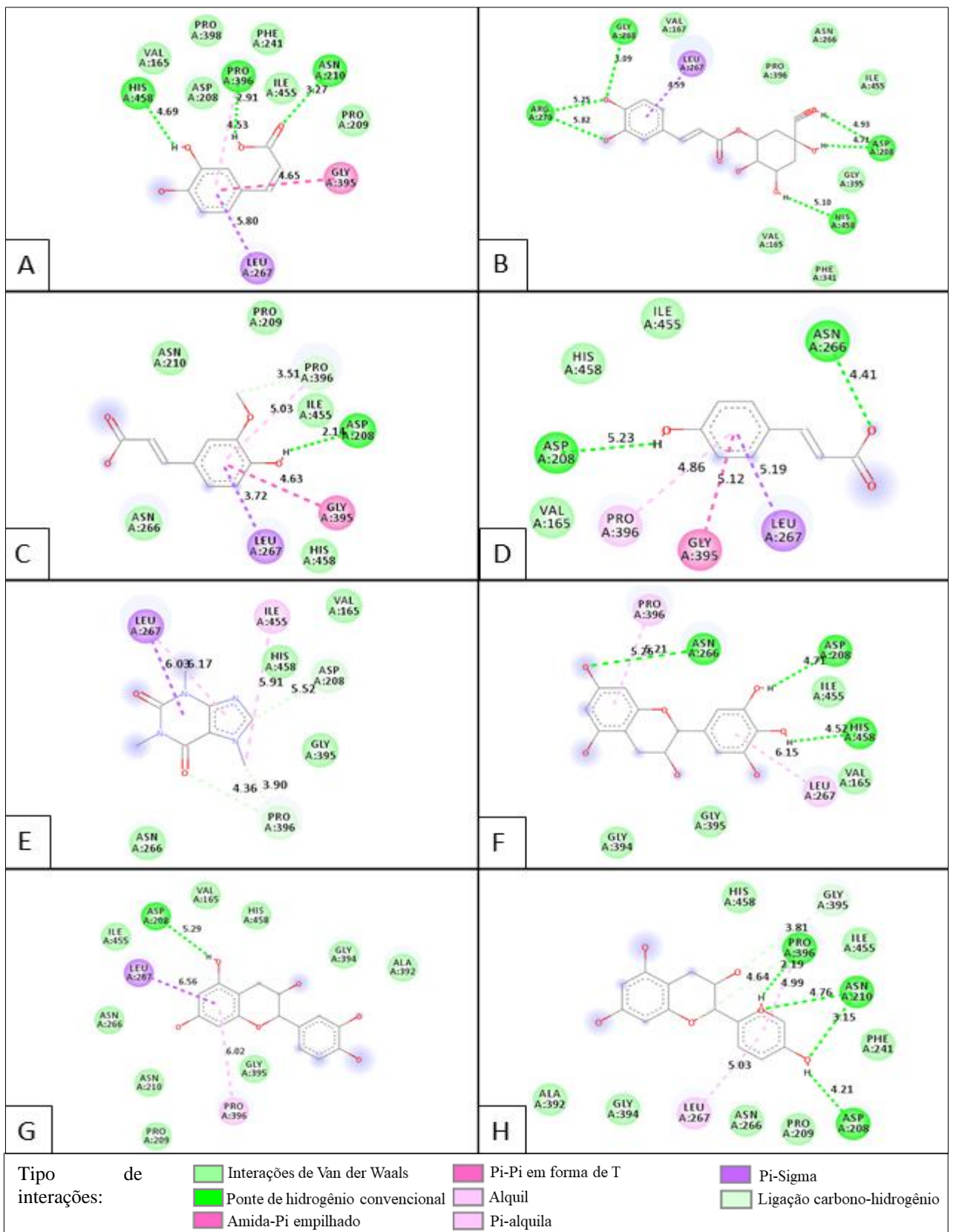
Tipo de interações:

- | | | | |
|---|----------------------------------|---|---------------------|
|  | Ponte de hidrogênio convencional |  | Pi-Pi em forma de T |
|  | Ligação carbono-hidrogênio |  | Alquil |
|  | Amida-Pi empilhado |  | Pi-alquila |
|  | Pi-Sigma | | |

Legenda: Atracamento molecular entre lacase de *Pleurotus ostreatus* e: A - ácido caféico; B - ácido clorogênico; C - ácido ferúlico; D- ácido p-cumárico; E- cafeína; F- calocatequina; G-catequina; H- epicatequina. ASN: asparagina; ARG: arginina; ALA: alanina; ASP: ácido aspártico; GLY: glicina; HIS: histidina; ILE: isoleucina; LEU: leucina; PHE: fenilalanina; PRO: prolina; VAL: valina.

Fonte: o autor.

Figura 16. Interações moleculares em duas dimensões entre a lacase de *Pleurotus ostreatus* e as estruturas alvo da cadeia produtiva do café solúvel



Legenda: Atracamento molecular entre lacase de *Pleurotus ostreatus* e: A - ácido caféico; B - ácido clorogênico; C - ácido ferúlico; D- ácido p-cumárico; E- cafeína; F- calocatequina; G-catequina; H- epicatequina. ASN: asparagina; ARG: arginina; ALA: alanina; ASP: ácido aspártico; GLY: glicina; HIS: histidina; ILE: isoleucina; LEU: leucina; PHE: fenilalanina; PRO: prolina; VAL: valina.

Fonte: o autor.

5.2. Caracterização da água residuária do café solúvel

Na Tabela 11 estão apresentados os parâmetros físicos químicos da ARCS.

Tabela 11. Parâmetros físico-químicos da ARCS.

Parâmetros	Valores
pH	7,33
CE ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	527 – 535
DQO ($\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$)	10502,64
Fenóis totais ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	1022,59
Alcalinidade Total ($\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$)	2349,81
Alcalinidade HCO_3 ($\text{mg HCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$)	616,52
Acidez Volátil	2712,53
Nitrogênio total kjeldahl ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	307,77
Nitrogênio, amônia ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	49,32
Fósforo total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	24,66
Fósforo solúvel ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	3,28
Sólidos totais ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	10042,33
Sólidos totais fixos ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	4304,33
Sólidos totais voláteis ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	5738,00
Sólidos suspensos totais ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	268,00
Sólidos suspensos fixos ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	21,33
Sólidos suspensos voláteis ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	246,67

5.3. Estudo do tratamento da ARCS por meio do fungo *P. ostreatus*

5.3.1. Cultivo sólido de *P. ostreatus* em ARCS

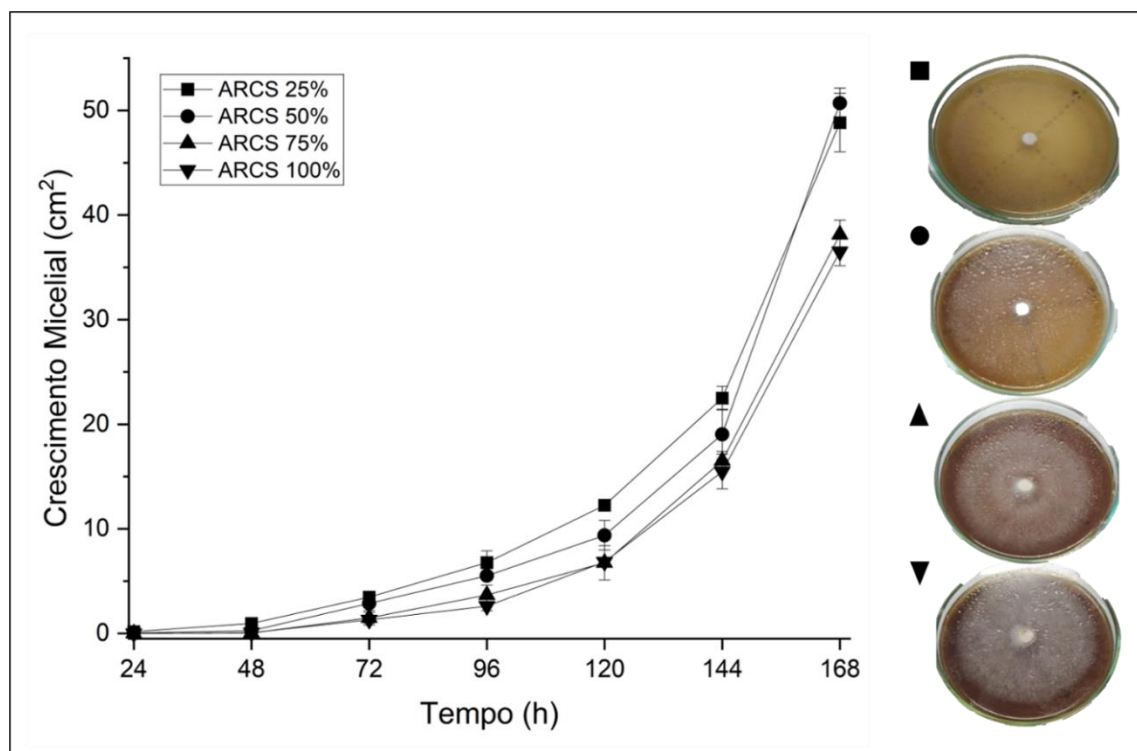
5.3.1.1. Crescimento Micelial de *P. ostreatus* em diferentes meios de cultura

Esse estudo teve como objetivo avaliar o crescimento micelial de *P. ostreatus* em ARCS visando sua utilização como inóculo etapa de tratamento da ARCS em meio líquido.

Inicialmente, foi utilizado como inóculo, o fungo crescido em meio BDA, entretanto, o fungo não resistiu a concentrações maiores que 30% da ARCS. Martinari (1995) relatou as mesmas dificuldades quando trabalhou no tratamento de água residuária da produção de azeite de oliva (ARAO) a partir de *P. ostreatus*. A adaptação de *P. ostreatus* em placa de Petri contendo ARAO em concentração de 0,2 g L⁻¹ foi descrita por Olivieri (2012). Dado o exposto, o estudo iniciou-se com a exposição do fungo a ARCS em meio sólido.

P. ostreatus foi capaz de crescer em todas as concentrações da ARCS (25%, 50%, 75% e 100%) em meio sólido utilizando somente ágar como agente solidificante, e autoclavado (Figura 16). Os maiores valores de crescimento fúngico ocorreram com 168h nos ensaios contendo 25% e 50% da ARCS com 48,8 cm² e 50,9 cm², respectivamente. Os ensaios contendo 75% e 100% da ARCS, obtiveram um crescimento micelial de 38,1 cm² e 36,5 cm², respectivamente. Observa-se que, mesmo com a adição de uma água residuária tóxica no meio de cultivo, as hifas fúngicas foram capazes de se expandir pela Placa de Petri, entretanto foi observado em todos os testes crescimento micelial com pouco vigor, isto é, as hifas apresentaram baixa densidade, principalmente nas concentrações de 25% e 50% (Figura 16). Não foi possível realizar a quantificação do crescimento fúngico nos testes realizados sem esterilização, devido à ocorrência de contaminações e baixa densidade micelial, o que dificultou a visualização.

Figura 16. Crescimento Micelial de *P. ostreatus* em concentrações crescentes de ARCS em ágar (agente solidificante).



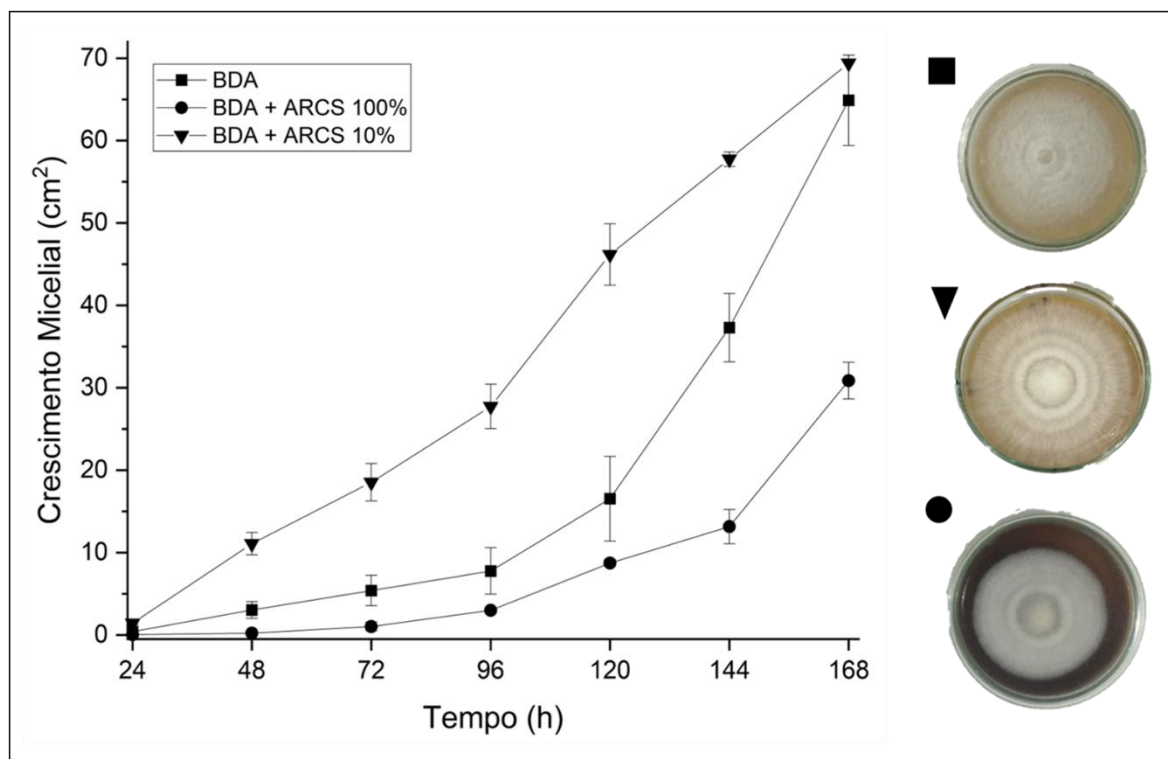
O crescimento de *P. ostreatus* utilizando meio BDA com e sem adição da ARCS está representado na Figura 17. Os ensaios que obtiveram maior crescimento micelial ocorreram na ausência da ARCS e com 10% da ARCS com 64,9 cm² e 69,39 cm², respectivamente, ao sétimo dia de cultivo. O ensaio com o meio BDA contendo 100% da ARCS apresentou um crescimento radial de 30,9 cm².

Os ensaios contendo somente BDA e BDA com 10% da ARCS apresentaram os maiores valores médios de crescimento, 6,15 mm dia⁻¹ e 7,45 mm dia⁻¹, respectivamente. O ensaio em BDA com 100% da ARCS apresentou um valor médio de crescimento de 3,33 mm dia⁻¹, indicando que a ARCS em baixas concentrações pode ser um suplemento nutricional para o crescimento de *P. ostreatus*, e que em concentrações maiores pode promover inibição no crescimento micelial.

Os testes em meio sólido usando meio BDA e 100% ARCS apresentaram maior densidade micelial, quando comparado com os testes com meio contendo somente ágar, com 100% de ARCS, como verifica-se nas Figuras 16 e 17. Nguyen e Ranamukhaarachchi (2020) avaliaram o crescimento de *P. ostreatus* em estado sólido a partir de diversos substrato, dentre eles, a borra de café que retardou o crescimento micelial utilizando tal substrato. Os autores sugeriram

que a presença de cafeína foi inibidora do crescimento microbiano da espécie, visto que quanto maior a concentração da borra de café maior a inibição.

Figura 17. Crescimento Micelial de *P. ostreatus* nas concentrações 0%, 10% e 100% em meio BDA.



Lee et al. (2017) avaliaram o crescimento micelial de basidiomicetos de *P. ostreatus* em Placa de Petri utilizando como substrato água residuária de suínos com 10g DQO L⁻¹ (a mesma concentração utilizada no presente estudo em 100% ARCS) tendo obtido velocidade de crescimento de 3,50 mm dia⁻¹. Vale ressaltar que nesse estudo, foram utilizados sete basidiomicetos, sendo eles: *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Lentinus edodes*, *Agaricus bisporus*, *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceus*, sendo somente observado crescimento micelial de *P. ostreatus* e *H. erinaceus*.

Zárate-Salazar et al. (2020) estudaram o crescimento de quatro cepas de *P. ostreatus* em meio BDA, obtendo valores médios de crescimento entre 3,48 mm dia⁻¹ e 4,08 mm dia⁻¹, velocidades inferiores ao evidenciado neste trabalho em 25°C, temperatura inferior utilizado nessa pesquisa (28°C). Pesquisas realizadas com cultivo de *P. ostreatus* em efluentes de café foram apresentadas por Fan (2000) e Carrasco-Cabrera; Bell e Kertesz (2019), em que os autores observaram um crescimento micelial a partir de extratos provenientes de borra doméstica de café. Em ambos os trabalhos foi evidenciada a inibição do crescimento

microbiano pela cafeína contida na borra de café, o que pode explicar o retardo do crescimento de *P. ostreatus* em maior concentração de ARCS.

Em termos de bioprocessos, o rápido crescimento micelial pode contribuir consideravelmente para a diminuição de contaminação devido ao reduzido tempo de incubação e a possibilidade de obtenção de metabólitos de forma mais célere (MKHIZE et al., 2017). *P. ostreatus* conseguiu crescer de forma moderada em meio sólido contendo 100% da ARCS. Embora o crescimento micelial mais expressivo tenha sido observado em ensaios com concentrações menores de ARCS, o vigor micelial e a adaptabilidade do fungo a ARCS são fatores importantes na viabilização do estudo submerso, logo o meio sólido contendo 100% foi utilizado para produzir inóculo para os ensaios em estado líquido, etapa seguinte.

5.3.1.2. Descoloração do meio de cultura contendo ARCS (100%) por *P. ostreatus*

A descoloração do meio de cultivo BDA de *P. ostreatus* contendo 100% da ARCS foi avaliada por análise colorimétrica. Essa técnica, formulada pela Comissão Internacional de Iluminação, que é a autoridade internacional em luz, iluminação, cor e espaços de cor, tem como base a reflexão da luz por uma superfície sendo visualmente combinada em uma mistura aditiva a partir das três cores primárias: vermelho, verde e azul (ZOLLINGER, 2003).

