



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS**

**EDUARDO DA SILVA FRANÇA**

**APROVEITAMENTO DA BORRA DE CAFÉ PARA  
PRODUÇÃO DE LIPASES POR FUNGOS  
FILAMENTOSOS ISOLADOS DO RIO IGARASSU,  
PE, BRASIL**

**Recife, 18 de junho de 2021**

**EDUARDO DA SILVA FRANÇA**

**APROVEITAMENTO DA BORRA DE CAFÉ PARA  
PRODUÇÃO DE LIPASES POR FUNGOS  
FILAMENTOSOS ISOLADOS DO RIO IGARASSU,  
PE, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

**Área de Concentração:** Desenvolvimento em Processos Ambientais.

**Linha de Pesquisa:** Biotecnologia e Meio Ambiente

**Orientador:** Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima

**Co-orientador:** Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva

**Recife, 18 de junho de 2021**

### **Ficha Catalográfica.**

F814a          França, Eduardo da Silva  
Aproveitamento da borra de café para produção de lipases  
por fungos filamentosos isolados do Rio Igarassu, PE, Brasil /  
Eduardo da Silva França, 2021  
56 f.: il.

Orientador: Marcos Antônio Barbosa de Lima  
Coorientador: Carlos Alberto Alves da Silva  
Mestrado (Dissertação) - Universidade Católica de  
Pernambuco. Programa de Pós-graduação em  
desenvolvimento de Processos Ambientais. Mestrado  
em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2021.

1. Biotecnologia. 2. Fungos filamentosos. 3. Enzimas.  
4. Resíduos agroindustriais. I. Título.

CDU 574.6

A ficha catalográfica elaborada por Luciana Vidal CRB-4/1338

# APROVEITAMENTO DA BORRA DE CAFÉ PARA PRODUÇÃO DE LIPASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO RIO IGARASSU, PE, BRASIL

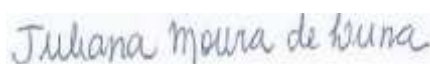
**EDUARDO DA SILVA FRANÇA**

**Examinadores:**



---

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima (Orientador)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE



---

Profa. Dra. Juliana Moura de Luna (membro interno)  
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP



---

Prof. Dr. Éder Galinari Ferreira (membro externo)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Defendida em: 18/06/2021.

Coordenador (a): Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

Dedico esta dissertação ao que tenho de  
mais valioso nesta Terra:  
Minha Família.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Oxum, pela saúde, sabedoria e discernimento concedido.

Ao orientador do trabalho, Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima, que dedicou o seu precioso tempo e com satisfação me indicou os passos e caminhos a ser percorrido para execução desse trabalho, contribuindo para minha formação acadêmica, abrindo horizontes aos meus conhecimentos em prol dos meus ideais profissionais e humanos.

Ao coorientador do trabalho Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva pela ajuda imprescindível para a construção deste trabalho de forma profissional.

A minha mãe, Veronice da Silva que se tornou instrumento de Deus para me conceder a vida e por me ajudar direta e indiretamente em todos os momentos da minha vida.

Ao meu companheiro Wilton Ferreira da Silva Júnior ao qual me apoiou e me entendeu quando muitas vezes tive que optar pelos estudos ao invés de um lazer ou atenção especial a ele.

Aos meus irmãos, Elaine da Silva França, Emanuel Henrique da Silva França, José Marlom da Silva Galvão Maia por todo apoio que recebi deles. E aos meus familiares em geral que torceram por mim.

Aos colegas do Curso de Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais (Unicap) em especial, Jaqueline dos Santos Marinho, Uiara Maria de Barros Lira Lins) pelo companheirismo, apoio e auxílio indispensável, além de contribuírem com palavras e conforto durante o curso.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais – Mestrado (Unicap): Prof<sup>ª</sup>. Dra. Clarissa Daisy da Costa Albuquerque, Prof. Dr. Valdemir Alexandre dos Santos, Prof. Dr. Sérgio Mendonça de Almeida, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Rosileide Fontenele da Silva Andrade, Prof<sup>ª</sup>. Dra Juliana Moura de Luna aos quais são para mim motivo de orgulho e referência. E a Prof<sup>ª</sup>. Dra. Kaoru Okada que me acompanhou em todos os momentos mesmo estando distante.

A Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) na pessoa do reitor. Pe Pedro Rubens Ferreira Oliveira e ao Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) na pessoa da coordenadora Prof<sup>ª</sup> Dra. Galba Maria de Campos Takaki por possibilitar a execução das pesquisas para realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de fomento à pesquisa para realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	<b>xi</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiii</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>14</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>17</b>
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1 Enzimas</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1.1 Lipases</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1.2 Fungos filamentosos produtores de lipases</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2 Fermentação em estado sólido (FES)</b> .....	<b>22</b>
<b>3.3 Resíduos agroindustriais</b> .....	<b>23</b>
<b>3.4 Resíduos do Café</b> .....	<b>25</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>38</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>40</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>40</b>
<b>2. Material e Métodos</b> .....	<b>41</b>
<b>2.1 Coleta de água, isolamento e identificação dos fungos filamentosos</b> .....	<b>41</b>
<b>2.1.1 Coleta das amostras de água</b> .....	<b>41</b>
<b>2.1.2 Isolamento dos fungos filamentosos</b> .....	<b>41</b>
<b>2.1.3 Identificação morfológica dos fungos filamentosos isolados</b> .....	<b>41</b>
<b>2.2 Obtenção e preparo do substrato</b> .....	<b>42</b>
<b>2.3 Caracterização da borra de café</b> .....	<b>42</b>
<b>2.4 Produção de lipase</b> .....	<b>42</b>
<b>2.4.1 Preparação do inóculo</b> .....	<b>42</b>
<b>2.4.2 Ensaio de seleção para produção de lipase</b> .....	<b>42</b>
<b>2.4.3 Determinação da atividade lipolítica</b> .....	<b>42</b>
<b>2.4.4 Planejamento fatorial</b> .....	<b>42</b>
<b>3. Resultados e discussão</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1 Isolamento dos fungos filamentosos</b> .....	<b>43</b>

<b>3.2 Identificação morfológica dos fungos filamentosos .....</b>	<b>43</b>
<b>3.2.1 <i>Aspergillus flavus</i> .....</b>	<b>44</b>
<b>3.2.2 <i>Aspergillus fumigatus</i> .....</b>	<b>44</b>
<b>3.2.3 <i>Aspergillus foetidus</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>3.2.4 <i>Paecilomyces variotii</i>.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2.5 <i>Mucor hiemalis</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>3.3 Ensaios preliminares em fermentação em estado sólido .....</b>	<b>48</b>
<b>3.4 Planejamento fatorial.....</b>	<b>48</b>
<b>3.5 Caracterização da borra de café .....</b>	<b>49</b>
<b>4. Conclusão .....</b>	<b>50</b>
<b>Agradecimento.....</b>	<b>50</b>
<b>Referências .....</b>	<b>50</b>
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>55</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>56</b>



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1 – Reação de hidrólise catalisada pela lipase .....	19
Figura 2 – Imagem do cafeeiro ( <i>Coffea arabica</i> ) .....	25
Figura 3 – Borra de café ( <i>Coffea</i> sp.) .....	26

### CAPÍTULO II

Figura 1 - Características macroscópicas e microscópicas do isolado <i>Aspergillus flavus</i> UCP 0316.....	44
Figura 2 - Características macroscópicas e microscópicas do isolado <i>Aspergillus fumigatus</i> UCP 0327 .....	45
Figura 3 - Características macroscópicas e microscópicas do isolado <i>Aspergillus foetidus</i> UCP 0360 .....	46
Figura 4 - Características macroscópicas e microscópicas do isolado <i>Paecilomyces variotii</i> UCP 0334.....	47
Figura 5 - Características macroscópicas e microscópicas do isolado <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>luteus</i> UCP 0343 .....	47
Figura 6 - Pareto referente à produção de lipases por <i>Aspergillus foetidus</i> UCP 0360 em relação à umidade (%), temperatura (°C) e concentração do resíduo (g) durante 144 horas .....	49
Figura 7 – Caracterização da borra de café .....	50

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1 – Classificação das enzimas .....	18
Tabela 2 – Espécies microbianas produtoras de lipases em diferentes resíduos agroindustriais .....	21
Tabela 3 – Fungos filamentosos produtores de lipases .....	22
Tabela 4 – Aplicações da borra de café .....	27

### CAPÍTULO II

Tabela 1 – Níveis das variáveis do planejamento fatorial $2^3$ para produção de lipases em borra de café pelo fungo selecionado.....	43
Tabela 2 – Chave de identificação dos fungos filamentosos isolados.....	43
Tabela 3 – Atividade lipolítica dos isolados .....	48
Tabela 4 – Planejamento fatorial $2^3$ aplicado à produção de lipases .....	49

## **LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

ABNT - Associação brasileira de normas técnicas

DBO – Demanda bioquímica de oxigênio

DQO – Demanda química de oxigênio

EC – Comissão de enzimas da união internacional de bioquímica

EMBRAPA – Empresa brasileira de pesquisa agropecuária

FES – Fermentação em estado sólido

F<sub>Sm</sub> – Fermentação submersa

MTE – Ministério do trabalho e emprego

NBR – Normas brasileiras

PIB – Produto interno bruto

## RESUMO

A produção de enzimas microbianas tem aumentado nas últimas décadas, devido a sua enorme versatilidade em diversos processos industriais. As lipases (EC 3.1.1.3) são hidrolases que catalisam a conversão de triacilgliceróis a ácidos graxos livres e glicerol. Estas enzimas são produzidas principalmente por diversos gêneros de fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Neste trabalho foi investigado a bioconversão da borra de café em lipases por fungos filamentosos isolados de água do Rio Igarassu, localizado na cidade de Igarassu no Estado de Pernambuco, Brasil. Para tanto, amostras de água foram coletadas e processadas para o isolamento de fungos filamentosos. Em seguida, os fungos filamentosos foram identificados morfológicamente e submetidos a um ensaio preliminar em fermentação em estado sólido, com 10 g da borra de café, 60% de umidade e temperatura de 28 °C por 144 h para selecionar o fungo com maior potencial de produção de lipases. Por meio de um planejamento fatorial  $2^3$ , os efeitos principais e as interações das variáveis umidade (%), temperatura (°C) e concentração da borra de café (g) foram avaliados na produção de lipase pelo fungo selecionado. Foram isolados e identificados 5 fungos filamentosos: *Aspergillus flavus* UCP 0316, *Aspergillus fumigatus* UCP 0327, *Paecilomyces variotii*, UCP 0334, *Mucor hiemalis* f. *luteus* UCP 0343 e *Aspergillus foetidus* UCP 0360. Todos os 5 fungos filamentosos foram capazes de crescer e produzir lipases em borra de café, todavia, foi observado uma maior produção nas espécies do gênero *Aspergillus* com destaque para *A. foetidus* UCP (0327) que exibiu uma atividade enzimática de 514,29 U/mL. A maior produção de lipase de 2941,87 U/ml foi obtida quando *A. foetidus* UCP 0360 foi cultivado em 25 g de borra de café, 37 °C e 50% de umidade por 144 h. Sendo assim, destacamos que a borra de café é um resíduo agroindustrial promissor para a produção de lipases, contribuindo na redução da poluição ambiental e gerando produtos de valor agregado à indústria.

**Palavras-chave:** Microrganismo, Enzimas, Resíduos agroindustriais, Fermentação em estado sólido.

## ABSTRACT

The production of microbial enzymes has increased in recent decades, due to its enormous versatility in several industrial processes. Lipases (EC 3.1.1.3) are hydrolases that catalyze the conversion of triacylglycerols to free fatty acids and glycerol. These enzymes are produced by several filamentous fungi, yeasts, and bacteria. In this work, the bioconversion of spent coffee grounds into lipases by filamentous fungi isolated from water of the Igarassu River, located in the city of Igarassu in the State of Pernambuco, Brazil, was investigated. Therefore, water samples were collected and processed for the isolation of filamentous fungi. Then, the filamentous fungi were morphologically identified and submitted to a preliminary test in solid state fermentation, with 10 g of spent coffee grounds, 60% moisture at a temperature of 28 °C for 144 h to select the fungus with the greatest potential for production of lipases. By using a 2<sup>3</sup> full factorial design, the main effects and interactions of the moisture (%), temperature (°C) and spent coffee grounds concentration (g) were evaluated in the production of lipase by the selected fungus. Five filamentous fungi were isolated and identified: *Aspergillus flavus* UCP 0316, *Aspergillus fumigatus* UCP 0327, *Paecilomyces variotii*, UCP 0334, *Mucor hiemalis* f. *luteus* UCP 0343 e *Aspergillus foetidus* UCP 0360. All 5 filamentous fungi were able to grow and produce lipases in spent coffee grounds, however, a higher production was observed in *Aspergillus* species, with emphasis on *A. foetidus* UCP (0327) which exhibited an enzymatic activity of 514.29 U/mL. The highest lipase production of 2941.87 U/ml was obtained when *A. foetidus* UCP 0360 was cultivated in 25 g of spent coffee grounds, 37 °C and 50% moisture for 144 h in solid state fermentation. Therefore, we emphasize that spent coffee grounds are a promising agro-industrial residue to produce lipases, contributing to the reduction of environmental pollution and generating value-added products for the industry.

**Keyword:** Microorganism, Enzymes, Agro-industrial waste, Solid state fermentation.

# CAPÍTULO I

## 1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia ambiental é uma área do conhecimento transdisciplinar que explora processos biológicos, principalmente microbianos, em aplicações ambientais, a saber, tratamento e monitoramento da poluição, biomonitoramento de resíduos (sólidos, líquido e gasosos) e biorremediação de ambientes poluídos (IVANOV; HUNG, 2010; FLORÊNCIO, *et al.*, 2019; ROSERO-DELGADO *et al.*, 2021).

A área de bioativos da biodiversidade é umas das áreas priorizadas da biotecnologia ambiental no Brasil, com isso, existe um aumento no desenvolvimento de pesquisas visando novos bioprodutos de alto valor agregado, produzidos por novos microrganismos que ainda não foram identificados, levando a um crescente interesse das indústrias por novos produtos, com maior qualidade, menor consumo energético e que causem menos impactos ambientais (MONTEIRO, 2017; SOARES *et al.*, 2018).

Enzimas são catalisadores biológicos produzidos por todos os organismos vivos que são indispensáveis a todas as reações do metabolismo celular e podem atuar como catalisadores em inúmeras reações bioquímicas. Além de serem catalisadores *in vivo*, as enzimas também podem ser catalisadoras *in vitro* para várias reações, incluindo diversos processos indústrias (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013; PALUDO *et al.*, 2018). O mercado global de enzimas é crescente, e estimativas indicam que ele deve atingir a cifra de US\$ 7,0 bilhões em 2023. Atualmente, os fabricantes de detergentes são os maiores consumidores desses insumos, que também são utilizados na produção de rações, alimentos e bebidas (BCC, 2017).

As lipases (EC 3.1.1.3) são hidrolases que catalisam a conversão de triacilgliceróis a ácidos graxos livres e glicerol. As lipases microbianas podem ser utilizadas como aditivos em alimentos para modificar e realçar as propriedades organolépticas, como também em detergentes para hidrolisar gorduras, no tratamento de efluentes oleosos, nas industriais farmacêuticas, de cosméticos, agroquímicas e oleoquímicas. Nos últimos anos, as lipases têm sido utilizadas em reações de transesterificação para converter óleos em biodiesel (MESSIAS, 2011; AHMAD *et al.*, 2019).

Os fungos produzem vários metabolitos secundários de interesse industrial como ácidos orgânicos (ácido cítrico), produção de fármacos (antibióticos), produção de pigmentos, produção de etanol e pela produção de enzimas de elevado valor econômico, destacando-se as xilanases (RAVINDRAN *et al.*, 2019), celulasas (JESUS; FERREIRA; DECHANDT, 2018; SILVA *et al.*, 2019), lacases (FABRINI *et al.*, 2016), lipases (JESUS *et al.*, 2016), tanases (SILVA, 2018), amilases (MURTHY *et al.*, 2009), protease (MURTHY *et al.*, 2010), frutofuranosidase (MUSSATTO *et al.*, 2013) e pectinases (MARCOLLA *et al.*, 2020).

As agroindústrias geram grandes quantidades de resíduos que podem ser multifásicos, apresentando múltiplos componentes. Os resíduos das indústrias de alimentos consistem em grandes quantidades de matérias orgânicas, ricas em nutrientes fontes de proteínas, carboidratos, vitaminas, fibras, minerais e compostos bioativos variando de acordo com a fonte. Portanto, o descarte destes resíduos representa uma perda de biomassa e nutrientes valiosos que podem ser reaproveitados pela indústria farmacêutica, alimentícia, química e na biotecnologia industrial para formulação de meios de cultura para produção microbiana de diversos bioprodutos de forma sustentável (SARAIVA *et al.*, 2018; SENTHILKUMAR *et al.*, 2019).

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo e que representa uma *commodity* essencial mundial (FAO, 2015; RUTA; FARCASANU, 2021). O Brasil é o país que mais produz e exporta café no mundo, seguido por Vietnã, Colômbia e Indonésia (ICO, 2020). Entre os anos 2018 e 2019, o consumo global de café foi de aproximadamente 165,18 milhões de toneladas, indicando que é grande a geração de borra (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION, 2019).

