



**CLARA RESENDE DE SOUZA CASTRO**

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS EM  
BIORREATOR PARA DEGRADAÇÃO DE MATERIAL  
LIGNOCELULÓSICO E DE ATRAZINA**

**LAVRAS – MG  
2021**

**CLARA RESENDE DE SOUZA CASTRO**

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS EM BIORREATOR PARA DEGRADAÇÃO  
DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO E DE ATRAZINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Mestre.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina Ferreira Silva e Batista

Orientadora

**LAVRAS – MG  
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Castro, Clara Resende de Souza.

Produção de enzimas fúngicas em biorreator para degradação  
de material lignocelulósico e atrazina / Clara Resende de Souza  
Castro. - 2021.

81 p.

Orientador(a): Cristina Ferreira Silva e Batista.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. enzimas. 2. fungos filamentosos. 3. bagaço de cana. I.  
Batista, Cristina Ferreira Silva e. II. Título.

**CLARA RESENDE DE SOUZA CASTRO**

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS EM BIORREATOR PARA DEGRADAÇÃO  
DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO E DE ATRAZINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 29 de abril de 2021

Dr<sup>a</sup> Cristina Ferreira Silva e Batista - UFLA

Dr<sup>a</sup> Angélica Cristina de Souza - UFLA

Dr<sup>a</sup> Maysa Lima Parente Fernandes - Czech Academy of Sciences (CAS)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina Ferreira Silva e Batista

Orientadora

**LAVRAS – MG  
2021**

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais e meu irmão,

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus e a São Francisco de Assis pelos momentos de força.

Aos meus pais e meu irmão, por toda a confiança depositada em mim e por terem batalhado para me ver chegar até aqui.

Aos meus cães de coração e à minha “filha” de quatro patas, Gaia, por virar noites ao meu lado e ser minha maior companheira!

À toda a minha família que se faz presente em todos os momentos, em palavras de conforto e em momentos de distração e alegria, em especial, às minhas afilhadas Ana e Alice.

À minha orientadora, Cristina, pela paciência, orientação, oportunidade e confiança depositadas em mim.

Aos meus colegas de laboratório e membros do NEMAI, por todo o auxílio, em especial à Fabi.

À Taís, pelo companheirismo nos momentos de sufoco no laboratório e por ter, literalmente, conduzido esta pesquisa ao meu lado. Obrigada por tudo!

À Julie, pela amizade e pelo apoio durante todos os momentos desta jornada.

A todos os meus amigos, em especial ao Ian, Bertô e Léo. Por todo o apoio, companheirismo e lealdade durante todos estes anos. À Iana, Isa, Fernanda e ao Sérgio e Rafinha, por todos os momentos compartilhados.

A todos os funcionários da Universidade Federal de Lavras, em especial à Cidinha, pela ajuda nas análises.

Ao Departamento de Biologia (DBI) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da UFLA.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 pelo apoio financeiro, indispensável para a realização deste trabalho.

**GRATIDÃO!**

*“Vocês se propuseram uma tarefa difícil, mas terão sucesso se perseverarem e encontrarão alegria em superar obstáculos. Lembrem-se de que nenhum esforço que fazemos para alcançar algo belo é perdido. O que procuro não está lá fora, está em mim.”*

- Helen Keller

## RESUMO

A agroindústria é uma importante atividade econômica que, além de gerar empregos, garante a produção de alimentos e a participação brasileira no mercado exterior. O agronegócio, embora importante, está relacionado ao uso de insumos agrícolas que, quando utilizados inadequadamente juntamente com os resíduos gerados pela atividade agrícola, impactam negativamente o meio ambiente. Para minimizar estes impactos, estratégias de biorremediação utilizando microrganismos vêm sendo traçadas a fim agregar valor aos resíduos agrícolas e converter os compostos contaminantes em produtos menos tóxicos. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi produzir enzimas ligninolíticas de fungos filamentosos por meio da fermentação em estado sólido utilizando uma fonte de carbono alternativa e avaliar sua eficiência na degradação do bagaço de cana e da atrazina. Foi avaliada a produção de lacase por *Penicillium brevicompactum* CCDCA 11400 em *low scale* e o *scale-up* da produção enzimática em biorreator de colunas nos tempos 0, 7 e 14 dias, a 19 °C e 23 °C e pH 4 e 7. A degradação do bagaço de cana foi avaliada em seis ensaios diferentes: controle, enzima pura, inóculo de *P. brevicompactum* CCDCA 11400 (pH 4), extrato bruto (pH 4), extrato bruto (pH 7) e inóculo de *P. brevicompactum* CCDCA 11400 (pH 7). Foi feita a análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para quantificação de carboidratos: arabinose, glicose, xilose e celobiose e ácidos orgânicos: ácido glucurônico, ácido fórmico e ácido acético e furfural e hidroximetilfurfural. Os melhores rendimentos enzimáticos foram obtidas *low scale* no pH 4 a 19 °C após 14 dias de fermentação, sendo o maior valor obtido igual a 1801 U/L. Em biorreator o maior valor da atividade de lacase também foi obtido a 19 °C, porém em pH 7, no valor de 965,5 U/L. Com relação à degradação do bagaço de cana, os melhores resultados foram obtidos quando combinado com a atrazina, principalmente com a utilização do inóculo de *P. brevicompactum* CCDCA 11400, na qual cerca de 40% do substrato foi degradado, possivelmente promovida pela atividade enzimática, que também foi maior nestas condições. As concentrações de glicose, xilose e ácido acético obtidas mostraram que a hemicelulose foi despolimerizada e que, provavelmente, durante a fermentação, o bagaço de cana tenha sido alvo de ataques de outras enzimas lignocelulolíticas além da lacase. Considerando que o furfura e o hidroximetilfurfural sejam compostos inibidores da fermentação, as concentrações obtidas foram baixas e, possivelmente, não interferiram na bioconversão do bagaço de cana. Isto posto, os resultados obtidos no presente estudo se mostraram satisfatórios para produção e a aplicação de lacase de *Penicillium brevicompactum* CCDCA 11400, que comprovam o potencial biotecnológico desta espécie.

**Palavras-chave:** Bagaço de cana. Ligninase. Lacase. *Penicillium brevicompactum*. Biorreator de coluna.



## ABSTRACT

Agroindustry is an important economic activity that, in addition to generating jobs, guarantees food production and Brazilian participation in the foreign market. Agroindustry, although important, is related to the use of agricultural inputs that, when used improperly along with the waste generated by agricultural activity, negatively impact the environment. To minimize these impacts, bioremediation strategies using microorganisms have been made to add value to agricultural waste and convert contaminating compounds into less toxic products. Therefore, the objective of this work was to produce ligninolytic enzymes of filamentous fungi through solid-state fermentation using an alternative carbon source and to evaluate their efficiency in the degradation of sugarcane bagasse and atrazine. Laccase production was evaluated by *Penicillium brevicompactum* CCDCA 11400 on a low scale and the scale-up of enzymatic production in column bioreactor at times 0, 7 and 14 days, at 19 ° C and 23 ° C and pH 4 and 7. Degradation of sugarcane bagasse was evaluated in six different assays: control, pure enzyme, inoculum of *P. brevicompactum* CCDCA 11400 (pH 4), crude extract (pH 4), crude extract (pH 7) and inoculum of *P. brevicompactum* CCDCA 11400 (pH 7). An analysis of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) was performed to quantify carbohydrates: arabinose, glucose, xylose, cellobiose, organic acids: glucuronic acid, formic acid and acetic acid and also furfural and hydroxymethylfurfural. The greatest enzymatic activities were corrected on a small scale at pH 4 to 19 ° C after 14 days of fermentation, with the highest value equal to 1801 U/L. In the bioreactor, the highest value of laccase activity was also found at 19 ° C, but at pH 7, in the amount of 965.5 U/L. Regarding the degradation of sugarcane bagasse, the best results were obtained when combined with atrazine, especially when using the inoculum of *P. brevicompactum* CCDCA 11400, where about 40% of the substrate was degraded, possibly promoted by enzymatic activity, which also was greater in these conditions. The concentrations of glucose, xylose and acetic acid obtained showed that hemicellulose was depolymerized and that, probably, during fermentation, sugarcane bagasse was the target of attack by other lignocellulolytic enzymes besides laccase. Considering the fact that furfural and hydroxymethylfurfural are fermentation inhibitor compounds, the concentration achieved was too low to be able to prejudice the bioconversion of sugarcane bagasse. That said, the results obtained in the present study were satisfactory for the production and application of laccase of *Penicillium brevicompactum* CCDCA 11400, which prove the biotechnological potential of this species.

**Keywords:** Sugarcane bagasse. Ligninase. Laccase. *Penicillium brevicompactum*. Column-type bioreactor.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>12</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>12</b>
<b>2. Referencial teórico</b> .....	<b>14</b>
2.1 Agroindústria e Resíduos .....	14
2.1.2 Resíduos Lignocelulósicos.....	15
2.1.2.1 Bagaço de cana.....	16
2.2 Compostos xenobióticos e pesticidas .....	18
2.2.1 Atrazina.....	20
2.3 Biotecnologia de fungos e o gênero <i>Penicillium</i> .....	21
2.3.1 Enzimas ligninolíticas de origem microbiana .....	23
2.3.1.1 Lacase (E.C 1.10.3.2).....	25
2.3.1.2 Manganês Peroxidase (MnP E.C. 1.11.1.13).....	26
2.4 Biodegradação.....	27
2.4.1 Biodegradação da biomassa lignocelulósica (Lignina).....	27
2.4.2 Biodegradação da Atrazina .....	29
<b>3. Considerações Finais</b> .....	<b>31</b>
<b>SEGUNDA PARTE</b> .....	<b>42</b>
Artigo: Degradação simultânea de bagaço de cana e atrazina por fungos filamentosos em biorreator de coluna.....	42

## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro é considerado um modelo de atividade econômica de sucesso, onde ocupa 30% das participações nas exportações de produtos advindos do setor agropecuário (FILIPPI & GUARNIERI, 2020). Dentre as culturas comerciais de destaque no Brasil, a cana-de-açúcar, por exemplo, é considerada uma das mais versáteis, sendo utilizada principalmente na produção de açúcar e álcool (BRASIL, 2015). Devido a intensa atividade, os impactos - principalmente ambientais - negativos causados pelo agronegócio e pela agroindústria têm impulsionado a busca por novas possibilidades de manejo, sobretudo, dos resíduos agroindustriais (HILOIDHARI et al., 2020).

As indústrias têm utilizado resíduos de diversas culturas e o bagaço de cana é um dos subprodutos com maior aplicabilidade pois, após sofrer transformações químicas, físicas e/ou bioquímicas, tornam-se matérias de alto valor agregado. O Brasil ganhou destaque por ser a primeira fábrica no mundo a produzir a pasta de celulose a partir da palha da cana-de açúcar. Além disso, a fabricação de papel biodegradável tem ganhado espaço no comércio (GLOBO RURAL, 2011; 2017). No entanto, o maior exemplo de transformação bioquímica de resíduos é através de técnicas fermentativas, que utilizam microrganismos a fim de produzir compostos de interesse industrial (FITZPATRICK et al., 2010).

A utilização de microrganismos em processos de biotransformação é uma opção considerada economicamente viável e que visa a minimização dos problemas ambientais, uma vez que a biomassa dos resíduos agroindustriais pode atuar como fonte de substrato para fungos e bactérias (REHMAN *et al.*, 2015). De forma geral, estes organismos tendem a apresentar um rápido crescimento, fácil controle das condições de cultivo e, muitas vezes, são aptos a modificações genéticas. Diante disso, torna-se interessante a utilização de microrganismos em processos biotecnológicos, principalmente pela capacidade que estes possuem de sintetizar

metabólitos de interesse industrial, como as enzimas. (JOSHI & SATYANARAYANA, 2015; KUMAR, 2015).

Atualmente, existem centenas de produtos onde existe a atuação de enzimas como o couro, o papel, medicamentos, conservantes e aditivos alimentícios, entre outros. A cada ano, o mercado de enzimas cresce e atinge um lucro de bilhões de reais nos principais setores de importância: alimentício, farmacêutico e de cosméticos (SANCHEZ & DEMAIN, 2017). Em 2019, o mercado foi estimado em 9.9 bilhões de dólares e as estimativas mostram um aumento de 7,1% por ano até 2027, considerando todos os segmentos industriais que envolvem a utilização de enzimas (MARKET ANALYSIS REPORT, 2020).

As hidrolases e oxidases, tais como as celulases, lacases e peroxidases são uma alternativa para atuar em processos de recuperação de áreas impactadas por acúmulo de matéria orgânica, como os resíduos de atividade da agroindústria, e de contaminantes usados nas atividades agrícolas, como pesticidas, herbicidas e fungicidas (RAVINDRAN & JAISWAL, 2016).

Os compostos contaminantes, embora diferentes da biomassa lignocelulósica, induzem os mesmos mecanismos que os microrganismos utilizam como fonte de nutrientes e energia. Algumas estruturas químicas presentes em alguns defensivos agrícolas, como o anel de s-triazina, são diferentes de compostos naturais e algumas espécies de microrganismos são capazes de secretar enzimas que atuam na degradação (UDIKOVIÇ- KOLIÇ et al., 2012; ESSER et al., 1975) e, portanto, diminuir seu potencial de contaminação.

Tradicionalmente, as técnicas de fermentações submersas capazes de produzir enzimas são muito utilizadas. Entretanto, a fermentação em estado sólido (FES) tem sido utilizada com a mesma finalidade, principalmente para produção de enzimas capazes de degradar polímeros comumente presentes em resíduos agroindustriais (SANTOS et al., 2018). Diante disso, este trabalho teve como objetivos selecionar fungos filamentos para produção de enzimas oxidases (lacase e manganês peroxidase) através da fermentação em estado sólido (FES) utilizando uma fonte de carbono alternativa e, avaliar sua eficiência na degradação do bagaço de cana e da atrazina.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Agroindústria e resíduos**

A agroindústria brasileira é responsável por uma parcela considerável do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, sendo aproximadamente 21,4% (EMBRAPA; CEPEA, 2020) com destaque para produção de café, soja, cana-de-açúcar, mandioca, entre outros. Complementando, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura apontou que o Brasil poderá ser responsável por metade da produção mundial alimentícia até 2050, na qual deverá ser ampliada em até 60% (EMBRAPA, 2020; FAO, 2021).

É inegável a importância do setor agroindustrial para economia brasileira uma vez que gera renda e mantém o homem no campo. No entanto, embora a importância seja positiva em relação à produção de alimentos e ao impacto na economia brasileira, há o agravamento dos problemas ambientais, tais como o aumento do desmatamento, poluição, mudanças climáticas e a geração de toneladas de resíduos todos os anos (MMA, 2010; COSTA-FILHO et al., 2017).

Os resíduos da agroindústria são gerados de duas maneiras: no transporte da lavoura até o consumidor, onde aproximadamente 20%-30% da safra de diversas culturas é perdida neste momento ou no processamento de produtos de origem vegetal, onde ocorre a perda de valor agregado destes. O descarte, na maioria das vezes, é ineficiente, devido ao grande volume de resíduos e os custos elevados para destinação adequada, o que é inviável, já que implica diretamente no preço do produto final (HILOIDHARI et al., 2020; DE FIGUEIRÊDO et. al, 2011). Para contornar o problema de acúmulo de resíduos, faz-se a incineração e o aterro e, ainda que possuam um custo relativamente alto, impactam negativamente o meio ambiente (GIL et al., 2018).

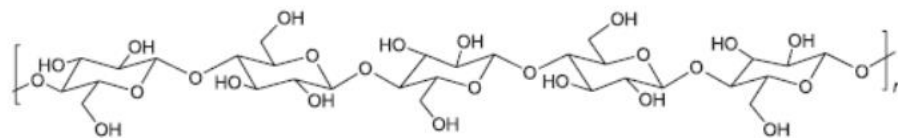
Isto posto, o maior desafio é agregar valor aos resíduos, de forma que eles possam ser reutilizados ou aplicados em outros processos. Atualmente, muitos destes resíduos são estudados para aplicação em processos de biorrefinaria, biorremediação de áreas contaminadas, produção de biogás, produção de painéis de construção, produção de biocombustível, entre outros (SILVA, 2011). Entretanto, mesmo com estes usos, há

ainda muito resíduo que não é utilizado ou que o processo de reutilização ainda é custoso.

### 2.1.2 Resíduos lignocelulósicos

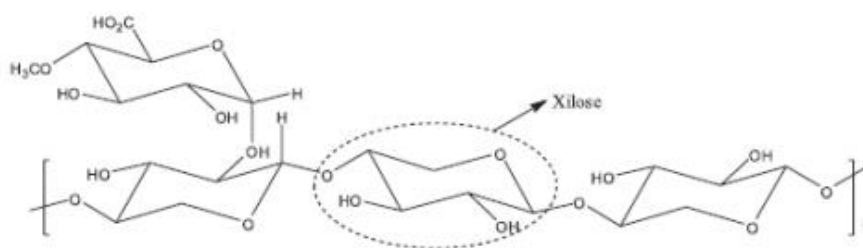
Os resíduos agroindustriais são, em sua maioria, compostos de celulose, hemicelulose e lignina, além de cinzas, carbono, nitrogênio, etc. Os três primeiros elementos são encontrados em maiores proporções nesses materiais – embora a quantidade possa variar de espécie para espécie - e, por isso, estes resíduos podem ser chamados de “materiais lignocelulósicos”. A celulose e a hemicelulose são polímeros formados por diferentes açúcares e a lignina é um polímero aromático sintetizado por precursores de fenilpropanoides (HILOIDHARI et al., 2020; JEFFRIES, 1994).

**Figura 1:** Representação estrutural da celulose



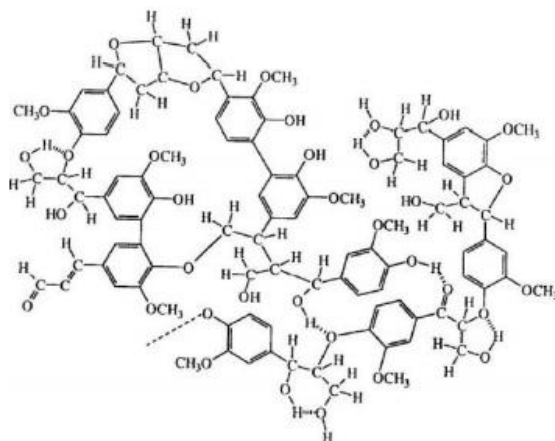
**Fonte:** Santos et al. (2012).

**Figura 2:** Representação estrutural da hemicelulose



**Fonte:** Santos et al. (2012).

**Figura 3:** Representação estrutural da lignina



**Fonte:** Rosa & Garcia (2009).

Quando se conhece a composição química destes materiais, torna-se mais fácil prever as possíveis aplicações biotecnológicas. A biomassa lignocelulósica é considerada muito estável devido à complexidade das moléculas ali presentes, especialmente a presença de anéis aromáticos, que dificulta a hidrólise e a oxidação dos polímeros e a utilização de técnicas de conversão destes materiais para liberação dos açúcares e fenóis presentes nas moléculas de lignina, celulose e hemicelulose torna-se fundamental (GOODMAN et al., 2020).

Existem quatro tipos de conversão de biomassa lignocelulósica: fermentação e conversão enzimática (transformação bioquímica), pirólise e gaseificação (transformação termoquímica), hidrólise ácida e transesterificação (transformação bioquímica) e destilação (transformação física) (FITZPATRICK et al., 2010).

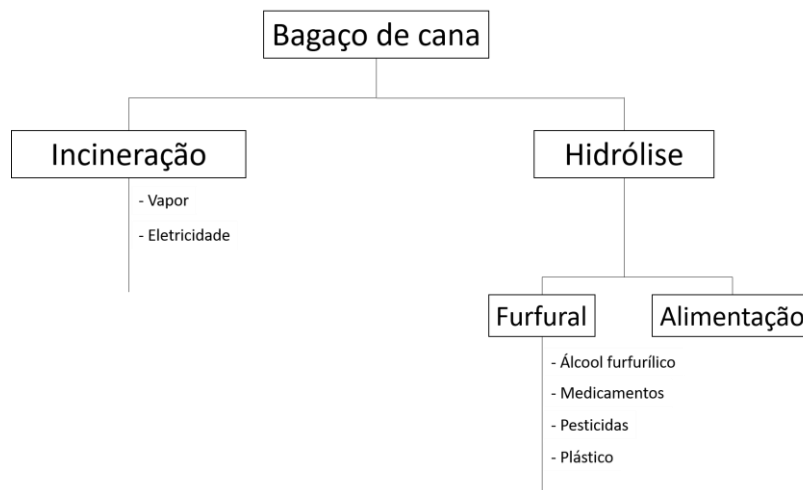
Diferentemente dos demais processos, a fermentação é capaz de adicionar um valor agregado à biomassa lignocelulósica através de hidrólises enzimáticas ou de sacarificação, que são capazes de modificar as frações poliméricas (lignina, celulose e hemicelulose), tornando-as menos complexas. Os microrganismos conseguem converter o produto final da fermentação em álcool, ácidos orgânicos, alcenos, lipídios ou outras moléculas de interesse (FILLAT et al., 2017).

### 2.1.2.1 Bagaço de cana

Pertencente à família *Poaceae* e ao gênero *Saccharum*, a cana-de-açúcar pode ser dividida em seis espécies, sendo que elas podem ser diferenciadas quanto à quantidade de sacarose e a capacidade que cada espécie possui em se adaptar em diferentes

condições climáticas (FERRARI et al., 2010). O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e açúcar do mundo. Em 2020, a produção chegou a 642,1 milhões de toneladas, tornando-se recorde na produção de açúcar. Grande parte é destinada para produção de etanol (CONAB, 2020).

