

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Escola de Engenharia de São Carlos

Produção de lacase para o pré-tratamento da digestão anaeróbia da água residuária do beneficiamento de café

Fabricio Soares Moreira

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental - Área de Concentração em Ciências da Engenharia Ambiental

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental

FABRICIO SOARES MOREIRA

**Produção de lacase para o pré-tratamento da digestão anaeróbia da água residuária do
beneficiamento de café**

São Carlos – SP

2024

FABRICIO SOARES MOREIRA

Produção de lacase para o pré-tratamento da digestão anaeróbia da água residuária do beneficiamento de café

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dr^a. Giovana Tommaso.

Área de concentração: Ciências da Engenharia Ambiental

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2024

AUTORIZO A REPRODUÇÃO 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 com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

S 835p	<p>Soares Moreira, Fabricio Produção de lacase para o pré-tratamento da digestão anaeróbia da água residuária do beneficiamento de café / Fabricio Soares Moreira; orientadora Giovana Tommaso. São Carlos, 2024.</p> <p>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, 2024.</p> <p>1. Digestão anaeróbia. 2. enzimas ligninolíticas. 3. P. ostreatus. 4. compostos fenólicos. 5. ARBC. I. Título.</p>
-----------	--

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **FABRICIO SOARES MOREIRA**.

Título da dissertação: "Produção de lacase para o pré-tratamento da digestão anaeróbia da água residuária do beneficiamento de café".

Data da defesa: 09/02/2024.

Comissão Julgadora

Resultado

Profa. Associada Giovana Tommaso
(Orientadora)

(Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/FZEA-USP)

Aprovado

Profa. Dra. Mirian Yasmine Krauspenhar Niz
(Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL)

Aprovado

Profa. Dra. Vera Maria Valle Vitali
(Instituto de Pesquisas Ambientais/SEMIL)

Aprovado

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:
Prof. Tit. **Marcelo Zaiat**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Carlos De Marqui Junior**

DEDICATÓRIA

A minha filha Maria Alice,

A minha esposa Cassia Emanuelle,

Aos meus pais e familiares,

Às pessoas que estiveram ao meu lado nesta conquista,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que permitiu tudo isso, estando sempre comigo nos momentos bons e ruins e guiando os meus passos ao longo de minha vida.

Aos meus pais e toda minha família, e seus ensinamentos transmitidos, por me ensinar o verdadeiro caminho da vida, e tanto me apoiar e incentivar nesta jornada.

A minha esposa Cassia Emanuelle, pelo incentivo em trilhar esse novo caminho, pela compreensão e aguentar todas as tribulações, por me incentivar, me motivar e me fazer acreditar que no fim tudo daria certo.

A minha co-orientadora, Glauciane, que sempre me atendeu em momentos de dificuldade deste trabalho, por compartilhar seu conhecimento, pela paciência, carinho e conselhos.

A minha orientadora, Giovana Tommaso, pela oportunidade, empenho e ensinamentos que me proporcionou nesses dois anos. Contribuindo muito em minha construção como pesquisador e profissional.

Agradeço aos professores que contribuíram para um melhor aprendizado, em especial aos professores, Rogers Ribeiro e Marcelo Zaiat, que tanto contribuíram para minha formação acadêmica.

A professora Eliana Kamimura por permitir que eu conduzisse meus experimentos no Laboratório de Bioprocessos.

Aos meus amigos, Marco, que me auxiliou tanto no início desse projeto; e ao José por todo seu auxílio no Laboratório, agradeço a atenção e disponibilidade.

A meus colegas do laboratório de Biotecnologia Ambiental: Gilda, Kyara, Gabriel, Maria Eduarda, Mirian, Vitória, Danilo, Diana. Que me ajudaram quando mais precisava e fizeram meus dias de trabalho mais alegre.

Agradeço à Fundação de Amparo e Pesquisa de São Paulo (FAPESP), processos 2021/15144-4, pelo financiamento necessário à condução da pesquisa e pelo fornecimento da bolsa de mestrado regular.

Obrigado a todos!

RESUMO

MOREIRA, F. S. **Produção de lacase para o pré-tratamento da digestão anaeróbia da água residuária do beneficiamento de café.** 2024. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2024.

O café possui grande importância comercial para o Brasil, que é considerado o maior produtor e exportador de café do mundo. O beneficiamento de toda essa produção é responsável pela geração de grandes quantidades de água residuária. A água residuária do beneficiamento de café (ARBC) é de difícil degradação por possuir grande quantidade de matéria orgânica e componentes tóxicos e, por isso, há necessidade do desenvolvimento de soluções economicamente viáveis para o gerenciamento deste resíduo antes do seu descarte. Com isso, o presente trabalho propôs o uso da ARBC como substrato para produção de enzimas ligninolíticas por fungo basidiomiceto, e o uso destas enzimas no pré-tratamento de uma água residuária do beneficiamento do café simulada em bancada para pré-tratamento da digestão anaeróbia. As etapas dessa pesquisa foram: 1. avaliação de crescimento do fungo *Pleurotus ostreatus* em ARBC em estado sólido; 2. otimização da produção enzimática de *P. ostreatus* usando delineamentos experimentais sequenciais; 3. caracterização da enzima lacase presente no extrato enzimático; 4. otimização da degradação dos componentes do ARBC pelo extrato enzimático (pré-tratamento); 5. determinação da biodegradabilidade anaeróbia da água residuária pré-tratada e da água residuária sem o pré-tratamento, com comparação dos processos através da estimativa de parâmetros cinéticos da produção de metano. A tolerância do *P. ostreatus* a ARBC foi avaliada em meio sólido contendo ARBC, o *P. ostreatus* foi capaz de crescer em todas as concentrações de ARBC, além de descolorir a ARBC sem diluição. A otimização da produção da enzima lacase em ARBC por *P. ostreatus*, *in vivo*, em meio líquido foi avaliada utilizando dois delineamentos experimentais: Plackett Burman (PB) e Planejamento Fatorial (PF). O PB indicou que as concentrações de CuSO_4 , MnSO_4 e agitação foram as variáveis que mais influenciaram positivamente a produção de lacase por *P. ostreatus*. No PF, somente o CuSO_4 foi estatisticamente significativo para produção de lacase, para um nível de confiança de 95%. Após a escolha da condição de produção de lacase foi realizado uma cinética de produção de lacase, durante 30 dias para determinação dos principais picos de produção da enzima. O extrato enzimático obtido no pico de produção da lacase foi caracterizado em parâmetros físico-químicos e utilizado para o pré-tratamento da água residuária produzida em bancada, otimizado a partir de um planejamento fatorial 2^3 , neste o pH e a agitação foram estatisticamente significativos, tendo o pH efeito negativo e a agitação efeito positivo, em relação a remoção de compostos fenólicos. O ensaio selecionado no pré-tratamento da ARBC foi estudado a partir da biodegradabilidade anaeróbia em comparação com a ARBC sem o pré-tratamento, foi verificado que o pré-tratamento enzimático promoveu a redução na produção de metano, sugerindo a possibilidade do *P. ostreatus* produzir metabólitos secundários que podem agir como inibidores do consórcio anaeróbio, como também, concentrações não inibitórias de compostos fenólicos podem ser importantes para o consórcio microbiano na digestão anaeróbia.

Palavras-chave: Metano, Biogás, enzimas ligninolíticas, *P. ostreatus*, compostos fenólicos, compostos tóxicos.

ABSTRACT

MOREIRA, F. S. **Production of laccase for the pre-treatment of anaerobic digestion of wastewater from coffee processing.** 2024. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2024.

Coffee has great commercial importance for Brazil, which is considered the largest producer and exporter of coffee in the world. The processing of all this production is responsible for the generation of large quantities of wastewater. Coffee processing wastewater (CPWW) is difficult to degrade as it contains a large amount of organic matter and toxic components and, therefore, there is a need to develop economically viable solutions for managing this waste before its disposal. Therefore, the present work proposed the use of CPWW as a substrate for the production of ligninolytic enzymes by basidiomycete fungus, and the use of these enzymes in the pre-treatment of wastewater from coffee processing simulated on a bench for pre-treatment of anaerobic digestion. Among the stages of this research were: 1. evaluation of growth of the fungus *Pleurotus ostreatus* in CPWW in solid state; 2. optimization of *P. ostreatus* enzyme production using sequential experimental designs; 3. characterization of the laccase enzyme present in the enzyme extract; 4. optimization of the degradation of CPWW components by the enzymatic extract (pre-treatment); 5. determination of the anaerobic biodegradability of pre-treated wastewater and wastewater without pre-treatment, with comparison of the processes through the estimation of kinetic parameters of methane production. The tolerance of *P. ostreatus* to CPWW was evaluated in solid medium containing CPWW, *P. ostreatus* was able to grow in all concentrations of CPWW, in addition to discoloring ARBC undiluted. The optimization of laccase enzyme production in CPWW by *P. ostreatus*, in vivo, in liquid medium was evaluated using two experimental designs: Plackett Burman (PB) and Factorial Design (PF). The PB indicated that the concentrations of CuSO₄, MnSO₄ and agitation were the variables that most positively influenced laccase production by *P. ostreatus*. In PF, only CuSO₄ was statistically significant for laccase production, at a 95% confidence level. After choosing the laccase production condition, laccase production kinetics was carried out for 30 days to determine the main enzyme production peaks. The enzymatic extract obtained at the peak of laccase production was characterized in physical-chemical parameters and used for the pre-treatment of wastewater produced on the bench, optimized from a 2³ factorial design, in which the pH and agitation were statistically significant, pH has a negative effect and agitation has a positive effect, in relation to the removal of phenolic compounds. The test selected in pre-treatment of CPWW was studied with anaerobic biodegradability in comparison with CPWW without pre-treatment, it was found that enzymatic pre-treatment promoted a reduction in methane production, suggesting the possibility of *P. ostreatus* producing secondary metabolites that can act as inhibitors of the anaerobic consortium, as well as non-inhibitory concentrations of phenolic compounds may be important for the microbial consortium in anaerobic digestion.

Keywords: Methane, biogas, ligninolytic enzymes, *P. ostreatus*, phenolic compounds, toxic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Partes do fruto do café.....	16
Figura 2: Diagrama geral do beneficiamento do café.....	17
Figura 3: Etapas do processo de digestão anaeróbia.....	21
Figura 4: Lacase orientação dos átomos de cobre e ciclo catalítico.....	26
Figura 5: Resumo da metodologia.....	30
Figura 6: Crescimento micelial de <i>P. ostreatus</i> em concentrações crescentes de ARBC em meio sólido, esterilizado A, não-esterilizado B.....	41
Figura 7: Descoloração da ARBC, esterilizada (A) e sem esterilização (B), na concentração de 100% por <i>P. ostreatus</i>	43
Figura 8: Diagramas de Pareto e significância das variáveis estudadas para o intervalo de confiança de 95%. A (Produção de lacase), B (Remoção de DQO) e C (Produção de biomassa).....	44
Figura 9: Diagramas de Pareto e significância das variáveis estudadas para o intervalo de confiança de 95%. A (Produção de lacase) e B (Remoção de DQO).....	48
Figura 10: Planejamento Fatorial 2^3 – Gráficos de superfície e curva de contorno: Produção de lacase por <i>P. ostreatus</i>	51
Figura 11: Planejamento Fatorial 2^3 – Gráficos de superfície e curva de contorno: Remoção de DQO por <i>P. ostreatus</i>	52
Figura 12: Perfil da produção de lacase, carboidratos e pH em ARBC.....	54
Figura 13: Biomassa e Demanda Química de Oxigênio (DQO) em ARBC.....	55
Figura 14: Efeito do pH de reação na atividade da lacase de <i>P. ostreatus</i> (■).....	56
Figura 15: Efeito da temperatura de reação na atividade de lacase de <i>P. ostreatus</i> (■).....	57
Figura 16: Perfil de estabilidade da atividade de lacase de <i>P. ostreatus</i> , frente ao pH. pH 4,5 (●), pH 6,0 (■) e pH 7,0 (▲).....	58
Figura 17: Perfil de estabilidade térmica da lacase de <i>P. ostreatus</i> a 25°C (▲), 40 °C (■), 50 °C (●) e 60 °C (▼).....	59
Figura 18: Velocidade de lacase produzida por <i>P. ostreatus</i> em diferentes concentrações de ABTS como substrato. A (Lacase x ABTS) e B (Duplo recíproco ou gráfico de Lineweaver-Burk).....	60
Figura 19: Efeito da concentração de sulfato de cobre (■), sulfato de manganês (▲) e sulfato de ferro (●) na atividade de lacase de <i>P. ostreatus</i>	61
Figura 20: Diagramas de Pareto e significância das variáveis estudadas para o intervalo de confiança de 95% para Degradação de CFT.....	63
Figura 21: Planejamento Fatorial 2^3 – Gráficos de superfície e curva de contorno: degradação CFT (%) por extrato enzimático bruto de <i>P. ostreatus</i>	65
Figura 22: Degradação de CFT (%) por extrato enzimático bruto de <i>P. ostreatus</i> com diferentes tempos de incubação. As barras indicam os limites superior e inferior de desvio padrão.....	66
Figura 23: Produção acumulada de metano.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterizações físico-químicas da ARBC.....	18
Tabela 2: Delineamento Experimental <i>Plackett-Burman</i> produção de lacase em ARBC - valores inferiores e superiores das variáveis codificadas	33
Tabela 3: Matriz do Delineamento Experimental <i>Plackett & Burman</i> produção de lacase em ARBC.	33
Tabela 4: Níveis do planejamento experimental - Planejamento Fatorial 2 ³ produção de lacase em ARBC.....	34
Tabela 5: Matriz do Delineamento Experimental – Planejamento Fatorial 2 ³ produção de lacase em ARBC.....	34
Tabela 6: Níveis do Delineamento Fatorial 2 ³ na avaliação do potencial do extrato bruto de <i>P. ostreatus</i> de degradar os compostos fenólicos da ARBC <i>in vitro</i>	36
Tabela 7: Matriz do Delineamento Fatorial 2 ³ na avaliação do potencial do extrato bruto de <i>P. ostreatus</i> de degradar os compostos fenólicos da ARBC <i>in vitro</i>	36
Tabela 8: Parâmetros físico-químicos das águas residuárias do beneficiamento do café.....	39
Tabela 9: Densidade micelial de <i>P. ostreatus</i> em concentrações crescentes de ARBC em meio sólido após 15 dias de incubação.	41
Tabela 10: Análise colorimétrica do efeito de <i>P. ostreatus</i> na concentração de 100% de ARBC em meio sólido.....	42
Tabela 11: Matriz de <i>Plackett & Burman</i> codificada para o design com 12 condições experimentais (1-12) e três repetições do ponto central (PC1-PC3) com suas respectivas variáveis respostas, remoção de DQO, produção de biomassa e produção de lacase por <i>P. ostreatus</i> após 15 dias de processo aeróbio submerso.	44
Tabela 12: Dados estatísticos obtidos após a realização dos ensaios para seleção de variáveis significativas para as variáveis resposta produção de lacase, remoção de DQO e produção de biomassa.....	46
Tabela 13: Delineamento Fatorial 2 ³ , Remoção de DQO e produção de lacase por <i>P. ostreatus</i> após 15 dias de processo aeróbio submerso.....	48
Tabela 14: Coeficientes de regressão do fatorial 2 ³ para avaliação da produção de lacase e remoção de DQO por <i>P. ostreatus</i>	49
Tabela 15: Análise de Variância (ANOVA) para a produção de lacase por <i>P. ostreatus</i>	49
Tabela 16: Análise de Variância (ANOVA) para remoção de DQO por <i>P. ostreatus</i>	49
Tabela 17: Propriedades bioquímicas de lacases de <i>P. ostreatus</i>	60
Tabela 18: Delineamento Fatorial 2 ³ , degradação de Compostos Fenólico Totais (CFT) por extrato enzimático bruto de <i>P. ostreatus</i>	62
Tabela 19: Coeficientes de regressão do fatorial 2 ³ para avaliação da Degradação de CFT por extrato enzimático bruto de <i>P. ostreatus</i>	63
Tabela 20: Análise de Variância (ANOVA) para a remoção de CFT por extrato enzimático bruto de <i>P. ostreatus</i>	64
Tabela 21: Parâmetros de ajuste de Gompertz modificado.....	67

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1.	Café e a ARBC.....	15
2.2.	Água residuária do beneficiamento do café.....	17
2.3.	Digestão anaeróbia.....	19
2.3.1.	Digestão anaeróbia da água residuária do beneficiamento do café.....	21
2.4.	Pré-tratamento enzimático.....	22
2.5.	Fungos basidiomicetos - <i>Pleurotus ostreatus</i>	23
2.6.	Enzimas ligninolíticas.....	24
2.6.1.	Peroxidasas.....	24
2.6.1.1.	Ligninas Peroxidasas.....	25
2.6.1.2.	Manganês Peroxidase.....	25
2.6.2.	Fenoloxidasas.....	25
2.6.2.1.	Lacase.....	26
2.7.	Expressão e produção de Lacase.....	27
2.8.	Aplicação da lacase na degradação de compostos fenólicos e não fenólicos.....	28
3.	HIPÓTESE GERAL:.....	29
4.	OBJETIVOS.....	29
5.	METODOLOGIA.....	29
5.1.	Produção da água residuária do beneficiamento de café simulada.....	31
5.2.	Caracterização da água residuária do beneficiamento de café.....	31
5.3.	Estudo da produção de lacase em ARBC por <i>P. ostreatus</i>	31
5.3.1.	Inóculo de Basidiomiceto.....	31
5.3.2.	Estudo do preparo do inóculo de <i>P. ostreatus</i> . em meio solido em ARBC.....	31
5.3.2.1.	Tolerância do <i>P. ostreatus</i> . em meio solido e indução da produção do complexo ligninolítico	31
5.3.2.2.	Descoloração da ARBC em meio sólido por <i>P. ostreatus</i>	32
5.3.3.	Produção de lacase em ARBC por <i>P. ostreatus</i> em meio líquido.....	32
5.3.3.1.	Produção de lacase - Delineamento Experimental <i>Plackett-Burman</i>	32
5.3.3.2.	Delineamento experimental – Planejamento Fatorial.....	33
5.3.3.3.	Cinética de produção de lacase por <i>P. ostreatus</i>	34
5.4.	Caracterização da atividade de lacase produzida por <i>Pleurotus ostreatus</i>	35
5.4.1.1.	Determinação da temperatura e do pH ótimos de reação.....	35
5.4.1.2.	Determinação da estabilidade térmica e ao pH.....	35
5.4.1.3.	Determinação dos parâmetros cinéticos.....	35

5.5. Estudo do pré-tratamento <i>in vitro</i> da ARBCs pelo extrato enzimático bruto produzido por <i>P. ostreatus</i>	36
5.6. Digestão Anaeróbia	37
5.6.1. Caracterização do inóculo	37
5.6.2. Determinação de Potencial Metanogênico	37
5.7. Análises físico-químicas e enzimática.....	38
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
6.1. Caracterização da ARBC.....	39
6.2. Estudo da produção de lacase por <i>Pleurotus ostreatus</i> em ARBC.....	40
6.2.1. Cultivo sólido <i>P. ostreatus</i> em ARBC.....	40
6.2.2. Descoloração do meio de cultura contendo ARBC (100%) por <i>P. ostreatus</i>	42
6.2.3. Produção de lacase em ARBC por <i>P. ostreatus</i> em meio líquido	43
6.2.3.1. Seleção das variáveis que influenciam a produção de lacase - Delineamento Experimental <i>Plackett-Burman</i>	43
6.2.3.2. Otimização da produção de lacase - Delineamento experimental Planejamento Fatorial	47
6.2.4. Cinética de produção de lacase.....	53
6.3. Pré-tratamento <i>in vitro</i> da ARBCs pelo extrato enzimático bruto produzido por <i>P. ostreatus</i>	61
6.4. Digestão Anaeróbia da ARBCs	66
7. CONCLUSÃO	69
8. ESTUDOS FUTUROS PROPOSTOS.....	70
REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais populares no mundo, e sua produção representa grande importância comercial para muitos países, em especial os em desenvolvimento. O Brasil é o maior produtor dessa *commodity*, sendo que no acumulado de janeiro a agosto de 2022 o Brasil exportou cerca de 25,7 milhões de sacas de 60 kg de café (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB, 2022). Toda essa produção é responsável pela geração de uma grande quantidade de água residuária durante seu beneficiamento, em especial nas etapas de despulpagem e fermentação (CORRÊA et al., 2020; RATTAN et al., 2015).

Tradicionalmente, a ARBC é lançada aos rios e riachos próximos às usinas de produção de café (IJANU; KAMARUDDIN; NORASHIDDIN, 2020), embora o condicionamento e tratamento do efluente venha melhorando pela utilização de lagoas, escoamento superficial e fertirrigação (ALMEIDA; SILVA, 2006). No entanto, em função da complexibilidade e toxicidade da ARBC, quando lançada nos corpos d'água, essas águas residuárias prejudicam o uso da água além de formar zonas anaeróbias, com liberação de gases tóxicos, como o metano, que é um potente gás de efeito estufa, sendo 84 vezes mais poderoso que o CO₂, além de ser um precursor do ozônio poluente do ar (BRUNO; OLIVEIRA, 2008; TOLEDO, 2019).

A água residuária do beneficiamento de café (ARBC) apresenta coloração, geralmente marrom (ANCY JENIFER et al., 2020), altas demandas química de oxigênio (DQO) e bioquímica de oxigênio (DBO) e apresenta várias macromoléculas, como os polifenóis, taninos, polissacarídeos e cafeína (CHAGAS et al., 2015), muitas das quais estão associadas a coloração marrom (SAXENA, 2016) e dificultam a degradação natural da matéria orgânica que os acompanha (NOVITA, 2016). Ainda os fenóis são tóxicos, e em concentrações superiores a 1 mg L⁻¹, podem afetar a vida aquática, inibindo o crescimento dos microrganismos nos processos biológicos de tratamento (BRUNO; OLIVEIRA, 2008). Diante disso, métodos têm sido estudados a fim de buscar soluções atuais e mais viáveis economicamente para gerenciamento desses resíduos (MURTHY; MADHAVA NAIDU, 2012; PIN et al., 2020).

A digestão anaeróbia (DA) vem sendo pesquisada como alternativa para o tratamento da ARBC por apresentar baixo consumo de energia, baixa produção de lodo e a possibilidade de operação a partir de uma variedade de substratos orgânicos e conversão destes em biogás (ALEMAYEHU; ASFAW; TIRFIE, 2020; BEYENE et al., 2014; PENG et al., 2020; PIN et al., 2020; THANGAMANI; PARTHIBAN, 2011) com a possibilidade de geração de energia elétrica ou na forma de calor (TUCKER, 2014). Entretanto, a presença de substâncias tóxicas, dentre elas, compostos fenólicos, inibem etapas da DA (MONLAU et al., 2014), e comprometem a eficiência na produção de metano durante o processo (CHAPLEUR et al., 2016). Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de pré-tratamentos que possam aumentar a biodegradabilidade e a

biodisponibilidade de matéria orgânica para os microrganismos anaeróbios, maximizando a produção de energia (PASSOS et al., 2018; RUGGERI et al., 2015).

Por outra via, os fungos basidiomicetos de podridão branca são conhecidos por serem capazes de crescer sob condições de estresse ambiental, as quais geralmente limitam o crescimento bacteriano (MAGAN; FRAGOEIRO; BASTOS, 2010). Os fungos degradadores da madeira atuam na mineralização completa da lignina liberando CO₂ e H₂O, por meio da excreção de enzimas extracelulares, que também podem ser utilizadas para degradar poluentes, como compostos fenólicos, clorofenóis, corantes azo e antraquinônicos, herbicidas e agrotóxicos (HENN et al., 2020; PATEL et al., 2019; SCHLOSSER, 2020). A aplicação de extratos enzimáticos obtidos a partir de substratos lignocelulósicos requer baixo custo operacional, além de reduzir a toxicidade de efluentes sintéticos tóxicos e recalcitrantes (COELHO et al., 2020).

Dentre as enzimas extracelulares produzidas por estes fungos para degradação da lignina e outros compostos, destacam-se as lacases, que vêm sendo aplicadas na degradação de diversos poluentes, como os corantes têxteis sintéticos (ALMEIDA et al., 2018; MOREIRA; MILAGRES; MUSSATTO, 2014), pentaclorofenol (COELHO et al., 2019) e compostos fenólicos (BERNATS; JUHNA, 2018; KŘESINOVÁ et al., 2018). Essa enzima catalisa a oxidação de seus substratos, com a concomitante redução de oxigênio molecular à água (MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2015).

Associadas a tratamentos enzimáticos, pesquisas de biologia computacional identificaram a viabilidade da lacase de fungos basidiomicetos em degradar compostos fenólicos complexos (BALLAMINUT et al., 2019; HONGYAN et al., 2019; SILVA, 2022; VIDAL-LIMON et al., 2018). Silva (2022), levantou os principais compostos fenólicos liberados na cadeia produtiva do café e conduziu o estudo do atracamento molecular da lacase de *P. ostreatus* com estes compostos. O autor observou que o atracamento molecular entre o modelo *Lacc 4* e os compostos alvo da cadeia produtiva do café indicaram a viabilidade de aplicação desta enzima no tratamento dos compostos fenólicos presentes nestas águas residuárias.

No entanto, os tratamentos enzimáticos se deparam com um obstáculo considerável devido aos custos elevados associados às enzimas. A produção dessas enzimas frequentemente demanda investimentos significativos em meios de cultura, representando aproximadamente 30-40% do custo total (RIGO et al., 2021; SAMPAIO; HADDAD; WIENDL, 2018). Nesse contexto, é crucial desenvolver técnicas que permitam reutilizar resíduos agroindustriais, transformando-os em fontes eficazes para a produção de bioprodutos de maior valor agregado (LEITE et al., 2021).

Acredita-se que o uso das enzimas produzidas por fungos de podridão branca no pré-tratamento da ARBC apresenta-se como uma proposta promissora para otimização da DA e conseqüentemente possa promover maior produção metanogênica. A escolha do tipo do pré-tratamento justifica-se ainda

pela redução de danos ao meio ambiente que processos físico e químicos podem trazer. Logo, essa pesquisa propôs a utilização da ARBC como substrato para produção do extrato enzimático do fungo basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, para aplicação como pré-tratamento da própria ARBC para degradação de compostos fenólicos, visando a otimização do desempenho energético da DA.

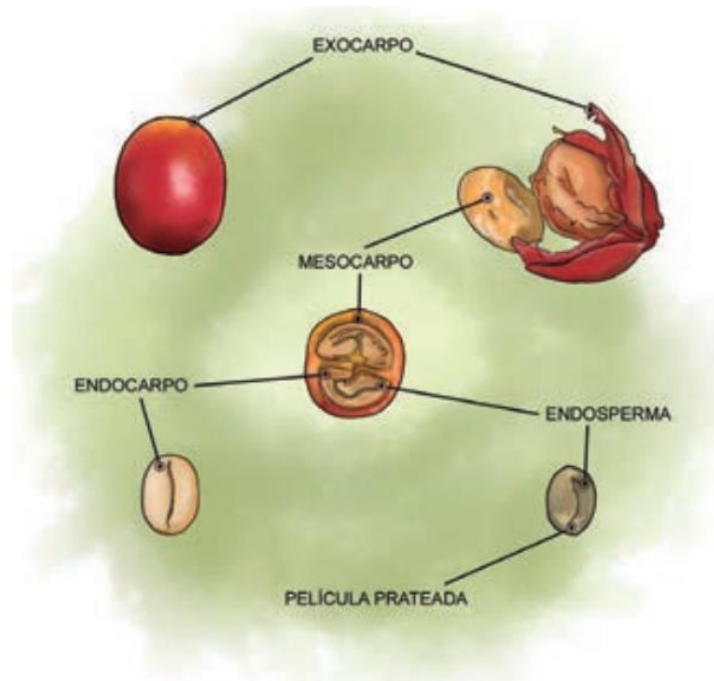
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Café e a ARBC

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, sendo o segundo produto mais comercializado, superado apenas pelo petróleo. 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). O Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo, que no total das exportações de café de agosto de 2022 a julho de 2023 foi de 36,1 milhões de sacas de 60kg, sendo aproximadamente 89,48% de café verde (CECAF, 2023).