Na indústria do café solúvel, para cada tonelada de café verde processada, são gerados 650 kg de borra e para cada kg de café solúvel produzidos são gerados 2 kg de borra, com valores entre 60 e 70% de umidade. É importante salientar que os resíduos produzidos em escalas menores, em residências, bares, restaurantes e cafeterias, não têm sido contabilizado (MARQUET; NICHETE, 2020).

Resíduos de café contêm concentrações altas de tanino e cafeína que se descartados incorretamente podem acarretar problemas ambientais (GETACHEW; CHUN, 2017). No entanto, esses subprodutos podem ser utilizados como ração animal, extração de bioativos farmacêuticos e como substratos para produção fermentativa de várias biomoléculas (ARYA *et al.*, 2021).

A seleção de cepas selvagens é importante, principalmente em países como o Brasil com uma grande biodiversidade o que justifica a busca de novas cepas fúngicas para a produção de enzima. Portanto o presente trabalho teve o objetivo de investigar o potencial biotecnológico de fungos filamentosos, isolados do rio Igarassu/PE, na bioconversão de borra de café em lipases em fermentação em estado sólido.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do Rio Igarassu na bioconversão de borra de café (*Coffea* sp.) em lipases utilizando fermentação em estado sólido.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Isolar fungos filamentosos da água superficial do Rio Igarassu;
- Identificar morfologicamente os fungos filamentosos isolados do Rio Igarassu;
- Selecionar o fungo filamentoso com maior potencial de produção de lipases;
- Analisar a produção de lipase em borra de café pelo isolado selecionado;
- Analisar a influência da umidade, temperatura e concentração da borra do café na produção de lipases seguindo um planejamento fatorial de  $2^3$ ;
- Avaliar o potencial de uso da borra de café como um substrato alternativo em bioprocessos de produção de lipases.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Enzimas

Enzimas são proteínas produzidas por todos os organismos vivos com a finalidade de acelerar ou retardar reações químicas do metabolismo, sendo conhecidas como excelentes biocatalisadores de funções bastante específicas (Tabela 1), sendo assim podem ser encontrados diversos tipos de enzimas sintetizadas para catalisar diferentes tipos de reações bioquímicas (BELI; MAGESTE; TAKETANI, 2019).

**Tabela 1.** Classificações das enzimas

Número EC	Classe das enzimas	Tipo de reação catalisada	Enzimas
EC 1...	Óxido-redutases	Reações de oxidação-redução. Transferência de átomos de O e H ou elétrons de um substrato para o outro.	Hidrogenase; Oxidase; Peroxidase; Hidroxilases; Oxigenases.
EC 2...	Transferases	Reações de transferências de grupos específicos de um composto para o outro.	Aminotransferases; Acetiltransferase; Cinases; Fosforilases; Frutossiltransferase.
EC 3...	Hidrolases	Reações hidrolíticas	Lipases; Proteases; Amilases; Carboidrases; Pectinases.
EC 4...	Liasas	Reações reversíveis, não hidrolíticas de remoção de grupos da molécula de substrato.	Descarboxilases; Aldolases.
EC 5...	Isomerases	Reação de isomerização transformam isômeros entre si (cis e trans).	Glicose-isomerase.
EC 6...	Ligases	Reação de síntese de novos compostos, derivados da junção de duas moléculas.	Piruvato carboxilase

EC – Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica (IUB). **Fonte:** Esposito; Azevedo (2010)

As enzimas hidrolases constitui uma grande classe de enzimas responsáveis pela catálise de reações de hidrólise de diversos substratos tais como: proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídios e biomoléculas menores como aminoácidos, ésteres e fosfatos orgânicos, ou seja, catalisam a clivagem hidrolítica das ligações C-O, -C-N, -C-C além de outros tipos de ligações de anidrido fosfórico (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010; SILVA, *et al.*,

2018). As enzimas têm inúmeras aplicações em alimentos, ração animal, produção de biocombustíveis, couro, têxtil, detergente, diagnósticos e biocatalisadores (SAHOO, *et al.*, 2019). De acordo com o relatório dos mercados globais de enzimas industriais, publicado pela BCC Research Report Overview (2018), o mercado global de enzimas foi avaliado em 5,3 bilhões de dólares em 2017 e vai atingir 7,0 bilhões de dólares em 2023, tendo a demanda de produção de enzimas na Ásia-Pacífico, América do Norte, Europa devido à crescente necessidade de soluções sustentáveis e a ampla diversidade bioquímica de microrganismos combinada com a viabilidade de produção em larga escala, são os principais fatores que resultam em microrganismos como a fonte mais comum de enzimas industriais.

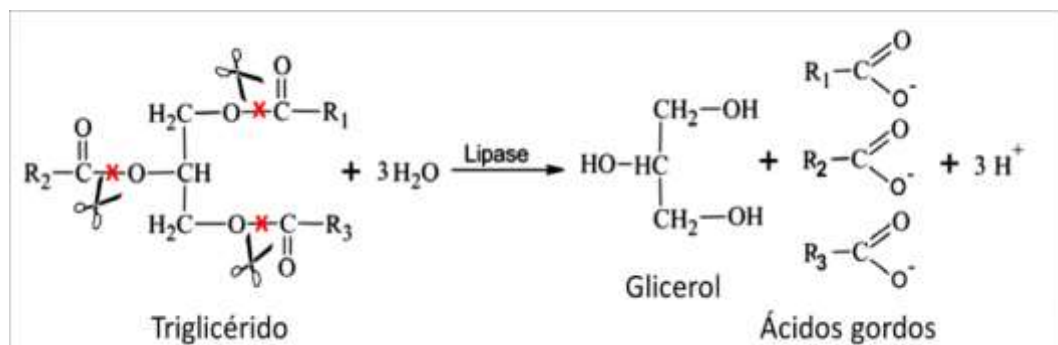
A maioria das enzimas atualmente disponível é fabricada a partir de microrganismos, sendo a de origem microbiana considerada de ampla aplicabilidade em diferentes setores industriais como na fabricação de produtos biotecnológicos, quando comparadas com as de origem animal e vegetal (RIGO, *et al.*, 2021).

Em virtude da facilidade de manuseio genético, especificidade, estabilidade e facilidade de produção em larga escala através do tratamento de resíduos, torna a produção de enzimas um dos setores primordiais da indústria biotecnológica e sua introdução em processos industriais torna-se um negócio lucrativo e atrativo do ponto de vista econômico (RÊGO, *et al.*, 2019).

### 3.1.1 Lipases

As lipases (EC 3.1.1.3) são hidrolases que atuam sobre os lipídeos, catalisando a conversão de triacilgliceróis a ácidos graxos livres e glicerol (Figura 1). São amplamente encontradas na natureza, sendo produzidas por uma variedade grande de organismos unicelulares e multicelulares, como bactérias, fungos, leveduras, plantas e animais (PALLAVI *et al.*, 2017).

**Figura 1.** Reação de hidrólise catalisada pela lipase



**Fonte:** <https://knoow.net/cienterravida/biologia/lipase/>

As lipases são enzimas industriais mais importantes devido a sua especificidade em hidrólise, interesterificação, esterificação e transesterificação (PATEL; SINGHANIA; PANDEY, 2017), alcoólise acidólise, aminólise (MESSIAS *et al.*, 2011; RIOS *et al.*, 2018; TRIYASWATI; IIMI, 2019). Essas enzimas são geralmente usadas em diferentes setores químicos, como detergente, alimento, bioenergia, aromas, produtos farmacêuticos e derivados de aminoácidos usados em produtos químicos finos e agroquímicos (KHAN *et al.*, 2017).

As lipases podem ser obtidas de diversas fontes em virtude de que todos os organismos são produtores de lipases. Porém as de origens microbianas são mais promissoras por possuírem muitas vantagens sobre as de origem animal e vegetal, como o menor custo de produção, a possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, requerimento nutrientes bastantes simples, amplo espectro de características físico-químicas, rendimento elevado e alta estabilidade fora da célula (ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010; JESUS, *et al.*, 2016).

As lipases microbianas são enzimas que possuem faixa ótima de pH muito ampla, dependendo do microrganismo produtor, que pode variar entre pH 4 e 9, assim como temperatura ótima de reação que pode variar entre 25 e 70 °C (SALIHU; ALAM; ABDULKARIM, 2012; ANGAJALA *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Podem ser amplamente aplicadas como aditivos em alimentos para modificar e realçar as propriedades organolépticas presentes, como também assumir a função de detergentes para hidrolisar gorduras no tratamento de efluentes oleosos, além da presença nas industriais farmacêuticas, de cosméticos, agroquímicas e oleoquímicas, na formulação de detergentes, na síntese de biossurfactantes, no tratamento de efluentes, na síntese de ésteres aromáticos (JAVED *et al.*, 2018; FRANÇA, *et al.*, 2020).

A produção das lipases microbianas está intensamente relacionada a diversos fatores, especialmente os fatores nutricionais como: tipos e concentrações de nutrientes, concentração, presença ou ausência de indutores, fatores físicos como: aeração do meio, agitação, temperatura e pH (COLLA *et al.*, 2016). O meio de cultura para o crescimento dos microrganismos é descrito na literatura como um dos empecilhos para a produção da enzima, pois é necessário o indutor e fontes nutricionais eficientes para sua produção. Vários resíduos agroindustriais (Tabela 2), têm sido avaliados quanto à produção de lipases por microrganismos (ALMEIDA *et al.*, 2016; OLIVEIRA, 2020).

**Tabela 2.** Espécies microbianas produtoras de lipases em diferentes resíduos agroindustriais

Microrganismos	Tipo de cultivo	Resíduos	Autores/Anos
<i>A. niger</i>	FES	Torta de dendê	Penha <i>et al.</i> , (2016)
<i>A. niger</i>	FES	Óleo de palma	Oliveira <i>et al.</i> , (2018)
<i>A. niger</i>	FES	Farelo de arroz*	Costa <i>et al.</i> , (2017)
<i>A. niger</i>	FES	Farelo de arroz*	Putri <i>et al.</i> , (2020)
<i>A. oryzae</i> e <i>japonicus</i>	FES	Torta de sementes de mamona	Jain e Naik (2018)
<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Corynebacterium aquaticum</i>	FSm	Pesca*	Aguiar <i>et al.</i> , (2018)
<i>Bacillus subtilis</i>	FSm	Óleo de cozinha residual*	Suci <i>et al.</i> , (2017)
<i>Candida rugosa</i> e <i>Geotrichum candidum</i>	FSm	Melaço de soja*	Júnior <i>et al.</i> , (2016)
<i>Cryptococcus</i> sp.	FES	Torta de sementes de algodão*	Thirunavukarasu <i>et al.</i> , (2016)
<i>G. candidum</i>	FSm	Óleo de semente de algodão*	Castro <i>et al.</i> , (2016)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	FES	Torta de canola	Rehman; Bhatti; Asgher (2019)
<i>Rhizomucor miehei</i>	FES	Torta de fibra de palma	Collaço <i>et al.</i> , (2021)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	FES	Farelo de trigo*	Dobrev <i>et al.</i> , (2018)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	FSm	Sementes e cascas de manga	Pereira <i>et al.</i> , (2019)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	FSm	Óleo de palma*	Fraga <i>et al.</i> , (2021)

FSm – Fermentação Submersa; FES – Fermentação em Estado Sólido; \*Resíduos suplementados no meio. **Fonte:** Autoria própria (2021)

### 3.1.2 Fungos filamentosos produtores de lipases

Entre os microrganismos, os fungos são reconhecidos como um dos melhores produtores de lipases (MEHTA; BODH; GUPTA, 2017). Os fungos filamentosos são conhecidos por serem potenciais produtores de lipases com notáveis propriedades catalíticas únicas, que são muito importantes para várias aplicações comerciais (RIGO *et al.*, 2021). Dentre os fungos filamentosos produtores de lipases comercial e industrialmente importantes, se destacam espécies dos gêneros: *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Mucor* e *Rhizomucor* (SCHNEIDER *et al.*, 2018). A produção de lipases por fungos filamentosos varia de acordo com a cepa e composição do meio de crescimento, como fontes de carbono e nitrogênio (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019).

Uma característica importante desses microrganismos que tem contribuído para o avanço de sua exploração como promissores agentes lipolíticos é sua incrível capacidade de crescer em substratos simples e de baixo custo. O isolamento de fungos filamentosos produtores de lipases pode ocorrer a partir de várias fontes, incluindo resíduos industriais e

domésticos oleosos ou gordurosos, solos contaminados com óleos, plantas, animais vivos ou mortos, sementes oleaginosas (RODRIGUES *et al.*, 2016; CORTEZ *et al.*, 2017).

Porém, para obter enzimas com maior poder catalítico e diminuir o custo da produção, há necessidade de pesquisas que utilizem microrganismos isolados de novos ambientes, bem como a utilização de resíduos agroindustriais para obter lipases com características adequadas para uma aplicação específica (SPENCER *et al.*, 2020). A obtenção de novas cepas de fungos filamentosos potencialmente produtoras de lipases é uma área crescente nas pesquisas científicas (CORTEZ, CASTRO, ANDRADE, 2017; OLIVEIRA, *et al.*, 2020). Diversos trabalhos apresentam a produção de lipases por fungos filamentosos, tipo de reação e aplicação, conforme a tabela 3.

**Tabela 3.** Fungos filamentosos produtores de lipases

Fungos	Tipo de cultivo	Meio de produção	Aplicação	Referências
<i>Aspergillus niger</i>	Estado sólido	Resíduos de dendê	---	Penha <i>et al.</i> (2016)
<i>Aspergillus ibericus</i>	Estado sólido	Tortas de óleo de subprodutos agroindustriais extraídas do óleo das sementes	Reações de hidrólise e esterificação	Oliveira <i>et al.</i> (2017)
<i>Aspergillus oryzae</i> e <i>A. japonicus</i>	Estado sólido	Torta de mamona	---	Jain; Naik (2018)
<i>Aspergillus niger</i>	Estado sólido	Bolo de semente de algodão, casca de grama vermelha, vagens de algaroba	Transesterificação	Mandari; Nema; Devarai (2020)
<i>Fusarium solani</i>	Submerso	Efluente de fábrica de óleo de palma	Esterificação e transesterificação	Geoffry; Achur (2018)
<i>Fusarium incarnatum</i>	Submerso	Farelo de trigo	Degradação de óleo residual de cozinha	Joshi; Sharmab; Kuila (2019)
<i>Penicillium</i>	Submerso	Óleo de oliva	Hidrólise	Marotti <i>et al.</i> (2017)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Estado sólido	Torta e fibra de palma	Esterificação e emulsificação	Collaço <i>et al.</i> (2021)

**Fonte:** Autoria própria (2021).

### 3.2 Fermentação em estado sólido (FES)

Fermentação em estado sólido (FES) é um método no qual os microrganismos crescem em um ambiente sem água livre, ou seja, com conteúdo muito baixo de água, em contrapartida a fermentação submersa (FSm), consiste em um processo no qual os microrganismos crescem em meio líquido, com alto teor de água livre (SOCCOL *et al.*, 2017). Embora a fermentação submersa (FSm), seja mais comum nos processos industriais, por ter vantagens em relação à instrumentação de controle do pH, oxigênio dissolvido, concentração de água e moléculas solúveis, separação de biomassa após a fermentação, mistura, aeração e expansão (FARIAS, 2015).

Porém a fermentação em estado sólido (FES) tem ganhado cada vez mais atenção devido as vantagens sobre a fermentação submersa (FSm) como: menores espaços requeridos, maior rendimento na produção, exploração de resíduos agroindústrias na produção de enzimas microbianas, ausência de formação de espuma, redução do risco de contaminação, além de simular as condições de crescimento natural, favorecendo tanto o metabolismo, quanto a capacidade produtiva (SANTOS *et al.*, 2018; ALVES *et al.*, 2020).

Outros aspectos citados como positivos da fermentação em estado sólido (FES) são: a maior quantidade e maior atividade dos substratos sem necessidade de solventes orgânicos (que geralmente conferem algum grau de toxicidade aos substratos) e custos de capital mais baixo (SINGHANIA, *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2011).

### 3.3 Resíduos agroindustriais

A agroindústria é conceituada como a indústria que processa ou beneficia matérias-primas oriunda da agricultura, pecuária, aquicultura e silvicultura e as vende como produto para consumo alimentar ou matéria-prima para outras industriais não destinadas à alimentação (ARAÚJO, 2005; ORMOND, 2006; BURANELLO, 2018). A economia brasileira é fortemente baseada no agronegócio que tem uma importante participação no Produto Interno Bruto (PIB) e a agroindústria apresenta um bom desempenho nesses resultados com a produção industrial de base agrícola o açúcar, bebida, biocombustíveis (etanol), conservas de frutas/legumes e outros vegetais, moagem e fabricação de produtos amiláceos, produtos de madeira, têxteis e vestuários (naturais), produção de celulose e papel, café, óleos vegetais e fumo entre outros produtos alimentares. E com a produção industrial da pecuária na atividade de carne, pescados e laticínios (SENAR, 2020).

A Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT, define resíduos sólidos por meio da Norma Brasileira NBR 10004:2004 como:

Resíduos nos estados sólido e semissólido, que resultam de atividades de origem industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços e de varrição. Ficam incluídos nesta definição os lodos provenientes de sistemas de tratamento de água, aqueles gerados em equipamentos e instalações de controle de poluição, bem como determinados líquidos cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou corpos de água, ou exijam para isso soluções técnica e economicamente inviáveis em face à melhor tecnologia disponível.