**Figura 4:** Representação esquemática das finalidades industriais do bagaço de cana



**Fonte:** adaptado de Santos et al. (2020).

O bagaço de cana é um dos principais subprodutos derivado da cana-de-açúcar, formado majoritariamente por polímeros de celulose (30,2%), hemicelulose (56,7%) e lignina (13,4%) (SADH et al., 2014) e a presença de uma biomassa diversa impulsiona o interesse acerca de possíveis aplicabilidades biotecnológicas (FERRARI et al., 2010). A diversidade de moléculas funcionais presentes na biomassa lignocelulósica é um dos principais fatores relacionados à necessidade de se reaproveitar e agregar valor aos resíduos (PFALTZGRAFF & CLARK, 2014).

Dentre as aplicabilidades encontradas, existem a produção de glicose, biocombustíveis e biofertilizantes (PFATTZGRAFF et al., 2013). Para tal, as moléculas são hidrolisadas por ação de químicos ou de enzimas. A hidrólise enzimática é considerada a opção mais sustentável, uma vez que é realizada por microrganismos e, muitas das vezes, um processo menos oneroso (LIU et al., 2009).

A necessidade emergente de se converter ou degradar os resíduos agroindustriais se dá pela quantidade em que são produzidos. A produção de cana-de-açúcar, no Brasil, é responsável por gerar cerca de 2,3 milhões de toneladas de bagaço por ano, sendo



considerada predominante entre os demais resíduos produzidos pela agroindústria (EMBRAPA, 2020).

O bagaço tem um alto valor em relação aos outros resíduos, uma vez que pode ser utilizado para produção de biocombustíveis, energia elétrica, furfural (SANTOS et al., 2020), como substrato para síntese de enzimas microbianas, como celulases, xilanases e lacases (FERREIRA et al., 2017; OGUNYEWU et al., 2020), como material alternativo em construções civis (COSTA, 2017). Não somente como substrato, mas o bagaço de cana também é utilizado como suporte de imobilização de células para produção de compostos, como o xilitol (SARROUH & DA SILVA, 2010).

Ainda que gerado em larga escala, este subproduto pode ser considerado versátil devido as inúmeras possibilidades de agregação de valor em produtos e reaproveitamento (SANTOS et al., 2020). Portanto, faz-se necessário o aperfeiçoamento de metodologias que envolvam o bagaço de cana e microrganismos, principalmente para síntese de enzimas, a fim de diminuir os custos de processamento e viabilizar o processo em escala industrial.

## **2.2 Compostos xenobióticos e pesticidas**

O termo xenobiótico se refere a qualquer composto que não é essencial para manutenção fisiológica e bioquímica dos seres vivos, sendo considerado um composto estranho, quando presente em um sistema biológico (MAURYA & MALIK, 2016). Estes compostos são sintetizados e estão presentes, industrialmente, em poluentes, pesticidas, medicamentos, cosméticos e aditivos alimentícios (CHEN et al., 2007; PADHI, 2013). Podem ser classificados em várias classes, desde medicamentos, aditivos alimentícios, até hidrocarbonetos e pesticidas (DATTA et al., 2020; KOPPEL et al., 2017).

O uso destas substâncias é considerado um grande avanço no desenvolvimento de fármacos, pesticidas e da indústria alimentícia, pois são sintetizadas a fim de solucionar problemas causados por infestação de pragas nas plantações e, conseqüentemente, aumentar a produtividade no campo (HASCHEK & WALLIG, 2013), tratar doenças através da elaboração de fármacos eficientes e (KORRAPATI & MEHENDALE, 2005), além disso, aumentar o tempo de prateleira e a conservação dos alimentos, como é o caso dos aditivos alimentícios (HASCHEK & WALLIG, 2013). Contudo, devido o uso incorreto dos compostos xenobióticos, uma série de problemas

foi descoberta ao longo de vários estudos, revelando que uso excessivo destes traz consequências severas para o meio ambiente e para os metabolismos animal e vegetal (ZHU et al., 2017).

Dentre os males causados pelo uso incorreto das substâncias xenobióticas, tem-se o potencial carcinogênico, a alta toxicidade, o potencial bioacumulativo e as alterações nos ambientes bióticos e abiótico. Além disso, estas substâncias são capazes de alterar e afetar o funcionamento das células eucarióticas e procarióticas. Com relação aos efeitos na saúde humana, existe uma série de desordens causadas: endócrina, sexual, cognitivas, mentais, entre outras (BOUWMAN, H., 2003; QADIR et al., 2017). Estudos recentes têm mostrado as consequências que o uso inadequado de pesticidas tem causado no meio ambiente e na saúde humana (SHARMA et al., 2020; RANI et al., 2020).

Os pesticidas são químicos utilizados na agricultura para o controle de doenças e para prevenção de uma série de agentes como bactérias, vírus, fungos, insetos, nematoides e ervas daninhas. Eles podem ser classificados amplamente de acordo com o seu alvo e sua composição (Tabela 1) (AL-JAWHARI, 2018). Acredita-se que o uso destes químicos foi responsável pelo aumento da produção e pela diminuição das perdas nas colheitas. Além disso, foi capaz de aumentar a disponibilidade de alimentos e, conseqüentemente, suprir a demanda necessária. Estima-se que aproximadamente 3 bilhões de quilos de pesticidas são utilizados todos os anos, sendo notável a importância de seu uso (SHARMA et al., 2020).

**Tabela 1:** Descrição e classificação dos principais pesticidas utilizados

<b>Categoria</b>	<b>Descrição</b>	<b>Classes</b>	<b>Exemplo</b>
Inseticidas	Elimina diversos tipos de insetos	Organofosforados	Malation
		Carbamatos	Aldicarbe
		Piretroides	Cipermetrina
<b>Herbicidas</b>	Elimina ervas daninhas e outras espécies vegetais indesejadas	Fosfonados	Glifosato
		Triazinas	<b>Atrazina</b>
		Clorofenóxi	2,4-D
Rodenticidas	Elimina roedores, especialmente ratos.	Anticoagulantes	Varfarina
		Anticonvulsiantes	Estricnina
		Veneno metabólico	Fluoroacetato sódico

	Elimina fungos fitopatogênicos	Ditiocarbamatos Cúprico Mercúrio metálico	Bunema Kocide Benomil
Fungicidas			
	Elimina nematoides presentes nos solos e plantas	Metilcarbamato Organofosforado Sulfonados	Tiodicarbe Cadusafós Fluensulfona
Nematicidas			

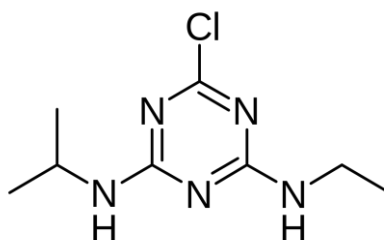
**Fonte:** Adaptado de Agrofit (2019); Al-Jawhari (2018); Chen et al., (2020); Roberts & Karr (2012).

Dentre os pesticidas, destaca-se a atrazina, por ser um dos herbicidas mais utilizados no mundo, principalmente para o controle de ervas daninhas nas culturas de milho e cana-de-açúcar (COLLA et al., 2008) e por ser um químico que demonstra uma alta capacidade de permanência no solo e nos cursos hídricos, o que torna o contexto preocupante (VIEIRA et al., 2020). Diante disso, é importante considerar alternativas que envolvam a manutenção correta de químicos no meio ambiente e meios de biorremediar as áreas afetadas.

### 2.2.1 Atrazina

A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) é um herbicida amplamente utilizado no mundo todo, que age no combate de ervas daninhas e gramíneas de culturas de cana-de-açúcar, trigo e milho (MAHÍA ET AL., 2007; BAIRD; CANN, 2011). Pertencente a classe das triazinas, o pesticida tem uma estrutura química que compreende um anel aromático com átomos de carbono e nitrogênio. Dentre as propriedades químicas da substância, destaca-se a baixa solubilidade em água e a capacidade de acumulação em altas concentrações (42,8 µg/L) (BARRETO et al., 2004), principalmente nos ecossistemas aquáticos e no solo (QIAN ET AL., 2014; GIBBLE & BAER, 2011).

**Figura 5:** Representação química da estrutura da atrazina



**Fonte:** Silva et al. (2015).

Sucintamente, o pesticida atua na inibição da fotossíntese, de maneira que a produção de ATP e NADPH são reduzidas, bem como a produtividade do processo de fixação de CO<sub>2</sub>. Devido ao uso em larga escala, é comum encontrar resíduos do pesticida nos solos e cursos hídricos e, embora certa quantidade seja permitida, faz-se necessário o manejo correto deste. A resolução CONAMA nº 396 de 2008 determina a concentração máxima de atrazina permitida em águas doces de até 2 µg/L, além disso, estudos demonstram que o pesticida se mantém no solo após a aplicação, e possui uma meia vida variável e dependente do manejo (ZHANG et al., 2014; SCHIAVON, 1988; ZAYA et al., 2011; BRASIL, 2008).

Utilizada em larga escala, a atrazina apresenta uma capacidade de persistência na natureza devido a sua meia vida - que pode variar de 21 dias a um ano -, o que ocasiona uma acumulação em níveis considerados acima do permitido (2 µg/L) (JAKINALA et al., 2019). Apesar de existirem diversos tratamentos físico-químicos para remoção da atrazina, os tratamentos biológicos vêm ganhando espaço devido a possibilidade de se utilizar microrganismos na degradação deste composto (YANG et al., 2018). As vias metabólicas de degradação da atrazina utilizando bactérias (principalmente dos gêneros *Pseudomonas*, *Rhodococcus* e *Bacillus*) já são bem elucidadas. Os fungos, embora também apresentem a capacidade de degradação da atrazina, ainda não possuem os mecanismos bem esclarecidos e nenhuma espécie foi relatada com o potencial de mineralização da atrazina (HENN et al., 2020).

### 2.3 Biotecnologia de fungos e o gênero *Penicillium*

Fungos unicelulares como as leveduras são conhecidas pelo seu potencial de uso em diversos setores industriais, por meio da fermentação de bebidas, alimentos, da produção de etanol e elaboração de ração e forragem, além da produção de enzimas e outros metabólitos. Além da *Saccharomyces cerevisiae* – principal

espécie explorada -, destacam-se muitas outras espécies que tiveram suas vias metabólicas elucidadas através de análises genômicas, como *Komagataella pastoris*, *Candida spp.*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, entre outras (JOHNSON & ECHAVARRI-ERASUN, 2011).

Além das leveduras, os fungos filamentosos também são importantes aliados à biotecnologia, uma vez que atuam na ciclagem de nutrientes através da decomposição, respiração e da produção de biomassa e metabólitos (GADD, G. M., 2017). Nestes organismos, a utilização de técnicas moleculares possibilitou a expansão do conhecimento acerca dos metabólitos produzidos, principalmente aqueles de interesse industrial (WÖSTEN, HAN A B, 2019). Explorados para diversos fins, os metabólitos de maior interesse são ácidos graxos e orgânicos, enzimas, vitaminas, aminoácidos e antibióticos, sendo que o Filo Ascomycota se destaca pela presença dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*, os quais possuem milhares de compostos produzidos identificados e estudados (WANG et al., 2017; LIAUD et al., 2014; DEVI et al., 2009).

*Penicillium* é um gênero de fungos filamentosos pertencentes à ordem *Eurotiales* onde existem cerca de 200 espécies identificadas até então (HOUBRAKEN et al., 2014). O gênero abriga espécies ubíquas, capazes de se distribuírem em solos, vegetações, ar e água, além de tolerarem extremos de pH, oxigênio, temperatura e de concentrações de sal e açúcar (HOUBRAKEN et al., 2014; PITT, J.I., 2014). Essas características evidenciam o alto potencial biotecnológico do gênero (VISSER et al., 2013).

A maioria das espécies do gênero é saprófita, cuja condição de decompositores proporcionou descobertas acerca da capacidade metabólica destes organismos. Posteriormente, a descoberta da penicilina enfatizou o potencial de *Penicillium spp.* no campo biotecnológico, ao sintetizar o primeiro antibiótico do mundo (HOUBRAKEN et al., 2014; VISAGIE et al., 2014; FLEMING, A., 1929).

Atualmente, existem espécies com o potencial de atuar em diversos campos industriais: na síntese de compostos potencialmente produtores de medicamentos/antibióticos, na fermentação de bebidas e alimentos como vinho, cerveja, queijo (*P. roqueforti*) e embutidos (*P. nalgiovense*), considerados processos bem elucidados, onde se busca cada vez aprimorar os processos de produção,

mediante a seleção das melhores cepas (KUMAR et al., 2018). Além disso, atuam na síntese de enzimas de interesse industrial, principalmente as lignocelulolíticas, que permitem agregar valor aos resíduos (NIGAM et al., 2018).

A síntese de enzimas fúngicas como as celulases por *Trichoderma* (FLORENCIO et al., 2012), xilanases e lacases por *Aspergillus e Penicillium* (MAESTRELLO & SOUZA, 2018; ASINA et al., 2016) e peroxidases por *Pleurotus e Trametes* (RODRIGUES et al., 2019) no processo de hidrólise lignocelulolítica tem se mostrado uma ferramenta indispensável para garantir um processo mais economicamente viável e menos danoso ao meio ambiente (HOUBRAKEN et al., 2014; NIGAM et al., 2018).

### **2.3.1 Enzimas ligninolíticas de origem microbiana**

De acordo com COELHO et al. (2008): “as enzimas são catalizadores biológicos, de natureza principalmente proteica que participam de várias reações bioquímicas, tendo como papel fundamental o controle metabólico”. Baseado na natureza das reações químicas, as enzimas podem ser divididas em seis classes: ligases, isomerases, liases, hidrolases, transferases e oxidoredutases (IUB – International Union of Biochemistry).

A comissão de enzimas (EC) codifica cada enzima de acordo com sua classe, seu modo de ação, o seu acceptor e, por fim, o seu conjunto de características reacionais. As lacases e as manganeses peroxidases, por exemplo, possuem como código EC 1.10.3.2 e EC 1.11.1.3, respectivamente (BRENDA, 2021).

O código da lacase a classifica como:

1 (Oxidoredutase). 10 (Atuante em difenóis e substâncias afins como doadores). 3 (Aceptor: oxigênio). 2 (São um grupo de enzimas multi-cobre com baixa especificidade que atuam em o- e p- quinois e atuam também em aminofenóis e fenilenediamina (BRENDA, 2021; DAWSON & TARPLEY, 1951).

O código da manganês peroxidase a classifica como:

1 (Oxidoredutase). 11 (Atuante em moléculas de peróxido como aceptores). 1 (Aceptor: peroxidase). 13 (Uma hemoproteína atuante na degradação oxidativa de lignina. A enzima oxida ligações de Mn<sup>2+</sup> em Mn<sup>3+</sup> na presença de peróxido de hidrogênio. A enzima é inativada na presença de álcool veratril e/ou na

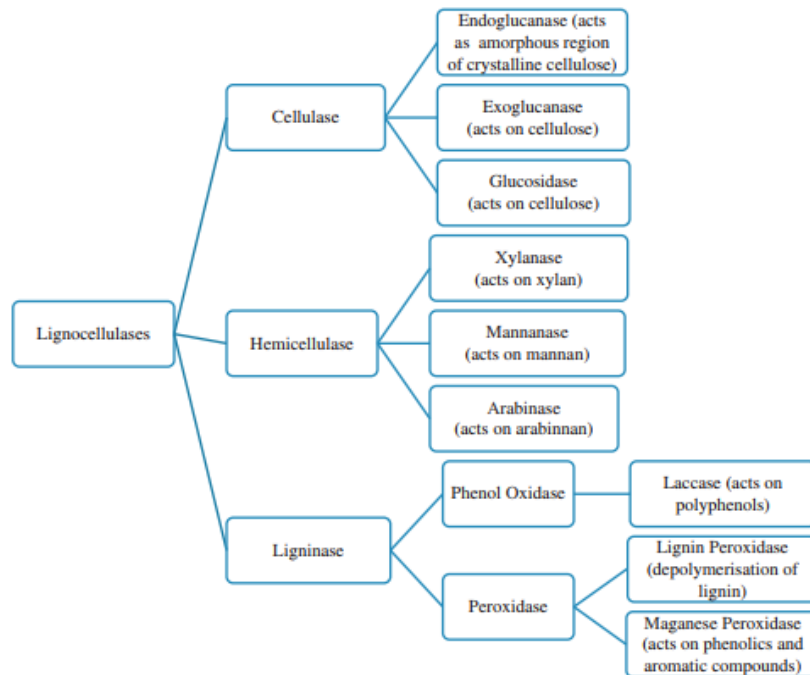
presença de substratos não-fenólicos (BRENDA, 2021; KUAN & TIEN, 1993; GLENN et al., 1986).

As enzimas microbianas podem ser sintetizadas por bactérias, fungos filamentosos ou leveduras. Dentre os mais estudados, destacam-se os ascomicetos, os basidiomicetos e as bactérias do gênero *Bacillus* – principalmente sua expressão gênica a fim de elucidar os mecanismos envolvidos na produção enzimática/síntese proteica. Com o avanço das técnicas moleculares e da genômica, uma série de espécies microbianas já são capazes de produzir enzimas de todas as classes, com o foco na produção industrial (TERPE, 2006; BINOD et al., 2013; VOLESKY & LUONG, 2008).

Apesar de existirem milhões de espécies de microrganismos na Terra, menos de um por cento consegue ser cultivado em laboratório. A busca por microrganismos produtores de enzimas pode ser realizada focando nos mais diversos grupos, desde os extremófilos e os psicrófilos, até os mais comuns, como os mesófilos. Os psicrófilos, por exemplo, têm se mostrado bons produtores de enzimas, principalmente aquelas que atuam na biomassa lignocelulósica. Ademais, fungos conhecidos como “podridão branca”, representados nos estudos principalmente pela espécie *Trametes versicolor* são comumente utilizados para produção de oxidases e hidrolases, tais como lacases e celulases a partir de resíduos agroindustriais (SANCHEZ & DEMAIN, 2017; LOPES et al., 2020).

As lignocelulases são enzimas que atuam na despolimerização da celulose, hemicelulose e lignina, sendo que existe um tipo para cada um destes polímeros e o alvo de cada uma delas (NIGAM, 2018).

**Figura 6:** Ligninases e seus alvos em relação aos polímeros celulose, hemicelulose e lignina.

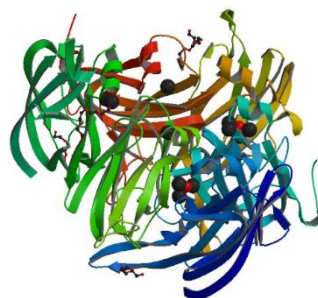


Fonte: Nigam (2018)

### 2.3.1.1 Lacase (E.C. 1.10.3.2)

As lacases são enzimas multi-cobre oxidases que acoplam a redução do oxigênio em duas moléculas de água com a oxidação de vários substratos fenólicos, arilaminas, anilinas, tióis e lignina. Esta redução é mediada pelos quatro íons de cobre presentes no sítio catalítico enzimático e sua atividade é relacionada à oxidação de compostos fenólicos (THURSTON, 1994; LI et al., 1999; ELEGIR et al., 2005; PIRES, B. A. O., 2015).

**Figura 7:** Representação da estrutura cristalina da Lacase (EC 1.10.3.2)



Fonte: RCSB Protein Data Bank, acesso em: 24/02/21



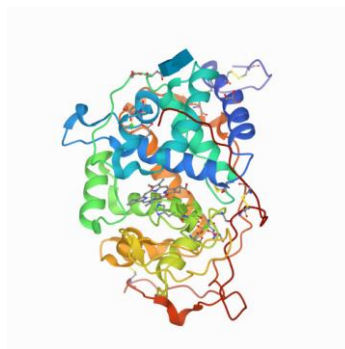
Além da produção por microrganismos como a bactéria *Azospirillum lipoferum* e alguns fungos filamentosos (*Trametes* sp., *Lentinus* sp. e *Pleurotus* sp.), a enzima também pode ser encontrada em algumas espécies de insetos e plantas. Estas enzimas conseguem trabalhar de maneira eficaz em uma série de substratos, sendo considerada uma ótima escolha para aplicações biotecnológicas, como a descoloração e a detoxificação de corantes têxteis e a biorremediação de solos e resíduos contaminantes (CARVALHO et al, 2016; ORZECOWSKI et al., 2018)

Dentre as enzimas ligninolíticas, as lacases se destacam pela ampla especificidade, que facilita a ligação da enzima com o composto contaminante alvo. Geralmente, a maneira mais eficiente de utilizá-la é inoculando diretamente o microrganismo produtor no ambiente de interesse, ou pela adição do extrato bruto enzimático (VISWANATH et al., 2015).

### 2.3.1.2 Manganês peroxidase (E.C 1.11.1.13)

Manganês peroxidase (MnP, E.C. 1.11.1.13) é uma enzima glicosilada que contém uma molécula heme como ferro protoporfirina IX. Essa enzima é capaz de catalisar a oxidação de  $Mn^{2+}$  em  $Mn^{3+}$  numa reação dependente de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Utilizada em processos de degradação de lignina e outros tipos de poluentes orgânicos (HOFRICHTER, M., 2002; EIBES et al., 2006; ZHAO et al., 2015).