Os frutos do café são formados pelo exocarpo (casca), mesocarpo (polpa), endocarpo (pergaminho), perisperma (película prateada) e endosperma (semente/grão) (Figura 1) (DURÁN et al., 2017). Os frutos geralmente são colhidos após 5 anos de seu plantio, cada fruto de café contendo, na maioria das vezes, 2 sementes (grãos) que normalmente são verdes, podendo ficar amareladas ao secar. O endosperma (grão) ocupa cerca de 50% do volume do fruto fresco (HALL; TREVISAN; DEVOS, 2022; MUSSATTO et al., 2011).

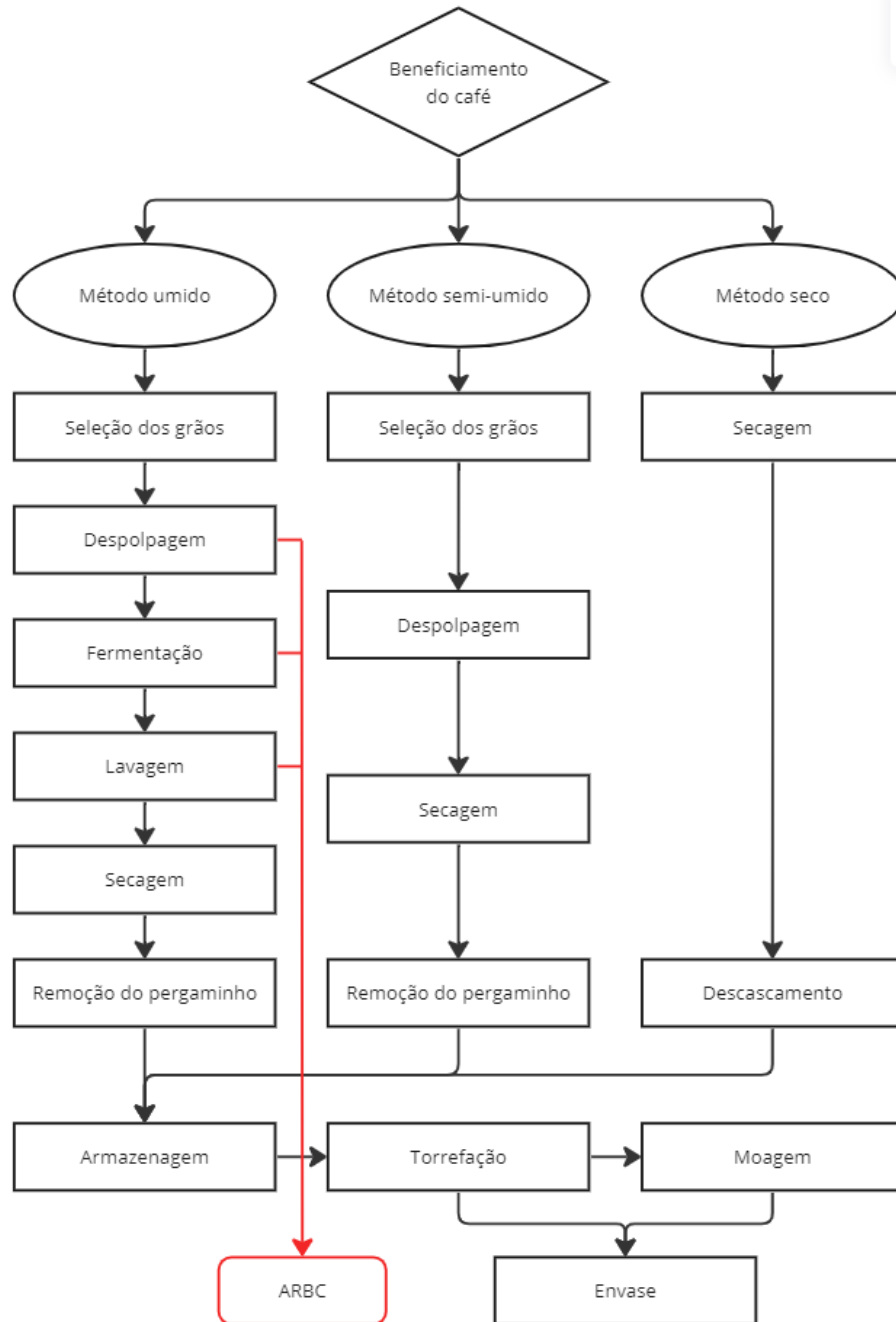
Figura 1 – Partes do fruto do café.



Fonte: (Serviço Nacional de Aprendizagem Rural – SENAR, 2017).

O beneficiamento do café (Figura 2) é realizado para a conversão dos frutos de café em grãos verdes, por meio da remoção da polpa e casca, que pode ser realizada por três vias: úmida, semiseca ou semiúmida e seca (ALEMAYEHU; ASFAW; TIRFIE, 2020; DIAS et al., 2012). As vias úmida e semiúmida visam uma produção de café com maior qualidade. Entretanto, esses métodos requerem uma grande quantidade de água durante o processo produtivo nas etapas de despolpação e fermentação gerando como consequência grande volume de água residuárias que pode variar dependendo da tecnologia de beneficiamento (ALEMAYEHU; ASFAW; TIRFIE, 2020).

Figura 2: Diagrama geral do beneficiamento do café.



Fonte: o autor.

Dependendo do método de beneficiamento do café podem ser gerados diferentes tipos de resíduos, entretanto os principais são a casca, a polpa, a mucilagem, o pergaminho, a pele prateada e a água residuária do beneficiamento do café (ARBC) (IJANU; KAMARUDDIN; NORASHIDDIN, 2020; NAVITHA K R, HINA KOUSAR, 2018).

2.2. Água residuária do beneficiamento do café

Estima-se que para cada tonelada de grãos de café beneficiados são produzidas de 5000 a 15000 L de água residuária (WOLDESENBET; WOLDEYES; CHANDRAVANSHI, 2014). A ARBC pode

ser caracterizada como um efluente tóxico de coloração marrom e com forte odor, contendo variadas macromoléculas, como polifenóis, taninos, polissacarídeos e cafeína, que são moléculas consideradas de difícil degradação a partir de processos convencionais de tratamento biológico, e apresentam alta carga orgânica (CHAGAS et al., 2015; NAVITHA; KOUSAR, 2017).

As características físico-químicas da ARBC variam muito, principalmente a depender da proporção de frutos de café beneficiados por litro de água (CAMPOS et al., 2010; PIN et al. 2020). Em termos de demanda química de oxigênio (DQO), de 8480 mg L⁻¹ a 45955 mg L⁻¹, Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), variando de 8005 mg L⁻¹ a 22330 mg L⁻¹, com relação entre a (DBO) e a DQO na faixa de 0,38 – 0,72, além de altos valores de compostos fenólicos totais (CFT), com valores de 45 mg L⁻¹ a 4661 mg L⁻¹ (Tabela 1).

Tabela 1: Caracterizações físico-químicos da ARBC.

Parâmetros (mg.L ⁻¹)	ARBC	Referências
DQO	38416	(PERALTA et al., 2014)
	17244	(ROSSMANN et al., 2012)
	8480–45955	(ALEMAYEHU; ASFAW; TIRFIE, 2020).
	11767-20367	(CAMPOS et al., 2010)
	24300–28500	(SUÁREZ, 2018)
DBO ₅	22330	(PERALTA et al., 2014)
	8005	(ROSSMANN et al., 2012)
	3700–5861	(ALEMAYEHU; ASFAW; TIRFIE, 2020).
	7616–9950	(CAMPOS et al., 2010)
DBO ₅ /DQO	0,56–0,59	(ALEMAYEHU; ASFAW; TIRFIE, 2020).
	0,38–0,72	(CAMPOS et al., 2010)
CFT	241,6–673	(SUÁREZ, 2018)
	4661	(PERALTA et al., 2014)
	133,4	(ROSSMANN et al., 2012)
	45–278	(ALEMAYEHU; ASFAW; TIRFIE, 2020).
pH	3,60–4,28	(SUÁREZ, 2018)
	4,2	(PERALTA et al., 2014)
	4,7	(ROSSMANN et al., 2012)
	3,57–4,21	(ALEMAYEHU; ASFAW; TIRFIE, 2020).
	4,08–5,17	(CAMPOS et al., 2010)
ST	3520–4200	(ALEMAYEHU; ASFAW; TIRFIE, 2020).
SST	2390–2820	
STV	8208	
N	1,5–231,6	(INCAPER, 2012)
P	1,0–23,0	
K	1,5–875,0	
Ca	1,0–94,1	
Mg	1,0–28,0	
Cu	1,0–40,0	
Zn	1,0–44,0	
Mn	1,0–80,0	
Fe	0,3–28,0	

Fonte: o autor.

Uma das grandes problemáticas da descarga dessa água residuária nos corpos hídricos é a coloração (geralmente marrom escura) e o acúmulo de nutrientes que prejudicam o uso da água, além de formar zonas anaeróbias, com liberação de metano, fenóis e ácido sulfídrico, cujo odor desagradável afeta as populações nas imediações. Além da alta concentração de compostos fenólicos que podem ser tóxicos, carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos, e em concentrações acima de 1 mg L^{-1} , afetam a vida aquática (VEERESH et al., 2005), e também podem inibir o crescimento dos microrganismos nos processos biológicos de tratamento (BRUNO; OLIVEIRA, 2008; IJANU; KAMARUDDIN; NORASHIDDIN, 2020; RATTAN et al., 2015).

Dentre as soluções para o tratamento da ARBC a digestão anaeróbia (DA) se destaca, em função da alta concentração de matéria orgânica presente nessa água residuária. Asha e Kumar (2016) verificaram a capacidade de um sistema de reatores em bateladas sequenciais anaeróbio-aeróbio seguido de sedimentação e decantação para degradar água residuária da polpação de café, que apresentava pH ácido (3,92 a 4,99), com DQO e DBO (8320 a 10400 mg L^{-1} e 1600 mg L^{-1} , respectivamente). Mesmo com um tratamento bioquímico, os pesquisadores sugeriram a aplicação de um pré-tratamento a fim de otimizar o processo anaeróbio-aeróbio.

Sengupta et al. (2020) apresentam vários métodos físico-químicos e biológicos para remover os compostos tóxicos das águas residuárias proveniente da cadeia produtiva do café buscando sustentabilidade e viabilidade econômica. Entretanto ainda há necessidade de explorar outros métodos que sejam menos agressivos ao meio ambiente e que tenham um balanço financeiro mais viável. Neste mesmo pensamento Moreira (2021), propôs o uso do tratamento enzimático para a degradação dos compostos tóxicos presentes na água residuária da produção do café solúvel como uma alternativa mais sustentável e viável para remoção de compostos fenólicos.

2.3. Digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia é um processo microbiológico, que ocorre na ausência de oxigênio, com interações enzimáticas e metabólicas sob diferentes tipos de matéria orgânica, possibilitando a reciclagem e recuperação de resíduos, convertendo-os em subprodutos com valores agregados como os bio fertilizantes e biogás, este constituído principalmente de metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2) (CAVALEIRO; ALVES, 2020; KUNZ; STEINMENTZ; AMARAL, 2019). Este processo é realizado por uma comunidade de microrganismos interagindo de forma complexa em sintrofia, em que o produto gerado na etapa anterior é utilizado como substrato na fase seguinte.

A digestão anaeróbia pode ser dividida em quatro etapas (Figura 3), sendo elas: hidrólise, em que são degradadas moléculas de alta massa molecular como os biopolímeros (lipídios, polissacarídeos e proteínas) em moléculas solúveis simples (ácidos graxos de cadeia longa, açúcares e aminoácidos).

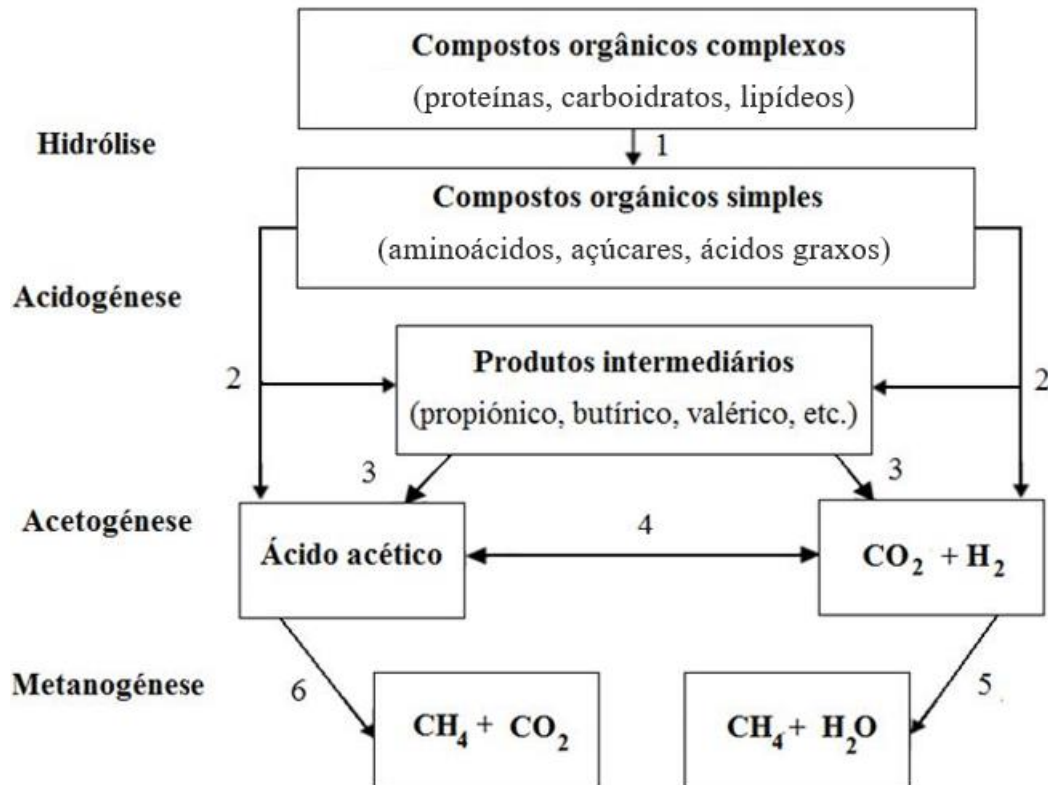
Este processo se dá pela produção de enzimas extracelulares excretadas por bactérias fermentativas hidrolíticas. O tempo decorrido neste processo é dependente do resíduo utilizado, podendo levar horas para carboidratos ou até uma degradação incompleta nos casos da lignina e lignocelulose (KUNZ; STEINMENTZ; AMARAL, 2019; LIU; WHITMAN, 2008; STAMS; PLUGGE, 2009).

Os produtos gerados na etapa de hidrólise são posteriormente utilizados como substrato na acidogênese, em que bactérias fermentativas acidogênicas os metabolizam em ácidos graxos de cadeia curta (ácido acético, butírico, propiônico, fórmico e láctico), álcoois (etanol, metanol, butanol e o glicerol), cetonas, dióxido de carbono e hidrogênio (CAVALEIRO; ALVES, 2020; DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011; LIU; WHITMAN, 2008).

Na terceira etapa (acetogênica) as bactérias acetogênicas consomem os ácidos de cadeia mais longa e álcoois, transformando-os em ácidos fórmicos e acético que contém somente um ou dois átomos de carbono, hidrogênio e dióxido de carbono (CAVALEIRO; ALVES, 2020; DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011; KUNZ; STEINMENTZ; AMARAL, 2019). A acetogênese não é a única via produtora desse ácido, também temos a homoacetogênese onde ocorre a produção de acetato por microrganismos acetogênicos autotróficos a partir de CO_2 e H_2 (CONRAD, 1999).

Por fim tem-se a metanogênese; esta ocorre pela ação de arqueias metanogênicas, um grupo formado por microrganismos metanogênicos hidrogenofílicos que consomem H_2 e CO_2 , arqueias metanogênicas metilotróficas degradam álcool metílico e os microrganismos metanogênicos acetoclásticos que utilizam como substrato o acetato, formando metano e dióxido de carbono (KUNZ; STEINMENTZ; AMARAL, 2019; PINTO, 2017; STAMS; PLUGGE, 2009). Alguns fatores, como: a composição química do efluente, a temperatura, o pH, a acidez e a alcalinidade do meio e, ainda, os nutrientes, podem influenciar a composição do biogás produzido, bem como a sua concentração de metano (HUACCHA CABRERA, 2022).

Figura 3: Etapas do processo de digestão anaeróbia.



Fonte: Modificado de Abad (2015)

Ainda substâncias tóxicas ou inibitórias a digestão anaeróbia que podem estar presentes na matéria orgânica a ser degradada, substâncias que muitas vezes, são responsáveis por favorecerem o desbalanceamento entre microrganismos metanogênicos e acidogênicos. Podendo gerar um desequilíbrio e redução da eficiência de reatores anaeróbios (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008; KROEKER et al., 1979). Dentre os compostos que podem agir como inibidores da digestão anaeróbia, temos os compostos fenólicos e aromáticos nitrogenados cíclicos (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008; TOMMASO et al., 2015). A aplicação de pré-tratamentos na digestão anaeróbia, pode ser usado para reduzir o tempo de hidrólise de substratos recalcitrantes, como os compostos lignocelulósicos, fenólicos, e aumentar a biodegradabilidade das águas residuárias, potencializando a produção de biogás (LI et al., 2020).

2.3.1. Digestão anaeróbia da água residuária do beneficiamento do café

Pesquisas vêm sendo desenvolvidas na última década a fim de otimizar o processo de DA a partir da ARBC (BEYENE et al., 2014; CRUZ-SALOMÓN et al., 2017; SELVAMURUGAN; DORAISAMY; MAHESWARI, 2010). Campos et al. (2010), demonstram a viabilidade do tratamento anaeróbio com geração de biogás a partir da ARBC, devido aos elevados potenciais de compostos orgânicos nestas águas residuárias.

Suárez (2018), avaliou um sistema de reator anaeróbio de fluxo ascendente em dois estágios, e uma série de três reatores anaeróbios horizontais de leito fixo, no tratamento da ARBC. Os dois sistemas proporcionaram condições favoráveis para a remoção da matéria orgânica com simultânea produção de metano. No entanto, foi necessário o pós-tratamento químico baseado na reação de Fenton, para remoção de sólidos totais e compostos fenólicos.

Pin et al. (2020), estudaram o potencial metanogênico da ARBC, tendo remoção de DQO de 16% a 77%, com maior teor de metano observado de 11,4%, os autores relatam que nos ensaios com baixos valores de redução indicam que compostos orgânicos tóxicos que não se degradam facilmente podem estar presentes na ARBC.

Por outra via, os fungos são capazes de crescer sob condições de estresse ambiental, as quais geralmente limitam o crescimento bacteriano, além de degradarem compostos recalcitrantes (MAGAN; FRAGOEIRO; BASTOS, 2010; SILVA, 2022). No entanto, no que diz respeito ao pré-tratamento os fungos ligninolíticos, esses dependem da presença de açúcares para o seu metabolismo, resultando em uma diminuição da recuperação do produto final, como verificado por Silva (2022). Além dessa desvantagem, o pré-tratamento com fungos podem ser caracterizados por uma lentidão intrínseca. Por outra via, os pré-tratamentos enzimático possibilitam a degradação dos compostos recalcitrantes, sem consumir os potenciais substratos para digestão anaeróbica. Além de maiores velocidades de reação do que em processos microbiológicos, demandando um investimento temporal consideravelmente menor (FARACO et al. 2009). A sinergia da combinação de processos biológicos e enzimáticos pode aumentar a biodegradabilidade dos compostos recalcitrantes tanto para aumento da produção de metano quanto para disposição final mais segura desta água residuária (PRABAKAR et al., 2018).

2.4. Pré-tratamento enzimático

Os trabalhos apontaram para a possibilidade de produção de metano digerindo tal água residuária (BEYENE et al., 2014; CRUZ-SALOMÓN et al., 2017; SELVAMURUGAN; DORAISAMY; MAHESWARI, 2010). Entretanto, Alemayehu, Asfaw e Tirfie (2020), Novita (2016) e Pin et al. (2020) verificaram elevado potencial tóxico do material sob o consórcio anaeróbio que pode ser justificado pela presença de compostos tóxicos fenólicos. Sendo assim, é evidente a necessidade de buscar pré-tratamentos que possam degradar inibidores da DA.

Peralta et al. (2014), ressalta a importância da degradação dos compostos tóxicos na ARBC. Neste estudo, avaliaram a oxidação catalítica por peróxido de hidrogênio de compostos fenólicos da ARBC, tendo uma conversão total de fenol de 62,4% após 96 h. No entanto, Mosquera et al. (2019) realizaram um estudo sobre a oxidação avançada com peróxido de hidrogênio e radiação UV, como pré-

tratamento da digestão anaeróbia da água residuária da produção do café solúvel, e não tiveram êxito utilizando métodos físico-químicos na melhoria da DA.

Por outra via, a utilização do pré-tratamento enzimático vem despertando cada vez mais as comunidades acadêmica e industrial, pois estes biocatalizadores podem potencializar a degradação de biopolímeros de difícil degradação e de compostos inibitórios, assim favorecendo o crescimento dos microrganismos e melhorando o desempenho da DA (DEWIL et al., 2008; JUNIOR, 2019).

As enzimas ligninolíticas vêm sendo utilizadas para o pré-tratamento de material lignocelulósico a fim de aumentar a produção de metano advindo na DA (ATELGE et al., 2020). Schroyen et al. (2014) relataram o pré-tratamento de palha de milho com lacase e peroxidase com melhorias na produção de metano de 25 e 17%, respectivamente. Hom-Diaz et al. (2016), avaliaram a aplicação de um pré-tratamento em biomassa de microalgas, com extrato enzimático bruto do fungo *Trametes versicolor* e lacase comercial (100 U L⁻¹). Para um tempo de exposição de 20 minutos os autores obtiveram um aumento de produção de metano de 74% para o extrato enzimático, e de 20% para lacase comercial. Essa diferença foi atribuída possivelmente à presença de outras moléculas excretadas pelo fungo. Os trabalhos descritos demonstram a importância do uso da lacase de basidiomicetos na otimização da produção de metano por DA.

2.5.Fungos basidiomicetos - *Pleurotus ostreatus*

No Filo Basidiomycota, do Reino Fungi, há dois grandes grupos de decompositores da madeira, classificados como os causadores da podridão branca e podridão parda. Os fungos causadores da podridão parda são responsáveis por metabolizar a celulose e polioeses, mas estes não têm aparato enzimático para a degradação completa da lignina, conseguindo apenas oxidar parcialmente a lignina, deixando um resíduo amorfo, marrom e quebradiço de coloração pardacenta (CASTRO et al., 2018; SILVA, 2020; WENG; PENG; HAN, 2021). Enquanto os fungos da podridão branca são conhecidos por serem eficientes em degradar a celulose, poliose e lignina até a mineralização, uma vez que são transformados completamente em CO₂ e H₂O. Esses fungos podem ser classificados em simultâneo, quando degradam todos os componentes da madeira; e em seletivos, quando degradam a lignina para obter acesso aos polímeros de carboidratos das células vegetais de parede (PINTO, 2020; WENG; PENG; HAN, 2021; MAGALHÃES et al., 2016; SCHWARZE, 2007).

A produção de um complexo enzimático ligninolítico apropriado para a degradação de lignina também é capaz de atuar na degradação de diversos compostos orgânicos (DHOUIB et al., 2006). Devido a ampla possibilidade de aplicação das enzimas ligninolíticas, os fungos da podridão branca vêm sendo usados no tratamento ambiental, como herbicida atrazina (LOPES et al., 2020), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (POZDNYAKOVA et al., 2018) e compostos fenólicos

(HUBLIK; SCHINNER, 2000; KŘESINOVÁ et al., 2018; ZERVA et al., 2017). Este potencial de aplicação é decorrente da produção do complexo ligninolítico contendo enzimas como Lacase (EC 1.10.3.2), Lignina Peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14) e Peroxidase dependente do Manganês (MnP, EC 1.11.1.13), além das enzimas acessórias como a Peroxidase versátil (EC 1.11.1.16), glioxal oxidase (EC 1.2.3.5), aril álcool oxidase (EC 9 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; HEINZ, 2017; HERNANÁNDEZ-SÁENZ et al., 2020).

2.6. Enzimas ligninolíticas

Os fungos da podridão branca são reconhecidos pela alta produtividade de enzimas ligninolíticas. Estudos tem demonstrado a relevância biotecnológica, biocatalítica e aplicabilidade industrial das enzimas da classe oxidorreductase, grupo ao qual as enzimas ligninolíticas pertencem (DAMASCENO, 2016). Apesar disso, estima-se que, somente em 2019, quase 30 mil toneladas de enzimas ou preparações enzimáticas tenham sido importadas pelo Brasil, contra 9,3 mil toneladas exportadas. Evidenciando a necessidade da busca por novas tecnologias para aumento da produção de enzimas em nível nacional (EMBRAPA, 2020).

A produção das enzimas ligninolíticas pode ser influenciada por diversos fatores como a composição do meio de crescimento, razão carbono e nitrogênio, fontes de carbono facilmente metabolizáveis (BETTIN et al., 2014), natureza química do substrato, temperatura, tempo de cultivo, pH, luminosidade e aeração (BAPTISTA et al., 2012; SINGH; GUPTA, 2020), ação dos indutores enzimáticos como o sulfato de cobre, misturas fenólicas, siringaldazina, vanilina, ácido benzoico, ácido gálico e o ácido tânico (SENTHIVELAN; KANAGARAJ; PANDA, 2016; YANG et al., 2017). Além da atuação de surfactantes, como tween 80 que pode aumentar a oxidação e despolimerização da lignina (HOFRICHTER, 2002). Evidenciando a necessidade de estudos para a otimização da produção de enzimas ligninolíticas (FARIA et al., 2015).

As principais enzimas do complexo ligninolítico são as enzimas oxidorreductases: lacase, manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP), que numa atuação com compostos de baixa massa molar, promovem a degradação da lignina. A maioria dos basidiomicetos produzem lacase e MnP, enquanto LiP apresenta uma menor distribuição (MOREIRA NETO, 2012; VALDERRAMA et al., 2003; SILVA et al., 2008)

2.6.1. Peroxidases

As Peroxidases são hemoproteínas que fazem parte do grupo de enzimas oxidativas, que oxidam substratos orgânicos tendo como aceitador de elétrons peróxido de hidrogênio. Entre as peroxidases produzidas por basidiomicetos ligninocelulolíticos destacam-se a lignina peroxidase (LiP) e a

peroxidase dependente do manganês (MnP) e peroxidase versátil (VP), que apresenta características híbridas entre a LiP e a MnP (MOREIRA et al., 2005; BILAL et al., 2017; HEINZ, 2017; HERNANÁNDEZ-SÁENZ et al., 2020). Apesar da dependência do H₂O₂ extracelular para as atividades das peroxidases e outras reações ligninolíticas, esse são gerados por álcool aril oxidases, glicoxal oxidase, glicose-1-oxidase e glicose-2-oxidase (MOREIRA NETO, 2012)

2.6.1.1.Ligninas Peroxidases

As Ligninas Peroxidases, contém ferroprotoporfirínico IX (heme) como grupo prostético, com massa molar de 38 a 43kDa, requerem peróxido de hidrogênio para a ação catalítica e podem ter como indutores álcool veratrílico e 2-cloro1,4 dimetoxibenzeno. Estas enzimas são capazes de despolimerizar a lignina oxidativamente pelo mecanismo de transferência de um elétron, mas conseguem catalisar uma variedade de compostos fenólicos (KOMURA, 2009; KUMAR et al., 2021; RICACZESKI, 2020).

A LiP é um importante componente do sistema ligninolítico dos fungos, pois apresenta o maior potencial redox. Segundo Aguiar e Ferraz (2011), as enzimas ligninolíticas podem ser ordenadas de acordo com suas capacidades oxidativas: LiPs > MnPs > Lacases. Porém, nem todos os fungos ligninolíticos a secretam, a depender das condições de cultivo (BALLAMINUT, 2016).