O Ministério do Trabalho e Emprego – MTE, define resíduos industriais por meio da Norma Regulamentadora n° 25 como:

Resíduos industriais são aqueles proveniente dos processos industriais na forma sólida, líquida ou gasosa ou combinação dessas, e que por suas características físicas, químicas ou microbiológicas não se assemelham aos resíduos domésticos, como cinzas, lodos, óleos, materiais alcalinos ou ácidos, escórias, poeiras, borras, substâncias lixiviadas e aqueles gerados em equipamentos e instalações de controle de poluição, bem como demais efluentes líquidos e emissões gasosas contaminantes atmosféricos.

De acordo com o Art. 13, item 1, subitem i, da Lei n° 12.305 de 2, agosto de 2010, define como resíduos sólidos agrossilvopastoris I (orgânicos), os resíduos gerados da agricultura, pecuária, silvicultura e agroindustriais e os resíduos sólidos agrossilvopastoris II (inorgânicos) os insumos utilizados nessas atividades (BRASIL, 2010),

Os resíduos resultantes das atividades agroindustriais são gerados em diversos processamentos de produção das indústrias coureira, madeireira, sucroalcooleira, alimentos etc., podendo ter sua produção sazonal condicionada pela maturidade da cultura ou oferta da matéria-prima (DENBINSKI, *et al.*, 2019; COUTO; FRANCO, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2020). A produção de água residuais oriundas de lavagens de produtos, escaldamentos, cozimentos, pasteurização, resfriamento e lavagem de equipamento de processamento e das instalações (OLIVEIRA, *et al.*, 2019). Aproximadamente 147,2 milhões de toneladas de resíduos agrícolas e agroindustriais são produzidas no mundo por ano e cerca de 89 milhões de toneladas de biomassa do estágio de produção agrícola, pós-colheita e processamento são desperdiçadas (CABALLERO; SOTO 2019).

As agroindústrias geram grandes quantidades de resíduos que podem ser multifásicos e podem consistir grupos de múltiplos componentes, mais especificamente os resíduos das indústrias de alimentos, que consistem grandes quantidades de matérias orgânicas, ricas em nutrientes fontes de proteínas, carboidratos, vitaminas, fibras, minerais e compostos bioativos variando de acordo com a fonte, apresentando altos valores de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), sólidos suspensos totais (SST) que se não forem tratados corretamente, podem causam sérios problemas ao meio ambiente. Além



de uma perda de biomassa e nutrientes valiosos que podem ser reaproveitados pela indústria farmacêutica, alimentícia, química e na biotecnologia industrial (SARAIVA *et al.*, 2018; SENTHILKUMAR *et al.*, 2019).

### 3.4 Resíduos do Café

O cafeeiro (Figura 2) é uma planta que tem sua origem nas regiões montanhosas da antiga Abissínia, que compreende hoje a região da Etiópia, o Sudeste do Sudão e o Norte do Quênia EMBRAPA (2016). Essa planta pertence ao Reino *Plantae*, Divisão: *Magnoliophyta*, Classe: *Manoliopsida*, Ordem: *Gentianales*, Família: *Rubiaceae* e Gênero: *Coffea*. A família *Rubiaceae* abrange mais de 10 mil espécies agrupados em 630 gêneros. Onde há mais de 100 espécie do gênero *Coffea*, das quais as de maior importância e interesse econômico são *Coffea arabica* (café arábica) e *Coffea canephora*, (café robusta ou conilon) (PERUZZOLO *et al.* 2019).

**Figura 2.** Cafeeiro (*Coffea arabica*)



**Fonte:** <https://maisro.com.br/wp-content/uploads/2015/12/cafeear.jpg>

Em nível mundial no período de 2018-2019 a produção de café foi de 167,47 milhões de sacas de 60 kg e um consumo de 165,18 milhões. Os sete países maiores produtores de café nesse período foram: Brasil com a produção estimada em 58,5 milhões de sacas, Vietnã 29,5 milhões de sacas, Colômbia com 14,2 milhões de sacas, Indonésia com 10,2 milhões de sacas, Etiópia com 7,5 milhões de sacas, Honduras com 7,45 milhões de sacas e a Índia com 5,2 milhões de sacas. A Organização mundial do Café (2021) estima que a produção mundial de café no ano cafeeiro 2020-2021 seja de 169,6 milhões de sacas.

A Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2020), estimou que no Brasil a safra de 2020 alcançou uma produção entre 57,2 – 62,02 milhões de sacas em uma área destinada a essa produção de 1.885,5 mil hectares apresentando um acréscimo de 4% e o

volume a ser produzido está entre 15,9% e 25,8% em relação a temporada passada. Tendo como principais estados produtores Minas Gerais (30,71 a 32,08 milhões de sacas), Espírito Santo (13,02 a 15,44 milhões de sacas), São Paulo (5,71 a 6,1 milhões de sacas), Bahia (3,6 a 4,1 milhões de sacas), Rondônia (2,34 a 2,39 milhões de sacas), Paraná (880 a 970 mil sacas), Rio de Janeiro (316 a 350 mil sacas), Goiás (265,2 a 276 mil sacas), Mato Grosso (159 a 168,8 mil sacas).

Com os dados apresentados da produção do café, obtêm-se um panorama da importância econômica da produção global do café, porém essa produção pode gerar impactos ambientais negativos, pois o cultivo do café gera resíduos desde a colheita até o seu consumo final. O processamento pós-colheita do café gera diferentes tipos de resíduos (casca, polpa, mucilagem, água de fermentação e lavagem e a borra). Cerca de 90% de todo o café consumido mundialmente, acaba sob forma de resíduo sólido, sendo que a borra é parte maior desse rejeito (MAGNAGO *et al.* 2019).

A borra do café (Figura 3) é um resíduo sólido gerado após a extração dos compostos solúveis presentes nos grãos de café torrado durante a preparação da bebida, seja para café expresso ou café passado ou popularmente conhecido como coado. Uma tonelada de café cru libera, em média cerca de 480 a 650 kg de borra, que são descartados e permanecem no meio ambiente após o consumo (DURÃN *et al.*, 2017; MAGNAGO *et al.*, 2019).

**Figura 3.** Borra de café (*Coffea* sp.)



**Fonte:** <https://www.cafeculturabrasil.com/uso-da-borra-de-cafe-voce-conhece/>

Este resíduo é usualmente descartado e encaminhado aos aterros sem nenhum tratamento prévio ou valorização e podem gerar efeitos negativos sobre o meio ambiente (RODRIGUES, 2017). A borra de café apresenta um potencial elevado de impacto ambiental, seja pela massa residual ou pela geração de líquidos a partir de sua decomposição (THODE FILHO *et al.*, 2020), promovendo alteração no comportamento da fauna do solo (THODE FILHO *et al.*, 2017).

Devido à grande quantidade de compostos insolúveis no café torrado, a borra do café apresenta em sua composição polissacarídeos (6-9% de celulose e 37-38% de hemicelulose), fibras dietéticas (30-47%) e lipídeos (24-30%) e minerais, o que desperta o interesse como potencial substrato na produção de bioprodutos (DURÁN *et al.*, 2017). A Tabela 4, apresenta algumas aplicações da borra do café.

**Tabela 4.** Aplicações da borra do café.

<b>Setor</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referências</b>
	Utilização da biomassa para geração de calor na produção de bioenergia	Soares <i>et al.</i> (2015); Balseca-Sampedro <i>et al.</i> (2018).
Produção de Energia	Utilização do óleo extraído da borra do café para produção de biodiesel	Blinová <i>et al.</i> (2017); Xavier <i>et al.</i> (2017)
	Utilização carvão ativado da borra de café no tratamento de rejeitos industriais têxtil	Xavier <i>et al.</i> (2017)
	Utilização da borra de café na produção de enzima microbiana (fosfatase alcalina)	Xavier <i>et al.</i> (2019)
Biotecnologia	Utilização da borra de café como biossorvente de corantes e metais pesados entre outros compostos químicos	Aranguri-Llerena; Reyes-Lázaro (2019); Boniolo <i>et al.</i> (2017); Castellar-Ortega <i>et al.</i> (2018)
Cosmética	Utilização do óleo extraído da borra de café como emoliente em formulações dermo-cosméticas	Hermann <i>et al.</i> (2019)

**Fonte:** Autoria própria (2020)

## REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 1004: Resíduos sólidos – Classificação**, p.1-7, Rio de Janeiro, 2004.

Disponível em: <https://analiticaqmcresiduos.paginas.ufsc.br/files/2014/07/Nbr-10004-2004-Classificacao-De-Residuos-Solidos.pdf>. Acesso em: 29.03.2020.

AGUIAR, G. P.; MARTINS, V. G.; MARTINS, P. C. C.; BOSCHERO, R. A.; PRENTICE-HERMÁNDEZ, C. Produção de lipase microbiana a partir de resíduos de Corvina. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v.10, n.1, p.118-129, 2018.

AHMAD, S.; RIAZ, A.; ABBASI, H.; ELJAZ, R.; SYED, M. N. Modification of process parameters for enhanced lipase induction from *Bacillus* SR1. **RADS Journal of Biological Research e Applied Sciences**, v.10, n.1, p.14-17, 2019.

ALVES, R. O.; OLIVEIRA, R. L.; SANTOS, A. F. M. S.; PORTO, T. S. Produção de celulases por *Aspergillus japonicus* URM5620 e *Aspergillus niger* URM5741 por diferentes processos fermentativos utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato. **Revista GEAMA, Scientific Journal of Environmental Sciences na Biotechnology**, v. 6, p.44-50, 2020.

ALMEIDA, A. F.; DIAS, K. B.; SILVA, A. C. C.; TERRASAN, R. F.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Agroindustrial wastes as alternative for lipase production by *Candida viswanathii* under solid-state cultivation: purification, biochemical properties, and its potential for fat hydrolysis. *Enzyme research*, v.2016, 2016.

ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Lipases: na overview of its current challenges and prospectives in revolution of biocatalysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.7, p.257-270, 2016.

ARANGURI-LLERENA, G.; REYES-LÁZARO, W. Adsorción del cianuro contenido en solución acuosa usando carbon active obtenido de residuo de café: eficiencia de absorción, modelado de equilibrio y cinética. **Scientia Agroecuaría**, v.10, n.3, p.315-325, 2019.

ARAÚJO, M. J. **Fundamentos de agronegócio**, 2º ed. Atlas, São Paulo, 2005. Disponível em: <http://catagronegocio.weebly.com/uploads/1/1/7/3/11739052/39500879-fundamentos-de-agronegocios.pdf>. Acesso em: 17.05.2020.

ARYA, S. S.; VENKATRAM, R.; MORE, P. R.; VIJAYAN, P. The wastes of coffee bean processing for utilization in food: a review. **Journal of Food Science and Technology**, p. 1-16, 2021.

BALSECA-SAMPEDRO, O. F.; LÓPEZ-ORTIZ, S. A.; VITERI-NÚÑEZ, E. F.; ANALUISA-LÓPEZ, D. S.; HERMÁNDEZ-GAVILANES, E. V. Elaboración, caracterización y posibles aplicaciones de briquetas de residuos de café (borra) como biocombustible sólido. **Polo del Conocimiento**, 21 ed., v. 3, n.7, p. 420-452, 2018.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: Na overview of screening production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.22, 2019.

BCC. Research Report Overview. **Global markets for enzymes in industrial applicatins**, 2018. Disponível em: <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications.html>. Acesso em: 05.06.2020.

França, E.S. Produção de lipases por fungos filamentosos a partir do ...

BELI, C. M.; MAGESTE, J. M.; TAKETANI, N. F. Bioprospecção de enzimas para cosmética: seu impacto na biotecnologia. **Revista Ensaios Pioneiros**, v.3, n.2, p.10-24, 2019.

BONIOLO, M. R.; YABUKI, L. N. M.; MORTARI, D. A.; MENEGÁRIO, A. A.; GARCIA, M. L. Biomassas Brasileiras aplicadas à remoção de urânio de drenagem ácida de minas por processos de biossorção. **Holos Environment**, v.17, n1, p.149-167, 2017.

BURANELLO, R. **Manual do direito do agronegócio**, 2º ed. Saraiva Educação, São Paulo, 2018. Disponível em: [https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=hdJiDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT5&dq=A+agroind%C3%BAstria+%C3%A9+conc+eituada+como+a+ind%C3%BAstria+que+processa+ou+beneficia+mat%C3%A9rias-primas+oriunda+da+agricultura,+pecu%C3%A1ria,+silvicultura+e+a+vende+como+produto+para+consumo+alimentar+ou+mat%C3%A9ria-primas+para+outras+industriais+n%C3%A3o+destinadas+%C3%A0+alimenta&ots=7iHsdjBqoq&sig=EQ-ejNzPqgfa\\_wKxVS13U8Yil8Q#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=hdJiDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT5&dq=A+agroind%C3%BAstria+%C3%A9+conc+eituada+como+a+ind%C3%BAstria+que+processa+ou+beneficia+mat%C3%A9rias-primas+oriunda+da+agricultura,+pecu%C3%A1ria,+silvicultura+e+a+vende+como+produto+para+consumo+alimentar+ou+mat%C3%A9ria-primas+para+outras+industriais+n%C3%A3o+destinadas+%C3%A0+alimenta&ots=7iHsdjBqoq&sig=EQ-ejNzPqgfa_wKxVS13U8Yil8Q#v=onepage&q&f=false). Acesso em: 18.05.2020.

BRASIL, Congresso. Lei nº 12.305, de 2 agosto de 2010. **Política Nacional de Resíduos Sólidos**. Brasília/DF, 2010. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm). Acesso em: 20.05.2020.

BLINOVÁ, L.; BARTOSOVÁ, A.; SIROTIK, M. Biodiesel production from spent coffee grounds. **Research papers**, v.25, n.40, p.113-121, 2017.

CABALLERO, E.; SOTO, C. Valorization of agro-industrial waste into bioactive compounds: Techno-economic considerations. Biorefinery. In: Bastidas-Oyanedel, J. R.; SCHMIDT, J. **Biorefinery**. Springer, Cham, p.235-252, 2019.

CASTELLAR-ORTEGA, G. C.; CELY-BAUTISTA, M. M.; CARDOZO-ARRIETA, B. M.; ÂNGULO-MERCADO, E. R.; PLAZA-VEJA, M. E. Adsorption del colorante azul directo 2 sobre borra de café em uma coluna de lecho fijo a escala de laboratório. **Revista U.D.C.A Act & Div. Cient.**, v. 21, n.2, p. 531-541.

CASTRO, P. F.; MOREIRA, N. C.; ESPERANÇA, M. N.; OLIVEIRA, L. M.; BADINO, A. C.; TAVANO, O. L.; MENDES, A. A.; BASSO, R. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. HIRATA, D. B. High lipase production from *Geotrichum candidum* in reduced time using cottonseed oil: optimization, easy purification, and specificity characterization. **Journal of Chemical Engineering Research Updates**, v.3, n.2, 2016.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; BENEDETTI, S.; LOSS, R. A.; LIMA, M.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47, n.2, 2016.

COLLAÇO, A. C. A.; AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI, E. D. C.; FREIRE, D. M. G. Development of an integrated process involving palm industry co-products for monoglyceride/diglyceride emulsifier synthesis: Use of palm cake and fiber for lipase production and palm fatty-acid distillate as raw material. **LWT - Food Science and Technology**, v. 135, 110039, 2021.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento nacional da safra brasileira do café**, v.6, n.1, p.1-62, Brasília/DF, 2020. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/cafes>. Acesso em: 24.03.2020.

França, E.S. Produção de lipases por fungos filamentosos a partir do ...

CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação, **Química Nova**, v.40, n.1, 2017.

COSTA, T. M. C.; HERMANN, K. L.; GARCIA-ROMAN, M.; VALLE, R. C. S. C.; TAVARES, L. B. B. Lipase production by *Aspergillus niger* grown in different agro-industrial wastes by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.34, n.2, 2017.

COUTO, M. M.; FRANCO, A. Gestão de resíduo madeira: estudo em empresa de estofados na Zona da Mata, Minas Gerais. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.3, p.12518-12536, 2020.

DENBINSKI, L. G.; OLIVEIRA, L. H.; AZZOLINI, J. C.; DEON, A. M. Tratamento do efluente da indústria de couro utilizando coluna de adsorção em leito fixo. **Brasilian Journal of Development**, v. 5, n.9, p. 14059-14073, 2019.

DOBREV, G.; STRINSKA, H.; HAMBARLIISKA, A.; ZHEKOVA, B.; DOBRAVA, V. Optimization of lipase production in soli-state fermentation by *Rhizopus Arrhizus* in nutrient medium containing agroindustrial wastes. *The Open Biotechnology Journal*, v. 12, n.1, p.189-203, 2018.

DURÁN, C. A. A. *et al.* Café: Aspectos gerais e seu aproveitamento para além da bebida. **Revista virtual de química**. v. 9, n.1, p.107-134, 2017.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Mudanças climáticas e a cafeicultura global**, v.5, n.9, 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/17793339/mudancas-climaticas-e-a-cafeicultura-global>>. Acesso em: 21.01.2020.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Revisada e ampliada. EDUCS. Caxias do Sul-RS, 2010.