**Figura 8:** Representação da estrutura cristalina de Manganês peroxidase (MnP, E.C 1.11.1.13)

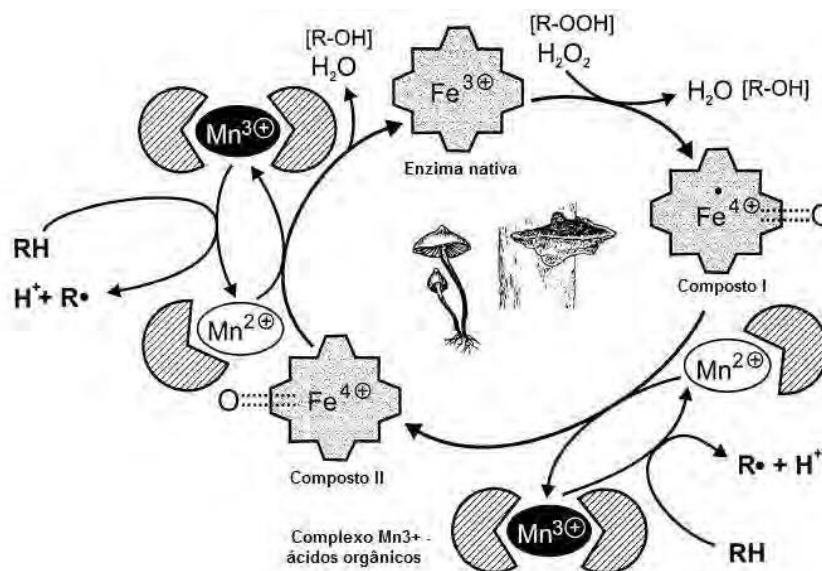


**Fonte:** RCSB Protein Data Bank, acesso em: 24/02/21

A enzima pode atuar na degradação de compostos fenólicos e não fenólicos. Essas reações de degradação são reações de quebra de carbono – carbono e aril-

aquáticas, onde ocorre uma transferência de elétrons do sítio ativo de MnP para  $\text{H}_2\text{O}_2$ , formando um complexo  $\text{Fe}^{4+}$  oxoporfirina, com a liberação de uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  (HENN, 2009).

**Figura 9:** Representação do ciclo catalítico de MnP



**Fonte:** Hofrichter (2002).

Os fungos da podridão branca são o principal grupo de fungos conhecidos pela produção de MnP, sobretudo representados pelos gêneros *Trametes* e *Pleurotus*. Apesar do interesse biotecnológico na utilização destes microrganismos, a falta da padronização das condições ideais de cultivo e o entendimento do metabolismo ainda é um problema. Ademais, o alto custo de produção ainda é um fator limitante para efetivação destes processos (ZHAO et al., 2015).

## 2.4 Biodegradação

### 2.4.1 Biodegradação da biomassa lignocelulósica (Lignina)

A biomassa lignocelulósica é a fonte de carbono renovável mais abundante no mundo. Composta majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina, estes compostos podem ser hidrolisados em açúcares e, então, processados a fim de terem um valor agregado. Uma das maneiras de se agregar valor a estes resíduos é a utilização destes como substrato para produção de enzimas através da fermentação (RAY &

BEHERA, 2017). Dependendo do tipo de fermentação e as condições metabólicas do microrganismo, é possível degradar a biomassa e sintetizar compostos de interesse simultaneamente, como é o caso das enzimas, tornando-se uma opção interessante a ser utilizada nas indústrias (DATTA et al., 2017).

A fermentação é um processo no qual são utilizados microrganismos que, neste caso, sintetizam enzimas capazes de quebrar as moléculas presentes na biomassa lignocelulósica. Quando em contato com o resíduo, o microrganismo sinaliza a presença de macromoléculas ao seu redor e sintetiza a enzima de interesse. Após a sinalização, os polímeros são degradados em monômeros e, então, estes passarão a atuar como principal fonte de energia e carbono para o crescimento microbiano. O produto final da biodegradação polimérica geralmente resulta em biomassa microbiana, H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub> (KARIGAR & RAO, 2011; LYAGIN et al., 2018; GHAFARI MOSANENZADEH al., 2014; MARIN et al. 2013; COSTA et al., 2014). Dentre estes polímeros, a lignina apresenta a estrutura mais complexa, contendo anéis aromáticos interligados por diferentes ligações covalentes de C – C e C – O que conferem à molécula uma característica hidrofóbica e uma estrutura recalcitrante de difícil acesso (SUN et al., 2018). As enzimas capazes de oxidar estas estruturas complexas são as ligninases (lacase, manganês peroxidase, peroxidase versátil e lignina peroxidase).

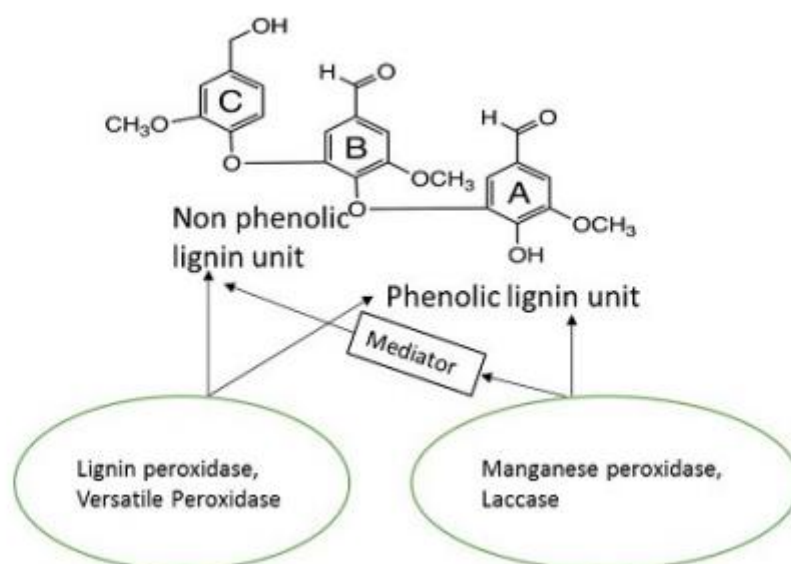
Dentre as ligninases, destaca-se a lacase, sendo enzima que possui seus mecanismos de degradação mais elucidados e estudados. Os fatores que mais afetam a síntese enzimática são a temperatura, a composição do meio de cultura e a presença ou ausência de mediadores fenólicos na reação. O foco da degradação pela lacase é nos compostos aromáticos presentes na lignina, contudo, seu ataque é limitado, uma vez que sua estrutura não é representada somente pelos anéis fenólicos (NIGAM, 2018; ELEGIR, 2005).

Os mecanismos de degradação biológica da lignina são pouco elucidados, uma vez que são gerados muitos metabólitos e substâncias alifáticas e os mecanismos de ação ainda são complexos. Deve-se considerar também que as espécies e as técnicas utilizadas para síntese enzimática podem apresentar diferentes resultados e, portanto, não é algo padronizado (KHATAMI et al., 2019; YADA et al., 2019).

Geralmente, os estudos relacionam a produção enzimática com a degradação dos polímeros presentes na biomassa lignocelulósica. Como existem enzimas específicas

para atuar em cada molécula, possivelmente a síntese de ligninases implicará na degradação de lignina, seu principal alvo. Para caracterizar e quantificar a degradação de lignina, utiliza-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, que é capaz de identificar os compostos de degradação (DATTA et al., 2017; DE CARVALHO OLIVEIRA et al., 2018).

**Figura 10:** Representação esquemática do alvo de cada ligninase, onde é possível visualizar o potencial de ação da lignina peroxidase e peroxidase versátil sobre as frações não fenólicas e manganês peroxidase e lacase sobre as frações fenólicas da lignina.



**Fonte:** Datta et al. (2017).

## 2.4.2 Biodegradação da Atrazina

A biorremediação de ambientes contaminados é uma alternativa de baixo custo e ambientalmente amigável, que depende apenas da fisiologia celular dos organismos capazes de degradar estes compostos (DEON et al., 2012). Para minimizar a toxicidade de substâncias contaminantes ou convertê-las em material inorgânico, os microrganismos são capazes de utilizar os compostos contaminantes como fonte de nutrição, convertendo-os em subprodutos menos tóxicos (TONINI et al., 2010). Por isso, com o crescente uso destes compostos, faz-se necessária a busca por novas espécies microbianas produtoras de enzimas, capazes de atuar nos processos de biorremediação (VISWANATH et al., 2015).

Existem alguns compostos como o halogênio, o metiltio-éter e o N-alquil, presentes no anel s-triazina da atrazina, capazes de inibir o metabolismo microbiano (VARGHA *et al.*, 2005). Entretanto, existem bactérias como *Achromobacter sp* e *Pseudomonas sp* que foram capazes de degradar completamente a atrazina presente no solo, através de um consórcio, onde todos os genes responsáveis pela degradação estavam presentes e ativos. O produto final da degradação geralmente é NH<sub>3</sub> e CO<sub>2</sub> e as bactérias nitrificantes do solo são responsáveis pela ciclagem do nitrogênio resultante (FERNANDES *et al.*, 2018; 2020). Em ambientes aquáticos contaminados, a abordagem é diferente, uma vez que a utilização de ozônio potencializa o efeito oxidativo e, conseqüentemente, atingir uma taxa de degradação igual a 99% (DIAS *et al.*, 2018).

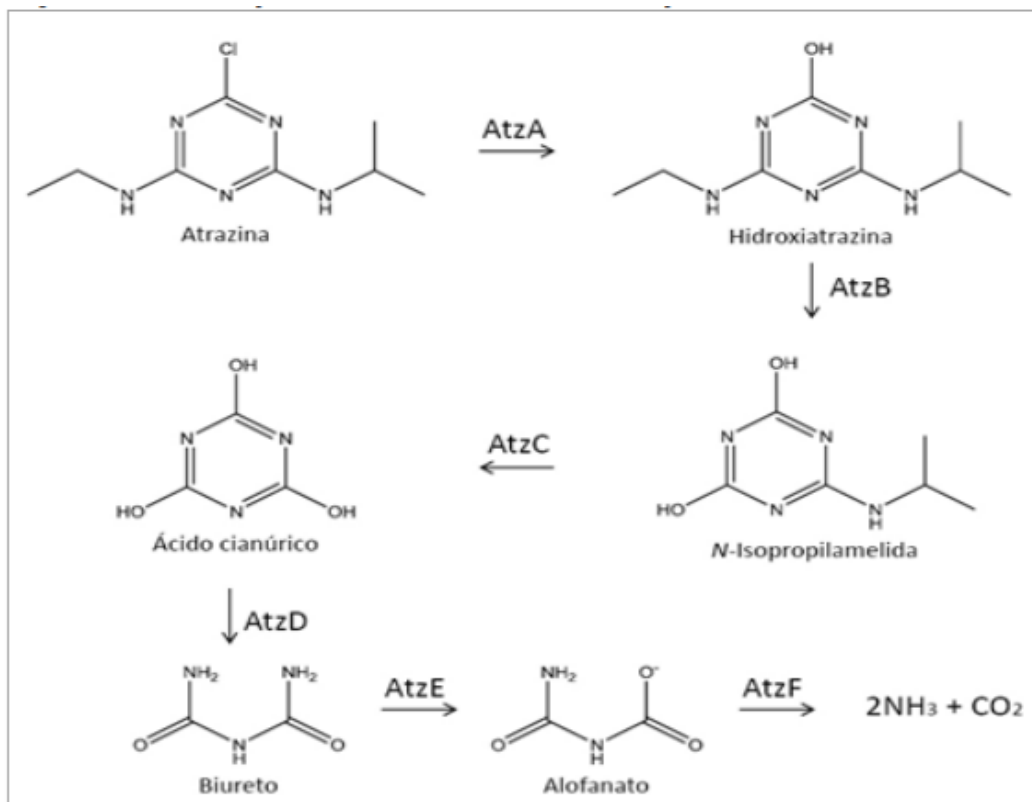
Assim como existem algumas bactérias que carregam os genes AtzA, AtzB, AtzC, AtzD, AtzE e AtzF, responsáveis pela degradação da atrazina, há também alguns fungos aptos para isto (FERNANDES, 2018). Um exemplo deste são algumas espécies de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Fusarium* que, não necessariamente, possuem todos estes genes, mas que ainda são aptas a degradar o composto em diferentes graus (ROMERO *et al.*, 2014).

A atrazina é degradada em uma variedade de produtos: hidroxiatrazina (HA), deetilatrazina (DEA) e deetilhidroxiatrazina (DEHA), desisopropilatrazina (DIA) e desetildeseopropilatrazina (DEDIA), ácido cianúrico, isopropilamina, biureto e alofanato. Todos os subprodutos resultantes da degradação são similares a atrazina, sendo considerados tóxicos e, um dos principais motivos que mantêm a toxicidade destes compostos – mesmo após a degradação – é a capacidade de persistência e conseqüente contaminação do ambiente (HANNA BARCHANSKA *et al.*, 2017; HU & CHENG, 2013; SINGH *et al.*, 2017).

Os fatores que mais influenciam o metabolismo de degradação da atrazina por fungos são o pH, a aeração, o substrato e o meio de cultivo (MISHRA *et al.*, 2001). Com as condições de cultivo favoráveis para o metabolismo fúngico, que é variável de espécie para espécie, o organismo é capaz de degradar a atrazina em diferentes graus, embora ainda não tenha sido relatado na literatura a total degradação (HENN *et al.*, 2020). Embora a via metabólica da degradação da atrazina por fungos ainda não seja totalmente elucidada, geralmente, os fungos tendem a degradar a atrazina através da

remoção sequencial de substituintes do anel aromático, que é iniciada pela fase de dealquilação, a principal fase da via metabólica da atrazina (MOUGIN et al., 1994; 1997).

**Figura 11:** Representação das estruturas alvo de cada gene envolvido na degradação de atrazina.



**Fonte:** Adaptado de Udikoviç-Koliç et al. (2012)

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de enzimas em processos biotecnológicos é uma realidade cotidiana. Nota-se sua importância nos mais diversos setores industriais: alimentício, têxtil, farmacêutico, cosmetológico, entre outros. Embora possam ser sintetizadas quimicamente e biologicamente, tem-se considerado o uso de enzimas microbianas, principalmente pela facilidade de controle metabólico destes organismos. O principal fator limitante do uso de enzimas destas origens é o custo de processamento das enzimas, que envolve desde as etapas de extração, até as etapas de purificação.

Uma opção para redução dos custos de processamento é a utilização de substratos alternativos, como os resíduos agroindustriais. Se por um lado o volume

gerado de resíduos é o principal responsável pelo acúmulo de matéria orgânica, por outro lado pode ser considerado um fator importante na redução do custo da síntese de enzimas e dos impactos ambientais.

Assim sendo, objetivou-se com este trabalho, a produção de enzimas oxidases (lacase e manganês peroxidase) e eficiências destas na despolimerização da biomassa lignocelulósica e da atrazina, por fungos filamentosos através da fermentação em estado sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o bagaço de cana.

## REFERÊNCIAS

AGROFIT Agrot: sistema de agrotóxicos tossanitários. **Disponível em:** [http://agrofit.agricultura.gov.br/primeira\\_pagina/extranet/AGROFIT.html](http://agrofit.agricultura.gov.br/primeira_pagina/extranet/AGROFIT.html). Acesso em: fev. 2021.

AL-JAWHARI, I. F. H. Heavy Metals, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), Radioactive Materials, Xenobiotic, Pesticides, Hazardous Chemicals and Dyes Bioremediation. **Phytobiont and Ecosystem Restitution**, 2018.

ASINA, F.; BRZONOVA, I.; VOELLER, K.; KOZLIAK, E.; KUBÁTOVÁ, A.; YAO B.; JI, Y. Biodegradation of lignin by fungi, bacteria and laccases. **Bioresource Technology**, 2016.

BAIRD, C.; CANN, M. **Química Ambiental**. 4. ed. Porto Alegre, RS: Bookman. xi, 844 p., 2011.

BARCHANSKA, H.; SAJDAK, K.; SZCZYPKA, K. et al. Atrazine, triketone herbicides, and their degradation products in sediment, soil and surface water samples in Poland. **Environmental Science and Pollution Research**, 24, 644-658, 2017.

BARRETO, F. M. D. S.; ARAÚJO, J. C. D.; NASCIMENTO, R. F. D. Caracterização Preliminar da Carga de Agrotóxico Presente na Água Subterrânea em Tianguá - Ceará (BRASIL). **Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas**, 13. São Paulo: 20 p. 2004.

BINOD, P., PALKHIWALA, P., GAIKAIWARI, R., NAMPOOTHIRI, K.M., DUGGAL, A., DEY, K., et al. Industrial enzymes – present status and future perspectives for India. **Journal of Scientific and Industrial Research**, 72, 271–286, 2013.

BOUWMAN, H. POPs in Southern Africa. In: Fiedler H: **The hand book of environmental chemistry, persistent organic pollutants**, 3rd edn, 2003.

CARVALHO, M. A.; COSTA, L. M. A. S.; DA SILVEIRA, D. M.; DIAS, D. R.; ZIED, D. C.; DIAS, E. S. Ligninase and Cellulase Activity of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler Strains in Different Culture Media. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, 10(3), p. 1683-1691, 2016.

CEPEA, 2020. **Disponível em:** <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>. Acesso em: mar. 2021.

CHEN, C.; GONZALEZ, F. J; IDLE, J. R. LC-MS-based metabolomics in drug metabolism. **Drug Metabolism**, 39 (2-3), 581–597, 2007.

CHEN, J.; LI, Q. X.; SONG, B. Chemical Nematicides: Recent Research Progress and Outlook. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 68 (44), 2020.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D.; **Tecnologia Enzimática**, 1<sup>a</sup> ed., EPUB: Rio de Janeiro, 2008.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra Brasileira: Cana-de-Açúcar, segundo levantamento. **Disponível em:**



<https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: fev. 2021.

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente. RESOLUÇÃO Nº 430, DE 13 DE MAIO DE 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>. Acesso em: fev. 2021.

COSTA FILHO, D.V.; SILVA, A.J.; SILVA, P.A.P.; SOUSA, F.C. Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais na Elaboração De Subprodutos. **Cointer - Pdvagro**, 2017.

COSTA, C. Z.; ALBUQUERQUE, M. C. C.; BRUMB, M. C.; CASTRO, M. A. Degradação microbiológica e enzimática de polímeros: uma revisão. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 259-267, 2015.

DATTA, S.; SINGH, S.; KUMAR, V.; SIDHU, K. G. D. S. D.; KUMAR, D. S. A. S.; SINGH, J. Endophytic bacteria in xenobiotic degradation. **Microbial Endophytes: Prospects for Sustainable Agriculture**, 2020.

DE SOUZA LOPES, L.; VIEIRA, N.; RODRIGUES DA LUZ, JOSÉ.MARIA., DE CASSIA SOARES DA SILVA, M.; CARDOSO, W. S.; MEGUMI KASUYA, M. C. Production of fungal enzymes in *Macaúba coconut* and enzymatic degradation of textile dye, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2020.

DEON, M. C. et al. Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaugmentação e atenuação natural. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 33, p. 73–82, 2012

DEVI, P.; D'SOUZA, L.; KAMAT, T.; RODRIGUES, C.; NAIK, C. G. Batch culture fermentation of *Penicillium chrysogenum* and a report on the isolation, purification, identification and antibiotic activity of citrinin. **Indian Journal of Marine Science**, 38 (1), 3844, 2009.

DIAS, A. C. L.; SANTOS, J. M. B.; SANTOS, A. S. P.; BOTTREL, S. L. C.; PEREIRA, R. O. Ocorrência de Atrazina em águas no Brasil e remoção no tratamento da água: revisão sistemática. **Revista Internacional de Ciências**, v. 08, n. 02, p. 234-253, 2018,

DOS SANTOS, P. S.; SOLIDADE, L. S.; SOUZA, J. G. B.; LIMA, G. S.; BRAGA Jr, A. C. R.; ASSIS, F.G.V.; LEAL, P. L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 04, n. 02, p. 181–188, 2018.

EIBES, G.; CAJTHAML, T.; MOREIRA M. T.; FEIJOO, G.; LEMA, J. M.; Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. **Chemosphere** 64: 408-414, 2006.

ELEGIR, G.; KINDL, A.; SADOCCO, P.; ORLANDI, M. Development of antimicrobial cellulose packaging through laccase-mediated grafting of phenolic compounds. **Enzyme Microbial Technology**. 43, 84–92, 2008.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ciência que Transforma: Resultados e Impactos Positivos da Pesquisa Agropecuária na Economia, no Meio Ambiente e na Mesa do Brasileiro. **Embrapa**, 2020.

ENZYME DATABASE – BRENDA, (N. D.). **Disponível em:** <http://www.brenda-enzymes.org>. Acesso em: fev. 2021.

ESSER H. O.; DUPUIS G.; EBERT E., MARCO G. J.; VOGEL C. s-Triazines. In: Kearney PC, Kaufman DJ (eds) **Herbicides, chemistry, degradation and mode of action**. Marcel Dekker, New York, pp 129–208, 1975.

FERNANDES, A.F.T.; WANG, P.; STALEY, C.; MORETTO J. A. S; ALTARUGIO, L. A.; CHAGAS, S. C.; GUEDES, S. E.; JAY, S. M. Impact of Atrazine Exposure on the Microbial Community Structure in a Brazilian Tropical Latosol Soil. **Microbes Environmental**. 35(2), 2020.

FERNANDES, A. F. T.; BRAZ, V. S.; BAUERMEISTER, A.; RIZZATO P. J. A.; LOPES, N. P.; STEHLING, E. G. Degradation of atrazine by *Pseudomonas* sp. and *Achromobacter* sp. isolated from Brazilian agricultural soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2018.

FERRARI, F.; GOMES, D. M; MARCON, E. F.; MACCHERONI, W.; FORNI-MARTINS, E. R. Mapping chromosome of sugarcane by FISH. In: **Society for Experimental Biology Annual Main Meeting**. Programme and abstract Book, 2010

FERREIRA, F. L.; DALL'ANTONIA, C. B.; SHIGA, E. A.; ALVIM, L. J.; PESSONI, R. A. B. Sugarcane bagasse as a source of carbon for enzyme production by filamentous fungi. **Hoehnea**, 45(1), 134–142, 2018.

FILIPPI, G. C. A.; GUARNIERI, P. O agronegócio brasileiro e o mundo rural: revisão sistemática de literatura. **Revista Agropampa**, v. 3, n. 3, 2020.

FILLAT, U.; IBARRA, D.; EUGENIO E. M.; MORENO, D. A.; TOMÁS-PEJÓ, E.; MARTÍN-SAMPEDRO, R. Laccases as a Potential Tool for the Efficient Conversion of Lignocellulosic Biomass: A Review. **Fermentation**, 3(2), 17, 2017.

FITZPATRICK, M.; CHAMPAGNE, P.; CUNNINGHAM, F. M.; WHITNEY, A. R. A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8915–8922, 2010.