2.6.1.2.Manganês Peroxidase

Já as peroxidases dependentes de Manganês ou Manganês peroxidases, são hemoproteínas glicosiladas, dependentes de peróxido de hidrogênio, com massa molar média 45 a 47 kDa e ponto isoelétrico de 3 a 5 (JANUSZ et al., 2013; SINGH; SINGH; SINGH, 2015). A MnP catalisa a oxidação de Mn²⁺ à Mn³⁺, os íons Mn³⁺ gerados neste processo são geralmente estabilizados pelos ácidos málico ou oxálico. A síntese da MnP pode ser regulada por fatores ambientais, como temperatura, pH e concentrações de nitrogênio e carbono e pela presença de indutores como Mn (II), Cu (II) (WONG, 2009). O Mn³⁺ complexado com um ácido orgânico atua como agente primário na clivagem da lignina. A atividade não específica da MnP sobre compostos aromáticos é de grande importância na decomposição de tais compostos, visto que catalisa a oxidação de vários fenóis monoaromáticos e corantes aromáticos (YANG et al., 2016).

2.6.2. Fenoloxidasas

Fenoloxidasas são oxidoredutases que catalisam oxidação de compostos fenólicos. São subdivididas em duas subclasses, tirosinases e lacases, tendo como acceptor terminal de elétrons o oxigênio molecular, diferente das peroxidases, não necessitam da adição de peróxido de hidrogênio (SAITO et al., 2004 ; DURÁN e ESPOSITO, 2000). As fenoloxidasas apresentam baixo potencial

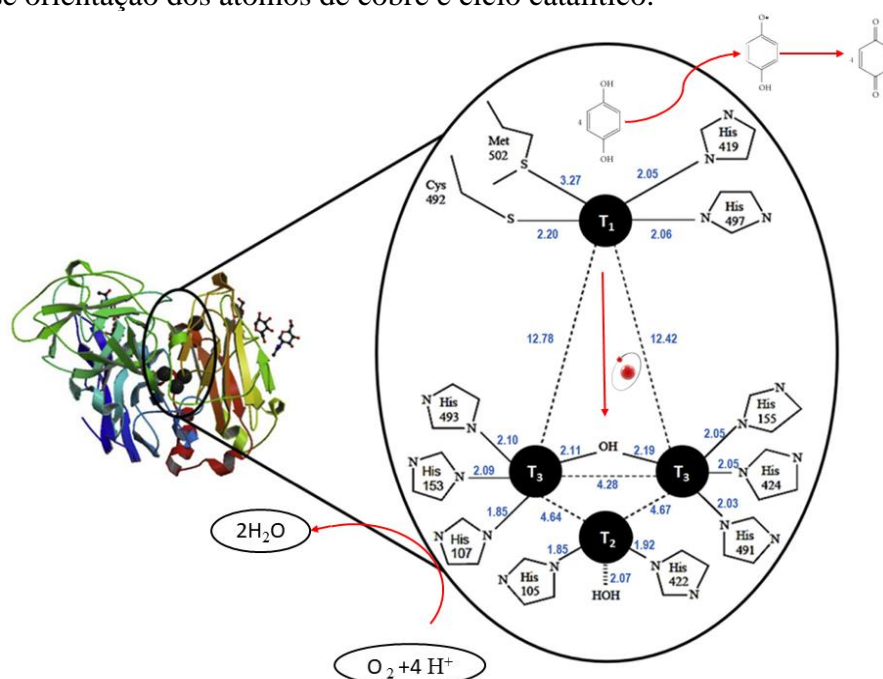
redox, permitindo oxidação direta apenas das unidades fenólicas da lignina, uma forma de ampliar a atividade catalítica da lacase para estruturas não fenólicas, é o uso de mediadores redox (BARRECA et al., 2003; MARTINEZ et al., 2005; PARRA GUARDADO et al., 2019; SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020).

2.6.2.1. Lacase

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 (1985) (MAYER; STAPLES, 2002), 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 (COELHO et al., 2019).

Essas enzimas são capazes de catalisar a oxidação de vários compostos aromáticos, principalmente fenóis, e são enzimas conhecidas como multicobre oxidases, que possuem de três a quatro átomos de cobre distribuídos entre diferentes sítios de ligação (Figura 4). As propriedades de cada um dos sítios de cobre conferem a eles um importante papel no mecanismo catalítico da enzima (DARONCH et al., 2020; SINGH; GUPTA, 2020). Seus cobres são classificados em três tipos: Cobre Tipo 1 (cobre azul) que catalisa a transferência de elétron do substrato e confere a cor azul típica à proteína, os elétrons extraídos são transferidos por meio de uma sequência fortemente conservada do tripeptídeo His-Cys-His, aos cobres T2 e T3 (receptores de elétrons), onde o oxigênio molecular é reduzido à água (REN et al., 2021; SINGH; GUPTA, 2020).

Figura 4: Lacase orientação dos átomos de cobre e ciclo catalítico.



Fonte: Modificado de Rivera-Hoyos., et al (2013)

A inespecificidade da lacase permite que ela seja aplicada em diferentes processos industriais, que vão desde a produção de bebidas e alimentos, até a biorremediação de solos e efluentes (BEHBAHANI; NOSRATI; MORADI, 2020), como na degradação de efluentes de indústria têxtil (NAVADA; KULAL, 2020), papelarias (SHARMA et al., 2020) e indústria farmacêutica (MASJOURI et al., 2021). Entretanto, devido ao potencial redox relativamente baixo ($\leq 0,8$ V), em comparação com outras enzimas ligninolíticas, estas enzimas podem ter a ação limitada a somente oxidação da parte fenólica da lignina (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020).

Para ampliar a atividade catalítica da lacase para estruturas não fenólicas da lignina e de poluentes recalcitrantes, tem sido utilizado mediadores redox (BARRECA et al., 2003; PARRA GUARDADO et al., 2019). Os mediadores redox também são produzidos como resultado do metabolismo secundário dos basidiomicetos e são excretados para o meio extracelular antes das enzimas iniciando o processo de degradação da lignina. O mediador é oxidado pela enzima e se difunde no substrato oxidando-o, voltando, em seguida, à sua condição inicial (WESENBERG et al., 2003).

2.7 Expressão e produção de Lacase

A produção das enzimas ligninolíticas pode ser influenciada por diversos fatores como a composição do meio de crescimento, razão carbono e nitrogênio, fontes de carbono facilmente metabolizáveis (BETTIN et al., 2014), natureza química do substrato, temperatura, tempo de cultivo, pH, luminosidade e aeração (BAPTISTA et al., 2012; SINGH; GUPTA, 2020), ação dos indutores enzimáticos como o sulfato de cobre, misturas fenólicas, siringaldazina, vanilina, ácido benzoico, ácido gálico e o ácido tânico (SENTHIVELAN; KANAGARAJ; PANDA, 2016; YANG et al., 2017). Assim, estudos para a otimização da produção de enzimas ligninolíticas precisam ser realizados (FARIA et al., 2015). Ainda a produção extracelular de enzimas ligninolíticas dispensa o uso de técnicas de extração intracelular, que geralmente promovem perda de rendimento. Em meio líquido a extração de enzimas a partir do cultivo é ainda mais fácil e permite a extração total das enzimas extracelulares produzidas (BARR; AUST, 1994).

A produção de enzimas fúngicas possui inúmeras vantagens. No entanto, a produção é muitas vezes inviável, devido ao alto custo dos meios de cultura utilizados, que representa aproximadamente 30- 40% do custo (RIGO et al., 2021; SAMPAIO; HADDAD; WIENDL, 2018). Neste sentido, a biotecnologia pode ser uma ferramenta muito importante para o desenvolvimento de técnicas de reutilização de resíduos agroindústrias como fonte de produção para bioprodutos de valor agregado (LEITE et al., 2021). Salazar et al. (2019) destacam que os resíduos agroindústrias podem ser utilizados como fonte de nutrientes para a fermentação microbiana, devido à sua riqueza orgânica, baixo custo e ampla disponibilidade. Ainda os compostos fenólicos com estrutura semelhante à dos derivados de lignina podem ser usados para aumentar essa produtividade da lacase, e o uso de resíduos

agroindustriais contendo indutores dessa enzima é uma estratégia alternativa interessante (GOLVEIA et al., 2021).

Moreira (2021), avaliou a água residuária da produção do café solúvel na concentração de 10% (1g DQO.L⁻¹) como um potencial substrato para produção de lacase por *P. ostreatus*. Em seu trabalho observou que a água residuária induziu a produção de lacase, com aumento de 22,3% em comparação ao meio Kirk modificado (meio sintético).

Na polpa do fruto do café já foram identificados alguns compostos fenólicos como ácido clorogênico, ácido caféico e taninos (CORRÊA et al., 2020; RATTAN et al., 2015). Já na ARBC foram identificados compostos fenólicos como: ácido caféico, catequina e galocatequina (Torres et al., 2016). A ARBC mostra-se como uma alternativa promissora tanto para produção de lacase como a degradação de estrutura fenólicas e não fenólicas presentes na ARBC, não unicamente devido a sua ação catalítica, mas também, pela possibilidade da ARBC possuir compostos que podem agir como mediadores enzimáticos para melhor biodegradação enzimática.

2.8 Aplicação da lacase na degradação de compostos fenólicos e não fenólicos

Devido à natureza inespecífica do sistema enzimático dos fungos causadores da podridão branca, possibilita a estes degradem não somente a lignina, como também compostos fenólicos e uma grande variedade de compostos químicos.

O uso de fungos de podridão branca vem sendo investigado no tratamento da água residuária da produção do azeite de oliva, uma água residuária com alta concentração de fenólicos, assim como a ARBC. Ntougias et al. (2015), avaliaram quarenta e nove fungos da podridão branca, quase todos os fungos tiveram degradação de fenólicos totais superiores a 60% e mais de 70% de descoloração. Zerva et al. (2017) relatam remoções de compostos fenólicos e coloração de até 90% da água residuária da produção do azeite de oliva.

Silva (2022), obteve uma remoção de até 70,99% de composto fenólicos e 63,53% de descoloração, no pré-tratamento fúngico utilizando *P. ostreatus* da digestão anaeróbia da água residuária da produção do café solúvel (ARCS). Entretanto foi observado uma menor produção de metano após o pré-tratamento. Uma das possibilidades que o autor levanta é que após o pré-tratamento, o fungo pode ter metabolizado açúcares e polímeros, que serviriam de fonte de nutrição da microbiota anaeróbia. Blika (2009) observou o mesmo achado, no pré-tratamento da água residuária da produção do azeite de oliva, tendo uma redução de 75% na concentração de fenólicos, no entanto ocorreu uma menor produção de metano atribuído a redução de 30% na concentração de matéria orgânica.

Por outra via os pré-tratamentos enzimático possibilitam a degradação dos compostos fenólicos, sem consumir os potenciais substratos para digestão anaeróbica. Moreira (2021), produziu extrato

enzimático utilizando a própria ARCS como substrato para o fungo na concentração de 10%. Posteriormente, aplicou o extrato enzimático bruto no tratamento da ARCS, empregando uma concentração de 70%, resultando em redução de 32,3% na concentração de compostos fenólicos.

Estes trabalhos demonstram que o uso do fungo *P. ostreatus*, tem grande potencial para produção enzimática em resíduos agroindustriais como a ARBC, bem como das enzimas produzidas por este fungo no pré-tratamento da ARBC para degradação de compostos fenólicos (MOREIRA, 2021; SILVA, 2022; ZERVA et al., 2017).

3 HIPÓTESE GERAL:

O fungo basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* será capaz de crescer e produzir lacase, em presença da ARBC, e a utilização do extrato enzimático bruto contendo lacase produzido pelo fungo possibilitará a degradação dos componentes fenólicos da ARBC, com consequente redução de toxicidade e melhoria do desempenho no processo de DA.

4 OBJETIVOS

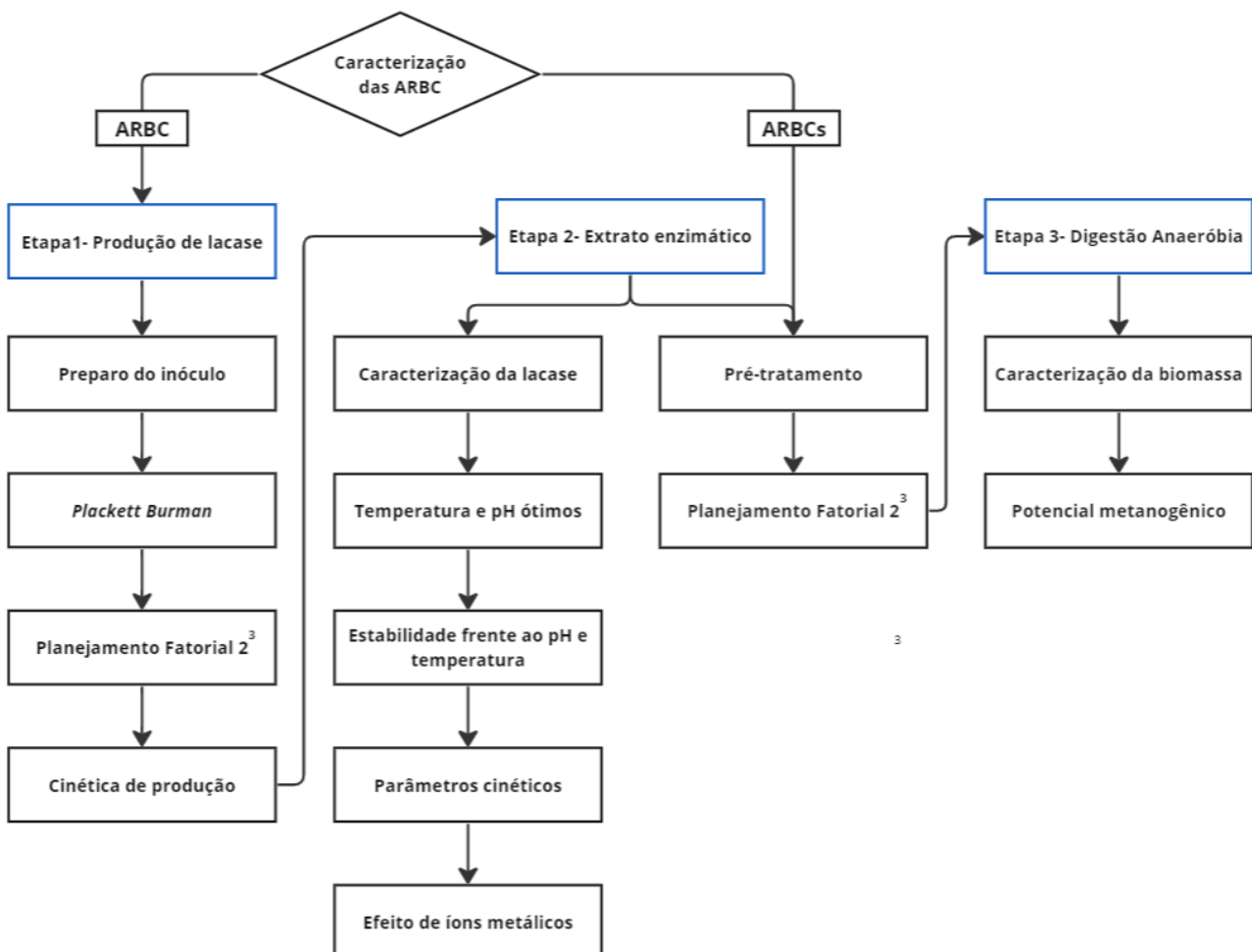
- Selecionar variáveis que induzam a produção de lacase por *P. ostreatus* em meio líquido tendo a ARBC como substrato, utilizando delineamentos experimentais sequenciais.
- Avaliar o potencial do extrato enzimático do fungo basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* em degradar componentes fenólicos do ARBC para melhoria da eficiência na produção de metano por meio da DA.

5. METODOLOGIA

No presente estudo duas águas residuárias foram utilizadas, uma a água residuária do beneficiamento do café (ARBC), coletada na Fazenda Santa Alina em São Sebastião da Grama – SP e uma água residuária do beneficiamento do café simulada em laboratório (ARBCs). A simulação da ARBCs foi necessária pois a coleta foi realizada no final da safra de 2022 e na ocasião, poucos frutos foram beneficiados. Isso ocasionou baixa concentração de compostos fenólicos totais. Dessa forma, para o estudo do pré-tratamento em meio líquido foi necessária a preparação da ARBCs, a qual foi acrescida solução de despulpamento de café realizado em bancada. Ambas as águas residuárias foram caracterizadas em parâmetros físico-químicos. O presente estudo foi dividido em quatro etapas (Figura 5). A primeira etapa (Produção de lacase) foi realizada com a ARBC coletada, e foi iniciada com o preparo do inóculo, avaliado em meio sólido com percentuais crescentes de ARBC, a melhor

condição foi utilizada para preparar o inóculo aplicado nos ensaios em meio líquido com ARBC, por meio de delineamentos experimentais, para seleção de variáveis significativas (*Plackett-Burman*) e obtenção da melhor condição de produção de lacase (Planejamento Fatorial 2^3). A melhor condição experimental foi usada para o estudo da cinética de produção de lacase. Na segunda etapa o extrato enzimático bruto produzido por *P. ostreatus* no pico de produção de lacase foi utilizado para caracterização da lacase, em termos de temperatura e pH ótimos, estabilidade, inibição por íons metálicos e determinação de parâmetros cinéticos. Na terceira etapa, o mesmo extrato enzimático foi conduzido para o pré-tratamento da digestão anaeróbia da ARBCs, por meio de um Planejamento Fatorial 2^3 , para obtenção da melhor condição de remoção de compostos fenólicos totais. Por fim, na quarta etapa foi avaliado o rendimento energético do processo de digestão anaeróbia da ARBCs pré-tratada em relação a água residuária não tratada.

Figura 5: Resumo da metodologia.



Fonte: o autor.

5.1. Produção da água residuária do beneficiamento de café simulada

A ARBCs foi produzida de acordo com Suárez (2018), por meio do despolpamento manual de aproximadamente 1 L de grãos de café, e posterior demolho da biomassa por 24 horas em dois litros de água destilada. O líquido foi subsequentemente filtrado (malha de 2 mm) para remoção das partículas e então combinado com a ARBC coletada na Fazenda Santa Alina em proporção para a obtenção de concentração de compostos fenólicos totais semelhante a aquele efluente.

5.2. Caracterização da água residuária do beneficiamento de café

A fim de caracterizar ambas as águas residuárias do beneficiamento de café foram avaliados os seguintes parâmetros: matéria orgânica expressa em DQO, pH, Sólidos Totais (ST), Sólidos Totais Voláteis (STV), Sólidos Totais Fixos (STF), compostos fenólicos totais, expressos em equivalentes de ácido gálico e açúcares totais.

5.3. Estudo da produção de lacase em ARBC por *P. ostreatus*

5.3.1. Inóculo de Basidiomiceto

O basidiomiceto *P. ostreatus* está depositado na Coleção de Cultura de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria de meio Ambiente, infraestrutura e logística do Estado de São Paulo, sob a numeração 2347. O isolado foi mantido por repiques sucessivos em BDA a $28^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C durante 7 dias. Discos de crescimento micelial em meio BDA de 0,7 cm de diâmetro foram utilizados como inóculo inicial do estudo.

5.3.2. Estudo do preparo do inóculo de *P. ostreatus*. em meio solido em ARBC

5.3.2.1. Tolerância do *P. ostreatus*. em meio solido e indução da produção do complexo ligninolítico

Os ensaios de tolerância em meio sólido em ARBC foram conduzidos utilizando placas de Petri para avaliar a capacidade do fungo *P. ostreatus* de crescer em concentrações crescentes da ARBC, para a indução da produção do complexo ligninolítico. O meio sólido foi constituído de ARBC, diluída convenientemente em água destilada para alcançar as concentrações percentuais de 25%, 50% 75% e 100% e ágar (18g L^{-1}). Dois tipos de tratamentos foram avaliados: a. com esterilização (autoclavagem, 121°C a $1\text{atm}/15\text{min}$), e; b. sem esterilização. Após a inoculação, as placas de Petri foram incubadas a $28^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C. O crescimento radial das culturas foi avaliado pela medida do crescimento micelial ao longo do tempo. A densidade micelial foi avaliada por meio de escala subjetiva, classificada em: + micélio pouco adensado, presença de hifas espaçadas e finas; ++

micélio mediantemente adensado e +++ micélio fortemente adensado (SILVA al., 2010). A melhor condição de crescimento foi usada para produção de inóculo para a produção de lacase em meio líquido.

5.3.2.2. Descoloração da ARBC em meio sólido por *P. ostreatus*

Os ensaios em meio sólido com 100% da ARBC tiveram a variação de coloração, durante o período de incubação de *P. ostreatus*, caracterizada em termos quantitativos de cor usando um colorímetro (Hunterlab ColorQuest, XE) com o sistema de cores CIELAB. Fornecendo os parâmetros L^* , a^* e b^* , em que os valores de L^* indicam a luminosidade da amostra, variando entre 0 (preto) a 100 (branco), os valores de a^* representam tons de vermelho ($+a^*$) e verde ($-a^*$), e os valores de b^* representam tons de amarelo ($+b^*$) e azul ($-b^*$). A partir dessas coordenadas é possível realizar o cálculo de croma (C^*) (Equação 1), e com os valores do ΔC , ΔL^* , descreve-se as diferenças de cores em termos de luminosidade e croma. Os valores de ΔC^* e ΔL^* representam cores claro ($+\Delta C^*$ e $+\Delta L^*$), intenso ($+\Delta C^*$ e $-\Delta L^*$), pálido ($-\Delta C^*$ e $+\Delta L^*$) e escuro ($-\Delta C^*$ e $-\Delta L^*$).

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

5.3.3. Produção de lacase em ARBC por *P. ostreatus* em meio líquido

Para a produção de lacase por *P. ostreatus* em meio líquido foram utilizados frascos de 250 mL, contendo 100mL de meio de cultivo, discos de 0,7 cm de diâmetro da melhor condição do teste de tolerância foram utilizados como inóculo. Os ensaios foram incubados a 28°C em meios de cultura contendo ARBC, após a incubação os frascos foram filtrados para determinação das variáveis dependentes.

5.3.3.1. Produção de lacase - Delineamento Experimental *Plackett-Burman*

O estudo em meio líquido foi realizado pela aplicação de delineamentos experimentais sequenciais, sendo o Plackett-Burman (PB) utilizado a fim de identificar os fatores mais significativos no início do processo (PLACKETT; BURMAN, 1946). As variáveis independentes foram estudadas em dois níveis (-1 e +1), (tabela 2) cuja matriz está apresentada na Tabelas 3. As variáveis dependentes avaliadas foram: atividade de lacase, produção de biomassa e remoção de DQO. A significância de cada variável foi determinada pela aplicação do teste *t* de Student em nível de significância de 95%. As análises estatísticas foram realizadas com o software *Statistica* (Versão 13.5.0.17). A água residuária foi diluída em água destilada para determinação das concentrações de ARBC em estudo. Como controle, foram feitos ensaios sem inoculação. Os ensaios foram feitos em triplicata e mantidos a 28°C durante 15 dias (SILVA, 2022).

Tabela 2: Delineamento Experimental *Plackett-Burman* produção de lacase em ARBC - valores inferiores e superiores das variáveis codificadas

Variáveis	(-1)	(0)	(+1)
Sulfato de Cobre (mM)	0	0,5	1
Sulfato de Manganês (mM)	0	0,5	1
óleo de Soja (%)	0	0,5	1
Agitação (rpm)	0	60	120
ARBC (%)	80	90	100
pH	4	5	6
Discos de crescimento micelial (unidade)	3	5	7

Tabela 3: Matriz do Delineamento Experimental Plackett & Burman produção de lacase em ARBC.

Ensaio	Variáveis independentes						
	CuSO ₄ (mM)	MnSO ₄ (mM)	óleo de Soja (%)	Agitação (rpm)	ARBC (%)	pH	Discos (unidades)
1	(+1) 1,0	(-1) 0,0	(+1) 1,0	(-1) 0,0	(-1) 80	(-1) 4,0	(+1) 7
2	(+1) 1,0	(+1) 1,0	(-1) 0,0	(+1) 120	(-1) 80	(-1) 4,0	(-1) 3
3	(-1) 0,0	(+1) 1,0	(+1) 1,0	(-1) 0,0	(+) 100	(-1) 4,0	(-1) 3
4	(+1) 1,0	(-1) 0,0	(+1) 1,0	(+1) 120	(-1) 80	(+1) 6,0	(-1) 3
5	(+1) 1,0	(+1) 1,0	(-1) 0,0	(+1) 120	(+) 100	(-1) 4,0	(+1) 7
6	(+1) 1,0	(+1) 1,0	(+1) 1,0	(-1) 0,0	(+) 100	(+1) 6,0	(-1) 3
7	(-1) 0,0	(+1) 1,0	(+1) 1,0	(+1) 120	(-1) 80	(+1) 6,0	(+1) 7
8	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(+1) 1,0	(+1) 120	(+) 100	(-1) 4,0	(+1) 7
9	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(+1) 120	(+) 100	(+1) 6,0	(-1) 3
10	(+1) 1,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(+) 100	(+1) 6,0	(+1) 7
11	(-1) 0,0	(+1) 1,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(-1) 80	(+1) 6,0	(+1) 7
12	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(-1) 80	(-1) 4,0	(-1) 3
PC1	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 60	(0) 90	(0) 5,0	(0) 5
PC2	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 60	(0) 90	(0) 5,0	(0) 5
PC3	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 60	(0) 90	(0) 5,0	(0) 5

Legenda: PC: ponto central; Discos: Discos de crescimento micelial (un.)

5.3.3.2. Delineamento experimental – Planejamento Fatorial

Na intenção de otimizar a produção enzimática, as variáveis ARBC, Sulfato de cobre (CuSO₄) e Sulfato de manganês (MnSO₄), selecionadas no Delineamento Experimental - Plackett & Burman, foram submetidas a um planejamento fatorial 2³ composto por 11 tratamentos, sendo 8 tratamentos fatoriais (+1 e -1) e 3 pontos centrais. As variáveis com os respectivos níveis e a matriz do planejamento experimental estão apresentadas nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. As variáveis dependentes avaliadas foram: Atividade de lacase e remoção de DQO. Os efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes, bem como a interação entre elas, foram avaliados pelo

software *Statistica* (Versão 13.5.0.17). Os ensaios foram realizados em triplicata e mantidos no pH 4 a 28°C e ARBC em 80%.

Tabela 4: Níveis do planejamento experimental - Planejamento Fatorial 2³ produção de lacase em ARBC.

Variáveis independentes	-1	0	+1
Agitação (rpm)	80	100	120
Sulfato de cobre (mM)	0,8	1,0	1,2
Sulfato de manganês (mM)	0,8	1,0	1,2

Tabela 5: Matriz do Delineamento Experimental – Planejamento Fatorial 2³ produção de lacase em ARBC.

Ensaio	Variáveis independentes		
	Sulfato de cobre (mM)	Sulfato de manganês (mM)	Concentração de ARBC (%)
1	(-1) 0,8	(-1) 0,8	(-) 80
2	(+1) 1,2	(-1) 0,8	(-) 80
3	(-1) 0,8	(+1) 1,2	(-) 80
4	(+1) 1,2	(+1) 1,2	(-) 80
5	(-1) 0,8	(-1) 0,8	(+) 120
6	(+1) 1,2	(-1) 0,8	(+) 120
7	(-1) 0,8	(+1) 1,2	(+) 120
8	(+1) 1,2	(+1) 1,2	(+) 120
9PC	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 100
10PC	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 100
11PC	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 100

5.3.3.3. Cinética de produção de lacase por *P. ostreatus*

A melhor condição experimental para a produção de lacase obtida no planejamento fatorial 2³ foi usada para o estudo da cinética de produção de lacase por *P. ostreatus*. As variáveis analisadas foram: biomassa fúngica, atividade de lacase, concentração de matéria orgânica expressa em DQO, pH e concentração de carboidratos totais. Os ensaios foram avaliados durante 30 dias, a cada três dias, uma alíquota, 1% do volume útil foi retirada, respeitando a retirada de no máximo 5% para cada frasco. Os ensaios foram realizados em triplicata e foram mantidos no pH 4 a 28°C e com concentração de ARBC em 80%.

5.4. Caracterização da atividade de lacase produzida por *Pleurotus ostreatus*

O extrato enzimático obtido no pico de produção de lacase da cinética após filtração, foi utilizado para a caracterização físico-química da atividade da lacase tendo o ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonato) como substrato, quanto aos parâmetros cinéticos, íons metálicos, pH ótimo, temperatura ótima e estabilidade ao pH e temperatura, por meio da incubação de 1 mL de extrato enzimático em presença de 1 mL de soluções tamponantes McIlvaine (McILVAINE, 1921), para seleção das melhores condições na aplicação do extrato bruto no pré-tratamento da ARBC. Os testes foram realizados em triplicata.