FABRINI, F. F.; AVELINO, K. V.; MARIM, R. A.; CARDOSO, B. K.; COLAUTO, G. A. L.; COLAUDO, N. B.; VALLE, J. S. Produção de lacase de *Pycnoporus sanguineus* em meio de cultivo à base de melação soja. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia de UNIPAR*, v.19, n.3, p.159-164, 2016.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i4985e.pdf>. Acesso em: 23.05.2021.

FARIAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 52, p.179-188, 2015.

FRAGA, J. L.; SOUZA, C. P. L.; PEREIRA, A. S.; AGUIEIRAS, E. C. G.; SILVA, L. O.; TORRES, A. G.; FREIRE, D. G.; AMARAL, P. F. F. Palm oil wastes as feedstock for lipase production by *Yarrowia lipolytica* and biocatalyst application/reuse. **3 Biotech**, v.11, n.4, p.1-11:191, 2021.

FRANÇA, E. S.; MARINHO, J. S.; CÂNDIDO, T. R. S.; LINS, U. M. B.; ANDRADE, R. F. S.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; SILVA, C. A. A.; OKADA, K. Detecção de esterase e lipase produzidas por fungos filamentosos isolados de solos da Caatinga. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.11, p.91693-91709, 2020.

França, E.S. Produção de lipases por fungos filamentosos a partir do ...

FLORÊNCIO, M. N. S.; ABUD, A. K. S.; COSTA, B. M. G.; OLIVEIRA-JUNIOR, A. M. Um panorama da produção tecnológica sobre biotecnologia ambiental no Brasil, **ISTI/SIMTEC**, v.10, n.1, p.846-853, 2019.

FRIES, E. M. *Systema mycologicum: sistens fungorum ordines, genera et species, huc usque cognitae, quas ad normam methodi naturalis determinativ.* **Lundae: Ex Officina Berlingiana**, 1832.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Optimization of novel halophilic lipase production by *Fusarium solani* strain NFCCL 4084 using palm oil mill effluent. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, p. 327–334, 2018.

GETACHEW, A. T.; CHUN, B. S. Influence of pretreatment and modifiers on subcritical water liquefaction of spent coffee grounds: a green waste valorization approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 142, p. 3719-3727, 2017.

HALLER, A. V. *Historia Stirpium Indigenarum Helvetiae Inchoata.* **Bernae: Sumptibus Societatis Typographicae**, 1768.

HERMANN, K. A. C.; MAGNAGO, R. F.; BIACHET, R. T.; MOECKE, E. H. S.; CUBAS, A. L. V. Avaliação do uso da borra de café para utilização em produtos cosméticos. **Revista Virtual de Química**, v.11, n.6, 2019.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **IBGE prevê safra recorde de grãos em 2020**. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/26537-ibge-preve-safra-recorde-de-graos-em-2020>. Acesso em: 15.01.2020.

ICO, International coffee organization 2017. Coffee market report. Disponível em: <http://www.ico.org/documents/cy2016-17/cmr-0917-e.pdf>. Acesso em: 28.03.2021.

ICO. International Coffee Organization. **Coffee Market Report abril/2021**. Disponível em: [cmr-0421-e.pdf](http://www.ico.org/documents/cy2019-20/cmr-0421-e.pdf) (ico.org). Acesso em: 30.05.2021.

ICO. International Coffee Organization. **Coffee Market Report fevereiro/2020**. Disponível em: <http://www.ico.org/documents/cy2019-20/cmr-0220-p.pdf>. Acesso em: 29.03.2020.

IVANOV, V.; HUNG, Y-T. Applications of Environmental Biotechnology. In: WANG, L. K.; IVANOV, V.; TAY, J-H.; HUNG, T-T. **Environmental Biotechnology**, v.10, 1-17, 2010.

JAIN, R.; NAIK, S. N. Adding value to the oil cake as a waste from oil processing industry: Production of lipase in solid state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 181–184, 2018.

JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M.; AFZAL, M.; KOUSER, A.; NADEEM, H. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v.132, p.23-34, 2018.

JEGANNATHAN, K. R. NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production: a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228-240, 2013.

JESUS, L. F. M. C.; FERREIRA, L. A.; DECHANDT, C. R. P. Degradação lignocelulósica por hidrólise enzimática visando a produção de etanol. **Revista eletrônica técnico-científica do IFSC**, v.2, n.7, p.53-70, 2018.

França, E.S. Produção de lipases por fungos filamentosos a partir do ...

JESUS, M. V.; OLIVEIRA, T. S.; FERREIRA, R. D. M.; LIMA, A. M.; RODRIGUES, J. R. S.; SILVA, C. F.; SOUZA, R. R. Produção de lipase utilizando manipueira como fonte alternativa de carbono. **Scientia Plena**, v.12, n.5, p.1-7, 2016.

JOSHI, R.; SHARMAB, R.; KUILA, A. (2019). Lipase production from *Fusarium incarnatum* KU377454 and its immobilization using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs for application in waste cooking oil degradation. **Bioresource Technology Reports**, v.5, p.134–140, 2019.

JÚNIOR, W. G. M.; KAMIMURA, E. S.; RIBEIRO, E. J.; PESSELA, B. C.; CARDOSO, V. L.; RESENDE, M. M. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. **Protein Expression and Purification**, v.123, p.26-34, 2016.

KHAN, F. I.; LAN, D.; DURRANI, R.; HUAN, W.; ZHAO, Z.; WANG, Y. The lid domain in lipases: structural and functional determinant of enzymatic properties. **Frontiers Bioengineering and Biotechnology Microbiotechnology**, v.5, p. 1-10, 2017.

KLICH, M. A. **Identification of Common Aspergillus Species**. Editora: Centalalbureau voor Schimmelcultures, Spiralbound, 2002.

MAGNAGO, R. F.; GARCIA, G. D.; MARQUES, D. V.; PREDROSO, I. D.; HERMANN, K. A. C.; PEREIRA, N. R. L.; MAZON, S. P.; COSTA, S. C. Combustíveis sólidos a partir de biomassa residual de borra de café, casca de arroz e casca de batata. **Mix Sustentável, Florianópolis**, v.5, n.2, p.43-53, 2019.

MANDARI, V.; NEMA, A.; DEVARAI, S. K. Sequential optimization and large scale production of lipase using trisubstrate mixture from *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v.89, p.46-54, 2020.

MARCOLLA, A. C.; RASBOLD, L.; SILVA, G. C.; KADOWAKI, M. K.; SILVA, J. L. C.; SIMÃO, R. C. G.; MALLER, A. Screening of filamentous fungi from the Atlantic Forest biome producing enzymes of the pectinolytic complex. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.8, p.57580-57585, 2020.

MAROTTI, B. S.; CORTEZ, D. V.; GONÇALVES, D. B.; CASTRO, H. F. Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação em hidrólise de óleos vegetais. **Química Nova**, v.40, n.4, 2017.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v.29, n.3, p.365-373, 2011.

MEHTA, A.; BODH, U.; GUPTA, R. Fungal lipases: a review. **Journal of Biotech Research**, v.8, p.58-77, 2017.

MESSIAS, J. M. *et al.* Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas, **Semana: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MICHELI, P. A. *Nova Plantarum Genera*. Typis Bernardi Paperinii, Florença, 1729.

MONTEIRO, S. G. Aplicações biotecnológicas. **Revista de Investigação Biomédica**, v.9, n.1, 2017. Disponível em: <http://www.ceuma.br/portalderevistas/index.php/RIB/article/view/78/pdf>. Acesso em: 07.06.2020.



França, E.S. Produção de lipases por fungos filamentosos a partir do ...

MURTHY, P. S.; MADHAVA N.; SRINIVAS, P. Production of  $\alpha$ -amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 84, n. 8, p. 1246-1249, 2009.

MURTHY, P. S.; MADHAVA N. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. **World Applied Sciences Journal**, v. 8, n. 2, p. 199-205, 2010.

MUSSATTO, S. I.; BALLESTEROS, L. F.; MARTINS, S.; MALTOS, D. A. F.; AGUILA, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Maximization of fructooligosaccharides and  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* under solid-state fermentation conditions. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 8, p. 2128-2134, 2013.

MTE. Ministério do Trabalho e Emprego. **NR 25 – Resíduos industriais**, p.1-2, 2011. Disponível em: [https://enit.trabalho.gov.br/portal/images/Arquivos\\_SST/SST\\_NR/NR-25.pdf](https://enit.trabalho.gov.br/portal/images/Arquivos_SST/SST_NR/NR-25.pdf). Acesso em: 17.05.2020.

OLIVEIRA, F.; SOUZA, C. E.; PECLAT, V. R. O. L.; SALGADO, J. M.; RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z.; VENÂNCIO, A.; BELO, I. Optimization of lipase production by *Aspergillus ibericus* from oil cakes and its application in esterification reactions. **Food and Bioprocess Processing**, v.102, p.268-277, 2017.

OLIVEIRA, A. C.; AMORIM, G. M.; AZEVÊDO, J. A. G.; GODOY, M. G.; FREIRE, D. M. G. Solid-state of co-products from palm oil processing: production of lipase and xylanase and effects on chemical composition. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.36, n.5, 2018.

OLIVEIRA, J. F.; FIA, R.; FIA, F. R. L.; RODRIGUES, F. N. OLIVEIRA, L. F. C.; FILHO, L. C. A. L. Efeitos da água residual de laticínios na respiração basal do solo, produtividade e remoção de nutrientes por Tifton 85 (*Cynodon sp*). **Revista de Ciências Agrárias**. Vol.42, n.1, p. 155-165, 2019.

OLIVEIRA, M. H. R.; SOUSA, A. E. C.; OLIVEIRA, R. S.; ÁGUAS, 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**, v.6, n.1, p. 3406-3421, 2020.

OLIVEIRA, N. M. L.; VIEIRA-ALMEIDA, E. C.; SILVA, L. P.; PAULA, C. B. C.; BASTOS, L. T. A.; LIMA, A. C. M.; SANTOS, I. L.; PAULA-ELIAS, F. C.; ALMEIDA, A. F. Lipases microbianas: Bioprocessos e aplicações industriais, cap.5. In: **Processos químicos e biotecnológicos**, Ed. Poisson, v.5, ed.1, 2020.

ORMOND, J. G. P. **Glossário de termos usados em atividades agropecuárias, florestais e ciências ambientais**, 3º ed., p. 1-316, BNDS, Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <[https://www.mma.gov.br/estruturas/sqa\\_pnla/\\_arquivos/glossrio\\_bndes\\_textodoc\\_46.pdf](https://www.mma.gov.br/estruturas/sqa_pnla/_arquivos/glossrio_bndes_textodoc_46.pdf)>. Acesso em: 17.05.2020.

PALUDO, G. B.; ABREU-LIMA, T. L.; CARREIRO, S. C. Potencial enzimático de leveduras isoladas de folhas em decomposição. **Acta Tecnológica**, v.13, n.2, p.65-77, 2018

PALLAVI, P.; BHAVANI, P.; KOMALI, J; MANJUSHA, T. Molecular identification of lipase producing bacteria based on 16S rDNA sequencing. **Internacional Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.6, p.2067-2071, 2017.

França, E.S. Produção de lipases por fungos filamentosos a partir do ...

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Production, and application of microbial enzymes. **Biotechnology of Microbial Enzymes**, p.13-41, 2017.

PENHA, E. M.; VIANA, L. A. N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; TERZI, S. C.; SOUZA, E. F.; FREITAS, S. C.; SANTOS, J. O.; SALUM, T. F. Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipases *Aspergillus Niger*. **Ciência Rural**, v.46, n.4, 2016.

PEREIRA, A. S.; FONTES-SANT'ANA, G. C.; AMARAL, P. F. F. Mango agro-industrial wastes for lipase production from *Yarrowia lipolytica* and the potential of the fermented solid as a biocatalyst. **Food and Bioproducts Processing**, v.115, p.68-77, 2019.

PERUZZOLO, M. C.; CRUZ, B. C. F.; RONQUI, L. Polinização e produtividade do café no Brasil. **PUBVET**, v.13, n.4, a.317, p.1 – 6, 2019.

PUTRI, D. N.; KHOOTAMA, A.; PERDANI, M. S.; UTAMI, T. S.; HERMANSYAH, H. Optimization of *Aspergillus niger* lipase production by solid state fermentation of agro-industrial waste. **Energy Reports**, v.6, n.1, p.331-335, 2020.

RAVINDRAN, R.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. Spent coffee waste as a potential media component for xylanase production and potential application in juice enrichment. **Foods**, v. 8, n.11, p.585, 2019.

RÊGO, A. P. B.; CUNHA, J. R. B.; SANTOS, R. S.; ASSIS, F. G. V.; LEAL, P. L. Produção de enzimas CMCASE e pectinase por processo fermentativo utilizando casca de café suplementada com manipueira como substrato. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.8, n.1, p.104-121, 2019.

REHMAN, S. BHATTI, H. N.; ASGHER, M. Optimization of process variables for enhanced production of extracellular lipase by *Pleurotus ostreatus* IBL-02 in solid-state fermentation. **Pak J. Pharm Sci**, v.32, n.2, p.617-624, 2019.

RIGO, D.; GAYESKI, L.; TRES, G. A.; CAMERA, F. D.; ZENI, J.; VALDUGA, E.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T. Produção microbiológica de enzimas: uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.1, p.9232-9254, 2021.

RIOS, S. N.; PINHEIRO, B. B.; PINHEIRO, M. P.; BEZERRA, R. M.; SANTOS, J. C. S.; GONÇALVES, L. R. B. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. **Process Biochemistry**, v.75, p.99-120, 2018

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. **Enzyme Research**, v.2011, p.1-16, 2011.

RODRIGUES, C.; CASSINI, S. T. A.; PEREIRA, A. P. W.; PINOTTI, L. M.; KELLER, R. P.; GONÇALVES, R. F. Lipase-producing fungi for potential wastewater treatment and bioenergy production. **African Journal of Biotechnology**, v.15, n.18, 2016.

RODRIGUES, F.; NUNES, M. A. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Applications of recovered bioactive compounds in cosmetics and other products. **Handbook of Coffee Processing By-Products: Sustainable Applications**, p. 195-220, 2017.

ROSETO-DELGADO, E. A.; ZAMBRANO-ARCENTALES, M. A.; GÓMEZ-SALCEDO-SALCEDO, Y.; BAQUERIZO-CRESPO, R. J.; DUSTET-MENDONZA, J. C. Biotechnology Applied to Treatments of Agro-industrial Wastes. In: MADDELA, N. R.; GARCIA-CRUZATTY,

França, E.S. Produção de lipases por fungos filamentosos a partir do ...

L. C.; CHAKRABORTY, S. (eds) **Advances in the Domain of Environmental Biotechnology**. Environmental and Microbial Biotechnology. Springer, Singapore, 2021.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em influentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, p.126-131, 2010.

RUTA, L. L.; FARCASANU, I. C. Coffee and Yeasts: From Flavor to Biotechnology. **Fermentation**, v. 7, n. 1, p. 9, 2021.

SAHOO, K.; SAHOO, R. K.; GAUR, M.; SUBUDHI, E. Cellulolytic thermophilic microorganisms in white biotechnology: a review. **Folia Microbial**, v. 65, p. 25-43, 2019.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, I.; SALLEH, H. M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v.58, p.36-44, 2012.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. **Introduction to food-and airborne fungi**. Editora: Centalalbureau voor Schimmelcultures, 2004.

SANDH, P. K.; DUHAN, S.; DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresour. Bioprocess**, v.5, p.1-15, 2018.

SANTOS, A. F. A.; ANDRADE, V. D.; CARDOSO, B. A.; SILVA, O. S.; OLIVEIRA, R. L.; PORTO, A. L. F. Bioprospecção de enzimas produzidas por *Aspergillus tamaritii* URM 4634, isolado do solo da Caatinga, por fermentação em estado sólido. **Brazilian Journal of development**, v.6, n.5, p.25663-25676, 2020.

SANTOS, P. S.; SOLIDADE, L. S.; SOUZA, J. G. B.; LIMA, G. S.; BRAGA-JUNIOR, 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.2, 2018.

SARAIVA, B. R.; VITAL, A. C. P.; ANJO, F. A.; CESARO, E.; MATUMOTO-PINTRO, P. T. **Valorização de resíduos agroindústrias: fontes nutrientes e compostos biativos para a alimentação humana**. Disponível em: <https://pubsaude.com.br/wp-content/uploads/2018/11/007-Valoriza%C3%A7%C3%A3o-de-residuos.pdf>. Acesso em: 20.05.2020.

SCHNEIDER, W. D. H.; GONÇALVES, T. A.; UCHIMAB, C. A.; REIS, L.; FONTANA, R. C.; SQUINAC, F. M.; DILLONA, A. J. P.; CAMASSOLAA, M. Comparison of the production of enzymes to cell wall hydrolysis using different carbon sources by *Penicillium echinulatum* strains and its hydrolysis potential for lignocellulosic biomass. **Process Biochemistry**, v.66, p.162-170, 2017.

SENAR, Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. **PIB do agronegócio 2019**. Disponível em: <<http://senar-ma.org.br/pib-do-agronegocio-cresce-13-em-novembro-de-2019/>>. Acesso em: 18.05.2020.

SENTHILKUMAR, K.; NAVEEN, K. M.; CHITRA, D. V.; SARAVANAN, K. EASWARAMOORTHY, S. Agro-industrial waste valorization to energy and value-added products for environmental sustainability. **Biomass Valorization to Bioenergy**, p. 1-9, 2019.