FLORENCIO, C.; COURI, S.; FARINAS, C. S. Correlation between Agar Plate Screening and Solid-State Fermentation for the Prediction of Cellulase Production by *Trichoderma* Strains. **Enzyme Research (Online)**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

YADA, G. M.; SHIRAISHI, I. S.; DEKKER, R. F. H.; SCHIRMANN, J. G.; BARBOSA-DEKKER, A. M.; DE ARAUJO, I. C.; ABREU, L. M.; DANIEL, J. F. S. Soil and entomopathogenic fungi with potential for biodegradation of insecticides: degradation of flubendiamide in vivo by fungi and in vitro by laccase. **Annals Of Microbiology**, v. 69, p. 1517-1529, 2019.

GHAFFARI MOSANENZADEH, S.; NAGUIB, H. E.; PARK, C. B.; ATALLA, N.; J. Effect of biopolymer blends on physical and Acoustical properties of biocomposite foams. **Journal of Polymer Science, Polymer Physics**, 52, 1002, 2014.

GIBBLE, R. E.; BAER, K. N. Effects of atrazine, agricultural runoff, and selected effluents on antimicrobial activity of skin peptides in *Xenopus laevis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 74, 593–599, 2011

GIL, A.; SILES, J. Á.; SERRANO, A.; MARTÍN, M. Á. Mixture optimization of anaerobic co-digestion of tomato and cucumber waste. **Environmental Technology**, 36, 2628-2636, 2015.

GLOBO RURAL. “Bagaço de cana produz papel biodegradável”. Revista Globo Rural, 2011. **Disponível em:** <http://revistagloborural.globo.com/Revista/Common/0,,EMI281184-18080,00BAGACO+DE+CANA+PRODUZ+PAPEL+BIODEGRADAV L.html> Acesso em: mar. 2021.

GLOBO RURAL. “Primeira fábrica que produz papel a partir da palha da cana é inaugurada em SP”. Revista Globo Rural, 2017. **Disponível em:** <https://revistagloborural.globo.com/Noticias/Agricultura/noticia/2017/02/globorural-primeira-fabrica-que-produz-papel-a-partir-da-palha-da-cana-e-inauguradaem-sp.html> Acesso em: mar. 2021.

GOODMAN, B. A. Utilization of Waste Straw and Husks from Rice Production: A Review. **Journal of Bioresources and Bioproducts**, 2020.

HASCHEK, W. M.; ROUSSEAU, C. G.; WALLIG, M. A.; BOLON, B.; OCHOA, R. **Haschek and Rousseau's Handbook of Toxicologic Pathology**, 2013.

HENN, C.; MONTEIRO, D. A.; BOSCOLO, M.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Biodegradation of Atrazine and Ligninolytic Enzyme Production by Basidiomycete Strains. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 266, 2020.

JOHNSON, E. A.; ECHAVARRI-ERASUN, C. The Yeasts: **Yeast Biotechnology**, p. 21-44, 2011.

HILOIDHARI, M.; BHUYAN, N.; GOGOI, N.; SETH, D.; GARG, A.; SINGH, A.; PRASAD, S. Agroindustry wastes: biofuels and biomaterials feedstocks for sustainable rural development. **Refining Biomass Residues for Sustainable Energy and Bioproducts**. 357-388, 2020.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 30, p. 454-466, 2002

HOUBRAKEN, J.; DE VRIES, R. P; SAMSON, R. A. Modern Taxonomy of Biotechnologically Important *Aspergillus* and *Penicillium* Species. **Advances in Applied Microbiology**, v.86, 2014.

HU, E.; CHENG, H. Rapid extraction and determination of atrazine and its degradation products from microporus mineral sorbents using microwave-assisted solvent extraction followed by ultra-HPLC-MS/MS. **Microchim Acta**, 180: 703-710, 2013

JAKINALA, P.; LINGAMPALLY, N.; KYAMA, A.; HAMEEDA, B. Enhancement of atrazine biodegradation by marine isolate *Bacillus velezensis* MHNK1 in presence of surfactin lipopeptide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 182, 2019.

JEFFRIES, T. W. Biodegradation of lignin and hemicelluloses. **Biochemistry of Microbial Degradation**. p. 233–277, 1994.

JOSHI, S.; SATYANARAYANA, T. In vitro engineering of microbial enzymes with multifarious applications: Prospects and perspectives. **Bioresource Technology**, 2014.

KARIGAR C. S.; RAO, S. S. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. **Enzyme Research**, p. 1-11, 2011.

KHATAMI, S.; DENG, Y.; HATCHER, P. G. Lignin Contribution to Aliphatic Constituents of Humic Acids through Fungal Degradation, **Journal of Environmental Quality**, 2019.

KOPPEL, N., REKDAL, V.M., BALSUS, E.P., 2017. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. **Science**, 356 (6344), 2017.

KORRAPATI, M. C., MEHENDALE, H. M. Urea. In: Wexler, Philip (Ed.) **Encyclopedia of Toxicology**, second ed., vol. 4. Elsevier, New York, pp. 409e411, 2005.

KRUGER, E.L.; SOMASUNDARAM, L.; KANWAR, R.S.; COATS, J.R. Persistence and degradation of [14C] atrazine and deisopropil atrazine as affected by soil depth and moisture conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.12, p.1959-1967, 1993.

KUMAR R; KAUR J; JAIN S; KUMAR A. Optimization of laccase production from *Aspergillus favus* by design of experiment technique: partial purification and characterization. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 125–131, 2016.

LI, J.; SUN, F.; LI, X.; YAN, Z.; YUAN, Y.; LIU, X.F. Enhanced saccharification of corn straw pretreated by alkali combining crude ligninolytic enzymes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 87, 1687–1693, 2012.

LIAUD, N.; GINIE, S. C.; NAVARRO, D.; FABRE, N.; CRAPART, S.; HERPOË, L.; GIMBERT, I; LEVASSEUR, A.; RAOUCHE, S.; SIGOILLOT, J. C. Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi. **Fungal Biology Biotechnology**, 2014,

LIU, Y. S.; ZENG, Y.; LUO, Y. Does the cellulose-binding module move on the cellulose surface? **Cellulose**, 16 (4), 587e597, 2009.

LYAGIN, I. V.; EFREMENKO, E. N. Biomolecular engineering of biocatalysts hydrolyzing neurotoxic organophosphates. **Biochimie**, v. 144, p. 115-121, 2018.

MAESTRELLO, C. C.; GUIMARÃES, L. H. S. Potential of the *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 as a producer of cellulolytic enzymes and xylanase under solid-state fermentation. **International Journal of Scientific Reports**, v. 4, p. 147-152, 2018.

MAHÍA, J.; MARTÍN, A.; CARBALLAS, T.; RAVIÑA, M. D. Atrazine degradation and enzyme activities in an agricultural soil under two tillage systems. **Science Total Environment**. 378, 187–194, 2007.

MARIN, E.; BRICEÑO, M.I.; CABALLERO, G. C. Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs. **International Journal of Nanomedicine**, v.8, p. 3071-3090, 2013.

MARKET ANALYSIS REPORT. Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Application (Industrial Enzymes, Specialty Enzymes), By Product (Carbohydrase, Proteases, Lipases), By Source, By Region, And Segment Forecasts, 2020 – 2027. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>. Acesso em: fev. 2021.

MAURYA, P. K.; MALIK, D. S. Bioaccumulation of xenobiotics compound of pesticides in riverine system and its control technique: a critical review. **Journal of Industrial Pollution Control**, 32(2), 2016.

MOUGIN, C.; LAUGERO, C.; ASTHER, M.; DOBROCA, J.; FRASSE, P.; ASTHER, M. Biotransformation of the herbicide atrazine by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n.2, p. 705-708, 1994.

NIGAM, D.; ASTHANA, M.; KUMAR, A. *Penicillium*: A Fungus in the Wine and Beer Industries. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, 2018.

OGUNYEWU, O. A.; RANDHAWA, A.; JOSHI, M.; JAIN, KUMAR, K.; WADEKAR, P.; ODANETH, A. A.; LALI, A. M.; YAZDANI, S. S. Engineered *Penicillium funiculosum* produces potent lignocellulolytic enzymes for saccharification of various pretreated biomasses. **Process Biochemistry**, 2020.

DE CARVALHO OLIVEIRA, F.; SRINIVAS, K.; HELMS, G. L.; ISERN, N. G.; CORT, J. R.; GONÇALVES, A. R.; AHRING, B. K. Characterization of coffee (*Coffea arabica*) husk lignin and degradation products obtained after oxygen and alkali addition. **Bioresource Technology**, 2018.

ORZECZOWSKI, J. et al. Avaliação do potencial de descoloração e de detoxificação de corantes têxteis por lacase de *Pleurotus sajor-caju*. **Evidência, ciência e biotecnologia**, 2018.

PADHI, T. Metabolic syndrome and skin: psoriasis and beyond. **Indian Journal of Dermatology**, 58 (4), 299–305, 2013.

PFALTZGRAFF, L. A. Green chemistry, biorefineries and second generation strategies for re-use of waste: an overview. **Advances in Biorefineries**, 3–33, 2014.

PIRES, O. A. B. Produção e aplicação de extratos enzimáticos de fungos da podridão branca como pré-tratamento para sacarificação de resíduos agrícolas. 2015. 51 f. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná**, Curitiba, 2015

PITT, J. I.; CSIRO. *Penicillium* and *Talaromyces*: Introduction. **Animal, Food and Health Sciences**, 2014.

QADIR, A. M. Z.; HASHMI, A. M. Xenobiotics, Types, and Mode of Action. (eds.), **Xenobiotics in the Soil Environment, Soil Biology** 49, 2017.

QIAN, X.; OLGA, G.; CHEN, L.; ZHANG, W.; DONG, W.; MA, J.; XIN, F.; JIANG, M.; OCHSENREITHER, K. Continuous self-provided fermentation for microbial lipids production from acetate by using oleaginous yeasts *Cryptococcus podzolicus* and *Trichosporon porosum*. **Renewable Energy**, 737-743, 2020.

RANI, A.; SAGHIR, A.; USMAN, S., CH, K. M.; ALI, S. Residual effects of pesticides on human health as perceived by farmers in Tehsil Faisalabad Sadar, Punjab, Pakistan. **Professional Medical Journal**, 27(2):395-402, 2020.

RAY, R. C.; AND BEHERA, S. S. Solid State Fermentation for Production of Microbial Cellulases, **Biotechnology of Microbial Enzymes**, 2017.

REHMAN, H. U.; SIDDIQUE, N. N.; AMAN, A.; NAWAZ, M. A.; BALOCH, A. H.; QADER, S. A. U. Morphological and molecular based identification of pectinase producing *Bacillus licheniformis* from rotten vegetable. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. v.13, p.139 –144, 2015.

ROBERTS, J. R.; KARR C. K. Technical report—pesticide exposure in children. American Academy of Pediatrics, Council on Environmental Health. **Pediatrics**, 130(6), 2012.

RODRIGUES, P. O.; GURGEL, L. V. A.; PASQUINI, D.; BADOTTI, F.; GÓES-NETO, A.; BAFFI, M. A. Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes. **Renewable Energy**, 145, 2683–2693, 2020.

DE FIGUEIRÊDO, M. C. B.; RODRIGUES, G. S.; CALDEIRA-PIRES, A.; ROSA, M. F.; DE ARAGÃO, F. A. S.; VIEIRA, V. P. P. B.; MOTA, F. S. B. Environmental performance evaluation of agro-industrial innovations part 1: Ambitec-Life Cycle, a methodological approach for considering life cycle thinking. **Journal of Cleaner Production**, v. 18, p. 1366-1375, 2010.

ROSA, S.; GARCIA, J. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, p. 117–155, 2009.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Useful Microbial Enzymes: An Introduction. **Biotechnology of Microbial Enzymes**, 2017.

SANTOS, F. A., et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quimica Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SANTOS, F.; EICHLER, P.; MACHADO, G.; MATTIA, J.; DE SOUZA, G. Sugarcane Biorefinery, Technology and Perspectives. **By-products of the sugarcane industry**. Chapter 2. 2020.

SARROUH, B. F.; DA SILVA, S. S. Application of Response Surface Methodology for Optimization of Xylitol Production from Lignocellulosic Hydrolysate in a Fluidized Bed Reactor. **Chemical Engineering & Technology**, v. 33, p. 1481-1487, 2010.

SCHEUNERT, I. Transformation and degradation of pesticides in soil. Em: EBING, W. ed **Terrestrial Behaviour of Pesticides**. Springer verlag, p.25-75, 1992.

SCHIAVON, M. Studies of the leaching of atrazine, of its chlorinated derivatives, and of hydroxyatrazine from soil using <sup>14</sup>C ring-labelled compounds under outdoor conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 15, 46–54, 1988.

SHARMA, A.; SHUKLA, A.; ATTRI, K.; KUMAR, M.; KUMAR, P.T; SUTTEE, A.; SINGH, G.; BARNWAL, R. P.; SINGLA, N. Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 201, 2020.

SILVA, R., CARDOSO, C., & SCORZA JÚNIOR, R. Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico para Quantificação de Atrazina do Fipronil e seus Produtos de Degradação em Amostras de Solo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Ciência e Natura**, 37(3), 693-702, 2015.

SINGH, S.; KUMAR, V.; CHAUHAN, A.; DATTA, S.; WANI, A. B; SINGH, N.; SINGH, J. Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. **Environmental Chemistry Letters**, 2017.

SUN, Z.; FRIDRICH, B.; DE SANTI, A.; ELANGO VAN, S.; BARTA, K. Bright Side of Lignin Depolymerization: Toward New Platform. **Chemicals**. v. 182, n.2, p. 614-678, 2018.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology Biotechnology**. 72, 211–222, 2006.

THURSTON, C.F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, 140, 19–26, 1994.

TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E. DE; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: Revisão. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 4, p. 1010–1020, 2010

UDIKOVIĆ-KOLIĆ, N.; SCOTT, C.; MARTIN-LAURENT, F. Evolution of atrazine degrading capabilities in the environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 5, p. 1175–1189, 2012.

VARGHA, M., TAKATS, Z., MÁRIALIGETI K. (2005), Degradation of atrazine in a laboratory scale model system with Danube river sediment. **Water Research**, 39, 1560 - 1568.

VIEIRA, L. A. J.; ALVES, R. D. F. B.; MENEZES-SILVA, P. E.; MENDONÇA, M. A. C.; SILVA, M. L. F.; SILVA, M. C. A. P.; FARNESE, F. S. Water contamination with atrazine: is nitric oxide able to improve *Pistia stratiotes* phytoremediation capacity? **Environmental Pollution**, 2020.

VISWANATH B., RAJESH B., JANARDHAN A., KUMAR A.P., AND NARASIMHA G. Fungal laccases and their applications in bioremediation. **Enzyme Research**, 2015.

- VOLESKY, B.; MCGILL; JOHN H. T. LUONG. Microbial Enzymes: Production, Purification, And Isolation. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, 2008.
- WACKETT, L. P., SADOWSKY, M. J., MARTINEZ, B., SHAPIR, N. (2002), Biodegradation of atrazine and related s- triazine compounds: from enzymes to field studies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 58, 39- 45.
- WANG, S.; ZHENG, D.; YIN, L.; WANG, F. Preparation, activity and structure of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with nanoparticle. **Enzyme Microbiology Technology**, 107:22–31, 2017.
- WÖSTEN, H. A. B. Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials. **Current Opinion in Biotechnology**, 59:65–70, 2019.
- YANG, X.; WEI, H.; ZHU, C.; GENG, B. Biodegradation of atrazine by the novel *Citricoccus* sp. strain TT3. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 147, 144–150, 2018.
- ZAYA, R. M.; AMINI, Z.; WHITAKER, A. S.; KOHLER, S. L.; IDE, C. F. Atrazine exposure affects growth, body condition and liver health in *Xenopus laevis* tadpoles. **Aquatic Toxicology**, 104, 243–253, 2011.
- ZHAO, X.; HUANG, X.; YAO, J.; ZHOU, Y.; JIA, R. Fungal Growth and Manganese Peroxidase Production in a Deep Tray Solid-State Bioreactor, and In Vitro Decolorization of Poly R-478 by MnP. **Journal of Microbiolog and Biotechnology**, 25(6), 803-813, 2015.
- ZHU, Y.; BOYE, A.; BODY-MALAPEL, M.; HERKOVITS, J. The Toxic Effects of Xenobiotics on the Health of Humans and Animals, **BioMed Research International**, 2017.



**SEGUNDA PARTE**

**Artigo 1: DEGRADAÇÃO SIMULTÂNEA DE BAGAÇO DE CANA E ATRAZINA POR FUNGOS FILAMENTOSOS EM BIORREATOR DE COLUNA**

## ABSTRACT

Sugarcane is an important Brazilian agricultural crop, responsible for the production of sugar, bioethanol and cachaça, a typical Brazilian drink. Its residue, sugarcane bagasse, is the one that is generated in greater quantity. To maintain productivity, it is necessary to use agricultural inputs and, in this culture, one of the most used is the herbicide Atrazine. In addition to the problems caused by the accumulation of organic matter in the waste, the incorrect use of these inputs harms the environment. To minimize these impacts, bioremediation strategies using microorganisms have been devised to add value to agricultural waste and convert contaminating compounds into less toxic products. The objective of this work was to produce ligninolytic enzymes of filamentous fungi through solid-state fermentation using sugarcane bagasse as an alternative carbon source and to evaluate its efficiency in the degradation of sugarcane bagasse and atrazine. Laccase production was evaluated by *Penicillium brevicompactum* CCDCA 11400 in low scale and the scale-up of enzymatic production in column bioreactor at times 0, 7 and 14 days, at 19 ° C and 23 ° C and pH 4 and 7. Sugarcane bagasse degradation was evaluated in six different assays: control, pure enzyme, inoculum of *P. brevicompactum* CCDCA 11400 (pH 4), crude extract (pH 4), crude extract (pH 7) and inoculum of *P. brevicompactum* CCDCA 11400 (pH 7). The analysis of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) was performed to quantify carbohydrates: arabinose, glucose, xylose and cellobiose and organic acids: glucuronic acid, formic acid and acetic acid and furfural and hydroxymethylfurfural. The highest enzyme activities were obtained at a low scale at pH 4 at 19 ° C after 14 days of fermentation, with the highest value being equal to 1801 U/L. In a bioreactor, the highest value of laccase activity was also obtained at 19 ° C, but at pH 7, in the amount of 965.5 U / L. Regarding the degradation of sugarcane bagasse, the best results were obtained when combined with atrazine, especially when using the inoculum of *P. brevicompactum* CCDCA 11400, where about 40% of the substrate was degraded, possibly promoted by enzymatic activity, which also was greater in these conditions. The concentrations of glucose, xylose and acetic acid obtained showed that hemicellulose was depolymerized and that, probably, during fermentation, sugarcane bagasse was the target of attacks by other lignocellulolytic enzymes besides laccase. Considering the fact that furfural and hydroxymethylfurfural are fermentation inhibitor compounds, the concentration achieved was too low to be able to prejudice the bioconversion of sugarcane bagasse. That said, the results obtained in the present study were satisfactory for the production and application of laccase of *Penicillium brevicompactum* CCDCA 11400, which prove the biotechnological potential of this specie.

**Keywords:** Bioremediation. Laccase. *Penicillium brevicompactum*. Low scale; Scale-up. Lignocellulosic biomass.

## 1 INTRODUÇÃO

O agronegócio é um importante setor produtivo para a economia brasileira, empregando cerca de 2,4 milhões de pessoas, somente no estado de Minas Gerais (CIM, 2021). O país destaca-se principalmente nas culturas de café, soja, milho e cana-de-açúcar e, em 2020, a produção recorde de grãos atingiu a marca de 252 milhões de toneladas (CONAB, 2020). De forma incontestável, o aumento da produtividade e a competitividade são resultado de um conjunto de fatores, dentre eles o uso de insumos agrícolas, como os pesticidas, que combatem o desenvolvimento de ervas daninhas, fitopatógenos, nematoides e insetos (GIOVANINI et al., 2019; CASTRO et al., 2017).

Em contrapartida, tanto o aumento da produtividade quanto o uso constante de insumos agrícolas, implicam em consequências ambientais graves, como o acúmulo de material orgânico nas áreas de produção, contaminação do solo e dos recursos hídricos, bem como a intoxicação humana pela ingestão destas substâncias através dos alimentos (RICARDINO et al., 2020; DE CAMPOS et al., 2021). Dada tamanha importância e necessidade de se manter a alta produtividade, é indispensável que os resíduos do processamento da agroindústria recebam o tratamento e o destino correto e que os insumos agrícolas sejam utilizados nas doses indicadas (COSTA et al., 2020; DE SOUZA FILHO, 2021).

A cana-de-açúcar é empregada para produção de açúcar, bioetanol e de cachaça, uma bebida tipicamente brasileira. Da produção destes, gera-se mais de 2,3 ton/ano, caracterizando-se como o setor produtivo que mais gera resíduos. De modo geral, o volume gerado é maior que a destinação como geração de energia ou compostagem, causando um acúmulo de material orgânico nas áreas de produção (MOURA & LANDAU, 2020; EMBRAPA, 2020). Dos resíduos, destaca-se o bagaço de cana (OLIVEIRA et al., 2020).

O bagaço de cana é um subproduto com alto potencial biotecnológico e tem sido utilizado para diversas aplicações (MUSTAFA et al., 2020). Dentre elas, a utilização deste como substrato em fermentações para produção de compostos de interesse, tais como enzimas, ácidos graxos, vitaminas e aminoácidos (HILARES et al., 2018; PATEL et al., 2017; FERREIRA et al., 2018; CARVALHO et al., 2020). A capacidade dos microrganismos na utilização deste material como fonte de carbono se dá pela sua composição: 50% celulose, 25 % hemicelulose e 25% lignina. Assim, o microrganismo

é capaz de sintetizar enzimas alvo para um dos polímeros presentes na biomassa do bagaço de cana e transformá-los em açúcares fermentáveis (NIGAM et al., 2018).