5.4.1.1. Determinação da temperatura e do pH ótimos de reação

A determinação do pH ótimo foi realizado no intervalo de pH de 4,0 a 7,0, incubados na temperatura de 25°C. A temperatura ótima foi determinada pela incubação do extrato enzimático nas temperaturas de 20 a 80°C, no pH ótimo. Ambos incubados durante 5 minutos, seguida pela determinação da atividade de lacase

5.4.1.2. Determinação da estabilidade térmica e ao pH

A determinação da estabilidade frente ao pH foi realizado por meio da incubação nos pHs 4,5 (pH próximo da ARBC), 6,0 (pH ótimo da lacase) e 7,0 (pH ótimo para DA), os ensaios foram mantidos na temperatura de 25°C. A estabilidade térmica foi realizada por meio da incubação em banho-maria nas temperaturas de 25, 40, 50 e 60°C, os ensaios foram realizados no pH ótimo. Ambas as estabilidades foram verificadas nos intervalos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 72, 96, 120 e 144h, pela determinação da atividade de lacase.

5.4.1.3. Determinação dos parâmetros cinéticos

O efeito da concentração de ABTS na atividade da enzima foi avaliado na faixa de 0,1 a 5 mM. A constante de Michaelis & Menten (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) foram determinadas através de gráficos de duplos recíprocos (LINEWEAVER; BURK, 1934).

5.4.1.4. Efeito de íons metálicos na atividade de lacase

Atividades de lacase foram determinadas na presença dos íons metálicos sulfato de manganês, sulfato de ferro e sulfato de cobre, em concentrações variadas de 0 a 120 mM, sendo incubadas durante 5 min, à temperatura ambiente ($25^\circ \pm 2^\circ$ C), conforme o ensaio padrão de determinação da atividade de lacase.

5.5. Estudo do pré-tratamento *in vitro* da ARBCs pelo extrato enzimático bruto produzido por *P. ostreatus*

Os ensaios de degradação da ARBCs *in vitro* pelo extrato enzimático bruto de *Pleurotus ostreatus* foram conduzidos utilizando um delineamento experimental 2^3 composto por 11 tratamentos, sendo 8 tratamentos fatoriais (+1 e -1) e 3 pontos centrais (Tabela 6 e 7). As variáveis dependentes foram a remoção de compostos fenólicos totais e atividade de lacase. Os ensaios foram realizados em frascos do tipo Erlenmeyer com capacidade de 125mL, com volume reacional de 50mL, sendo 36mL de ARBCs, 9mL de tampão McIlvaine e 5 mL de extrato enzimático bruto (550 U.L⁻¹). O meio reacional teve o pH ajustado com fosfato dissódico para os valores em estudo. Água destilada foi utilizada para diluir a ARBC para atingir as concentrações de estudo. O extrato enzimático obtido no pico de produção de lacase (cinética de produção) foi utilizado. Os frascos foram incubados na ausência de luminosidade, por 24h (SAPARRAT et al., 2010). O melhor ponto do planejamento fatorial foi utilizado para determinação do melhor tempo de pré-tratamento, sendo avaliado nos tempos de 24, 48 e 72h.

Tabela 6: Níveis do Delineamento Fatorial 2^3 na avaliação do potencial do extrato bruto de *P. ostreatus* de degradar os compostos fenólicos da ARBC *in vitro*.

Variável	-1	0	+1
Concentração da ARBC (%)	60	80	100
Agitação (rpm)	0	60	120
pH	4	5,5	7

Tabela 7: Matriz do Delineamento Fatorial 2^3 na avaliação do potencial do extrato bruto de *P. ostreatus* de degradar os compostos fenólicos da ARBC *in vitro*.

Ensaio	Variáveis independentes		
	Agitação (rpm)	pH	Concentração de ARBC (%)
1	(-1) 0	(-1) 4	(-) 60
2	(+1) 120	(-1) 4	(-) 60
3	(-1) 0	(+1) 7	(-) 60
4	(+1) 120	(+1) 7	(-) 60
5	(-1) 0	(-1) 4	(+) 100
6	(+1) 120	(-1) 4	(+) 100
7	(-1) 0	(+1) 7	(+) 100
8	(+1) 120	(+1) 7	(+) 100

9PC	(0) 60	(0) 5,5	(0) 80
10PC	(0) 60	(0) 5,5	(0) 80
11PC	(0) 60	(0) 5,5	(0) 80

5.6. Digestão Anaeróbia

5.6.1. Caracterização do inóculo

Para realização dos ensaios de potencial metanogênico foi utilizado inóculo oriundo de reator UASB da ETE da Avícola Dacar (Tietê/SP). Para tanto, o lodo foi submetido as seguintes análises de caracterização: Sólidos Totais (ST), Sólidos Totais Voláteis (STV), Sólidos Totais Fixos (STF).

5.6.2. Determinação de Potencial Metanogênico

A digestão anaeróbia da ARBC 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. Controle positivo, utilizando celulose microcristalina como substrato (C+); b. ARBCs sem pré-tratamento (E1); c. ARBCs pré-tratada (E2) e d. ARBCs com o extrato enzimático desnaturado (E3). Os ensaios foram descontados do ensaio branco (ensaio com apenas o inóculo), tal procedimento visou descontar as possíveis reservas de carbono presentes no inóculo. Os ensaios foram encerrados quando a produção diária de metano, durante três dias consecutivos foi menor que 1% do volume acumulado de metano (HOLLIGER et al., 2021). Os ensaios foram conduzidos em frascos de medição automática de produção de biogás de 250 mL com 100 mL de ARBC. A relação S/M (Substrato, em termos de DQO e microrganismo, em termos de STV) em cada frasco foi igual a 0,4. A concentração inicial de substrato foi de 4000 mg DQO.L⁻¹. Os parâmetros analisados nos ensaios de biodegradabilidade foram a DQO, mg L⁻¹ e análise de biogás por cromatografia gasosa. A produção de biogás foi monitorada por transdução de pressão. Cromatógrafo gasoso GC-2010 Shimadzu com detector de ionização de chama (FID), coluna HP INNOWAX de 30m x 0,25mm (diâmetro interno) x 0,25 µm (espessura do filme). Injeção de padrão contendo 50% de CH₄ e 50% de CO₂ (mol/mol) foi realizada periodicamente para obtenção do fator de conversão entre área dos picos e massa de metano presente nas amostras.

A produção metanogênica acumulada foi ajustada pelo modelo de Gompertz modificado por Zwietering et al. (1990) apresentado na equação 2. A partir de tal ajuste foi possível estimar a máxima produção metanogênica esperada (P_{CH₄}) e a velocidade máxima de produção metanogênica (k), bem como o período de tempo até o início da produção de metano (λ). Sendo e, o número de Euler. Os ajustes foram realizados utilizando método de Levemberg-Marquardt (Microsoft Origin 9.0).

$$P_{CH_4}(t) = P_{CH_4} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{k \cdot e}{P_{CH_4}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}, \quad \text{Equação 2}$$

Os parâmetros cinéticos obtidos por meio do ajuste do modelo foram utilizados na avaliação da eficiência do pré-tratamento estudado.

5.7. Análises físico-químicas e enzimática

Os parâmetros analisados durante os ensaios foram a DQO, mg L⁻¹, 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), pH (Potenciômetro), carboidratos totais (DUBOIS et al., 1956; BLUNDI; GADELHA, 2001), biomassa foi quantificada pela filtragem em membrana de nylon 0,45 µm, previamente seca até massa constante e secagem a 105 °C, por 24 horas, descoloração por análise colorimétrica com sistema de cores CIELAB conforme descrito por Oliveira et al. (2020), concentração de compostos fenólicos totais, 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, uma unidade enzimática foi definida como à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µMol de substratos por minuto, de acordo com Ballaminut e Matheus (2007) . O pH foi aferido utilizando um pH digital, previamente calibrado. A produção de biogás foi monitorada continuamente por um medidor eletrônico de gás transdução de pressão. A composição do biogás foi analisada em cromatógrafo gasoso (Shimadzu, modelo GC-2014 - equipado com detector de condutividade térmica, coluna Shincarbon, com comprimento de 1,0 m e diâmetro interno de 1mm) de acordo com Bonadio et al. (2016). Injeção de padrão contendo 50% de CH₄ e 50% de CO₂ (mol/mol) sendo realizada periodicamente para obtenção do fator de conversão entre área dos picos e massa de metano presente nas amostras.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Caracterização da ARBC

Ambas as águas residuárias do beneficiamento do café (ARBC e ARBCs) foram caracterizadas em parâmetros físico-químicos. Os resultados estão apresentados na Tabela 8, juntamente com resultados de outros estudos de caracterização da água residuária do beneficiamento do café descritos na literatura.

Tabela 8: Parâmetros físico-químicos das águas residuárias do beneficiamento do café.

Parâmetros	Presente estudo		Autores		
	Coletado	Simulado	Suárez (2018)	Peralta et al., (2014)	Alemayehu, Asfaw e Tirfie (2020)
pH	4,13	4,01	3,41–4,28	4,2	3,57–4,21
DQO (mg. L ⁻¹)	11912,57	24189,76	15378-28500	38416	8480–45955
Açúcares totais (mg.L ⁻¹)	11881,73	20519,42	-	-	-
Açúcares solúveis (mg.L ⁻¹)	11508,51	19276,97	-	-	-
Fenóis totais (mg.L ⁻¹)	18,01	163,3334	363-673	4661	45–278
ST (mg.L ⁻¹)	61,1	261,8667	9615-20270	-	3520–4200
STF (mg.L ⁻¹)	7,2	57,13333	-	-	-
STV (mg.L ⁻¹)	54,2	204,7333	7197-13326	-	8208

Os resultados encontrados neste estudo para ARBC demonstram um pH ácido entre 4,01 a 4,13. O valor obtido correspondeu à faixa relacionada ao pH registrado na literatura, o que segundo Suárez (2018) é esperado devido ao alto teor de açúcares facilmente fermentáveis que são convertidos em ácidos orgânicos, impactando na acidez das águas residuais. O pH ácido pode ser interessante para basidiomicetos, já que esses organismos crescem bem em pH ácido (MOREIRA NETO, 2012). No entanto de acordo com Hollinger et al. (2016), para otimizar o processo anaeróbio, os valores de pH devem ser corrigidos para a faixa entre 7,0 e 8,5, para favorecer a produção de metano na digestão anaeróbia.

A concentração de matéria orgânica expressa em DQO para a água residuária coletada foi de 11912,57 mg. L⁻¹, e encontra-se um pouco abaixo dos valores encontrados na literatura. Para a ARBCs a DQO foi de 24189,76, valor mais condizentes com os relatados por Suárez (2018) e Alemayehu; Asfaw; Tirfie (2020).

A concentração de compostos fenólicos totais (CFT) da ARBC coletada na Fazenda Santa Alina foi de 18,01 mg L⁻¹, valor muito abaixo da faixa de CFT observada na literatura, possivelmente

em virtude da baixa quantidade de frutos beneficiados, pois a coleta foi realizada no final da safra de 2022. Já a concentração de CFT da ARBCs foi de 163,33 mg L⁻¹, um valor ainda que menor que os trabalhos identificados na literatura, traz em sua composição maior teor de compostos fenólicos. No entanto, devido aos frutos do café estarem extremamente maduros, a ARBCs ficou abaixo da faixa encontrada por Suárez (2018), tanto em relação ao efluente simulado quanto coletado pelo autor.

A concentração de CFT das águas residuária do beneficiamento do café variam muito, dependendo da quantidade de frutos de café beneficiados por litro de água (CAMPOS et al., 2010; PIN et al. 2020), bem como do estágio de maturação dos frutos beneficiados, com a quantidade de compostos fenólicos decaindo em frutos muito maduros (ROSSETTI, 2007), o que condiz com a baixa concentração de CFT no presente estudo.

6.2. Estudo da produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* em ARBC

6.2.1. Cultivo sólido *P. ostreatus* em ARBC

Esse estudo teve como objetivo avaliar o crescimento micelial de *P. ostreatus* em ARBC visando a indução das enzimas ligninolíticas, especialmente a lacase, como descrito por Beserra (2023), demonstrando a importância do inóculo na indução da expressão de lacase de *Lentinus crinitus*, bem como a produção de inóculo para a etapa de otimização da produção de lacase em ARBC por *P. ostreatus* em meio líquido.

O *P. ostreatus* foi capaz de crescer em todas as concentrações da ARBC (25%, 50%, 75% e 100%) em meio sólido utilizando somente ágar como agente solidificante, tanto nos meios com ou sem esterilização.

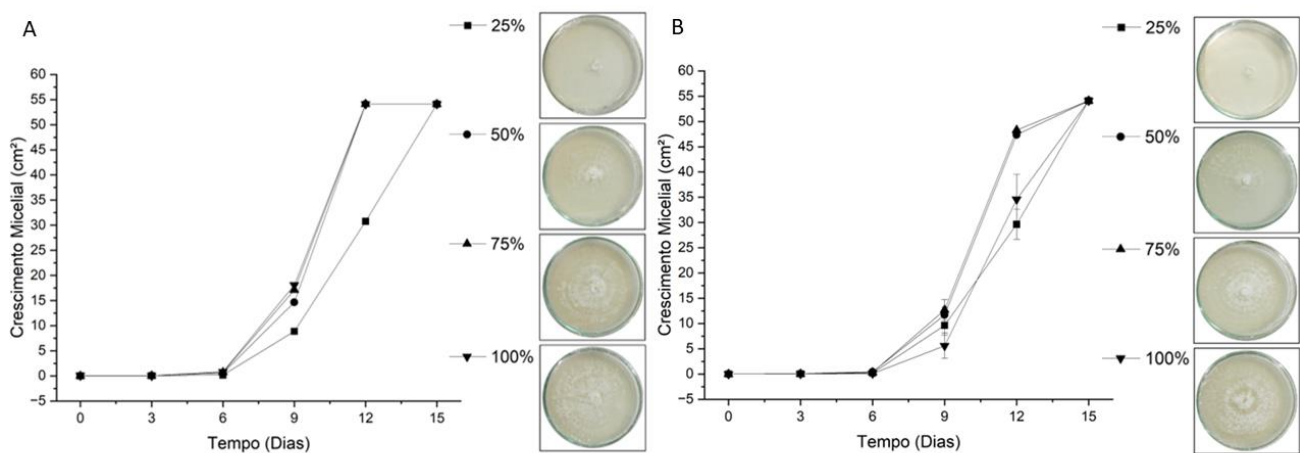
Para o meio esterilizado, os maiores valores de crescimento fúngico ocorreram nas concentrações de 50%, 75% e 100% de ARBC, completando toda área da placa de Petri com 12 dias de incubação, com 54,1 cm². Para a concentração de 25%, o crescimento micelial no mesmo período foi de 30,7 cm². Comportamento que pode ser relacionado com o aumento da concentração de carboidratos no meio.

Nos ensaios sem a esterilização, o crescimento micelial foi inferior ao meio esterilizado, neste estudo a concentração de 75% e 50% foram superiores aos demais ensaios, com crescimento de 48,3 cm² e 47,3 cm², respectivamente (Figura 6). Entretanto para ambos os estudos foi observado que em baixas concentração de ARBC o crescimento micelial ocorreu com pouco vigor, isto é, as hifas apresentaram baixa densidade, principalmente nas concentrações de 25% e 50% como é possível visualizar na Tabela 9. O crescimento reduzido nos meios sem a esterilização pode ser atribuído, sobretudo, a dois fatores principais. O primeiro deles é a alteração no pH do meio de cultura resultante do tratamento térmico aplicado nos meios, conforme relatado por Pasqual; Ribeiro e Barros (1992).

O segundo fator está relacionado à competição com outros microrganismos presentes na água residuária não esterilizada.

Silva (2022) observou o mesmo achado, no crescimento micelial de *P. ostreatus* na água residuária do café solúvel em placa de Petri, o fungo foi capaz de crescer em todas as concentrações de água residuária, tendo crescimento micelial com pouco vigor e baixa densidade, nas concentrações de 25% e 50%. A densidade micelial está relacionada a diversos fatores como fontes nutricionais, pH, temperatura, luminosidade, umidade e oxigenação que influenciam no desenvolvimento e no vigor micelial (COELHO et al., 2021).

Figura 6: Crescimento micelial de *P. ostreatus* em concentrações crescentes de ARBC em meio solido, esterilizado A, não-esterilizado B.



Lee et al. (2017) avaliaram o crescimento micelial de sete fungos da podridão branca em placa de Petri, utilizando como substrato água residuária de suínos. Neste estudo, somente foi observado crescimento micelial para os fungos *P. ostreatus* e *H. erinaceus*. Os autores empregaram o uso da metodologia de superfície de resposta para determinar a combinação de pH, temperatura (T) e concentração de substrato (C) para maximizar o crescimento micelial, e para *P. ostreatus* a condição ótima foi estimada em pH = 5,8, T = 28,8 °C, e C = 11,2 g de DQO/L (a mesma concentração de substrato utilizada no presente estudo em 100% de ARBC).

Tabela 9: Densidade micelial de *P. ostreatus* em concentrações crescentes de ARBC em meio solido após 15 dias de incubação.

Concentração da ARBC (%)	Densidade micelial (critério subjetivo)			
	25%	50%	75%	100%
Esterilizado	+	++	+++	+++
Não esterilizado	+	++	+++	+++

Legenda: + micélio pouco adensado; presença de hifas espaçadas e finas; ++ micélio mediamente adensado; +++ micélio fortemente adensado.

6.2.2. Descoloração do meio de cultura contendo ARBC (100%) por *P. ostreatus*

Os ensaios contendo ARBC a 100% foram selecionados para análise de descoloração por análise colorimétrica. As análises quantitativas de cor foram realizadas como base a reflexão da luz por uma superfície com o sistema de cores CIELAB.

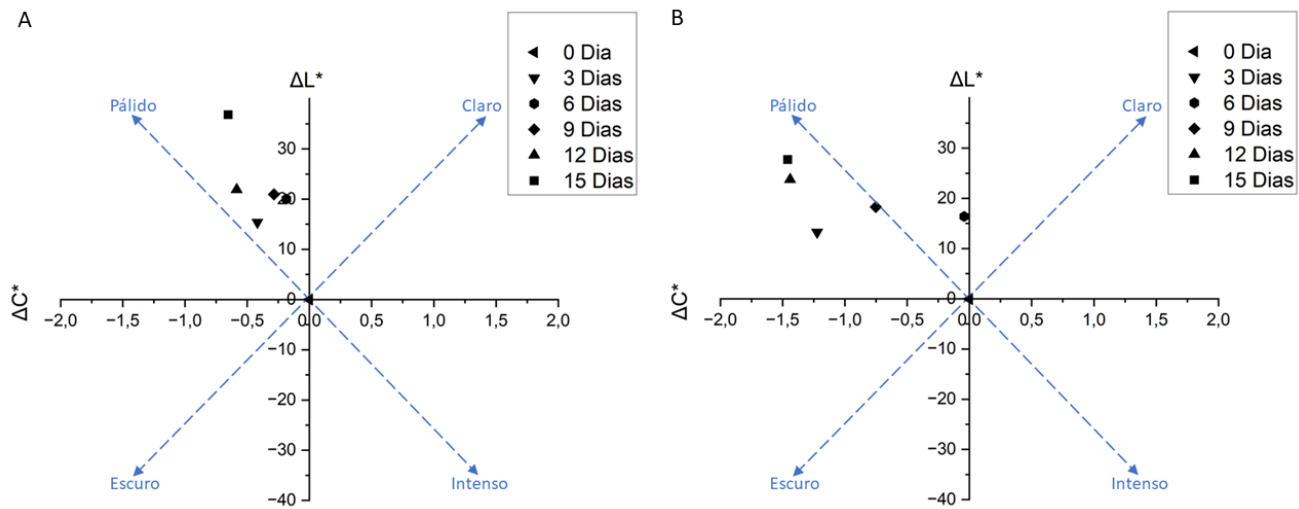
A partir da Tabela 10 e Figura 7, observa-se que tanto para o meio esterilizado quanto para o sem esterilização, que o fungo foi capaz de descolorir a ARBC na concentração de 100%. Os valores ΔC^* foram negativos, indicando cores mais pálidas. O valor de ΔL^* (variação da luminosidade) aumentou gradativamente, de 0 para 36,8 para o meio esterilizado e de 0 para 27,7 para o meio sem esterilização, caracterizando um clareamento parcial no meio de cultura. O valor de L^* (luminosidade) iniciou com 12,6 e 14,3 no dia da inoculação, e no 15º dia foi quantificado em 49,4 e 40,0, para os meios esterilizado e não esterilizado, respectivamente.

Silva (2022) avaliou a descoloração da água residuária do café solúvel (ARCS) a 100% em meio BDA por *P. ostreatus* em placa de Petri. O autor identificou que o fungo foi capaz de descolorir o meio, tendo ΔL^* de 17,39 no 15º dia de incubação. Moreira et al. (2023) estudaram o pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio tratando a ARCS utilizando *Pleurotus ostreatus* em meio sólido contendo ágar como agente solidificante, e verificaram que o fungo promoveu a descoloração parcial do meio, confeccionado com a ARCS nas concentrações de 75% e 100% e ARCS, tendo ΔL^* de 11,96 e 12,27, respectivamente, no 15º dia. Em ambos os trabalhos tendo valores inferiores ao evidenciado neste trabalho.

Tabela 10: Análise colorimétrica do efeito de *P. ostreatus* na concentração de 100% de ARBC em meio sólido

Tempo em dias	Com esterilização				Sem esterilização			
	L^*	Cromo	ΔL^*	ΔC^*	L^*	Cromo	ΔL^*	ΔC^*
0	12,6	0,81	0	0	14,3	1,57	0	0
3	28,0	0,39	15,4	-0,41	27,6	0,34	13,2	-1,22
6	32,6	0,62	20,0	-0,18	30,7	1,52	16,4	-0,04
9	33,6	0,52	20,9	-0,28	32,6	0,81	18,2	-0,75
12	34,5	0,22	21,8	-0,58	38,1	0,13	23,7	-1,43
15	49,4	0,161	36,8	-0,65	42,0	0,11	27,7	-1,45

Figura 7: Descoloração da ARBC, esterilizada (A) e sem esterilização (B), na concentração de 100% por *P. ostreatus*.



6.2.3. Produção de lacase em ARBC por *P. ostreatus* em meio líquido

6.2.3.1. Seleção das variáveis que influenciam a produção de lacase - Delineamento Experimental *Plackett-Burman*

No processo de produção enzimática, diversas variáveis podem influenciar no desempenho. Quando todos os fatores de um processo são conhecidos, é possível combinar os efeitos dos fatores para maximizar ou minimizar uma resposta de interesse. Contudo, em processos complexos, a plena compreensão de todos os fatores envolvidos é desafiadora, no entanto, é possível restringir a procura e seleção, priorizando fatores com maior possibilidade de afetarem significativamente o processo. Na estatística o delineamento experimental Plackett & Burman (PB) destaca-se como uma ferramenta valiosa para identificar os fatores mais impactantes em um processo ou resposta específica, empregando um número reduzido de experimentos. Com isso, foi empregado o delineamento experimental PB para avaliação da influência de sete fatores na produção de lacase, produção de biomassa e remoção de matéria orgânica expressa em DQO da ARBC.

As variáveis independentes estudadas no PB, foram: CuSO_4 , MnSO_4 , óleo de soja, agitação, porcentagem de ARBC, pH e discos de inóculos. Na Tabela 11 foram compilados os dados da matriz do PB, bem como os valores obtidos referentes às variáveis dependentes.

Tabela 11: Matriz de Plackett & Burman codificada para o design com 12 condições experimentais (1-12) e três repetições do ponto central (PC1-PC3) com suas respectivas variáveis respostas, remoção de DQO, produção de biomassa e produção de lacase por *P. ostreatus* após 15 dias de processo aeróbio submerso.

Ens	Variáveis independentes						Variáveis dependentes			
	CuSO ₄ (mM)	MnSO ₄ (mM)	óleo de Soja (%)	Agitação (rpm)	ARBC (%)	pH	Discos (un)	Lacase (U.L ⁻¹)	R-DQO (%)	Biomass a
1	(+1) 1	(-1) 0	(+1) 1	(-1) 0	(-1) 80	(-1) 4	(+1) 7	50,3	40,9	0,380
2	(+1) 1	(+1) 1	(-1) 0	(+1) 120	(-1) 80	(-1) 4	(-1) 3	793,7	50,5	0,132
3	(-1) 0	(+1) 1	(+1) 1	(-1) 0	(+) 100	(-1) 4	(-1) 3	26,4	54,2	0,535
4	(+1) 1	(-1) 0	(+1) 1	(+1) 120	(-1) 80	(+1) 6	(-1) 3	51,2	65,3	0,750
5	(+1) 1	(+1) 1	(-1) 0	(+1) 120	(+) 100	(-1) 4	(+1) 7	497,4	57,0	0,178
6	(+1) 1	(+1) 1	(+1) 1	(-1) 0	(+) 100	(+1) 6	(-1) 3	128,8	50,3	0,551
7	(-1) 0	(+1) 1	(+1) 1	(+1) 120	(-1) 80	(+1) 6	(+1) 7	19,0	70,4	0,858
8	(-1) 0	(-1) 0	(+1) 1	(+1) 120	(+) 100	(-1) 4	(+1) 7	18,4	63,8	1,001
9	(-1) 0	(-1) 0	(-1) 0	(+1) 120	(+) 100	(+1) 6	(-1) 3	7,4	84,8	0,223
10	(+1) 1	(-1) 0	(-1) 0	(-1) 0	(+) 100	(+1) 6	(+1) 7	267,5	57,3	0,140
11	(-1) 0	(+1) 1	(-1) 0	(-1) 0	(-1) 80	(+1) 6	(+1) 7	78,6	53,7	0,154
12	(-1) 0	(-1) 0	(-1) 0	(-1) 0	(-1) 80	(-1) 4	(-1) 3	29,0	63,1	0,077
PC	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 60	(0) 90	(0) 5	(0) 5	247,0	64,3	0,545
PC	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 60	(0) 90	(0) 5	(0) 5	239,6	66,4	0,503
PC	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 60	(0) 90	(0) 5	(0) 5	241,6	59,9	0,494

Legenda: Ens: ensaios; PC: ponto central; Discos: Discos de crescimento micelial (un.), R-DQO: remoção de DQO

No PB a maior produção de lacase foi de 793 U no ensaio 2, seguido dos ensaios 5 e 10 com produção de 497 U.L⁻¹ e 267 U.L⁻¹, respectivamente (Tabela 11). O ensaio 2, teve uma atividade enzimática 37% maior que o segundo melhor ensaio. As condições de cultivo do ensaio 2 foram: 1 mM de CuSO₄, 1Mm de MnSO₄, ausência de óleo de soja (0 mL), 120 RPM de agitação, 80% de ARBC, pH de 4 e 3 discos de inóculos.

O aumento do pH e a concentração de óleo de soja apresentaram efeito negativo sobre a produção de lacase, enquanto o aumento da concentração de CuSO₄ e de MnSO₄ favoreceram produção de lacase ($p < 0,05$) (Figura 8A). Lu e Ding (2010), verificam o mesmo achado com produção 3,4 vezes maior em culturas suplementadas com 0,5 a 3,0 mM de Cu²⁺. Os ensaios 3, 7, 8, 9 e 12, não receberam CuSO₄ e apresentaram os menores valores de lacase, todos os ensaios com

produção inferior a 30 U.L⁻¹, evidenciando a relevância do CuSO₄ na produção da enzima, confirmado pelo Gráfico de Pareto (Figura 8A) e pelos resultados das análises estatísticas (Tabela 12).

A maior remoção de DQO foi no ensaio 9 com 84,8%, seguido pelos ensaios 7 e 4 com remoção de DQO de 70,4% e 65,3%, respectivamente. A remoção de DQO foi favorecida pelo aumento da agitação e do pH, porém o CuSO₄ e MnSO₄ apresentaram efeito negativo sobre essa variável ($p < 0,05$), confirmado pelo Gráfico de Pareto (Figura 8B). Os ensaios com maiores remoções de DQO não tiveram uma alta produção de lacase, mesmo assim, estes podem ser valioso em estudos dedicados ao tratamento de efluentes, especialmente quando é crucial a redução de matéria orgânica (ESPOSITO, 1992). E contribui para a compreensão da importância do uso desse fungo na remoção de DQO da ARBC, mostrando que existe a possibilidade de tratamento da ARBC *in vivo* com *P. ostreatus*.