A partir da Tabela 12, observa-se que os valores a^* e b^* foram positivos, indicando cores voltadas para vermelho e amarelo, respectivamente. O valor de L^* (luminosidade) iniciou-se com 3,76 no dia do inóculo, e no 15º dia foi quantificado em 21,15, caracterizando um clareamento no meio de cultura. Os ângulos de matriz variaram de 36,57 a 54,55 correspondendo à cor vermelho com base na seguinte escala: 0 para vermelho, 90 para amarelo, 180 para verde e 270 para o azul. As cores correspondentes ao espaço CIELAB em relação a descoloração da ARCS estão representadas na Figura 18.

O valor do croma representa a pureza ou “saturação” de uma cor, sendo que baixos valores de C^* representam cores opacas ou cinzas. Observa-se durante os 15 dias de acompanhamento do crescimento micelial de *P. ostreatus* (Tabela 12) uma diminuição gradual de valores do croma, confirmando uma transição de cor preto, cinza para cor vívida, um avermelhado. Na Figura 19, observa-se a descoloração do meio BDA com 100% da ARCS por *P. ostreatus* durante 15 dias, respaldado pelos valores de luminosidade, ângulo de matiz e de croma.

Tabela 12. Análise Colorimétrica do efeito *P. ostreatus* em meio sólido (BDA + ARCS 100%)

Tempo (d)	L*	a*	b*	Cromo	Ângulo de matriz
0	3,75	0,97	0,85	1,32	40,88
3	4,49	1,25	1,26	1,78	43,58
6	8,83	14,92	11,12	18,62	36,57
9	12,26	18,96	16,03	24,84	40,20
12	14,04	21,18	19,65	28,90	42,82
15	21,15	19,44	27,36	33,57	54,55

Figura 18. Descoloração da ARCS a partir da classificação de cores pelo espaço CIELAB durante 15 dias.

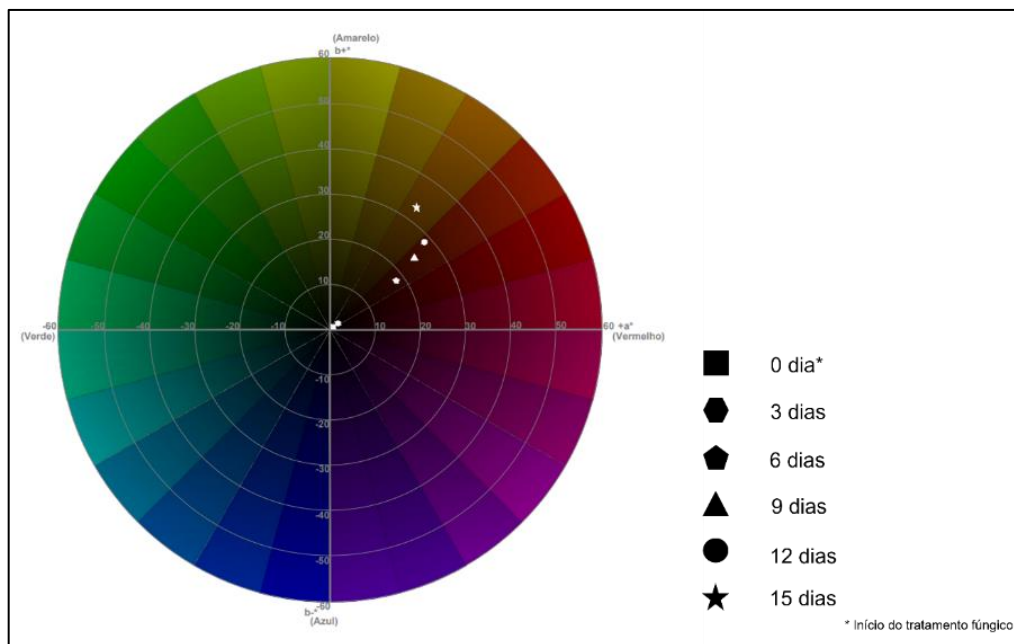
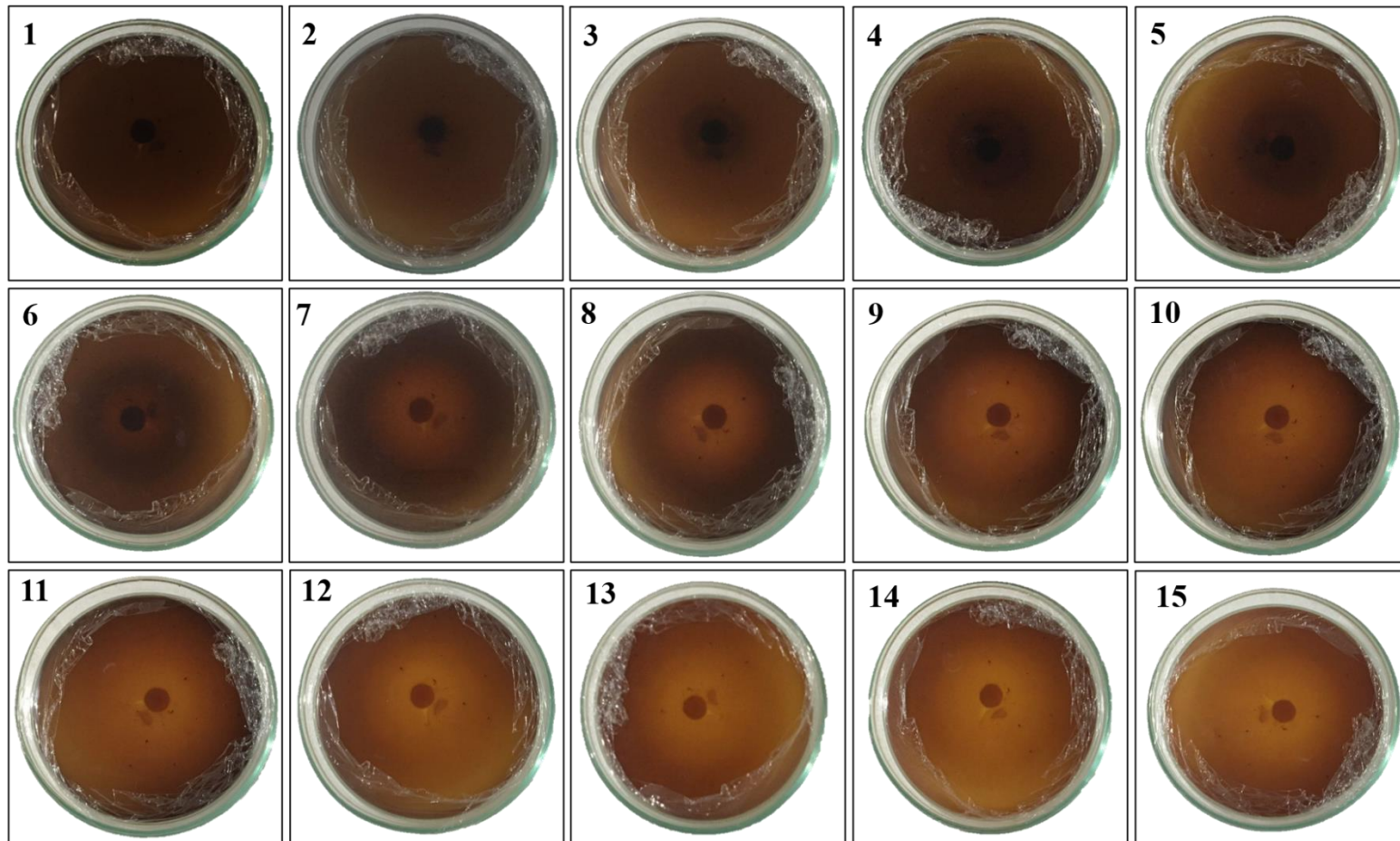


Figura 19. Avaliação visual da descoloração do meio BDA em 100% da ARCS por *P. ostreatus* durante 15 dias.



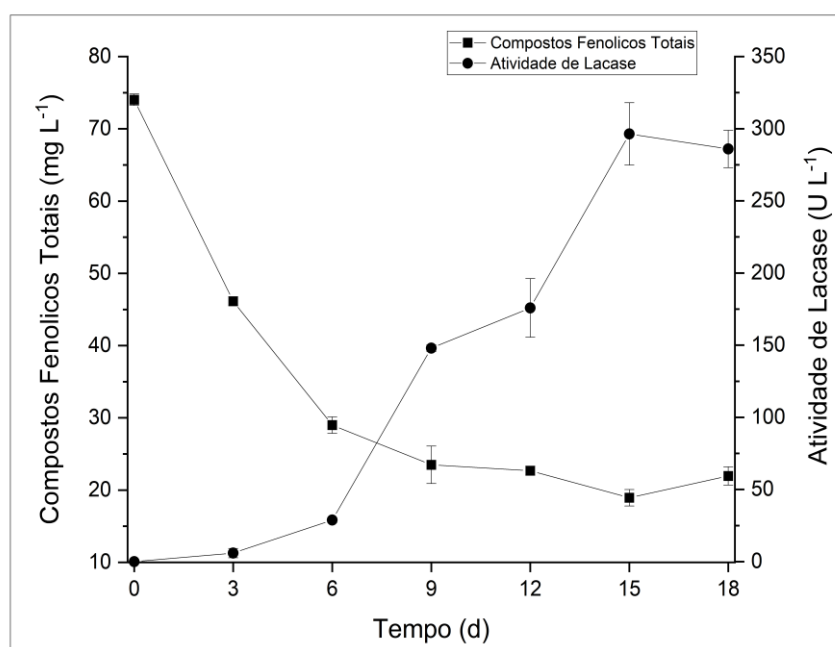
5.3.2. Biotransformação da ARCS por *P. ostreatus* em meio líquido

5.3.2.1. Avaliação da remoção de compostos fenólicos

Os perfis de produção de lacase, degradação de compostos fenólicos biomassa e DQO durante 18 dias, em cultivo submerso de *P. ostreatus* em ARCS a 10% estão apresentados nas Figuras 20 e 21). A partir da Figura 21, observa-se uma relação inversamente proporcional entre a concentração de CFT (compostos fenólicos totais), e o aumento da atividade de lacase.

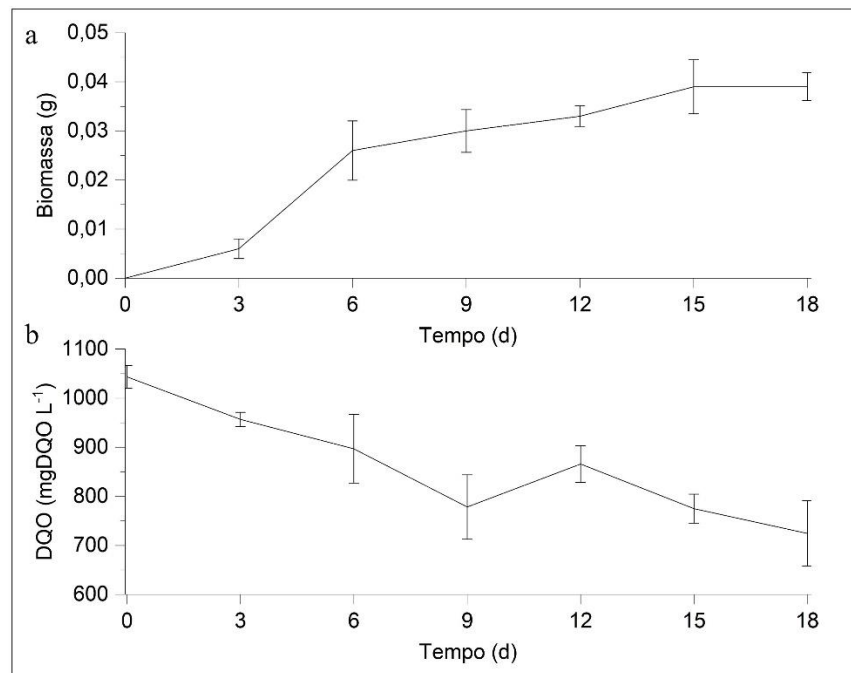
No período entre o 3º e o 6º dias de processo aeróbio, houve uma redução dos CFT de 37,67% e 60,83%, respectivamente. A máxima redução dos CFT foi de 68,3%, no nono dia. A atividade de lacase foi crescente até o 15º dia, quando foi observado o pico de produção enzimática com 269,37 U L⁻¹.

Figura 20. Atividade de lacase e compostos fenólicos totais em ARCS a 10%.



Na Figura 21, observa-se que houve um pequeno aumento da biomassa associado a uma tendência de redução da DQO, sendo observado uma redução de 30,56% em relação a DQO inicial.

Figura 21. Biomassa e Demanda Química de Oxigênio (DQO) em ARCS a 10%. a: biomassa ($\text{g } 100\text{mL}^{-1}$); b: DQO (mg DQO.L^{-1})



Elisashvili, Kachlishvili e Asatiani (2018) estudaram a viabilidade de produção de lacase e remoção de compostos fenólicos por basidiomicetos, incluindo a espécie *Pleurotus ostreatus*, tendo observado que a água residuária de azeite de oliva, que contém alto percentual de compostos fenólicos, se diluída, pode ser utilizada como meio nutricional para a produção de lacase. Os autores observaram remoção de 62,4% dos CFT em 24h, e baixo crescimento microbiano justificado pela indisponibilidade de fonte nutricional.

A partir do observado no item 5.2.2.1., e de experimentos prévios com concentrações maiores da ARCS (dados não descritos), decidiu-se seguir com o Delineamento Experimental - Plackett Burman com a concentração mínima (-1) para estudo de 30% e como concentração máxima (+1) de 70%.

5.3.2.2. Seleção de variáveis - Delineamento Experimental: Plackett-Burman (PB)

Os ensaios para a escolha das variáveis mais significativas para a redução da concentração de CFT e da coloração da ARCS (Tabela 13) foram avaliados para o intervalo de confiança de 90%, significância recomendado por Rodrigues e Iemma (2014), por meio da avaliação dos efeitos e *p-valor* (Tabela 14) de cada variável independente em relação a variável resposta e pelo Diagrama de Pareto (Figura 22).

Dentre as variáveis independentes estudadas no PB somente a concentração de extrato de levedura apresentou efeito negativo sobre a redução de CFT enquanto o número de discos de crescimento micelial, o pH, a agitação e a concentração de ARCS favoreceram a redução dos CFT ($p < 0,1$) (Figura 23A).

A maior redução de CFT foi 71% no ensaio 9, seguido dos ensaios 7 e 8 com redução de 58,93% e 57,31%, respectivamente (Tabela 13). No ensaio 9, a concentração inicial da ARCS foi de 30 em relação a água residuária bruta, sem a adição de nenhum mediador enzimático (CuSO_4 e MnSO_4). Já, os ensaios 7 e 8 foram realizados a uma concentração inicial da ARCS em 70% com a presença de ambos os mediadores enzimático. Embora esses ensaios sugiram a necessidade de mediadores enzimáticos para a redução de CFT em concentrações maiores da ARCS, há lacunas em relação ao sinergismo de todas as variáveis independentes em relação a variável resposta. Além disso, os ensaios no ponto central do PB (Tabela 13, ensaios PC1-PC4) apresentaram baixos valores de remoção, e a adição dos mediadores CuSO_4 e MnSO_4 , bem como do tween, não foram estatisticamente significativos, confirmado pelo Gráfico de Pareto (Figura 22A).

O ensaio 4 foi que apresentou menor remoção de CFT (17,2%) com concentração inicial de ARCS de 30% e com MnSO_4 e Tween 80, extrato de levedura. Na Tabela 14 observa-se que o extrato de levedura atuou inibindo a remoção de CFT, e embora o surfactante seja observado nos ensaios de maior redução de CFT, não houve influência estatisticamente significância no PB.

A descoloração da ARCS foi favorecida pela presença de tween 80 e pela concentração de ARCS (Figura 22B). O Plackett-Burman – PB com 8 variáveis apresentou as seguintes variáveis estatisticamente significativas para a descoloração da ARCS por *P. ostreatus*: a concentração de Tween 80 e da e da ARCS ($p < 0,1$). Além dessas variáveis, as restantes não foram estatisticamente significativas para a remoção de cor da água residuária (Figura 22B). A maior remoção de cor foi no ensaio 5 com 64%, com concentração inicial de 70%, com a adição de extrato de levedura, Tween 80 e CuSO_4 . Embora com a concentração inicial de 30%, o ensaio 3 foi que obteve menor descoloração da ARCS (17,2%) com adição de CuSO_4 e MnSO_4 (Tabela 13). Os ensaios avaliados no planejamento estão demonstrados na Figura 23.

Tabela 13. Matriz de Plackett & Burman codificada para o design com 12 condições experimentais (E1-E12) e três repetições do ponto central (PC1-PC3) com suas respectivas variáveis respostas

Ensaio	Variáveis Independentes								Variáveis respostas	
	ExtLev g L ⁻¹	CuSO ₄ mM	MnSO ₄ mM	Tween %	pH	Agitação Rpm	ARCS %	Discos Unid.	CFT (%)	Descoloração (%)
E1	+1(2)	-1(0)	+1(1)	-1(0)	-1(4)	-1(0)	+1(70)	+1(6)	45,07	27,71
E2	+1(2)	+1(1)	-1(0)	+1(2)	-1(4)	-1(0)	-1(30)	+1(6)	33,43	34,89
E3	-1(0)	+1(1)	+1(1)	-1(0)	+1(6)	-1(0)	-1(30)	-1(2)	45,16	27,42
E4	+1(2)	-1(0)	+1(1)	+1(2)	-1(4)	+1(120)	-1(30)	-1(2)	17,18	36,97
E5	+1(2)	+1(1)	-1(0)	+1(2)	+1(6)	-1(0)	+1(70)	-1(2)	33,56	38,02
E6	+1(2)	+1(1)	+1(1)	-1(0)	+1(6)	+1(120)	-1(0)	+1(6)	52,63	19,74
E7	-1(0)	+1(1)	+1(1)	+1(2)	-1(4)	+1(120)	+1(70)	-1(2)	58,93	22,35
E8	-1(0)	-1(0)	+1(1)	+1(2)	+1(6)	-1(0)	+1(70)	+1(6)	57,31	33,28
E9	-1(0)	-1(0)	-1(0)	+1(2)	+1(6)	+1(120)	-1(30)	+1(6)	70,99	63,53
E10	+1(2)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	+1(6)	+1(120)	+1(70)	-1(2)	38,35	28,70
E11	-1(0)	+1(1)	-1(0)	-1(0)	-1(4)	+1(120)	+1(70)	+1(6)	55,15	24,55
E12	-1(0)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	-1(4)	-1(0)	-1(30)	-1(2)	22,83	29,69
PC1	0(1)	0(0,5)	0(0,5)	0(1)	0(5)	0(60)	0(50)	0(4)	30,38	27,23
PC2	0(1)	0(0,5)	0(0,5)	0(1)	0(5)	0(60)	0(50)	0(4)	30,36	25,50
PC3	0(1)	0(0,5)	0(0,5)	0(1)	0(5)	0(60)	0(50)	0(4)	29,88	28,42

Legenda: E: ensaio; PC: ponto central. ExtLev: extrato de levedura; Discos: Discos de crescimento micelial (un.)