Microrganismos capazes de produzir enzimas despolimerizantes podem também serem capazes de degradar outras moléculas complexas, como aqueles presentes nos pesticidas (KUMAR & CHANDRA, 2020; QADIR et al., 2021). Um exemplo é o herbicida Atrazina, comumente utilizado na lavoura da cana-de-açúcar. A atrazina contém um anel aromático halogenado na sua estrutura química, conhecido como s-triazina que, quando convertido, tende a produzir metabólitos tóxicos (SINGH et al., 2018). Além disso, deve-se considerar que como todo produto sintético tem efeito recalcitrante no ambiente, agravando o uso frequente nas lavouras (SRIVASTAV, L. A., 2020).

Isto posto, uma das alternativas de acelerar o processo de depuração dos ambientes contaminados ou saturados com insumos agrícolas e agregar valor aos resíduos da agroindústria, é o uso de microrganismos que sintetizam enzimas despolimerizantes, como as lacases (NIGAM et al., 2018; ZHANG et al., 2020; PANDEY et al., 2018). Dentre os microrganismos, destacam-se os fungos filamentosos, principalmente aqueles pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Pleurotus* (REHMAN et al., 2018; COPETE-PERTUZ et al., 2019; AYLA et al., 2018).

A degradação do material orgânico e da atrazina pode ser realizada via fermentação submersa, porém, a fermentação em estado sólido (FES) tem se mostrado muito efetiva, uma vez que garante maior produtividade com menor custo, principalmente quando utilizada a biomassa lignocelulósica como substrato para produção de enzimas lignocelulolíticas (PLIEGO-SANDOVAL et al., 2014; SINDHU, 2015; SINGH, 2014). Diante disso, considerando a necessidade urgente da disposição adequada de resíduos orgânicos e a degradação de insumos agrícolas, este trabalho teve como objetivo a produção de enzimas oxidases (lacase e manganês peroxidase) por *Penicillium brevicompactum* CCDCA 11400 por fermentação em estado sólido (FES) utilizando o bagaço de cana como fonte de carbono alternativa e a aplicação destas enzimas na degradação do bagaço de cana e da atrazina.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reativação dos microrganismos e condições de cultivo

Seis cepas de fungos filamentosos pertencentes à Coleção de Culturas do Departamento de Ciência dos Alimentos (CCDCA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) foram avaliadas quanto à capacidade de produção de ligninases. *Penicillium brevicompactum* CCDCA 11400 foi isolada de solo amazônico (Brasil). *P. lanosum* CCDCA 11619, *P. crustosum* CCDCA 11620, *P. thomii* CCDCA 11615, *P. daejonium* CCDCA 11633 e *Pseudogymnoascus panorum* CCDCA 11607 foram isolados de solo de rizosfera de *Deschampsia antártica* (Antártica).

Para detecção da produção enzimática foram realizados testes qualitativos em meio sintético sólido, onde os microrganismos foram submetidos às seguintes condições de cultivo: para produção de lacase (E.C. 1.10.3.2) e manganês peroxidase (E.C. 1.11.1.13), as cepas foram cultivadas em meio básico (10,0 g L<sup>-1</sup> de glicose; 1,0 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1,0 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 g L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>; 15,0 g L<sup>-1</sup> de ágar, 1,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura) acrescido de ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico]) e Azure B, respectivamente (CARVALHO et al. 2016). Os cultivos foram incubados a 25 °C e 19 °C por 14 dias. A confirmação da produção de lacase é evidenciada pela presença de halo verde ao redor da colônia (POINTING, 1999) e de manganês peroxidase pela presença de halo hialino ao redor da colônia (ARCHIBALD, 1992). Cada ensaio foi realizado em triplicata e o meio de cultura sem adição de ABTS e Azure B foi utilizado como controle.

Para avaliar o potencial de *P. brevicompactum* CCDCA 11400 na degradação de atrazina, realizou-se o cultivo em meio básico + Atrazina 97% (Syngenta) (1,0 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1,0 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 g L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>; 15,0 g L<sup>-1</sup> de ágar, 1,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura) acrescido de 10 g L<sup>-1</sup> de atrazina, a 19 °C e 23 °C. Para o controle foi utilizado o cultivo em meio sem atrazina, acrescido de glicose.

#### 2.1.2 Influência do pH e da temperatura na produção de lacase

*P. brevicompactum* CCDCA 11400, o único microrganismo que se mostrou produtor de ligninase (lacase), foi cultivado em meio básico acrescido de ABTS a 19

°C, 23 °C e 25 °C em pH 4.0, 5.5 e 7.0. Como controle, foi utilizado o meio básico + ABTS, sem o controle de pH.

Após selecionar as melhores condições de cultivo, o fungo *Penicillium brevicompactum* CCDCA 11400 foi cultivado em meio MEA (15 g L<sup>-1</sup> de glicose; 15 g L<sup>-1</sup> de extrato de malte; 15 g L<sup>-1</sup> de ágar) e incubado a 25 °C durante 7 dias para produção do inóculo.

A suspensão de esporos foi preparada adicionando-se sobre a placa contendo a colônia fúngica 10 mL de solução Tween 80 (0,1%) e espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalski. A contagem de esporos foi realizada em Câmara de Neubauer e o inóculo foi padronizado na concentração final de 10<sup>8</sup> esporos/mL (IRFAN et al., 2018).

## **2.2 Preparo do substrato para a fermentação em estado sólido (FES)**

O bagaço de cana foi cedido pela Cachaçaria Carinhosa, localizada na cidade de Perdões, Minas Gerais (21°4'4.058" S 44°59'29.036" W).

As amostras foram secas em estufa a 60 °C durante 72 h, até atingirem peso constante. Após a secagem, o bagaço foi moído em moinho “Willey” em partículas de 1.0 mm e armazenado em sacos plásticos de polipropileno impermeáveis, mantidos em temperatura ambiente.

## **2.3 Fermentação em estado sólido *low scale* para produção do extrato bruto enzimático (Pré-teste)**

A produção do extrato bruto enzimático foi realizada através de fermentações em erlenmeyers de 250 mL, contendo 15 g do bagaço de cana e autoclavados a 121 °C durante 15 min.

Assepticamente, em cada erlenmeyer, foram adicionados 15 mL de solução nutriente (FERREIRA et al., 2018) (9 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>, 2,25 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,75 g L<sup>-1</sup> KCl, 0,75 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>, 0,015 g L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>, 0,015 g L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>), 5 mL de solução tampão citrato, 3 mL do inóculo e homogeneizados com bastão de vidro estéril. O volume final consistiu em 23 mL de solução para 15 g de bagaço de cana. Os pH dos ensaios foram ajustados (4.0 e 7.0) e incubados a 19 e 23 °C, por 14 dias. O controle negativo consistiu de 15 g de bagaço de cana sem inoculação do microrganismo e incubado nas mesmas condições descritas anteriormente. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

Para obtenção do extrato bruto, utilizou-se as metodologias propostas por Ballaminut et al. 2009 e Bento et al. 2016, com modificações. Foram adicionados 50 mL de tampão acetato fosfato (pH 4.5) em cada ensaio e homogeneizado com barra magnética em banho de gelo durante 10 minutos. Após, as amostras foram filtradas com o auxílio de um filtro de TNT e acondicionadas em tubos Falcon, e armazenadas em freezer (-22 °C) até a quantificação da atividade enzimática.

### **2.3.1 Avaliação dos parâmetros físico-químicos durante a fermentação *low scale***

Em cada ensaio foi realizada a aferição da atividade de água usando o aparelho Aqualab Pawkit (Meter, WA, U.S.A.), onde aproximadamente 1 g de cada amostra foram retiradas a cada 3 dias, totalizando 5 diferentes aferições (0, 3, 6, 9 e 12 dias).

A cada três dias, durante o período de 14 dias, sob condições estéreis e com o auxílio de um bastão de vidro estéril, o substrato (bagaço de cana) foi revolvido para homogeneização e aeração.

### **2.4 Determinação da atividade enzimática de lacase**

A quantificação da atividade enzimática da lacase foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Prinz et al (2014) com modificações. A quantificação da atividade enzimática de lacase se deu por espectrofotometria a partir da oxidação de 500 µM de ABTS (2,2'-azino-bis- [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico]) a 420 nm.

A mistura reacional continha 100 µL de tampão citrato-fosfato (pH 4.0), 100 µL de extrato bruto de cada ensaio e 800 µL de ABTS (100 µM) e foi incubada em banho maria a 50 °C/ 20 min. Posteriormente, 100 µL da mistura de cada amostra foram transferidos para poços em microplaca de 96 poços. A placa foi inserida em aparelho Elisa (Thermo Scientific MultiSkan FC) para leitura a 420 nm. O controle positivo consistiu da determinação da atividade nas mesmas condições utilizando enzima pura comercial Lacase de *Aspergillus* sp. (Sigma), diluída 100x. O branco da análise consistiu em 200 µL da mesma solução tampão e 800 µL de ABTS.

As absorbâncias obtidas foram convertidas para unidade de atividade enzimática/litro de acordo com a fórmula 1, que define uma unidade de atividade enzimática (U) como 1µM de ABTS oxidado por minuto. Para o cálculo da enzimática considerou-se o coeficiente de absorção molar ( $\epsilon$ ) equivalente a  $3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,

diâmetro de cada poço da microplaca de 6 mm, e volume no poço de 100  $\mu\text{L}$  (NILADEVI et al., 2009).

$$U/L = \frac{\Delta \text{ Abs} \times 10^6}{\epsilon \times R \times t} = [\text{U/L min}]$$

Fórmula 1

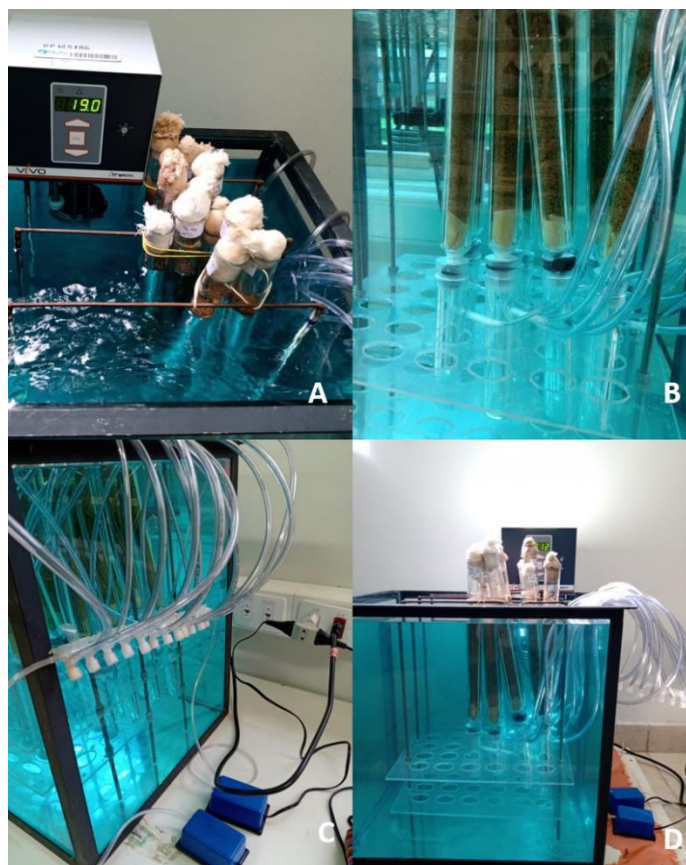
$\Delta \text{ Abs}$  = Absorbância,  $\epsilon$  = Coeficiente de absorção molar,  $R$  = Quantidade de solução da amostra,  $t$  = Tempo de reação (minutos),  $U/L$  = Unidade de Atividade/Litro

### 2.5 *Scale-up* da produção enzimática

Para degradação do bagaço de cana e da atrazina e simultânea produção de lacase, foi utilizado um biorreator de colunas (Figura 1). O biorreator possui 15 colunas (2,5 x 30 cm). As colunas, após preenchimento, são conectadas a mangueiras de silicone acopladas a um compressor de bancada.

**Figura 1:** Biorreator de colunas equipado com os aparatos necessários para montagem final. A – Termostato posicionado no biorreator com a temperatura de controle. B – Posicionamento das colunas preenchidas e conectadas às mangueiras de ar. C – Controle de oxigênio através das mangueiras conectadas ao compressor de ar. D – Visão geral do biorreator em funcionamento.





**Fonte:** Do autor (2021)

Antes do preenchimento de cada coluna com o substrato, foram adicionados ao fundo das colunas um papel filtro e algodão para impedir o vazamento do bagaço de cana e permitir a passagem de ar. Posteriormente, o bagaço de cana foi acondicionado em sacos plásticos estéreis e as soluções foram adicionadas, de acordo com cada ensaio (Tabela 1), para homogeneização. Após, 15 g do substrato foram transferidas para cada coluna previamente identificada. As colunas foram vedadas com tampão de algodão e posicionadas no biorreator. Adicionou-se cerca de 1 mL de azul de metileno (WAGHMARE et al., 2020) na água que preenche o biorreator para evitar contaminações.

Para o controle de temperatura, utilizou-se um termostato (Vivo, iTherm Heating Immersion, Germany). Os ensaios para avaliação da degradação do bagaço de cana e produção de lacase foram realizados em duplicata a 19 e a 23 °C.

A atividade de água das amostras foi aferida nos tempos 0, 7 e 14 dias, como descrito no item 2.3.1.

**Tabela 1:** Descrição dos ensaios realizados na fermentação em estado sólido (FES) em biorreator

Ensaio	Descrição
Controle	Controle: 23 mL de água destilada
1	Enzima comercial (diluição $10^{-4}$ ) em solução tampão acetato-fosfato (pH 5)
2	3 mL inóculo + 15 mL meio (pH 4) + 5 mL solução tampão citrato-fosfato
3	23 mL extrato bruto enzimático (pH 4)
4	23 mL extrato bruto enzimático (pH 7)
5	3 mL inóculo + 15 mL meio (pH 7) + 5 mL solução tampão citrato-fosfato

Para avaliação da degradação da atrazina, 15 g de bagaço de cana previamente autoclavados foram contaminados artificialmente com 100  $\mu\text{L}$  de atrazina ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) e, após, o bagaço de cana foi submetido à secagem em estufa a  $85 \text{ }^\circ\text{C}$  overnight. Os ensaios foram conduzidos no biorreator em duplicata a  $19 \text{ }^\circ\text{C}$ , como descrito na Tabela 1.

Além dos ensaios conduzidos em biorreator, para comparação do grau de degradação foram realizados dois controles em fermentação submersa com a presença somente da atrazina como fonte de carbono, nos pHs 4 e 7. O processo também foi realizado em duplicata.

### 2.5.1 Avaliação da degradação do bagaço de cana

A avaliação da degradação do bagaço de cana foi feita pela diferença entre os pesos secos iniciais e finais da fermentação.

O bagaço foi submetido a secagem em estufa overnight, a  $\pm 85 \text{ }^\circ\text{C}$  e pesado para o cálculo da diferença entre os pesos e a comparação entre os ensaios.

## 2.6 Quantificação dos compostos lignocelulósicos e da atrazina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

### 2.6.1 Hidrólise dos oligômeros e extração das amostras

A caracterização química dos materiais lignocelulósicos foi realizada conforme De Carvalho Oliveira et al (2018), com modificações. Para a hidrólise completa dos oligômeros presentes nas amostras adicionou-se 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (0,1 M) em 1 g do bagaço de cana e a mistura foi submetida a aquecimento em banho termostaticado a 45 °C por 7 min.

Em seguida, adicionou-se 135 mL de água destilada à mistura e o conteúdo foi transferido para erlenmeyer de 250 mL, autoclavado por 30 min, a 121°C. Após resfriada, a mistura reacional foi filtrada em membrana Milipore (0,1 µm) e avolumada com água destilada a 250 mL em balão volumétrico, e utilizada para análise de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural.

Foram considerados como fração celulósica os compostos glicose, celobiose, ácido fórmico e hidroximetilfurfural, e como fração hemicelulósica a xilose, arabinose, ácido glucurônico, ácido acético e furfural.

Todas as análises foram conduzidas utilizando o mesmo modelo de cromatógrafo líquido (LC-10Ai; Shimadzu Corp., Tóquio, Japão).

#### **2.6.1.1 Carboidratos e ácidos orgânicos**

As análises de carboidratos e ácidos orgânicos foram realizadas usando um cromatógrafo líquido equipado com um sistema de detecção duplo consistindo de um detector de UV-vis a 210 nm (SPD-10Ai; Shimadzu) e um detector de índice de refração (RID-10Ai; Shimadzu). Uma coluna de exclusão de íons Shimadzu (Shim-pack SCR 101-H, 7,9 mm × 30 cm) foi utilizada para determinação de carboidratos e ácidos orgânicos utilizando como fase móvel a água ultrapura acidificada com HClO<sub>4</sub> (pH 2.1), fluxo de corrida 0,6 mL/min e temperatura de forno igual a 50 °C.

As concentrações foram determinadas a partir de curvas de calibração dos compostos puros (glicose, celobiose, xilose, arabinose, ácido fórmico, ácido glucurônico e ácido acético).

#### **2.6.1.2 Furfural e hidroximetilfurfural**

As análises de furfural e hidroximetilfurfural foram realizadas usando um cromatógrafo líquido equipado com um sistema de detecção duplo consistindo de um detector de UV-vis a 276 nm (SPD-10Ai; Shimadzu), um detector de índice de refração

(RID-10Ai; Shimadzu) e uma coluna C18 (LC18 15 cm x 4,6 cm). Utilizou-se como fase móvel acetonitrila/água 1:8 (v/v) com 1% de ácido acético a uma vazão de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>, a 27 °C e detector de UV a 276 nm.

As concentrações foram determinadas a partir de curvas de calibração dos compostos puros (furfural e hidroximetilfurfural).

## **2.7 Análises estatísticas**

Para a avaliação da produção enzimática *low scale* e em biorreator, o delineamento inteiramente casualizado (DIC) foi utilizado com arranjo fatorial 2x2x3, sendo duas condições de pH (4 e 7), duas temperaturas (19 e 23 °C) e três tempos (0, 7 e 14 dias). O DIC também foi utilizado para avaliação da degradação do bagaço de cana, com arranjo fatorial 6x2 com seis ensaios e duas temperaturas (19 e 23 °C). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas utilizando o teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, através do *Software R* (R Development Core Team, 2008).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Screening enzimático e seleção das melhores condições de cultivo

Foram selecionadas seis cepas de fungos filamentosos para produção de lacases e manganês peroxidase (MnP). Dentre as seis cepas testadas para produção enzimática, a única produtora de enzima foi *Penicillium brevicompactum* CCDCA 11400, responsável pela produção de lacase em todas as condições de temperatura testadas, como pode ser observado na Tabela 2.

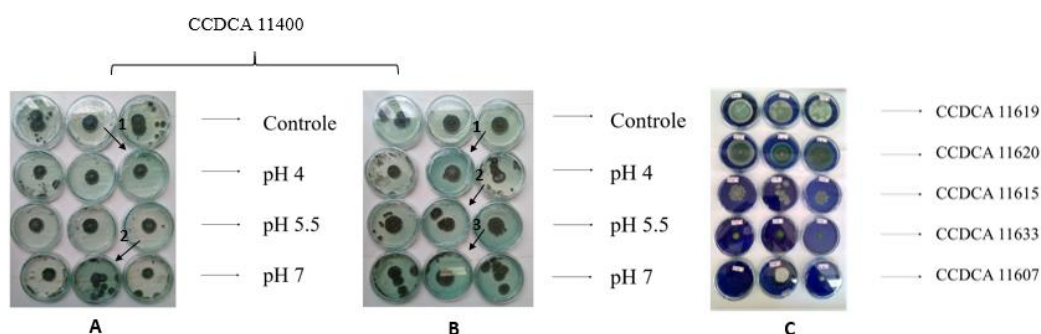
**Tabela 2:** Condições de temperaturas estabelecidas para produção de enzimas pelas cepas testadas. Para cepa isolada de solo amazônico (CCDCA 11400), foram testadas três temperaturas e para as cepas isoladas de solo antártico (CCDCA 11619, CCDCA 11620, CCDCA 11615, CCDCA 11633, CCDCA 11607) foram testadas duas condições de temperatura.

Espécie	Lacase			MnP		
	23 °C	19 °C	25 °C	23 °C	19 °C	25 °C
CCDCA 11400	+	+	+	-	-	-
CCDCA 11619	NT	-	-	NT	-	-
CCDCA 11620	NT	-	-	NT	-	-
CCDCA 11615	NT	-	-	NT	-	-
CCDCA 11633	NT	-	-	NT	-	-
CCDCA 11607	NT	-	-	NT	-	-

**Legenda:** CCDCA 11400: *Penicillium brevicompactum*, CCDCA 11619: *Penicillium lanosum*, CCDCA 11620: *Penicillium crustosum*, CCDCA 11615: *Penicillium thomii*, CCDCA 11633: *Penicillium daejonium*, CCDCA 11607: *Pseudogymnoascus pannorum*. NT: não testado.

Após a confirmação da produção enzimática nestas condições de temperatura, *P. brevicompactum* CCDCA 11400 foi submetido ao cultivo em diferentes condições de pH (4; 5.5 e 7) e o critério utilizado para seleção das melhores condições da produção de lacase, seguiu-se a intensidade da coloração esverdeada ao redor da colônia no meio de cultura (POINTING, 2000), conforme mostra a Figura 2.

**Figura 2:** Representação esquemática dos cultivos das cepas testadas para produção de lacases (A; B) em diferentes condições de pH e temperatura (23 °C - A e 19 °C - B) e manganês peroxidase (C) a 25 °C após 14 dias. A produção de lacase é representada pela coloração esverdeada no meio de cultivo ao redor da colônia. O critério de seleção das melhores condições de produção de lacase se deu por meio da intensidade da coloração no meio, representada pelas setas 1 para o pH 4 e 2 para o pH 7 na imagem A, e pelas setas 1 para o pH 4, 2 para o pH 5.5 e 3 para o pH 7 na imagem B. Para a confirmação da produção de manganês peroxidase, o meio de cultura deveria ser descolorido, o que não ocorreu, como mostra a imagem C.