O maior rendimento de biomassa foi obtido no ensaio 8, que continha 1% de óleo de soja, 120 RPM de agitação, 100% de ARBC, pH de 6 e 3 discos de inóculo, e proporcionou um rendimento de biomassa de 1,001g em 100 mL de meio, equivalente a 10,01 g/L de biomassa. A produção de biomassa foi favorecida pelo óleo de soja e agitação, com efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) (Figura 8C). O crescimento do *Pleurotus ostreatus* foi severamente reduzido em culturas estáticas em comparação com as agitadas, tendo um crescimento superficial predominante em culturas estáticas, enquanto o crescimento em culturas agitadas foi caracterizado pela formação de várias 'pelotas', achado verificado também por Flores et al. (2010), com *Pleurotus ostreatus*. Foi possível observar também uma relação inversa entre produção de biomassa e de lacase, sendo que os ensaios com maior produção de lacase, produziram pouca biomassa. Tavares et al. (2005) estudaram o cultivo submerso de *Trametes versicolor* e associam a produção de biomassa ao metabolismo primário, e a produção de lacase ao metabolismo secundário. Ensaio com altas concentrações de carbono, em que o fungo realiza metabolismo primário por muito tempo, diminuem o pH, podendo inibir o metabolismo secundário voltado a produção de lacase. Embora a produção de biomassa não seja benéfica para a produção de lacase, este estudo pode ser útil em trabalhos em que o crescimento rápido e abundante é importante, como na bio-sorção de íons (BURATTO et al., 2013).

Figura 8: Diagramas de Pareto e significância das variáveis estudadas para o intervalo de confiança de 95%. A (Produção de lacase), B (Remoção de DQO) e C (Produção de biomassa).

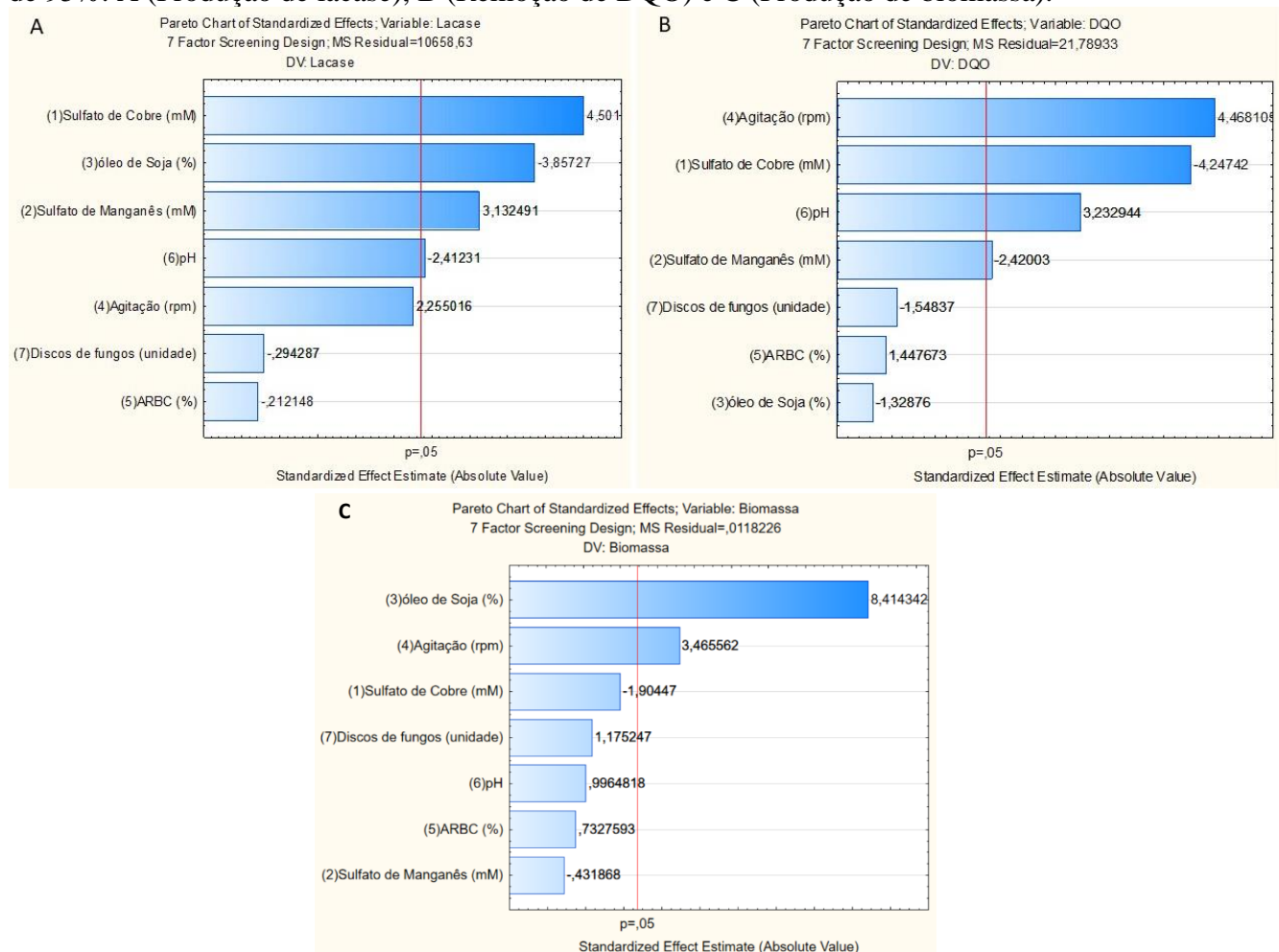


Tabela 12: Dados estatísticos obtidos após a realização dos ensaios para seleção de variáveis significativas para as variáveis resposta produção de lacase, remoção de DQO e produção de biomassa.

Variável	Produção de lacase				Remoção de DQO				Produção de biomassa			
	Efeito	Erro	t	p-valor	Efeito	Erro	t	p-valor	Efeito	Erro	t	p-valor
Média	179,76	18,20	9,87	0,00	60,16	1,21	50,04	0,00	0,43	0,02	15,49	0,00
CuSO₄	268,32	40,69	6,59	0,00 ***	-11,44	2,70	-4,26	0,05 ***	-0,11	0,06	-1,90	0,09 *
MnSO₄	186,71	40,69	4,58	0,01 **	-6,52	2,70	-2,43	0,84 **	-0,02	0,06	-0,43	0,67
óleo de Soja	-229,91	40,69	-5,64	0,01 ***	-3,58	2,70	-1,33	0,00	0,52	0,06	8,41	0,00 ***
Agitação	134,41	40,69	3,30	0,04 *	12,04	2,70	4,48	0,00 ***	0,21	0,06	3,46	0,010 **
ARBC	-12,64	40,69	-0,31	0,77	3,90	2,70	1,45	0,12	0,04	0,06	0,73	0,48
pH	-143,78	40,69	-3,53	0,03 **	8,71	2,70	3,24	0,22 **	0,06	0,06	0,99	0,35
Discos	-17,54	40,69	-0,43	0,69	-4,17	2,70	-1,55	0,06	0,07	0,06	1,17	0,27

Legenda: * variável estatisticamente significativa a $p \leq 0,1$; ** e caráter em negrito variável estatisticamente significativa a $p \leq 0,05$; *** variável estatisticamente significativa a $p \leq 0,01$;

Em resumo, o Plackett & Burman forneceu os seguintes resultados para a estruturação de um novo delineamento experimental – Planejamento Fatorial 2^3 (PF), buscando a otimização da produção de lacase:

- O óleo de soja não foi considerado para o PF, pois promoveu efeito significativamente negativo na produção de lacase.
- Embora a concentração de ARBC não tenha sido estatisticamente significativa, esta variável foi fixada na concentração de 80%, procurando-se aproximar às condições do ensaio 2 (ensaio com maior produção de lacase) em que essa concentração de ARBC foi utilizada
- O pH foi fixado no seu valor mínimo, visto que o aumento dos valores de pH teve efeito significativo negativo na produção de lacase.
- A quantidade de discos de crescimento micelial não afetou significativamente nenhuma variável dependente, mas teve efeito negativo sobre a produção de lacase e remoção de DQO, sendo fixado no seu valor mínimo.
- Os indutores enzimáticos CuSO_4 e MnSO_4 tiveram efeito positivo, estatisticamente significativos, sobre a indução da produção de lacase e ambos continuaram sendo estudados no PF.
- A agitação foi selecionada para estudo no PF, pois foi a terceira variável com maior efeito positivo sobre a produção de lacase, apesar de não ter sido estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Adicionalmente, essa variável teve efeito positivo significativo sobre a remoção de DQO.

6.2.3.2.Otimização da produção de lacase - Delineamento experimental Planejamento Fatorial

Após a seleção das variáveis no delineamento experimental Plackett & Burman, foi realizado Planejamento Fatorial 2^3 para o entendimento maior acerca produção de lacase e remoção de DQO em meio líquido constituído de ARBC diante das variáveis independentes: Agitação e a concentração dos indutores CuSO_4 e MnSO_4 . Para a agitação escolheu-se um limite inferior de 80 rpm e um limite superior de 120 rpm, para os mediadores CuSO_4 e MnSO_4 um limite inferior de 0,8 mM um limite superior de 1,2 mM, o pH foi fixado em 4, a ARBC em 80% e com 3 discos de crescimento micelial como inóculo.

Os ensaios 2, 4, 6, 8 e os pontos centrais tiveram as maiores produção de lacase, com valores de produção de lacase superiores a 719 U.L^{-1} . Porém o CuSO_4 gerou menores remoções de DQO (Figura 9B), em que os ensaios com 1,2 mM de CuSO_4 tiveram no máximo 59,1% de remoção. As maiores remoções de DQO foram de 76,0% e 74,4% nos ensaios 5 (120 rpm, 0,8 mM de CuSO_4 e 0,8 mM MnSO_4) e 7 (120 rpm, 0,8 mM de CuSO_4 e 1,2 mM de MnSO_4), respectivamente. Vale destacar que a remoção de DQO teve níveis superiores a 50,4 % em todos os ensaios. (Tabela 13).

Tabela 13: Delineamento Fatorial 2^3 , Remoção de DQO e produção de lacase por *P. ostreatus* após 15 dias de processo aeróbio submerso.

Ensaio	Variáveis independentes			Variáveis dependentes	
	CuSO ₄ (mM)	MnSO ₄ (mM)	Agitação (rpm)	Lacase (U.L ⁻¹)	Remoção de DQO (%)
1	(-1) 0,8	(-1) 0,8	(-) 80	355,5	64,7
2	(+1) 1,2	(-1) 0,8	(-) 80	766,4	50,4
3	(-1) 0,8	(+1) 1,2	(-) 80	197,6	58,8
4	(+1) 1,2	(+1) 1,2	(-) 80	755,4	51,4
5	(-1) 0,8	(-1) 0,8	(+) 120	388,7	76,0
6	(+1) 1,2	(-1) 0,8	(+) 120	767,2	59,1
7	(-1) 0,8	(+1) 1,2	(+) 120	178,7	74,4
8	(+1) 1,2	(+1) 1,2	(+) 120	719,5	53,8
9PC	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 100	775,6	61,2
10PC	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 100	760,5	62,2
11PC	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 100	752,9	60,3

A partir da Tabela 14 e no Gráfico de Pareto (Figura 9) verificam-se os efeitos individuais e das respectivas interações sobre as variáveis dependentes (produção de lacase e remoção de DQO), a nível de confiança de 95%. Somente a concentração de CuSO₄ foi estatisticamente significativa em relação a produção de lacase, com efeito positivo de 472 U.L⁻¹. Para a remoção de DQO, a agitação, apresentou efeito significativo positivo de 9,53%, e CuSO₄, um efeito significativo negativo de 14,77%.

Figura 9: Diagramas de Pareto e significância das variáveis estudadas para o intervalo de confiança de 95%. A (Produção de lacase) e B (Remoção de DQO).

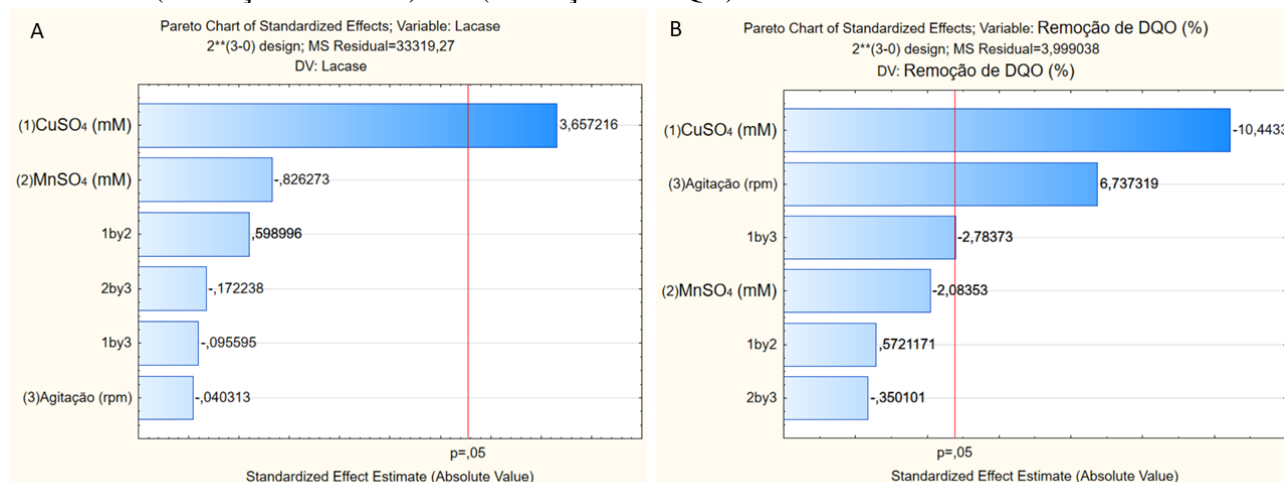


Tabela 14: Coeficientes de regressão do fatorial 2^3 para avaliação da produção de lacase e remoção de DQO por *P. ostreatus*.

Variável	Produção de lacase				Remoção de DQO			
	Efeito	Erro	t	p-valor	Efeito	Erro	t	p-valor
Média	583,45	55,04	10,60	0,00	61,12	0,60	101,37	0,00
CuSO₄	472,04	129,07	3,66	0,02 **	-14,77	1,41	-10,44	0,00 ***
MnSO ₄	-106,65	129,07	-0,83	0,46	-2,95	1,41	-2,08	0,11
Agitação	-5,20	129,07	-0,04	0,97	9,53	1,41	6,74	0,00 ***
CuSO ₄ x MnSO ₄	77,31	129,07	0,60	0,58	0,81	1,41	0,57	0,60
CuSO ₄ x Agitação	-12,34	129,07	-0,10	0,93	-3,94	1,41	-2,78	0,05 **
MnSO ₄ x Agitação	-22,23	129,07	-0,17	0,87	-0,50	1,41	-0,35	0,74

Legenda: * variável estatisticamente significativa a $p \leq 0,1$; ** e caractere em negrito variável estatisticamente significativa a $p \leq 0,05$; *** variável estatisticamente significativa a $p \leq 0,01$;

A partir da Tabela 15 e 16, observa-se que a análise de variância comprova que o F calculado foi maior que o F tabelado, tanto para produção de lacase quanto para remoção de DQO, com valor de R^2 de 78,32 e 97,66, respectivamente, ambos sendo superior a 70%, conforme recomendado por Rodrigues e Iemma (2014). Portanto, foi construído os gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno em relação a produção de lacase (Figura 10) e remoção de DQO (Figura 11), relacionando a interação entre as variáveis independentes CuSO₄, MnSO₄ e a agitação.

Tabela 15: Análise de Variância (ANOVA) para a produção de lacase por *P. ostreatus*.

Fator	SQ	GL	QM	F _{calc}	F _{tab}	p-valor
Regressão	481702,8	1 (p-1)	481702,8	32,528	5,12	0,00029
Resíduos	133277,1	9 (n-p)	14808,566			
Total	614979,9	10 (n-1)				
R²	78,32					

Tabela 16: Análise de Variância (ANOVA) para remoção de DQO por *P. ostreatus*.

Fator	SQ	GL	QM	F _{calc}	F _{tab}	p-valor
Regressão	667,813	3 (p-1)	222,604	97,419	4,35	0,000045
Resíduos	15,9962	7 (n-p)	2,285			
Total	683,8098	10 (n-1)				
R²	97,66					

A análise das superfícies de resposta é de grande interesse, uma vez que possibilita a previsão da faixa de valores ideais para diversas variáveis independentes, para uma variável dependente. A identificação das principais interações entre as variáveis experimentais é facilitada pela análise da natureza circular dos contornos, representando geralmente em um gráfico de contorno do modelo de regressão em formato 3D (Figura 10 e 11).

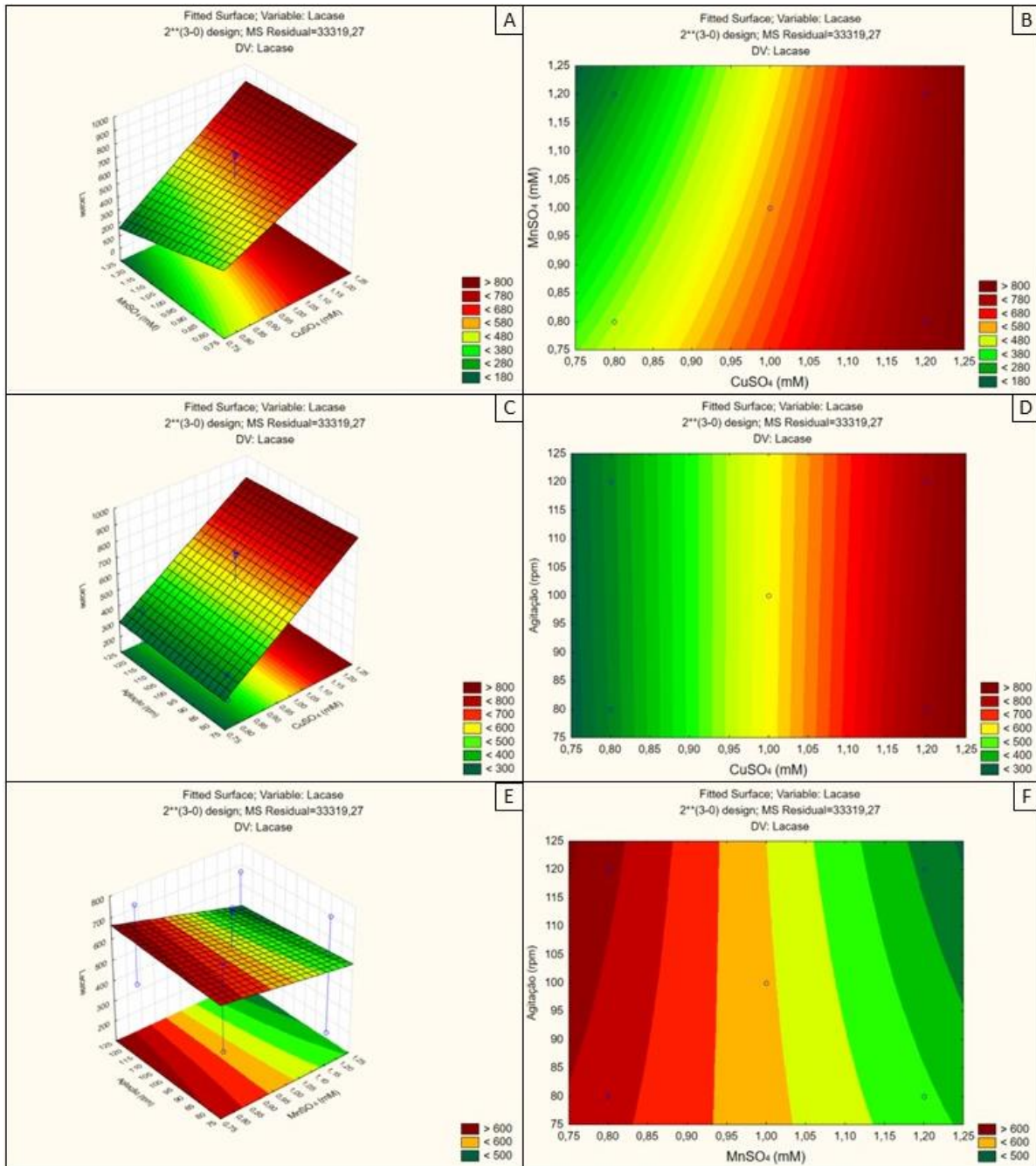
Na Figura 10, é possível visualizar o comportamento da variável dependente (produção de lacase) em relação às variáveis independentes: CuSO_4 , MnSO_4 e Agitação. Observa-se que com o aumento da concentração da CuSO_4 para valores a partir de 1mM, a produção enzimática aumenta (Figura 10A, 10B, 10C e 10D). Chmelová e Ondrejovič (2014), verificam um aumento de 3,7 vezes com a suplementação de CuSO_4 até concentrações de 3mM, para maiores concentrações de íons de cobre teve um efeito negativo na produção de lacase. Kiran et al. (2012) estudaram a descoloração de RB222 por *P. ostreatus*, e observaram que 1mM de CuSO_4 favoreceu não apenas a descoloração, com também a produção de lacase.

Observa-se um comportamento diferente para a concentração de MnSO_4 , tendo melhor produção de lacase em concentrações menores que 1mM (Figura 10A, 10B, 10E e 10F). Lu e Ding (2010), também verificam que o Mn^{2+} induziu a atividade de lacase até uma suplementação máxima de 0,8 mM, para *Coprinus comatus*.

Manubens et al. (2007), identificaram e caracterizaram lcs, um gene que codifica lacase no basidiomiceto de podridão branca *Ceriporiopsis subvermispora*, nesse trabalho, o efeito do Mn^{2+} na produção de lacase foi avaliado. Os autores observaram que em concentrações baixas (0-10 mM) de Mn^{2+} foram obtidos altos títulos de lcs-mRNA, enquanto em concentrações altas, os níveis de transcritos diminuiram marcadamente.

A partir da Figura 10C e 10E, percebe-se que a variação da agitação para valores maiores que 80rpm apresentaram pouca influência na resposta. O comportamento visualizado nos gráficos superfície e curva de contorno estão de acordo com o apresentado pelo gráfico de Pareto (Figura 9A). Velocidades mais altas de agitação podem causar maior energia e transferência de oxigênio para a cultura fúngica (Buchs, 2001). A agitação crescente, pode proporcionar maior produtividade de lacase, até certo ponto, no entanto, os fungos da podridão branca parecem ser adversamente afetados por agitação excessiva, conforme evidenciado por Saat et al. (2014).

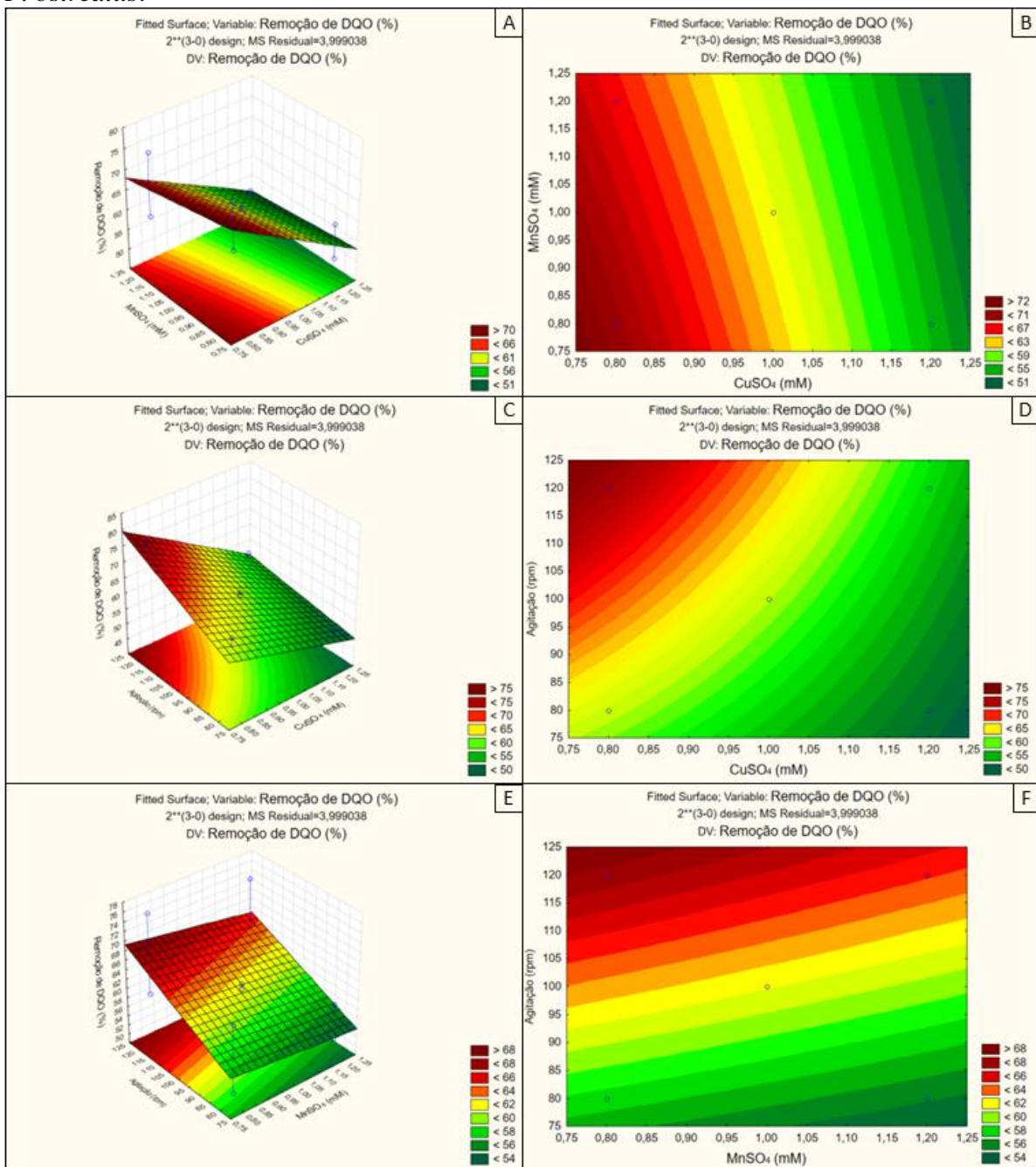
Figura 10: Planejamento Fatorial 2^3 – Gráficos de superfície e curva de contorno: Produção de lacase por *P. ostreatus*.



Legenda: A: CuSO_4 x MnSO_4 (superfície de resposta); B: CuSO_4 x MnSO_4 (curva de contorno); C: CuSO_4 x Agitação (superfície de resposta); D: CuSO_4 x Agitação (curva de contorno); E: Agitação x MnSO_4 (superfície de resposta); F: Agitação x MnSO_4 (curva de contorno).

Na Figura 11, é possível observar o comportamento da variável alvo (remoção de DQO) em relação às variáveis independentes: CuSO_4 , MnSO_4 e Agitação, em que o aumento da agitação e a diminuição da concentração de CuSO_4 e MnSO_4 , resultam em um aumento na remoção de DQO, tendo o MnSO_4 com um comportamento relativamente irrelevante, conforme evidenciado nas Figuras 11A e 11E.

Figura 11: Planejamento Fatorial 2^3 – Gráficos de superfície e curva de contorno: Remoção de DQO por *P. ostreatus*.



Legenda: A: CuSO_4 x MnSO_4 (superfície de resposta); B: CuSO_4 x MnSO_4 (curva de contorno); C: CuSO_4 x Agitação (superfície de resposta); D: CuSO_4 x Agitação (curva de contorno); E: Agitação x MnSO_4 (superfície de resposta); F: Agitação x MnSO_4 (curva de contorno).