Figura 22. Diagramas de Pareto e significância das variáveis estudadas para o intervalo de confiança de 90%. A (Remoção de Compostos fenólicos) e B (Descoloração da ARCS).

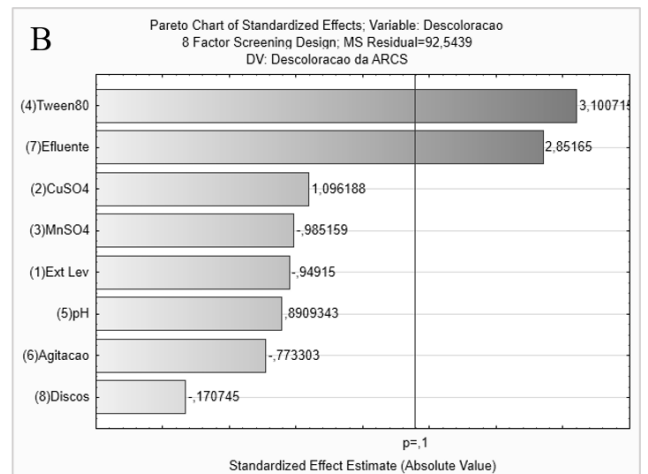
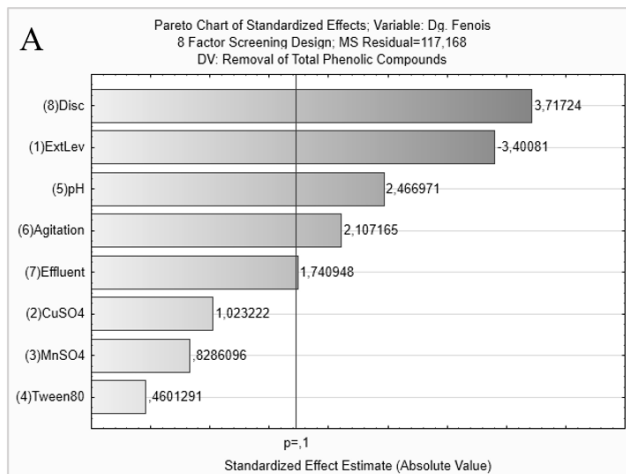


Tabela 14. Dados estatísticos obtidos após a realização dos ensaios para seleção de variáveis significativas para as variáveis resposta remoção de CFT e descoloração da ARCS.

Variável	Remoção de CFT				Descoloração da ARCS			
	Efeito	Erro Padrão	t calculado	p-valor	Efeito	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	41,48	2,05	20,28	0,0000	31,18	2,40	12,96	0,0000
(1) Extrato de Levedura	-15,03	4,42	-3,40	0,0030*	-5,27	5,55	-0,95	0,3742
(2) CuSO4	4,52	4,42	1,02	0,3191	6,09	5,55	1,10	0,3093
(3) MnSO4	3,66	4,42	0,83	0,4176	-5,47	5,55	-0,99	0,3574
(4) Tween80	2,03	4,42	0,46	0,6506	17,22	5,55	3,10	0,0173*
(5) pH	10,90	4,42	2,47	0,0233*	4,95	5,55	0,89	0,4025
(6) Agitação	9,31	4,42	2,11	0,0486*	-4,30	5,55	-0,77	0,4647
(7) ARCS	7,69	4,42	1,74	0,0979*	15,84	5,55	2,85	0,0246*
(8) N° de discos	16,43	4,42	3,72	0,0015*	-0,95	5,55	-0,17	0,8693

*variável estatisticamente significativa a $p \leq 0,1$

Figura 23. Ensaios provenientes da matriz Plackett & Burman com 12 condições experimentais (E1-E12).



E: ensaio.

O não uso de peróxido de hidrogênio foi escolhido para não estimular a produção de Mn-peroxidases que necessitam do mediador para a biotransformação de compostos fenólicos em espécies de radicais, além disso, o mediador é capaz de formar espécies reativas, sem a participação do fungo. Essa escolha objetivou-se minimizar variáveis no entendimento da lacase como agente catalítico (enzimático).

De forma resumida, o PB forneceu os seguintes resultados para a estruturação de um novo delineamento experimental – Planejamento Fatorial (PF) 2^3 :

1. O extrato de levedura não foi considerado para o PF, pois promoveu efeito significativamente negativo na remoção de CFT.
2. Os mediadores enzimáticos não foram estatisticamente significativos sobre a degradação de CFT e na descoloração da ARCS, ambos não foram mantidos para o estudo do PF.

3. As variáveis, agitação e número de discos, foram fixados no seu valor máximo, visto que tiveram efeitos significativos positivos na remoção de CFT;
4. Embora o Tween 80 não tenha sido estatisticamente significativo na remoção de CFT, foi verificado efeito estatisticamente significativo na remoção de cor do da ARCS (descoloração). Além disso, nos ensaios com maiores valores de remoção de CFT (ensaio 7-9) houve adição do surfactante, por isso essa variável foi considerada para o PF.
5. Como é de interesse avaliar concentrações maiores da ARCS, a faixa dessa variável foi expandida a fim de se obter a água residuária pré-tratada sem diluição. Além disso, o PB avaliou o comportamento do fungo em pH mais elevado.

5.3.2.3. Delineamento Experimental: Planejamento Fatorial 2³

O Planejamento Fatorial 2³ foi realizado em busca do entendimento maior acerca do efeito do cultivo *in vivo* de *P. ostreatus* na remoção de compostos fenólicos, consumo de matéria orgânica total, produção de enzima lacase e alteração do pH, durante 15 dias os quais ocorreu o processo aeróbio submerso (Figura 24).

Em todos os ensaios foi observada uma redução da concentração de CFT nos primeiros três dias de processo, em especial nos ensaios com concentração inicial de ARCS de 50%. A tendência de redução foi detectada até os 9 dias de cultivo, com pouca variação até o 15º dia. Resultado similar foi observado por Goudopoulou, Krimitzas e Typas (2010), que verificaram a diminuição de 75% de CFT em 4 dias de processo com *P. ostreatus*, e no fim do processo, aos 14 dias com 78% de remoção de CFT em água residuária de azeite de oliva. Os autores verificaram ainda uma pequena atividade de lacase com 4 dias de processo, que teria sido utilizada para a remoção de compostos fenólicos solúveis facilmente biodegradáveis, permanecendo somente compostos fenólicos recalcitrantes.

A variação de concentração de matéria orgânica expressa em DQO durante todo o processo fermentativo foi observada, com um aumento de 30,25% e 42,02% nos ensaios 7 e 5, respectivamente, nos três primeiros dias de processo. Os perfis dos ensaios mostram-se similares com base na concentração de ARCS inicial e Tween 80, isto é, os ensaios 1 e 3; os ensaios 2 e 4, os ensaios 5 e 7, e os ensaios 6 e 8 apresentam as mesmas tendências, sugerindo um sinergismo entre as duas variáveis independentes. Essa variação de DQO pode ter ocorrido pela produção de outros metabólitos e metabolização de polissacarídeos durante o processo.

O perfil de DQO em processos envolvendo fungos basidiomicetos ainda é pouco discutido. Ntougias et al. (2015) em estudo de tratamento de água residuária de azeite de oliva observou diminuição de 47% da DQO, um dos maiores valores de remoção já evidenciado por *P. ostreatus* e *Trametes versicolor*. Para outros gêneros de basidiomicetos, os autores não identificaram correlação entre DQO solúvel e produção de enzimas ou biodegradabilidade da água residuária, os autores sugerem que o aumento de valores de DQO, sugerindo a liberação de matéria orgânica devido a decomposição de biomassa.

A biomassa fúngica foi quantificada somente após 15 dias do processo fermentativo, atingindo valores entre 0,111 e 0,148g (Figura 25). No estudo de Goudopoulou, Krimitzas e Typas (2010) foi observado que o rendimento de biomassa foi igual em todas as concentrações de compostos fenólicos, ou seja, a produção de biomassa não foi afetada pela concentração de CFT, em estudo com água residuária de azeite de oliva. Além disso, Zerva et al. 2017 observaram baixa produção de biomassa em linhagens de *Pleurotus* com e sem suplementação de nitrogênio.

Carrasco-Cabrera; Bell e Kertesz (2019) estudaram o metabolismo da cafeína durante o crescimento de *P. ostreatus* em borra doméstica de café, verificando que houve uma inibição no crescimento micelial do fungo, no entanto, os autores constataram degradação de cafeína promovendo desintoxicação no resíduo. Torres (2021) evidenciou a degradação de cafeína por lacase comercial e por lacase bruta do basidiomiceto *Trametes villosa*.

A produção de lacase iniciou com três dias processo apenas nos ensaios 1 e 3, com 23,00 e 17,06 U L⁻¹, respectivamente. Durante o processo foi observado maiores valores de produção enzimática nos ensaios contendo 100% da ARCS, sendo eles: ensaio 2, 4, 6 e 8, com 508,11; 308,81; 304, 56; e 647,58 U L⁻¹, respectivamente, demonstrando o potencial do uso da ARCS na produção enzimática. A produção de lacase a partir da adição de água residuária de azeite de oliva foi evidenciada por Goudopoulou, Krimitzas e Typas (2010). Os autores ainda verificaram que a adição da água residuária induziu a produção da enzima de forma mais expressiva quando comparado à adição de mediadores comumente utilizados como o CuSO₄ e o MnSO₄.

O perfil de pH foi similar para todos os ensaios até 9 dias, a partir desse período, observa-se um processo de acidificação do meio nos ensaios que continham 50% da concentração de ARCS, ensaios 1,3,5,7, indicando a produção de ácidos orgânicos, como o ácido oxálico a partir de *P. ostreatus*, já evidenciado para essa espécie fúngica (JACKET, 2012). Os ensaios que

continham 100% da concentração de ARCS mantiveram o pH elevado, entre 8,3 e 9,1, próximo ao valor inicial.

Embora o presente trabalho não tenha realizado ensaios a fim de avaliar a absorção de matéria orgânica na biomassa produzida por *P. ostreatus*, acredita-se que a remoção dos compostos fenólicos ocorre por ação enzimática da lacase e de possíveis outros metabólitos, como por exemplo, enzimas acessórias, e por ação adsorptiva, entretanto mínima, visto que a produção de biomassa foi abaixo de 0,20g em todos os ensaios (Figura 24 e 28).

Olivieri et al. (2012) realizou a desfenolização de água residuária de processamento de azeite de oliva (ARAO) (concentração de polifenóis em 5g L^{-1}) sob condições controladas não estéreis, isto é, sem o processo de autoclavagem, utilizando *P. ostreatus*, em ARAO pré-aerada, nos fornecendo uma abertura para realização de futuros trabalhos sem a necessidade de uma breve esterilização da ARCS. Vale ressaltar que os ensaios que desfenolização a partir de *P. ostreatus*, em batelada e em sistema contínuo, sem a pré-aeração não obtiveram redução de polifenóis.

Esse é o primeiro relato de tratamento de água residuária proveniente da produção industrial de café solúvel a partir de fungos basidiomicetos. A discussão desse trabalho trouxe informações, principalmente, sobre a ação de *P. ostreatus* em água residuária da produção industrial de azeite de oliva devido sua similaridade dessa água residuária com a água residuária em estudo, isto é, os trabalhos discutidos utilizaram água residuária real e pelas características físico-químicas, tais como, alta concentração de matéria orgânica expressa em DQO, e presença de compostos fenólicos.

Figura 24. Perfil da concentração de CFT, matéria orgânica expressa em DQO, produção de lacase e pH durante a processo líquido em ARCS.

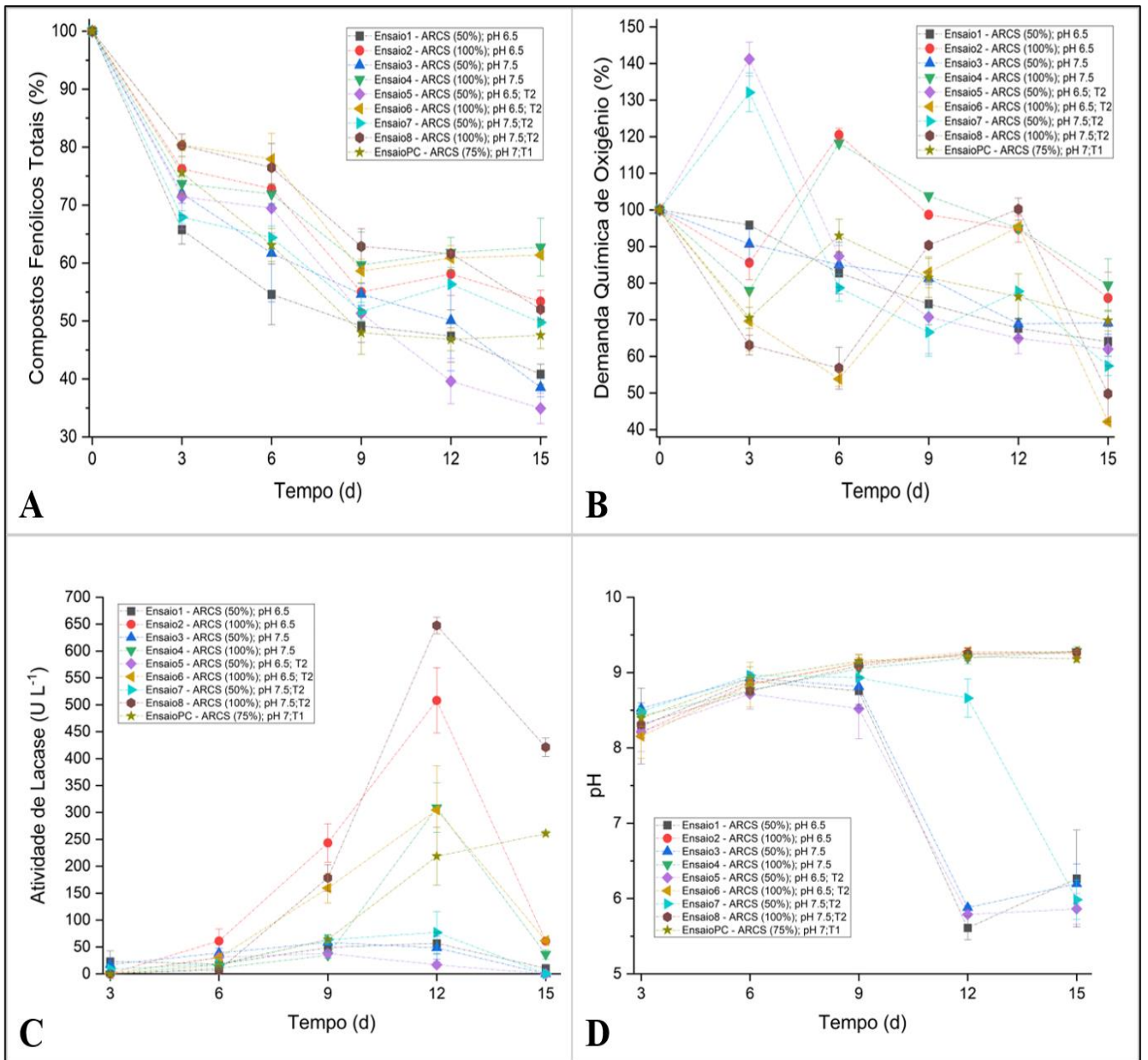
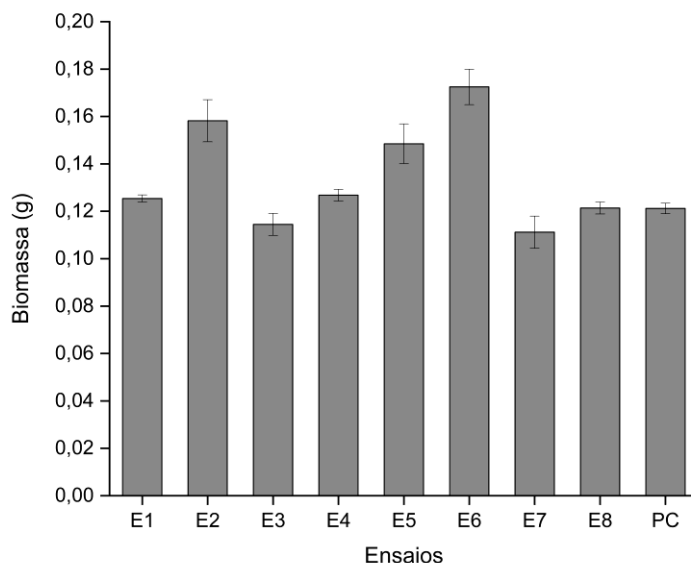


Figura 25. Biomassa de *P. ostreatus* ao fim de processo líquido em ARCS, em 15 dias.