França, E.S. Produção de lipases por fungos filamentosos a partir do ...

SILVA, G. A.; SANTOS, M. S. M.; SANTOS, E. G.; BATISTOTE, M.; LEITE, R. S. R. Fungo do cerrado com potencial para produção de enzimas celulase. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v.17, n.2, p.1-8, 2019.

SILVA, B. C. R.; GOIS, I. M.; BISPO, D. F.; MARQUES, J. J.; SILVA, C. F. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de enzimas de interesse comercial, **Scielo**, v.14, n.2, p.1-10, 2018.

SILVA, E. P.; FILHO, L. B. F.; LIMA, C. A. F.; ALBUQUERQUE, P. V.; PEREIRA, L. B. S. B.; ALCANTARA, S. F.; NETO, J. A. M.; NASCIMENTO, J. C. S.; AMORIM, M. J. A. A. L. Seleção de fungos do gênero *Aspergillus* produtores de tanase para inclusão em ração animal. **PUBVET**, v.12, n.2, p.1-7, 2018.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCOOL, C. R.; PANDEY, A. P. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, n.1, p.13-18, 2009.

SOARES, C. C.; DRUZIAN, J. I.; LOBATO, A. K. C. L. Estudo prospectivo de patentes relacionadas a utilização do *Bacillus subtilis* em bioprocessos. **Cadernos de prospecção**, v.11, p.2995-303, 2018.

SOARES, L. S. S.; MORIS, V. A. S.; YAMAJI, F. M.; PAIVA, J. M. F. Utilização de resíduos de borra de café e serragem na moldagem de briquetes e avaliação de propriedades. **Revista Matéria**, v.20, n.2, p.550-560, 2015.

SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology research e innovation**, v.1, p.52-71, 2017.

SPENCER, P. V. D.; COSTA, T. P.; SOUZA, M. J.; PINTO, N. A. V. D.; NELSON, D. L.; BENASSI, V. M. Analysis of the lipolytic potential of filamentous fungi isolated from some plants and soil samples in Minas Gerais, Brazil. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v.11, p.475-487, 2020.

SUCI, M.; ARBIANTI, R.; HERMANSYAH, H. Lipase production from *Bacillus subtilis* with submerged fermentation using waste cooking oil. **IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science**, v.105, 2017.

VADLAPUDI, V.; BORAH, N.; YELLUSANI, K. R.; GADE, S.; REDDY, P.; RAJAMANIKYAM, M.; VEMPATI, L. N. S.; GUBBALA, S. P.; CHOPRA, P.; UPADHYAYULA, S. M.; AANCHY, R. *Aspergillus* Secondary Metabolite Database, a resource to understand the Secondary metabolome of *Aspergillus* genus. **Scientific Reports**, 2017.

THIRUNAVUKARASU, K.; PURUSHOTHAMAN, S.; SRIDEVI, J.; AARTHY, M.; GOWTHAMAN, K.; NAKAJIMA-KAMBE, T.; KAMINI, N. R. Degradation of poly(butylene succinate) and poly(butylene succinate-co-butylene adipate) by a lipase from yeast *Cryptococcus* sp. Grown on agro-industrial residues. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.110, p.99-107, 2016.

THODE FILHO, S.; SOUZA, L. C.; JORGE, E. N. L. F.; SILVA, M. L. M.; GUEDES, A. S. O.; FRANCO, H. A. Assessment of associated impacts the inappropriate disposal of coffee waste on the behavior escape of the earthworms. **REGET/UFMS**, v.21, p.16-23, 2017.

THODE FILHO, S.; PAIXÃO, C. P. S.; MARANHÃO, F. S.; FRANCO, H. A. Avaliação do impacto do extrato solubilizado da borra de café sobre a germinação de semente de alface. **Journal of Social Technological and Environmental Science**, v.9, n.1, p.414-423, 2020.

França, E.S. Produção de lipases por fungos filamentosos a partir do ...

TRIYASWATI, D.; IIMI, M. Lipase-producing filamentous fungi from non-dairy creamer industrial waste. **Microbiol Biotechnol Lett**, v. 48, n.2, p.167-178, 2020.








XAVIER, K. A. S.; MARÃES, T. S.; FONSECA, J. S.; SERUDO, R. L. Design experimental utilizando borra de café e *Aspergillus* sp. para produção de fosfatase alcalina, **Scientia Amazonia**, v.8, n.2, p.10-18, 2019.

# **CAPÍTULO II**

**BIOCONVERSÃO DA BORRA DE CAFÉ A LIPASE  
POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO RIO  
IGARASSU NO ESTADO DE PERNAMBUCO**



## BIOCONVERSÃO DA BORRA DE CAFÉ A LIPASE POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO RIO IGARASSU NO ESTADO DE PERNAMBUCO

Eduardo da Silva França<sup>1</sup> , Adriana Ferreira de Souza<sup>2</sup> , Diego Guedes de Lima Lemos<sup>1</sup> ,  
Jaqueline dos Santos Marinho<sup>1</sup> , Carlos Alberto Alves da Silva<sup>2</sup> , Galba Maria de Campos  
Takaki<sup>4</sup> , Marcos Antônio Barbosa de Lima<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup>Doutorado em Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>3</sup>Doutorado em Biologia de Fungos, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>4</sup>Pós-doutorado em Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

### Corresponding author:

Eduardo da Silva França

Email: [eduardo.franca10@hotmail.com](mailto:eduardo.franca10@hotmail.com)

### Resumo

A maioria das lipases usadas para fins comerciais são isoladas de microrganismo devido a sua estabilidade e de fácil recuperação, novos resíduos têm sido estudados para obtenção de enzimas, a fim de redução dos custos de produção. Portanto, este trabalho investigou o potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do Rio Igarassu, na conversão da borra de café em lipase em fermentação em estado sólido. Os fungos foram isolados, identificados e submetidos a um ensaio preliminar com 10 g da borra de café, 60% de umidade em 28 °C por 144 h para selecionar o fungo filamentoso com maior potencial de produção de lipases. Um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> foi realizado para avaliar a influência das variáveis umidade, temperatura e concentração do resíduo na produção de lipases pela espécie selecionada. Foram isolados e identificados 5 fungos filamentosos: *A. flavus* UCP 0316, *A. fumigatus* UCP 0327, *P. variotii*, UCP 0334, *M. hiemalis f. luteis* UCP 0343 e *A. foetidus* UCP 0360. Todos os fungos filamentosos cultivados em borra de café foram capazes de crescer e produzir lipases, porém *A. foetidus* UCP 0327 exibiu maior atividade enzimática de 514,29 U/mL. Observamos que a produção de lipase foi mais alta (2941,87 U/mL) quando *A. foetidus* UCP 0360 foi cultivado em 25 g de borra de café, 37 °C e 50% de umidade. Sendo assim, destacamos que a borra de café é um resíduo agroindustrial promissor para a produção de lipases, contribuindo na redução da poluição ambiental e gerando produtos de valor agregado à indústria.

**Palavras-chave:** Microrganismo, Enzimas, Resíduos agroindustriais, Fermentação em estado sólido.

### 1. Introdução

A busca por novos microrganismos isolados e identificados de ambientes ainda pouco conhecidos para produção de bioativos, principalmente as enzimas microbianas, se faz necessário pois a indústria biotecnológica necessita de novos produtores microbianos com alta eficiência. Nesse contexto, existe um aumento mundial no consumo de enzimas industriais e os fungos filamentosos estão entre as principais fontes microbianas produtores destas enzimas (Coutinho, 2007; Monteiro; Silva, 2009; Alves, *et al.*, 2014; Silva, *et al.*, 2019; Barbosa, *et al.*, 2020; França, *et al.*, 2020).

As enzimas são catalizadores eficazes, não só aumentando a velocidade de conversão de substrato em produto, mas também reconhecendo uma estrutura química específica na presença de estruturas semelhantes, para produzir um produto específico (Devlin, 2011, Gorch-Lira, Gomes, Polizelli, 2020). Esses biocatalizadores podem ser produzidos por animais, plantas e microrganismos, sendo as de origem microbianas, preferíveis por apresentar uma série de vantagens como menor tempo de produção, alto rendimento, facilidade de manipulação e principalmente porque são consideradas mais ativas e estáveis que as de origem animal e vegetal (Nagarajan, 2012; Liu; Kokare, 2017; Ferraz, 2018; Tripathi; Yadav; Sharma, 2020; França, *et al.*, 2020).



Lipases (hidrolases triacylglicerol E.C. 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise dos triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos e tem sido aplicadas nos últimos anos em emulsificantes, farmacêuticos, cosméticos, sabores, fragrâncias, bem como no tratamento de águas residuais ricas em lipídios oriundas de processos de fabricação de alimentos, na biorremediação de óleos e síntese de biodiesel (Pereira *et al.*, 2019; Chandra, *et al.*, 2020; Melani, *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2020; Mehta, *et al.*, 2021;). Segundo o relatório de Markerts Research Report (2020) o mercado global de lipase deverá atingir US\$ 774,2 milhões até 2027 com crescimento de 5,3%. Já as lipases microbianas deverão registrar 5,1% de crescimento e atingir US\$ 579 milhões em 2027.

A produção industrial de enzimas microbianas é limitada, pois demanda elevados custos com substratos, e estima-se que cerca de 30-40% do custo de produção das enzimas é devido aos substratos utilizados para o cultivo dos microrganismos, o que poderia ser reduzido utilizando substrato de baixo custo, como os resíduos agroindustriais (Nascimento *et al.*, 2007; Marzo *et al.*, 2019).

A fermentação em estado sólido (FES) é uma tecnologia alternativa e promissora devido ao menor gasto de energia, maior produtividade, baixa geração de efluente, menor risco de contaminação por bactérias, assim como permite o uso de resíduos e subprodutos agroindustriais como substrato para produção de biomoléculas de valor agregado. Portanto, a FES apresenta potenciais benefícios econômicos e ambientais que podem tornar os processos industriais mais sustentáveis (Soccol *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2018; Sath, *et al.*, 2018).

O Brasil é o maior produtor e exportador de café e o segundo maior consumidor da bebida no mundo, com uma produção em 2021 estimada em 47,3 milhões de sacas de 60 kg (CONAB, 2021). O processamento pós-colheita do café gera diferentes tipos de resíduos (casca, polpa, mucilagem, água de fermentação e lavagem e a borra). Cerca de 90% de todo o café consumido mundialmente, acaba sob forma de resíduo sólido, sendo que a borra representa a maior parte dos resíduos gerados (Magnago *et al.* 2019).

Na produção do café solúvel, estima-se que para cada tonelada de café verde processada, são gerados 650 kg de borra e para cada kg de café solúvel produzidos são gerados 2 kg de borra, com valores entre 60 e 70% de umidade. É importante salientar que os resíduos produzidos em escalas menores, em residências, bares, restaurantes e cafeterias, não têm sido contabilizado (Durán *et al.*, 2017; Marquet; Nichete, 2020).

Resíduos de café contêm concentrações altas de tanino e cafeína que se descartados incorretamente podem acarretar problemas ambientais (Getachew; Chun, 2017). Sendo assim, o presente trabalho teve o objetivo de investigar o potencial biotecnológico de fungos filamentosos, isolados do rio Igarassu, na bioconversão de borra de café em lipases em fermentação em estado sólido.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Coleta de água, isolamento e identificação dos fungos filamentosos**

#### **2.1.1 Coleta das amostras de água**

A coleta das amostras de água foi realizada no rio Igarassu, Município de Igarassu/PE, Brasil, em 30.10.2019 às 08:00 horas. As condições do tempo no dia da coleta foram 27 °C, umidade relativa de 75%, vento de 14 km/h e pluviosidade 0 mm. Foram feitas coletas de água superficial no trecho situado no km 41,7 da BR-101/PE nas seguintes coordenadas: latitude: 7° 50'07.1" S e longitude: 34°54'47.3" W. Foram coletados 1,5 L de água superficial, utilizando três frascos coletores de plástico polipropileno estéril de 500 mL. A coleta foi realizada com a imersão do frasco na profundidade de 15 cm. Depois da coleta os frascos foram vedados, secos, identificados e acondicionados em caixa isotérmica contendo gelo. Em seguida as amostras foram transportadas ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia – NPCIAMB da Universidade Católica de Pernambuco (UCP), onde foi iniciada imediatamente as técnicas de isolamento.

#### **2.1.2 Isolamento dos fungos filamentosos**

O isolamento dos fungos filamentosos foi realizado adicionando 1 mL de água do rio Igarassu, usando o método de *pour-plate*, em meio ágar Sabouraud 4 % suplementado com 0,05 g/L de cloranfenicol para inibição de crescimento bacteriano. As placas foram incubadas a 28 °C por 96 horas. Após o crescimento, as colônias isoladas foram purificadas e mantidas em ágar Sabouraud a 5 °C.

#### **2.1.3 Identificação morfológica dos fungos filamentosos isolados**

Os isolados foram identificados avaliando as características macromorfológicas (cor, aspecto, diâmetro das colônias) e micromorfológicas conforme as literaturas especializadas tais como: Klich (2002); Samson (2004); Schipper e Samson (1978) para o gênero *Aspergillus*; Samson (1974) e Samson *et al* (2009) para o gênero *Paecilomyces*; Trufem (1981), Alves *et al.* (2002); Souza *et al* (2016) para o gênero *Mucor*.

Após a identificação os isolados foram estocados em óleo mineral segundo Sherf (1943) e em água destilada esterilizada segundo Castellani (1939). A seguir, foram catalogados como: *Aspergillus flavus* UCP 0316, *Aspergillus fumigatus* UCP 0327, *Paecilomyces variotii*, UCP 0334, *Mucor hiemalis* f. *luteus* UCP 0343, *Aspergillus foetidus* UCP 0360 e depositados no Banco de Cultura da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), localizado no Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB).

## 2.2 Obtenção e preparo do substrato

A borra de café gentilmente cedida por cafeterias e residências, localizadas em Recife/PE, foram secas em estufa a 65 °C por 96 h e armazenadas em recipientes de plástico com rosca até o uso.

## 2.3 Caracterização da borra de café

A borra de café foi submetida a análise espectroscópica FTIR no equipamento Shimadzu, IR-TRACER 100, utilizando acessório de refletância total atenuada (ATR) constituído por um cristal misto “diamante/ZnSe”. Os picos obtidos foram comparados com a literatura para confirmar a presença de lipídeos.

## 2.4 Produção de lipase

### 2.4.1 Preparação do inóculo

As amostras foram cultivadas em ágar Sabouraud e incubadas a 28 °C, por 96 h até a esporulação. Após a esporulação o inóculo foi obtido transferindo esporos para Erlenmeyer contendo 50 mL de água destilada estéril para obtenção de uma suspensão esporica de 10<sup>7</sup> UFC/mL. A contagem de esporos em suspensão foi realizada em câmara de Neubauer e microscópio óptico.

### 2.4.2 Ensaio de seleção para produção de lipase

As 5 espécies de fungos filamentosos foram submetidas a uma seleção em fermentação em estado sólido para produção de lipase utilizando como substrato a borra de café. Assim Erlenmeyer de 125 mL contendo 10 g de borra de café foram esterilizados, posteriormente tiveram sua umidade ajustada para 60 % pela adição de base salina composta por NaNO<sub>3</sub> (3,0 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,0 g/L), MgSO<sub>4</sub> (0,5 g/L), KCl (0,5 g/L), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,01 g/L), pH 6,0 e por 5 mL da suspensão de esporos (10<sup>7</sup> UFC/mL), como descrito por Colla; Hemkemeier; Gil (2012). Os frascos foram incubados a 28 °C por 144 horas de cultivo em triplicata. Após o processo fermentativo dos ensaios a enzima foi removida adicionando 50 mL de água destilada e levados a agitação orbital de 150 rpm à 28 °C por 30 minutos. Foram submetidos a filtração em membranas de Nylon para separação da biomassa, o filtrado foi centrifugado em 5000 rpm a 28 °C por 15 minutos para retirada de biomassa residual da filtração, posteriormente foi utilizado para detecção da atividade enzimática da lacase.

### 2.4.3 Determinação da atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi determinada através da metodologia descrita por Soares *et al* (1999). Foi realizada a reação de uma mistura contendo 5 mL de uma emulsão de óleo de oliva e goma arábica (7%), adicionado de 2 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7.0) e 1 mL do líquido metabólico filtrado, exceto aos brancos reacionais. As misturas foram agitadas em agitador orbital a 82 rpm, 37 °C, durante 10 minutos. As reações foram paralisadas através da adição de 10 mL de uma mistura acetona-etanol-água (1:1:1), liberando os ácidos graxos livres presentes na mistura. As misturas foram tituladas com uma solução de KOH (0,04 N) na presença do indicador fenolftaleína. O experimento foi realizado em triplicata. A unidade da atividade lipolítica (U/mL) foi definida como a quantidade da enzima bruta que liberou 1 μmol/mL de ácidos graxos por minuto. A atividade enzimática de lipase foi calculada através da equação 1:

$$AE (U/mL) = \frac{(V_a - V_b) \times N \times 1000}{t \times V_b} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: AE é a atividade lipolítica (U/mL); V<sub>a</sub> é o volume da amostra titulada (mL); V<sub>b</sub> é o volume da amostra utilizado da reação (mL); N é a normalidade da solução de KOH (N); T é o tempo de reação em minutos.