**Fonte:** Do autor (2021).

O crescimento dos isolados fúngicos foi avaliado nos tempos 0, 7, 10 e 14 dias. Para *Penicillium brevicompactum* CCDCA 11400, até o décimo dia de cultivo, o meio de cultura permaneceu com a coloração inalterada. Do décimo ao décimo quarto dia, a diferença da coloração do meio foi imperceptível, aumentando a intensidade, principalmente, dos cultivos em pH 4 e 7.

A 19 °C, a produção de lacase se mostrou mais efetiva no último dia de incubação (14º dia) e nos pHs 4 e 7. A 23 °C, a produção de lacase também se mostrou mais efetiva no último dia de incubação (14º dia), nos pHs 4, 5.5 e 7. A fim de padronizar as condições de cultivo, as melhores condições selecionadas foram as temperaturas 19 e 23 °C e os pHs 4 e 7. A produção de manganês peroxidase não foi encontrada em nenhuma cepa testada a 19 °C e a 23 °C e, portanto, a produção desta enzima não pôde ser testada em biorreator.

A produção microbiana de manganês peroxidase já é reconhecida em diversas espécies fúngicas, principalmente aquelas pertencentes ao filo Basidiomycota e gênero *Pleurotus* (ALBORNOZ et al., 2018; SINGH et al., 2013; AYDINOĞLU et al., 2013). Entretanto, algumas espécies de ascomicetos têm sido utilizadas em consórcios para

produção de MnP, representadas pelo gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, principalmente pela espécie *Penicillium chrysogenum* (NAYANASHREE & THIPPESWAMY, 2014).

Neste trabalho, os microrganismos isolados da Antártica utilizados foram cultivados primariamente a 25 °C, temperatura média comumente utilizada para o cultivo de fungos filamentosos. Ao diminuir a temperatura para 19 °C, esperava-se a indução da produção enzimática, principalmente por se tratar de microrganismos psicrófilos, isolados de ambientes extremos, como a Antártica. Contudo, não houve produção enzimática.

Os microrganismos isolados de ambientes extremos de temperatura, como a Antártica, tendem a sofrer um estresse celular e, uma das estratégias de sobrevivência a estes estresses é através da síntese de enzimas (DUARTE et al., 2016; 2018). Acredita-se que as enzimas sintetizadas por microrganismos psicrófilos sejam mais adaptáveis à baixas temperaturas, as quais podem proporcionar uma maior eficiência catalítica (GOICHEVA et al., 2009). Duarte et al. (2018), através do screening enzimático de fungos filamentosos isolados de diversas origens da Antártica, testaram diferentes condições para produção de ligninases e, a melhor temperatura encontrada para produção de lacase foi a 15 °C. Entretanto, este parâmetro pode variar de espécie para espécie.

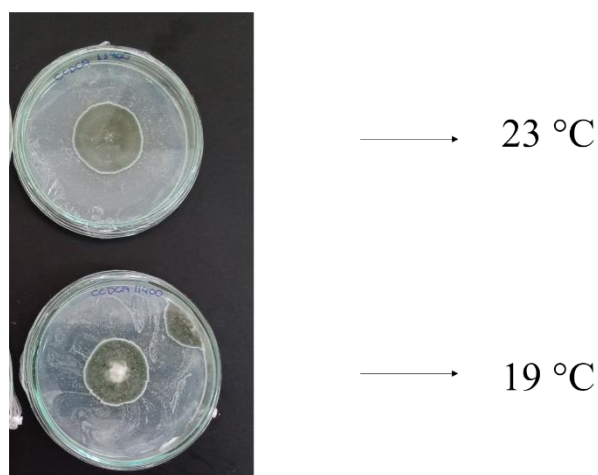
O potencial biotecnológico de *Penicillium brevicompactum* já é explorado para produção de ácido micofenólico (PATEL et al., 2016; HANSEN et al., 2011). Quanto a produção de enzimas, não há relato na literatura da produção de lacase e manganês peroxidase por esta espécie. Contudo, existem estudos que relatam a produção de outras enzimas, tais como L-glutaminase, L-asparaginase e lipases (ELSHAFEI et al., 2012, 2014; SILVA et al., 2011).

### **3.1.2 Utilização de atrazina como fonte de carbono por *Penicillium brevicompactum* CCDCA 11400**

A atrazina é um importante herbicida utilizado nas culturas de cana-de-açúcar e milho. O maior problema decorrente do seu uso é a capacidade de acumulação durante longos períodos (HALLBERG, 1987). Contudo, estratégias para degradação deste pesticida vêm sendo adotadas, e o uso de microrganismos é uma alternativa economicamente viável, que garante a sustentabilidade do processo.

A capacidade de utilização de atrazina como fonte de carbono alternativa por *P. brevicompactum* CCDCA 11400 foi testada a 19 °C e a 23 °C, conforme mostra a Figura 3.

**Figura 3:** Avaliação do crescimento de *P. brevicompactum* CCDCA 11400 após 14 dias de cultivo em meio de cultura contendo atrazina como fonte de carbono em duas diferentes temperaturas.



**Fonte:** Do autor (2021)

Já foram relatadas na literatura espécies de fungos filamentosos capazes de utilizar pesticidas como fonte alternativa de carbono, tais como *Trichoderma atroviride* e *Pleurotus* sp. (COLLA et al., 2008; SENE et al., 2010; MARINHO et al., 2017; ALUFFI et al., 2020). Acredita-se que isto seja possível pela síntese de enzimas pouco específicas no sítio ativo capazes, então, de reconhecer compostos ou estruturas dos compostos presentes em diversos pesticidas. As lacases são capazes de degradar a lignina, que apresenta compostos aromáticos em sua estrutura semelhantes aos encontrados na atrazina (KOROLEVA et al., 2015). Isto permitirá que simultaneamente ocorra a degradação do material orgânico com a descontaminação ambiental.

Dentre as espécies capazes de utilizar a atrazina como fonte alternativa de carbono, destacam-se aquelas pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, além dos fungos da podridão branca, conhecidos por sua alta capacidade de bioconversão e biodegradação de compostos xenobióticos (ALUFFI et al., 2020; KOROLEVA et al., 2015).

### 3.2 Fermentação em estado sólido para produção enzimática

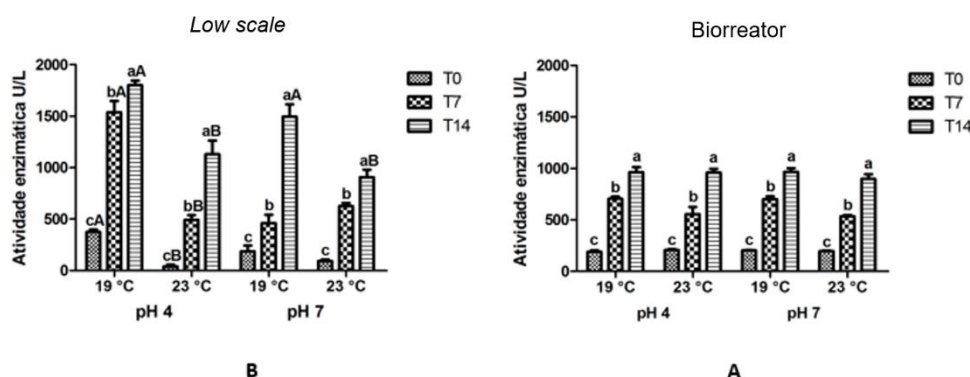


### 3.2.1 Produção enzimática

Embora pouco relatado na literatura, *Penicillium brevicompactum* é um fungo filamentosamente versátil que cresce entre -2 a 30 °C e possui a temperatura ótima igual a 23 °C e, no geral, cresce numa faixa de pH entre 3-7 (PITT, J. I., 2006). Estas características o tornam uma espécie interessante para utilização em estudos que envolvem a síntese de metabólitos microbianos, inclusive para produção de enzimas.

A Figura 4 mostra os valores da atividade enzimática de lacase de *Penicillium brevicompactum* CCDCA 11400, obtidos nos tempos 0 (T0), 7 (T7) e 14 (T14) dias de fermentação, tanto em biorreator quanto em erlenmeyer (*low scale*).

**Figura 4:** atividade enzimática (U/L) durante a fermentação em estado sólido em *low scale* (A) e biorreator (B), em três diferentes tempos, dois pHs (4 e 7) e duas temperaturas (19 °C e 23 °C), onde T0 = 0 dias, T7 = 7 dias e T14 = 14 dias.



**Legenda:** Figura A - Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Letras minúsculas avaliam o efeito das diferentes temperaturas para um mesmo intervalo de tempo. Letras diferentes indicam diferença estatística. Figura B - Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Letras minúsculas avaliam os diferentes ensaios em uma mesma condição. Letras maiúsculas avaliam o mesmo ensaio nas diferentes condições. Letras diferentes indicam diferença estatística.

As maiores médias foram encontradas nos ensaios conduzidos em *low scale* (erlenmeyer), com o maior valor encontrado a 19 °C e pH 4, no tempo T14, igual a 1801 U/L. Nos ensaios conduzidos em biorreator, as maiores médias foram encontradas no tempo T14, porém, sem diferenças estatísticas quando comparadas as temperaturas e os pHs.

Considerando a atividade enzimática *low scale*, houve diferença significativa em cada tempo de avaliação, para o pH 4.0 em ambas as temperaturas (19 °C e 23 °C), sendo as maiores produções enzimáticas observadas na menor temperatura (19 °C). No

pH 7.0 também houve diferença significativa em cada tempo de avaliação, porém com relação a temperatura apenas o tempo de 14 dias apresentou diferença significativa, com maior produção da enzima a 19 °C.

As maiores médias foram encontradas no tempo de 14 dias (T14). Na temperatura de 19 °C, a maior produção enzimática ocorreu em meio ácido (pH 4) com valor de 1801 U/L, enquanto no pH 7 a produção foi de 1495 U/L. A 23 °C, o maior valor também foi observado na fermentação em meio ácido (pH 4), igual a 1130 U/L. Em pH 7, o valor foi menor 907,6 U/L.

No tempo de 7 dias de fermentação (T7), maior concentração da enzima foi produzida a 19 °C, pH 4 com 1537 U/L e menor em pH 7 460 U/L. Contrariamente, na temperatura de 23 °C maior produção enzimática foi verificada em pH 7 com 625,6 U/L, enquanto em pH 4 a produção foi de 492.6 U/L.

No início da fermentação (T0), como esperado, observou-se os menores valores de produção enzimática. A 19 °C, os valores observados nos pHs 4 e 7 foram de 375,3 U/L e 187,6 U/L, respectivamente. A 23 °C, verificou-se menor atividade enzimática com relação a temperatura de 19 °C e que no pH 7 essa atividade foi maior que no pH 4, com valor de 92 U/L e 40,6 U/L, respectivamente.

Observou-se, no geral, maior produtividade a 19 °C e em pH 4. A 23 °C a atividade de lacase se mostrou maior em pH 4 apenas no tempo de 14 dias. Nos tempos inicial (T0) e T7, opostamente, a atividade de lacase se mostrou maior em pH 7.

Com relação a FES em biorreator, para a produção da lacase, não houve diferença significativa entre as temperaturas (19 e 23 °C) e nem entre os pH (4 e 7). Diferenças significativas foram observadas apenas entre os tempos de fermentação, em todas as condições de temperatura e de pH. No geral, as médias da atividade enzimática se mantiveram equivalentes em todos os ensaios.

As médias das atividades enzimáticas em cada tempo de fermentação foram muito semelhantes em todas as condições avaliadas. No tempo inicial (T0) a atividade da enzima foi de 188,5 U/L em pH 4 e 204,5 U/L em pH 7 a 19 °C, enquanto que a 23 °C esses valores foram de 208 U/L em pH 4 e 197,5 U/L em pH 7. Com sete dias de fermentação, a produção da enzima atingiu valores de 705 U/L em pH 4 e 701 U/L em pH 7 a 19 °C e de 555,5 U/L em pH 4 e 534 U/L em pH 7 a 23 °C. Com 14 dias de

fermentação a 19 °C as médias da produção enzimática foram de 963 U/L e 965,5 U/L, em pH 4 e 7, respectivamente. Já a 23 °C, os valores médios foram de 959 U/L e 897 U/L em pH 4 e 7, respectivamente.

Assim como *low scale*, a fermentação em biorreator a 19 °C se mostrou mais efetiva na produção de lacase por *P. brevicompactum* CCDCA 11400. Diferentemente do *low scale*, no biorreator, nesta temperatura, quando utilizado o inóculo com o pH 4, o microrganismo foi responsável por um menor rendimento enzimático quando comparado com o inóculo com o pH 7. Na temperatura de 23 °C, exceto no tempo T14, o inóculo com o pH 4 se mostrou eficiente. É provável que a atividade de lacase tenha sido maior nestes ensaios devido ao crescimento acentuado do fungo no substrato durante a fermentação, observado na Figura 5.

Considerando a fisiologia da espécie *Penicillium brevicompactum*, é possível explorar a sua versatilidade, principalmente se tratando dos fatores de cultivo, tais como a temperatura, o pH e a atividade de água. Desta forma, é praticável analisar a melhor forma de obtenção de metabólitos por meio da fermentação em estado sólido. Neste trabalho, a temperatura, pH e a atividade de água foram fatores determinantes para avaliar a capacidade deste fungo em sintetizar a lacase, assim como em quais condições obteve-se maior rendimento enzimático.

**Figura 5:** crescimento micelial de *P. brevicompactum* CCDCA 11400 perceptível nas colunas do biorreator onde ocorreu a FES durante 14 dias. As setas A e B indicam parte do crescimento fúngico no bagaço de cana que foi substrato para a fermentação.



**Fonte:** Do autor (2021).

A produção de lacases por fungos filamentosos já é bem reconhecida (WANG et al., 2019; DOS SANTOS et al., 2016; BUCIĆ-KOJIĆ et al., 2017; RODRÍGUEZ-COUTO et al., 2011). Uma das maneiras mais eficientes de se obter lacases fúngicas é através da fermentação em estado sólido. A FES é eficiente para estes fins, pois, ao utilizar substratos sólidos como base da fermentação, as condições proporcionadas no meio são semelhantes às condições naturais de muitos fungos filamentosos (BARRIOS-GONZÁLEZ et al., 2008; MIRANDA et al., 2014). O substrato geralmente atua como suporte e fonte de nutrientes, como fonte de carbono, por exemplo. A versatilidade dos resíduos agroindustriais permite que estes sejam reutilizados nestas fermentações, reduzindo o custo do processo (PEREZ et al., 2014).

Estas fermentações podem ocorrer em erlenmeyers ou em biorreatores, onde espera-se que a produção enzimática ocorra em maior escala. O biorreator de colunas já é bem utilizado para produção de enzimas fúngicas através da FES (FLORES et al., 2013; VALLE-PÉREZ et al., 2021).

Neste trabalho, a produção enzimática alcançou maiores valores nos ensaios conduzidos em *low scale* quando comparado com a produção enzimática em biorreator. Tal fato pode estar relacionado à superfície de cultivo e aeração do meio. O cultivo em erlenmeyers de 250 mL era supervisionado a cada 3 dias, onde fazia-se o revolvimento do substrato, permitindo a aeração do meio. Na fermentação conduzida em biorreator, as colunas eram preenchidas em até 85% de sua capacidade e o espaço, diferentemente do erlenmeyer, tornava-se restrito.

Além do espaço, que influencia a difusão de oxigênio e o crescimento fúngico, o tamanho das partículas do substrato, o substrato propriamente dito e as condições de cultivo, como o pH e a temperatura, influenciam diretamente a produção de lacases, que têm afinidade por substratos que apresentem substâncias fenólicas em sua composição, como a biomassa lignocelulósica (TADESSE et al., 2008).

A manutenção do tamanho das partículas do substrato nas fermentações em estado sólido deve favorecer o acesso aos nutrientes e a aeração do meio, que está diretamente ligada à disponibilidade de oxigênio. Geralmente, partículas menores são mais acessíveis aos ataques microbianos, contudo, quando muito pequenas, favorecem a compactação do substrato, vindo a interferir na aeração e no crescimento microbiano. Partículas maiores permitem maior aeração do meio, promovida pelos espaços entre as partículas, entretanto, limitam a superfície de ataque microbiano. Neste tipo de fermentação, geralmente são escolhidas partículas com os tamanhos entre 1 a 10 mm (MITCHELL et al., 2000; PANDEY et al., 2001).

Poucos estudos relatam a produção de lacase por *Penicillium* sp. (AYLA et al., 2018; SAROJ et al., 2014), entretanto, todos utilizaram a fermentação submersa como via de obtenção da enzima. Considerando as vantagens na obtenção de enzimas por fermentação em estado sólido (maior rendimento de enzimas e maior concentração final de produtos), torna-se interessante a condução de novos estudos utilizando microrganismos produtores de enzimas previamente testados em fermentação submersa.

Diante disso, é importante considerar que os valores estabelecidos de pH e temperatura estão intimamente relacionados com a manutenção do metabolismo da espécie de estudo, devendo-se atentar aos valores ótimos e a capacidade desta em tolerar condições adversas de cultivo para produção de metabólitos de interesse industrial

(PIROTA et al., 2014). Além disso, a mecânica das superfícies de cultivo é um fator que influencia as fermentações em estado sólido (MANAN & WEBB, 2017).

Neste caso, o design das colunas que compõem o biorreator, quando comparado com design dos erlenmeyers, pode ter sido um fator que impediu a produção enzimática nas mesmas proporções dos resultados obtidos para os ensaios *low scale*, uma vez que foram conduzidos nas mesmas condições. Outro fator que pode ter favorecido a produção enzimática *low scale* é a aeração, que foi promovida periodicamente pelo revolvimento do substrato. Em biorreator, a aeração foi promovida através de um compressor de bancada, que mantinha o fluxo de oxigênio nas colunas durante todo o tempo de fermentação.

A fermentação em estado sólido (FES) tem se mostrado vantajosa em relação à fermentação submersa, pois favorece o metabolismo e capacidade produtiva de enzimas do microrganismo. Além disso, a otimização das condições de cultivo, como o pH, temperatura, umidade e a composição do meio de cultura na FES potencializa a produção enzimática e pode viabilizar processos industriais para produção em larga escala (PANDEY, 1992; BARRIOS-GONZÁLEZ, 1996; SINDHU, 2015; SINGH, 2014).

A atividade de água, durante todo o processo de fermentação (*low scale* e biorreator), foi monitorada, com o objetivo de se controlar a umidade do meio e manter as condições adequadas para produção de enzimas através da FES.

Os valores médios correspondentes à atividade de água foram obtidos para cada ensaio, e mostraram que nas fermentações *low scale*, não foram alterados de forma significativa em nenhum dos ensaios. Opostamente, a  $a_w$  foi variável durante a fermentação em biorreator, com valores de 0.87 (no ensaio 3) a 0.99 (controle) a 23 °C. Em contrapartida, a 19 °C, o menor valor foi obtido no ensaio 3 e o maior valor no ensaio controle, no valor de 0.98. Na fermentação contendo a combinação atrazina e bagaço de cana, o menor valor foi obtido no ensaio 3, no valor de 0.90 e o maior valor nos ensaios 2 e 4, no valor de 0.97.

Estudos que buscam a produção enzimática de forma otimizada tendem a controlar diversos fatores que influenciam a eficiência da FES, como o meio de cultivo, a temperatura, pH e a presença de água no meio, relacionada diretamente com a

atividade de água e a umidade (HE et al., 2019). A atividade de água ( $a_w$ ) e a umidade relativa são fatores correlacionados que podem ter seus valores otimizados, a fim de aumentar a capacidade do fungo de produzir enzimas (RANJBAR & HEJAZI, 2019).

O uso de biorreatores automáticos favorece o controle destas condições e, conseqüentemente, favorece o metabolismo microbiano, uma vez que as condições se encontram adequadas para produção de enzimas (RAY & BEHERA, 2017; GE et al., 2017). Tanto em *low scale*, quanto em biorreator não houve o controle da umidade, apenas o monitoramento da atividade de água. No entanto, a proposta aqui foi implementar um sistema de produção enzimática com pouco controle, mas eficiente de modo que possa ser implementado em usinas e cachaçarias para uso do bagaço de cana como substrato.

Quando não é possível controlar estes fatores de forma automática, uma forma de minimizar o impacto causado pelas variações de valores relacionados a atividade de água e a umidade é monitorar as amostras periodicamente e, quando necessário, umidificar o substrato para a manter a viabilidade do microrganismo no estágio fisiológico de produção enzimático. O excesso de água livre no meio pode afetar a capacidade do microrganismo produzir enzimas, pois preenche os espaços entre o substrato, dificultando a difusão de oxigênio no meio, além disso, favorece a contaminação (GERVAIS & MOLIN, 2003; GONZÁLES & TARRAGÓ-CASTELLANOS, 2017). Geralmente, na FES, a atividade de água deve assumir valores entre 0.80 a 0.99 para manutenção do metabolismo fúngico (MARTINS et al., 2011).

Em síntese, considerando os valores de  $a_w$ , especialmente aqueles referentes aos ensaios 2 e 5, nos quais referem-se ao uso do inóculo microbiano para a síntese de lacase, pode-se afirmar que a média da atividade de água durante a FES se manteve dentro dos parâmetros considerados viáveis para manutenção do metabolismo de fungos filamentosos, uma vez que os valores variaram entre 0.95 – 0.99, favorecendo o metabolismo de *P. brevicompactum* CCDCA 11400 naquelas condições. Diante dos resultados expostos, *P. brevicompactum* CCDCA 11400 se mostrou eficiente na produção de lacase utilizando o bagaço de cana como substrato e fonte de carbono nas condições testadas.

### **3.2.2 Degradação do substrato (bagaço de cana)**

Os valores obtidos para degradação do bagaço de cana foram convertidos em porcentagem e as Tabelas 3 e 4 mostram os as médias após análises estatísticas.

As médias obtidas no ensaio controle provavelmente se referem a retirada periódica de frações das amostras para aferição da atividade de água.