Na Tabela 15, observa-se que o ensaio 3 (concentração de ARCS em 50%, pH 7,5) e o ensaio 5 (concentração de ARCS em 50%, pH 6,5 e com a presença de Tween 80), promoveram os melhores valores de remoção de CFT da ARCS por *P. ostreatus* após 15 dias de tratamento, com 61,46% e 65,07% de remoção, respectivamente. Enquanto nos ensaios com a ARCS sem diluição, ou seja 100%, a remoção de CFT foi de 37,27% e 38,62%, nos ensaios 4 (pH 7,5 e na ausência de Tween 80) e 6 (pH 6,5 na presença de Tween 80). Os ensaios de 9 a 11, referentes aos pontos centrais, obtiveram média de remoção de 55,39% \pm 2,15. Observa-se que tanto nos ensaios com concentração inicial de 50% a 100%, a remoção de CFT ocorreu nos níveis mínimo e máximo das variáveis independentes, pH e Tween 80.

Nos ensaios 1 e 2, mantendo o pH (6,5) e na ausência do surfactante, e dobrando a concentração da ARCS, os níveis de remoção de CFT foram superiores a 45% (59,16% e 46,63%).

Tabela 15. Remoção de Compostos Fenólicos Totais (CFT) e de cor de ARCS por *P. ostreatus* após 15 dias de processo aeróbio submerso.

Ensaio	ARCS (%)	pH	Tween80	Remoção de CFT (%)	Descoloração
1	50	6,5	0	59,19*	37,25*
2	100	6,5	0	46,63*	13,25*
3	50	7,5	0	61,46*	29,23*
4	100	7,5	0	37,27*	14,01*
5	50	6,5	2	65,07*	48,25*
6	100	6,5	2	38,62*	28,32*
7	50	7,5	2	50,23*	42,56*
8	100	7,5	2	47,98*	26,14*
9 (PC)	75	7	1	56,58	22,36
10 (PC)	75	7	1	56,68	19,45
11 (PC)	75	7	1	52,91	24,22

PC – ponto central.

*média, de triplicatas, de remoção de CFT em 15 dias de tratamento.

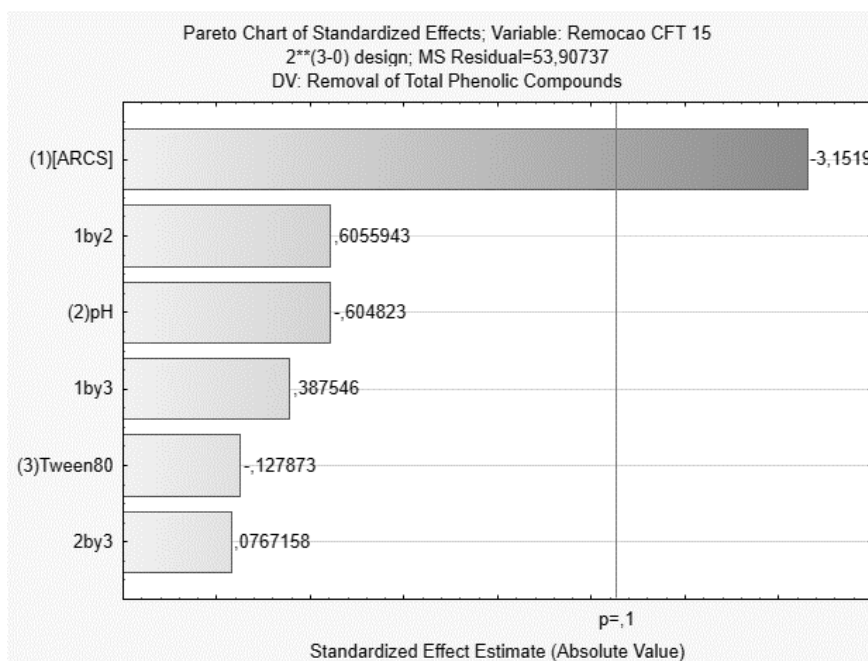
Na Tabela 16 e no Gráfico de Pareto (Figura 26) verifica-se os efeitos individuais e das respectivas interações dos fatores, isto é, das variáveis independentes, em relação a variável dependente (remoção de CFT). No experimento, somente a concentração inicial da ARCS foi estatisticamente significativa, a 90% de confiança, em relação a remoção de CFT, apresentando um efeito negativo de 16,36%, indicando que quando que sai do nível inferior (50%, ARCS) para o nível superior (100%, ARCS) ocorre uma redução na remoção de CFT. O pH e o Tween 80 e as interações entre as variáveis não foram estatisticamente significativas.

Tabela 16. Efeitos Principais e Interações na remoção de CFT da ARCS por *P. ostreatus*.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(4)	p-valor	LC 90,%	LC +90,%
*Média	52,06	2,21	23,52	0,0000	47,34	56,78
*[ARCS]	-16,36	5,19	-3,15	0,0344	-27,43	-5,30
pH	-3,14	5,19	-0,60	0,5779	-14,21	7,93
Tween80	-0,66	5,19	-0,13	0,9044	-11,73	10,40
[ARCS] x pH	3,14	5,19	0,61	0,5775	-7,92	14,21
[ARCS] x Tween 80	2,01	5,19	0,39	0,7181	-9,06	13,08
pH x Tween 80	0,40	5,19	0,08	0,9425	-10,67	11,47

*variável estatisticamente significativa a $p \leq 0,1$

Figura 26. Diagramas de Pareto e significância das variáveis estudadas para o intervalo de confiança de 90% em relação a remoção de CFT.



Na Tabela 17 e no Gráfico de Pareto (Figura 27) verifica-se os efeitos individuais e de respectivas interações dos fatores, isto é, das variáveis independente, em relação a variável dependente (remoção de cor da ARCS). No experimento, a concentração inicial da ARCS e de tween 80 foram estatisticamente significativas, a 90% de confiança, em relação a variável resposta, apresentando um efeito negativo, para a variável ARCS de 16,36%, e positivo, para a variável tween 80 de 12,95%, O pH e as interações entre as variáveis não foram estatisticamente significativas.

Tabela 17. Efeitos Principais e Interações na descoloração da ARCS por *P. ostreatus*.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(4)	p-valor	LC 90,%	LC +90,%
*Média	27,76	1,85	14,99	0,0001	23,81	31,70
*[ARCS]	-18,96	4,34	-4,37	0,0120	-28,22	-9,70
pH	-3,85	4,34	-0,89	0,4254	-13,11	5,41
*Tween80	12,95	4,34	2,98	0,0406	3,69	22,21
[ARCS] x pH	3,14	4,34	0,72	0,5096	-6,12	12,40
[ARCS] x Tween 80	0,65	4,34	0,15	0,8883	-8,61	9,91
pH x Tween 80	-0,22	4,34	-0,05	0,9620	-9,48	9,04

*variável estatisticamente significativa a $p \leq 0,1$

Figura 27. Diagramas de Pareto e significância das variáveis estudadas para o intervalo de confiança de 90% em relação a descoloração.

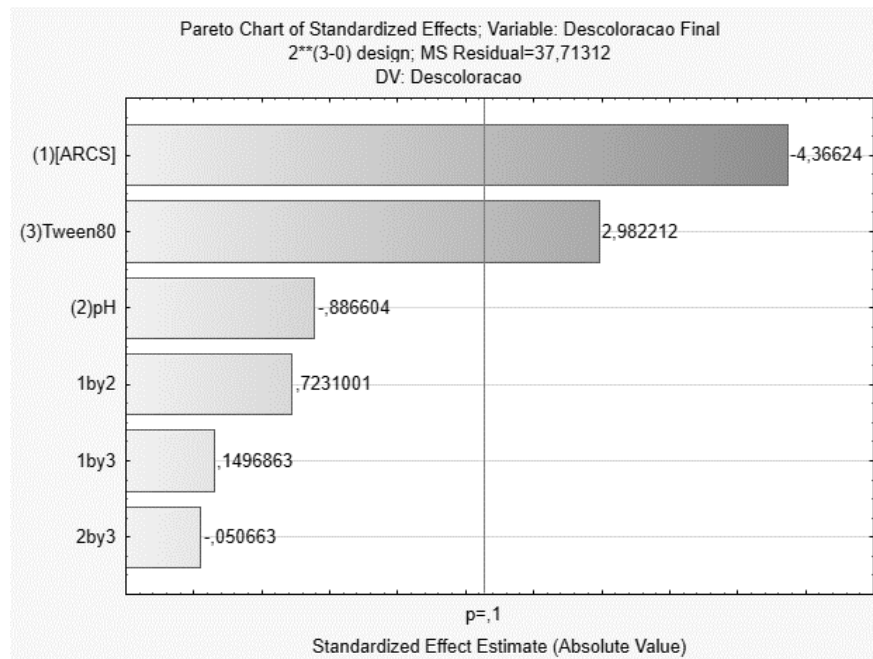
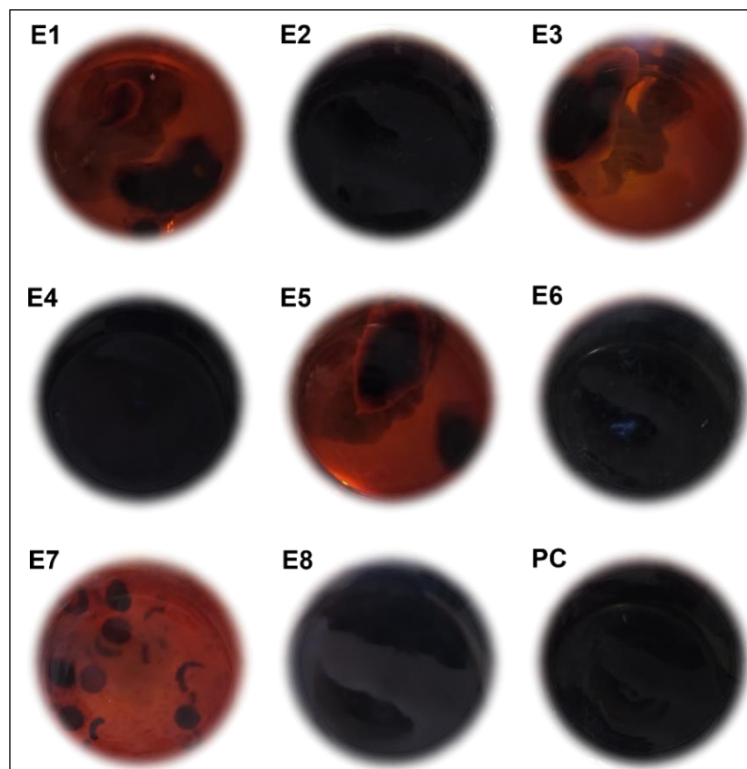


Figura 28. Recorte visual em Erlenmeyer de cada tratamento utilizado para a construção do Planejamento Fatorial após 15 dias de processo aeróbio submerso.



Metodologia de superfície de resposta – remoção de compostos fenólicos (15 dias)

A partir dos resultados do delineamento experimental – Fatorial 2³ (Tabela 15) foram obtidos os coeficientes de regressão, que estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Coeficientes de regressão do fatorial 2³ para avaliação do rendimento da remoção de CFT de ARCS por *P. ostreatus*.

Fator	β_i	CR	Erro Padrão	t (4)	p-valor	LC 90,%	LC +90,%
*Média	β_0	52,0567	2,2137	23,51520	0,00002	47,3373	56,7760
*[ARCS]	β_1	-8,1820	2,5958	-3,15195	0,03445	-13,7159	-2,6480
pH	β_2	-1,5700	2,5958	-0,60482	0,57793	-7,1040	3,9639
Tween80	β_3	-0,3319	2,5958	-0,12787	0,90442	-5,8659	5,2020
[ARCS] x pH	β_{12}	1,5720	2,5958	0,60559	0,57747	-3,9619	7,1060
[ARCS] x Tween 80	β_{13}	1,0060	2,5958	0,38755	0,71809	-4,5279	6,5400
pH x Tween 80	β_{23}	0,1991	2,5958	0,07672	0,94253	-5,3348	5,7331

*variável estatisticamente significativa a $p \leq 0,1$; β_i , e CR – coeficientes de regressão; LC – limite de confiança.

Os coeficientes de regressão estatisticamente significativos foram a média e a concentração da ARCS. A partir disso, é possível escrever a equação de primeira ordem (modelo reduzido).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot ARCS = 52,06^* - 8,18 \cdot ARCS^*; \text{Equação 3}$$

*estatisticamente significativo a 90% de confiança, Y (%) é a remoção de CFT.

Dessa forma, conforme a equação, um pequeno aumento da concentração da ARCS possui uma grande influência na redução de CFT. Para a equação 3 seja estatisticamente significativa pelo teste F, o valor de F calculado deve ser maior que F tabelado, sendo verificado pela análise de variância (ANOVA) apresentado na Tabela 19.

Embora a análise de variância comprove que o F calculado foi maior que o F tabelado, o valor de R² foi apenas de 66,95. Esse valor impossibilita a confiabilidade amostral em relação a equação 3 e a construção dos gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno. em relação a remoção de CFT da ARCS relacionando a concentração da ARCS com o pH inicial e a concentração de Tween. R² fornece uma medida de proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas, admitindo um valor mínimo de 70 (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Tabela 19. Análise de Variância (ANOVA) para a remoção de CFT em ARCS por *P. ostreatus*.

Fator	SQ	GL	QM	F _{calc}	F _{tab}	p-valor
Regressão	584,3	1 (p-1)	535,46	18,23	3,36	0,002081
Resíduos	215,5	9 (n-p)	29,372			
Total	799,8	10 (n-1)				
R²	66,95					

SQ – soma dos quadrados; QM – quadrado médio; F_{calc} – F calculado; F_{tab} – F tabelado; n – número de total de ensaios (11); p – número de parâmetros do modelo reduzido (2).

Limite confiança de 90%.

Metodologia de superfície de resposta – remoção de cor em ARCS (descolorização) (15 dias)

A partir dos resultados do delineamento experimental – Fatorial 2³ (Tabela 15) foram obtidos os coeficientes de regressão, que estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Coeficientes de regressão do fatorial 2³ para avaliação do rendimento descolorização da ARCS por *P. ostreatus*.

Fator	β _i	CR	Erro Padrão	t (4)	p-valor	LC 90,%	LC +90,%
*Média	β ₀	27,7555	1,8516	14,9899	0,00012	23,8081	31,7028
*[ARCS]	β ₁	-9,4800	2,1712	-4,3662	0,01200	-14,1087	-4,8513
pH	β ₂	-1,9250	2,1712	-0,8866	0,42538	-6,5537	2,7037
*Tween80	β ₃	6,4750	2,1712	2,9822	0,04065	1,8463	11,1037
[ARCS] x pH	β ₁₂	1,5700	2,1712	0,7231	0,50964	-3,0587	6,1987
[ARCS] x Tween 80	β ₁₃	0,3250	2,1712	0,1497	0,88826	-4,3037	4,9537
pH x Tween 80	β ₂₃	-0,1100	2,1712	-0,0507	0,96202	-4,7387	4,5187

*variável estatisticamente significativa a p≤0,1; β_i, e CR – coeficientes de regressão; LC – limite de confiança.

Os coeficientes de regressão estatisticamente significativos foram a média, a concentração da ARCS e do surfactante Tween 80. A partir disso, é possível escrever a equação de primeira ordem (modelo reduzido).

$$W = \beta_0 + \beta_1 \cdot ARCS + \beta_3 \cdot Tween80 = 27,75^* - 9,48 \cdot ARCS^* + 6,47 \cdot Tween80^*; \text{Equação 4}$$

*estatisticamente significativo a 90% de confiança, W (%) é o rendimento de remoção de cor.

Dessa forma, conforme a equação, um pequeno aumento da concentração da ARCS possui uma grande influência na redução do rendimento, diferentemente do surfactante que possui comportamento antagônico. Para a equação 4 seja estatisticamente significativa pelo

teste F, o valor de F calculado deve ser maior que F tabelado, sendo verificado pela análise de variância (ANOVA) apresentado na Tabela 21.

A análise de variância comprova que o F calculado foi maior que o F tabelado e o valor de R^2 foi de 84,04. Portanto, foi construído os gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno em relação a descolorização da ARCS relacionando a interação entre concentração da ARCS versus o pH inicial e a concentração de Tween 80, respectivamente, e o pH versus a concentração inicial de Tween 80 (Figura 29).

Tabela 21. Análise de Variância (ANOVA) para a descoloração da ARCS por *P. ostreatus*.