### 2.4.4 Planejamento fatorial

Um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, com 4 pontos centrais, foi realizado para avaliar a influência das variáveis independentes umidade, temperatura e concentração da borra de café na variável resposta atividade lipolítica, em fermentação em estado sólido por 144 h, utilizando a espécie selecionada no ensaio preliminar para produção de lipase. Cada variável independente foi investigada em três níveis mínimo (-1), central (0) e máximo (+1) conforme a tabela 1. Os dados foram analisados utilizando o software STATISTIC versão 7.0 considerando a significância dos resultados para (p <0.05).

**Tabela 1.** Níveis das variáveis do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> para produção de lipase em borra de café pelo fungo selecionado

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Umidade (%)	50	70	90
Temperatura (°C)	25	31	37
Concentração (g)	5	15	25

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1 Isolamento dos fungos filamentosos

Foram isolados 5 fungos filamentosos, sendo 3 do gênero *Aspergillus*, 1 do gênero *Mucor* e 1 do gênero *Paecilomyces*. Gomes *et al.* (2008) analisaram água e sedimento das praias de Bairro Novo e Casa Caiada em Olinda, Pernambuco, e observaram com mais frequência *Aspergillus* e *Paecilomyces*, dentre outros gêneros.

Resultados semelhantes também foram relatados por Doi *et al.* (2018) que isolaram 15 gêneros de fungos filamentosos na água e sedimento da baía do Araçá em São Sebastião/SP, sendo os principais *Aspergillus*, *Mucor* e *Paecilomyces* com destaque para espécies do gênero *Aspergillus* que apresentaram maior densidade e diversidade.

Lima *et al.* (2017) descreve que os fungos são encontrados onde há matéria orgânica, sendo a maioria saprófitos e, ocasionalmente, patogênicos. Espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Paecilomyces* entre outros como *Penicillium*, *Trichoderma* e *Fusarium* são biologicamente mais bem sucedidas e encontradas em todos os habitats, incluindo a água.

#### 3.2 Identificação morfológica dos fungos filamentosos

Foram identificados 5 táxons já conhecidos na literatura: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. foetidus*, *Paecilomyces variotii*, e *Mucor hiemalis*. Os isolados mencionados podem ser identificados com base na chave proposta a seguir (Tabela 2):

**Tabela 2.** Chave de identificação de espécies de fungos filamentosos isolados do Rio Igarassu

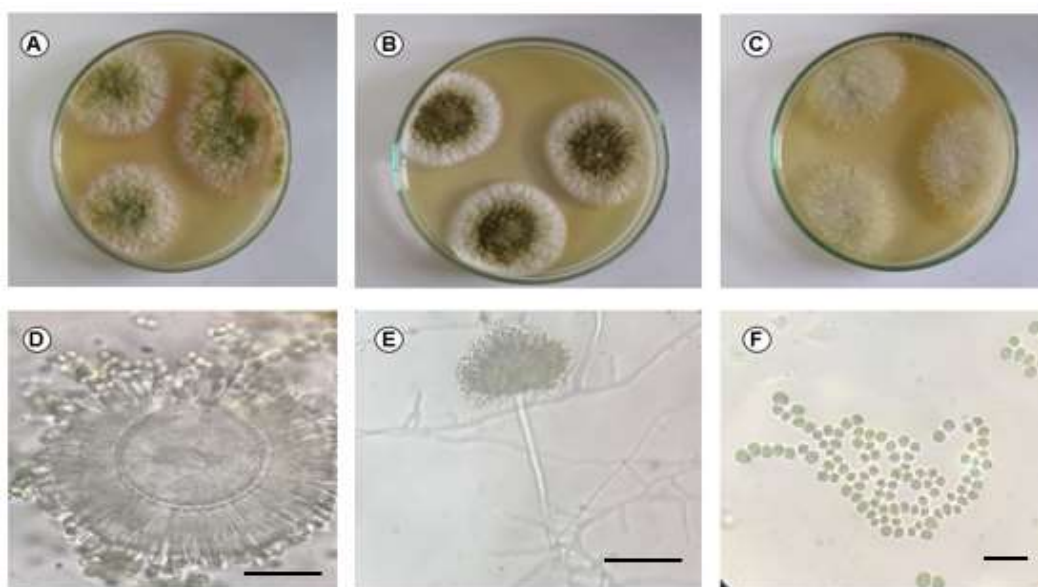
1	Hifas septadas .....	2
1	Hifas cenocíticas .....	4
2	Conidióforo com ápice inflado (vesícula), contendo numerosas fiálides .....	<b><i>Aspergillus</i></b>
2'	Conídios verde oliva a verde papagaio em CYA 25 °C, alcançando 3 a 6 µm de diâmetro. Seriação predominantemente bisseriada .....	<b><i>A. flavus</i></b>
2''	Seriação monosseriada. Conídios de coloração turquesa globosos e finamente rugosos alcançando até 3 µm (3,5 µm), cabeça conidial do tipo colunar .....	<b><i>A. fumigatus</i></b>
2'''	Conídios de coloração marrom escuro a preto. Bisseriado com conídios globosos e finamente rugosos, alcançando de 4-5 µm .....	<b><i>A. foetidus</i></b>
2	Conidióforo sem formação de vesícula com produção de fiálides .....	3
3	Conídios globosos, penicilos bem desenvolvidos .....	<b><i>Penicillium</i></b>
3	Conídios limoniforme e pobremente penicilados .....	<b><i>Paecilomyces</i></b>
3'	Conidióforos irregularmente ramificado, fiálide 12 a 20 µm de diâmetro, conídios cilíndricos a elipsoidal .....	<b><i>P. variotii</i> e <i>P. formosus</i></b>
3''	Em meio CREA não produz compostos ácidos .....	<b><i>P. variotii</i></b>
4	Esporangióforos simples ou ramificados com esporângio sem apófise.....	<b><i>Mucor</i></b>

4'	Columela obovóides, esporos elipsoidais e fusiformes 2,5 - 10 $\mu\text{m}$ ..... <i>M. hiemalis f. hiemalis</i>
4''	Columelas globosas a obovóides; esporângiosporos elipsóides e longos 2,5 (1,5 $\mu\text{m}$ ) - 8,0 $\mu\text{m}$ (12 $\mu\text{m}$ ) ..... <i>M. hiemalis f. luteus</i>

CYA – Ágar Czapek Extrato de Levedura; CREA – Ágar Creatina Sacarose.

### 3.2.1 *Aspergillus flavus*

As colônias crescidas em Ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA) à 25 °C, apresentaram diâmetro de 57,7 mm, aspecto sulcado com textura lanosa a flocosa, micélio branco com conídios de coloração verde oliva (Fig. 1A) e de reverso alaranjado. Quando incubadas em 37 °C, as colônias apresentaram diâmetro de 43,8 mm, aspecto sulcado com textura lanosa a flocosa, micélio branco com conídios de coloração verde (Fig. 1B). Em Ágar Extrato de Malte (MEA) as colônias apresentaram colônia sulcada com textura lanosa a flocosa, micélio branco com conídios de coloração oliva (Fig. 1C). Nenhuma das culturas produziram pigmento e exsudato. Produção de esclerócios com 14 dias. Avaliando as características microscópicas foram observados conidióforos incolores próximos ao ápice, parede rugosa (400-800  $\mu\text{m}$ ), cabeças conidiais do tipo radial para colunar e predominantemente bisseriada 1D e 1E. Vesículas predominantemente piriformes (Fig. 1D). Conídios globosos e finamente rugosos, alcançando até 3 – 5  $\mu\text{m}$  (Fig. 1F).



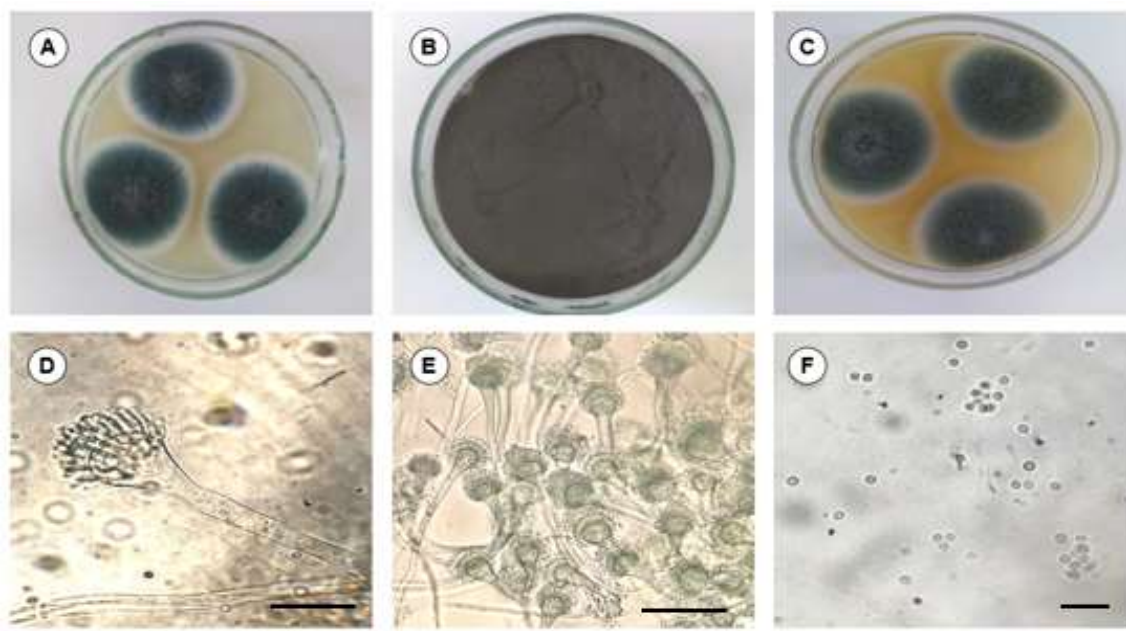
**Figura 1.** Características macroscópicas e microscópicas do isolado *Aspergillus flavus* UCP 0316. (A – B) Aspecto da colônia, 25 °C e 37 °C em CYA, respectivamente; (C) Aspecto da colônia a 25 °C em MEA; (D) Vesícula esférica, com metulas e fiáldes; (E) cabeça conidial radial; (F) Conídios globosos para elipsóides. Barras: D = 30  $\mu\text{m}$ ; E = 100  $\mu\text{m}$ ; F = 10  $\mu\text{m}$ . Fonte: Próprio autor.

A variação de cor da colônia de verde claro a verde escuro de *A. flavus* pode ocasionar em uma identificação errônea como *A. parasiticus*. No entanto, a micromorfologia como a seriação e forma e ornamentação de conídios auxiliam na diferenciação. Geralmente a seriação dominante em *A. parasiticus* é unisseriada com poucas seriações bisseriada (Klich 2002; Kokalis-Burelle *et al.*, 1977). A cepa estudada produz poucos esclerócios. A produção de esclerócio é conhecida como uma característica comum da seção Flavi de *Aspergillus* (Varga *et al.*, 2011). No entanto, muitos estudos relataram que a produção foi variada dentro da mesma espécie, tornando essa característica irrelevante, além disso, a produção dessas estruturas não está necessariamente correlacionada com a produção de aflatoxina (Reis *et al.*, 2014; Norlia *et al.*, 2018). No entanto, a diferenciação morfológica por si só na seção Flavi é insuficiente para discriminar a maioria dos *Aspergillus* spp. nesta seção devido às semelhanças interespecíficas e variabilidade intraespecífica (Rodrigues *et al.*, 2009).

### 3.2.2 *Aspergillus fumigatus*

As colônias crescidas em CYA à 25 °C, apresentaram diâmetro de 52,70 mm, conídios de coloração azul turquesa acinzentado e micélio branco, bem como colônia com textura aveludada a flocosa e radialmente sulcada (Fig. 2A) e reverso incolor. Já em CYA a 37 °C as colônias apresentaram diâmetros de 83,32 mm com produção

intensa de conídios de coloração acinzentada (Fig. 2B). Em MEA as colônias apresentaram características semelhantes ao CYA à 25 °C (Fig. 2C). Nenhuma das culturas produziram esclerócitos, pigmento e exsudato. Avaliando as características microscópicas foram observados conidióforos incolores à acinzentados próximos ao ápice, parede lisa (200-400 µm), cabeças conidiais do tipo colunar e monosseriado (sem presença de métulas), com fiálides alcançando de 6 a 8 µm, cobrindo apenas a parte superior das vesículas como mostradas nas figuras 2D e 2E. Vesículas predominantemente piriforme e espatular (Fig. 2D). Conídios globosos e finamente rugosos, alcançando até 3 µm (Fig. 2F).



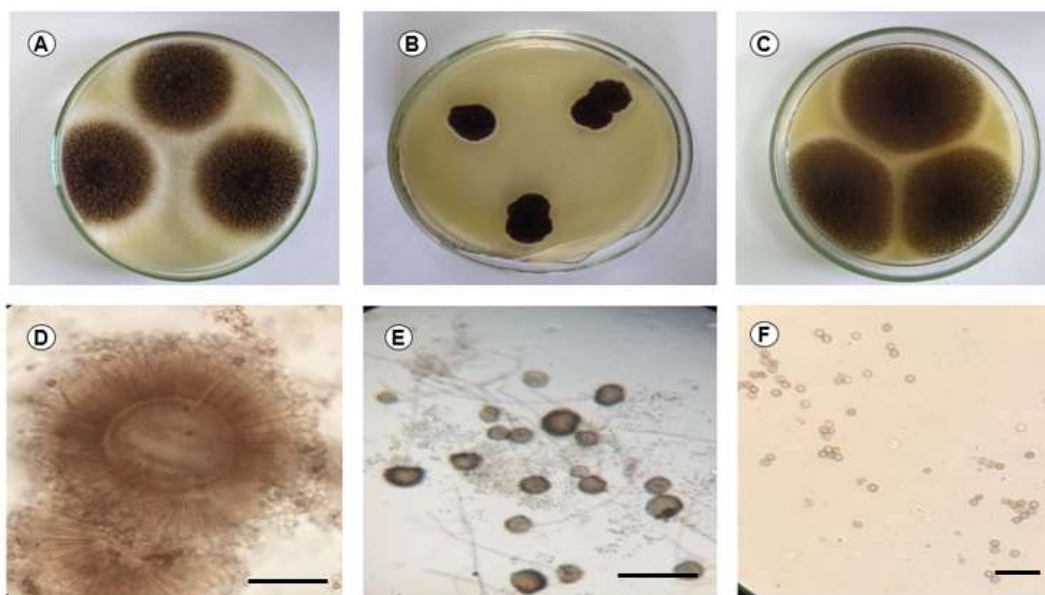
**Figura 2.** Características macroscópicas e microscópicas do isolado *Aspergillus fumigatus* UCP 0327. (A – B) Aspecto da colônia, 25 °C e 37 °C em CYA, respectivamente; (C) Aspecto da colônia a 25 °C em MEA; (D) Cabeça conidial colunar; (E) Vesículas piriformes a espatulares; (F) Conídios globosos. Barras: D = 20 µm; E = 100 µm; F = 10 µm. **Fonte:** Próprio autor

A espécie *A. fumigatus* se distingue das demais espécies de *Aspergillus* por suas colônias de rápido crescimento com tonalidades turquesa a verde escuro, fiálides paralelas ao conidióforo e conídios carregados em coluna (Klick, 2002).

No entanto, as colônias de *A. lentulus*, *A. fumigatiaffinis* e *A. novofumigatus* são macroscopicamente semelhantes a *A. fumigatus*, porém se diferem pela intensidade de esporulação. Em relação as características microscópicas a maioria das cepas de *A. fumigatus* apresentam vesículas subclavadas, enquanto as vesículas das demais espécies da seção são subglobosas. Em comparação, a maioria das vesículas de *A. fumigatus* eram mais largas do que 22 µm, enquanto nas outras as vesículas eram mais estreitas (Hong *et al.*, 2005).

### 3.2.3 *Aspergillus foetidus*

As colônias crescidas em CYA à 25 °C, apresentaram diâmetro de 53,3 mm, micélio branco com conídios de coloração de marrom escuro a preto, colônia com textura velutinea e radialmente sulcada (Fig. 3A) e reverso incolor. Em CYA a 37 °C as colônias apresentaram diâmetros de 19,7 mm (Fig. 3B). Em MEA as colônias apresentaram característica semelhante ao CYA à 25 °C (Fig. 3C). Nenhuma das culturas produziram esclerócitos, pigmento e exsudato. Analisando as características microscópicas foram observados conidióforos incolores a ligeiramente marrons próximos ao ápice, parede lisa (400-800 µm), cabeças conidiais globosas a ligeiramente alongadas, predominantemente bisseriadas, métulas alcançando de 5-18 µm, fiálides alcançando de 3-3,5 µm, conforme as figuras 3D e 3E. Adicionalmente, apresentaram conídios globosos e finamente rugosos, alcançando de 4-5 µm (Fig. 3F).