Em resumo, foram selecionadas as seguintes condições de cultivo no Planejamento Fatorial 2^3 , para estudo da cinética de produção de lacase: CuSO_4 na concentração de 1mM, embora o CuSO_4 tenha tido uma alta influencia na produção de lacase, não se observou um aumento na produção ao elevar a concentração para 1,2mM, entretanto, esse aumento resultou em uma redução da remoção de DQO. A concentração de MnSO_4 foi mantida em 0,8mM, pois demonstrou não influenciar positivamente a produção de lacase em concentração maiores, além de não impactar na remoção de

DQO. A agitação foi fixada em 120rpm, pois, embora tenha apresentado pouca influência na produção de lacase, esta variável apresentou o maior efeito positivo na remoção de DQO.

6.2.4. Cinética de produção de lacase

A cinética de produção da lacase por *Pleurotus ostreatus* foi avaliada empregando a condição otimizada no planejamento fatorial 2³, com agitação em 120 rpm, CuSO₄ 1 mM e MnSO₄ 0,8 mM, bem como os parâmetros selecionados no Plackett & Burman, com pH foi fixado em 4, a ARBC em 80% e a quantidade de discos em 3 unidades.

A cinética de produção de lacase foi realizada com intuito de determinar os picos de produção da enzima, bem como sua relação com o consumo de matéria orgânica e pH. Os perfis de produção de lacase, carboidratos totais, pH, DQO e biomassa durante 30 dias, em cultivo submerso de *P. ostreatus* em ARBC estão apresentados nas Figuras 12 e 13.

A partir da Figura 12, observa-se que a produção da lacase ocorreu a partir do sexto dia de incubação, no entanto a maior produção foi a partir do nono dia partindo de 48 U.L⁻¹ para 783 U.L⁻¹ no décimo quinto dia, em que o pico de produção da enzima foi verificado. Após esse intervalo, observou-se uma tendência de diminuição na produção da lacase, no entanto, mantendo-se acima de 519 U.L⁻¹.

Moreira (2021), estudou a valoração da água residuária da produção de café solúvel (ARCS) para produção de lacase, em comparação ao meio Kirk (meio sintético), utilizando o fungo *Pleurotus ostreatus*. O autor verificou o pico de produção de lacase com atividade de 242 U.L⁻¹ para o meio sintético e 296 U.L⁻¹ para ARCS. Verificando uma indução na produção de lacase no meio contendo a ARCS, com aumento de 22,3%. Silva (2022), avaliou o pré-tratamento da ARCS com o fungo *Pleurotus ostreatus*. Em seu trabalho foi observado uma alta produção da enzima lacase com produção máxima de 647,58 U.L⁻¹, demonstrando o potencial do uso da ARCS na produção enzimática. Ambos os trabalhos evidenciam que as águas residuárias da cadeia produtiva do café podem ser utilizados como indutores para a produção de lacase.

O pH do extrato enzimático apresentou tendência de aumento a partir do sexto dia passando de 4,13 para 5,64 ao decimo quinto dia de fermentação. A Figura 12 mostra que a produção de lacase tem um perfil semelhante ao do pH, tendo um sincronismo quando se compara concentração de lacase e o respectivo pH. Comportamento verificado também por Tavares et al. (2005) na otimização da produção de lacase em cultivo submerso por *T versicolor*.

O consumo de carboidratos teve uma redução de 57,49% com quinze dias de fermentação, partindo de 9223 mg para 3920,5 mg (Figura 12). Durante a cinética de produção de lacase é observado uma relação entre consumo de carboidratos com o aumento do pH do meio, que pode ser atribuída ao

consumo de ácidos orgânicos (MÄKELÄ et al., 2002), comportamento esperado devido ao alto teor de ácidos orgânicos presentes na ARBC (ALEMAYEHU; ASFAW; TIRFIE, 2020).

A DQO teve uma redução semelhante à observada de carboidratos (Figura 21 e 22), tendo uma redução na DQO de 57,46% no décimo quinto dia de incubação e de 70% no trigésimo dia. O perfil de DQO no tratamento de águas residuárias por fungos basidiomicetos ainda é pouco discutido. Alguns trabalhos relatam a redução de DQO no tratamento da água residuária da produção do azeite de oliva. Blika (2009) observou uma redução de 30% com fungos da podridão branca, Fountoulakis et al. (2002) obtiveram redução de 12% com o fungo *P. ostreatus*, Ntougias et al. (2015) observaram diminuição de 47% da DQO, um dos maiores valores de remoção já evidenciado por *P. ostreatus*.

A biomassa apresentou tendência de crescimento até o décimo quinto dia de incubação com produção de 220 mg, após esse período, ocorreu uma diminuição na velocidade do crescimento fúngico, se mantendo constante, e chegando a 236 mg no trigésimo dia, com crescimento de apenas 7,2% (Figura 13). A partir da Figura 12 e 13, é possível observar uma forte relação no consumo de DQO e carboidratos com a produção de biomassa, ocorrendo um decaimento acentuado na matéria orgânica até o decimo quinto dia, com redução de 57,4%, quando ocorre a maior produção de biomassa, após esse período tem-se uma diminuição tanto na produção de biomassa quanto no consumo de DQO e carboidratos, com redução a partir do decimo quinto dia de apenas 12,6% e 14,7%, respectivamente.

Figura 12: Perfil da produção de lacase, carboidratos e pH em ARBC.

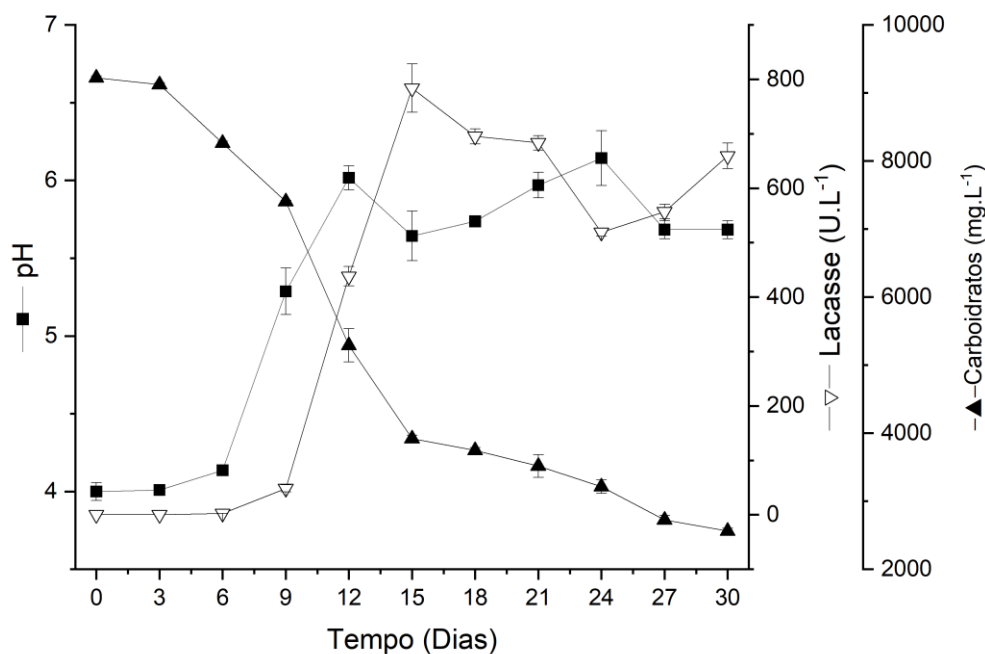
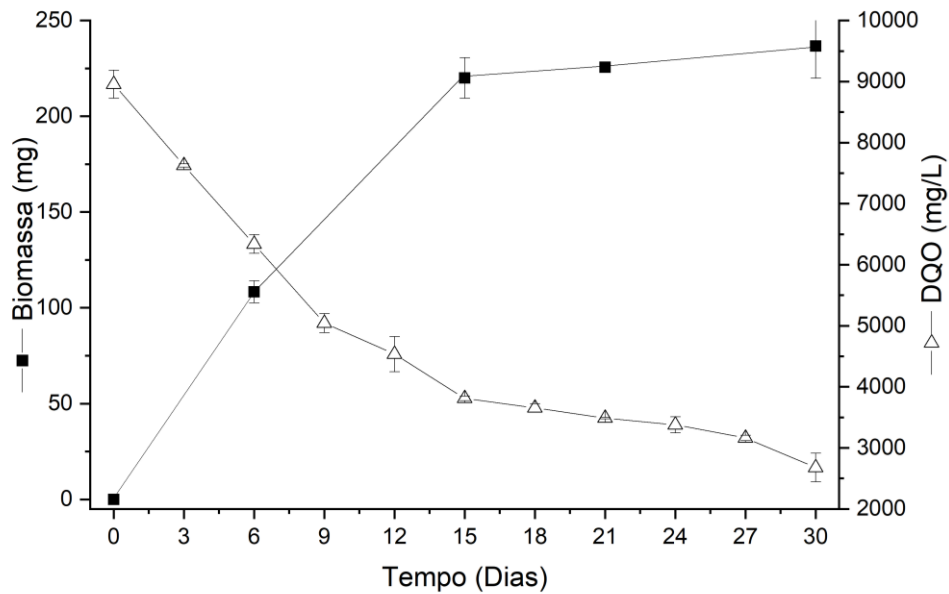


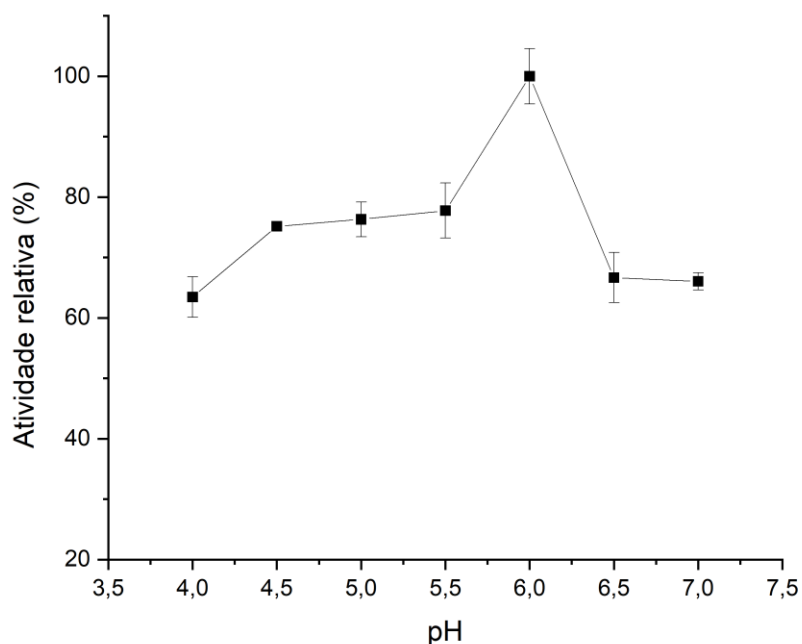
Figura 13: Biomassa e Demanda Química de Oxigênio (DQO) em ARBC.



6.2.5. Caracterização da atividade de lacase produzida por *P. ostreatus*

6.2.5.1. Temperatura e do pH ótimos de reação

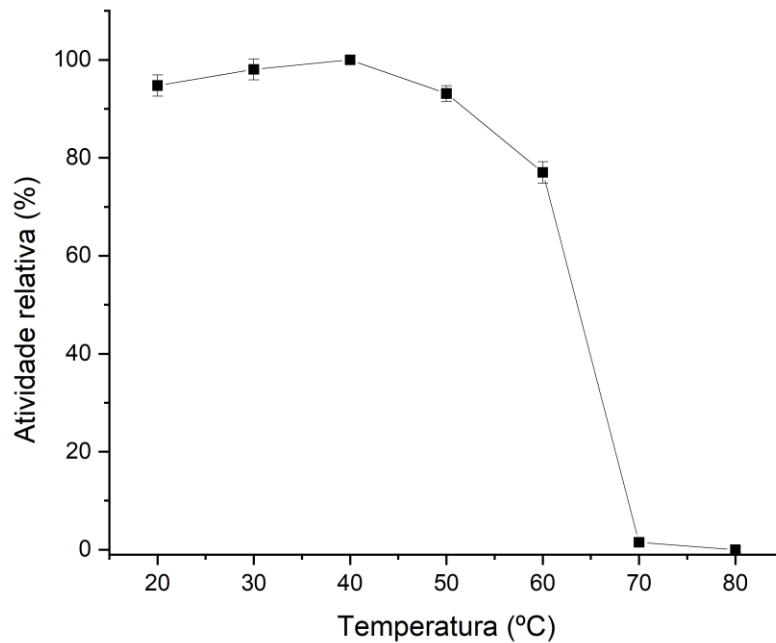
O perfil da atividade de lacase em função do pH (Figura 14) evidenciou pH ótimo em 6,0, apresentando-se ainda bastante resistentes à alteração de pH, tendo uma atividade relativa superior a 60% nos demais pHs. Alguns trabalhos verificaram pH ótimo em faixas maiores que 4 para *Pleurotus ostreatus*, Santos et al. (2015) e Pacheco et al. (2014) obtiveram o pH ótimo de 5,5, Junior (2010) verificaram pH ótimo de 4,5, Santos et al. (2019) e Souza (2018) pH ótimo de 5 e Moreira (2021) pH ótimo de 6. No entanto, os achados desses trabalhos estão em contraposição com vários relatórios para lacase de *Pleurotus ostreatus*, em que é verificado pH ideal na faixa ácida entre 3,0-3,6, tendo o ABTS como substrato (KUMAR et al., 2012; POZDNYAKOVA et al., 2004; OTHMAN et al., 2014; GIARDINA 1999; PALMIERI et al., 1997). A maioria das lacases fúngicas funcionam sob condições ácidas suaves (KUMAR et al., 2012). No entanto, algumas lacases de basidiomicetos podem apresentar grande variação em relação ao pH ótimos, a depender de vários fatores como fungo estudado, fonte nutricional, substrato utilizado entre outros (GIL et al., 2009; SOUZA, 2018). A alta atividade relativa na região de pH neutro, além da região ácida de pH, relatada neste trabalho abre novas janelas de aplicação para a atual lacase.

Figura 14: Efeito do pH de reação na atividade da lacase de *P. ostreatus* (■).

O efeito da temperatura sobre a atividade da lacase de *Pleurotus ostreatus* está apresentado na Figura 15. A lacase não apresentou uma temperatura ótima, mas sim uma faixa de temperatura ótima de reação de 20 °C e 50 °C, comportamento verificado também por Souza (2018) e Santos et al. (2019), para a lacase de *Pleurotus ostreatus*, sendo que em poucos casos as lacases apresentaram temperatura ótima abaixo de 42°C (MOREIRA NETO, 2012 ; OTHMAN et al., 2014), o que traz grande possibilidade de aplicação deste extrato bruto a diferentes aplicações industriais. Acima de 60 °C observou-se redução acentuada da atividade enzimática, com cerca de 1,5 % da atividade residual a 70 °C e desnaturação completa a 80 °C.

A faixa de temperatura ótima da lacase de *P. ostreatus* em estudo condiz com vários trabalhos encontrados na literatura com fungos basidiomicetos (GIARDINA et al., 1999; LACERDA, 2015; SILVEIRA, 2019; SOUZA, 2018; SANTOS et al., 2019). Estes trabalhos evidenciam a redução da atividade de lacase em valores acima de 60 °C, em que podem induzir a desnaturação das enzimas, alterando suas ligações fracas e conseqüentemente a estrutura tridimensional da enzima.

Figura 15: Efeito da temperatura de reação na atividade de lacase de *P. ostreatus* (■).

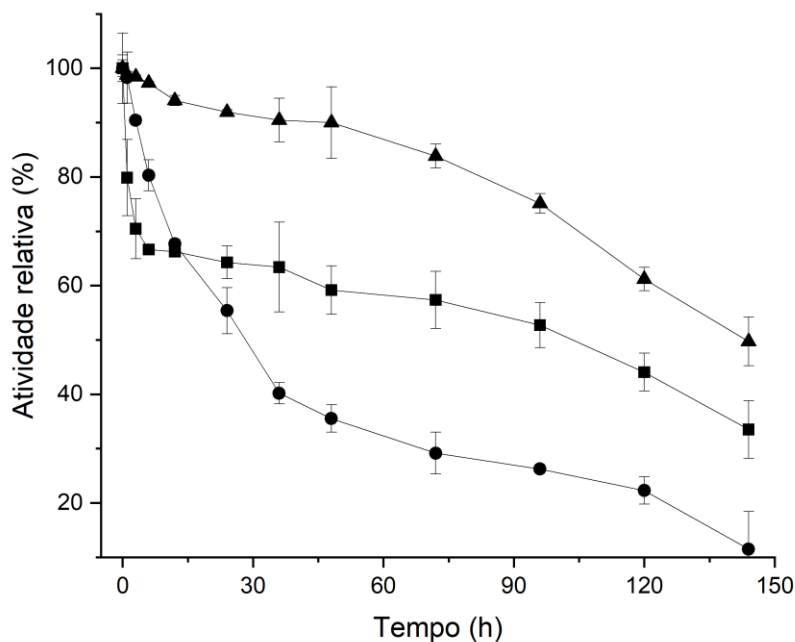


6.2.5.2. Estabilidade térmica e ao pH

A estabilidade ao pH foi avaliada no pH 4,5, próximo a faixa de pH das águas residuárias do beneficiamento do café, pH 6, pH ótimo da enzima, e no pH 7, faixa de pH ótimo da digestão anaeróbia (Figura 16). Nos pHs 6 e 7 a enzima apresentou meia vida ($T_{1/2}$) de cerca de 103h e 143h, respectivamente. A estabilidade da lacase foi mais baixa em pH 4,5, apresentando $T_{1/2}$ de 28h. Com 24h de incubação foram verificadas atividades relativas de 55%, 64% e 92% nos pHs 4,5, 6,0 e 7,0, respectivamente. Comportamento relatado por Giardina et al. (1999), com maiores estabilidade em pHs próximos a neutralidade, utilizando diferentes isoenzimas de *Pleurotus ostreatus*.

Souza (2018), estudou a estabilidade da enzima lacases produzida com casca de *Astrocaryum aculeatum Meyer*, tendo atividade residual maior que 85% quando incubadas por 24h em pH entre 5 e 6, no entanto, em pHs mais alcalinos entre 7 e 9 a atividade residual foi <50%, em 24h. Moreira (2021), avaliou o extrato enzimático do fungo *Pleurotus ostreatus* produzido em água residuária da produção do café solúvel, e obteve $T_{1/2}$ de cerca de 47 h, 50 h e 70h, nos pHs 4,6, 6,0 e 7,0 respectivamente. $T_{1/2}$ para os pH 6 e pH 7 bem a baixos do presente estudo. As diferentes estabilidades da lacase, podem ocorrer devido aos diferentes resíduos utilizados para a sua produção. Alguns desses resíduos contêm altas cargas de compostos como os fenólicos e metais que podem comprometer a estabilidade da enzima (MOREIRA NETO, 2012). Como também a composição do meio pode causar a produção de diferentes isoformas de lacase, como demonstrado por Godínez (2012).

Figura 16: Perfil de estabilidade da atividade de lacase de *P. ostreatus*, frente ao pH. pH 4,5 (●), pH 6,0 (■) e pH 7,0 (▲).

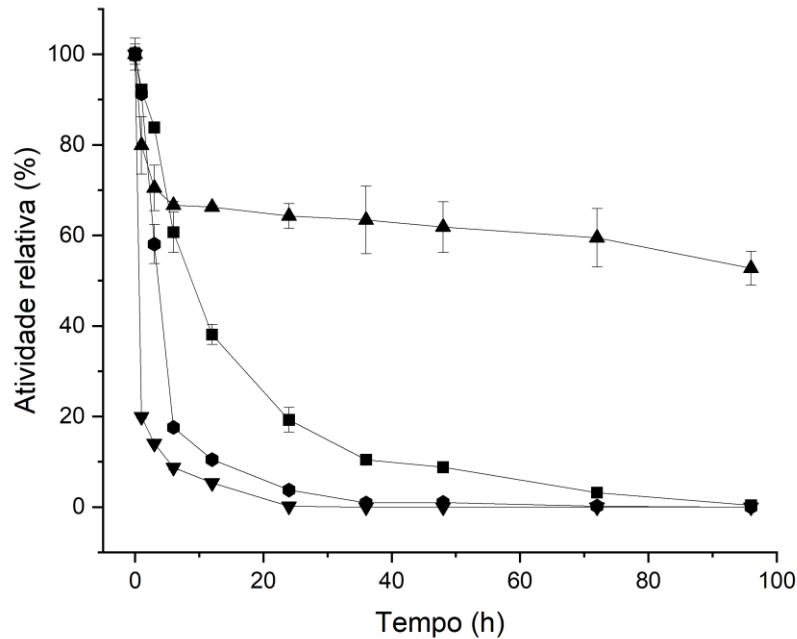


A estabilidade térmica da lacase do fungo *Pleurotus ostreatus* foi avaliada nas temperaturas de 25°C, 40°C, 50°C e 60°C e está apresentada na Figura 17. Observa-se que a lacase apresentou T_{1/2} de 0,62h e 3,6h, 8,8h e 103h nas temperaturas de 60°C, 50°C, 40°C e 25°C, respectivamente. Com 24h de incubação foram verificadas atividades relativas de 0,15 %, 3,74 %, 19,24% e 64% à 60°C, 50°C, 40°C e 25°C, respectivamente. Valores condizentes com vários trabalhos com lacase de *Pleurotus ostreatus* da literatura.

Moreira (2021), estudou a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* na água residuária do café solúvel, tendo atividade relativa semelhante a este trabalho, com 63,7%, 31,3% e 8,5%, após 24h de incubação a 25°C, 40°C e 50°C, respectivamente.

Libardi-Jr. et al. (2012) e Kumar et al. (2012), avaliaram a estabilidade térmica da lacase, por *P. ostreatus*, em ambos os trabalhos, observaram um comportamento semelhante ao do presente trabalho, com valores de estabilidade menores que 20%, em temperaturas maiores que 40°C, em 24h. No entanto, com estabilidades menores a ao presente trabalho para temperaturas próximas a temperatura ambiente, com atividade relativa menores que 50%, em 24h.

Figura 17: Perfil de estabilidade térmica da lacase de *P. ostreatus* a 25°C (▲), 40 °C (■), 50 °C (●) e 60 °C (▼).



6.2.5.3. Parâmetros cinéticos

A partir do gráfico do duplo recíproco (Figura 18) foi possível determinar os valores das constantes K_m e V_{max} para a lacase de *P. ostreatus* em relação ao ABTS. Foi verificado K_m de 4,8 mM (Tabela 17), o qual indica baixa afinidade desta lacase pelo ABTS (COELHO, 2007). Santos et al. (2015) observaram K_m de 2,71 mM, Patel et al. (2014) relatam K_m de 46,51, Giardina et al. (1999) com K_m de 0,37 mM, e Palmier et al. (1997) avaliou três isoenzimas lacase produzidas por *Pleurotus ostreatus*, com diferentes valores de K_m de 9,0 mM, 1,2 mM e 2,8 mM.

O valor de V_{max} da lacase de *P. ostreatus* para o ABTS foi de 1,4285 mM.min⁻¹. Othman et al. (2014) verificaram V_{max} 2,632 μmol min⁻¹, Pacheco et al. (2014) com V_{max} de 0,54 mM.min⁻¹, Rampinelli (2016) relata V_{max} de 1,25 mM.min⁻¹, para lacase de *Pleurotus sajor-caju*. O valor de K_m e V_{max} está condizente com os encontrados na literatura, no entanto, uma grande variação com relação à afinidade das lacases de *Pleurotus ostreatus* para o ABTS é observada.

Os resultados relatados na literatura apresentam variações nos valores de K_m de 0,37 a 46,51 mM e V_{max} de 0,002 a 1,25 mM.min⁻¹, dependendo de vários fatores como a espécie em estudo e meio de cultura utilizado para produção da lacase. Essas variações podem ser consequência da presença de inibidores competitivos no caldo enzimático, ou até mesmo indutores adicionados ao meio (RAMPINELLI, 2016).

Figura 18: Velocidade de lacase produzida por *P. ostreatus* em diferentes concentrações de ABTS como substrato. A (Lacase x ABTS) e B (Duplo recíproco ou gráfico de Lineweaver-Burk).

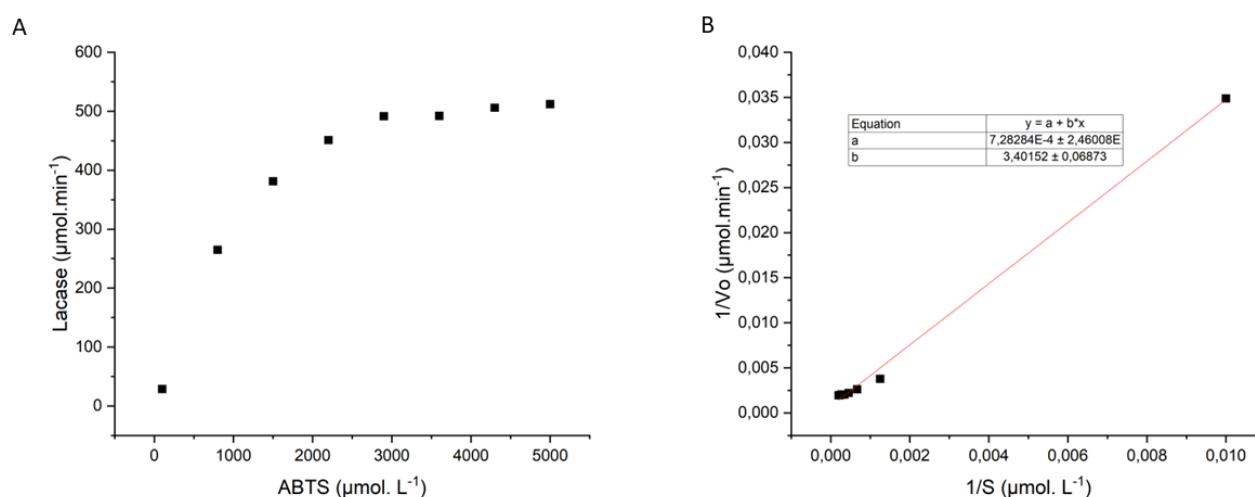


Tabela 17: Propriedades bioquímicas de lacases de *P. ostreatus*.

Propriedades	Valores
Km (mM)	4,8
V _{max} (mM.min ⁻¹)	1,4285
pH ótimo	6,0
Temperatura ótima (°C)	20 - 50

6.2.5.4. Efeito de íons metálicos na atividade de lacase

Diferentes compostos presentes no ambiente podem afetar a estabilidade das enzimas ligninolíticas. O efeito na atividade da lacase com diferentes metais, normalmente encontrados na ARBC, conforme levantado na revisão bibliográfica (Tabela 18), como Mn²⁺, Cu²⁺ e Fe²⁺ foram avaliados (Figura 19). Para isso, a lacase foi incubada com os sulfatos dos íons mencionados acima em concentrações que variam de 1 a 120 mM, seguindo a metodologia descrita anteriormente tendo ABTS como substrato.

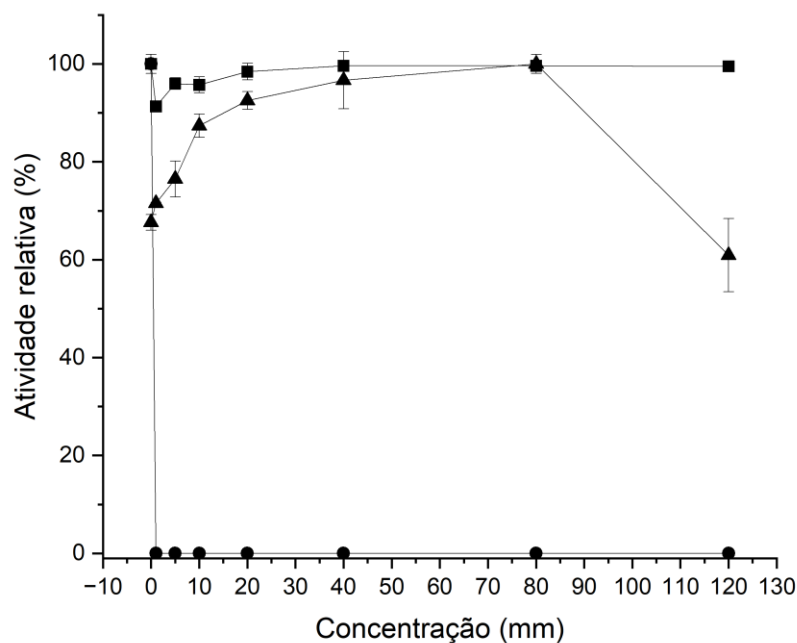
A atividade da lacase de *P. ostreatus* foi inibida completamente pela adição de sulfato de ferro em concentrações superiores a 1mM. Coelho et al. (2019) verifica a inibição completa de lacase de *D. castanella* na concentração de sulfato de ferro a 1mM. A inibição de lacases de *Pleurotus sajor-caju* (MURUGESAN, 2006) e de *P. ostreatus* (KUMAR et al., 2012), por FeSO₄ também é relatado.