**Tabela 3:** Médias de cada ensaio referentes a degradação do bagaço de cana após 14 dias de fermentação em estado sólido em biorreator em duas temperaturas (19 °C e 23 °C).

Degradação do substrato (%)		
Ensaio	19 °C	23 °C
Controle	22,78 cA	23,36 bA
1	30,76 bA	24,86 bA
2	38,86 aA	33,89 aA
3	19,13 cA	17,93 cA
4	34,86 aA	15,49 cB
5	29,69 bA	23,86 bA

**Legenda:** Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Letras minúsculas avaliam os diferentes ensaios na mesma temperatura. Letras maiúsculas avaliam o mesmo ensaio nas diferentes temperaturas. Letras diferentes indicam diferença estatística. Controle: SCB + água destilada; 1 = SCB + enzima pura; 2 = SCB + inóculo (pH 4); 3 = SCB + extrato bruto (pH 4); 4 = SCB + extrato bruto (pH 7); 5 = SCB + inóculo (pH 7). SCB = bagaço de cana.

Na temperatura de 19 °C, houve diferença significativa entre os ensaios sendo observados maiores porcentagens de degradação para os ensaios 2 (SCB + inóculo, pH 4) com 38,86% e 4 (SCB + extrato bruto, pH 7) com 34,86%. A 23 °C o ensaio 2 também apresentou maior porcentagem de degradação (33,89%).

Avaliando um mesmo ensaio nas diferentes condições de temperatura, observou-se diferença significativa apenas para o ensaio 4 (SCB + extrato bruto, pH 7) que apresentou mais que o dobro da porcentagem de degradação a 19 °C (34,86%) quando comparado a 23 °C (15,49%). Nos demais ensaios, embora não tenha sido observada diferença significativa, maiores valores de degradação foram obtidos a 19 °C.

Além da diferença observada entre os ensaios, pôde-se observar que a temperatura influenciou diretamente a degradação do substrato. Isto pode estar diretamente ligado à produção de lacase, que se mostrou maior a 19 °C.



**Tabela 4:** Degradação do bagaço de cana após 14 dias de fermentação em estado sólido em biorreator em duas condições (sem atrazina e com atrazina).

Degradação do substrato (%)		
Ensaio	Sem atrazina	Com atrazina
Controle	22,78 cA	24,86 bA
1	30,76 bA	33,99 aA
2	38,86 aA	40,00 aA
3	19,13 cB	35,33 aA
4	34,86 aB	42,73 aA
5	29,69 bB	38,66 aA

**Legenda:** Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Letras minúsculas avaliam os diferentes ensaios na mesma condição (com atrazina ou sem atrazina). Letras maiúsculas avaliam o mesmo ensaio nas diferentes condições (com atrazina ou sem atrazina). Letras diferentes indicam diferença estatística. Controle: SCB + água destilada; 1 = SCB + enzima pura; 2 = SCB + inóculo (pH 4); 3 = SCB + extrato bruto (pH 4); 4 = SCB + extrato bruto (pH 7); 5 = SCB + inóculo (pH 7). Com a atrazina (Atz), os ensaios foram os mesmos, porém, adicionou-se a atrazina ao bagaço de cana, exceto pelo ensaio controle, que permaneceu o mesmo. SCB = bagaço de cana.

Sem a atrazina, os melhores resultados foram obtidos nos ensaios 2 (SCB + inóculo, pH 4) e 4 (SCB + extrato bruto, pH 7). Com a atrazina, todos os ensaios tiveram maiores resultados comparados ao controle (sem atrazina). Comparando um mesmo ensaio em cada condição (ausência ou presença de atrazina), houve diferença significativa para os ensaios 3, 4 e 5 com maior taxa de degradação na presença da atrazina. Nos demais ensaios, embora não tenha sido observada diferença significativa, os maiores valores de degradação foram obtidos também na presença de atrazina. No ensaio 2, não houve diferença entre a ausência e uso da atrazina.

O uso de extrato bruto na sua forma livre pode ter a sua eficiência reduzida dependendo do substrato e das condições do meio. Uma das formas de manter e/ou aumentar a eficiência dos extratos brutos é através da utilização de mediadores redox, que se ligam no sítio ativo da enzima e no substrato com a finalidade de aumentar o potencial redox e, conseqüentemente, permitir uma maior oxidação, neste caso, do bagaço de cana. Além de aumentar a eficiência enzimática, os mediadores são capazes de manter a funcionalidade da enzima durante o processo de fermentação, permitindo um melhor alcance de resultados (ZENG et al., 2017; MOROZOVA et al., 2007).

A atrazina pode ter atuado como indutor de lacase, potencializando o seu efeito de oxidação sobre o substrato e, conseqüentemente, a degradação do bagaço de cana.

Singh et al. (2009) e Cupul et al. (2014) estudaram diferentes tipos de substrato e o efeito destes sobre a atividade de lacase. Observaram que diversos pesticidas, inclusive a atrazina, induziram a atividade de lacase, aumentando a atividade enzimática e concluíram que isto só foi possível devido à presença de um anel aromático em sua estrutura, que induz a síntese de lacase. Acredita-se que, nestes casos, a síntese de lacase é maior pois trata-se de um mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo causado pelo substrato, no caso, o pesticida.

O fato de estes ensaios terem apresentado um melhor resultado nestas condições pode estar relacionado com o potencial da lacase em degradar este tipo de material, uma vez que as lacases são enzimas lignocelulolíticas que atuam na oxidação de compostos aromáticos, como a lignina, na qual o O<sub>2</sub> é o acceptor final da reação (BETTIN et al., 2014). Como são encontradas em diversas fontes, existem relatos de que a enzima possui diferentes mecanismos de atuação e, até mesmo sua estrutura não pode ser padronizada, variando de espécie para espécie (MADHAVI & LELE, 2009). A busca por lignocelulases se dá principalmente pela capacidade que elas possuem em degradar ou converter qualquer tipo de matéria lignocelulósica (BALLESTEROS, M., 2010).

Os ensaios 3 e 4 correspondem a inoculação do extrato bruto (pH 4 e 7, respectivamente), enquanto o ensaio 5 corresponde ao inóculo (pH 7) e, portanto, pode-se afirmar que, nestas condições, o uso dos extratos brutos e do inóculo fúngico na degradação da biomassa lignocelulósica do bagaço de cana se mostrou eficiente, principalmente no ensaio que utilizou a combinação do bagaço de cana com a atrazina.

Neto et al. (2017) utilizaram o extrato bruto de lacase fúngica para conversão do bagaço de cana e obtiveram bons resultados, uma vez que, após o tratamento, ocorreu a deslignificação da biomassa lignocelulósica, facilitando o ataque de enzimas hidrolíticas como as celulasas e as hemicelulasas às frações de celulose e hemicelulose.

A utilização de inóculos microbiano, como nos ensaios 2 e 5, para degradação do bagaço combinado com a atrazina ainda não foi relatada em outros estudos, entretanto, o bom desempenho destes ensaios pode estar relacionado com a capacidade de *Penicillium brevicompactum* CCDCA 11400 em utilizar fontes alternativas de carbono, como a lignina e a atrazina. Além disso, pode-se considerar que as estruturas químicas que formam estes compostos são representadas por anéis aromáticos, sendo os principais alvos de ataques por lacases (SU et al., 2018).

A produção de lacases por espécies do gênero *Penicillium* é bem limitada (NARAIAN & GAUTAM, 2018). Por isso, tem-se utilizado coquetéis enzimáticos, nos quais enzimas lignocelulolíticas de *Penicillium* sp. e outros fungos filamentosos são aplicadas em processos de tratamento do bagaço de cana, garantindo uma maior eficiência na deslignificação das biomassas lignocelulósicas (DWIVEDI et al., 2011; RAI et al., 2019).

O ensaio 1 corresponde ao uso da lacase comercial e, em comparação com as médias dos demais ensaios e em ambos os ensaios, as médias se mantiveram próximas, com uma pequena diferença favorável ao ensaio que possui a atrazina. A enzima pura tende a ter sua eficácia aumentada quando imobilizada, combinada com extratos brutos ou com uma enzima pura de outra fonte ou, por fim, quando combinada com cofatores específicos (HOWARD et al., 2003; BERNAL et al., 2018; WANG et al., 2014). Outra alternativa que aumenta a eficiência da enzima é o uso de mediadores, que têm sido implementados, formando um complexo enzima-mediador (MOROZOVA et al., 2007). O sistema lacase mediador utiliza mediadores -NO, -NOH e -NRNOH para aumentar a capacidade de oxidação de compostos aromáticos e tem sido eficiente nos tratamentos de materiais lignocelulósicos e compostos xenobióticos, como os pesticidas (HOWARD et al., 2003; DENG et al., 2019).

Embora não tenham sido utilizados mediadores nos ensaios apresentados neste trabalho, observou-se um potencial elevado no uso de inóculos de *Penicillium brevicompactum* CCDCA 11400 e nos extratos brutos aplicados nos ensaios que objetivaram a degradação do substrato utilizado na fermentação em estado sólido, no caso, o bagaço de cana.

### **3.2.3 Caracterização dos compostos do bagaço de cana após FES por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Após o *scale-up* da produção enzimática em biorreator, o bagaço de cana foi caracterizado a fim de se obter a concentração dos compostos presentes nas frações celulósicas e hemicelulósicas da biomassa lignocelulósica. Considerou-se como fração hemicelulósica a xilose, a arabinose, o ácido acético e o ácido glucurônico e o furfural, e como fração celulósica a glicose, a celobiose, o hidroximetilfurfural e o ácido fórmico (DE CARVALHO OLIVEIRA et al. 2018).

Geralmente, a conversão bioquímica dos compostos lignocelulósicos seguem vias complexas, envolvendo uma série de produtos intermediários ao longo das reações químicas (GIRISUTA et al., 2013). A celulose é despolimerizada em glicose e, posteriormente, convertida em hidroximetilfurfural. Este último atua como produto intermediário da reação que, quando catalisado, é convertido em ácidos (levulínico e fórmico). A hemicelulose de bagaço de cana é composta em sua maior parte por xilanas que, quando despolimerizada, é convertida em xilose e arabinose e, posteriormente, transformados em furfural e ácido fórmico. A lignina, estrutura mais resistente do bagaço de cana, é convertida em ácidos solúveis e em lignina insolúvel (GIRISUTA et al., 2013).

Após os 14 dias de fermentação o bagaço de cana possivelmente sofreu conversões bioquímicas devido a ação de lacase de *Penicillium brevicompactum* CCDCA 11400. Além disso, é provável que a biomassa lignocelulósica também tenha sido alvo de ataques por outras enzimas ligninocelulolíticas, como as celulasas e as hemicelulasas. Os valores das concentrações dos carboidratos e ácidos orgânicos obtidas nos ensaios conduzidos em biorreator são mostrados nas Tabelas 4 e 5. Não foram detectados os carboidratos celobiose e arabinose e os ácidos glucurônico e fórmico.

**Tabela 4:** Concentração (g/L) dos carboidratos e ácidos orgânicos presentes no bagaço de cana referentes aos ensaios conduzidos em biorreator após fermentação em estado sólido durante 14 dias a 23 °C. Dados obtidos após análise por CLAE.

Ensaio	Glicose	Xilose	Ácido acético	Furfural	HMF
Controle	0.150 ± 0.031	0.239 ± 0.076	ND	0.0003 ± 0.0002	0.0005 ± 0.0004
1	0.135 ± 0.081	0.141 ± 0.104	0.042 ± 0.035	0	0.0019 ± 0.0001
2	0.015 ± 0.014	0.013 ± 0.016	0.033 ± 0.014	0.0002 ± 0.0001	0.0005 ± 0.0001
3	0.132 ± 0.052	0.160 ± 0.077	0.001 ± 0.015	0.0001	0.0027 ± 0.0016
4	0.146 ± 0.026	0.179 ± 0.038	0.002 ± 0.008	ND	0.0020 ± 0.0004
5	0.009 ± 0	0.011 ± 0.007	0.043 ± 0.032	0.0001	0.0002 ± 0.0003

**Legenda:** Controle: SCB + água destilada; 1 = SCB + enzima pura; 2 = SCB + inóculo (pH 4); 3 = SCB + extrato bruto (pH 4); 4 = SCB + extrato bruto (pH 7); 5 = SCB + inóculo (pH 7). SCB = bagaço de cana. Média  $\pm$  desvio padrão. ND = não detectado. HMF = hidroximetilfurfural.

**Tabela 5:** Concentração (g/L) dos carboidratos e ácidos orgânicos presentes no bagaço de cana referentes aos ensaios conduzidos em biorreator após fermentação em estado sólido durante 14 dias a 19 °C. Dados obtidos após análise por CLAE.

Ensaio	Glicose	Xilose	Ácido acético	Furfural	HMF
Controle	0.128 $\pm$ 0.104	0.097 $\pm$ 0.068	ND	0.0004 $\pm$ 0.0003	0.0171 $\pm$ 0.0132
1	0.075 $\pm$ 0.025	0.096 $\pm$ 0.029	0.025 $\pm$ 0.012	0.0001 $\pm$ 0.0000	0.0002 $\pm$ 0.0001
2	0.011 $\pm$ 0.009	ND	0.085 $\pm$ 0.064	0.0001 $\pm$ 0.0000	0.0001 $\pm$ 0.0000
3	0.045 $\pm$ 0.012	0.082 $\pm$ 0.036	ND	0.0001 $\pm$ 0.0001	0.0004 $\pm$ 0.0000
4	0.170 $\pm$ 0.022	0.175 $\pm$ 0.018	0.008 $\pm$ 0.018	0.0003 $\pm$ 0.0001	0.0025 $\pm$ 0.0001
5	0.030 $\pm$ 0	0.005 $\pm$ 0.019	0.228 $\pm$ 0.144	0.0001 $\pm$ 0.0000	0.0003 $\pm$ 0.0003

**Legenda:** Controle: SCB + água destilada; 1 = SCB + enzima pura; 2 = SCB + inóculo (pH 4); 3 = SCB + extrato bruto (pH 4); 4 = SCB + extrato bruto (pH 7); 5 = SCB + inóculo (pH 7). SCB = bagaço de cana. Média  $\pm$  desvio padrão. ND = não detectado. HMF = hidroximetilfurfural.

Em ambas as temperaturas (23 e 19 °C), as menores concentrações de glicose foram encontradas nos ensaios 2 e 5. Com relação à xilose, as menores concentrações foram encontradas nos ensaios 2 e 5 a 23 °C e 3 e 5 a 19 °C. Nesta última temperatura, a xilose não foi detectada no ensaio 2.

Referente aos ácidos orgânicos, apenas o ácido acético foi detectado e, ainda assim, ausente nos ensaios controle e nos ensaios 3 a 19 °C. As menores concentrações foram detectadas nos ensaios 3 e 4 a 23 °C e nos ensaios 1 e 4 a 19 °C.

As maiores concentrações de glicose e xilose foram encontradas nos ensaios controle, 1 e 4. Possivelmente, estes ensaios apresentaram estes resultados devido a ação de celulasas e hemicelulasas presentes no meio, uma vez que as concentrações de glicose e xilose aumentam à medida que a celulose e hemicelulose são despolimerizadas (VERARDI et al., 2016). A 23 °C as concentrações destes carboidratos foram ainda maiores que quando comparados a 19 °C.

Em contrapartida, as concentrações de ácido acético foram maiores nos ensaios 5 e 2 a 19 °C e nos ensaios 1 e 5 a 23 °C. O ácido acético é um composto facilmente

hidrolisado derivado do grupo acetil presente na hemicelulose (SAHA et al., 2013), que pode ser considerado composto inibidor da fermentação e, geralmente, são removidos nos processos de conversão da biomassa lignocelulósica.

Com relação ao hidroximetilfurfural e ao furfural, é comum que estes compostos sejam removidos durante as etapas de pré-tratamento, pois, assim como o ácido acético, também são considerados compostos inibidores da fermentação. A formação de todos estes compostos inibidores acontece após a despolimerização das pentoses e hexoses. Enquanto o hidroximetilfurfural é produto de formação das celuloses, o furfural é produto de hemiceluloses. A presença de inibidores impede a fermentação, uma vez que estes compostos, em contato com a célula microbiana, prejudicam o metabolismo intracelular, uma vez que afetam as enzimas da via glicolítica (JONSSON et al., 2013; RAN et al., 2014)

Embora detectados em concentrações muito baixas em relação aos valores encontrados para os carboidratos e ácidos orgânicos, o furfural obteve a concentração mais alta a 19 °C, no ensaio controle. O mesmo foi observado a 23 °C. Para o hidroximetilfurfural, os maiores valores foram detectados a 23 °C, nos ensaios 3, 4 e no Controle. A 19 °C, o maior valor encontrado foi no ensaio Controle, seguido do ensaio 4. Isto pode ser explicado pela ausência do inóculo do microrganismo *Penicillium brevicompactum* CCDCA 11400 neste ensaio, bem como pela ausência do extrato bruto de lacase. Neste ensaio, havia apenas o bagaço de cana e água destilada e, possivelmente, a presença de outras enzimas no meio foi capaz de hidrolisar o bagaço de cana e, no caso, de hidrolisar a celulose em hidroximetilfurfural e a hemicelulose em furfural.

Nos ensaios 3 e 4, onde também foram detectados estes compostos, a presença do extrato bruto de lacase e de outras enzimas no meio pode, de certa forma, ter contribuído para despolimerização não somente da lignina, seu principal alvo, mas também da celulose e da hemicelulose. Entretanto, ainda são necessárias mais análises para, de fato, concluir

Assim sendo, considera-se que o bagaço de cana sofreu transformações bioquímicas através do ataque de enzimas, confirmado pelos dados obtidos pela cromatografia líquida. Contudo, para afirmar que esta conversão tenha sido realizada pela lacase de *P. brevicompactum* CCDCA 11400, é preciso obter mais dados

relacionados aos produtos de formação da lignina e a caracterização química dos polímeros formadores do material lignocelulósico (lignina, celulose e hemicelulose).

#### 4 CONCLUSÃO

O potencial biotecnológico de *Penicillium brevicompactum* CCDCA 11400 foi observado através da capacidade de utilização de fontes alternativas de carbono, como o bagaço de cana e a atrazina, e da produção de lacase. O microrganismo demonstrou a capacidade de síntese enzimática na fermentação em estado sólido *low scale* e em biorreator, principalmente em meio ácido (pH 4) e a 19 °C. Além disso, observou-se após os 14 dias de fermentação, uma redução considerável do substrato (bagaço de cana), sobretudo quando combinado com a atrazina. Com relação à conversão do material lignocelulósico, possivelmente a lacase teve efeito positivo na oxidação da lignina.

Diante dos resultados expostos, o fungo *P. brevicompactum* CCDCA 11400 pode ser considerado um microrganismo promissor, com potencial para aplicação na indústria de enzimas. A multifuncionalidade desta espécie, caracterizada pela sua fisiologia e pelos fatores que influenciam a síntese de metabólitos, como a temperatura, o pH e a atividade de água, estimula a busca por novas aplicações biotecnológicas.

Ademais, poucos trabalhos utilizando este microrganismo para produção de enzimas foram encontrados na literatura e, portanto, este estudo servirá como base para trabalhos futuros.



## REFERÊNCIAS

- ALBORNOZ, S.; WYMAN, V.; PALMA, C.; CARVAJAL, A. Understanding of the contribution of the fungal treatment conditions in a wheat straw biorefinery that produces enzymes and biogas. **Biochemical Engineering Journal**. 140, 140–147, 2018.
- ALUFFI, M. E; CARRANZA, C. S; BENITO, N.; MAGNOLI, K.; MAGNOLI, C. E.; BARBERIS, C. L. Isolation of culturable mycota from Argentinean soils exposed or not-exposed to pesticides and determination of glyphosate tolerance of fungal species in media supplied with the herbicide. **Revista Argentina de Microbiologia**, 2020.
- ARCHIBALD, F. S. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. **Applied Environmental Microbiology**, 58(9): 110-116, 1992.
- AYDINOĞLU, T.; SARGIN, S. Production of laccase from *Trametes versicolor* by solid-state fermentation using olive leaves as a phenolic substrate. **Bioprocess Biosystem Engineering**. 36, 215–222, 2013.
- AYLA, S.; GOLLA, N.; PALLIPATI, S. Production of ligninolytic enzymes from *Penicillium* sp. and its efficiency to decolourise textile dyes. **Open Biotechnology Journal**, 12, 112–122, 2018.
- BALLAMINUT, N.; YAMANAKA, R.; MACHADO, K. M. G. Interference of a commercial catalase preparation in laccase and peroxidase activities. **Brazilian Archives of Microbiology and Technology**, 52(5): 1193-1198, 2009.
- BALLESTEROS, M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. In **Bioalcohol Production. Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass**; Waldron, K., Ed.; Woodhead Publishing: Cambridge, pp. 159–177, 2010.
- BARRIOS-GONZALES, J.; TARRAGÓZ, CASTALLANOS, R. Fungal Metabolites. In: **Solid-State Fermentation: Special Physiology of Fungi**. (Chapter 6), 319–347, 2017.
- BARRIOS-GONZÁLEZ J.; BAÑOS J. G.; COVARRUBIAS, A. A.; GARAY-ARROYO A. Lovastatin biosynthetic genes of *Aspergillus terreus* are differentially expressed in solid-state and in liquid submerged fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology** 79:179–186, 2008.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Production of Secondary Metabolites by Solid-State Fermentation. **Biotechnology Annual Review**, v2. 85–121, 1996.
- BEHERA, S. S.; RAY, R. C. Solid State Fermentation for Production of Microbial Cellulases: Recent Advances and Improvement Strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2015.
- BENTO, T. S.; TORRES, L. M. B.; FIALHO, M. B.; BONONI, V. L. R. Leaf extracts of *Casearia sylvestris* and *Casearia decandra* affect growth and production of ligninolytic enzymes in wood decay basidiomycetes. **Hoehnea**, 43, pp. 575-581, 2016.
- BERNAL, C.; RODRIGUEZ, K.; MARTINEZ, R. Integrating enzyme immobilization and protein engineering: an alternative path for the development of novel and improved industrial biocatalysts. **Biotechnology**. 1470–1480, 2016.