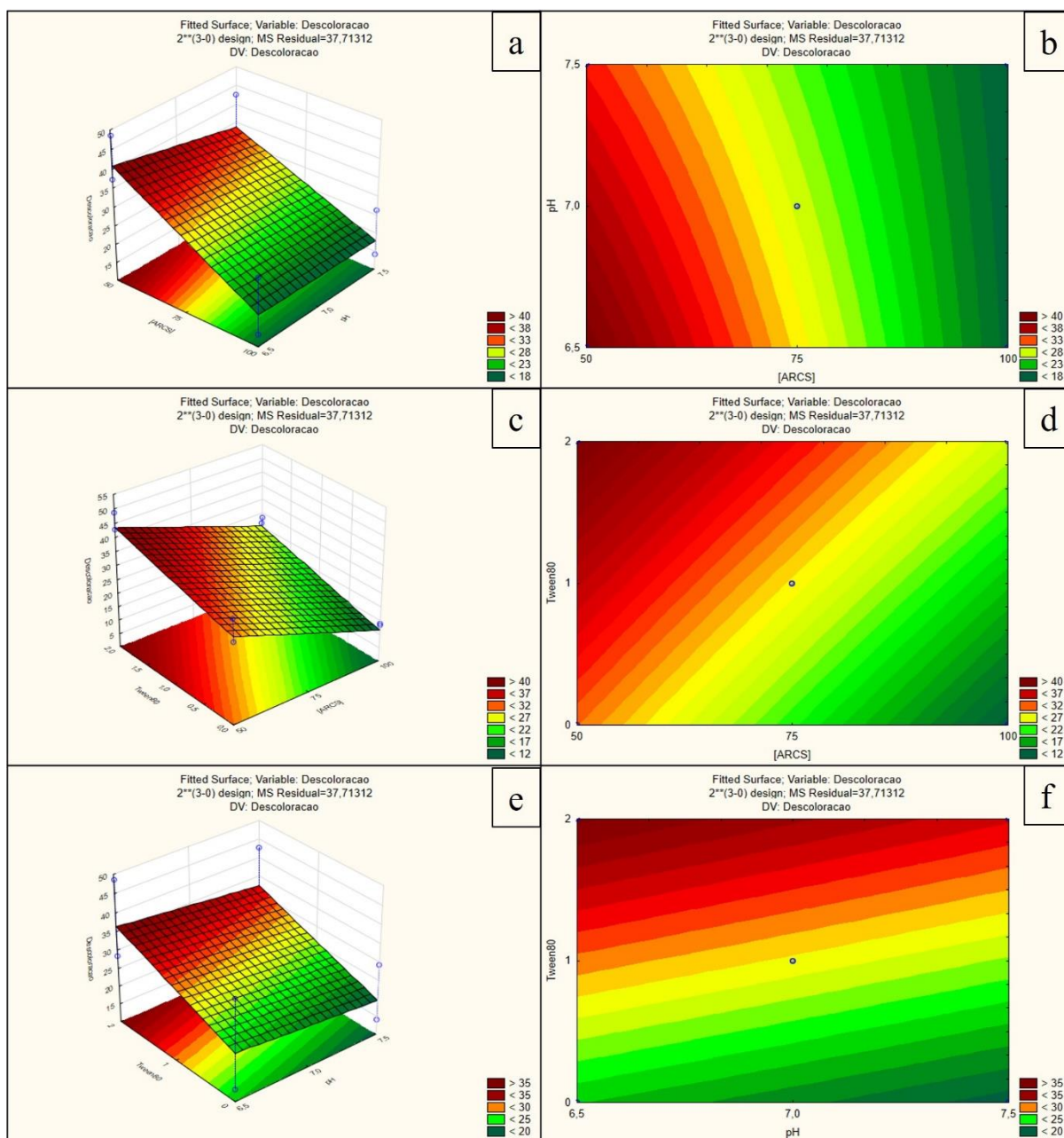
Fator	SQ	GL	QM	F_{calc}	F_{tab}	p-valor
Regressão	1045,8	2 (p-1)	522,9	21,1	3,13	0,00065
Resíduos	198,6	8 (n-p)	24,8			
Total	1244,4	10 (n-1)				
R²	84,04					

SQ – soma dos quadrados; QM – quadrado médio; F_{calc} – F calculado; F_{tab} – F tabelado; n – número de total de ensaios (11); p – número de parâmetros do modelo reduzido (2).

Limite confiança de 90%.

Na Figura 29 observa-se o comportamento da variável alvo (descoloração da ARCS) em relação as variáveis independentes: ARCS, pH e tween 80. Nota-se que com a redução da concentração da ARCS e diminuição do pH, há aumento da remoção de CFT (Figura 29a e 29b). Além disso, a partir das Figuras 30c e 30d, observa-se o comportamento antagônico da concentração de Tween 80 quando relacionada a ARCS. Já em relação ao comportamento ao comportamento nos gráficos relacionando pH versus Tween 80, observa-se que a melhor descoloração da água residuária ocorre em maior nível da variável Tween 80, e o pH mostra-se como fator irrelevante (Figura 29d e 29e), ressaltando o que foi apresentado pelo gráfico de Pareto (Figura 27). A partir disso, a melhor remoção de cor da ARCS ocorre na faixa de pH 6,5 com concentração inicial de ARCS em 70% e com a presença de Tween 80 (2%).

Figura 29. Fatorial 2³ – Gráficos de superfície e curva de contorno: descoloração da ARCS por *P. ostreatus*.



Legenda: a: ARCS x pH (superfície de resposta); b: ARCS x pH (curva de contorno); c: ARCS x Tween 80 (superfície de resposta); d: ARCS x Tween 80 (curva de contorno); e: Tween 80 x pH (superfície de resposta); f: Tween 80 x pH (curva de contorno);

Metodologia de superfície de resposta – produção de lacase (12 dias)

A partir dos resultados do delineamento experimental foram obtidos os coeficientes de regressão, que estão apresentados na Tabela 22. Diferentemente da avaliação de metodologia de superfície de resposta da remoção de CFT e da descoloração, a análise da superfície de resposta da produção de lacase foi avaliada em 12 dias, durante os quais foi observado o pico

de produção enzimática em todos os tratamentos avaliados, com exceção do ensaio ponto central.

Tabela 22. Coeficientes de regressão do fatorial 2³ para avaliação do rendimento descolorização da ARCS por *P. ostreatus*.

Fator	β_i	CR	Erro Padrão	t (4)	p-valor	LC 90,%	LC +90,%
*Média	β_0	232,722	28,774	8,0879	0,00127	171,3802	294,0634
*[ARCS]	β_1	196,294	33,740	5,8178	0,00435	124,3644	268,2231
pH	β_2	24,394	33,740	0,7230	0,50970	-47,5356	96,3231
Tween80	β_3	15,494	33,740	0,4592	0,66993	-56,4356	87,4231
[ARCS] x pH	β_{12}	11,539	33,740	0,3420	0,74957	-60,3906	83,4681
[ARCS] x Tween 80	β_{13}	18,309	33,740	0,5426	0,61620	-53,6206	90,2381
*pH x Tween 80	β_{23}	76,334	33,740	2,2624	0,08645	4,4044	148,2631

*variável estatisticamente significativa a $p \leq 0,1$; β_i , e CR – coeficientes de regressão; LC – limite de confiança.

Os coeficientes de regressão estatisticamente significativos foram a média, a concentração da ARCS e a interação entre o pH e o surfactante, tween 80. A partir disso, é possível escrever a equação de segunda ordem (modelo reduzido).

$$K = \beta_0 + \beta_1 \cdot ARCS + \beta_2 \beta_3 \cdot pH \cdot Tween80 =$$

$$232,72^* - 196,29 \cdot ARCS^* + 76,33 \cdot pH \cdot Tween80^*; \text{Equação 5}$$

*estatisticamente significativo a 90% de confiança, K (%) é o rendimento de produção de lacase

Dessa forma, conforme a equação, o aumento da concentração da ARCS possui uma grande influência no aumento da produção enzimática, assim como, a ação sinérgica do pH e do tween 80 possui similar comportamento. Para a equação W seja estatisticamente significativa pelo teste F, o valor de F calculado deve ser maior que F tabelado, sendo verificado pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 23.

A análise de variância comprova que o F calculado foi maior que o F tabelado e o valor de R² foi de 90,93. Portanto, foi construído os gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno em relação a descolorização da ARCS relacionando a interação entre concentração da ARCS versus o pH inicial e a concentração de Tween 80, respectivamente, e o pH versus a concentração inicial de Tween 80 (Figura 30).

Tabela 23. Análise de Variância (ANOVA) para a descoloração da ARCS por *P. ostreatus*.

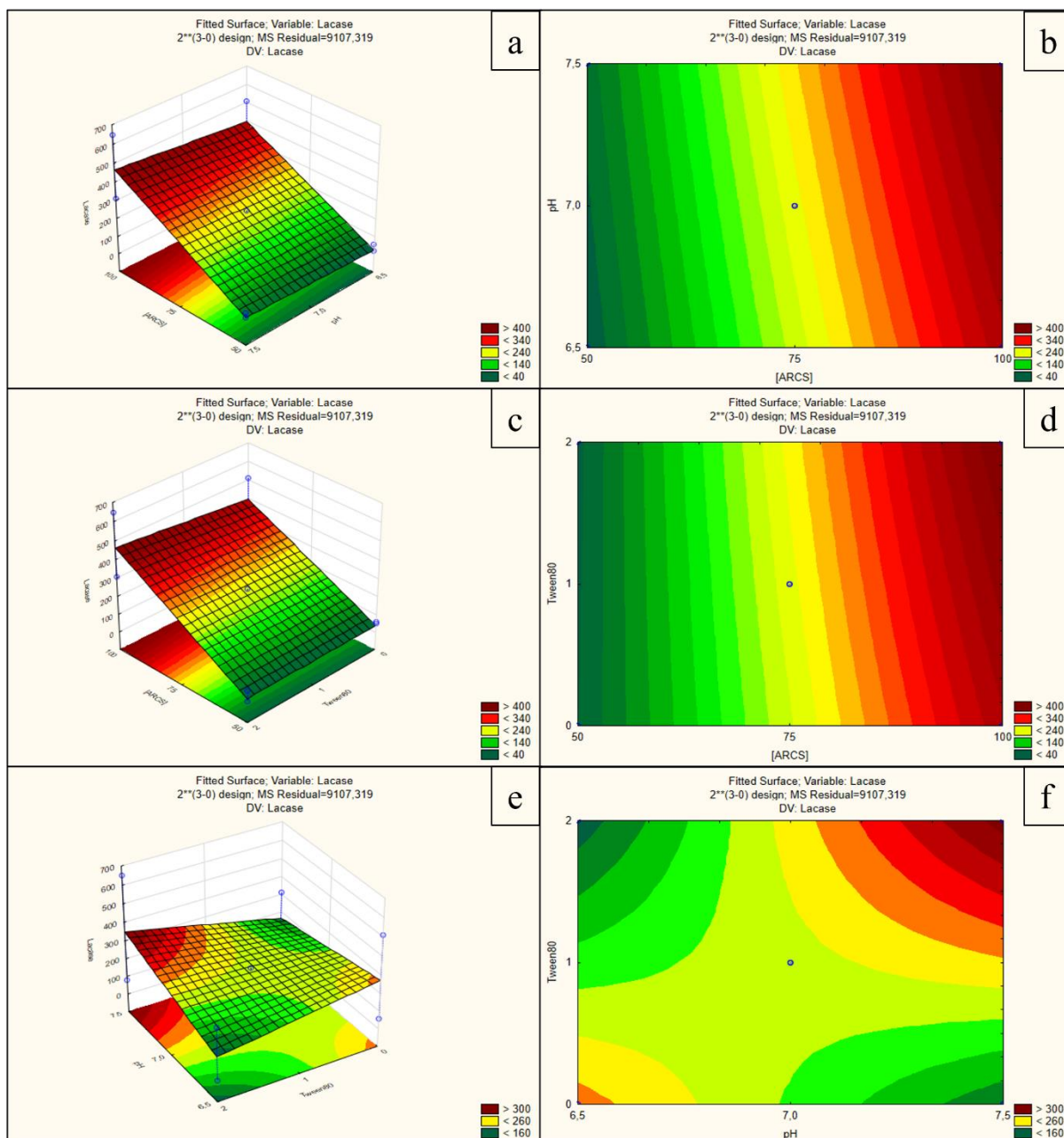
Fator	SQ	GL	QM	F_{calc}	F_{tab}	p-valor
Regressão	354864,6	2 (p-1)	177832,3	30,2	3,13	0,00019
Resíduos	46989,1	8 (n-p)	5873,6			
Total	401253,7	10 (n-1)				
R²	90,93					

SQ – soma dos quadrados; QM – quadrado médio; F_{calc} – F calculado; F_{tab} – F tabelado; n – número de total de ensaios (11); p – número de parâmetros do modelo reduzido (2).

Limite confiança de 90%.

Na Figura 30 observa-se o comportamento da variável alvo (produção de lacase) em relação às variáveis independentes: ARCS, pH e Tween 80. Nota-se com o aumento da concentração da ARCS, a produção enzimática aumenta (Figura 25a e 25b). Além disso, a partir das Figuras 30c e 30d, observa-se o comportamento similar na relação entre a concentração de Tween 80 e a concentração de ARCS. Nos gráficos relacionando pH e Tween 80, observa-se que quanto maior o pH e a concentração inicial de Tween 80, melhor foi a produção de lacase. Esse sinergismo está de acordo com o apresentado pelo gráfico de Pareto (Figura 27). A partir disso, as condições para melhor produção de lacase norteiam na faixa de pH 7,5 com concentração inicial de ARCS em 100% e com a presença de Tween 80 (2%).

Figura 30. Fatorial 2^3 - rendimento da produção de lacase em ARCS por *P. ostreatus*.



Legenda: a: ARCS x pH (superfície de resposta); b: ARCS x pH (curva de contorno); c: ARCS x Tween 80 (superfície de resposta); d: ARCS x Tween 80 (curva de contorno); e: Tween 80 x pH (superfície de resposta); f: Tween 80 x pH (curva de contorno);

O tween 80 é um surfactante que possui ácidos graxos insaturados de fácil degradação oxidativa que favorecem a ocorrência de peroxidação lipídica que favorecem o processo de oxidação e despolimerização. A partir desse mecanismo, esse surfactante pode ser caracterizado como um mediador de baixa massa molecular com atuação na transferência de elétrons e consequente degradação ou biotransformação de poluentes (HOFRICHTER, 2002; POLAK;

JAROSZ-WILKOLAZKA, 2012), justificando seu potencial como componente importante na descoloração da ARCS.

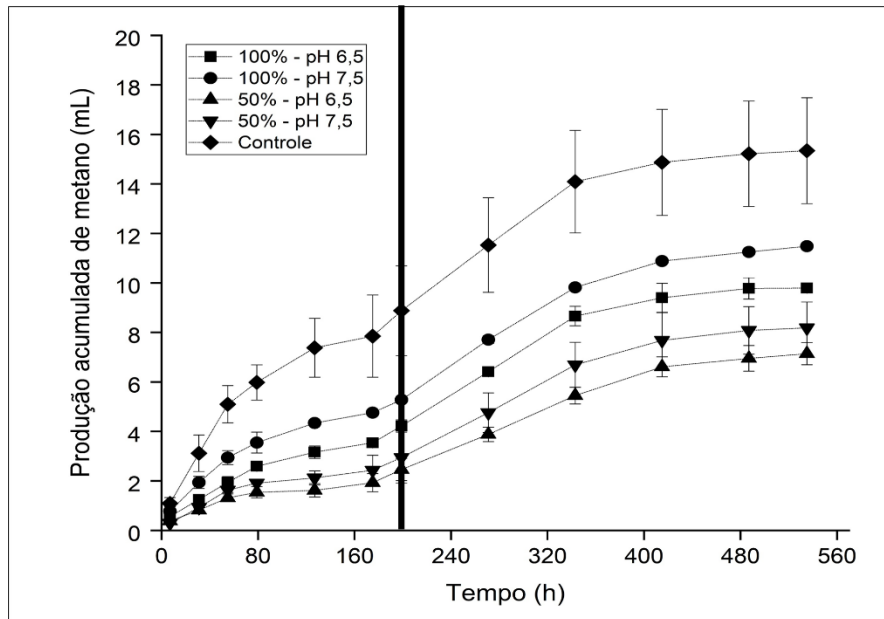
5.4. Biodegradabilidade anaeróbia da ARCS

Após a análise do crescimento de *Pleurotus ostreatus* e da produção enzimática de lacase em ARCS, as condições - ensaio 1 (50% (ARCS), 6,5 (pH)), ensaio 2 (100% (ARCS), 6,5 (pH), ensaio 3 (50% (ARCS), 7,5 (pH) e ensaio 4 (100% (ARCS), 7,5 (pH) - foram escolhidas para o estudo da biodegradabilidade anaeróbia da ARCS, em comparação com ARCS não tratada (controle). Essas condições foram escolhidas pois apresentaram bons resultados de remoção de matéria orgânica, CFT e produção de lacase sem a necessidade de adição de Tween 80, que conferiu DQO adicional a água residuária, e não apresentou melhora estatisticamente significativa para a remoção de matéria orgânica e produção de lacase.

A produção metanogênica do controle foi de 7,85 mL, enquanto dos ensaios 1, 2, 3 e 4 foram 2,43 mL, 3,54 mL, 2,43 mL e 4,76 mL, respectivamente, sendo observado que após o pré-tratamento fúngico de 15 dias houve redução na produção de metano (Figura 31). A avaliação do pré-tratamento para a produção metanogênica foi realizada até 175 horas. Esses resultados sugerem que o tempo de pré-tratamento tenha promovido a metabolização de polissacarídeos importantes para a biodegradabilidade anaeróbia (FANG et al., 2020).

Sendo observado que o pré-tratamento inibiu a biodegradabilidade anaeróbia, foi adicionada, em 175h do processo, em todos os ensaios uma fonte de carbono de fácil assimilação, glicose (1 g DQO L⁻¹) (Figura 31). A produção de metano do ensaio 1 (8,17 mL), ensaio 2 (9,76 mL), ensaio 3 (8,18 mL) e ensaio 4 (11,48 mL) foram inferiores ao ensaio controle, em que obteve 15,34 mL em 535 horas do processo de biodegradabilidade anaeróbia. Esses resultados sugerem que durante pré-tratamento o fungo produziu metabólitos secundários inibitórios, com ação bacteriostática ou bactericida, como antibióticos, a partir de *Pleurotus* spp. como relatado por Ge et al. (2022) após 20 dias de processo aeróbio.

Figura 31. Produção acumulada de metano.



Legenda: ensaio 1 (50% da ARCS em pH inicial 6,5), ensaio 2 (100% ARCS em pH inicial 6,5), ensaio 3 (50% ARCS em pH inicial de 7,5), ensaio 4 (100% ARCS em pH inicial 7,5), controle: ARCS sem pré-tratamento. Barra vertical: momento em que foi adicionado glicose.

Em estudo realizado por Gerasimenya et al. (2002) verificou-se a produção de antibióticos a partir de *P. ostreatus* em meio nutricional com glicose, peptona, triptona, NaCl, em pHs ácidos e neutros em que foi evidenciado inibição microbiana, tanto para bactérias Gram positivas, como Gram negativas. Vale ressaltar que essas substâncias, por normalmente serem metabólitos secundários, só foram detectadas somente após 14 dias de processo aeróbio. Além disso, substâncias antimicrobianas foram detectadas em corpo de frutificação de *P. ostreatus* (BINDHU et al., 2020; LIMA et al., 2021).