O CuSO₄ afetou ligeiramente a atividade enzimática nas concentrações avaliadas. Lorenzo et al. (2005) avaliou a inibição da atividade lacase de *Trametes versicolor* por metais, constatando inibições superiores a 40%, para concentrações maiores que 20mM de Cu²⁺.

A adição de MnSO₄ na mistura reacional estimulou a atividade da lacase para concentrações inferiores a 80 mM, com aumento de 33%, para a concentração de 120 mM foi observado uma

inibição de aproximadamente 40% na atividade de lacase. Para a lacase de *Trametes versicolor* o Mn^{2+} não afetou a atividade de lacase em concentrações inferiores a 80mM (LORENZO et al., 2005). Kumar et al. (2012) observaram aumento em 20% para concentração de 10 mM de Mn^{2+} , na atividade de lacase de *Pleurotus ostreatus*. Othman et al. (2014) e Coelho et al. (2019), verificam que os íons manganês causou um aumento da atividade de lacases em concentrações de até 1mM.

Figura 19: Efeito da concentração de sulfato de cobre (■), sulfato de manganês (▲) e sulfato de ferro (●) na atividade de lacase de *P. ostreatus*.



6.3. Pré-tratamento *in vitro* da ARBCs pelo extrato enzimático bruto produzido por *P. ostreatus*

O extrato enzimático bruto obtido no pico da produção de lacase durante a cinética de produção (4.2.3.3) por *Pleurotus ostreatus* foi empregado para a avaliação do pré-tratamento da água residuária do beneficiamento do café simulada em bancada (ARBCs), por meio de um Planejamento Fatorial 2^3 em busca das melhores condições na degradação de compostos fenólicos totais (CFT), diante das variáveis independentes: Agitação, pH e concentração de ARBCs. Para a agitação escolheu-se limite inferior de 0 rpm e limite superior de 120 rpm, o pH teve como limite inferior 4 (pH próximo ao da ARBCs) e superior 7 (pH utilizado na digestão anaeróbia) e a ARBCs com limite inferior de 60% e limite superior 100%, a temperatura foi fixada em 25°C, temperatura em que a enzima apresentou maior estabilidade e dentro da faixa ótima da lacase em estudo, os ensaios foram incubados com 55 U.L⁻¹ de lacase e o tempo de incubação em 24h.

A partir da Tabela 18, é possível observar que os maiores valores de degradação de CFT aconteceram no pH de 4, evidenciado pelo gráfico de Pareto (Figura 20), em que o aumento do pH apresentou efeito negativo. Os ensaios com maior degradação de compostos fenólicos foram: ensaio 1, ensaio 2, ensaio 5 e ensaio 6, com redução nos CFT de 41,0%, 48,5%, 35,6% e 46,1%, respectivamente, ensaios que tiveram em comum pH em 4. Esses resultados indicam a relevância da lacase na degradação dos CFT da ARBCs.

Tabela 18: Delineamento Fatorial 2^3 , degradação de Compostos Fenólico Totais (CFT) por extrato enzimático bruto de *P. ostreatus*

Ensaio s	Variáveis independentes			Variáveis dependentes	
	Agitação (rpm)	pH	Concentração de ARBCs (%)	Lacase (U.L ⁻¹)	Degradação de CFT (%)
1	(-1) 0	(-1) 4	(-) 60	51,54	41,0
2	(+1) 120	(-1) 4	(-) 60	49,83	48,5
3	(-1) 0	(+1) 7	(-) 60	39,89	16,1
4	(+1) 120	(+1) 7	(-) 60	45,23	20,8
5	(-1) 0	(-1) 4	(+) 100	52,56	35,6
6	(+1) 120	(-1) 4	(+) 100	43,08	46,1
7	(-1) 0	(+1) 7	(+) 100	36,33	18,6
8	(+1) 120	(+1) 7	(+) 100	41,51	24,7
9PC	(0) 60	(0) 5,5	(0) 80	49,82	31,7
10PC	(0) 60	(0) 5,5	(0) 80	49,66	31,1
11PC	(0) 60	(0) 5,5	(0) 80	50,61	32,2

Na Tabela 19 e no Gráfico de Pareto (Figura 20) verifica-se os efeitos individuais e das respectivas interações dos fatores, a nível de confiança de 95%. O pH foi a variável independente com maior influência no pré-tratamento, com efeito negativo de 22,79%, seguido pela agitação que gerou um efeito positivo de 7,2%, a concentração da ARBCs não foi estatisticamente significativa em relação a degradação de CFT. As interações entre as variáveis independentes foram significativas, as interações entre ARBCs e pH, e ARBCs e Agitação, tiveram efeito positivo de 3,5 % e 1,1%, respectivamente, no entanto, a Agitação e pH tiveram efeito negativo de 1,8%.

Figura 20: Diagramas de Pareto e significância das variáveis estudadas para o intervalo de confiança de 95% para Degradação de CFT.

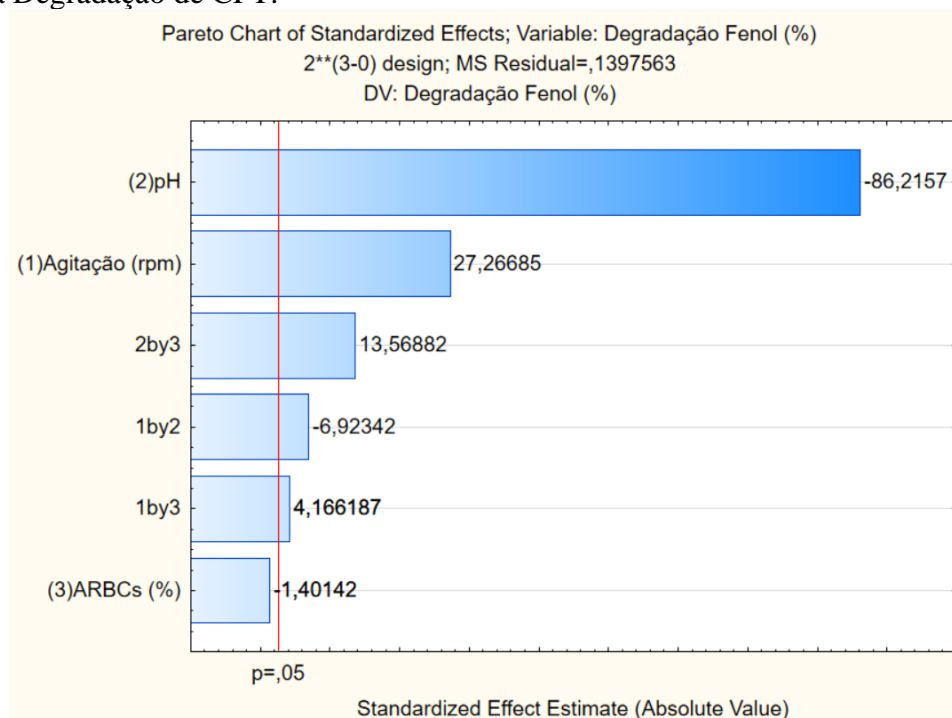


Tabela 19: Coeficientes de regressão do fatorial 2^3 para avaliação da Degradação de CFT por extrato enzimático bruto de *P. ostreatus*.

Variável	Remoção de compostos fenólicos			
	Efeito	Erro	t	p-valor
Média	31,449	0,108	291,413	0,000000
Agitação	7,208	0,264	27,267	0,000001 ***
pH	-22,791	0,264	-86,216	0,000000 ***
ARBCs	-0,370	0,264	-1,401	0,220005
Agitação x pH	-1,830	0,264	-6,923	0,000964 ***
Agitação x ARBCs	1,101	0,264	4,166	0,008771 ***
pH x ARBCs	3,587	0,264	13,569	0,000039 ***

Legenda: * variável estatisticamente significativa a $p \leq 0,1$; ** e caractere em negrito variável estatisticamente significativa a $p \leq 0,05$; *** variável estatisticamente significativa a $p \leq 0,01$;

A partir da Tabela 20, observa-se que a análise de variância comprova que o F calculado foi maior que o F tabelado e o valor de R^2 de 99,94 foi superior a 70%, conforme recomendado por Rodrigues e Iemma (2014). Portanto, foi construído os gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno em relação a remoção de CFT relacionando a interação entre as variáveis independentes concentração da ARBCs, pH inicial e a agitação (Figura 21).

Tabela 20: Análise de Variância (ANOVA) para a remoção de CFT por extrato enzimático bruto de *P. ostreatus*.

Fator	SQ	GL	QM	F_{calc}	F_{tab}	p-valor
Regressão	1177,865	4 (p-1)	294,466	2538,5	4,53	8,234
Resíduos	0,699	6 (n-p)	0,116			
Total	1178,564	10(n-1)				
R²	99,94					

Os gráficos de superfície de resposta obtidos a partir dos dados do Planejamento Fatorial 2³ estão apresentados a seguir nas Figura 21. Nota-se que com a redução do pH e maiores agitações, há um forte aumento da degradação de CFT (Figura 21A e 21B). Contudo a degradação de CFT é altamente sensível a variações de pH. Os valores mais altos de degradação foram obtidos em baixos valores de pH (Figura 21A, 21B, 21C e 21D). Achado verificado também por Asadgol et al. (2014), na remoção de fenol e bisfenol-A por lacase, sendo que valores de pH mais ácidos tiveram maior remoção, para ambos os poluentes. Margot et al. (2013), avaliaram a degradação pela enzima lacase de quatro tipos de poluentes, sendo eles: diclofenaco (DFC), ácido mefenâmico (MFA), triclosan (TCN) e bisfenol A (BPA), neste trabalho foi verificado uma forte influência do pH na taxa de remoção, o pH ideal para a degradação era dependente do composto, mas os maiores índices de degradação foram em faixa acida.

Bettin et al. (2019), estudaram a descoloração com os vinte e dois corantes por lacase de *Pleurotus sajor-caju* e verificaram que os melhores resultados em termos de percentagem de a descoloração, foram obtidos principalmente em pH ácidos, os resultados menos satisfatórios foram obtidos em pH 5,0, pois apenas seis corantes apresentaram descoloração após o tratamento. De acordo com Xu (1997), a influência do pH está ligado a dois efeitos opostos: a influência do pH no potencial redox da reação enzimática e a inibição da enzima pelo hidróxido ânions em pH alto.

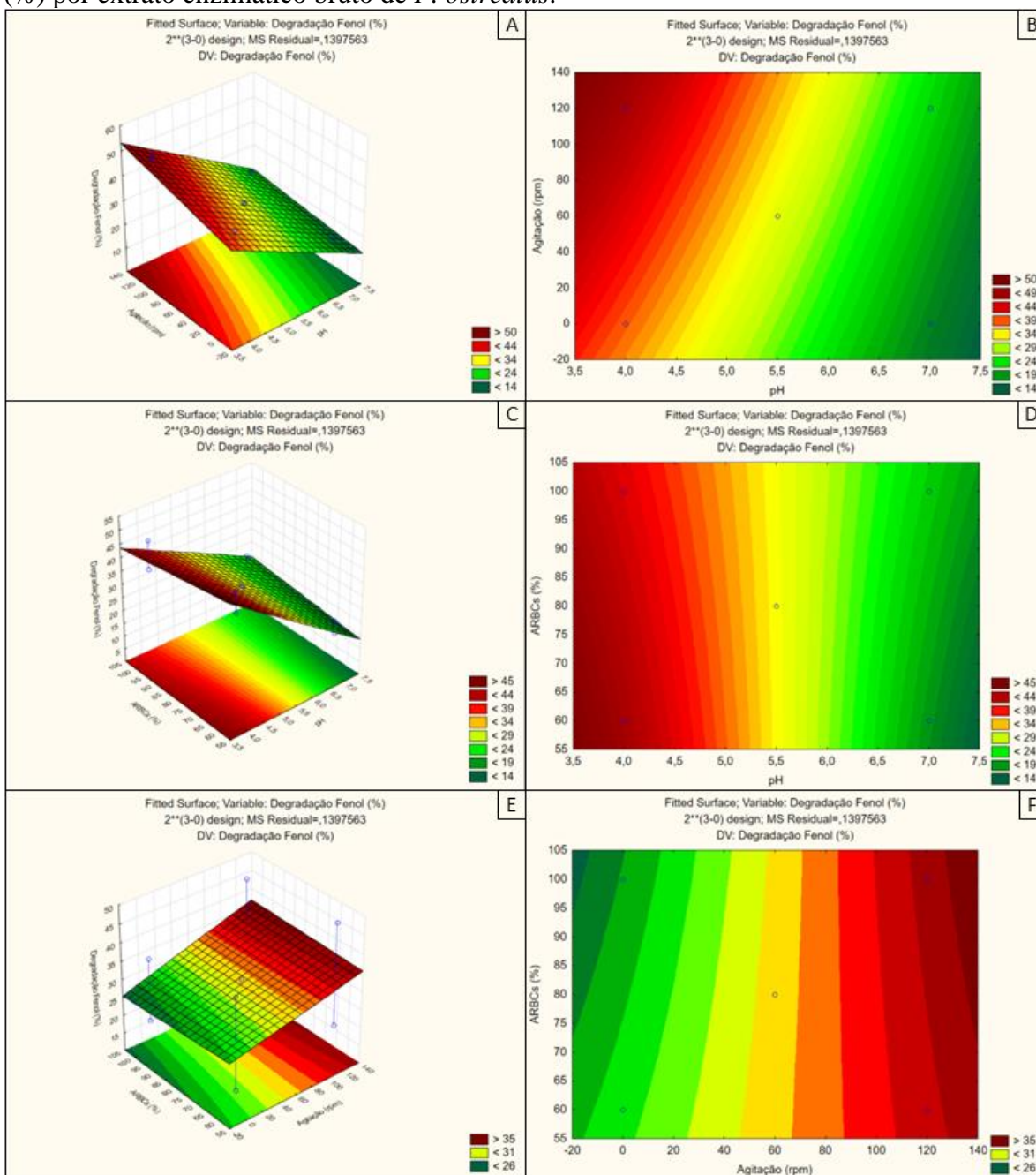
O efeito das concentrações da ARBCs sobre a degradação de CFT está apresentada na Figura 21C e 21E. Percebe-se que a concentração a ARBCs teve pouca influência na resposta, com um ligeiro aumento de degradação de CFT para concentrações de ARBCs mais altas. Assim, em uma primeira análise, pode-se inferir que a enzima lacase, deste estudo, demonstrou relativa tolerância a grandes variações de ARBCs, mostrando ainda a possibilidade de suportar águas residuárias mais concentradas.

Nas Figuras 21A e 21E observa-se o comportamento da variável alvo (Degradação de CFT) em relação a variáveis independentes agitação. Nota-se que com o aumento da agitação, há uma maior degradação de CFT, possivelmente devido auxílio da agitação na transferência de massa, assegurando que os substratos se liguem a superfície ativa da enzima, onde ocorre a reação catalisada. Além disso,

observa-se que quando altas agitações combinada com baixos pHs e maiores concentrações de ARBCs, tem-se um comportamento positivo na remoção de CFT.

Estudos *in vitro* demonstraram a capacidade de lacases degradar compostos fenólicos totais em outras águas residuárias. A lacase de *Corioloropsis rígida* promoveu redução de 42% nos CFT, com 24h de incubação, no tratamento da água residuária da produção de azeite (DÍAZ et al., 2010). Moreira (2021) avaliou o extrato bruto de *Pleurotus ostreatus* produzido em baixas concentrações de Água residuária do café solúvel, na degradação de compostos fenólicos da água residuária em maiores concentrações, em seu trabalho verificou degradação de até 32,28% nos CFT.

Figura 21: Planejamento Fatorial 2^3 – Gráficos de superfície e curva de contorno: degradação CFT (%) por extrato enzimático bruto de *P. ostreatus*.

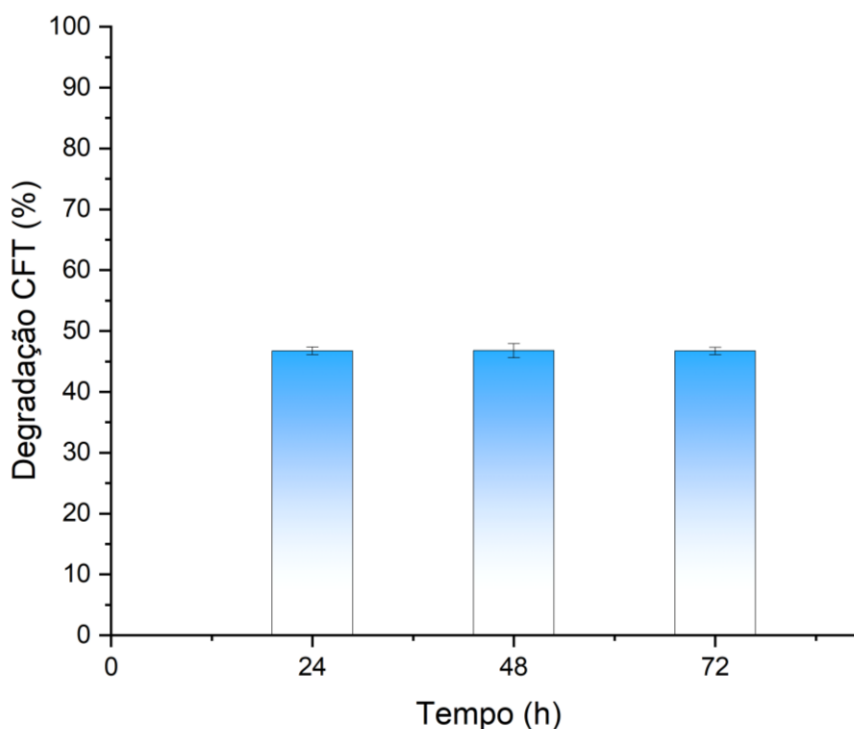


Legenda: A: Agitação x pH (superfície de resposta); B: Agitação x pH (curva de contorno); C: Agitação x

ARBCs (superfície de resposta); D: Agitação x ARBCs (curva de contorno); E: ARBCs x pH (superfície de resposta); F: ARBCs x pH (curva de contorno);

Após a seleção das variáveis no delineamento experimental Planejamento Fatorial 2^3 foi avaliado o efeito do tempo do pré-tratamento (24, 48 e 72h) sobre a degradação dos CFT empregando-se a condição otimizada no planejamento fatorial 2^3 , com agitação em 120 rpm, pH em 4, a ARBCs em 100% (ensaio 6). Na Figura 22, verifica-se que maiores tempos de tratamento não geraram maiores degradações de CFT, que se manteve em 46%, mesmo havendo atividade residual de grande parte da enzima lacase após 24h (Tabela 18). No estudo de Shao et al. (2007), os pesquisadores relatam o mesmo comportamento, com remoção máxima com 20h de incubação. A estagnação na degradação dos compostos fenólicos após 24 h, pode ser devido ao possível acúmulo dos produtos de degradação causando inibição da lacase, conforme relatado anteriormente por Russo et al. (2008) e demonstrado também por Bayramoğlu e Arica (2009).

Figura 22: Degradação de CFT (%) por extrato enzimático bruto de *P. ostreatus* com diferentes tempos de incubação. As barras indicam os limites superior e inferior de desvio padrão.



6.4. Digestão Anaeróbia da ARBCs

Após a análise do pré-tratamento com extrato enzimático bruto produzido *Pleurotus ostreatus*, as condições do ensaio 6 (ARBCs 100%, pH 4 e 120 rpm), com 24h de pré-tratamento foi escolhida para o estudo do potencial metanogênico, em comparação com ARBCs não tratada e com um ensaio com as mesmas condições do ensaio 6, porém com o extrato enzimático desnaturado, com intuito de avaliar o efeito da lacase e possíveis metabolitos secundários produzidos pelo fungo na DA. O ensaio

6 foi selecionado, pois apresentou 46,1% de degradação de CFT sem a necessidade de ajuste do pH, pois foi o mesmo pH da ARBCs e não necessitou a diluição da ARBCs.

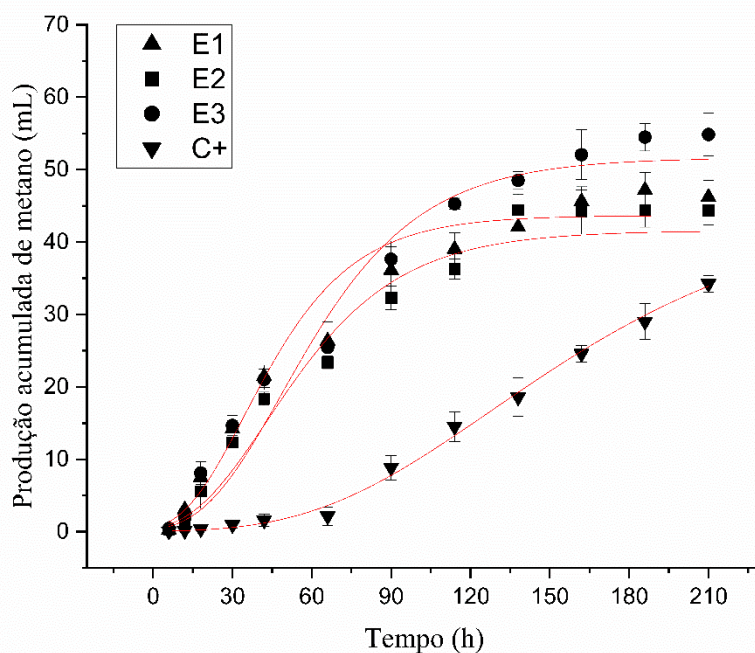
A partir da Tabela 21, é possível visualizar a Produção máxima de metano acumulada ($P_{m\acute{a}x}$), velocidade máxima de produção metanogênica ($k_{m\acute{a}x}$) e o período até o início da produção de metano (λ). O ajuste de Gompertz modificado para a produção metanogênica retornou valores médios de produção máxima de metano acumulada ($P_{m\acute{a}x}$) para o ensaio com pré-tratamento (E2) de 41,56,7 mL, enquanto os ensaios com extrato enzimático desnaturado (E3) e ARBCs sem tratamento (E1), apresentaram um valor médio de 41,64mL e 43,66 mL, respectivamente. Para o controle positivo (C+) a produção máxima de metano acumulada média foi de 45,39 mL. O início da produção de metano (λ) para E1 e E2 foram próximos, com 14,84h e 11,55h, respectivamente, para o E3 foi verificado λ de 19,22h. Os valores das velocidades máximas de produção de metano ($k_{m\acute{a}x}$), para o E2 foi de 1,4758 mL.h⁻¹, enquanto para E3 e E1 a velocidade máxima de produção metanogênica média foi superior com um valor de 1,759 e 1,898 mL.h⁻¹, respectivamente.

Os resultados obtidos a partir da análise dos parâmetros indicam que o pré-tratamento da água residuária do beneficiamento do café não resultou em um aumento na produção de metano, conforme evidenciado na Figura 23 e nos ajustes de Gompertz modificados para os dados experimentais de produção acumulada de metano. Apesar da complexidade dos constituintes dessa água residuária, observou-se que ela não inibiu a atividade do lodo anaeróbico, demonstrando capacidade de alcançar uma produção máxima de metano superior em comparação com a ARBCs pré-tratada.

Tabela 21: Parâmetros de ajuste de Gompertz modificado.

Ensaio	$P_{m\acute{a}x}$ (mL)	$k_{m\acute{a}x}$ (mL.h ⁻¹)	λ (h)	R^2
ARBCs sem pré-tratamento (E1)	43,66 ± 1,7	1,898± 0,17	11,55 ± 0,53	0,987
ARBCs Pré-tratada (E2)	41,56 ± 2,9	1,475± 0,15	14,84 ± 3,2	0,973
ARBCs + Extrato enzimático desnaturado (E3)	51,64 ± 3,0	1,759± 0,17	19,22 ± 2,7	0,987
Controle positivo (C+)	45,39 ± 2,7	0,680± 0,01	61,1 ± 2,9	0,997

Figura 23: Produção acumulada de metano.



Legenda: E1 (ARBCs sem pré-tratamento); E2 (ARBCs pré-tratada); E3 (ARBCs + Extrato enzimático desnaturado); C+ (controle positivo com celulose microcristalina)

MOSQUERA et al. (2019) realizaram um estudo sobre a oxidação avançada com peróxido de hidrogênio e radiação UV, como pré-tratamento da digestão anaeróbia da água residuária do café solúvel, buscando a remoção dos compostos recalcitrantes dessa água residuária e melhoria da DA. Os autores alcançaram um percentual de redução de taninos de 70,53%, no entanto, não houve êxito na melhoria da DA.

Huaccha Cabrera (2022), estudou a digestão anaeróbia das águas residuárias da produção de café solúvel, neste estudo a autora verifica que a degradação dos compostos fenólicos pela digestão anaeróbia fez que a concentração de metano aumentasse, mesmo esses compostos sendo tóxicos ao metabolismo das arqueias metanogênicas. Vítěz et al. (2016), verificam que mesmo com a presença de compostos inibitórios como a cafeína, taninos e polifenóis na borra do café, não houve nenhuma inibição da produção de metano durante a DA. Suidan et al. (1988), avaliaram diferentes compostos fenólicos, em seu estudo foi verificado que esses compostos podem causar efeitos tóxicos aos microrganismos anaeróbios em concentrações maiores que 363 mg.L^{-1} .

Gerasimenya et al. (2002), avaliaram quatorze cepas de *Pleurotus ostreatus* como produtores de compostos bioativos, os extratos produzidos por todos os fungos apresentaram atividade antimicrobiana, uma das cepas selecionadas inibiram tanto bactérias Gram positivas, quanto Gram negativas. Kalyoncu et al. (2010), verificam o mesmo achado, estudando a atividades antimicrobianas de dez diferentes fungos, os fungos *P. ostreatus* e *M. giganteus* foram as espécies de maior potencial contra bactérias e leveduras. Os estudos realizados por Gerasimenya et al. (2002)

e Kalyoncu et al. (2010) demonstram que muitas cepas de *P. ostreatus* podem produzir metabólitos secundários que agem como inibidores da atividade bacteriana, o que pode explicar uma menor produção de metano para os ensaios com o pré-tratamento, onde o extrato enzimático estava ativo.

Os resultados do presente estudo sugerem que os compostos fenólicos em concentrações não inibitórias podem ser usados como substrato pelos microrganismos anaeróbios, que o utilizariam como fonte de carbono devido à redução da biodisponibilidade de outros substratos, comportamento relatado também por Suárez (2018) na digestão anaeróbia da ARBC. Além disso, há a possibilidade do *P. ostreatus* do presente estudo produzir metabólitos secundários que agem como inibidores do consórcio anaeróbio.

7. CONCLUSÕES

- O fungo *P. ostreatus* tolerou a ARBC em todas as concentrações estudadas, mesmo sem esterilização do meio, sendo capaz de descolorir a ARBC sem diluição, mostrando-se promissor para estudos de descoloração de águas residuárias.
- A ARBC apresentou-se como indutor da produção da enzima lacase, demonstrando que a ARBC tem um grande potencial como substrato para produção dessa enzima.
- Os indutores enzimáticos, CuSO_4 e MnSO_4 promoveram uma forte influência positiva sobre a produção de lacase.
- A agitação e valores de pH mais elevados, geraram altas remoções de DQO, uma das maiores verificadas para o fungo *P. ostreatus*, sugerindo o potencial de aplicação *in vivo* de *P. ostreatus* no tratamento da ARBC.
- Os altos valores de meia vida, temperatura e pH ótimos abre novas janelas de aplicação para a atual lacase de *P. ostreatus*, além da região ácida de pH e em uma ampla faixa de temperatura.
- Embora o pré-tratamento enzimático não tenha aumentado a produção de metano da ARBCs, esse demonstra grande potencial para remoção de CFT.
- Os dados de biodegradabilidade anaeróbia sugerem que baixas concentrações de CFT, podem ser importantes para produção de metano.