BETTIN, F.; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T. A.; SILVEIRA, M. M.; DILLON, A. J. P. Additive effects of CuSO<sub>4</sub> and aromatic compounds on laccase production by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 using sucrose as a carbon source. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 31(2), 335–346, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cana-de-açúcar: saiba mais**. Brasília, DF, 2015. Disponível em: Acesso em: fev. 2021.

BUCÍK-KOJÍC, A.; ŠELO, G.; ZELIĆ, B.; PLANINIĆ, M.; TIŠMA, M. Recovery of phenolic acid and enzyme production from corn silage biologically treated by *Trametes versicolor*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, 181, 948–960, 2017.

CARVALHO, A. F. A.; FIGUEIREDO, F. C.; DE CAMPIONI, T. S.; PASTORE, G. M.; DE OLIVA NETO, P. Improvement of some chemical and biological methods for the efficient production of xylanases, xylooligosaccharides and lignocellulose from sugarcane bagasse. **Biomass and Bioenergy**, 143, 105851, 2020.

CARVALHO, M. A.; COSTA, L. M. A. S.; DA SILVEIRA, D. M.; DIAS, D. R.; ZIED, D. C.; DIAS, E. S. Ligninase and Cellulase Activity of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler Strains in Different Culture Media. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, 10(3), p. 1683-1691, 2016.

CASTRO, N. R.; SPOLADOR, H. F. S.; GASQUES, J. G. Valor da produção, produtividade e uso dos insumos na agricultura – uma análise descritiva para alguns estados brasileiros. **Perspectiva Econômica**, 13, 1-23, 2017.

CIM UFLA. Centro de Inteligência em Mercados. Disponível em: <https://ufla.br/noticias/pesquisa/14322-agronegocio-emprega-2-4-milhoes-de-pessoas-em-minas-gerais-segundo-cim-ufla>. Acesso em: fev. 2021.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; DE LIMA, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Isolation and screening of fungi to bioremediation from triazine herbicide contaminated soil. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 809-813, 2008.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3652-producao-de-graos-deve-superar-268-milhoes-de-toneladas-na-safra-202021#:~:text=De%20acordo%20com%20o%201%C2%BA,de%20toneladas%20da%20%C3%BAltima%20safra>. Acesso em: fev. 2020.

COPETE-PERTUZ, L. S.; ALANDETE-NOVOA, F.; PLÁCIDO, J.; CORREA-LONDOÑO, G. A.; MORA-MARTÍNEZ, A. L. Enhancement of ligninolytic enzymes production and decolourising activity in *Leptosphaerulina* sp. by co-cultivation with *Trichoderma viride* and *Aspergillus terreus*. **Science of The Total Environment**, 646, 1536–1545, 2019.

COSTA, I. G.; Assahara, C. H. Descarte De Resíduos Agroindustriais Como Atividade Potencialmente Poluidora: tutela ambiental e dano social. **Revista Húmus**, vol. 10, num. 30, 21-45, 2020.

CUPUL, W. C.; ABARCA, G. H.; VÁZQUEZ, R. R.; SALMONES, D.; HERNÁNDEZ, R. G.; GUTIÉRREZ, E. A. Response of ligninolytic macrofungi to the herbicide atrazine: dose-response bioassays. **Revista Argentina de Microbiología**, 46(4), 348–357, 2014.

DAWSON, C. R.; TARPLEY, W. B. The copper oxidases. In: Sumner, J.B. and Myrbäck, K. (Eds.), **The Enzymes**, 1st ed., vol. 2, Academic Press, New York, p. 454-498, 1951.

DE CAMPOS, A. L.; IGNACIO, A. R. A.; OLIVEIRA, E. S.; JUNIOR, & LÁZARO, W. L. O avanço do agrotóxico no brasil e seus impactos na saúde e no ambiente. **Revista Em Agronegócio e Meio Ambiente**, 14(1), 1-15, 2021.

DE CARVALHO OLIVEIRA, F.; SRINIVAS, K.; HELMS, G. L.; ISERN, N. G.; CORT, J. R.; GONÇALVES, A. R.; AHRING, B. K. Characterization of coffee (*Coffea arabica*) husk lignin and degradation products obtained after oxygen and alkali addition. **Bioresource Technology**, 2018.

DENG, Z., XIA, A., LIAO, Q. *et al.* Laccase pretreatment of wheat straw: effects of the physicochemical characteristics and the kinetics of enzymatic hydrolysis. **Biotechnology Biofuels** 12, 159, 2019.

DUARTE, A. W. F.; BARATO, M. B.; NOBRE, F. S.; POLEZEL, D. A.; DE OLIVEIRA, T. B.; DOS SANTOS, J. A.; RODRIGUES, A.; SETTE, L. D. Production of cold-adapted enzymes by filamentous fungi from King George Island, Antarctica. **Polar Biology**, 2018.

DUARTE, A. W. F.; PASSARINI, M. R.; DELFORNO, T. P. *et al.* Yeasts from macroalgae and lichens that inhabit the South Shetland Islands, Antarctica. **Environmental Microbiology Report**. 8, 874–886, 2016.

DWIVEDI, P.; VIVEKANAND, V.; PAREEK, N.; SHARMA, A.; SINGH, R. P. Co-cultivation of mutant *Penicillium oxalicum* SAUE-3.510 and *Pleurotus ostreatus* for simultaneous biosynthesis of xylanase and laccase under solid-state fermentation. **N Biotechnology**, 28(6), 616–626, 2011.

ELSHAFEI A. M.; HASSAN, M. M.; ABOUZEID, M. A.; MAHMOUD, D. A.; ELGHONEMY, D. H. Screening and optimization of L-asparaginase and L-glutaminase production by some filamentous fungi. **Advances in Food Science**, 34:150-8, 2012.

ELSHAFEI, A. M.; HASSAN, M. M.; ALI, N. H. *et al.* Purification, kinetic properties and antitumor activity of L- glutaminase from *Penicillium brevicompactum* NRC829. **British Microbiology Research Journal**. 4:97-115, 2014.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ciência que Transforma: Resultados e Impactos Positivos da Pesquisa Agropecuária na Economia, no Meio Ambiente e na Mesa do Brasileiro. **Embrapa**, 2020.

FAO. Food and agriculture data: production: crops. Acesso em: fev. 2021.

FERREIRA, F. L.; DALL'ANTONIA, C. B.; SHIGA, E. A.; ALVIM, L. J.; PESSONI, R. A. B. Sugarcane bagasse as a source of carbon for enzyme production by filamentous fungi. **Hoehnea**, 45(1), 134–142, 2018.

FLORES, J. A.; GSCHAEDLER, A.; AMAYA-DELGADO, L.; HERRERA-LÓPEZ, E. J.; ARELLANO, M.; ARRIZON, J. Simultaneous saccharification and fermentation of *Agave tequilana* fructans by *Kluyveromyces marxianus* yeasts for bioethanol and tequila production. **Bioresource Technology**, 146, 267–273, 2013.

GERVAIS P.; MOLIN P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 13, 85–101, 2003.

GIOVANINI, A.; CLOVIS SAATH, K.; ALMEIDA, H. J. F. Ineficiências Alocativas E Sua Relação Como Crescimento Da Produtividade Agropecuária Internacional. **Revista De Economia E Agronegócio**, 17(3), 420-441, 2019.

GIRISUTA, B.; DUSSAN, K.; HAVERTY, D.; LEAHY, J. J.; HAYES, M. H. B. A kinetic study of acid catalysed hydrolysis of sugar cane bagasse to levulinic acid. **Chemical Engineering Journal**, 217, 61-70, 2013.

GLENN, J. K.; AKILESWARAN, L.; GOLD, M. H. Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 251, 688-696, 1986.

GOICHEVA Y. G.; TOSI, S.; KRUMOVA E. T. et al. Temperature downshift induces antioxidant response in fungi isolated from Antarctica. **Extremophiles**, 13, 273–281, 2009.

HALLBERG, G. R. The Impacts of Agricultural Chemicals on Ground Water Quality. **GeoJournal**, 15, 283-295, 1987.

HANSEN, B. G.; MORTENSEN, U. H.; HERTWECK, C.; NIELSEN, J. REGUEIRA, T. B.; KILDEGAARD, K. R. Molecular Basis for Mycophenolic Acid Biosynthesis in *Penicillium brevicompactum*. **Applied Environmental Microbiology**, 77(9), 3035–3043, 2011.

HE, Q.; PENG, H.; SHENG, M.; HU, S.; QIU, J.; GU, J. Humidity Control Strategies for Solid-State Fermentation: Capillary Water Supply by Water-Retention Materials and Negative-Pressure Auto-controlled Irrigation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 7, 263, 2019.

HOWARD R. L.; ABOTSI, E.; JANSEN VAN RENSBURG, E. L.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, 2 (3), pp. 158-174, 2003.

IRFAN, M.; MEHMOOD, S.; IRSHAD, M.; ANWAR, Z. Optimized production, purification and molecular characterization of fungal laccase through *Alternaria alternata*. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 43, n. 6, 613-622, 2018.

JONSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 16, 2013.

KOROLEVA, O. V.; ANATOLY, V. Z.; KULIKOVA, N. A. The Role of White-rot Fungi in Herbicide Transformation, Herbicides, Physiology of Action, and Safety. **IntechOpen**, 2015.

KUAN, I. C; TIEN, M. Stimulation of Mn peroxidase activity: a possible role for oxalate in lignin biodegradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 1242-1246, 1993.

- KUMAR, A.; CHANDRA, R. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. **Heliyon**, 6(2), e. 03170, 2020.
- LOPEZ-PEREZ, M.; RODRIGUEZ-GOMEZ, D.; LOERA, O. Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid-state culture: current status and future perspectives. **Critical Reviews in Biotechnology**, 1–8, 2014.
- MADHAVI, V., & LELE, S. Laccase: properties and applications. **Bioresources**, 4, 1694-1717, 2009.
- MANAN, M. A.; WEBB, C. Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. **Journal of Applied Biotechnology Bioengineering**, 4(1):511-532, 2017.
- MARINHO, G.; BARBOSA, B.C.A.; RODRIGUES, K.; AQUINO, M.; PEREIRA, L. Potential of the filamentous fungus *Aspergillus niger* AN 400 to degrade Atrazine in wastewaters. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 9, 162–167, 2017.
- MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology**, 29, 365-373, 2011.
- MÉRILLON, J. M.; RAMAWAT, K. G. Solid-State Fermentation: Special Physiology of Fungi in **Fungal Metabolites**, v. 6, 319–347, 2017.
- MIRANDA R. U.; GÓMEZ-QUIROZ, L.E.; MENDOZA, M.; PÉREZ-SÁNCHEZ, A.; FIERRO, F.; BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Reactive oxygen species regulate lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus* during submerged and solid-state fermentation. **Fungal Biol**, 118, 879–989, 2014.
- MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, M D.; PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation: II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, 35(10), 1211–1225, 2000.
- MOROZOVA, O. V.; SHUMAKOVICH, G. P.; SHLIEV, S. V.; YAROLOV, Y. I. Laccase-mediator systems and their applications: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 43(5), 523–535, 2007.
- MOURA, L.; LANDAU, E. C. Evolução da Produção de Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp., Poaceae) Dinâmica, cap. 19. In: **Produção Agropecuária e da Paisagem Natural no Brasil nas Últimas Décadas**, Embrapa, 625-650, 2020.
- MUSTAFA, G.; ARSHAD, M.; BANO, I. et al. Biotechnological applications of sugarcane bagasse and sugar beet molasses. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2020.
- NARAIAN, R.; GAUTAM, R. Penicillium Enzymes for the saccharification of lignocellulosic feedstocks. In: Vijai Gupta, S.R.-C. (Ed.), **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, First ed. Elsevier, pp. 474, 2018.

NAYANASHREE, G.; THIPPESWAMY, B. Natural rubber degradation by laccase and manganese peroxidase enzymes of *Penicillium chrysogenum*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, 12 (8), 2665–2672, 2015.

NETO, L. BERTONHA, L. C.; MORIYAMA, C. T.; BUZZO, A. J. R.; CASTOLDI, R.; PERALTA, R. M. Bioprospecção de extratos ligninolíticos úteis para o pré tratamento biológico de bagaço de cana de açúcar: Contribuições para a Obtenção De Etanol Celulósico. **Universidade Estadual de Maringá. 26º encontro anual de iniciação científica e 6º encontro anual de iniciação científica Jr**, 2017.

NIGAM, D.; ASTHANA, M.; KUMAR, A. *Penicillium*: A Fungus in the Wine and Beer Industries. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, 2018.

NILADEVI, K. N.; SUKUMARAN, R. K.; JACOB, N.; ANISHA, G. S.; PREMA, P. Optimization of laccase production from a novel strain-*Streptomyces psammoticus* using response surface methodology. **Microbiological Research**, v. 164, n. 1, p. 105–113, 2009.

OLIVEIRA, M. H. R.; SOUSA, A. E. C.; OLIVEIRA, R. S.; AGUAS, M. A.; ÁVILA, E. A. S.; SILVA, W. R.; PEREIRA, D. R. M.; COUTO, C. A. Gestão dos resíduos pós colheita da cana-de-açúcar no cerrado: uso da palhada versus contribuição econômica. **Brazilian Journal of Development**, 6(1): 3406-3421, 2020.

PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, 27(2), 109–117, 1992.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; RODRIGUEZ-LEON, J.A.; NIGAM, P. Solid state fermentation in biotechnology. Nova Deli: **Asiatech**, 2001. 221p.

PANDEY, R. K.; TEWARI, S.; TEWARI, L. Lignolytic mushroom *Lenzites elegans* WDP2: Laccase production, characterization, and bioremediation of synthetic dyes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 158, 50–58, 2018.

PATEL, G.; PATIL, M. D.; SONI, S.; KHOBRAGADE, T. P.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production of mycophenolic acid by *Penicillium brevicompactum*—A comparison of two methods of optimization. **Biotechnology Reports**, 11, 77–85, 2016.

PATEL, H.; CHAPLA, D.; SHAH, A. Bioconversion of pretreated sugarcane bagasse using enzymatic and acid followed by enzymatic hydrolysis approaches for bioethanol production. **Renewable Energy**, 109, 323–331, 2017.

PÉREZ, T.; MEJÍA, A.; BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Amplification of *laeA* gene in *Aspergillus terreus*: a strategy to generate lovastatin-overproducing strains for solid-state fermentation. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**, 4, 537–555, 2015.

- PIROTA, R. D.; DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S. Simplification of the biomass to ethanol conversion process by using the whole medium of filamentous fungi cultivated under solid-state fermentation. **BioEnergy Research**, 7, 744–752, 2014.
- PITT J. I. *Penicillium and related genera*, in Food Spoilage Microorganisms, Blackburn C. de W. **Woodhead Publishing**, Cambridge, 437-50, 2006.
- POINTING, S. B.; JONES, E. B. G.; VRIJMOED, L. L. P. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. **Mycologia**, 92, 139-144, 2000.
- PRINZ, A.; HÖNIG, J.; SCHÜTTMANN, I.; ZORN, H.; ZEINER, T. Separation and purification of laccases from two different fungi using aqueous two-phase extraction. **Process Biochemistry**, 49(2), 335–346, 2014.
- QADIR, A.; HAMEED, M. A.; ZAFAR, M. S. B.; FAROOQI, Z. U. R.; FAZILAYOUNAS, M. M. H.; MOHY-UD-DIN, W. Phytoremediation of inorganic pollutants: An eco-friendly approach, its types and mechanisms. **Plant and Environment**, v. 01(02), 2021
- RAI, R.; BIBRA, M.; CHADHA, B. S.; SANI, R. K. Enhanced hydrolysis of lignocellulosic biomass with doping of a highly thermostable recombinant laccase. **International Journal of Biological Macromolecules**, 137, 232–237, 2019.
- RAN, H., ZHANG, J., GAO, Q., LIN, Z., & BAO, J. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 51, 2014.
- RANJBAR, S.; HEJAZI, P. Modeling and validating *Pseudomonas aeruginosa* kinetic parameters based on simultaneous effect of bed temperature and moisture content using lignocellulosic substrate in packed-bed bioreactor. **Food and Bioproducts Processing**, 2019.
- RICARDINO, I. E. F.; SOUZA, M. N. C.; DA SILVA NETO, I. F. Vantagens e Possibilidades do reaproveitamento de resíduos agroindustriais. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v.1, n.8, p.55-79, 2020.
- RODRÍGUEZ-COUTO, S. Production of laccase and decolouration of the textile dye Remazol Brilliant Blue R in temporary immersion bioreactors. **Journal of Hazardous Materials**, 194, 297–302, 2011.
- SAHA, B. C.; YOSHIDA, T.; COTTA, M. A.; SONOMOTO, K. Hydrothermal pretreatment and enzymatic saccharification of corn stover for efficient ethanol production. **Industrial Crops and Products**, 44, 367–372, 2013.
- SANTOS, J. A.; VIANNA, M. V.; VIEIRA, J. M. F.; MALLAGUTTI, V. H.; INFORSATO, F. J.; WENTZEL, L. C. P. LARIO, L. D.; RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; PESSOA JUNIOR, A.; DURÃES SETTE, L. Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. **Critical Reviews in Biotechnology**, 1–20, 2017.
- SAROJ, S.; KUMAR, K.; PAREEK, N.; PRASAD, R.; SINGH, R. P. Biodegradation of azo dyes Acid Red 183, Direct Blue 15 and Direct Red 75 by the isolate *Penicillium oxalicum* SAR-3. **Chemosphere**, 107, 240–248, 2014.

- SENE, L.; CONVERTI, A.; SECCHI, G. A. R.; SIMÃO, R. C. G. New aspects on atrazine biodegradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 53 (2), 487–496, 2010.
- SILVA, M. F.; FREIRE, D. M. G.; DE CASTRO, A. M. *et al.* Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. **Bioprocess Biosystem Engineering**, 34, 145–152, 2011.
- SINDHU, R. Solid-state Fermentation for the Production of Poly(hydroxyalkanoates). **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, 29(2), 173–181, 2015.
- SINGH, G.; BATISH, M.; SHARMA, P.; CAPALASH, N. Xenobiotics enhance laccase activity in alkali-tolerant  $\gamma$ -proteobacterium JB. **Brazilian Journal of Microbiology**, 40(1), 26–30, 2009.
- SINGH, M. K.; SINGH, J.; KUMAR, M.; THAKUR, I. S. Novel lipase from basidiomycetes *Schizophyllum commune* ISTL04, produced by solid state fermentation of *Leucaena leucocephala* seeds. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 110, 92–99, 2014.
- SINGH, P.; SULAIMAN, O.; HASHIM, R.; PENG, L.C.; SINGH, R.P. Evaluating biopulping as an alternative application on oil palm trunk using the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **International Biodeterioration and Biodegradation** 82, 96–103, 2013.
- SOUZA FILHO, A. D. Direito à informação: agrotóxicos, legislação e saúde. 18f. **Unicesumar - Universidade Cesumar: Maringá**, 2020.
- SRIVASTAV, A. L. Chemical fertilizers and pesticides: role in groundwater contamination. **Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation**, 143–159, 2020.
- SU, J.; NORO, J.; FU, J.; WANG, Q.; SILVA, C.; CAVACO-PAULO, A. Exploring PEGylated and immobilized laccases for catechol polymerization. **AMB Express**, 8(1), 134, 2018.
- SUN, S.Y., XU, Y. Solid-state fermentation for whole-cell synthetic lipase production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. **Process Biochemistry**. 43, 219-224, 2008.
- TADESSE, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GALLI, C.; GENTILI, P.; SERGI, F. An assessment of the relative contributions of redox and steric issues to laccase specificity towards putative substrates, **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, 868-878, 2008.
- TERÁN HILARES, R.; DE SOUZA, R. A.; MARCELINO, P. F.; DA SILVA, S. S.; DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; SANTOS, J. C. Sugarcane bagasse hydrolysate as a potential feedstock for red pigment production by *Monascus ruber*. **Food Chemistry**, 245, 786–791, 2018.
- VALLE-PÉREZ, A.U.; FLORES-COSÍO, G.; AMAYA-DELGADO, L. Bioconversion of Agave Bagasse to Produce Cellulases and Xylanases by *Penicillium citrinum* and *Aspergillus fumigatus* in Solid-State Fermentation. **Waste Biomass Valor**, 2021.



VERARDI, A. et al. Improving the enzymatic hydrolysis of *Saccharum officinarum* L. bagasse by optimizing mixing in a stirred tank reactor: Quantitative analysis of biomass conversion. **Fuel Processing Technology**, v. 149, p. 15–22, 2016.

WAGHMARE, V., KHANDAGLE, A., MOREY, R. Antifungal Potential of *Parthenium hysterophorus*, *Achyranthes aspera* and *Catharanthus roseus* against *Aspergillus* sp., *Candida* sp. and *Penicillium* sp. of Aquarium Fish. Egyptian Academic **Journal of Biological Sciences, B. Zoology**, 12(1), 1-8, 2020.

WANG, F.; HU, J.; GUO, C.; LIU, C. Enhanced laccase production by *Trametes versicolor* using corn steep liquor as both nitrogen source and inducer. **Bioresource Technology**, 166, 602-605, 2014.

X. GE, J.; VASCO-CORREA, Y. LI. Solid-state fermentation bioreactors and fundamentals, in: C. Larroche, M.A. Sanroma'n, D. Guocheng, A. Pandey (Eds.), **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Bioprocesses, Bioreactors and Control**, Elsevier, Amsterdam, 381-402, 2017.

ZENG S, QUIN X, XIA L. Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator system. **Biochemical Engineering Journal**, 119:92–100, 2017.

ZHANG, S.; XIAO, J.; WANG, G.; CHEN, G. Enzymatic hydrolysis of lignin by ligninolytic enzymes and analysis of the hydrolyzed lignin products. **Bioresource Technology**, 122975, 2020.