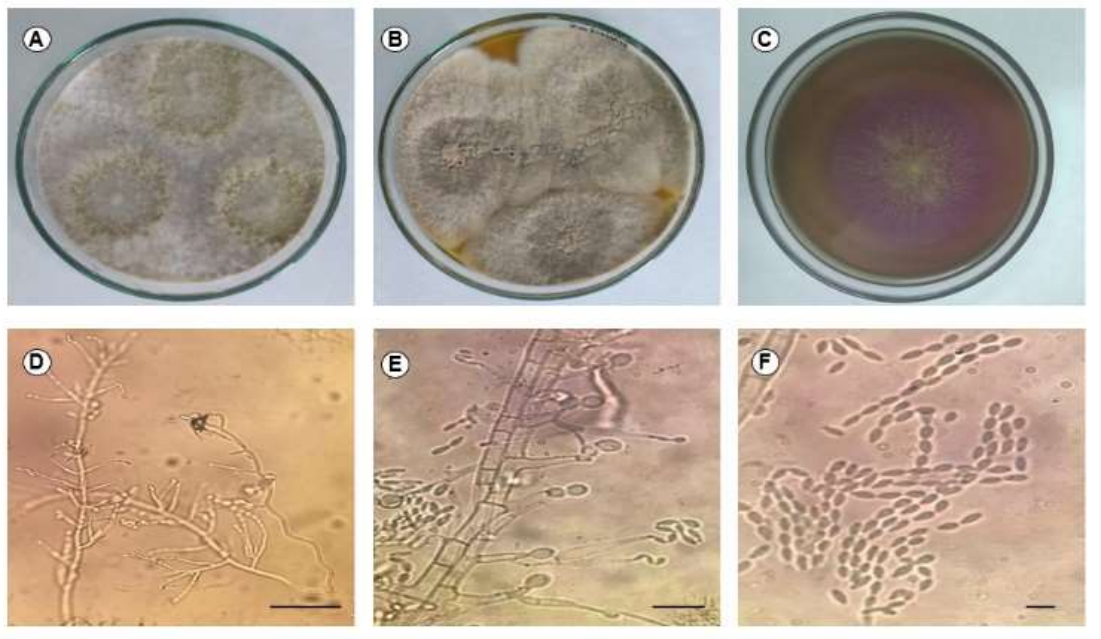
**Figura 3.** Características macroscópicas e microscópicas do isolado *Aspergillus foetidus* UCP 0360. (A – B) Aspecto da colônia, 25 °C e 37 °C em CYA, respectivamente; (C) Aspecto da colônia a 25 °C em MEA; (D) Vesícula esférica, bisseriada; (E) cabeça conidial radial; (F) Conídios globosos para elipsoidal. Barras: D = 20 µm; E = 300 µm; F= 10 µm. **Fonte:** Próprio autor

A Seção *Nigri* é uma das mais confusas e complexas devido às mínimas diferenças entre as espécies. Espécies como *A. carbonarius*, com esporos que podem alcançar 11 µm de diâmetro, e as espécies monosseriadas (*A. japonicus* e *A. aculeatus*), são facilmente identificadas por características microscópicas (Pitt; Hocking, 1997).

*Aspergillus foetidus*, *A. niger* e *A. tubingensis* são espécies difíceis de distinguir com características morfológicas (Samson *et al.*, 2004). Neste estudo a espécie relatada (*A. foetidus*), se diferencia da espécie *A. niger* por apresentar conidióforos que não ultrapassavam 1000 µm, o que o difere de *A. niger* que alcançam até 3000 µm de comprimento (Klich, 2002). Além disso, *A. foetidus* é distinguido dessas espécies por sua ornamentação de conídios, que quando jovens são finamente rugosos e, quando maduros, são conídios lisos (Klich *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2011).

#### 3.2.4 *Paecilomyces variotii*

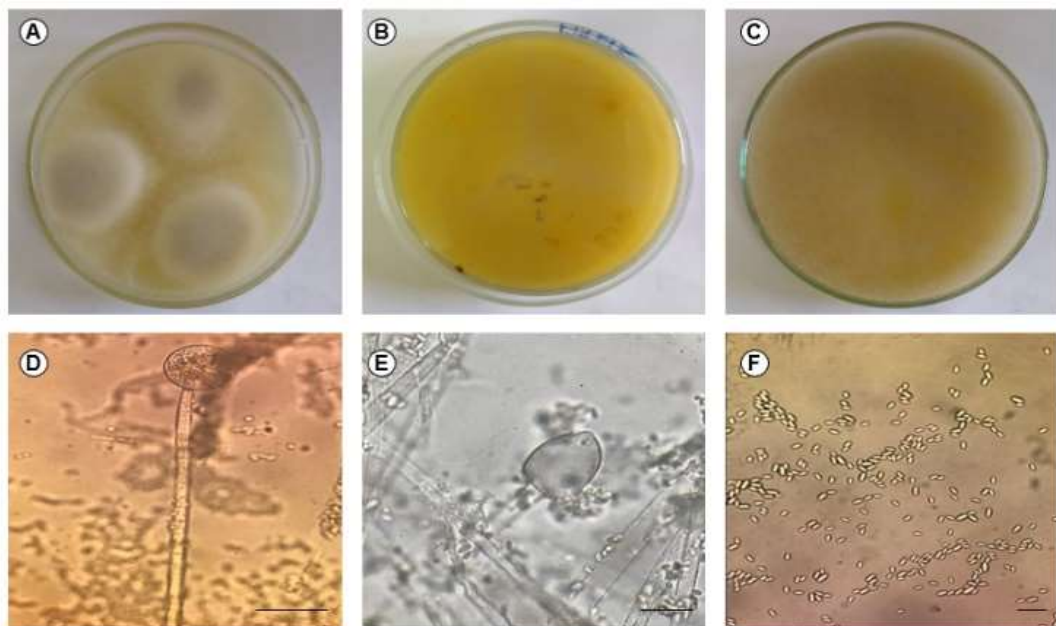
As colônias crescidas em MEA a 30 °C apresentaram diâmetro de 81,25 mm, conídios de coloração verde oliva e micélio branco, bem como textura aveludada a flocosa (Fig. 4A) e reverso amarelo para incolor. Já em CYA à 37 °C, apresentaram diâmetro de 64,57 mm (Fig. 4B). Em CREA não houve produção de componentes ácidos (Fig. 4C). Analisando as características microscópicas foram observados conidióforos irregularmente ramificados, filídes alcançando de 12 a 20 µm de comprimento com base larga terminando em um pescoço longo e delgado (Fig. 4D e 4E). Conídios cilíndricos a elipsoidais alcançando até 5,6 µm (Fig. 4F). O *P. variotii* se assemelha morfológicamente ao *P. formosus* porém, esse último produz componentes ácidos no ágar creatina (Samson, 2009).



**Figura 4.** Características macroscópicas e microscópicas do isolado *Paecilomyces variotii* UCP 0334. (A) Aspecto da colônia em MEA a 30 °C; (B) Aspecto da colônia em CYA a 37 °C; (C) Aspecto da colônia a 25 °C em CREA sem produção de compostos ácidos; (D – E) conidióforos irregularmente ramificados e fiálides com base larga terminando em um pescoço longo e delgado; (F) Conídios cilíndricos a elipsoidais alcançando até 5,6 μm. **Fonte:** Próprio autor

### 3.2.5 *Mucor hiemalis*

O isolado pertence a espécie *M. hiemalis* por apresentar columela elipsoidal com base truncada, esporóforos simples, não ramificados ou escassamente ramificados (Fig. 5D–E), esporangiósporos com formas e tamanhos regulares, às vezes com um dos lados dilatados (Fig. 5F). Inicialmente as colônias brancas e com o envelhecimento da colônia apresentam coloração amarelada, fototropismo positivo e não apresenta crescimento em 40 °C (Fig. 5A - C).



**Figura 5.** Características macroscópicas e microscópicas do isolado *Mucor hiemalis* f. *luteus* UCP 0343. (A) Aspecto da colônia em BDA a 25 °C; (B) Aspecto da colônia a 25 °C em MEA; (C) Aspecto da colônia a 40 °C em MEA; (D – E) Columela globosa e esporangióforos; (D) Esporangiospóros de 2,5 x 8. **Fonte:** Próprio autor

As características morfológicas do *M. hiemalis* relatadas aqui mostram similaridades próximas com a descrição de Schipper (1978), com diferença mínima no diâmetro de esporangiospóros e forma globosa de algumas columelas. Esporangiospóros com tamanhos de 2.5 x 8 µm e presença de columelas globosas, corresponde a espécie *M. hiemalis* f. *luteus* relatada por Alves *et al.*, (2002).

Cepas de *M. hiemalis* exibem semelhanças morfológicas com algumas variantes de *M. circinelloides*. No entanto, *M. hiemalis* carece de ramificações curtas que são abundantes em *M. circinelloides* (Schipper, 1978).

As formas das columelas de *M. hiemalis* se assemelham à espécie *M. racemosus*, porém são diferenciados pela presença abundante de clamidospóros em que em *M. hiemalis* são escassos, além disso nunca estão presentes em esporangióforos (Schipper, 1978; Souza *et al.*, 2017).

### 3.3 Ensaios preliminares em fermentação em estado sólido

Os resultados da triagem para selecionar a espécie de fungo filamentoso com maior potencial de produção de lipase em fermentação em estado sólido no meio alternativo contendo borra de café são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Atividade lipolítica de *Aspergillus flavus* UCP 0316, *Aspergillus fumigatus* UCP 0327, *Paecilomyces variotii*. UCP 0334, *Mucor hiemalis* f. *luteus*, UCP 0343 e *Aspergillus foetidus* UCP 0360 em meio a base de borra de café com umidade de 60%, a 28 °C por 144h de cultivo

Código do isolado	Identificação	Atividade lipolítica (U/mL)
UCP 0316	<i>Aspergillus flavus</i>	147,29
UCP 0327	<i>Aspergillus fumigatus</i>	213,80
UCP 0334	<i>Paecilomyces variotii</i>	63,06
UCP 0343	<i>Mucor hiemalis</i> f. <i>luteus</i>	151,40
UCP 0360	<i>Aspergillus foetidus</i>	514,29

- UCP – Universidade Católica de Pernambuco

Os resultados obtidos indicaram que todas as espécies testadas apresentaram atividade lipolítica no meio alternativo contendo borra de café. No entanto, *A. foetidus* apresentou maior atividade enzimática de 514,29 U/mL em meio a base de borra de café com umidade de 60% em 28 °C durante 144h de cultivo. Putri *et al.*, (2020) obtiveram atividade lipolítica inferior, 176 U/mL, com *A. niger* cultivado em farelo de arroz. Por outro lado, Guedes *et al.*, (2021) relataram que dentre os fungos filamentosos produtores de lipases o gênero *Aspergillus* se destaca. França *et al.*, (2020) relatam a importância da busca por novos microrganismos de ambientes ainda pouco conhecidos para produção de bioativos, principalmente as enzimas microbianas, pois a indústria biotecnológica necessita de novos produtores microbianos.

### 3.4 Planejamento fatorial

Os efeitos das variáveis independentes sobre a produção de lipases por *Aspergillus foetidus* UCP 0360 durante 144 horas foram investigados de acordo com o planejamento fatorial 2<sup>3</sup> (Tabela 4). A umidade de 50%, temperatura de 37 °C e concentração do substrato de 25 g favoreceram a maior produção da enzima (2941,87 U/mL).

Planejamentos fatoriais são amplamente utilizados como ferramentas na otimização dos processos de produção de lipases (Gochev *et al.*, 2012; Toscano *et al.*, 2013; Adnani *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2009). Neste estudo, o planejamento fatorial 2<sup>3</sup> propiciou um aumento de 5,7 vezes na produção da lipase por *Aspergillus foetidus* UCP 0360.

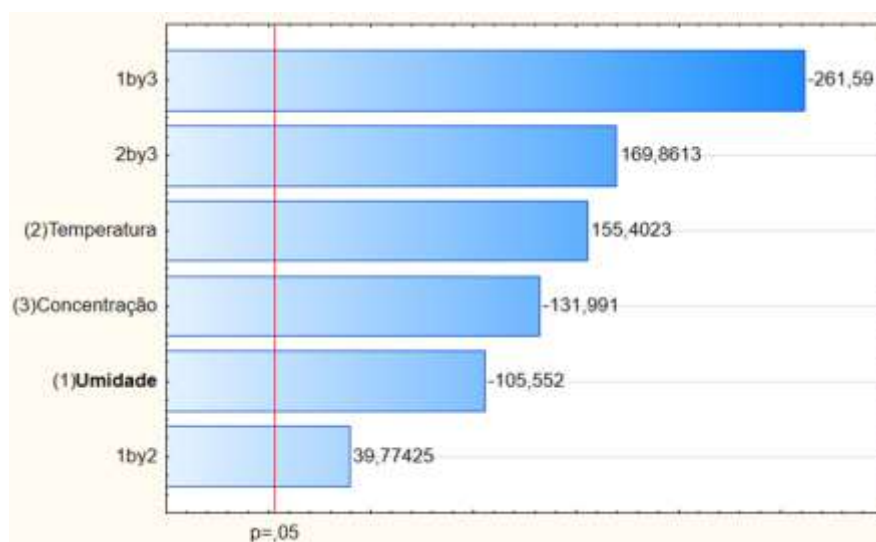


**Tabela 4.** Produção de lipase por *Aspergillus foetidus* UCP 0360 de acordo com um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.

Experimentos	Umidade (%)	Temperatura (°C)	Concentração (g)	AE (U/ml)
1	50	25	5	2009,99
2	90	25	5	868,65
3	50	37	5	220,75
4	90	37	5	2548,00
5	50	25	25	273,84
6	90	25	25	310,68
7	50	37	25	2941,87
8	90	37	25	114,70
9	70	31	15	456,30
10	70	31	15	443,53
11	70	31	15	448,55
12	70	31	15	447,19

AE – Atividade enzimática

A análise estatística dos dados demonstrou que as três variáveis independentes umidade, temperatura e concentração do substrato, bem como a interação entre elas foram significativas quando analisadas no nível de confiança de 95 % (Figura 6). A interação das variáveis umidade e concentração do substrato foi a mais significativa, porém influenciou negativamente, indicando que níveis menores podem favorecer a produção da enzima. Todavia, a temperatura e a sua interação com a concentração do substrato influenciaram positivamente na produção de lipase.



**Figura 6.** Diagrama de Pareto do efeito das variáveis na produção de lipase por *Aspergillus foetidus* UCP 0360 em fermentação em estado sólido usando borra de café como substrato por 144 h.

### 3.5 Caracterização da borra de café

Os espectros da borra de café apresentaram várias regiões de absorção, conforme a Figura 7. A absorção de regiões de picos em 2900 e 2800  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas a alongamentos de C de ligação simples H, possivelmente de grupos  $\text{CH}_2$ -funcionais. As bandas de vibração de alongamento CH em 1745  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao grupo carbonil de éster de triglicerídeos (Nakasato *et al.*, 2007). Sendo notável no espectro a presença de lipídeos.

As bandas de vibração de alongamentos CH em  $2926\text{ cm}^{-1}$  (cetona  $\nu(\text{C-H})\text{CH}_3$ ), associadas a picos em  $1652\text{ cm}^{-1}$  representa o trecho de ligação dupla, adjacente a um conjunto de anéis que são possivelmente atribuídas à lignina (Iriundo-Dehond *et al.*, 2019). Enquanto o pico adjacente, pouco representativo, em  $2899\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao modo de alongamento CH, associado ao pico em  $899\text{ cm}^{-1}$  foi atribuído aos modos de flexão HCC e HCO ( $\delta(\text{C}(1)\text{H}(\beta))$ ), de acordo com a atribuição vibracional para celulose (Iriundo-Dehond *et al.*, 2019). Um pico amplo em  $1632\text{ cm}^{-1}$  representando pequenas concentrações de amida I (proteína/peptídeos) também foi observado (Iriundo-Dehond *et al.*, 2019; Nakasato *et al.*, 2007).

Foram observados modos de flexão e deformação na região entre  $1000$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$ . A banda em  $1460\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída ao modo de desenvolvimento  $\text{CH}_3$  (ou  $\text{CH}_2$ ) das coordenadas de metileno. Bandas de alongamento entre a região  $1200$  e  $900\text{ cm}^{-1}$  representa alongamento de C da ligação simples C -  $\nu(\text{C-C})$  e C da ligação simples O -  $\nu(\text{C-O})$ , sendo o pico mais intenso o  $1030\text{ cm}^{-1}$ , mas essas bandas não são atribuídas apenas a açúcar, mas também para proteínas e lipídios (Nakasato *et al.*, 2007).