8. ESTUDOS FUTUROS PROPOSTOS

O trabalho abrangeu várias fases e levantou diversas hipóteses. Diante disso, este item aponta oportunidades para investigações futuras.

- Avaliar a purificação da lacase produzida por *P. ostreatus* em ARBC.
- Avaliar a produção da enzima lacase em reatores em bancada em comparação com os frascos agitados.
- Estudar menores tempos de pré-tratamento e avaliar os compostos fenólicos que estão sendo degradados pelo extrato enzimático de *P. ostreatus*.
- Avaliar concentrações crescentes de ARBC, para determinar a concentração de CFT inibitória para a digestão anaeróbia e aplicar o pré-tratamento enzimático da ARBC em condições de inibição metanogênica.
- Avaliar a aplicação do fungo *P. ostreatus* no pós-tratamento *in vivo* da digestão anaeróbia, voltados para remoção de DQO e compostos fenólicos.

REFERÊNCIAS

- ABAD, P. M. **Valorização de resíduos agro-industriais por processos de digestão anaeróbia**. 2015. Tese de Doutorado. 00500:: Universidade de Coimbra.
- ALEMAYEHU, Y. A.; ASFAW, S. L.; TIRFIE, T. A. Management options for coffee processing wastewater. A review. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 22, n. 2, p. 454–469, 2020.
- ALMEIDA, C. D. G. C. DE; SILVA, I. J. O uso de águas residuárias do beneficiamento do café. **THESIS São Paulo**, v. 6, n. 3, p. 30–43, 2006.
- 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.
- ANCY JENIFER, A. et al. Evaluation of efficacy of indigenous acidophile- bacterial consortia for removal of pollutants from coffee cherry pulping waste water. **Bioresource Technology Reports**, v. 11, n. May, p. 100533, 2020.
- APHA, A. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association. **Inc., Washington, DC**, 2012.
- ARCURI, M. DE L. C. **Caracterização dos genes da família das lacases de eucalipto (*eucalyptus grandis*)**. Universidade Estadual Paulista. 2016.
- ASADGOL, Z. et al. Removal of phenol and bisphenol-A catalyzed by laccase in aqueous solution. **Journal of Environmental Health science and engineering**, v. 12, p. 1-5, 2014.
- ASHA, G.; KUMAR, B. Performance Evaluation of Sequencing Batch Reactor for Treatment of Coffee Pulping Wastewater. **Journal of Scientific Research and Reports**, v. 9, n. 5, p. 1–9, 2016.
- 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.
- BALLAMINUT, Nara. **Caracterização do processo de descoloração de corante reativo diazo por basidiomicetos tropicais**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2016.
- BALLAMINUT, N. et al. Descoloração in vitro e in silico de corante reativo pela lacase de fungo de Basidiomiceto. In: **Conhecimento, conservação e uso de fungos**. p. 107.2019.
- 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.
- BAPTISTA, N. M. Q. et al. Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos. v. 8, n. 1, 2012.
- BARR, D.P.; AUST, S.D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science and Technology**, v. 28, n. 2, p. 78-87, 1994.
- 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. \
- BAYRAMOĞLU, G.; ARICA, M. . Immobilization of laccase onto poly (glycidylmethacrylate) brush grafted poly (hydroxyethylmethacrylate) films: Enzymatic oxidation of phenolic compounds. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 6, p. 1990-1997, 2009.
- BEHBAHANI, M. et al. Using Chou’s General Pseudo Amino Acid Composition to Classify Laccases from Bacterial and Fungal Sources via Chou’s Five-Step Rule. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 190, n. 3, p. 1035–1048, 1 mar. 2020.
- 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.

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.

BETTIN, F. et al. Effects of pH, temperature and agitation on the decolourisation of dyes by laccase-containing enzyme preparation from *Pleurotus sajor-caju*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 2019.

BEYENE, A. et al. Experimental evaluation of anaerobic digestion for coffee wastewater treatment and its biomethane recovery potential. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 7, p. 1881–1886, 2014.

BESERRA, E. S. S. et al. **Efeito do inóculo sobre a expressão de lacase por *Lentinus crinitus* CCIBt2611**. 2023.

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.

BLIKA, P. S. et al. Anaerobic digestion of olive mill wastewater. **Global NEST Journal**, v. 11, n. 3, p. 364–372, 2009.

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.

BONADIO, C. et al. **Effect of addition of cellulosic materials in anaerobic digestion of hydrothermal liquefaction wastewater XII DAAL - Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion** Cuzco, Peru, 2016.

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.

BRUNO, M.; OLIVEIRA, R. A. DE. Tratamento anaeróbio de águas residuárias do beneficiamento de café por via úmida em reatores uasb em dois estágios. **Eng. Agríc., Jaboticaba**, p. 364–377, 2008.

BÜCHS, Jochen. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 7, n. 2, p. 91–98, 2001.

BURATTO, A. P.; COSTA, R. D.; FERREIRA, E. S. Aplicação de biomassa fúngica de *Pleurotus ostreatus* em processo de biossorção de íons cobre (II). **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 17, p. 413–420, 2012.

CASTRO, V. G. DE et al. **Deterioração e preservação da madeira**. primeira ed. MossoróRN: Editora Universitária (EdUFERSA). 2018.

CAVALEIRO, A.; ALVES, M. Digestão anaeróbia. **Revista de Ciência Elementar**, v. 8, n. 1, 30 mar. 2020.

CECAFE, C. DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO B. **Relatório mensal do café julho 2023**. , 2023.

CHAGAS, P. M. B. et al. Immobilized soybean hull peroxidase for the oxidation of phenolic compounds in coffee processing wastewater. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 568–575, 2015.

CHAPLEUR, O. et al. Increasing concentrations of phenol progressively affect anaerobic digestion of cellulose and associated microbial communities. **Biodegradation**, v. 27, n. 1, p. 15–27, 2016.

CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4044–4064, 1 jul. 2008.

- CHMELOVÁ, D.; ONDREJOVIC, M. Effect of potential inducers on laccase production by white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 3, p. 84, 2014.
- COELHO, Glauciane Danusa. Purificação parcial do sistema enzimático produzido por *Psilocybe castanella* CCB444 durante crescimento em solo. **Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente**, 2007.
- 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.
- COELHO, M. do P. S. de L. V., Barbosa, E. E. P., Pimenta, L., Batista, S. C. P., Prado, F. B., Martim, S. R., Filho, R. F. da C., & Teixeira, M. F. S. Alternative of nutritional sources for the development of the mycelial phase and production of hydrolases by edible mushroom from tropical forest. *Brazilian Journal of Development*, 7(3), 22890–22907, 2021.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de café. v. 9, n. 3, p. 1–65, 2022.
- CONRAD, R. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 28, n. 3, p. 193–202, 1 mar. 1999.
- CORRÊA, C. L. O. et al. Enzymatic Technology Application on Coffee Co-products: A Review. **Waste and Biomass Valorization**, n. 0123456789, 2020.
- CRUZ-SALOMÓN, A. et al. Evaluation of hydraulic retention time on treatment of coffee processing wastewater (ARBC) in EGSB bioreactor. **Sustainability (Switzerland)**, v. 10, n. 1, 2017.
- DAMASCENO, A. A. **Purificação e caracterização da lacase do fungo *trametes cubensis* (mont.) sacc. 1891**. Universidade federal do Amazonas. 2016.
- DARONCH, N. A. et al. **Elucidating the choice for a precise matrix for laccase immobilization: A review**. **Chemical Engineering Journal** Elsevier B.V., , 1 out. 2020.
- DEUBLEIN, Dieter; STEINHAUSER, Angelika. Biogas from waste and renewable resources: an introduction. **John Wiley & Sons**, 2011.
- DHOUB, A.; HAMZA, M.; ZOUARI, H.; MECHICHI, T.; H'MIDI, R.; LABAT, M.; MARTÍNEZ, .M.J.; SAYADI, S. Autochthonous fungal strains with high ligninolytic activities from Tunisian biotopes. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 5, p. 431-436, 2005.
- DIAS, E. C. et al. Biogenic amine profile in unripe arabica coffee beans processed according to dry and wet methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 16, p. 4120–4125, 25 abr. 2012.
- DÍAZ, R. et al. Biochemical and molecular characterization of *Coriolopsis rigida* laccases involved in transformation of the solid waste from olive oil production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 88, p. 133–142, 2010.
- DURÁN, C. A. A. et al. **Coffee: General aspects and its use beyond drink**. **Revista Virtual de Química** Sociedade Brasileira de Química, , 1 jan. 2017.
- DURAN, N; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied catalysis B: environmental**, v. 28, n. 2, p. 83-99, 2000.
- EMBRAPA. **Mistura de enzimas mostrou alto desempenho para gerar etanol a partir de bagaço de cana**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/52639673/mistura-de-enzimas-mostrou-alto-desempenho-para-gerar-etanol-a-partir-de-bagaco-de-cana>>. Acesso em: 4 nov. 2022.

- ESPOSITO, Elisa. **Processos envolvidos no tratamento biológico de efluentes: aplicação de um biorreator de leite recheado**. Tese de Doutorado, 1992.
- FARACO, V.; PEZZELLA, C., MIELE, A., GIARDINA, P., SANNIA, G. Bio-remediation of colored industrial wastewaters by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and their enzymes. **Biodegradation**, v. 20, n. 2, p. 209-220, 2009.
- 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.
- FLORES, C. et al. Production of laccases by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation in co-culture with *Trichoderma viride*. **Journal of applied microbiology**, v. 108, n. 3, p. 810-817, 2010.
- 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, 2002.
- 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.
- GIARDINA, P.; PALMIERI, G.; SCALONI, A.; FONTANELLA, B.; FARACO, V.; CENNAMO, G.; SANNIA, G. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biochemistry Journal**, v. 341, p. 655-663, 1999.
- GODÍNEZ, R. D. **Efecto del pH inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida sobre su actividad de lacasas**. 2012. Tese de Doutorado.
- GOLVEIA, J. C. S. et al. Resíduos agroindustriais substituindo indutores sintéticos na produção de lacase fúngica. **Cognoscere**, v. 2, n. May, 2021.
- GUTIÉRREZ, A. et al. Hyphal-sheath polysaccharides in fungal deterioration. **Science of the Total Environment**, v. 167, n. 1-3, p. 315-328, 1995.
- HALL, R. D.; TREVISAN, F.; DE VOS, R. C. H. Coffee berry and green bean chemistry – Opportunities for improving cup quality and crop circularity. **Food Research International**, vol. 151, 1 Jan. 2022.
- HEINZ, O. L. **Aplicação do fungo de degradação branca *pleurotus ostreatus* (eb 016) na biorremediação do efluente da indústria de compensado**. [s.l.] Universidade tecnológica federal do paraná. 2017.
- HENN, C. et al. Biodegradation of atrazine and ligninolytic enzyme production by basidiomycete strains. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 266, p. 1–12, 2020.
- HERNANÁNDEZ-SÁENZ, D. et al. Evaluación del consorcio entre *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* y bacterias aeróbicas para remoción de colorantes sintéticos. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 22, n. 1, p. 45–59, 1 jan. 2020.
- 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.
- HOM-DIAZ, A. et al. Enzymatic pretreatment of microalgae using fungal broth from *Trametes versicolor* and commercial laccase for improved biogas production. **Algal Research**, v. 19, p. 184–188, 1 nov. 2016.
- 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.
- HOYOS, S. L. M. **Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de lacase**. [s.l.] Universidade tecnológica federal do paraná. 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.

- HUACCHA CABRERA, K. Y. **Digestão anaeróbia das águas residuárias da produção de café solúvel**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2022.
- 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.
- JANUSZ, G. et al. **Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation**. **Enzyme and Microbial Technology**, 10 jan. 2013.
- JUNIOR, N. L. **Estudo de lacases fúngicas para degradação de compostos interferentes endócrinos**. Dissertação de Mestrado. Universidade da Região de Joinville, 2010.
- JUNIOR, N. L. et al. Laccase production by the aquatic ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03 and the white rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 during submerged cultivation on banana peels and enzyme applicability for the removal of endocrine-disrupting chemicals. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 167, p. 1144-1156, 2012.
- JUNIOR, W. DE S. B. **Aplicação de pectinases, lacases e hemicelulases no prétratamento das fibras da cana energia para a produção de biogás**. Instituto federal de educação ciência e tecnologia de goiás, 2019.
- KIRAN, S. et al. Comparative study on decolorization of Reactive Dye 222 by white rot fungi *Pleurotus ostreatus* IBL-02 and *Phanerochaete chrysosporium* IBL-03: **Academic Journals**, 6: 3639-3650 p. 2012.
- KALYONCU, F. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of mycelia of 10 wild mushroom species. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 2, p. 415-419, 2010.
- KRAMER, K. J. et al. Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. **Tetrahedron**, v. 57, p. 385–392, 2001.
- KŘESINOVÁ, Z. et al. Biodegradation of endocrine disruptors in urban wastewater using *Pleurotus ostreatus* bioreactor. **New Biotechnology**, v. 43, p. 53–61, 2018.
- KUMAR, V. Vinoth et al. Biochemical characterization of three phase partitioned laccase and its application in decolorization and degradation of synthetic dyes. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**, v. 74, n. 1-2, p. 63-72, 2012.
- KUNZ, AIRTON; STEINMETZ, RICARDO LUIS RADIS; DO AMARAL, ANDRÉ CESTONARO. Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato. **Embrapa Suínos e Aves-Livro científico**, 2019.
- LACERDA, M. F. A. R. **DEGRADAÇÃO DE HORMÔNIO SINTÉTICO POR MEIO DE LACASES FÚNGICAS IMOBILIZADAS EM FIBRAS DE *Luffa cylindrica***. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS ESCOLA, 2015.
- 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.
- LEITE, P. et al. ScienceDirect Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 27, p. 100407, 2021.
- LI, Y.; XU, H.; HUA, D.; ZHAO, B.; MU, H.; JIN, F.; MENG, G.; FANG, X. Two-phase anaerobic digestion of lignocellulosic hydrolysate: focusing on the acidification with different inoculum to substrate ratios and inoculum sources. **Science of the Total Environment**, 699: 134226., 2020.
- LIMA, L. M. et al. Behavioral aspects of the coffee consumer in different countries : The case of Brazil. In: **Coffee Consumption and Coffee Industry Strategies in Brazil**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. p. 321–341.

- LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of American Chemistry Society**, v. 56, p. 658-666, 1934.
- LIU, Y.; WHITMAN, W. B. **Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea**. Annals of the New York Academy of Sciences. **Anais...**Blackwell Publishing Inc., 2008.
- LOPES, R. DE O. et al. Atrazine, desethylatrazine (DEA) and desisopropylatrazine (DIA) degradation by *Pleurotus ostreatus* INCQS 40310. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 38, n. 6, p. 415–430, 1 nov. 2020.
- LORENZO, M. et al. Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds. **Chemosphere**, v. 60, n. 8, p. 1124-1128, 2005.
- LU, X.; DING, S. Effect of Cu²⁺, Mn²⁺ and aromatic compounds on the production of laccase isoforms by *Coprinus comatus*. **Mycoscience**, v. 51, n. 1, p. 68-74, 2010.
- 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.
- 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.
- MANUBENS, A. et al. Manganese affects the production of laccase in the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. **FEMS microbiology letters**, v. 275, n. 1, p. 139-145, 2007.
- MARGOT, Jonas et al. Influence of treatment conditions on the oxidation of micropollutants by *Trametes versicolor* laccase. **New biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 803-813, 2013.
- MASJOURI, M. et al. Pharmaceuticals removal by immobilized laccase on polyvinylidene fluoride nanocomposite with multi-walled carbon nanotubes. **Chemosphere**, v. 263, 1 jan. 2021.
- MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, p. 551–55, 2002.
- MCILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 183-186, 1921.
- 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.
- MOREIRA, F. S. **Valoração da água residuária da produção de café solúvel para a produção de lacase**. Universidade Federal de Campina grande. 2021.
- MOREIRA, F. S. et al. Utilização de fungo basidiomiceto para o pós-tratamento em estado sólido de reator asbbr no tratamento da água residuária do café solúvel. congresso nacional de microbiologia, 2023.
- 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.
- MOREIRA NETO, Sergio Luiz. **Caracterização de lacase de *Peniophora cinerea* e estudo do potencial de aplicação biotecnológica**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2012.
- MOREIRA-NETO, S. L. et al. Decolorization of salt-alkaline effluent with industrial reactive dyes by laccase-producing basidiomycetes strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 283–290, 2013.
- MURTHY, P. S.; MADHAVA NAIDU, M. Sustainable management of coffee industry by-products and value

addition - A review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 66, p. 45–58, 2012.

MUSSATTO, S. I. et al. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. **Food and Bioprocess Technology**, jul. 2011.

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, 2019

NAVADA, K. K.; KULAL, A. Enhanced production of laccase from gamma irradiated endophytic fungus: A study on biotransformation kinetics of aniline blue and textile effluent decolourisation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 2, 1 abr. 2020.

NAVITHA, K. R.; KOUSAR, H. Efficiency of *Aspergillus niger* in Reducing Certain Physicochemical Parameters of Coffee Effluent. **Global Journal of Current Research**, v. 5, n. 4, p. 193–196, 2017.

NAVITHA K R , HINA KOUSAR, N. K. R. , H. K. A Comparative Study on the Potential of *Aspergillus Niger* and *Aspergillus Flavus* for the Treatment of Coffee Processing Effluent. **International Journal of Environment, Ecology, Family and Urban Studies**, v. 8, n. 4, p. 17–22, 2018.

NOVITA, E. Biodegradability Simulation of Coffee Wastewater Using Instant Coffee. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 9, p. 217–229, 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.

OLIVEIRA, F. DE et al. Biosynthesis of natural colorant by *Talaromyces amestolkiae*: mycelium accumulation and colorant formation in incubator shaker and in bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, n. June, 2020.

OTHMAN, A. M. et al. Purification, biochemical characterization and applications of *Pleurotus ostreatus* ARC280 laccase. **Br Microbiol Res J**, v. 4, n. 12, p. 1418-1439, 2014.

PACHECO, S.; SOARES, C. H. L. Imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleras. **Química Nova**, v. 37, p. 209-214, 2014.

PALMIERI, G. et al. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 50, p. 31301-31307, 1997.

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.

PASQUAL, M.; RIBEIRO, V. G.; BARROS, I. de. Influência da chapa aquecedora e autoclave sobre o pH do meio de cultura. 1992.

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, H. et al. Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1. **3 Biotech**, v. 4, n. 1, p. 77-84, 2014.

PATEL, N. et al. Mode of Action, Properties, Production, and Application of Laccase: A Review. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 13, n. 1, 2019.

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.

PERIASAMY, R.; PALVANNAN, T. Optimization of laccase production by *Pleurotus ostreatus* IMI 395545 using the Taguchi DOE methodology. **Journal of Basic Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 548-556, 2010.

PIN, B. V. DA R. et al. Energetic use of biogas from the anaerobic digestion of coffee wastewater in southern Minas Gerais, Brazil. **Renewable Energy**, v. 146, p. 2084–2094, 2020.

PLACKETT, R. L., and J. P. Burman. “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.](http://www.jstor.com/stable/2332195)” *Oxford University Press on behalf of Biometrika Trust* 33(4): 305–25, 1946.

PINTO, A. A. D. S. **Eficiência de extrativos da folha de tectona grandis l.f na inibição de fungos apodrecedores de madeira.** Faculdade De Tecnologia Universidade De Brasília. 2020.

PINTO, M. P. M. **Valorização e aproveitamento energético através da tecnologia de digestão anaeróbia de resíduos de café.** [s.l.] Universidade Estadual de Campinas. 2017.

POZDNYAKOVA, N. et al. The degradation of three-ringed polycyclic aromatic hydrocarbons by wood-inhabiting fungus *Pleurotus ostreatus* and soil-inhabiting fungus *Agaricus bisporus*. **Fungal Biology**, v. 122, n. 5, p. 363–372, 1 maio 2018.

POZDNYAKOVA, N. N.; RODAKIEWICZ-NOWAK, J.; TURKOVSKAYA, O. V. Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 1, p. 19-24, 2004.

PRABAKAR, D.; K., S.S.; Manimudi, V.T.; Mathimani, T.; Kumar, G.; Rene, E.R.; Pugazhendhi, A. Pretreatment technologies for industrial effluents: Critical review on bioenergy production and environmental concerns. **Journal of Environmental Management**, 218: 165-180, 2018.

RAMPINELLI, J. R. et al. **Utilização da casca de banana para a produção de lacase por *Pleurotus sajor-caju* CCB 019.** Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

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.

REN, D. et al. **Recent environmental applications of and development prospects for immobilized laccase: a review.** *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* Taylor and Francis Ltd., , 2020.

RICACZESKI, C. C. **Produção de enzimas ligninolíticas a partir de um processo fermentativo em efluente têxtil por *phanerochaete chrysosporium*.** Universidade Tecnológica Federal Do Parana. 2020.

RIVERA-HOYOS, C. M. et al. Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**, v. 27, n. 3-4, p. 67-82, 2013.

RIGO, D. et al. Produção Microbiológica de Enzimas: uma Revisão. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, p. 9232–9254, 2021.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental design and process optimization.** Crc Press, 2014.

ROSSETTI, R. P. **Determinação de fenóis totais em frutos do café: avaliações em diferentes fases de maturação.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2007.

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.

RUSSO, M. E. et al. Assessment of anthraquinone-dye conversion by free and immobilized crude laccase mixtures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 6, p. 521-530, 2008.

SAAT, Muhammad Naziz et al. Modeling of growth and laccase production by *Pycnoporus sanguineus*. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 37, p. 765-775, 2014.

SAITO, T., KATO, K., YOKOGAWA, Y., NISHIDA, M. & YAMASHITA, N. 2004. Detoxification of bisphenol a and nonylphenol by purified extracellular laccase from a fungus isolated from soil. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 98: 64–66.

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.

- SAMPAIO, P. R.; HADDAD, D. S.; WIENDL, D. V. B. UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS EM PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA PRODUÇÃO DA ENZIMA TANASE. **Sinergia**, v. 19, p. 152–156, 2018.
- SANTOS, E. C. et al. Degradação do repelente DEET pelas lacases do *Pleurotus ostreatus*. **Revista de Divulgação Científica Sena Aires**, v. 8, n. 2, p. 160-169, 2019.
- SANTOS, L. G. B. et al. Produção e Caracterização de Lacase de *Pleurotus ostreatus* cultivado em Casca de Arroz. **Blucher Biochemistry Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 397-397, 2015.
- SAPARRAT, Mario CN et al. Transformation of the water soluble fraction from “alpeorujo” by *Coriolopsis rigida*: the role of laccase in the process and its impact on *Azospirillum brasiliense* survival. **Chemosphere**, v. 78, n. 1, p. 72-76, 2010.
- SCHLOSSER, D. **Laccases in Bioremediation and Waste Valorisation**. 33. ed. 2020.
- SCHROYEN, M. et al. Impact of enzymatic pretreatment on corn stover degradation and biogas production. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 59–66, 1 dez. 2014.
- SELVAMURUGAN, M.; DORAISAMY, P.; MAHESWARI, M. An integrated treatment system for coffee processing wastewater using anaerobic and aerobic process. **Ecological Engineering**, v. 36, n. 12, p. 1686–1690, 2010.
- SENAR – Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. Café: classificação e degustação. **Serviço Nacional de Aprendizagem Rural**. – Brasília: SENAR, 2017.
- 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.
- SHAO, J.; GE, H.; YANG, Y. Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan–SiO₂ gel for removal of aqueous phenol. **Biotechnology letters**, v. 29, p. 901-905, 2007.
- SHARMA, D. et al. **Greener approach for pulp and paper industry by Xylanase and Laccase. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** Elsevier Ltd, , 1 maio 2020.
- SILVA, E.; MARTINS, S.; MILAGRES, A.M.F. Extraction of manganese peroxidase produced by *Lentinula edodes*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2471- 2475, 2008.
- SILVA, F. D. D. S. **Deterioração da madeira de *Piptadenia moniliformis* benth. E *pinus* sp. Pela podridão branca e parda em ensaios de laboratório**. Universidade federal rural do Semi-árido. 2020.
- SILVA, G. A. et al. Avaliação do potencial de degradação de fungos causadores de podridão branca. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, n. 2, p. 225-231, 2010.
- SILVA, M. A.. **Pré-tratamento fúngico para a melhoria da biodegradabilidade anaeróbia de água residuária da produção de café solúvel (ARCS)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2022.
- SILVEIRA, T. R. **IMOBILIZAÇÃO DE LACASE EM PARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS COM QUITOSANA PARA APLICAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2019.
- SINGH, D.; GUPTA, N. Microbial Laccase: a robust enzyme and its industrial applications. **Biologia** (, v. 75, n. 8, p. 1183–1193, 2020.
- SINGH, R. L.; SINGH, P. K.; SINGH, R. P. **Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes - A review. International Biodeterioration and Biodegradation** Elsevier Ltd, , 1 out. 2015.

- SOUZA, T. J. S. M. DE. **Casca de *Astrocaryum aculeatum* Meyer como substrato para produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* LM 6226 para remoção de composto recalcitrante.** [s.l.] UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS, 2018.
- STAMS, A. J. M.; PLUGGE, C. M. **Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea.** *Nature Reviews Microbiology*, 2009.
- SUÁREZ, W. A. B. **High-rate anaerobic reactors treating coffee processing wastewater at different OLR and post-treatments: effects on methane production, effluent quality and microbial populations.** Universidade Estadual Paulista. 2018.
- SUIDAN, Makram T. et al. Anaerobic biodegradation of phenols inhibition kinetics and system stability. *Journal of environmental engineering*, v. 114, n. 6, p. 1359-1376, 1988.
- TAVARES, A. P. M. et al. Laccase improvement in submerged cultivation: Induced production and kinetic modelling. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 80, n. 6, p. 669–676, jun. 2005.
- THANGAMANI, A., Parthiban, R.; Management of industrial tannery solid waste for biogas production. **Lambert Academic Publishing GmbH & CO**, Saarbrücken, Germany, 2011.
- TOLEDO, André Luiz Lopes. **EMISSÕES DE GASES DE EFEITO ESTUFA DA MOBILIDADE URBANA: O CASO DE NATAL.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2019.
- 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.
- TUCKER, R. Biogas derived from...coffee? *Renewable Energy Focus*, v. 15, n. 5, p. 14–15, 2014.
- VEERESH, G.S.; KUMAR, P.; MEHROTA, I. Treatment of phenol and cresol in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) process: a review. *Water Research*, Oxford, v.39, p.154-70, 2005.
- 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.
- VÍTĚZ, Tomáš et al. On the spent coffee grounds biogas production. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, v. 64, n. 4, p. 1279-1282, 2016.
- WENG, C.; PENG, X.; HAN, Y. **Depolymerization and conversion of lignin to value-added bioproducts by microbial and enzymatic catalysis.** *Biotechnology for Biofuels* BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2021.
- WESENBERG, Dirk; KYRIAKIDES, Irene; AGATHOS, Spiros N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology advances*, v. 22, n. 1-2, p. 161-187, 2003.
- WOLDESENBET, A. G.; WOLDEYES, B.; CHANDRAVANSI, B. S. Characteristics of wet coffee processing waste and its environmental impact in Ethiopia. *International Journal of Research in Engineering and Science*, v. 2, n. 4, p. 1–5, 2014.
- WONG, D. W. S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 157, n. 2, p. 174–209, 2009.
- XU, Feng. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *Journal of biological chemistry*, v. 272, n. 2, p. 924-928, 1997.
- YANG, J. et al. Laccases: Production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. MAY, 2017.
- YANG, X. et al. Degradation and detoxification of the triphenylmethane dye malachite green catalyzed by crude manganese peroxidase from *Irpex lacteus* F17. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, n. 10, p. 9585–9597, 1 maio 2016.
- YOSHIDA, H. Chemistry of Lacquer (Urushi). *J. Chem. Soc. Trans.*, v. 43, n. 47, p. 472–486, 1883.

ZERVA, A. et al. Degradation of olive mill wastewater by the induced extracellular ligninolytic enzymes of two wood-rot fungi. **Journal of environmental management**, v. 203, p. 791-798, 2017.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875–1881, 1990.



EESC • USP