Krupodorova et al. (2016) avaliaram a atividade antibacteriana em 30 espécies de basidiomicetos e ascomicetos cultivados em meio GPY (*glucose-peptone-yeast*) em 14 dias de processo aeróbio. Os autores verificaram que a maioria dos fungos apresentou atividades microbianas fracas, no entanto, alguns fungos de podridão branca inibiram totalmente o crescimento bacteriano, *P. ostreatus* inibiu de forma moderada bactérias Gram positivas e negativas.

As pesquisas realizadas por Gerasimenya et al. (2002) e Krupodorova et al. (2016) reforçam a necessidade de estudo em relação ao tempo de pré-tratamento com o objetivo de compreender a produção de metabólitos secundários que podem agir como inibidores da atividade metanogênica. Embora a inibição microbiana de *P. ostreatus* nesses trabalhos tenha

ocorrido de forma moderada, isso pode ter limitado biodegradabilidade anaeróbia no processo por meio de ação bacteriostática.

A viabilidade de aplicação de fungos basidiomicetos causadores de podridão branca em degradar polímeros de biomassa lignocelulósica e estruturas recalcitrantes tem sido bastante estudada, em especial fungos que são eficientes em degradar a lignina alterando de forma mínima a hemicelulose e celulose (KUMAR; SHARMA, 2017; NOONARI et al., 2020). No entanto, a degradabilidade fúngica varia com a variedade de matéria orgânica, assim como, a seletividade em relação a matriz lignocelulósica depende da espécie fúngica e do tempo de pré-tratamento (WAN; LI, 2012).

Em trabalho desenvolvido por Piccitto et al. (2022) foi observado que o fungo de podridão branca, *Irpex lactus*, promoveu diminuição do rendimento de produção de metano quando comparada a biomassa (cana-do-reino, gramínea lignocelulósica, espécie de planta pertencente à família *Poaceae*) não tratada. O estudo ressalta que o *I. lacteus* degradou além de lignina, a hemicelulose e a celulose, comprovando que os baixos rendimentos de metano obtidos foram devido à degradação de todos os componentes celulósicos durante o pré-tratamento. Os autores recomendam a seleção de uma cepa mais seletiva, assim como, redução do tempo de duração do pré-tratamento para diminuir o consumo de carboidratos pelo fungo, visto que o processo durou 30 dias.

Em pesquisa realizada por Basinas et al. (2022), em que utilizou *P. ostreatus* como pré-tratamento da digestão anaeróbia de silagem de milho, verificou-se a promoção de biogás pelo fungo após 10 dias de pré-tratamento com aumento de 1,55 vezes. Entretanto, foi verificado que pré-tratamento mais longo, em 30 dias, obteve efeito menor em relação a produção de biogás indicando estudos voltados a duração ideal de ação fúngica na matéria orgânica utilizada como substrato.

Efeitos similares foram observados por Mustafa; Poulsen e Sheng (2016) que também atribuíram o menor desempenho de geração de metano de substrato pré-tratado a uma perda prolongada de matéria orgânica. Além disso, os autores inferem que a perda de substâncias orgânicas digeríveis é dependente de vários parâmetros, como por exemplo, a matriz lignocelulósica, o tamanho das partículas, a superfície de contato, e o teor de umidade da mistura durante o pré-tratamento.

Os trabalhos de Mustafa; Poulsen e Sheng (2016), Basinas et al. (2022) e Piccitto et al. (2022), associada à resposta dos ensaios após a adição de glicose no presente trabalho, que 15 dias seja um tempo muito longo para pré-tratamento da água residuária proveniente da indústria

de café solúvel. Acredita-se que durante esse tempo de processo aeróbio houve consumo excessivo da hemicelulose e celulose, e de outros açúcares existentes na ARCS. Segundo Fang et al. 2020, os polissacarídeos, hemicelulose e celulose, são as frações de um substrato lignocelulósico mais importantes para a biodegradabilidade anaeróbia, pois constituem fontes de carbono para crescimento e atividade das bactérias e arqueias envolvidas na DA (ABRAHAM et al., 2020).

A borra de café no cenário da produção metanogênica é um desafio devido à presença de substâncias inibitórias similares aos presentes na ARCS, como cafeína, taninos e polifenóis (MUSSATTO et al., 2011), e uma das formas de viabilização do processo é a co-processo aeróbia e co-digestibilidade anaeróbia. Awedem Wobiwo et al. (2018) realizaram a produção de cogumelo a partir de palha de milho e palha de miscanthus misturada à borra de café, e o resultante disso foi submetida à digestibilidade anaeróbia, sendo observado que o fungo utilizado, *Pleurotus sp.*, não foi responsável por mudança significativa na digestibilidade do substrato anaeróbio.

O efeito do pré-tratamento por fungo basidiomiceto em água residuária similar a ARCS, água residuária da produção de azeite de oliva, foi investigado por Fountoulakis et al. (2002), que realizou dois tipos de pré-processo aeróbio por *P. ostreatus*. Observou-se que aquele em que foi adicionado o *P. ostreatus* obteve maior rendimento em comparação ao somente tratado termicamente. Embora observe-se a contribuição do fungo na produção de metano, o trabalho não demonstrou ensaios utilizando somente o processo fúngico como alternativa de pré-tratamento, além do período em que ocorreram os pré-tratamentos (térmico e fúngico).

A metabolização a lignina é uma barreira que deve ser vencida a fim de otimizar a produção metanogênica via digestão anaeróbia, assim como a cristalinidade da hemicelulose e celulosas que são determinantes durante o processamento de biodegradabilidade anaeróbia (NEGI et al., 2020; PATINVOH et al., 2017). O pré-tratamento microbiano mostra-se uma opção com viabilidade para aumento da digestibilidade de biomassa por meio da modificação da estrutura morfológica de substrato (ABRAHAM et al., 2020), devido ser uma alternativa com melhor custo-benefício em comparação com outros tratamentos físico-químicos e mecânicos (SCHROYEN et al., 2015). No entanto, fica claro a necessidade de pesquisas que estudem o metabolismo e rotas metabólicas que ocorrem no pré-tratamento fúngico, assim como, o tempo ideal que garanta a nutrição e metabolização dos microrganismos envolvidos na DA.

Vale ressaltar que em pesquisa realizada na *Scopus*, utilizando como busca as palavras chaves “anaerobic digestion” e “*Pleurotus ostreatus*”, utilizando o operador booleano “AND”, foram encontrado 33 trabalhos em toda literatura científica internacional, observando um aumento de artigos a partir do 2019, com 17 trabalhos sobre pré-tratamento fúngico de matriz lignocelulósica sólida, e somente uma pesquisa sobre o uso de borra de café como substrato de co-processo aeróbio e co-digestão anaeróbia (AWEDEM WOBIVO et al., 2018).

Nessa busca, foi observado somente um trabalho utilizando água residuária como substrato, envolvendo a produção industrial de azeite de oliva (FOUNTOULAKIS et al., 2002). Na busca com as palavras chaves “anaerobic digestion” e “basidiomycete” foram encontrado somente 19 trabalhos. Observa-se uma escassez na literatura de informações acerca de uso de fungos basidiomicetos como suporte da digestão anaeróbia, ressaltando a importância desse trabalho para futuras pesquisas, visto que esse é o primeiro relato do uso de fungo basidiomiceto como pré-tratamento da digestão anaeróbia da água residuária de café solúvel.

6. CONCLUSÕES

- O modelo teórico da lacase de *P. ostreatus* (*Lacc 4*) construído a partir da técnica de homologia comparativa apresentou alta qualidade esteoquímica e estrutural.
- O atracamento molecular entre o modelo *Lacc 4* e os compostos alvo da cadeia produtiva do café sugerem a possibilidade de aplicação da lacase de *P. ostreatus* para a redução de compostos fenólicos da ARCS, in vivo e in vitro.
- *P. ostreatus* foi capaz de crescer em meios sólidos (ágar e BDA) contendo ARCS em diferentes concentrações.
- O fungo foi capaz de descolorir a ARCS em meio de cultura BDA com 100% da concentração de água residuária.
- A ARCS apresentou-se como mediador da produção da enzima lacase em diferentes concentrações, mostrando que a ARCS pode ser não só degradada, mas também valorada como matriz para produção dessa enzima.
- O extrato de levedura e os mediadores enzimáticos, sulfato de cobre e sulfato de manganês não promoveram a redução de CFT da ARCS.
- A descoloração da ARCS foi verificada em todas as concentrações da água residuária, em especial, com o uso do surfactante tween 80 e em concentrações menores da ARCS.

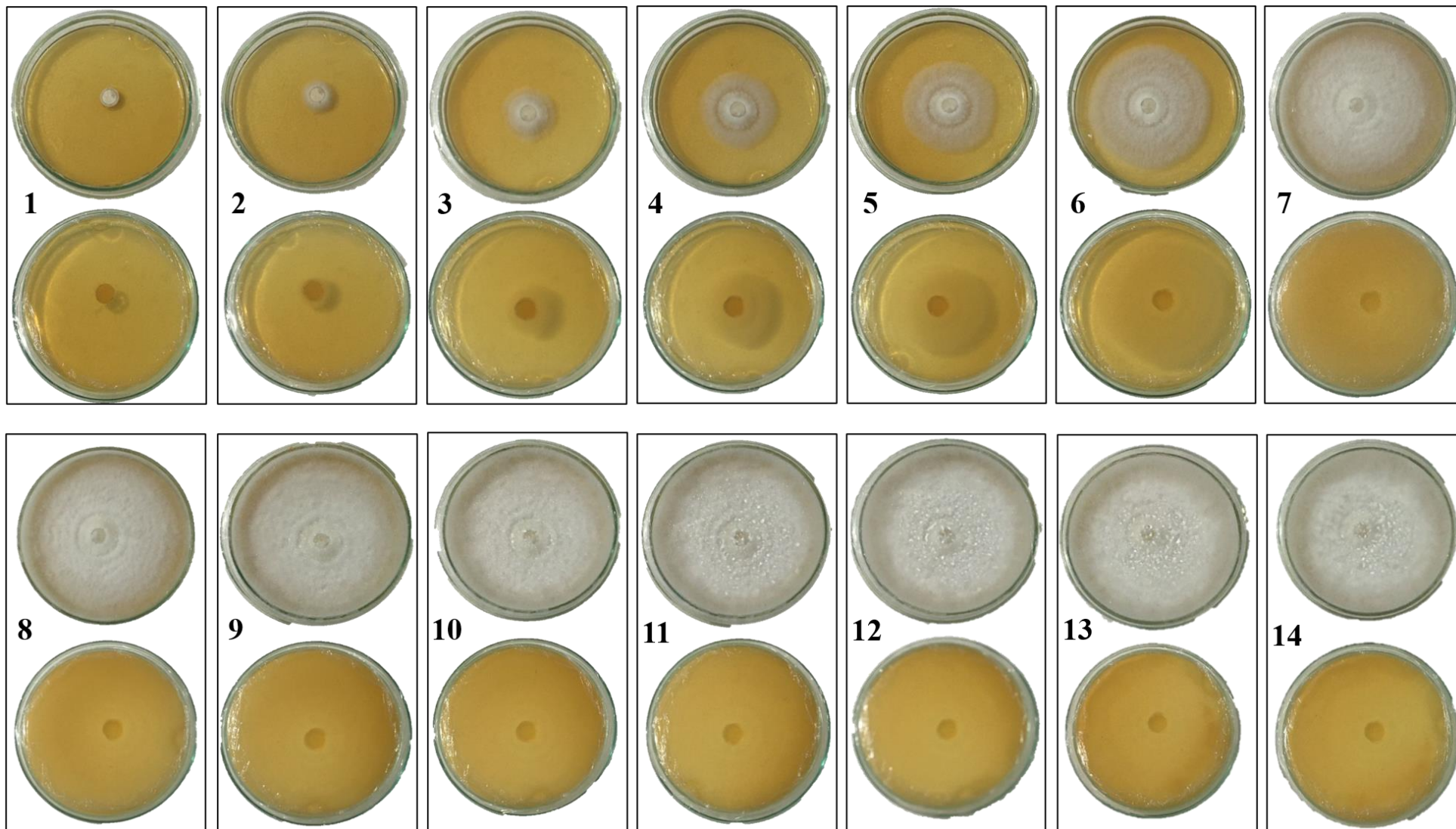
- O pré-tratamento fúngico não contribuiu para o aumento da produção metanogênica possivelmente devido à formação de metabólitos secundários inibidores da atividade metanogênica ou à metabolização de açúcares e polímeros, fontes de nutrição da microbiota anaeróbia.

7. ESTUDOS FUTUROS PROPOSTOS

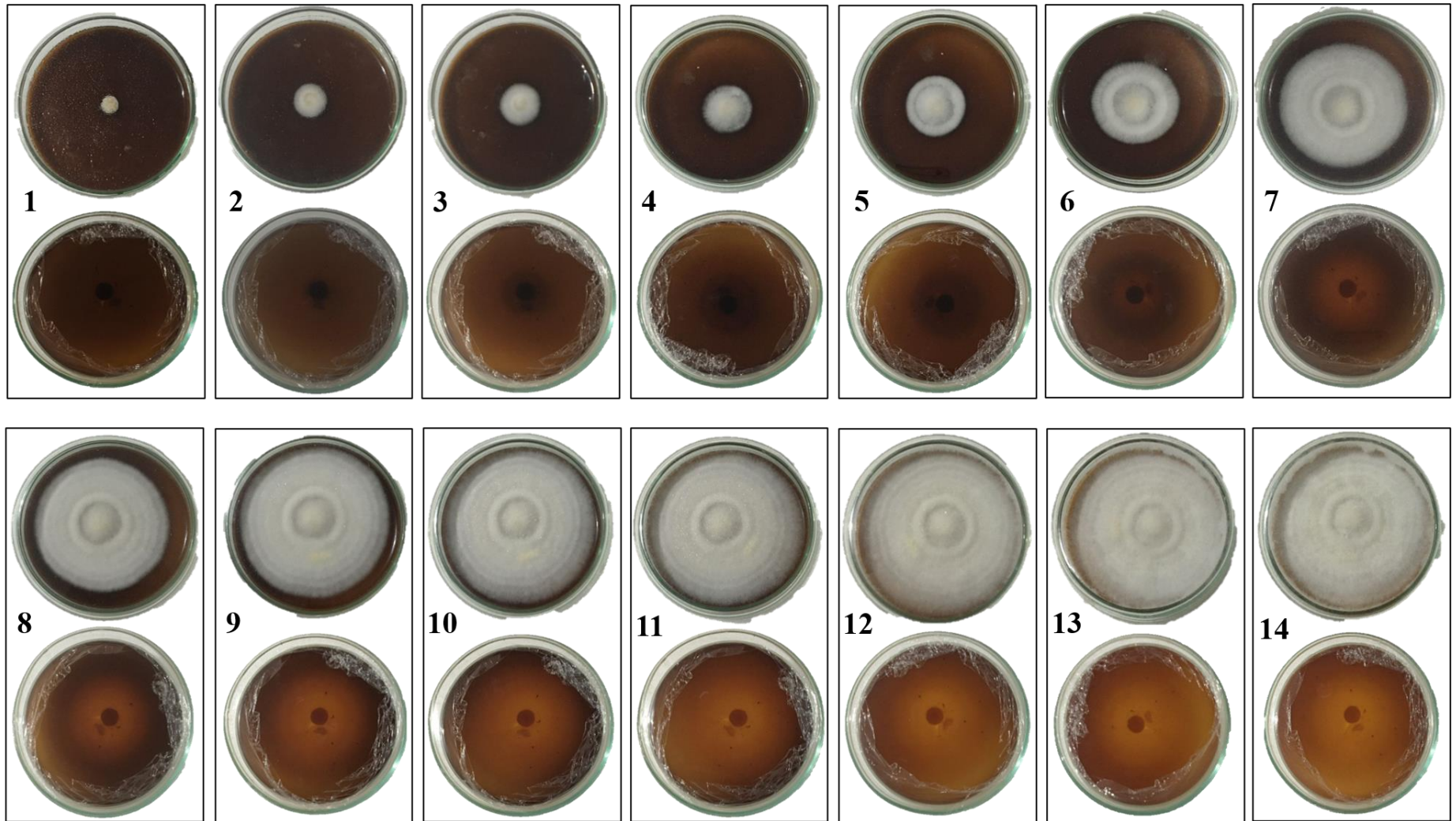
O trabalho realizado passou por etapas diversas, além de sugerir muitas hipóteses para os presentes resultados. Diante disso, este item traz possibilidades de estudo que podem ser futuramente realizados.

- Estudo de consumo de açúcares por *P. ostreatus*, assim como, da produção de metabólitos secundários e sua ação inibidora para a biodegradabilidade anaeróbia da ARCS.
- Estudo do período de pré-tratamento fúngico (*in vivo*) da ARCS com objetivo de minimizar o consumo de polissacarídeos e açúcares importante para a DA.
- Estudo do tratamento da ARCS por fungos mais seletivos (*screening*), isto é, que possuam mecanismo de ação voltado à biodegradabilidade de lignina, e permanência de polissacarídeos.
- Estudo voltado para a produção de ácidos orgânicos de cadeia curta e média de interesse industrial pela DA advindo de pré-tratamento fúngico.
- Estudo de pré-tratamento da produção metanogênica a partir do extrato bruto produzido a partir de fungos basidiomicetos (*in vitro*).
- Estudo comparativo entre a aplicação de extrato bruto, contendo a lacase, e enzima comercial.

ANEXO 1 Crescimento do *P. ostreatus* em meio BDA durante 14 dias.



ANEXO 2 – Crescimento de *P. ostreatus* em meio DBA contendo 100% da ARCS.



ANEXO 3 - Biomassa de *P. ostreatus* após 15 dias do Planejamento Fatorial 2³: a. após fim de processo aeróbio; b. após secagem (massa seca).