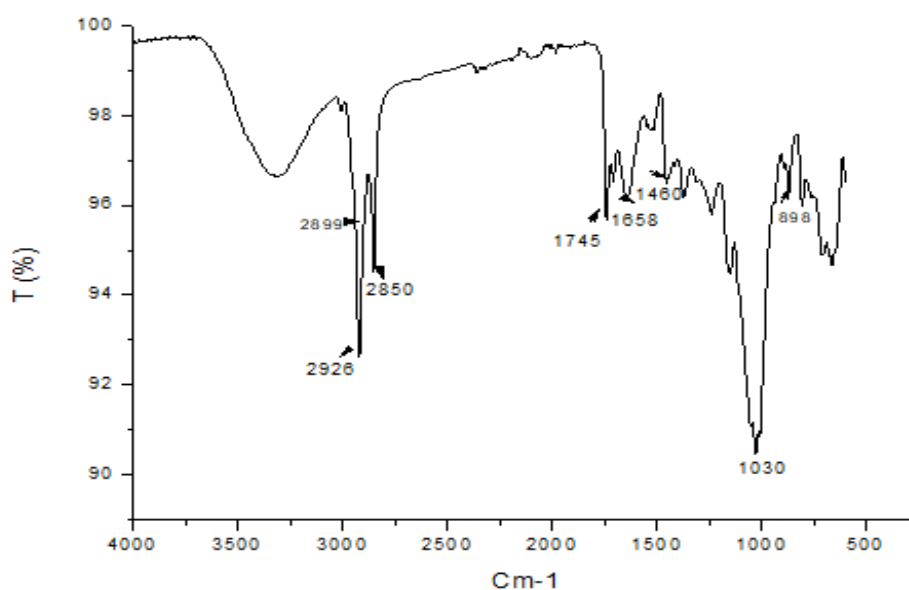


Figura 7. Espectro de absorção no infravermelho da borra de café

#### 4. Conclusão

Os cinco isolados *Aspergillus flavus* UCP 0316, *Aspergillus fumigatus* UCP 0327, *Paecilomyces variotii* UCP 0334, *Mucor hiemalis* f. *luteus* UCP 0343 e *Aspergillus foetidus* UCP 0360 foram capazes de crescer e produzir lipases em resíduo de borra de café. No entanto, *A. foetidus* apresentou maior atividade enzimática. A melhor condição para produção de lipase ocorreu com umidade de 50%, temperatura a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  e concentração do substrato de 25 g. Por fim, a borra de café se mostrou um substrato promissor, para produção de lipase em fermentação em estado sólido, como alternativa para diminuição dos custos do processo.

#### Agradecimento

Os autores agradecem a CNPq, CAPES e FACEPE pelo suporte financeiro para realização desse trabalho, ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia da Universidade Católica de Pernambuco pela infraestrutura para execução de toda parte experimental e ao Laboratório Multiusuário de Análises Químicas - LABMAQ do Departamento de Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela análise química.

#### Referências

- Adnani A, Basri M, Malk EA, Salleh AB, Rahman MBA, Chaibakhsh N, Rahman RNZRA (2010) Optimization of lipase-catalyzed synthesis of xylitol ester by Taguchi robust design method. *Industrial Crops and Products* 31(2): 350-356. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.12.001>
- Alves AM, Moura RB, Carvalho AKF, Castro HF, Andrade GSS (2019) *Penicillium citrinum* whole-cells catalyst for the treatment of lipid-rich wastewater. *Biomass and Bioenergy* 120:433-438. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.12.004>

- Alves MH, Trufem SFB, Milanez AI (2002) Táxons de *Mucor Fresen.* (Zygomycota) em fezes de herbívoros, Recife, PE, Brasil. Rev Bras Bot 25(2):147-160. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042002000200004>
- Castellani, A (1939) Viability of some pathogenic fungi in distilled water. Journal of Tropical Medicine and Hygiene 42:225-226
- Chandra P, Enespa, Singh R, Arora PK(2020) Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. Microb Cell Fact 19, 169. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>
- Colla LM, Hemkemeier M, Gil AS (2012) Biossorção de Cádmio e Produção de Biossurfactantes por fungos filamentosos em Fermentação Submersa. Revista CIATEC 4(1):1-10. <https://doi.org/10.5335/ciatec.v4i1.1934>
- Conab. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento nacional da safra brasileira do café (2021) 6(1):1-62, Brasília/DF. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe>>. Acesso em: 30.04.2021.
- Costa JAV, Treichel H, Kumar V *et al.*, (2018) Advances in solid-state fermentation. In: Curr Dev Biotechnol Bioeng, 1ª ed. Elsevier, Amsterdã 1-17. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00001-3>
- Cunha FM, Esperança MN, Zangirolami TC, Badino AC.; Farinas CS. (2012) Cultivo sequencial de estado sólido e submerso de *Aspergillus niger* em bagaço de cana-de-açúcar para a produção de celulose. Tecnologia bioresource 112:270-274
- Coutinho HDM (2007) Dinâmica populacional e atividade de enzimas extracelulares de bactérias hemofílicas e termofílicas isoladas do solo do semiárido nordestino. Brazilian Journal of Microbiology 38(1). <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000100028>
- Couri S, Damaso MCT. Enzimáticos. Agência Embrapa Informação Tecnológica. Disponível em: <[https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia\\_de\\_alimentos/arvore/CONT000fid5sgif02wyiv80z4s473v6o7sud.html](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid5sgif02wyiv80z4s473v6o7sud.html)>. Acesso em: 10.05.2021.
- Doi SA, Pinto AB, Canali MC, Polezel DR, Chinellato RAM, Oliveira AJFC (2018) Densidade e diversidade de fungos filamentosos na água e sedimento da baía do Araçá em São Sebastião, São Paulo, Brasil. Biota neotropical 18(1). <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2017-0416>
- Barbosa RN, Bezerra JDP, Santos AC, Melo RFR, Houbraken J, Oliveira NT, Souza-Motta, CM (2020) Brazilian tropical dry forest (Caatinga) in the spotlight: an overview of species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* (Eurotiales) and the description of *P. vascosobrinhou* sp. nov. Acta Botanica Brasilica 34(2). <https://doi.org/10.1590/0102-33062019abb0411>
- Devlin TM (2011) Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas. Ed. Edgard Blücher, São Paulo
- Durán CAA, Tsukui A, Santos FKF, Martinez ST, Bizzo HR, Rezende CM (2017) Café: Aspectos Gerais e seu Aproveitamento para além da Bebida. Ver. Virtual Quim. 9(1):107-134
- Ely C, Kempka AP, Skoronski E (2016) Aplicação de Peroxidases no Tratamento de Efluentes, Ver. Virtual Quim 8(5):1537-1549
- Ferraz JLAA, Souza LO, Silva TP, Franco M (2018) Obtenção de Lipases Microbianas: Uma Breve Revisão. Revista Ciências Exatas e Naturais 20(1):30-54
- França ES, Marinho JS, Cândido TRS, Lins UMB, Andrade RFS, Campos-Takaki GM, Silva CAA, OKADA K (2020) Detecção de esterase e lipase produzidas por fungos filamentosos isolados de solos da Caatinga. Brazilian Journal of Development 6(11):91693-91709. Doi:[10.34117/bjdv6n11-543](https://doi.org/10.34117/bjdv6n11-543)
- Gao, Yin-Yu, Chen Wen-Wei, Lei H, Liu Y, Lin X, Ruan R (2009) Optimization of transesterification conditions for the production of fatty acid methyl ester (FAME) from Chinese tallow kernel oil with surfactant-coated lipase. Biomass and bioenergy 33(2):277-282. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.05.013>

Getachew AT, Chun BS (2017) Influence of pretreatment and modifiers on subcritical water liquefaction of spent coffee grounds: a green waste valorization approach. *Journal of Cleaner Production* 142:3719-3727. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.10.096>

Gochev V, Monteiro G, Kostov G, Toscano L, Stoytcheva M, Krastanov A, Georgieva A (2012) Nutritive medium engineering enhanced production of extracellular lipase by *trichoderma longibrachiatum*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 26(2):2875-2882. <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2011.0138>

Gomes DNF, Cavalcanti MAQ, Fernandes MJS, Lima DMM, Passavante JZO (2008) Filamentous fungi isolated from sand and water of “Bairro Novo” and “Casa Caiada” beaches, Olinda, Pernambuco, Brasil. *Braz. J. Biol.* 68(3):377-382. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842008000300016>

Gorlach-Lira K, Gomes KD, Polizelli MA (2020) Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima beta-galactosidase. *Brazilian Journal of Development* 6(5):28194-28208. Doi: [10.34117/bjdv6n5-316](https://doi.org/10.34117/bjdv6n5-316)

Guedes EHS, Santos AL, Ibiapina A, Aguiar AO, Soares CMS, Vellano PO, Santos LSS, Junior AFC (2021) Resíduos agroindustriais como substrato para a produção de lipases microbiana: uma revisão. *Research Society and Development* 10(2):1-12. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12537>

Guerrand D (2017) Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. *EDP Sciences* 24(4):1-7. Doi: [10.1051/ocl/2017031](https://doi.org/10.1051/ocl/2017031)

Hong Seung-Beom, Go Seung-Joo, Shin Hyeon-Dong, Frisvad JC, Samson RA (2005) Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* 97(6):1316-1329. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832738>

Iriondo-Dehond A, Garcia NA, Fernandez-Gomez, Guisantes-Batan, E, *et al.*, (2019) Validation of coffee by-products as novel food ingredients. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 51:194-204. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.06.010>

Kokalis-Burelle N, Porter DM, Rodriguez-Kábana R, Smith DH, Subrahmanyam P (1997) Compendium of peanut diseases. 2ª Ed. St. Paul: The American Phytopathological Society

Klich, M. A (2002) Identification of Common *Aspergillus* species. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelauteurs

Lima AKS, Rodrigues JR, Souza IS, Rodrigues JC, Souza TC, Maia C. R.; Fernandes OCC (2017) Fungos isolados da água de consumo de uma comunidade ribeirinha do médio Rio Solimões, Amazonas-Brasil: potencial patogênico. *Rev. Ambient. Água* 12(6). <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2018>

Liu X, Kokare C (2017) Microbial Enzymes of Use in Industry. *Biotechnology of Microbial Enzymes* 267-298. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>

Magnago RF, Garcia GD, Marques DV, Predroso ID, Hermann KAC, Pereira NRL, Mazon SP, Costa SC (2019) Combustíveis sólidos a partir de biomassa residual de borra de café, casca de arroz e casca de batata. *Mix Sustentável, Florianópolis* 5(2). <https://doi.org/10.29183/2447-3073.MIX2019.v5.n2.43-53>

MARKERTS RESEARCH REPORT. **Lipase**, 2020. Disponível em: <<https://www.marketresearch.com/Global-Industry-Analysts-v1039/Lipase-14376630/>>. Acesso em: 10.05.2021.

Marzo, C, Diaz AB, Caro I, Blandino A (2019) Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. *Waste Management and Research* 37(2):149-156. Doi: [10.1177/0734242X18798699](https://doi.org/10.1177/0734242X18798699)

Mehta A, Guleria S, Sharma R, Gupta R (2021) The lipases and their applications with emphasis on food industry. *ScienceDirect* 143-164. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819813-1.00006-2>

Melani NB, Tambourgi EB, Silveira E (2020) Lipases: From Production to Applications. *Separation & Purification Reviews* 49(2). <https://doi.org/10.1080/15422119.2018.1564328>

Monteiro VN, Silva RN (2009) Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. Revista de Processos Químicos 3(5):9-23

Nagarajan S (2012) New tools for exploring “old friends-microbial lipases”. Appl Biochem Biotechnol 168(5). Doi: [10.1007/s12010-012-9849-7](https://doi.org/10.1007/s12010-012-9849-7)

Nascimento WCA, Silva CR, Carvalho RV, Martins MLL (2007) Otimização de um meio de cultura para produção de proteases por um *Bacillus* sp. Hemofílico. Ciênc. Tecnol. Aliment 27(2):417-421. Doi: [10.1590/S0101-20612007000200035](https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000200035).

Nakasato K, Ono T, Ishiguro, T, Takamatsu, M, Tsukamoto, C, Mikami M (2007) Rapid quantitative analysis of the major components in soymilk using Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). Food science and technology research 10(2):137-142. <https://doi.org/10.3136/fstr.10.137>

Norlia M, Jinap S, Nor-Khaizura MAR, Son R, Chin CK, Sardjono (2018) Polyphasic approach to the identification and characterization of aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section Flavi isolated from peanuts and peanut-based products marketed in Malaysia. International journal of food microbiology 282:9-15. Doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.030](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.030)

Oliveira NML, Vieira-Almeida EC, Silva LP, Paula CBC, Bastos LTA, Lima ACM, Santos I L, Paula-Elias FC, Almeida AF (2020) Lipases microbianas: Bioprocessos e aplicações industriais. Editora Poisson 5

Pereira AS, Fontes-Sant’ana GC, Amaral PFF (2019) Mango agroindustrial wastes for lipase production from *Yarrowia lipolytica* and the potential of the fermented solid as a biocatalyst. Food and Bioproducts Processing 15:68-77. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.02.002>

Pinheiro LR, Ambrozim FM, Oliveira VM (2019) Produção de celulases por fermentação em estado sólido a partir de resíduos agroindustriais. Brazilian Journal of Development 5(10):19056-19060. Doi: [10.34117/bjdv5n10-140](https://doi.org/10.34117/bjdv5n10-140)

Pitt JL, Hocking AD (1997) Fungi and food spoilage. Cambridge: Chapman & Hall

Putri DN, Khoutama A, Perdani MS, Utami TS, Hermansyah H (2020) Optimization of *Aspergillus niger* lipase production by solid state fermentation of agro-industrial waste. Energy Reports 6(1):331-335. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2019.08.064>

Reis TA, Baquião AC, Ataydea DD, Grabarz F, Corrêa B (2014) Characterization of *Aspergillus* section Flavi isolated from organic Brazil nuts using a polyphasic approach. Food Microbiol 42: 34–39. Doi: [10.1016/j.fm.2014.02.012](https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.012)

Rodrigues JGC, Gurgel RS, Oliveira RL, Albuquerque PM, Junior SD (2019) Produção de celuloses por actinobactérias cultivadas em diferentes substratos. Brazilian Journal of Development 5(7):10636-10646. Doi: [10.34117/bjdv5n7-206](https://doi.org/10.34117/bjdv5n7-206)

Rodrigues P, Venâncio A, Kozakiewicz Z, Lima N (2009) A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section Flavi isolated from Portuguese almonds. Int. J. Food Microbiol. 129(2):187–193. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.023>

Sadh PK, Duhan S, Duhan JS (2018) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. Bioresour. Bioprocess 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>

Samson RA, Houbraken J, Varga J, Frisvad JC (2009) Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssosclamyces* and its *Paecilomyces* anamorphs. Persoonia 22:14–27

Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC (2004) Introduction to food-and airborne fungi. Editora: Centalalbureau voor Schimmelcultures

Samson RA (1974) *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. Studies in Mycology. 1–119

Silva IL, Silva LAO, Coelho CBB (2019) The Brazilian Caatinga Biome and its Biotechnological Potential. Advances in Applied Science and Technology 5: 123-142

Silva DM, BATISTA LR, REZENDE EF, FUNGARO MH, Sartori D, Alves E (2011) Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section Nigri using polyphasic taxonomy. Brazilian Journal of Microbiology 42(2):761-773. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000200044>

Soares CMF, Castro HF, Moraes FF, Zanin GM (1999) Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. Applied Biochemistry and Biotechnology 79(77):745-757

Souza CAF, Lima DX, Oliveira RJV, Gurgel LMS, Santiago ALCM (2017) Coprophilous Mucorales (Zygomycota) from three areas in the semi-arid of Pernambuco, Brazil. Brazilian journal of microbiology 48(1):79-86. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.008>

Souza CAF, Lima DX, Oliveira RJV, Gurgel LMS, Santiago ALCM (2016) *Mucor indicus* isolated from the semiarid region of Brazil: a first record for South America. Mycotaxon 131(4):897-906. Doi:[10.5248/131.897](https://doi.org/10.5248/131.897).

Soccol CR, Costa ESF, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, Vandenberghe LPS (2017) Recent developments and innovations in solid state fermentation. Biotechnology Research and Innovation 1:52-71

Schipper MAA (1978) On certain species of *Mucor* with a key to all accepted species. Studies in Mycology 17:l-53

Sherf AF (1943) A method for maintaining *Phytophthora septentrionalis* for long periods without transf. Phytopathology 33:30-32

Toscano L, Monteiro G, Stoycotcheva M, Gochev V, Cervantes L, Campbell H, Zlatev R, Valdez B, Pérez C, Gil-Samaniego M (2013) Lipase production through solid-state fermentation using agro-industrial residues as substrates and newly isolated fungal strains. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 27(5):4074-4077. <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2012.0145>

Tripathi BC, Yadav P, Sharma R (2020) Microbial Enzymes in Food Industry: Applications. Journal of Critical Reviews 7(9):1418-1422

Trufem SFB (1981) Mucorales do Estado de São Paulo. 1. Gênero *Mucor* Micheli. Rickia

Varga J, Frisvad JC, Samson RA (2011) Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section Flavi. Stud. Mycol 69:57-80. Doi: [10.3114/sim.2011.69.05](https://doi.org/10.3114/sim.2011.69.05)

# **CAPÍTULO III**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os cinco isolados *Aspergillus flavus* UCP 0316, *Aspergillus fumigatus* UCP 0327, *Paecilomyces variotii*, UCP 0334, *Mucor hiemalis* f. *luteus* UCP 0343 e *Aspergillus foetidus* UCP 0360 foram capazes de crescer e produzir lipases em resíduo de borra de café;
- No entanto, *A. foetidus* apresentou maior atividade enzimática. Tendo a melhor condição para produção de lipase em umidade de 50%, temperatura a 37 °C e concentração do substrato de 25 g;
- A borra de café se mostrou um substrato promissor, para produção de lipase em fermentação em estado sólido, como alternativa para diminuição dos custos do processo;
- Este bioprocessamento mostrou-se eficiente e sustentável;
- Este trabalho demonstrou a valorização dos substratos agroindustrial atendendo aos requisitos da bioeconomia circular, transformando o descarte (borra de café) em matéria-prima para o desenvolvimento de um meio de cultura e para produção de lipase.
- Contribuiu para a redução da poluição do meio ambiente, uma vez que utilizou descarte da produção da bebida do café (borra de café) para crescimento do micro-organismos para produção da enzima.