REFERÊNCIAS

- ABICS, A. B. DA I. DE C. S. –. **Café Solúvel**. Disponível em: <<https://www.abics.com.br/caffe-soluvel.phpa>>. Acesso em: 16 jan. 2021.
- ABRAHAM, A. et al. Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 301, n. December 2019, 2020.
- ALMEIDA, P. H. et al. Decolorization of remazol brilliant blue R with laccase from *lentinus crinitus* grown in agro-industrial by-products. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 4, p. 3463–3473, 2018.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, out. 1990.
- ALVAREZ, J. J. S.; SARMIENTO, J. L. B. **Evaluación de la producción de Biogás en régimen continuo y discontinuo a partir de aguas residuales de Café Instantáneo**?. [s.l.] Universidad de Guayaquil, 2016.
- ÁLVAREZ-MACHANCOSES, Ó.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, J. L.; KLOCZKOWSKI, A. Prediction of Protein Tertiary Structure via Regularized Template Classification Techniques. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 2467, 26 maio 2020.
- APHA, A. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association. **Inc., Washington, DC**, 2012.
- ATELGE, M. R. et al. A critical review of pretreatment technologies to enhance anaerobic digestion and energy recovery. **Fuel**, v. 270, n. January, p. 117494, 2020.
- AWASTHI, M. et al. Molecular docking and dynamics simulation analyses unraveling the differential enzymatic catalysis by plant and fungal laccases with respect to lignin biosynthesis and degradation. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 33, n. 9, p. 1835–1849, 2015.
- AWEDEM WOBIWO, F. et al. Valorization of spent coffee ground with wheat or miscanthus straw: Yield improvement by the combined conversion to mushrooms and biomethane. **Energy for Sustainable Development**, v. 45, p. 171–179, 2018.
- BALLAMINUT, N. et al. Descoloração in vitro e in silico de corante reativo pela lacase de fungo de Basidiomiceto. In: OLIVEIRA, L. A. DE et al. (Eds.). **Conhecimento, conservação e uso de Fungos**. 1. ed. Manaus/SP: INPA, 2019. p. 107–115.
- BALLAMINUT, N.; MATHEUS, D. R. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 248–252, 2007.
- BARNETO, A. G. et al. Investigating the structure-effect relationships of various natural phenols used as laccase mediators in the biobleaching of kenaf and sisal pulps. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 327–335, 2012.
- BARRECA, A. M. et al. Laccase/mediated oxidation of a lignin model for improved delignification procedures. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 26, n. 1–2, p. 105–110, 2003.
- BARROS, V. G. DE et al. Treatment of biodigested coffee processing wastewater using Fenton’s oxidation and coagulation/flocculation. **Environmental Pollution**, v. 259, 2020.
- BASINAS, P. et al. Fungal pretreatment parameters for improving methane generation from anaerobic digestion of corn silage. **Bioresource Technology**, v. 345, n. October 2021, 2022.
- BERNATS, M.; JUHNA, T. Removal of phenols-like substances in pharmaceutical wastewater with fungal bioreactors by adding *Trametes versicolor*. **Water Science and Technology**, v. 78, n. 4, p. 743–750, 2018.
- BERTRAND, G. The presence of laccase and tyrosinase in the liquid extract of mushrooms. **CR Hebd Seances Acad Sci**, n. 123, p. 463–465, 1986.

- BERTRAND, T. et al. Crystal Structure of a Four-Copper Laccase Complexed with an Arylamine: Insights into Substrate Recognition and Correlation with Kinetics. *Biochemistry*, v. 41, n. 23, p. 7325–7333, 1 jun. 2002.
- BETTIN, F. et al. Additive effects of CuSO_4 and aromatic compounds on laccase production by *Pleurotus sajor-caju* ps-2001 using sucrose as a carbon source. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 31, n. 2, p. 335–346, 2014.
- BILAL, M. et al. Immobilized ligninolytic enzymes: An innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants – A review. *Science of the Total Environment*, v. 576, p. 646–659, 2017.
- BINDHU, J. et al. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activity of the ethanol extract of *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Natural Remedies*, v. 20, n. 2, p. 110–115, 2020.
- BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2020, San Diego: Dassault Systèmes, 2022.
- BITENCOURT-FERREIRA, G.; VEIT-ACOSTA, M.; DE AZEVEDO, W. F. Van der Waals Potential in Protein Complexes. In: [s.l.: s.n.]. p. 79–91.
- BLUNDI, C. E.; GADÊLHA, R. F. Metodologia para determinação de matéria orgânica específica em águas residuárias. In: **Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios**, 2001.
- BOWIE, J.; LUTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*, v. 253, n. 5016, p. 164–170, 12 jul. 1991.
- BRAVO, J. et al. Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Research International*, v. 50, n. 2, p. 610–616, 2013.
- BRAZIL. **Intended National determined contribution to attainment of the framework convention’s goal of the united nations on climate change.** Disponível em: <http://www.itamaraty.gov.br/images/ed_desenvsust/BRASIL-iNDC-portugues.pdf>. Acesso em: 8 set. 2020.
- CARBAJO, J. M. et al. Tannic acid induces transcription of laccase gene *cglcc1* in the white-rot fungus *Coriopsis gallica*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 48, n. 12, p. 1041–1047, 2002.
- CARRASCO-CABRERA, C. P.; BELL, T. L.; KERTESZ, M. A. Caffeine metabolism during cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with spent coffee grounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 103, n. 14, p. 5831–5841, 2019.
- CASTRO, V. G. DE. **Deterioração da madeira de *Piptadenia moniliformis* benth. E *pinus* sp. Pela podridão branca e parda em ensaios de laboratório.** [s.l.] Universidade Federal Rural do Semi-Árido, 2020.
- CHATZIKONSTANTINO, A. V. et al. Stabilization of Laccase Through Immobilization on Functionalized GO-Derivatives. In: [s.l.: s.n.]. p. 47–81.
- CHUNG, S. Y.; SUBBIAH, S. A structural explanation for the twilight zone of protein sequence homology. *Structure*, v. 4, n. 10, p. 1123–1127, out. 1996.
- COELHO, G. D. et al. Characterization of a thermostable *Deconica castanella* Laccase and application toward pentachlorophenol degradation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 49, n. 9, p. 908–915, 2019.
- COELHO, G. D. et al. Biodegradation of synthetic effluent containing CI Direct Red 28 (Congo Red) by *Lentinus crinitus* Laccase leads to low ecotoxicity. *Current Biotechnology*, v. 09, p. 1–7, 2020.
- COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science*, v. 2, n. 9, p. 1511–1519, set. 1993.
- CONAB, C. N. DE A. Acompanhamento da Safra Brasileira. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, p. 33, 2020.

- CONCEIÇÃO, J. C. S. et al. Phenolic Compound Biotransformation by *Trametes versicolor* ATCC 200801 and Molecular Docking Studies. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 190, n. 4, p. 1498–1511, 2020.
- CORRÊA, C. L. O. et al. Enzymatic Technology Application on Coffee Co-products: A Review. **Waste and Biomass Valorization**, n. 0123456789, 2020.
- DA SILVA, H. H. B. et al. Biodegradation of 2,4 dichlorophenol by *Pleurotus ostreatus* DSM 1833. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 6, p. 1563–1570, 2009.
- DARONCH, N. A. et al. Elucidating the choice for a precise matrix for laccase immobilization: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 397, p. 125506, 1 out. 2020.
- DE LA MORA, E. et al. **Chain A, CORIOLOPSIS GALLICA LACCASE - Protein - NCBI**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/5A7E_A>. Acesso em: 16 set. 2021.
- DE LA MORA, E. et al. Structural changes caused by radiation-induced reduction and radiolysis: the effect of X-ray absorbed dose in a fungal multicopper oxidase. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 68, n. 5, p. 564–577, 1 maio 2012.
- DE LIMA, L. M. et al. Behavioral aspects of the coffee consumer in different countries: The case of Brazil. In: **Coffee Consumption and Industry Strategies in Brazil: A Volume in the Consumer Science and Strategic Marketing Series**. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. p. 321–341.
- DE OLIVEIRA, R. A.; BRUNO, N. M. N. Start-up of horizontal anaerobic reactors with sludge blanket and fixed bed for wastewater treatment from coffee processing by wet method. **Engenharia Agricola**, v. 33, n. 2, p. 353–366, 2013.
- DIAS, M. E. et al. Anaerobic digestion of hydrothermal liquefaction wastewater from spent coffee grounds. **Biomass and Bioenergy**, v. 148, p. 106030, 1 maio 2021.
- DILALLO, R.; ALBERTSON, O. E. Volatile acids by direct titration. **Water Pollution Control Federation**, v. 33, n. 4, p. 356–365, 1961.
- DINSDALE, R. M.; HAWKES, F. R.; HAWKES, D. L. Comparison of mesophilic and thermophilic upflow anaerobic sludge blanket reactors treating instant coffee production wastewater. **Water Research**, v. 31, n. 1, p. 163–169, 1 jan. 1997a.
- DINSDALE, R. M.; HAWKES, F. R.; HAWKES, D. L. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion with thermophilic pre-acidification of instant-coffee-production wastewater. **Water Research**, v. 31, n. 8, p. 1931–1938, 1 ago. 1997b.
- EL-ZAHER, E. H. F. A. et al. THE ROLE OF EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCED BY *Pleurotus Sapidus* AS MEDICAL AGENT. **Delta Journal of Science**, v. 43, n. 1, p. 133–148, 2021.
- ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; ASATIANI, M. D. Efficient production of lignin-modifying enzymes and phenolics removal in submerged fermentation of olive mill by-products by white-rot basidiomycetes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 134, n. August, p. 39–47, 2018.
- EMBRAPA, E. B. DE P. A. **Exportações do café solúvel brasileiro atingem volume equivalente a 2,94 milhões de sacas de 60kg em nove meses**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/55415349/exportacoes-do-caffe-soluvel-brasileiro-atingem-volume-equivalente-a-294-milhoes-de-sacas-de-60kg-em-nove-meses>>. Acesso em: 16 jan. 2021.
- FACHNIAR, G. et al. Effect of laccase oxidation on phenol content and antioxidant capacity of roasted coffee. **AIP Conference Proceedings**, v. 2215, n. April, 2020.
- FANG, W. et al. Evaluation of white rot fungi pretreatment of mushroom residues for volatile fatty acid production by anaerobic fermentation: Feedstock applicability and fungal function. **Bioresource Technology**, v. 297, n. November 2019, p. 122447, 2020.
- FARAH, A. Coffee Constituents. **Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention**, p. 21–58, 2012.

- FARIA, R. A. et al. Effects of manganese, 2,5-xylidine, veratryl alcohol and tween 80 on the production of ligninolytic enzymes by *Ceriporiopsis subvermispora*. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 19, p. 1675–1685–1685, 2015.
- FERRE, F.; CLOTE, P. DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Web Server, p. W230–W232, 1 jul. 2005.
- FISER, A. Comparative Protein Structure Modelling. In: **From Protein Structure to Function with Bioinformatics**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2017. p. 91–134.
- FOUNTOULAKIS, M. S. et al. Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Water Research**, v. 36, n. 19, p. 4735–4744, 1 nov. 2002.
- FROESE, R. **Species 2000 & ITIS Catalogue of Life**. Disponível em: <www.catalogueoflife.org/col/>. Acesso em: 18 abr. 2021.
- FU, N. et al. Genes Identification, Molecular Docking and Dynamics Simulation Analysis of Laccases from *Amylostereum areolatum* Provides Molecular Basis of Laccase Bound to Lignin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8845, 22 nov. 2020.
- GALHAUP, C. et al. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 529–536, 2002.
- GE, X. et al. Secondary Metabolites Produced by Coculture of *Pleurotus ostreatus* SY10 and *Pleurotus eryngii* SY302. **Chemistry and Biodiversity**, v. 19, n. 4, p. 1–8, 2022.
- GERASIMENYA, V. P. et al. Antimicrobial and Antitoxical Action of Edible and Medicinal Mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. Extracts. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 4, n. 2, p. 6, 2002.
- GIACOBELLI, V. G. et al. Repurposing designed mutants: a valuable strategy for computer-aided laccase engineering – the case of POXA1b. **Catalysis Science & Technology**, v. 7, n. 2, p. 515–523, 2017.
- GIARDINA, P. et al. Laccases: a never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 369–385, 2010.
- GLAZUNOVA, O. A. et al. Elucidation of the crystal structure of *Corioloropsis caperata* laccase: restoration of the structure and activity of the native enzyme from the T2-depleted form by copper ions. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 71, n. 4, p. 854–861, 1 abr. 2015.
- GOUDOPOULOU, A.; KRIMITZAS, A.; TYPAS, M. A. Differential gene expression of ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus* grown on olive oil mill wastewater. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, n. 2, p. 541–551, 2010.
- GUNNE, M. et al. Structural and redox properties of the small laccase Ssl1 from *Streptomyces sviveus*. **FEBS Journal**, v. 281, n. 18, p. 4307–4318, set. 2014.
- HENN, C. et al. Biodegradation of Atrazine And Ligninolytic Enzyme Production By Basidiomycete Strains; p. 1–12, 2020.
- HOFRICHTER, M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 454–466, 2002.
- HOLLIGER, C. et al. Towards a standardization of biomethane potential tests. **Water Science and Technology**, v. 74, n. 11, p. 2515–2522, 2016.
- HOLLIGER, C. et al. Towards a standardization of biomethane potential tests: A commentary. **Water Science and Technology**, v. 83, n. 1, p. 247–250, 2021.
- HONGYAN, L. et al. Study on transformation and degradation of bisphenol A by *Trametes versicolor* laccase and simulation of molecular docking. **Chemosphere**, v. 224, p. 743–750, 2019.

- HSU, C. A. et al. Biological degradation of anthroquinone and azo dyes by a novel laccase from *Lentinus* sp. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 9, p. 5109–5117, 2012.
- HUANG, C. et al. Treatment of nitrogen heterocyclic compounds (NHCs) in coking wastewater by white-rot fungi. **Tecnología y Ciencias del Agua**, v. 10, n. 4, p. 195–218, 2019.
- HUBLIK, G.; SCHINNER, F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 3–5, p. 330–336, 2000.
- IBARRA-TAQUEZ, H. N. et al. Integrated electrocoagulation-electrooxidation process for the treatment of soluble coffee effluent: Optimization of COD degradation and operation time analysis. **Journal of Environmental Management**, v. 200, p. 530–538, 15 set. 2017.
- IJANU, E. M.; KAMARUDDIN, M. A.; NORASHIDDIN, F. A. Coffee processing wastewater treatment: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Applied Water Science**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.
- ISHWARYA, S. P.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Spray-Freeze-Drying approach for soluble coffee processing and its effect on quality characteristics. **Journal of Food Engineering**, v. 149, p. 171–180, 1 mar. 2015.
- JANUSZ, G. et al. Laccase Properties , Physiological Functions , and Evolution. **International Journal of Molecular Sciences**, p. 25, 2020.
- JEON, J.-R. et al. Laccase-catalysed oxidations of naturally occurring phenols: from in vivo biosynthetic pathways to green synthetic applications. **Microbial Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 318–332, maio 2012.
- JONES, S. M.; SOLOMON, E. I. Electron transfer and reaction mechanism of laccases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 5, p. 869–883, 9 mar. 2015.
- JOY, S. et al. Detailed Comparison of the Protein-Ligand Docking Efficiencies of GOLD, a Commercial Package and ArgusLab, a Licensable Freeware. **In Silico Biology**, v. 6, n. 6, p. 601–605, 2006.
- KAINTHOLA, J. et al. Fungal pretreatment and associated kinetics of rice straw hydrolysis to accelerate methane yield from anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 286, n. March, p. 121368, 2019.
- KARP, S. G. et al. Statistical optimization of laccase production and delignification of sugarcane bagasse by *Pleurotus ostreatus* in solid-state fermentation. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- KAWABATA, T.; GO, N. Detection of pockets on protein surfaces using small and large probe spheres to find putative ligand binding sites. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 68, n. 2, p. 516–529, 19 abr. 2007.
- KOSHY, J.; CHANDRAN, N.; NAMBIAN, P. Biodegradation of phenol using spent substrate of *Pleurotus* sp. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 2, p. 656–661, 2012.
- KOSTENBERG, D.; MARCHAIM, U. Solid waste from the instant coffee industry as a substrate for anaerobic thermophilic digestion. **Water Science and Technology**, v. 27, n. 2, p. 97–107, 1993.
- KŘESINOVÁ, Z. et al. Biodegradation of endocrine disruptors in urban wastewater using *Pleurotus ostreatus* bioreactor. **New Biotechnology**, v. 43, p. 53–61, 2018.
- KRUPODOROVA, T. A. et al. Antibacterial activity of macromycetes mycelia and culture liquid. **Microbiology and Biotechnology Letters**, v. 44, n. 3, p. 246–253, 2016.
- KUMAR, A. K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, 2017.
- KUMAR, S. V. S. et al. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 4, p. 386–394, 20 ago. 2003.

- LASKOWSKI, R. A. et al. PDBsum: Structural summaries of PDB entries. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 129–134, jan. 2018.
- LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.
- LAWRENCE, K. et al. **Handbook of Industrial and Hazardous Wastes Treatment**. 2. ed. New York: Marcel Dekker Inc., 2004.
- LEE, J. et al. Use of Swine Wastewater as Alternative Substrate for Mycelial Bioconversion of White Rot Fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, n. 2, p. 844–859, 2017.
- LIMA, G. A. et al. **Agaricus subrufescens and Pleurotus ostreatus mushrooms as alternative additives to antibiotics in diets for broilers challenged with Eimeria spp.** [s.l.] Taylor & Francis, 2021. v. 62
- LIU, Y. et al. Effect of surfactants on the interaction of phenol with laccase: Molecular docking and molecular dynamics simulation studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 357, n. December 2017, p. 10–18, 2018.
- LUNDELL, T. K. et al. Genomics, Lifestyles and Future Prospects of Wood-Decay and Litter-Decomposing Basidiomycota. **Advances in Botanical Research**, v. 70, p. 329–370, 1 jan. 2014.
- LV, W.; SCHANBACHER, F. L.; YU, Z. Putting microbes to work in sequence: Recent advances in temperature-phased anaerobic digestion processes. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9409–9414, 2010.
- MAESTRE-REYNA, M. et al. Structural and Functional Roles of Glycosylation in Fungal Laccase from *Lentinus* sp. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0120601, 7 abr. 2015.
- MAGALHÃES, L. M. et al. Rapid assessment of bioactive phenolics and methylxanthines in spent coffee grounds by FT-NIR spectroscopy. **Talanta**, v. 147, p. 460–467, 15 jan. 2016.
- MAGAN, N.; FRAGOEIRO, S.; BASTOS, C. Environmental Factors and Bioremediation of Xenobiotics Using White Rot Fungi. **Mycobiology**, v. 38, n. 4, p. 238, 2010.
- MAIA, R. T.; DE ARAÚJO CAMPOS, M.; DE MORAES FILHO, R. M. Introductory Chapter: Homology Modeling. In: **Homology Molecular Modeling - Perspectives and Applications**. [s.l.] IntechOpen, 2021.
- MAIA PEREIRA, P. et al. Optimized Atrazine Degradation by *Pleurotus ostreatus* INCQS 40310: an Alternative for Impact Reduction of Herbicides Used in Sugarcane Crops. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 01, n. S12, p. 6–13, 2013.
- MÄKELÄ, M. et al. Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 542–549, 2002.
- MANAVALAN, T.; MANAVALAN, A.; HEESE, K. Characterization of Lignocellulolytic Enzymes from White-Rot Fungi. **Current Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 485–498, 2015.
- MANCHÓN, N. et al. Distribution patterns of polyphenols and alkaloids in instant coffee, soft and energy drinks, and tea. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 31, n. 5, p. 483–500, 2013.
- MANSUR, M. et al. The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. **Mycologia**, v. 95, n. 6, p. 1013–1020, nov. 2003.
- MARTÍNKOVÁ, L. et al. Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A review. **Chemosphere**, v. 149, p. 373–382, 2016.
- MARTÍ-RENOM, M. A. et al. Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 29, n. 1, p. 291–325, jun. 2000.
- MARTIRANI, L. et al. Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Water Research**, v. 30, n. 8, p. 1914–1918, 1996.

- MATE, D. M.; ALCALDE, M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1457–1467, 3 nov. 2017.
- MATERA, I. et al. Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with p-toluate. **Inorganica Chimica Acta**, v. 361, n. 14–15, p. 4129–4137, out. 2008.
- MATHEUS, D. R. et al. Growing basidiomycetes in bioreactors to be applied to bioremediation of HCB in soil. **Seventh International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium**, 2003.
- MAYANS, B. et al. An assessment of *Pleurotus ostreatus* to remove sulfonamides, and its role as a biofilter based on its own spent mushroom substrate. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 6, p. 7032–7042, 2021.
- MEHRA, R.; MEYER, A. S.; KEPP, K. P. Molecular dynamics derived life times of active substrate binding poses explain K_M of laccase mutants. **RSC Advances**, v. 8, n. 64, p. 36915–36926, 2018.
- MESSAOUDI, A.; BELGUTH, H.; BEN HAMIDA, J. Homology modeling and virtual screening approaches to identify potent inhibitors of VEB-1 β-lactamase. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, v. 10, n. 1, p. 22, 2 dez. 2013.
- MESSINA, G. et al. The beneficial effects of coffee in human nutrition. **Biology and Medicine**, v. 7, n. 4, 2015.
- MKHIZE, S. S. et al. Performance of *Pleurotus pulmonarius* mushroom grown on maize stalk residues supplemented with various levels of maize flour and wheat bran. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 37, n. 4, p. 570–577, 2017.
- MIYAZAWA, N. et al. Molecular dynamics study of laccase immobilized on self-assembled monolayer-modified Au. **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 21, p. 12848–12853, 17 nov. 2017.
- MO, D. et al. Molecular docking simulation on the interactions of laccase from *Trametes versicolor* with nonylphenol and octylphenol isomers. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 3, p. 331–343, 2018.
- MOHAMAD, S. BIN; ONG, A. L.; RIPEN, A. M. Evolutionary trace analysis at the ligand binding site of laccase. **Bioinformatics**, v. 2, n. 9, p. 369–372, 18 jun. 2008.
- MONLAU, F. et al. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 5, p. 934–951, 2014.
- MORALES-ÁLVAREZ, E. D. et al. Partial removal and detoxification of malachite green and crystal violet from laboratory artificially contaminated water by *Pleurotus ostreatus*. **Universitas Scientiarum**, v. 21, n. 3, p. 259–285, 2016.
- MORALES-ÁLVAREZ, E. D. et al. Malachite Green and Crystal Violet Decolorization by *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus ostreatus* Supernatant and by rGILCC1 and rPOXA 1B Concentrates: Molecular Docking Analysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 3, p. 794–805, 2018.
- MOREIRA, S.; MILAGRES, A. M. F.; MUSSATTO, S. I. Reactive dyes and textile effluent decolorization by a mediator system of salt-tolerant laccase from *Peniophora cinerea*. **Separation and Purification Technology**, v. 135, n. 1, p. 183–189, 2014.
- MOSQUERA, A. C. et al. Influencia De Los Procesos Oxidativos Avanzados En La Digestión Anaerobia De Aguas Residuales De La Industria Del Café. **Centro Azúcar**, v. 46, n. 2, p. 89–100, 2019a.
- MOSQUERA, R. A. C. et al. Evaluación de la arrancada de filtros anaerobios para el tratamiento de aguas residuales de café instantáneo. **CENIC Ciencias Biológicas**, v. 50, n. 1, p. 40–54, 2019b.
- MOT, A. C.; SILAGHI-DUMITRESCU, R. Laccases: Complex architectures for one-electron oxidations. **Biochemistry (Moscow)**, v. 77, n. 12, p. 1395–1407, 15 dez. 2012.
- MUSSATTO, S. I. et al. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 5, p. 661–672, 2011.

- MUSTAFA, A. M. et al. Combinations of fungal and milling pretreatments for enhancing rice straw biogas production during solid-state anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 174–182, 2017.
- MUSTAFA, A. M.; POULSEN, T. G.; SHENG, K. Fungal pretreatment of rice straw with *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma reesei* to enhance methane production under solid-state anaerobic digestion. **Applied Energy**, v. 180, p. 661–671, 2016.
- NAZILAH, K. R. et al. Effect of laccase oxidation pre-treatment on coffee (*Coffea arabica*) bean processing waste for composting substrate. **AIP Conference Proceedings**, v. 2215, n. April, 2020.
- NEGI, S. et al. Collegial effect of maggots larvae and garbage enzyme in rapid composting of food waste with wheat straw or biomass waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 258, p. 120854, 2020.
- NGUYEN, T. M.; RANAMUKHAARACHCHI, S. L. Effect of different culture media, grain sources and alternate substrates on the mycelial growth of *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 3, p. 223–230, 2020.
- NOONARI, A. A. et al. Effects of isolated fungal pretreatment on bio-methane production through the co-digestion of rice straw and buffalo dung. **Energy**, v. 206, p. 118107, 2020.
- NOVITA, E. Biodegradability Simulation of Coffee Wastewater Using Instant Coffee. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 9, p. 217–229, 1 jan. 2016.
- NTOUGIAS, S. et al. Olive mill wastewater biodegradation potential of white-rot fungi - Mode of action of fungal culture extracts and effects of ligninolytic enzymes. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 121–130, 2015.
- OLIVIERI, G. et al. Strategies for dephenolization of raw olive mill wastewater by means of *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 5, p. 719–729, 2012.
- ORLIKOWSKA, M. et al. Structural studies of two thermostable laccases from the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1629–1640, fev. 2018.
- OSIPOV, E. et al. Effect of the L499M mutation of the ascomycetous *Botrytis aclada* laccase on redox potential and catalytic properties. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 70, n. 11, p. 2913–2923, 1 nov. 2014.
- PALLI, L. et al. Preliminary evaluation of *Pleurotus ostreatus* for the removal of selected pharmaceuticals from hospital wastewater. **Biotechnology Progress**, v. 33, n. 6, p. 1529–1537, 2017.
- PALMIERI, G. et al. A Novel White Laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 50, p. 31301–31307, dez. 1997.
- PAREDES, C. A. M.; MENDOZA, B. F. R.; MOREIRA, S. E. G. Anaerobic Digestion of Wastewater From the Instant Coffee Industry. **Espamciencia**, v. 9, n. 1, p. 23–32, 2018.
- PARRA GUARDADO, A. L. et al. Effect of redox mediators in pharmaceuticals degradation by laccase: A comparative study. **Process Biochemistry**, v. 78, n. October 2018, p. 123–131, 2019.
- PASSOS, F. et al. Anaerobic co-digestion of coffee husks and microalgal biomass after thermal hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 253, n. December 2017, p. 49–54, 2018.
- PATEL, N. et al. Mode of Action, Properties, Production, and Application of Laccase: A Review. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 13, n. 1, 2019.
- PATINVOH, R. J. et al. Innovative pretreatment strategies for biogas production. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 13–24, 2017.
- PENG, W. et al. Digestate management for high-solid anaerobic digestion of organic wastes: A review. **Bioresource Technology**, v. 297, n. November 2019, p. 122485, 2020.

- PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.
- PICCITTO, A. et al. Advanced Biomethane Production from Biologically Pretreated Giant Reed under Different Harvest Times. **Agronomy**, v. 12, n. 3, p. 1–14, 2022.
- PIONTEK, K.; ANTORINI, M.; CHOINOWSKI, T. Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37663–37669, out. 2002.
- PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The Design of Optimum Multifactorial Experiments Author (s): R . L . Plackett and J . P . Burman Published by : Oxford University Press on behalf of Biometrika Trust Stable URL : <http://www.jstor.com/stable/2332195>. **Oxford University Press on behalf of Biometrika Trust**, v. 33, n. 4, p. 305–325, 1946.
- POLAK, J.; JAROSZ-WILKOLAZKA, A. Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 1295–1307, 2012.
- PONTIUS, J.; RICHELLE, J.; WODAK, S. J. Deviations from Standard Atomic Volumes as a Quality Measure for Protein Crystal Structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 264, n. 1, p. 121–136, nov. 1996.
- PRATHEEBAA, P.; PERIASAMY, R.; PALVANNAN, T. Factorial design for optimization of laccase production from *Pleurotus ostreatus* IMI 395545 and laccase mediated synthetic dye decolorization. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 236–245, 2013.
- PUBCHEM, D. OF CHEMICAL MOLECULES. **PubChem**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 2 dez. 2021.
- RATTAN, S. et al. A comprehensive review on utilization of wastewater from coffee processing. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 9, p. 6461–6472, 2015.
- RIGAS, F. et al. Biodegradation of lindane by *Pleurotus ostreatus* via central composite design. **Environment International**, v. 31, n. 2, p. 191–196, 2005.
- RIPLEY, A. L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestion of High-Strength Wastes. **Water Pollution Control Federation**, v. 58, n. 5, p. 406–411, 1986.
- RODRIGUEZ-COUTO, S. Laccases for Denim Bleaching: An Eco-Friendly Alternative. **The Open Textile Journal**, v. 5, n. 1, p. 1–7, 2012.
- RODRÍGUEZ PÉREZ, S. et al. Decolourisation of mushroom farm wastewater by *Pleurotus ostreatus*. **Biodegradation**, v. 19, n. 4, p. 519–526, 2008.
- ROUCHES, E. et al. Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 59, p. 179–198, 2016.
- RUGGERI, B. et al. The selection of pretreatment options for anaerobic digestion (AD): A case study in olive oil waste production. **Chemical Engineering Journal**, v. 259, p. 630–639, 2015.
- SAADATI, S. et al. Laccase-Based Oxidative Catalytic Systems for the Aerobic Aromatization of Tetrahydroquinazolines and Related N-Heterocyclic Compounds under Mild Conditions. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2018, n. 30, p. 4050–4057, 2018.
- SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ, S. et al. Biotransformation of lignocellulosic biomass into industrially relevant products with the aid of fungi-derived lignocellulolytic enzymes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1099–1116, 2020.
- ŠALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, n. 3, p. 779–815, dez. 1993.

SAMOGGIA, A.; RIEDEL, B. Consumers' perceptions of coffee health benefits and motives for coffee consumption and purchasing. **Nutrients**, v. 11, n. 3, 2019.

SAXENA, D. **A Case Study on Effluent Treatment Plant of An Instant Coffee Production Unit Water Today**, 2016. Disponível em: <<http://eprints.utm.my/9687/>>

SCHLOSSER, D. **Laccases in Bioremediation and Waste Valorisation**. [s.l.: s.n.].

SCHROYEN, M. et al. Effect of enzymatic pretreatment of various lignocellulosic substrates on production of phenolic compounds and biomethane potential. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 696–702, 2015.

SCHWARZE, F. W. M. R. Wood decay under the microscope. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 133–170, 1 nov. 2007.

SENGUPTA, B. et al. Toward sustainable and eco-friendly production of coffee: abatement of wastewater and evaluation of its potential valorization. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 22, n. 5, p. 995–1014, 2020.

SENTHIVELAN, T.; KANAGARAJ, J.; PANDA, R. C. Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: An eco-friendly approach - A review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 21, n. 1, p. 19–38, 2016.

SINGH, D. et al. Molecular modeling and simulation studies of recombinant laccase from *Yersinia enterocolitica* suggests significant role in the biotransformation of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 469, n. 2, p. 306–312, 2016.

SINGH, D.; GUPTA, N. Microbial Laccase: a robust enzyme and its industrial applications. **Biologia**, v. 75, n. 8, p. 1183–1193, 2020.

SITARZ, A. K.; MIKKELSEN, J. D.; MEYER, A. S. Structure, functionality and tuning up of laccases for lignocellulose and other industrial applications. **Critical Reviews in waalBiotechnology**, v. 36, n. 1, p. 70–86, 2 jan. 2016.

SRIDHAR, S. et al. In Silico and in Vitro Physicochemical Screening of *Rigidoporus* sp. Crude Laccase-assisted Decolorization of Synthetic Dyes-Approaches for a Cost-effective Enzymebased Remediation Methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 3, p. 911–922, 2013.

SRINIVASAN, S. et al. Application of docking and active site analysis for enzyme linked biodegradation of textile dyes. **Environmental Pollution**, v. 248, p. 599–608, 1 maio 2019.

SUKSONG, W. et al. Enhanced solid-state biomethanisation of oil palm empty fruit bunches following fungal pretreatment. **Industrial Crops and Products**, v. 145, n. June 2019, p. 112099, 2020.

THAKURIA, B.; JUNGAI, N.; ADHIKARI, S. Catalytic Site Prediction of Azoreductase Enzyme of *E. coli* with Potentially Important Industrial Dyes Using Molecular Docking Tools. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 5, n. 2, p. 91–99, 2015.

THANGAMANI, A.; PARTHIBAN, R. **Management of industrial tannery solid waste for biogas production**. 1. ed. Saarbrücken, Alemanha: [s.n.].

THANGAMANI, A.; RAJAKUMAR, S.; RAMANUJAM, R. A. Anaerobic co-digestion of hazardous tannery solid waste and primary sludge: Biodegradation kinetics and metabolite analysis. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 12, n. 5, p. 517–524, 2010.

THANGUDU, R. R. et al. Analysis on conservation of disulphide bonds and their structural features in homologous protein domain families. **BMC Structural Biology**, v. 8, n. 1, p. 55, 26 dez. 2008.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

- TIAN, X.; FANG, Z.; GUO, F. Perspective: Jatropha cultivation in southern India: Assessing farmers' experiences. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 3, p. 246–256, 2012.
- TORRES, J. A. et al. Enzymatic oxidation of phenolic compounds in coffee processing wastewater. **Water Science and Technology**, v. 73, n. 1, p. 39–50, 2016.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, p. NA-NA, 2009.
- TRUGO, L. C.; MACRAE, R. An investigation of coffee roasting using high performance gel filtration chromatography. **Food Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 1 jan. 1986.
- TUCKER, R. Biogas derived from...coffee? **Renewable Energy Focus**, v. 15, n. 5, p. 14–15, 2014.
- UNUOFIN, J. O.; OKOH, A. I.; NWODO, U. U. Aptitude of oxidative enzymes for treatment of wastewater pollutants: A laccase perspective. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 1–36, 2019.
- VIDAL-LIMON, A. et al. Enhanced Degradation of Pesticide Dichlorophen by Laccase Immobilized on Nanoporous Materials: A Cytotoxic and Molecular Simulation Investigation. **Bioconjugate Chemistry**, v. 29, n. 4, p. 1073–1080, 2018.
- VIGNOLI, J. A. et al. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. **Food Research International**, v. 61, p. 279–285, 1 jul. 2014.
- VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 863–868, 2011.
- WALLNER, B.; ELOFSSON, A. All are not equal: A benchmark of different homology modeling programs. **Protein Science**, v. 14, n. 5, p. 1315–1327, maio 2005.
- WAN, C.; LI, Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1447–1457, 2012.
- WANG, J. et al. Lignin engineering through laccase modification: a promising field for energy plant improvement. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 145, 15 dez. 2015.
- WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 54, n. 1, 20 jun. 2016.
- WENG, C.; PENG, X.; HAN, Y. Depolymerization and conversion of lignin to value-added bioproducts by microbial and enzymatic catalysis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, p. 1–22, 2021.
- YANG, J. et al. Laccases: Production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAY, 2017.
- YOSHIDA, H. Chemistry of Lacquer (Urushi). **J. Chem. Soc. Trans.**, v. 43, n. 47, p. 472–486, 1883.
- ZÁRATE-SALAZAR, J. R. et al. Use of lignocellulosic corn and rice wastes as substrates for oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* Jacq.) cultivation. **SN Applied Sciences**, v. 2, n. 11, p. 1–10, 2020.
- ZARRINBAKHS, N. et al. Characterization of wastes and coproducts from the coffee industry for composite material production. **BioResources**, v. 11, n. 3, p. 7637–7653, 2016.
- ZERVA, A.; SIMI, S.; TOPAKAS, E. Applications of Microbial Laccases: Patent Review of the Past Decade (2009–2019). **catalysts Review**, v. 9, p. 1–26, 2019.
- ZDOBNOV, E. M.; APWEILER, R. InterProScan - an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. **Bioinformatics**, v. 17, n. 9, p. 847–848, 1 set. 2001.

ZHANG, Y. et al. Effect of Triton X-100 on the removal of aqueous phenol by laccase analyzed with a combined approach of experiments and molecular docking. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 97, p. 7–12, 2012.